

Magyar–német (TKA–DAAD) kutatócsere projekt

Záró beszámoló

A projekt adatai:

Nyilvántartási szám: 65134

Projektcím: Peszticid vegyületek kardiovaszkuláris hatásának vizsgálata zebraadánián – a káros hatások és halembrió biotesztek fejlesztésének jelentősége

Magyar projektvezető neve: Dr. Csenki–Bakos Zsolt Imre

Magyar intézmény neve: Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéke

Német projektvezető neve: Dr. Stefan Scholz

Német intézmény neve: UFZ (Helmholtz – Zentrum für Umweltforschung)

Támogatási időszak: 2015–2016

A. A projektidőszakban elvégzett munka összefoglalása (max. 2 oldal)

Az együttműködés keretében több peszticid vegyület kardiovaszkuláris hatását vizsgáltuk, valamint a vizsgálatok egy részét képező új szívritmus monitorozó készülék módszerfejlesztését végeztük el ezen peszticid anyagokkal. A környezetbe kerülő szennyezőanyagok közül kiemelkedő jelentőségűek a peszticidek, amelyek alkalmazása az emberi életminőség javításának elősegítésére szolgál. A világon a peszticid–hatóanyagok mennyisége folyamatosan növekszik. Világviszonylatban az elmúlt 3 évtizedben a peszticidek felhasználása mintegy négyszeresére emelkedett (Lehel & Laczay. 2011). A peszticidek zavart okozhatnak az ideg-, immun-, szív- és érrendszerben, légzőszervi, vese elváltozásokat okozhatnak, illetve befolyásolhatják a szaporodásbiológia folyamatokat (Mostafalou & Abdollahi 2013, Mastin 2005). A peszticid kitétség hatására bizonyos krónikus betegségek előfordulásának valószínűsége növekszik. Megfigyelhető, hogy a peszticid kitétség befolyásolhatja a cukorbetegség, a Parkinson-kór, Alzheimer-kór, sclerosis multiplex, a daganatos betegségek, a szív- és érrendszeri és krónikus vesebetegségek kialakulásának gyakoriságát (Abdollahi et al. 2004, De Souza et al. 2011, Mostafalou & Abdollahi, 2012).

A kísérletekhez használt peszticidek a 2,4–D; chlorpyrifos; bendiocarb; propranolol (pozitív kontroll); és a verapamil (negatív kontroll) voltak

Az általunk választott vegyületek toxikológiai vizsgálata több okból is fontos. Egyrészt a humán kitétség miatt meg kell ismerni mind az akut, mind a krónikus hatásokat, másrészt ökológiai szempontból is fontos vizsgálni az adott anyagokat, hiszen a vegyülettel már kis

koncentrációban kapcsolatba kerülő élőlények vitalitása csökkenhet, ami nemcsak egyed, hanem populációs szinten is problémát jelenthet.

Napjainkban egyre több vegyület kerül a környezetbe, amelyekről gyakran a szigorodó szabályozások ellenére, a klasszikusnak számító LC50, LC10, NOEC, LOEC értékeken kívül pontosabb ismerettel nem rendelkezünk. Ennek következtében előfordulhat, hogy már a környezetben megtalálható anyag toxikus hatására csak későn derül fény.

A hal, mint modellszervezet kiváló alanya a különböző toxikológiai vizsgálatoknak. A „klasszikus” eljárások mellett, a komplex ökotoxikológiai rendszereknek is fontos résztvevője, hiszen teljes életciklusát a vízben tölti. A potenciálisan kardiovaszkuláris toxicitást mutató vegyületek tanulmányozására is kifejezetten alkalmas, mivel a szívműködést befolyásoló alapvető élettani folyamatok a halakban nagyrészt megegyeznek az emlősökével.

A halmodellek közül is kiemelkedő jelentőséggel bír a zebradánió (*Danio rerio*). Mint modell szervezetet, régóta használják a szív fejlődésének és a különböző vegyületek kardiotoxikus és szívműködést befolyásoló hatásának tanulmányozására.

A munkaelőzményeként a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéke a 2,4-D, chlorpyrifos, deltamethrin peszticidek és a propranolol vegyület szívritmusra gyakorolt hatását már tesztelte 48 hpf korú zebradánión rövid kitettséggű (1h) vizsgálattal. A német fél, pedig rendelkezett eredményekkel a verapamil anyagról.

Első lépésként a range finding és FET tesztek végeztük el, melyek eredményei alapján megállapítottuk az LC50, LC10, NOEC és LOEC értékeket. Ezek szolgáltak alapul a krónikus tesztekhez, valamint a német partnernél fejleszteni kívánt szívritmus monitorozó készüléken végzett vizsgálatokhoz. A tesztek az OECD Guideline for Testing of Chemicals No 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (adopted 26th July 2013) alapján végeztük el. Az eredmények tükrében a német félnél a chlorpyrifos, propranolol és verapamil szívre gyakorolt hatását 48 hpf és 96 hpf lárvákon vizsgáltuk az ott rendelkezésre álló VAST Biomager™ készülékkel.

A készülékbe 2 és 7 nap közötti korú zebradánió lárvákat lehet vizsgálni egy kapilláris rendszerben. A működése teljesen automatizálható és kiegészítő mikroszkóp is integrálható hozzá a további megfigyelésekhez. A módszer lényege, hogy a VAST Biomager™ pozícionálja a lárvákat a beállított paraméterek alapján és fényképet illetve videót is készít a vizsgált területről vagy az egész halról. Az embriók behívása történhet 50ml-s csőből vagy 96 lyukú lemezről, ahol megadhatjuk a felszívás sorrendjét is.

A 2015-ös év során elsődleges feladatunk az volt, hogy sztenderdizáljuk a rendszert és hatékony, megfelelő behívási programot alakítsunk ki. Ehhez meghatároztuk az inkubálási időintervallumokat (pl. mennyi idő kell különböző tartóedényekből történő beszíváshoz, egy lárvá mennyi ideig maradhat a kapillárisban, milyen mértékű legyen az altatás, mennyire hígul a tesztoldat a kapilláris rendszerben stb.). Ezután következhetett az előkísérletek során meghatározott koncentrációkban kezelt lárvákkal az éles mintákat vizsgálata. A rögzített képeket és videókat KNIME® Analytics Platform segítségével értékeltük ki, amely egy nyílt forrás kódú több statisztikai és elemző programot integráló software.

Ezek mellett LMR (Locomotor Response) viselkedés vizsgálatokat is végeztünk ViewPoint Behavior Technology ZebraBox Revolution készüléken. A toxicitás számos végponttal mérhető az állatmodellek esetén, amik közül a leggyakoribb még mindig a mortalitás, viszont egyre jobban előtérbe kerülnek a szub-letális hatásokra visszavezethető, a természetes populációk sűrűségében, vagy biokémiai, reprodukciós, fiziológiai és a viselkedésbeli változások is. Az állatok számos tevékenysége mérhető a viselkedés toxikológiában függetlenül attól, hogy az abnormalitásokat kémiai vagy fizikai ágensek okozzák.

2016 tavaszán, egyeztetések után német fél részéről David Leuthold érkezett a gödöllői laborba FELS (OECD Guideline for testing of chemicals Fish, Early-life Stage Toxicity Test 210 (adopted by the concil on 26th July 2013) tesztek végzésére.

A vizsgálatok Aldicarb és APM (Azinphos-methyl (Guthion)) anyagokkal történtek. A tesztek célja korai életszakaszban lévő halak különböző koncentrációiban történő vizsgálata, melyből az anyag krónikus hatását állapítjuk meg. A vizsgálatot fél-statisztikus körülmények közt végeztük. A teszt megtermékenyített ikrák kezelésével kezdődött és 33 napig tartott. A letális és szubletális hatásokat értékeltük és összehasonlítottuk a kontroll értékekkel, amiből meg tudtuk állapítani a megfigyelt legalacsonyabb koncentrációt, ami hatással bírt és egyúttal azt a koncentrációt, ahol nem figyeltünk meg hatást (NOEC és LOEC értékek). A teszt végén a túlélő egyedek nedves és száraz testtömegét, valamint testhosszát mértük.

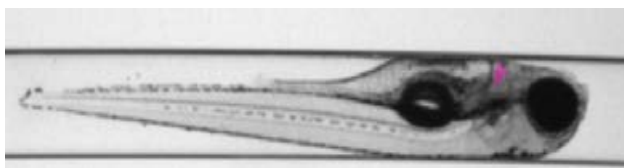
A korai életszakasz teszt mellett szintén végeztünk viselkedés vizsgálatokat is, továbbá enzimaktivitás vizsgálatokat is folytattunk.

A 2,4-D és chlorpyrifos vegyületekkel szívritmus méréseket, valamint függeszkedés, sötét-világos preferencia és szín preferencia viselkedés vizsgálatokat is végeztünk.

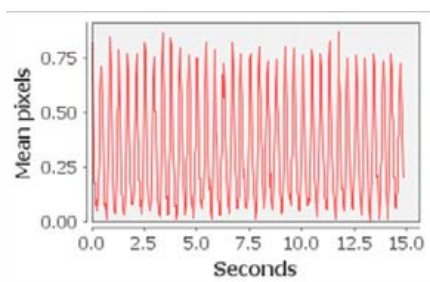
B. A közös projekt eredményei (max. 2 oldal)

Halembriókról készített videofelvételek alkalmasak arra, hogy utána egy másodlagos program segítségével kielemezzük a szívverést. Ezen 15 másodperces videók elemzését KNIME Analytics Platform program segítségével végeztük. Az elemzés elve azon alapul, hogy a program automatikusan felismeri azt a régiót, ahol a mozgás miatt pixel változások vannak. Ez a pixel változások rész a mi esetünkben a szív régiójában van. A program a pixelváltozást elemzi, majd Fourier-transzformációval meghatározza a szívfrekvenciát. (1. ábra). A Fourier-transzformációt R script program segítségével végeztük és azt integráltuk a KNIME program munkafolyamataiba.

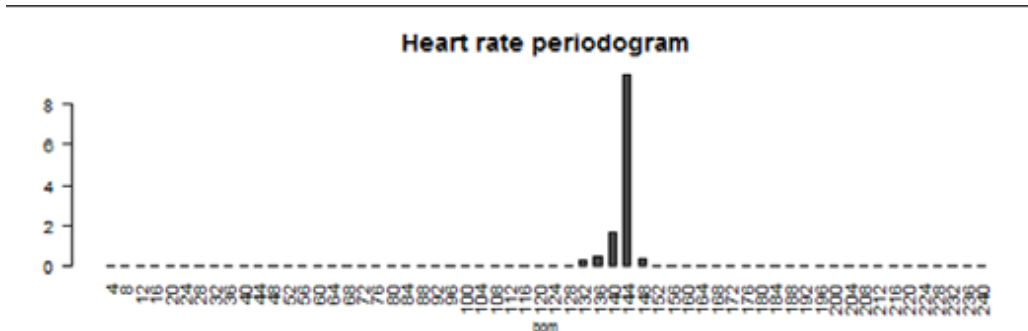
A



B



C



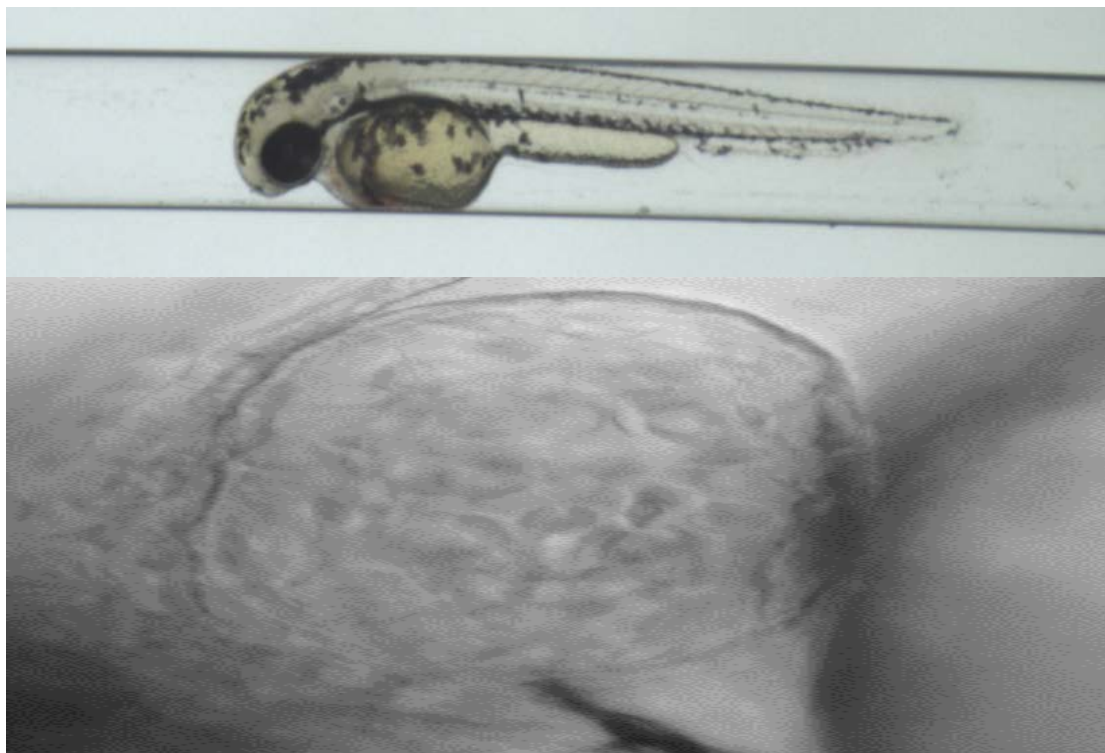
1. Ábra: Grafikus ábrázolása az automatikus szívverés felismerés és frekvenciává alakítás elvének KNIME Analytics Platform programmal. A – Videofelvétel az embrióról egy üveg kapillárisban, ami automatikusan lokalizálja a szív régiót (lilán jelölve). B – időbeli ábrázolása a pixelek változásoknak a szív régióban. C – A Fourier transzformáció diagramja, ami megadja a szívfrekvenciát

Chlorpyrifos

A neurotoxikus és kardiotoxikus hatás vizsgálatához 0,5; 1; 1,5; 3 és 5 mg/L-es töménységű oldatokat állítottunk elő. Az eredmények alapján egyértelmű neurotoxikus hatás mutatkozott mindhárom 96 órás korban elvégzett viselkedésvizsgálatnál. A függeszkedés vizsgálat esetében a két legmagasabb, a sötét-világos vizsgálatnál pedig a legmagasabb koncentráció és a kontroll csoport között szignifikáns különbséget tapasztaltunk. A színpreferencia teszteknel szintén változott a nagyobb töménységű oldatokkal kezelt lárvák színpreferenciája a kontrollhoz képest. Az embriók pulzusszáma a három legmagasabb koncentráció esetében emelkedett szignifikáns mértékben a kontroll csoporthoz képest.

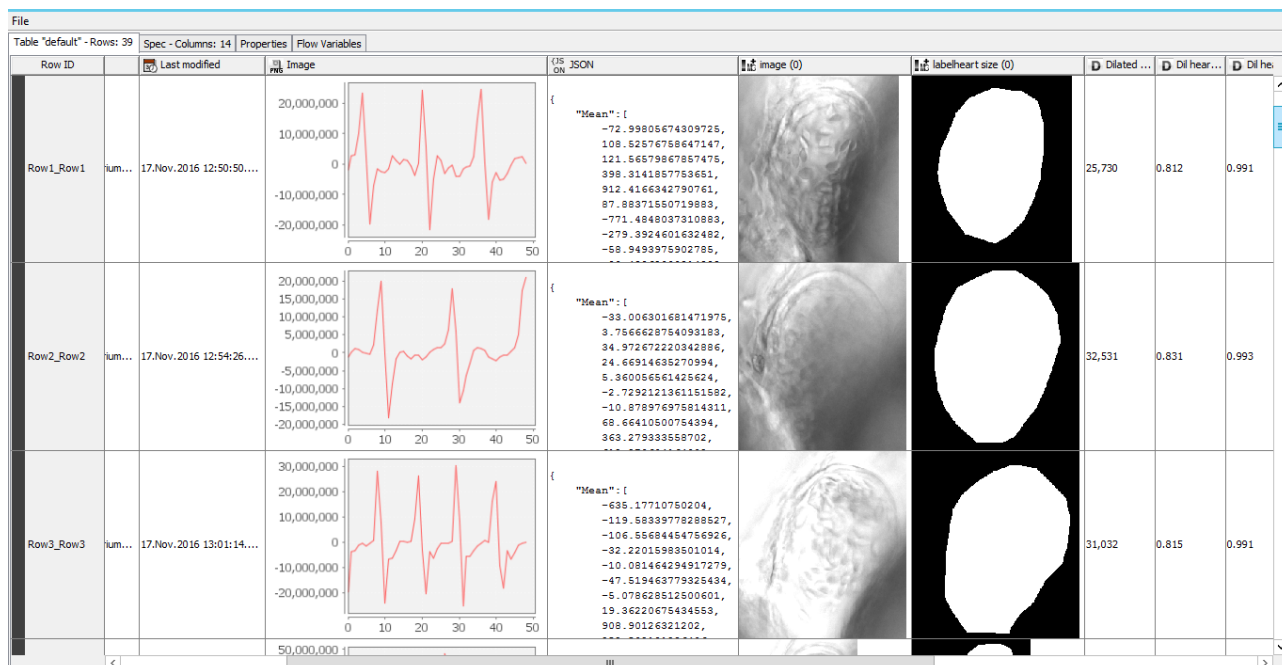
Mindezek alapján kijelenthető, hogy a chlorpyrifos a zebradánióra neurotoxikus és kardiotoxikus hatással is bír.

A német félnél fejlesztés alatt áll egy szívösszehúzódást is elemző módszer, melyet a projekt utolsó etapjában teszteltünk a chlorpyrifos anyaggal. A módszer lényege, hogy külön kell videót készíteni a pitvarról és a kamráról is a megadott paraméterekkel. A 2. ábrán látható a VAST kapillárisában pozícionált 48 hpf lárva, valamint a pitvaráról készült kép.



2. Ábra VAST kapilláris felvétel és Leica 40x-es nagyítású pitvar felvétel

A felvételeket szintén KNIME programban létrehozott „workflow”-val elemeztünk. (ábra. 3.). A program riportjában minden szívről megkapjuk a pitvar illetve kamara méretét, a pixelváltozásokon alapuló szívfrekvenciát és az összehúzódások mértékét. Ezen értékekre átlagot is számol.

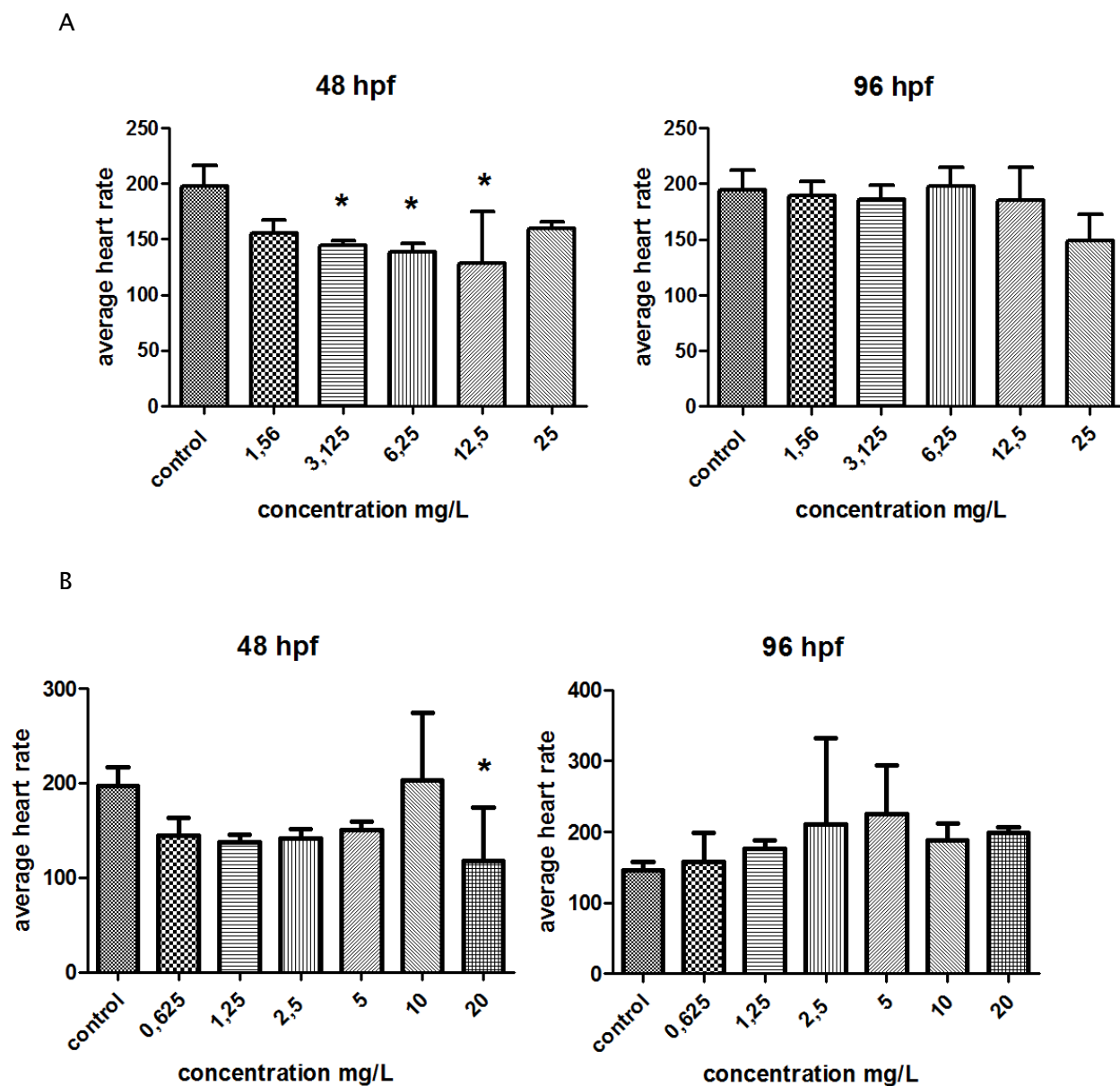


3. Ábra KNIME riport szívkonstrukcióra.

Verapamil, bendiocarp és propranolol

A verapamil egy kalciumcsatorna blokkoló, amely csökkenti a szívfrekvenciát és a vérnyomást. A bendiocarp egy acetilkolinészteráz-gátló, ami reverzibilisen kötődik és szintén szívverés csökkentő hatással bír. A propranolol, pedig egy béta-blokkoló, a béta-adrenerg receptorokat blokkolja. Ilyen receptorok vannak a szimpatikus idegrendszerben és a szívizomsejtekben is. A gátlás révén csökkenti a szívverést és megváltoztatja a nyugalmi rátát.

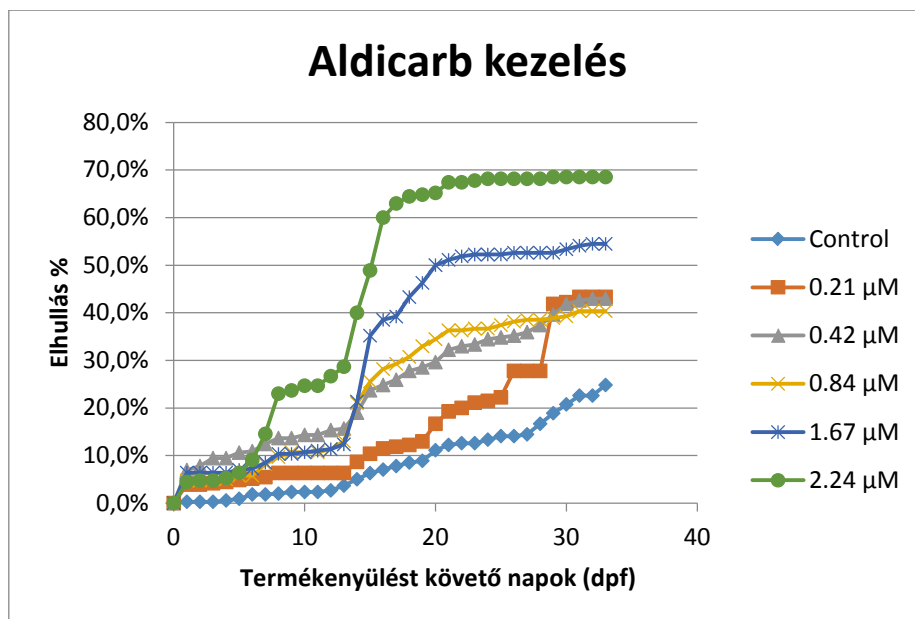
A kontrollként használt verapamil és a bendiocarb eredményeit a 4. ábrán láthatók, ami összhangban van az anyagok hatásmechanizmusával, különösen a verapamil esetén látható, hogy csökkentette a szívverést. Azonban ezen mérések még a módszer optimalizálásakor készültek és itt a számított eredmények még nagy változatosságot mutatnak. Miután sikerült a hőmérsékletet is stabilizálni és a mérési módszert optimalizálni már nem kaptunk ilyen mértékű szórást.



4. ábra: A szívverések átlagos frekvenciája A verapamil és B bendiocarb esetén különböző kezelési időkben

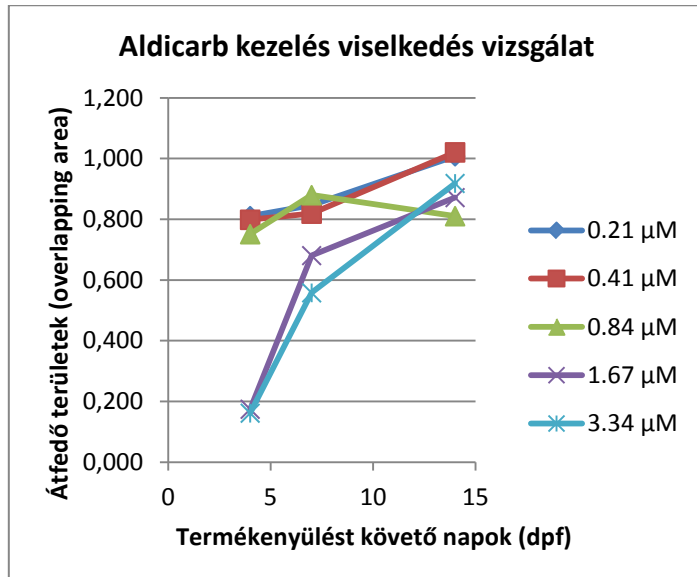
Aldicarb

Aldicarb tesztek arra irányultak, hogy a halak érzékenységét vizsgáljuk korai életszakaszban és kielemezzük a növekvő elhullás mögött, milyen növekvő érzékenység és hozzá kapcsolható mechanizmus áll (pl. különböző acetilkolinészteráz-gátlás). Elsőként a mortalitást néztük (5. ábra) ahol a 14. napon tapasztaltuk a legnagyobb elhullást.



5. Ábra Aldicarb mortalitás

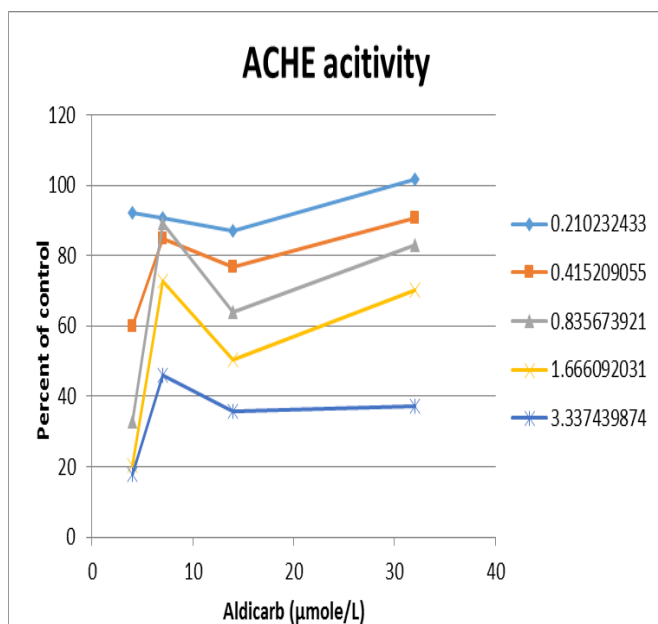
Aldicarb viselkedés vizsgálat (LMR) során az idő előrehaladtával az egyedek kevésbé voltak érzékenyek a fényingerekre. Ez valószínűleg az AChE gátlás miatt van, ami szerepet játszik az oxigén felvételben is. Azok a halak, amelyek kevésbé mozogtak és amelyek 14 napos korban elpusztultak valószínűleg emiatt a gátlás miatt megfulladtak.



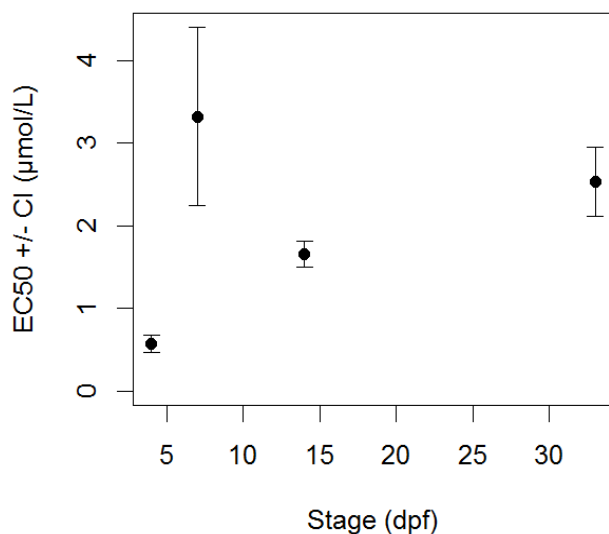
6. Ábra Az LMR vizsgálatok 4, 7, 14 dpf korban aldicarb anyaggal.

A korai életszakasz vizsgálat végén mind testtömeget mind testhosszat is mértünk.

A kezelés során mintákat tettünk el enzimaktivitás mérésére is. Az acetilkolinészteráz enzim aktivitása illetve a vizsgálati anyag általi gátlásának mértékét a következő ábra mutatja.



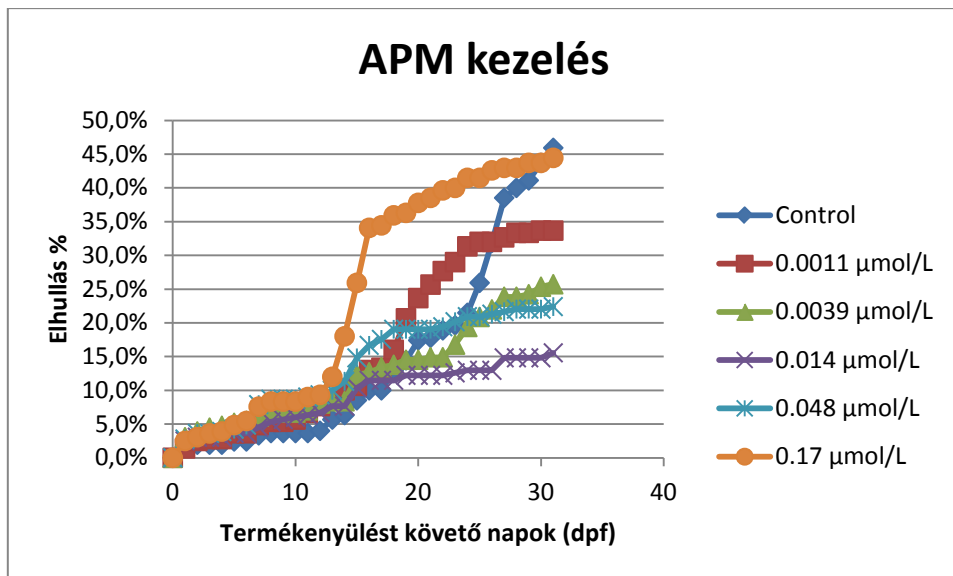
Aldicarb ACHE inhibition



7. Ábra Enzim aktivitás és annak gátlása

APM (Azinphos-methyl)

A kontrollba is magas volt az elhullás, ezért csak a két legtöményebb koncentrációt vettük figyelembe (8. ábra). Az eredmény hasonló volt az aldicarbéhoz, vagyis 14 dpf-s korban megemelkedik a pusztulás. Az AChE gátlás csak 50% volt a legmagasabb koncentrációban. Így elmondható, hogy az elhullás 70–90% -át okozta csak a gátlás.

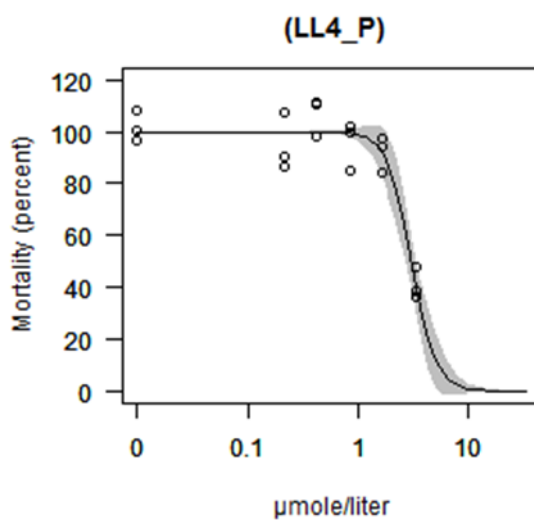
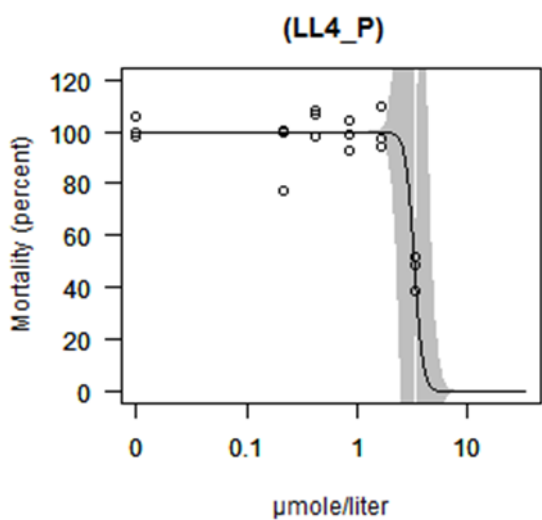


8. Ábra Időbeni elhullás APM kezelés hatására

APM enzimgátlása és abból következő elhullás 4, 7, 14 és 33 napos korban vett minták alapján a következőképp alakultak (9. ábra).

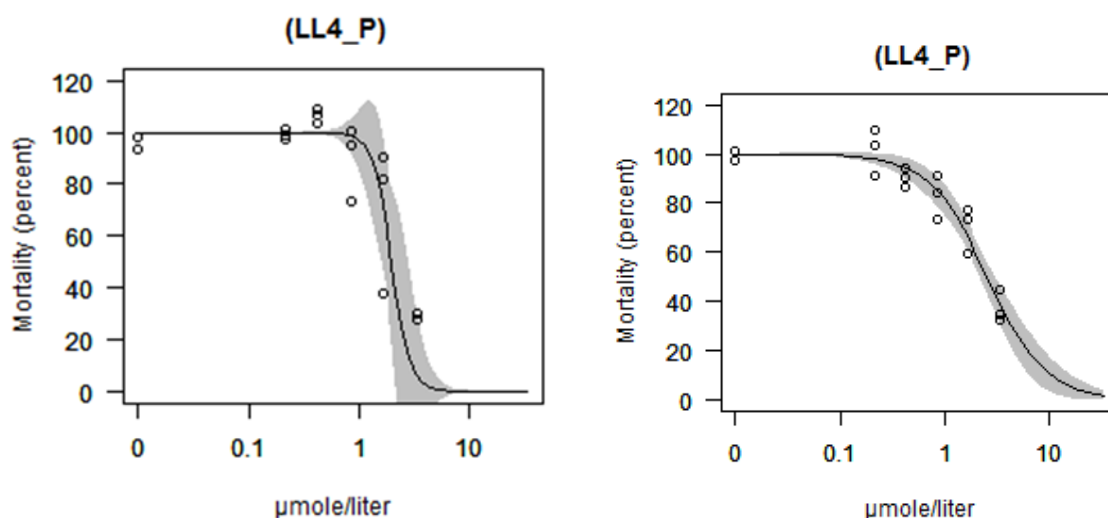
4dpf

7 dpf



14 dpf

33 dpf



9. Ábra ACHE gátlás és mortalitás alakulása APM kezelésre

2,4-D

Vizsgálatainknak elsődleges célja volt a 2,4-D hatásának megfigyelése zebradánió embriók és lárvák viselkedésére és szív működésére a korábban elvégzett akut toxicitás tesztek alapján. A kísérlet során 120 órán keresztül különböző koncentrációjú (12,5; 8; 5,5; 4; 2,5 mg/l) oldatokkal kezeltük a zebradánió embriókat. Naponta mikroszkóp segítségével dokumentáltuk a fenotípusos elváltozásokat és a mortalitást. A 48 órás lárvák szívéről videó felvételeket készítettünk, melyeket manuálisan elemeztünk ki, majd a 96 órás korú lárvák viselkedését színpreferencia, sötét-világos és függeszkedés tesztekkel tanulmányoztuk.

A viselkedésvizsgálatok eredményei alapján a színpreferencia és sötét-világos tesztek eseteiben nem tapasztalhattunk statisztikailag igazolható különbségeket az egyes 2,4-D-vel kezelt egyedek aljzat szín és sötét-világos preferenciájában. A függeszkedés teszt eredményei nem mutattak szignifikáns különbséget az egyes kezelések és a kontroll között. A 8 és a 12,5 mg/l-rel kezelt halak pulzusszáma szignifikánsan nőtt mindkét kontroll csoporthoz képest. Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a 2,4-D kezelés a kezelt hal lárvák viselkedését nem befolyásolta, ugyanakkor a halak szív működésére hatással volt.

C. Az együttműködés további szempontjai: (max. 3 oldal)

1. Mennyiben alapulnak a projekt elért eredményei a német–magyar együttműködésen?

A projekt nagy része és annak eredményei az együttműködésen alapultak, a két fél a pályázatban leírt munkatervben szereplő vizsgálatok csak egymás segítségével tudták elvégezni. A munkák kölcsönös módszer, eszköz és információ transzferen keresztül valósultak meg.

2. Hogyan befolyásolta a támogatás a projekt előmenetelét?

A projekt előmenetelét nagymértékben segítette mind szakmai, mind anyagi szempontból. Magyar kutatók a német félnél rendelkezésre álló műszerekkel olyan vizsgálatokat is el tudtak végezni, amelyek a projekt nélkül nem valósulhattak volna meg, ezzel pedig a peszticid vegyületek kardiovaszkuláris hatásainak jobb megismerését tették lehetővé. A német félnek olyan akut és szubkrónikus haltesztek, illetve enzimmérések elvégzését biztosítottuk, amelyre a saját intézetükben nincs lehetőségük. Az eredmények szintén a vizsgált anyagok hatásainak pontosabb leírását segíti elő.

Hogyan csatlakozott a második évi munka az első év eredményeihez?

Az első évben elvégzett vizsgálatok alapjaitul szolgáltak a második évi munkáknak. A 2015-ben kapott eredmények tükrében tudtuk folytatni és tervezni a munkákat.

3. Milyen szempontból volt jelentős a projekt a fiatal kutatók tapasztalatszerzése, szakmai fejlődése szempontjából?

A projekt során 5 magyar és 2 német fiatal kutató kolléga szakmai utazásai valósultak meg. A projekten szerzett tapasztalatok, az új technikák megismerése és a senior kollégákkal tartott konzultációk jelentős szakmai fejlődést nyújtottak mindkét fél résztvevőinek. Az eredményeket a fiatal résztvevők a doktori munkájuk elkészítéséhez is felhasználhatják a közeljövőben.

4. Sorolja fel azokat a hazai vagy külföldi tudományos közleményeket és publikációkat, amelyek az együttműködés eredményeként jelentek meg!

Csenki Zsolt, Bakos Katalin, Kovács Róbert, Ferincz Árpád, Czimmerer Zsolt, Reining Márta, Urbányi Béla (2016) Transzgenikus biomarker zebradánió (*Danio rerio*) vonalak potenciális alkalmazása a toxikológiában TOX'2016 konferencia, Hajdószoboszló 2016 október 12–14.

Gyöngyi Gazsi, Lilla Fabi, Viktória Kellner, Róbert Kovács, Edina Garai, Erna Balogh, Szilvia Ráth, Árpád Ferincz, Zsolt Csenki, Zsolt Czimmerer, Béla Urbányi, Ferenc Baska, Márta Reining (2016): Investigation of fluoride ion oxidative and ossification effect on zebrafish, Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology conference, Aulnay-sous-Bois/Paris

Gyöngyi Gazsi, Flóra Kerekes, Benjamin Bálint, Márta Reining, Edina Garai, Erna Balogh, Szilvia Ráth, Árpád Ferincz, Zsolt Csenki, Zsolt Czimmerer, Béla Urbányi, Róbert Kovács (2016): Cardiovascular and neurotoxicity effects of the 2,4-D and chlorpyrifos on zebrafish with acute exposure Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology conference, Aulnay-sous-Bois/Paris

Urbányi, B., Kovács, R., Bakos, K., Ferincz, Á., Csenki, Zs. (2015): Vízi ökotoxikológiai tesztrendszerek és potenciális alkalmazhatóságuk különböző szennyezők vizsgálatára, TOX'2015 Konferencia, Harkány 2015 október 14–16.

Róbert Kovács, Gyöngyi Gazsi, Márta Reining, Katalin Bakos, Ádam Appl, Doi Thi Vuong, Pham Thai Giang, Dóra Bencsik, György Grosz, Stefan Scholz, Éva Fetter, Julia Ortmann, Ferenc Baska, Béla Urbányi, Zsolt Csenki (2015) A complex study of fluoride cardiotoxic and neurotoxic effects on zebrafish. The 9th European Zebrafish Meeting, 2015. június 28– július 2. Oslo, Norvégia p.52.

Bencsik D., Urbányi B., Hajós Zs., Reining M., Bakos K., Appl Á. J., Rácz G., Szende B., Gazsi Gy., Kövesi J., Ferincz Á., Kovács R., Csenki Zs. (2015) Az ivóvíz minőségét befolyásoló tényezők víztoxikológiai vizsgálatának lehetőségei és irányvonlai XXXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás Szarvas p. 42.

Gazsi Gyöngyi, Kovács Róbert, Appl Ádám János, Csepeli Andrea, Ferincz Árpád, Bencsik Dóra, Garai Edina, Kövesi Judit, Reining Márta, Csenki Zsolt Imre, Urbányi Béla (2015): Akut fluorid terhelés hatása zebra-dánió (*Danio rerio*) embriók szív működésére HAKI napok, Szarvas

A munkák eredményeiből az alábbi hallgatók készítettek diploma és tudományos diákköri dolgozatot a pályázatban résztvevő kollégák témavezetésével: Pesti Mónika (védés 2017), Tarnavölgyi Gáspár Levente (TDK és diploma 2016), Kerekes Flóra (TDK és diploma 2016)

A kapott eredményekből nemzetközi IF-os közleményeket készítünk, melyek beküldése, illetve elfogadása a 2017-es évben várható.

5. Milyen akadályokat vagy problémákat érzékelt a projekt végrehajtása során?

A projekt során semmiféle akadály illetve probléma nem merült fel. A projekt koordinátora mindenben a segítségünkre volt és mielőtt az esetleges hiba kialakulhatott volna felhívta a figyelmünket és minden információval a rendelkezésünkre állt.

6. Mi a legjelentősebb szakmai eredmény, amit kiemelne a projekt együttműködés kapcsán?

A korai életszakasz vizsgálattal a német partner fiatal kutatója olyan módszert sajátított el, amire Németországban nincs lehetősége. Ennek a módszernek a használata hozzájárult ahhoz, hogy kutatásaikat olyan eredményekkel tudták kibővíteni, mellyel publikálási impaktjukat növelhetik.

A hazai kutatóknak lehetősége volt egy olyan új szívvizsgálati módszert használniuk a munkájuk során, melyet saját fejlesztésű rendszereikkel szinkronba tudnak hozni.

Az tesztelt anyagokkal kapott eredmények, illetve a közösen összehangolt vizsgálati rendszerek alapján a közeljövőben várható, hogy a két fél közös EU-s kutatási pályázatban is részt fog venni.

7. Van-e olyan javaslat, amivel módosítaná a pályázati felhívás és végrehajtás szempontjait a jövőre nézve?

-

