

Víztisztítási reakció-melléktermékek toxikus, mutagén és karcinogén hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* rendszereken

Doktori értekezés

Dr. Rác Gergely István

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szende Béla egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Sótonyi Péter Tamás, D.Sc. egyetemi tanár
Dr. Glasz Tibor Ph.D. egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly D.Sc. egyetemi tanár,
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kéry Ágnes Ph.D. egyetemi docens
Dr. Tóth Erika Ph.D. főorvos

**Budapest
2014**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Gyakoribb rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	3
1.1. Irodalmi háttér	3
1.2. Az ivóvíz kezelése	4
1.3. Az ivóvíz fertőtlenítése.....	5
1.4. A fertőtlenítés melléktermékei	11
1.5. Oldott szerves anyagok (Dissolved Organic Material - DOM).....	13
2. Célkitűzések	17
3. Anyagok és Módszerek	18
3.5. <i>In vitro</i> vizsgálatok	25
3.6. <i>In vivo</i> vizsgálatok	33
4. Eredmények	39
4.1. A vízminták klór-, ózon- és szerves széntartalmának mérési eredményei	
4.2. <i>In vitro</i> vizsgálatok I.: Kezeletlen vízminta mutagén aktivitása	39
4.3. <i>In vitro</i> vizsgálatok II. A kezelt vízminta mutagén aktivitása	42
4.4. <i>In vitro</i> vizsgálatok III.: Apoptotózis indukció a vízkoncentrátumok hígítási sorával.....	49
4.5. <i>Analitikai kémiai vizsgálatok</i> : szerves mikroszennyezők azonosítása	52
4.6. <i>In vitro</i> vizsgálatok IV.: Comet-teszt a CDBP-vel és a kiválasztott vegyülettel: 2,4-difluoroanilin és a 4-etilbenzaldehyd	53
4.7. <i>In vitro</i> vizsgálatok V.: Apoptózis indukció a két kiválasztott vegyülettel: 2,4-difluoroanilin és a 4-etilbenzaldehyd	54
4.8. <i>In vivo</i> vizsgálatok: Zebradánió toxicitás	56
5. Az eredmények megbeszélése	62
5.1. Kezeletlen és tisztított víz <i>in vitro</i> mutagenitásának vizsgálata AMES-tesztel .	62
5.2. Ivóvíz-tisztítási melléktermékek <i>in vitro</i> apoptózis indukáló képessége.....	65
5.3. Víz tisztítási melléktermékek vizsgálata <i>in vivo</i> zebradánió modellen	66
6. Következtetések.....	69
7. Összefoglalás	70
8. Summary.....	71
9. Irodalomjegyzék	72
10. Dr. Rácz Gergely publikációs jegyzéke	80
Az értekezés témakörében megjelent közlemények.....	80
Egyéb közlemények.....	80
11. Köszönetnyilvánítás	83

Gyakoribb rövidítések jegyzéke

ASV: Air saturation volume

EBA:4-etilbenzaldehyd

EPA: Environmental Protection Agency – Környezetvédelmi Hivatal, USA

CDBP: Concentrate of Disinfection Byproducts

CSRW: Concentrate of Sediment of Raw Water

DBP:Disinfection byproduct – víztisztítási melléktermék

DFA:2,4-difluoroanilin

DOM: Dissolved Organic Matter – Oldott Szerves Anyag

GC-MS: Gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria

HAA: Haloacetic acid (Haloecetsav)

HE: Hematoxin-Eozin

IARC:International Agency for Research on Cancer (Nemzetközi Rákkutató Hivatal)

NOM:Natural Organic Matter – a vízben természetesen előforduló szerves anyagok

PAS: Periodic Acid-Schiff)

PBS:Phosphate buffered saline

THM:Trihalometán

WHO: World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

1.1. Irodalmi háttér

Az ivóvíz az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen. A különböző szennyezések és szennyezőanyagok, valamint különösen az emberi tevékenység miatt létrejövő szennyezések következtében a természetben található vizek jelentős része közvetlen emberi fogyasztásra alkalmatlan. Ezért a fertőtlenítés alapvetően fontos az ivóvíz okozta és közvetítette ártalmak megelőzésében. Az ivóvíz patogén mikrobákkal történő szennyeződése (kontaminációja) alapvetően hozzájárul a fertőző betegségek terjedéséhez. A víz ezen vektorjellegének megszüntetéséhez az egyik leggyakrabban alkalmazott aspecifikus eljárás az ivóvíz fertőtlenítése. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization - WHO) által publikált adatok szerint a Föld lakosságának mintegy 20%-a potenciálisan fertőzést okozó, megbetegítő képességgel rendelkező mikrobákkal szennyezett vizet fogyaszt (közel 1 milliárd emberről van szó). A mikrobákkal szennyezett vízzel terjedő fertőző betegségek a 0-5 éves korcsoportba tartozó gyermekeket különösen sújtják. Évi mintegy 900 millió 5 év alatti gyermek hasmenéses megbetegedését tulajdonítják mikrobákkal szennyezett víznek, és évi mintegy 1,5-1,8 millió 5 év alatti gyermek halálát szennyezett víz okozta fertőzés idézi elő (Ashbolt, 2004).

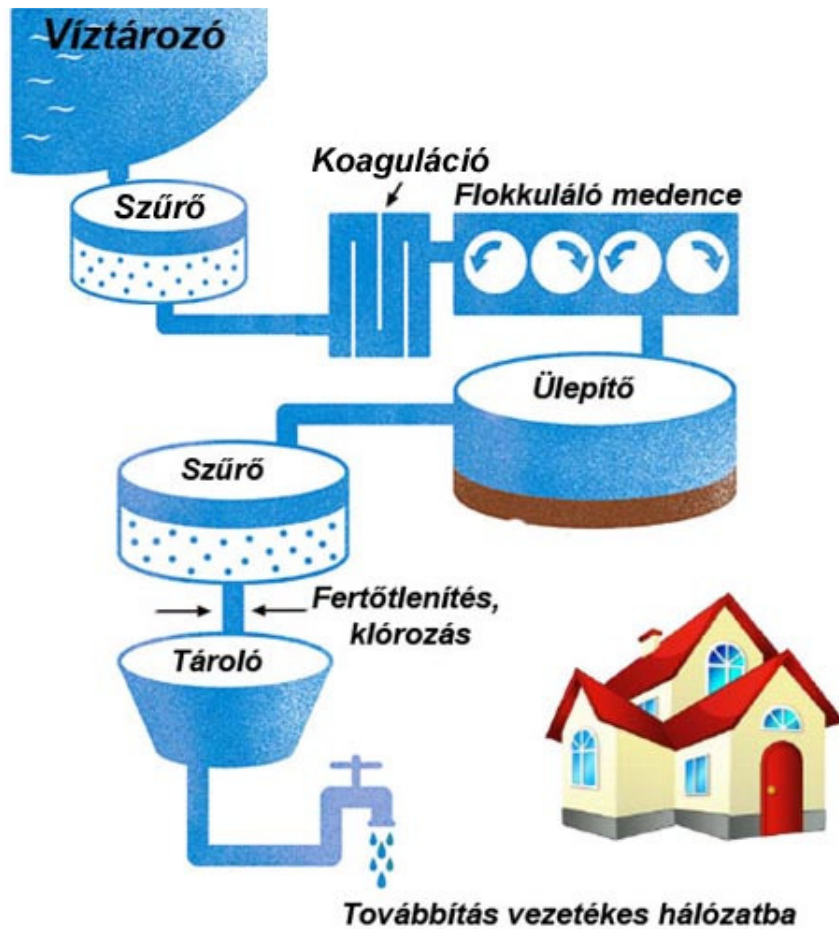
Az ivóvíz fertőtlenítésében többek között nehézséget okoz, hogy bizonyos mikroorganizmusok (pl. *Cryptosporidium parvum*, vagy a *Mycobacterium avium complex*) rendkívül ellenállóak a leggyakrabban alkalmazott fertőtlenítőszer-dózisokkal szemben (Nasser *et al.*, 2012), ami szükségszerűen a fertőtlenítőszer mennyiségének jelentős emelésével jár (Esrey *et al.*, 1989; Payment *et al.*, 1989). A fertőtlenítőszer koncentráció emelése a víztisztítási-melléktermékek (disinfection-byproducts, DBP) képződését növelheti (von Gunten *et al.*, 2001). Az Egyesült Államokban már 1974-óta foglalkoznak a fertőtlenítési reakciótermékek azonosításával illetve ezek egészségügyi vonatkozásainak vizsgálatával. (Kanarek & Young, 1982; Chowdhury *et al.*, 2009). A DBP expozíció és egészségügyi kockázatok közötti ok-okozati összefüggésekre számos tanulmány rávilágít (Zoeteman, 1985; Pilotto, 1995; Krishnan *et al.*, 1997; Malcolm *et al.*, 1999; Hrudey, 2009). A világ számos országában a hatóságok a közegészségügy megfelelő szinten

tartásának érdekében alternatív vízkezelési rendszerek bevezetésén fáradoznak, valamint megfelelő szabályokkal és rendeletekkel próbálják a víztisztítási melléktermékek szintjét megtervezni, és az egészségügyi határértékek közelében tartani úgy, hogy az ivóvíz minősége ne szenvedjen károkat. Ily módon a potenciális egészségkárosító kockázat mértéke is csökkenthető (Abstract EPA /600/R-01/110, december 2001). (chlorination by-products, (1991) IARC Monographs Vol 52. Roger, A. et al.(1996).

Jelen értekezésben bemutatásra kerülő vizsgálatainknak célja is az volt, hogy megállapítsuk, van-e a magyarországi ivóvíz-mintákban található fertőtlenítési reakciómelléktermékeknek toxikus, mutagén vagy karcinogén hatása.

1.2. Az ivóvíz kezelése

Jóminőségű, emberi fogyasztásra alkalmas ivóvíz előállításához megfelelő felszíni nyersvíz-forrást kell használni, amelyet aztán további kezelésnek kell alávetni. A víztisztítás számos lépést tartalmaz, melynek egyszerűsített vázlatát az 1. ábrán mutatjuk be. A nyersvíz szűrését követi a koaguláció- flokkuláció (derítés), az ülepítés, szűrés és végül a víz különböző módon történő fertőtlenítése, majd az ivóvíz vagy átmeneti tározókba vagy közvetlenül az elosztó rendszerbe kerül. Az 1. ábra a hagyományos víz-kezelés folyamatát illusztrálja. A víztisztítás viszonylag rövid története során ezek a lépések valamelyest finomodtak - elsősorban a technológiában bekövetkezett fejlődés és a szabályozási környezet változásaiból kifolyólag - az alapvető cél azonban nem változott: biztonságosan fogyasztható tiszta ivóvíz előállítása (Dawson & Sartory, 2000). A felszín alatti vizek feldolgozása során általában kevesebb lépést kell alkalmazni, mivel az értekezésben ilyen forrásból származó vizeket nem vizsgáltunk, erre nem térek ki részletesebben.



1. ábra. Víz tisztítás során alkalmazott alapfolyamatok sematikus bemutatása

1.3. Az ivóvíz fertőtlenítése

A vízkezelés tökéletlensége és fejletlensége tehető felelőssé a XIX. sőt a XX. század több nagy és súlyos járványáért. Ugyanakkor a vízügyi és egészségügyi szakemberek azon felismerése, hogy a nyersvizet megfelelő módszerekkel meg lehet szabadítani a megbetegedést okozó ágensektől talán a XX. század legnagyobb közegészségügyi vívmányai közé tartozik. Sajnos azonban a világ kevésbé fejlett országaiban még napjainkban is a nem megfelelő vízkezelés és a fertőtlenítés fejletlensége miatt naponta (!) 4900 ember hal meg, többek között a szennyezett víz okozta hasmenéssel járó fertőzések miatt (WHO 2004). Ezekből a szomorú adatokból is jól látható, hogy nem csak történelmi távlatokban, de napjaink fejlődő országainak társadalmaiban is jelentős egészségügyi problémát jelent a biztonságos ivóvízhez való

hozzáférés. Ezért szeretnénk hangsúlyozni, hogy az ivóvíz kezelése és fertőtlenítése alapvető és kulcsfontosságú a modern társadalmak jó közegészségügyi állapotának fenntartásához (Crittenden *et al.*, 2005).

1.3.1. Mikroorganizmusok okozta egészségkárosodás

A víz nem csak az eukariótaszervezet számára elengedhetetlen, hanem számos egyéb életforma számára jelent alapvető közeget, különösen a különféle mikrobiális szervezetek preferálják a vizet, mint étletteret. Ezért a vízben - és ennek megfelelően az ivóvíznek szánt nyersvizekben is - számtalan különböző típusú mikroorganizmus fordul elő, melyek lehetnek baktériumok, vírusok, protozonok, férgek vagy algák (Momba & Kaleni, 2002; Stanger *et al.*, 2006; Locas *et al.*, 2007). Ezen mikroorganizmusok emberi szervezetbe jutása egészen változatos megbetegedéseket tud okozni, melyek lehetnek csupán kényelmetlenséggel járók, de akár halálos kimenetelű fertőzések is. A legtöbb algaféle elsősorban a vízkezelés folyamatában okozhat fennakadásokat, ill. a késztermék esztétikáját jelentősen ronthatják (zavaros víz) (Watson, 2004). Beszámoltak már azonban biotoxin termelő algákról is, melyek potenciálisan egészségkárosodást is okozhatnak (Paerl *et al.*, 2001; Ferranti *et al.*, 2008).

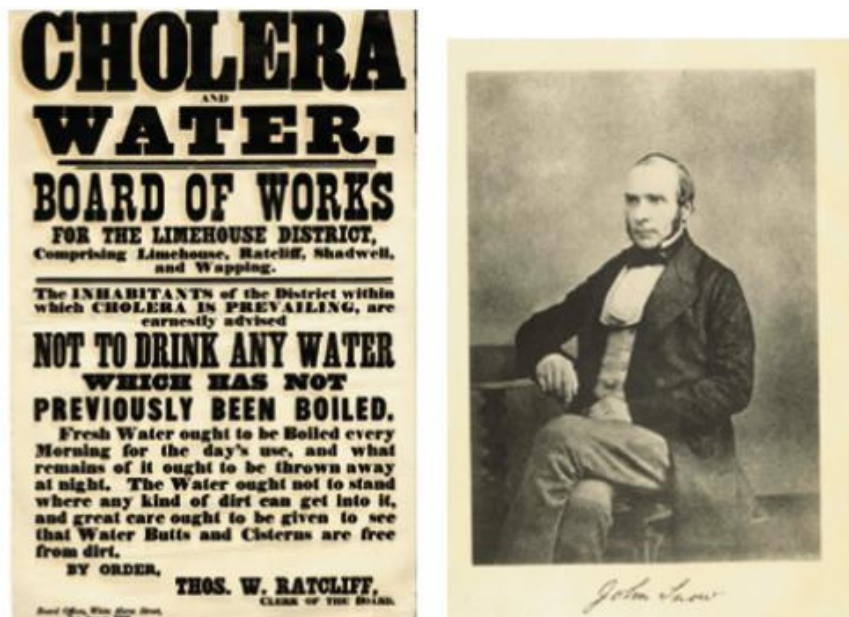
Ha nincsenek megfelelően eltávolítva, inaktiválva vagy elölve, a különböző vírusok, baktériumok és paraziták, enyhe vagy akár súlyos egészségkárosodásokat is okozhatnak, amelyek némelyike halálos is lehet az érzékeny szubpopulációknál (Wright & Collins, 1997; Fawell & Nieuwenhuijsen, 2003; Nwachuku & Gerba, 2006; Ikner *et al.*, 2012; Ganesh & Lin, 2013; Ngwenya *et al.*, 2013). Az ivóvízben leggyakrabban előforduló bakteriális mikroorganizmusokat az 1. táblázatban mutatjuk be.

	Mikroorganizmus	Megbetegedés típusa
Ismert kórokozók	<i>Salmonella typhosa</i>	Hastífusz
	<i>S. paratyphi</i>	Paratífusz
	<i>S. schottinuleri</i>	
	<i>S. hirschfeldi</i> C.	
	<i>Shigella flexneri</i>	Disentéria
	<i>Sh. dysenteriae</i>	
	<i>Sh. Sonnei</i>	
	<i>Sh. Paradysinteriae</i>	
	<i>Vibrio comma</i>	Cholera
	<i>V. cholerae</i>	
	<i>Pasteurella tularensis</i>	Tularemia
	<i>Brucella melitensis</i>	Brucellosis
	<i>Pseudomonas- psuedomallei</i>	Melioidosis
<i>Leptospira- icterohaemorrhagiae</i>	Leptospirosis	
<i>Enteropathogenic E. coli</i>	Gastroenteritis	
Vizből már kimutatott baktériumok	<i>Enterogaagregative E. coli</i>	Gastroenteritis
	<i>Enteroinvasive E. coli</i>	
	<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>	
	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	
Feltételezett vízben terjedő kórokozók	<i>Legionella pneumophila</i>	Legionellosis
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenteritis
	<i>Helicobacter- pylori</i>	ulcus pepticum ventriculi és duodeni
	<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>	Pneumonia
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Különböző fertőzések

1. táblázat. Megbetegedéseket okozó legismertebb baktérium-
törzsek előfordulása ivóvízben (Crittenden *et al.*, 2005)

1.3.2. A fertőtlenítés története

Az 1600-as évek vége tekinthető a mikrobiológia hajnalának, hiszen ekkor fedezték fel és figyelték meg először a vízben élő mikroorganizmusokat (Smit & Heniger, 1975). Egészen a XIX. század közepéig azonban nem hozták összefüggésbe az ivóvizet és ennek segítségével terjedő különféle járványokat. A londoni Soho-ban 1854-ben kitört nagy kolerajárvány idején azonban John Snow angol orvos egyértelműen bebizonyította, hogy a járványt a *Broad Street Well* kontaminációja okozza, ezzel tulajdonképpen megalapozója volt a modern járványügynek és alapvetően hozzájárult az ivóvíz eredetű járványok megfékezéséhez (2. ábra) (Brody *et al.*, 1999; Bingham *et al.*, 2004).



2. ábra. 1866-ból származó felhívás a víz forralással történő kezelésre a kolerajárvány megelőzése céljából (bal panel). John Snow (1813-1858, jobb panel). forrás: London School of Hygiene & Tropical Medicine Library & Archives

Ebben az időben a nagyobb települések már rendelkeztek ugyan közösségi víztisztító telepekkel, azonban a tisztítás legmagasabb szintjét az egyszerű szűrés jelentette. A klór használatát fertőtlenítési céllal először Robley Dunlinsgen 1835-ben írt művében (Public Health) fedezhetjük fel, amely úttörő jelentőségű volt a víztisztítás történelmében (Crittenden *et al.*, 2005).

Ugyanekkor tette megfigyeléseit a bécsi kórház szülészeten Semmelweis Ignác, Egyetemünk névadója is, aki rájött, hogy a gyermekági láz kialakulását azok az orvosok okozzák, akik a boncolás után a szülészeti osztályon fertőtlenítetlen kézzel vizsgálják a várandósokat. Semmelweis ezért kötelezte kollégáit, hogy a szülészeti osztályokra történő belépés ill. a páciensekkel történő érintkezés előtt klórmész-oldatos kézmosás minden esetben előzze meg a vizsgálatokat. Semmelweis megfigyelésének az adja a különleges tudományos értékét, hogy mintegy két évtizeddel megelőzte Pasteur és Koch munkásságát, ami a mikrobák felismeréséhez vezetett.

Végül 1881-ben, egy évtizeddel azután, hogy Pasteur megfogalmazta csíraleméletét, Robert Koch bizonyította be, hogy a klór valóban képes hatástalanítani a baktériumokat (Howard-Jones, 1984). A XX. század elejére már egyre szélesebb körben elterjedt a koagulációs, ülepítési, szűrési, és a túlnyomásos elosztási alapokon működő vízkezelés és a legtöbb szennyvíztisztító telep ilyen módon működött. Klórt a szennyvíz tisztítására 1902-ben használtak először hivatalosan a belgiumi Middelkerke szennyvíztisztító telepén (Crittenden *et al.*, 2005). A klórt ún. „ferrochlor” formában használták, amely művelet során kalcium-hipokloritot és vas-kloridot kombináltak ami egyszerre volt képes a szennyvizet koagulálni és fertőtleníteni. Négy évvel később pedig a franciaországi Nizzában bevezették az ózonnal történő vízfertőtlenítést. Természetesen a víz fogyaszthatósága és biztonsága ezen módszerek elterjedésével párhuzamosan rohamosan nőtt, azonban több, mint fél évszázadnak kellett ahhoz eltelni, hogy felismerjék azt, hogy a fertőtlenítés és vízkezelés során potenciálisan egészségkárosító melléktermékek keletkezhetnek.

1.3.3. A fertőtlenítőszeres különböző formái

A XX. század technológiai fejlődése természetesen nem hagyta érintetlenül a víztisztítást sem, így rohamos fejlődésnek indult nem csak a tisztító telepek hatékonysága, hanem újabb és újabb fertőtlenítő szerek jelentek meg. A századfordulón nem sokkal a ferroklor és az ózon-alapú fertőtlenítés után megjelent a hipoklorit is a fertőtlenítőszeres listáján. Később a folyékony klórgáz használata terjedt el, melynek fertőtlenítő hatása megegyezett a hipokloritével, azonban könnyebben volt

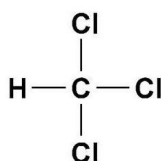
alkalmazható és nem bomlott le olyan könnyen, így hamarosan a világ legelterjedtebb elsődleges fertőtlenítő-szerévé vált. Az 1960-as és 1970-es években a klórozási melléktermékek felfedezését követően azonban ismét az ózon vált a primer fertőtlenítőszerévé, legalábbis Európa nagy részén (Lawrence & Cappelli, 1977). Az öt leggyakoribb fertőtlenítőszer napjainkban a szabad klór, kombinált klór (gyakran nevezik klóraminoknak), ózon, klór-dioxid és az UV- fény (Crittenden *et al.*, 2005).

Az ózon széles körű felhasználását annak köszönheti, hogy igen erős oxidálószer, továbbá hatékonyan szabályozza a vízben előforduló kellemetlen íz- és illatanyagokat. Az UV fény kivételével azonban minden fent említett fertőtlenítőszer alkalmazása lebomlási, fertőtlenítési maradványokat hagy hátra. A megfelelő fertőtlenítőszer kiválasztása éppen ezért igen bonyolult és nagy körültekintést igényel. Minden esetben figyelembe kell venni a víz minőségét, forrását, eredetét, szerves anyag tartalmát és még számos itt nem részletezett paramétert. Azonban egy valami kijelenthető: a víz fertőtlenítése során valamilyen kompromisszum elengedhetetlen, hiszen a szennyvíz tisztítása során mindig keletkeznek tisztítási melléktermékek, melyek károsak ugyan, de ez még mindig kisebb veszéllyel jár, mint ha nem pusztítjuk el a vízben élő kórokozókat. Vajon tényleg jó kompromisszumokat kötünk a vízkezelés során? Értekezésemben többek között erre is kerestem a választ.

1.4. A fertőtlenítés melléktermékei

1.4.1. A tisztítási melléktermékek felfedezése az ivóvízben

Az 1970-es évek elején Johannes Rook holland vegyész a rotterdami vízkezelés és fertőtlenítés háttérét vizsgálva fedezte fel, hogy a Rajna folyó felszíni vízbázisából nyert vízben nyomokban szerves szennyező anyagok találhatóak. Rook vizsgálatai során rájött, hogy a nyersvízben nem volt jelen kloroform (3. ábra), azonban a tisztított ivóvízben igen jelentős mennyiségben fordult elő (Rook, 1974; 1976).



3. ábra. A kloroform kémiai szerkezete.

Ebből Rook azt a következtetést vonta le, hogy a víz fertőtlenítése során alkalmazott különböző klórvegyületek reagáltak a vízben természetesen előforduló oldott szerves anyagokkal (Dissolved Organic Matter – DOM), amely eredményeképpen alakulhatott ki a kloroform és egyéb trihalometán-származékok (THM). Eredményeit csak később közölte, miután meggyőződött adatai megbízhatóságáról és a THM-ok jelenlétéről a tisztított vízben. Miután 1974-ben publikálta eredményeit, mind a tengerentúlon, mind pedig Európában nagy megdöbbenést okozott a tudományos közéletben, hiszen addig ilyen, egészségre potenciálisan káros anyagok jelenlétére a fertőtlenített ivóvízben nem volt adat. Később Rook eredményeit az Egyesült Államok és Kanada vízkezeléssel foglalkozó szakemberei megerősítették (Bellar *et al.*, 1974; Symons *et al.*, 1975; Williams *et al.*, 1980; Hasan *et al.*, 2010)

1.4.2. Fejlesztések és rendeletek

A kezdeti aggodalmat követően igazi robbanás következett be a kutatásokban, amely az ivóvíz fertőtlenítése során kialakuló ismert DBP-k számának szintén robbanásszerű növekedéséhez vezetett (Hrudey, 2009). Ezzel párhuzamosan a víztisztító telepek működését egyre szigorúbb és hatékonyabb rendeletekkel szabályozták és

megjelentek az ivóvízszabványok. Ezzel párhuzamosan analitikusok egész hada a világ szinte minden országában próbálta és próbálja meg napjainkban is azonosítani a DBP-ok kialakulásának mechanizmusát, azok kémiai szerkezetét, meghatározni prekursoraikat, továbbá olyan műszereket fejleszteni, amelyek eléggé érzékenyek ahhoz, hogy igen kis mennyiségben is képesek legyenek detektálni ezen anyagokat. A toxikológusok és járványügyi szakemberek folyamatosan tanulmányozzák és figyelemmel kísérik a THM-ok és egyéb, a klórozási folyamatok során kialakuló DBP-k egészségügyi hatásait. Számos kutatócsoport foglalkozik a nyers- és szennyvizekben található szerves oldott anyagok (dissolved organic matter – DOM) kémiai és biológiai szerepének megértésén, hiszen már az 1970-es években egyértelművé vált, hogy ez a heterogén vegyületcsoport lehet a DBP-k elsődleges prekuzora (Kitis *et al.*, 2001; Dotson *et al.*, 2009; Hrudey, 2009; Lu *et al.*, 2009; Chuang *et al.*, 2013). A mérnökök és a vízkezelő szakemberek pedig folyamatosan azon dolgoznak, hogy olyan technológia felhasználásával történjen a víz fertőtlenítése, amely minimalizálja a DBP képződést, sőt, újabban komolyan megkérdőjelezzik a klór ilyen jellegű felhasználását (Musikavong *et al.*, 2005; Badawy *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013).

Az intenzív kutatás eredményeképpen az ismert DBP-k száma ma már több százra, tehető. A THM mellett a második legnagyobb DBP csoport a haloecetsavak (HAA) továbbá a haloaceto-nitrilek, klórozott ketonszármazékok, klorálhidrátok, halonitrometánok, hogy csak a legfontosabbakat említsük (Krasner *et al.*, 2006).

Az ivóvíz minőségére és a benne található esetleges szennyeződések jelenlétére számos ajánlás ill. szabvány, előírás létezik. Ezeket három csoportra oszthatjuk:

- a) globális (világméretű); pl.: WHO Guidelines (Az Egészségügyi Világszervezet ajánlásai)
- b) regionális; pl.: EU Direktívák;
- c) országos szabványok.

Ezek a szabványok az egyes előbb említett komponensek maximálisan megengedhető koncentrációit határozzák meg. A szabályozások és az általuk meghatározott határértékek természetesen a legújabb kutatási eredmények alapján rendszeresen felülvizsgálatra kerülnek, jellemzően szigorodnak. A '70-es és a '80-as években a hazai ivóvízszabvány (MSZ 445-1978, MSZ 445-1989) kialakításakor a WHO irányelveit vették figyelembe. Hazánk Európai Unió csatlakozását követően, sőt már ezt

megelőzően is az EU Direktívák váltak irányadóvá. Ezen szabályozások és rendeletek ill. szabványok részletezésére az értekezésben nem térek ki részletesen.

1.5. Oldott szerves anyagok (Dissolved Organic Matter - DOM)

1.5.1. A DOM eredete és összetétele

A természetes eredetű oldott szerves anyagok nagy része közvetlen egészségügyi kockázatot nem jelent az emberi szervezetre, de ismert, hogy a fertőtlenítőszerként adagolt klórral reagálva rákkeltő hatású trihalo-metán vegyületek, illetve mutagén hatást kifejtő klórozott szénhidrogének alakulhatnak ki. Oldott szerves anyagok szinte minden természetes vízben jelen vannak (Leenheer, 2009).

A DOM heterogén, polifunkcionális makromolekulák, polimerek és különféle kolloid-mérettartományba tartozó, vizes fázisban oldott biomassza eredetű anyagokból áll. Eredete elsősorban a fotoszintetizálni képes szervezetek tevékenységére, szárazföldi és vízben élő mikrobák lebontó tevékenységére és egyéb, másodlagos szerves-anyag feldolgozást végző heterotróf baktériumok és gombák működésére vezethető vissza (Rositano *et al.*, 2001). Jelentősen hozzájárulnak a DOM kialakulásához a talajból vízbe jutó szerves anyagok is, ezek közül talán a legfontosabb a huminsav tartalmú humusz (Thurman & Malcolm, 1981; Borisover & Graber, 2004). Mindenképpen meg kell említeni itt az emberi tevékenységet is, hiszen a szerves anyagok egy kisebb, de nem jelentéktelen hányada mesterségesen úton – elsősorban mezőgazdasággal összefüggő és szennyvízkibocsátással kapcsolatos – jut a felszíni vizekbe (Dotson *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009; Reemtsma, 2009).

Az oldott szerves anyagokról már régóta tudjuk, hogy képesek a víztisztítás- és fertőtlenítés során különböző problémákat okozni. Ilyen DOM jelenlétére utaló problémák közé tartozik például a kellemetlen íz- ill. színyanyagok jelenléte, a szűrési folyamatok teljesítményének és hatékonyságának csökkenése, valamint a DOM szolgáltatja a fertőtlenítőszer alkalmazása során kialakuló káros melléktermékek számára a kiindulási szubsztrátok legnagyobb csoportját is – amelyek éppen ezen értekezés fókuszában is állnak.

A természetes vizekben az oldott szerves anyagok koncentrációja, összetétele és kémiai tulajdonságai igen széles skálán mozognak, akár térbeli, akár időbeli megoszlásukat vizsgáljuk. A vízben jelen lévő kolloidális összetevők tulajdonságai többek között függenek attól, hogy milyen forrásból származik az adott szerves anyag, továbbá a hőmérséklettől, a pH-tól, a víz kation összetételétől, az üledékszemcsék felszínén kialakuló reakciófelszíntől, a vízben élő mikrobák összetételétől, az esetleges fotolitikus és még számos egyéb tényezőtől is (Ho *et al.*, 2004; Humbert *et al.*, 2007).

A természetes felszíni vizekben jelentős mennyiségben fordulhatnak elő anorganikus prekursorok is, amelyek közül a bromid és a jodid ionok adnak okota legnagyobb aggodalomra. Ezek igen gyorsan képesek hipobrómossavvá (HOBr) ill. hipojódossavvá (HOI) oxidálódni, amelyek már könnyen reakcióba léphetnek a DOM-al (Hua *et al.*, 2006). A Br⁻-ről már régóta ismert, hogy képes a THM-ek különböző csoportjaival reakcióba lépni, a jodo-THM-ek jelenlétére a fertőtlenített ivóvízben azonban csak napjainkban derült fény (Richardson *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2011; Allard *et al.*, 2013).

1.5.2. Egészségügyi vonatkozások

Az ivóvízben kialakuló DBP-k-nek felfedezésük óta különös figyelmet szentelnek a toxikológusok és a járványügyi szakemberek. Különösen az ivóvízben egyre gyakrabban előforduló ún. „high-priority” DBP-k okoznak egyre több aggodalmat, hiszen keveset tudunk ezen vegyületek egészségügyi kockázatairól és lehetséges egészségügyi hatásairól. Egy nemrégiben megjelent tanulmány (Richardson *et al.*, 2007) az elmúlt 30 év járványügyi és toxikológiai, víztisztítási melléktermékekkel kapcsolatos vizsgálatait összegezte, amelyben különös hangsúlyt fektetett ezen igen veszélyes melléktermékekre. Számos, a témában megjelent toxikológiai vizsgálat hívja fel a figyelmet arra, hogy a klórozott ivóvíz fogyasztása megnöveli a hólyagrák és vastagbélrák kockázatát (King & Marrett, 1996; Ranmuthugala *et al.*, 2003; Michaud *et al.*, 2007; Villanueva *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2010). Ezen megbetegedések kialakulása azonban korrelációt mutat az expozíció módjával (ivás, dermális kontaktus, ill. belégzés). Ugyanakkor számos adat utal arra, hogy viszonylag gyenge kapcsolat mutatható ki a víztisztítási melléktermékek és más pl. kongenitális anomáliák, vagy reprodukciós szerveket érintő megbetegedések között (Tardiff *et al.*, 2006).

A DBP-k toxikológiai meghatározása ma már nem jelent különösebb analitikai problémát, hiszen számos standard és jól meghatározott útmutatást adnak a szakirodalomban fellelhető adatok. A korábban már említett összefoglaló munka alapján (Richardson *et al.*, 2007) mutagénnek tekinthető egy DBP amennyiben az mérhető változást (mutációt) okoz a DNS-ben, akár gén, akár a kromoszóma szintjén. A genotoxikus anyagok nem csak mutagén, hanem DNS károsító tulajdonsággal is rendelkeznek (pl. az anyag kovalensen hozzákötődik a DNS molekulához, vagy képes DNS szál-törést előidézni). (Attias *et al.*, 1995; Bull *et al.*, 1995; Catto *et al.*, 2013). Számos ún. szabályozott THM-ről kimutatták, hogy laboratóriumi állatokban DNS károsító tulajdonságuk révén karcinogén hatásúak lehetnek, a bróm-tartalmú THM-ok pedig citotoxikusak is (Landi *et al.*, 1999). A HAA-ról is ismert mutagén és genotoxikus hatás, azonban a bróm-származékaik sokkal erőteljesebb károsító hatással bírnak, mint klórozott változataik (Richardson *et al.*, 2007). A legkárosabb DBP anyag azonban egyértelműen a bromát, amely mutagén és genotoxikus mind *in vivo*, mind pedig *in vitro*. A bromát bromidból alakul ki ózon hatására, illetve abban az esetben is megfigyeltek bromát képződést, amikor közvetlen napsugárzás mellett klórdioxiddal

fertőtlenítették a vizet (Macalady *et al.*, 1977). Az egyik leggyakoribb szervesetlen prekursor ugyanis a bromid. A bromid 10-100 µg/l koncentrációban található meg általában a felszíni vizekben, ennél némileg kevesebb van a talajvizekben, szennyeződésként kerülhet továbbá a vízhez különböző klórtartalmú fertőtlenítőszerekkel. Klórtartalmú szerek használata során bromáttá alakulhat át, nagyobb mennyiségben különösen akkor, ha a fertőtlenítési eljárás során ózont is felhasználnak. Továbbá, miután a klór oldatban van jelen, általában mint HOCl, ionokra disszociálta, bromid jelenlétében BrCl és HOBr keletkezhet, ami végül szerves összetevők brominálásához, illékony klórozott szerves trihalometánok keletkezéséhez vezethet. Az ivóvízben leggyakrabban előforduló, illékony klórozott szerves trihalometán vegyületek: triklórmetán, CHCl₃, diklórbrómmetán, CHBrCl₂, dibromklórmetán, CHBr₂Cl, tribrommetán, CHBr₃, triklórjódmetán, CHI₃. Ezen DBP-k közül számos rendelkezik azokkal a kritériumokkal, amelyek alapján a Nemzetközi Rákkutató Hivatal(IARC) ezen anyagokat humán karcinogén anyag kategóriájába sorolta. A jelenleg 11 szabályozott DBP közül hatot mind az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal, mind pedig a Nemzetközi Rákkutató Hivatal egyértelműen humán rákkeltő anyagként tart számon (Richardson *et al.*, 2007).

Bár a toxikológiai szakirodalomban bőségesen találunk még fehér foltokat e területen, ma már számos adat áll rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy a szabályozatlan és újonnan felfedezett DBP közül számos sokkal károsabb, mint a szabályozott kategóriába tartozó hasonló DBP vegyületek. Az állóvizet azon nemrég felismert vegyületcsoportok kavarták fel legjobban, amelyekről eddig csak kevés ismerettel rendelkezünk, de rendkívül toxikusnak bizonyultak. Ilyenek elsősorban a még szabályozatlan bromozott, jódosított, továbbá a nitrogén tartalmú-DBP-k (N-DBP). Az utóbbira talán az egyik legismertebb példa nemrég látott napvilágot: egy, Németországban igen elterjedt peszticid nitrozamin prekuzorrá bomlik, amelyből igen erőteljesen rákkeltő N-nitroso-dimetil-amin (NDMA) alakul ki ózonos vízfertőtlenítés során (Schmidt & Brauch, 2008).

2. Célkitűzések

Az itt ismertetett szakirodalmi adatok tükrében fontosnak tartottuk, hogy hazai körülmények között is vizsgálat tárgyává tegyük:

- a víztisztítás során keletkezett reakció melléktermékek jelenlétét ivóvízben,
- a reakció melléktermék-komplex esetleges mutagén hatását Ames-teszt alkalmazásával,
- a reakció melléktermék-komplex esetleges programozott sejthalált-apoptózist-kiváltó hatását, humán lymphocyták alkalmazásával,
- a reakció melléktermék-komplex kémiai összetételét,
- a kémiai szerkezet alapján kiválasztott vegyületek feltételezett apoptózist fokozó hatását,
- a kémiai szerkezet alapján kiválasztott vegyületek *in vivo* toxicus vagy carcinogén vizsgálatát kísérleti akváriumi halak alkalmazásával.

A vizsgálatokat részben a Semmelweis Egyetemen belül az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet és a Közegészségtani Intézet közötti kollaborációval, az Európai Közösség INCO COPERNICUS-Community Research project keretében végeztük (Biotechnological procedures for sustainable water management No. ERBIC 15 CT 980129-PL971185), részben a Szent István Egyetemen belül a Patológiai Tanszékkel és a Halgazdálkodási Tanszékkel történő kollaborációval végeztük. Az analitikai vizsgálatok a BÁLINT ANALITIKAMérnöki Kutató és Szolgáltató Kft. kémiai laboratóriumában történtek.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek

Serdolit PAD III pro anal. (Serva), Amberlite XAD-2 pract. (Serva), Nátrium Azid (Aldrich), 4-Nitro-o-feniléndiamin (Aldrich), 2-Aminoantracén (Sigma Aldrich Magyarország), Dimetilszulfoxid (Sigma), Arochlor 1254 (Antechnika), Ultratiszta víz (Milli Ro Plus, Milli-Q Plus (Millipore)), 4-Etilbenzaldehyd (EBA) 98% (Sigma 23,363-3) 2,4-Difluoroanilin (DFA) 99% (Sigma D10,140-0); (mindkettő Sigma Aldrich Magyarország). A törzsoldatokat ultrahangos diszpergálással készítettük desztillált vízben. Minden további hígítás is desztillált víz felhasználásával készült.

A vizsgálatokhoz felhasznált anyagok minőségi követelményeit a vizsgálati módszereknél megkívánt előírások szerint vettük figyelembe.

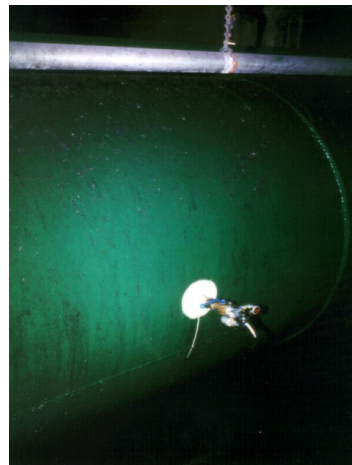
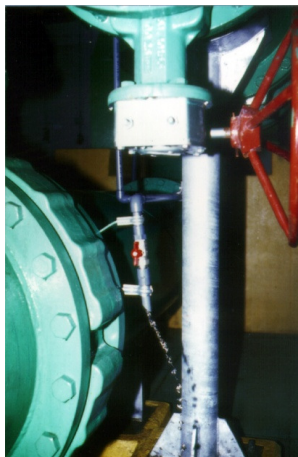
Serdolit PAD III és Amberlite XAD-2 tisztítása: US. EPA ajánlásána szerint történt (Daignault *et al.*, 1988)

3.2. Vízmintavétel, a minták klór-, ózon- és szerves széntartalmának ellenőrzése

A vízminták a Fővárosi Vízművek Csepeli Vízkezelőművek dunaparti csápos kútjából származtak. (4. ábra). A kezeletlen (nyers) csápos kútvíz mintavételi helyét, és a kezelt (tiszta) víz mintavételi helyét az 5. ábra mutatja. Egy mintavétel során összesen 600-800 litert vízmintát vettünk. A vízminta klór tartalmát a Magyar Vízszabvány MSZ 448/25-81 DPD fotometriás módszerével ellenőriztük. A vízminták ózon tartalmát jodometriásan ellenőriztük, a Fővárosi Vízművek RT. Minőségügyi Kézikönyve alapján. A vízminta szerves széntartalmának ellenőrzése: LAB TOC 2100 készüléken történt.



4. ábra. Csáspos kút vízmintavételi hely a Duna parton (Fővárosi Vízművek Csepeli Vízkezelőművek)



5. ábra. A kezeletlen (nyers) csáspos kútvíz mintavételi helye (bal panel) és a kezelt (tisztá) víz mintavételi helye (jobb panel).

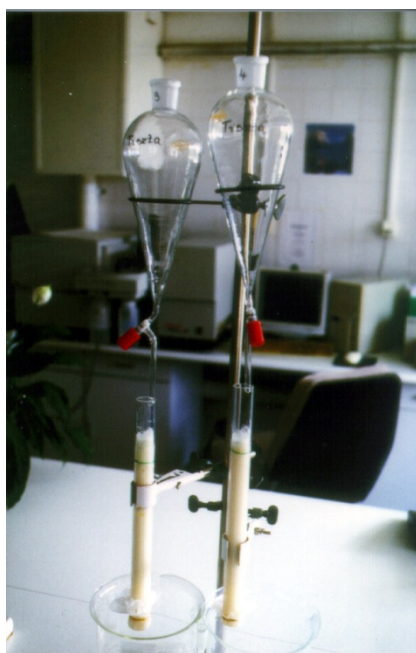
3.3. A vízminták ismeretlen szerves mikroszennyezőinek azonosítása

A módszer lényege, hogy a kiválasztott vízmintákat speciális adszorbensen folytatjuk át, amelyek különböző módokon megkötik a nyersvízben meglévő és a vízkezelés során keletkező szerves mikroszennyezőket. A gyanta fehér, gyöngy alakú, hidrofób, apoláros, nemionos, következésképpen az apoláros, nemionos, semleges szerves vegyületeket adszorbeálja, a poláros, ionos szerves vegyületeket kevésbé köti meg. A makroretikuláris XAD gyantaoszlopokon ezek a vegyületek hatékonyabban

adszorbeálódnak. A gyantán túlsúlyban adszorpcióval dúsulnak a szerves vegyületek, míg kemisorpcióval gyakorlatilag nem kötődnek meg, ezért az adszorbeált vegyületeket jó hatásfokkal deszorbeálhattuk.

3.3.1. A gyanta oszlopok készítése

A Serdolit PAD III és Amberlite XAD-2 makroretikuláris gyantákat a méretre vágott üvegcsövekbe töltöttük. A gyantaoszlopok méretei: 23 cm x 2,3 cm. A gyantaoszlop tetején kb. 2-3 mm tisztított üveggyapotot helyeztünk el. Az üveggyapot tisztítása megegyezett az Amberlite XAD-2 pract. tisztításával. A gyantaoszlop elrendezését az 6. ábra mutatja.



6. ábra. A gyantaoszlopok elrendezése.

3.3.2 A vízkoncentrátumok készítése

100-100 liter vízmintát folyamatosan csepegtettük a gyantaoszlopokra a kísérlet időtartama alatt. Az utolsó vízminta frakció lecsöpögése után az oszlopokat négyszeres ágytérfogattal (=4*95,50ml) metilalkohollal és diklór-metánnal átmostuk. Az eluálás metilalkohollal – poláros, nagyobb molekulásúlyú vegyületekhez –, és diklór-metánnal – illékony, kisebb molekulásúlyú vegyületekhez – történt. Az oldószer frakciókat 50°C-on forgófilmes vákuum-desztillálóban (Rotadeszt) 10 ml-re pároltuk be. Üveg dugós üvegekben +4°C-on tároltuk a feldolgozásig.

3.3.3 A vízminták ismeretlen szerves szennyezőinek azonosítása gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria(GC-MS) módszerrel

A metilalkohol- és a diklór-metán frakció 10-10 ml oldataihoz n-hexánt mértünk, egy lezárható edénybe. Az oldatokat 30 percig kevertük mágneses keverővel. A fázisok szétválása után az oldószeres fázist lepipettáztuk, az oldószerben levő vizet kifagyasztottuk. Az oldószeret vákuum-desztillálással betöményítettük, n-hexánnal átöblített, lezárható kémcsőbe öntöttük. A végtérfogatot úgy állítottuk be, hogy az oldószeret 0,50 ml-re nitrogén gáz befúvással töményítettük, végül a térfogatot n-hexánnal 1,00 ml-re egészítettük ki.

A módszer elve

Az ismeretlen szerves mikro szennyező anyagok azonosítása GC-MS módszerrel SCAN üzemmódban végezzük el. A mérés megkezdése előtt a tömegspektrométert úgynevezett automatikus hangolással állítjuk be a SCAN módszerhez, majd felvesszük a minta tömegspektumát, amelyet könyvtári tömegspektrumokkal való összehasonlítással értékelünk ki.

Alkalmazási terület

A módszer alkalmas felszíni, felszín alatti, ivóvíz és szennyvíz ismeretlen szerves szennyezőinek minőségi azonosítására. Az azonosítást zavarják mindazok a vegyületek, amelyek retenciós ideje és iontömege azonos. A zavaró hatások kiküszöbölésére teljes tömegspektrumotvettünk fel, és a kiértékelést több azonosító ion alapján végeztük el.

Mintaelőkészítés

2l vízmintához 25.0 ml, a célnak megfelelő, ellenőrzött minőségű oldószert (pl. n.-hexánt, vagy n.-hexán és diklór-metán 1: 1 arányú elegyét) adtunk a mintavételhez használt üvegedénybe. Az edénybe egy előzetesen oldószerral lemosott és megszáritott teflon bevonatú vagy üveg keverő rudacskát tettünk, és az edény lezárása után 30 percig intenzíven kevertük mágneses keverővel az elegyet. A fázisok szétválása után az oldószert fázisból 20.0 ml-t teflon-szeptumos csavaros záróelemű üvegedénybe pipettáztuk. A minta ilyen formában jól lezárva mélyhűtőben hosszabb ideig (néhány hét) tárolható. Az extraktumot az oldószert felesleg nagytisztaságú nitrogénnel történő lefúvatásával szoba hőmérsékleten 1 mL-re betöményítettük (kb. 0.5 mL-re pároljuk, majd az eredeti oldószerttel beállítottuk a végtérfogatot).

A felhasznált vegyszerek és eszközök

- n.-hexán (ellenőrzött minőségű, Merck GC)
- diklór-metán (ellenőrzött minőségű, Merck GC)
- üvegedények teflon bevonatú szeptummal
- Hamilton fecskendők 10,25 JIL-esek
- gázkromatográf tömegspektrómetérral vagy tömegszelektív detektorral
- .

Gázkromatográfiás vizsgálati körülmények

Vizsgálatainkhoz HP 5890 típusú gázkromatográfot használtunk tömegspektrómetérral (GC-MS) vagy tömegszelektív detektorral a következő beállításokkal: Injektor 250 °C, splitless idő: 1 perc Vivőgáz: hélium T5.5, fejnyomás 70 kPa; Kolonna: kémiailag kötött fázisú 100 metil-szilikon [HP-ultra 1] hossza 25 m, belső átmérője 0.2 mm, filmvastagság 0.50 µm; Detektor: tömegspektrómetér (MS) vagy tömegszelektív detektor (MSD) SCAN üzemmód. A mérés megkezdése előtt a tömegspektrómetérral

ügynevezett automatikus hangolással állítjuk be a SCAN módszerhez, majd a mintából és a vakból 1 µl-t injektálunk a gázkromatográfba és felvesszük a minta és a vakpróba tömegspektrumát. A SCAN üzemmód pásztázó üzemmódot fed. A pásztázó üzemmódban a tömegspektrométer néhány tized másodpercenként automatikusan tömegspektrumokat készít. A vak próba a megfelelően hígított DMSO volt.

A vizsgálati eredmények értékelése

A vízmintákban és a vak-próbában lévő szerves anyagok minőségi azonosítását tömegspektrumaik WILEY 138 spektrum könyvtárral való összehasonlításával végeztük (7.ábra). Ha a vakpróba szokatlanul szennyezett, az előkészítési folyamatot lépésről lépésre ellenőrizni kell újabb vakpróbák készítésével, hogy a vak szennyezettségének okát kiderítsük és kiküszöböljük. A módszer kimutatási határa kb. 1-10 µg/L a vegyület minőségétől és a zavaró hatásoktól függően. A GC/MS nem csak érzékeny módszer, de az anyagok egyértelmű beazonosítására is lehetőséget ad.

72	23.98	0.49	C:\DATABASE\WILEY138.L 9,11-Octadecadienoic acid, methyl est 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, met 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, met	71939 013030-47-6 70 133233 000112-63-0 70 71940 000112-63-0 62
73	24.37	0.43	C:\DATABASE\NIST98.L Cyclopentanol, 1-methyl- Cyclohexanol, 4-tert-butyl-1,2-dimeth Phenmetrazine	24426 001462-03-9 14 24547 032383-56-5 14 114495 000134-49-6 14
74	24.83	1.31	C:\DATABASE\NIST98.L 5-Octadecene, (E)- 9,12-Octadecadienoic acid, methyl est 3-Octadecene, (E)-	13707 007206-21-5 42 2347 002566-97-4 25 22895 007206-19-1 25
75	24.94	0.41	C:\DATABASE\WILEY138.L 3-Pyridinamine Carbonic acid, neopentyl phenyl ester Propanoic acid, 2,2-dimethyl-, phenyl	472 000462-00-0 59 38409 013183-19-2 59 24688 004920-92-7 45
76	25.06	2.07	C:\DATABASE\NIST98.L 13,16-Octadecadienoic acid, methyl es 3,4-Octadiene, 7-methyl- 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, met	13274 056846-99-2 38 21002 037050-05-8 38 100742 000112-63-0 30
77	25.55	0.74	C:\DATABASE\NIST98.L 8-Azabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one, 8- 1H-Indazole, 4,5,6,7-tetrahydro 1H-Pyrrole-2-acetic acid, 1-methyl-,	40740 004438-38-4 46 40810 002305-79-5 43 40871 051856-79-2 43
78	25.72	1.69	C:\DATABASE\WILEY138.L Hexanamide Dodecanamide Hexanamide	3267 000628-02-4 50 34318 001120-16-7 49 119400 000628-02-4 42
79	25.83	0.79	C:\DATABASE\WILEY138.L Carbonic acid, isobutyl phenyl ester Carbonic acid, butyl phenyl ester Pyrazine, methyl	127858 013183-18-1 64 31736 004824-76-4 50 117503 000109-08-0 36
80	25.88	0.38	C:\DATABASE\NIST98.L Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) e 2,3-Difluoroaniline 2,4-Difluoroaniline	58245 000103-23-1 47 58349 004519-40-8 43 58348 000367-25-9 43
81	25.92	0.83	C:\DATABASE\NIST98.L 1-Propanesulfonic acid, 3-chloro-, ph Benzene, (cyclohexyloxy)- .alpha.-D-Gulofuranoside, phenyl-	40566 021297-87-0 50 40880 002206-38-4 45 40655 1000150-07-4 42
82	26.09	0.63	C:\DATABASE\WILEY138.L P-MENTHA-1,5-DIEN-8-OL Benzene, (octyloxy)- Benzene, (octyloxy)-	13648 001686-20-0 59 128871 001818-07-1 59 37587 001818-07-1 45
83	26.15	0.44	C:\DATABASE\WILEY138.L Benzene, (1,1-dimethylethoxy)- Benzene, (octyloxy)- .ALPHA.-D-GULOFURANOSIDE, PHENYL-	123709 006669-13-2 50 120871 001818-07-1 39 58734 000000-00-0 9
84	26.65	0.35	C:\DATABASE\WILEY138.L Benzene, (octyloxy)-	37587 001818-07-1 59

7. ábra. Részlet a vízminták GC-MS módszerrel történő vizsgálati jegyzőkönyvből. A listában több ismeretlen szerves szennyezőazonosítása figyelhető meg. A 80-as sorszámnál a későbbiekben vizsgálataink tárgyát képező vegyület a 2,4 -difluoroanilin látható.

3.4 Hígítások készítése

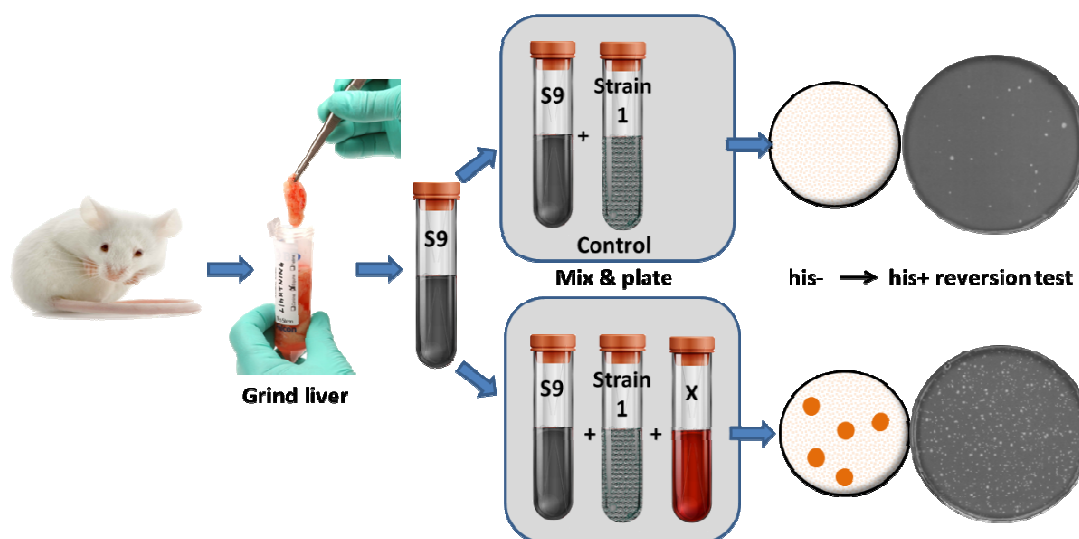
Az n-hexános oldatokat egyesítettük, majd nitrogén gázzal légszárakra bepároltuk, a légszáraz maradékot dimetil-szulfoxid-ban oldottuk, és 2,00 ml törzsoldatot készítettünk. Ez a 2,00 ml törzsoldat 100 liter vízmintában lévő, gyantaoszlopokon adszorbeált anyagokat tartalmaz. Ebből az oldatból logaritmikus hígítási sort készítettünk. A hígítási sorból 0,05-0,05 ml törzsoldatot mértünk a lemezekre. Ez a térfogat a vízminta 0,00-0,09-0,28-0,83-2,50 literének felel meg.

3.5 In vitro vizsgálatok

3.5.1. Genotoxicitási vizsgálatok

3.5.1.1. Ames-teszt

A Salmonella reverz mutációs teszt Bruce N. Ames és munkatársai által 1975-ben közölt módszer, ami kidolgozója nevére vált ismertté, és napjainkra a legáltalánosabban használt eljárás lett a kémiai anyagok mutagenitásának kimutatására. Egyre szélesebb körben alkalmazzák a környezeti mintákból készített extraktumok tesztelésére is. A vizsgálati rendszer lehetőséget nyújt a pontmutációk, azaz a deléció, szubsztitúció, bázispárcserét okozó és a frameshift mutagének elkülönítésére, továbbá a metabolikus aktivációt nem igénylő direkt mutagének, és a nagyobb számú, metabolikus aktivációt igénylő indirekt mutagének elkülönítésére is (8. ábra).



8. ábra. Az Ames teszt sematikus bemutatása (Griffith nyomán módosítva). Részleteket ld. a szövegben

A teszt alapja, hogy az alkalmazott Salmonella typhimurium baktérium törzs egy defekt, mutált gént tartalmaz a genomjában, ami alkalmatlanná teszi arra, hogy a médiumból, amiben tenyészik, hisztidint (His) állítson elő. Abban az esetben, ha valami hatás következtében újabb mutáció során ez a gén visszanyeri eredeti, funkcionáló alakját, a revertáns baktériumok His-mentes táptalajon is képesek lesznek szaporodni. Ezek, az ún. hisztidin-auxotróftörzsek mutáció hatására tehát visszanyerik a hisztidin-mentes környezetbeni szaporodó-képességüket, így hisztidin-mentes agaron a

Salmonella telepek megjelenése mutagén anyag jelenlétét jelzi. Ezen modellrendszerben tesztelt vegyi anyagok pozitív eredmény esetén még nem biztos, hogy emlős sejteken is mutagénnek bizonyulnak, a relevancia 80% körüli.

Számos anyag eredeti formájában nem mutagén (vagy karcinogén), de a szervezetben történő metabolizációjuk során keletkezhetnek belőlük aktív, egészségre káros formák. Miután a *S. typhimurium* prokarióta, benne ez a metabolizáció természetesen nem játszódhat le. Ezt a problémát oldja meg a kísérletben alkalmazott S9 mix, ami patkánymáj kivonat és az eukarióta májban fellelhető enzimrendszereket helyettesíti. A teszthez különböző jelzésű Salmonella törzseket használhatunk (pl. TA98, TA100), amik egymástól abban különböznek, hogy milyen típusú mutáció detektálására a legérzékenyebbek (pl. frameshift mutáció, pontmutáció, 2. táblázat). A teszt értékelése a revertáns klónok telepeinek összeszámlálásából és statisztikai elemzéséből áll.

Törzs neve	Módosítást tartalmazó allél	Módosítás és célszekvencia	Reverz mutáció típusa, amelyre érzékeny	R-faktor: Plazmid
TA 1535	hisG46, rfa, uvrB	CTC (leucin)→GGG (prolin)	bázis-pár csere: tranzíció, transzverzió	-
TA 1537	hisD3076, rfa, uvrB	kereteltolódás (+ 1 bázis) CCC ismétlődő szakasz körül	kereteltolódás	-
TA 1538	his3052, rfa, uvrB	Kereteltolódás (-1 bázis) CGCGCGCG ismétlődő szakasz körül	kereteltolódás	-
TA 102	hisG428, rfa	CAAGTAAGAGC	A:T bázis-pár csere, cross-linking(keresztkötés),	pKM101, pAQ1
TA 97	hisD6610, rfa, uvrB	CCCCCC	kereteltolódás	pKM101
TA 98	hisD3052, rfa, uvrB	CGCGCGCG	kereteltolódás	pKM101
TA 100	hisG46, rfa, uvrB	CCC	bázis-pár csere	pKM101

2. táblázat. Különböző Salmonella teszt-törzsek és egyes lényeges tulajdonságaik. Piros színnel az általunk használt teszt-törzsek vannak feltüntetve.

A teszteléshez olyan teszt-törzseket alkalmazunk, melyek hisztidin-operonja többféle változtatást hordoz emiatt ezek a törzsek nem képesek hisztidin szintézisére újabb mutáció vagyis reverz-mutáció nélkül. A reverz mutáció, és a mutációk általában kétféleképpen jöhetnek létre: spontán módon és vegyszerek által indukáltan. A teszt az indukált mutációs hatások mérésére szolgál.

A tesztörzsek a hisztidin-operon módosításán kívül olyan módosításokat tartalmaznak, amelyek megkönnyítik a his-auxotróf sejtek kisselektálását (pl. antibiotikumrezisztencia) és az érzékenységet (lipopoliszacharid réteg képzésének hiánya) is. Az érzékenységet növeli, hogy a törzsek DNS javító mechanizmusa hiányzik.

Érzékenység a mutagén hatásokra

A hisztidinoperon különböző pontjain az egyes törzsek különböző módosításokat (hisD, hisG, hisC módosítás helye a hisztidin génjén) tartalmaznak, ezeket is mutációval idézték elő, majd a tesztben a mutagén hatásra ezek vissza mutálódnak (= revertálódnak), az eredeti módosítás azonban meghatározza azt is, hogy a törzs milyen típusú mutagén hatásra lesz érzékeny (pontmutáció, kereteltolódás). A hisztidinoperonon elvégzett módosítások helyei ún. hotspotok olyan helyek, amelyek nem túl stabilak, gyenge pontok, így itt gyakori a mutáció, normális sejtben a „beépített javító mechanizmus” itt gyakran dolgozik.

Ames-teszthez szükséges tápoldatok elkészítése

Minimál glükóz agarlemez készítése

Összetevők 1000 ml-re számítva:

- 914 ml desztillált víz
- 17 g agar
- 20 ml 50X Vogel-Bonnorsó oldat
- 50 ml 40 %-os glükóz oldat

Elkészítjük az agart a desztillált vízzel és sterilizzuk. Az 50X Vogel-Bonnorsó oldatot, a 40%-os glükóz oldatot külön sterilizzuk, és a Petri-csészére való kiöntés előtt adjuk hozzá a forró, de nem 100°C-os agarhoz. Ügyeljünk a sorrendre (1. 50X V-B sóoldat, 2. 40%-os glükóz oldat)! Ezután ha megszilárdul az agar, már nem lehet vissza olvasztani, mert a glükóz bomlásnak indul és az agar megbarnul.

Top agar

0,6 % agar és 0,5 % NaCl-.ot tartalmaz, sterilizálás után 10 ml His/Bio oldatot adunk 100 ml top agarhoz.

50X Vogel-Bonnarsóoldat

—670 ml desztillált víz

—10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

—100 g Citromsav monohidrát

—500 g K_2HPO_4

—175 g $\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

A készítésnél a sókat ebben a sorrendben adjuk a desztillált vízhez folyamatos kevergetés és óvatos melegítés mellett.

S9 mix 50 ml

-2-5 ml S9

-1 ml MgCl_2 -KCl oldat

-0,25 1M-os glükóz-6-foszfát oldat

-2 ml 0,1 M-os NADP

-25 ml 0,2 M-os foszfát puffer pH 7.4

50 ml-re kiegészítjük steril desztillált vízzel

MgCl_2 -KCl oldat 500 ml

—61,5 g KCl

—40,7 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1 M-os glükóz-6-foszfát oldat 2,82 g/10 ml desztillált víz

0,2 M-os foszfát puffer pH 7.4

—60 ml 0,2 M-os $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (13,6 g/500 ml)

—440 ml 0,2 M-os Na_2HPO_4 (14,2 g/500 ml)

NADP oldat 383 mg NADP/5 ml desztillált víz

Ampicillin oldat ampicillin trihidrát 0,8 g/ 100 ml 0,02 M-os NaOH

Tetraciklin oldat 8 mg tetraciklin/ 1 ml 0,02 M-os HCl

Kristályibolya oldat 0,1 g/100 ml

Ames-teszt menete

1. lépés: lemezöntés – teszt vegyület 0,1 ml; metabolikus aktiváció: S9 mix 0,05 ml; Salmonella tesztörzs 0,1 ml (kb.: 10^8 élő sejt); 2 ml 45 °C-os Top agar → minimál glükóz agar
2. lépés: inkubáció – 37 °C-on 48-72 órán át, fénytől védve
3. lépés: telepszámlálás – az inkubációs idő letelte után megszámloljuk a kinőtt telepeket
4. lépés: eredmények értékelése

Teszt törzsek

TA-98 és TA-100 hisztidin auxotróf Salmonella typhimurium LT-2 mutáns törzsek, a teszt törzsek genotípusát Maron és Ames szerint ellenőriztük.

Negatív kontroll: 0,05-0,05 ml dimetil-szulfoxid

Pozitív kontroll: TA-98 és TA-100 teszter törzsnél +S9 mix aktiválás esetén 2µg/lemez 2-aminoantracént tettünk az elegybe; –S9 mix aktiválás nélkül: a TA-98 teszter törzsnél 2µg/lemez Nátrium-azidot, a TA-100 teszter törzsnél 4µg/lemez 4-Nitro-*o*-feniléndiamint használtunk.

Sterilitási kontroll: Az ivóvízminta extraktumok legnagyobb dózisékat, az S9-mixet, az extrakcióra használt oldószer légszáraz maradékának DMSO oldatát (“vak”) a mutagenitási teszteléssel megegyezően eljárva sterilitásra ellenőriztük.

A vízminta extractum tesztelése (praeinkubációs teszt): 2-3 üveg kémcsőbe szobahőmérsékleten 0,50-0,50 ml S9 mixet (vagy puffert) 0,10-0,10 ml baktérium tenyészet szuszpenziót, 0,50-0,50 ml vízminta extractum dimetil-szulfoxidos hígítását (vagy oldószert) mértünk. Az elegyet 30 percig rázattuk 37°C-os vízfürdőben, majd szobahőmérsékleten 2,0-2,0 ml 45°C-os top agart mértünk a kémcsövekbe. A homogén elegyet minimal agar lemezre öntöttük, a táplemez felületén egyenletesen eloszlattuk. A top agar lemezeket a megdermedés után 37°C-on inkubáltuk 48-70 órán keresztül. A revertáns telepeket megszámloltuk Domino automata képanalizátorral (Perceptive

Instruments Ltd., Halstead, Essex, UK). A háttérnövekedést tízszeres nagyítású objektívvel ellenőrizzük.

3.5.2 Az eredmények statisztikai-matematikai elemzése és a mutagenitási teszt értékelése

A regressziós együtthatók, a regressziós állandók, a korrelációs koefficiensek és a Student féle kétoldali t-teszteket egy fx-7500gG kalkulátor segítségével számoltuk ki. Az adatsorokból származó átlagokat és standard hiba értékét minden koncentráció csoportban kiszámoltuk és ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, a szignifikancia szintje $p < 0.05$ volt.

Pozitív mutagén aktivitásról akkor beszélhetünk egy vizsgált anyag esetében, ha:

1. A revertáns baktériumok száma legalább három egymást követő hígításban emelkedik.
2. A legkisebb hígításban a baktériumok száma a kontollhoz viszonyítva legalább a kétszeresére emelkedik.
3. Revertáns baktériumszám és a vízminta extraktum adagja a statisztikai matematikai összefüggés elemzés szerint: lineáris regressziót, korrelációt ad. A korrelációs együttható a Student-féle kétoldali t-próbával számítva t-eloszlást mutat.
4. A vizsgálathoz használt teszter törzsek genotípusa megfelel Ames leírásának (Maron & Ames, 1983).
5. A vizsgálati vízminta steril.
6. A vizsgálati vízminta nem toxikus.

3.5.3 Apoptózis vizsgálat

A sejtszrendszerek működését szabályozó egyik legfontosabb mechanizmus a program szerinti sejthalál, az apoptózis. Ez távolítja el a feleslegessé vált vagy a károsodott sejteket, megakadályozva többek között azt, hogy a genetikai állományokban hibát hordozó sejtek szaporodjanak. Minden olyan tényező, amely az apoptózis ellen hat, potenciálisan a daganatkeletkezést elősegítőnek tekinthető, hiszen a sejthalál

elmaradásával megnő az esélye annak, hogy a sejtek génhibáikkal együtt felhalmozódjanak.

Az apoptózis jelensége már régóta ismert, morfológiailag igen hasonló lehet a nekrozis során megfigyelt piknózishoz, de a nekrozistól való elkülönítése alig négy évtizedes. Morfológiai jellegzetességei közé tartoznak: a citoplazma kitüremkedések (blebek) megjelenése, a sejt zsugorodása, a kromatin zsugorodása, a kromatin kondenzációja a sejtmag membrán mentén (marginizáció), a lebontott sejt-komponensek membránokba csomagolása (apoptotikus testek). Metszetekben HE-festéssel elsősorban az utóbbiakat lehet jól megfigyelni. Az apoptotikus sejt maradványait a környező makrofágok vagy parenchyma sejtek bekebelezik, lebontják anélkül, hogy a sejt alkotórészek a környezetbe kerülnek. Ezért a nekrotikus sejtekkel ellentétben az apoptózis nem vált ki gyulladást, bár a fagocitáló sejteket aktiválhatja, és így az immunrendszert stimulálhatja. Ha az immunrendszer erősebb, akkor a nekrozishoz hasonló jelenségek is felléphetnek: sejtduzzadás, a sejt membrán korai károsodása (másodlagos nekrozis). Feltételezések szerint az apoptózis és a nekrozis bekövetkeztét az határozza meg, hogy a sejtpusztulás programjához elegendő ATP áll-e rendelkezésre. Ha igen, akkor apoptózis következik be: a sejtmembrán és a sejtorganellek egy ideig még működőképesek, ha nem, akkor nekrozis lép fel: a sejtmembrán károsodása nyomán az elhalt sejt alkotórészei a környezetbe jutnak, ami a gyulladást okozó sejtek megjelenését provokálja (Kopper, 2003).

3.5.4 Felhasznált sejtek

A perifériás lymphocytákat három, nemdohányzó 25-32 év közötti egészséges felnőtt férfiből nyertük venipunktúrával, K-citrát tartalmú fiolák segítségével; a kinyert vér egy órán belül felhasználásra került. A mononucleáris sejteket Boyum által leírt módszer szerint szeparáltuk (Boyum 1968). A lymphocytákat Bürker kamra segítségével számoltuk és 24-lyukas Greiner (Kremsmünster, Austria) plate-ekre helyeztük RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich, Magyarország). A sejtek száma a plate-re helyezéskor 5×10^5 /ml volt.

3.5.5 A lymphocyta sejt kultúrák vizsgálata

A különböző kezeletlen és kezelt vízmintákból származó tisztítási melléktermékeket inkubáltuk a lymphocytákkal, egy órával a kultúrák létrehozását követően. Kontrollként DMSO szolgált. A kísérleteket a kezelés kezdetétől számított öt óra múlva befejeztük.

3.5.6 Flow-citometria

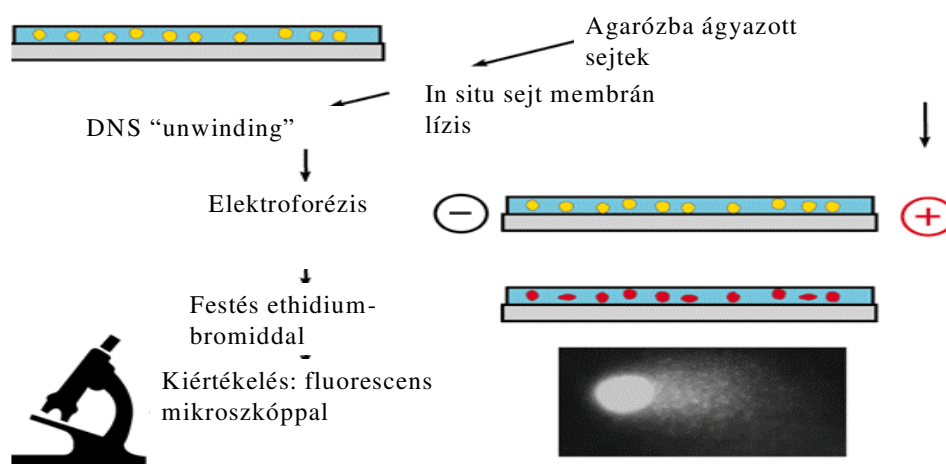
A kísérletek végén a lymphocytákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os 70%-os etanolban fixáltuk 24^{h} órán keresztül. A lymphocytákon végzett Flowcitometria (DNS tartalom meghatározás) FACScan flow cytométerrel történt (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA), Macintosh Quadra computer és Cellquest adatelemző software felhasználásával. Az apoptotikus sejtek számát és a sejtciklus vizsgálatát Modifit software segítségével végeztük. A sejtek szuszpenzálását Schuler et al. szerint végeztük (Schuler *et al.*, 1994). Röviden, az etanol fixálás után az internukleoszómálisan fragmentált DNS-t eltávolítottuk az apoptotikus sejtekből RNázal kiegészített citrát pufferben ($\text{pH}=7.8$), majd a DNS tartalmat flow-cytometriával határoztuk meg. Minden koncentráció esetén a kontroll és három kísérleti minta került mérésre.

3.5.7 Comet-teszt

Lényegileg sejtszintű elektroforetikus vizsgálat egyes és kettős szálú DNS-törések identifikálására. Első lépésként a kezelt lymphocytákat is tartalmazó sejteket centrifugával besűrítettük, majd agarózba (Sigma-Aldrich, Magyarország) szuszpendálva „szendvicsbe” ágyasztuk. Fontos az agaróz sűrűségének megfelelő beállítása, hogy benne, miután megszilárdult, az apoptózisra jellemző 2-300kbp-nyi fragmentek, amik a jellegzetes apoptotikus létrát is adják, az elektroforézis során vándorolni tudjanak, de a nagyobb DNS darabok, amik apoptózisra nem patognomikusak, méretüknél fogva ne tudjanak beágyazott helyükről elmozdulni. (Ajánlásokat követve 0,5%-os LMP agarózt használtunk.) A sejtmembrán lizálására azért van szükség, mert apoptózis során a membránok intaktak maradnak, szemben a

nekrózissal. A lizáláshoz az oldat tritont tartalmaz (NaCl, EDTA, Tris, DMSO, Triton), a folyamat 4°C-on, sötét helyen, 1órán át tart. Az elektroforézis 15percig, 300mA-rel, 25V-on történik. Ezután történik a festés EtBr-dal, majd a fluorescens vagy confocalis mikroszkópos értékelés. A jellegzetes apoptotikus sejt leginkább egy üstököshöz hasonlítható, melynek csóvája tartalmazza a megfestett, fluoreszkáló DNS-fragmenteket.

COMET-teszt



10. ábra. A Comet teszt sematikus bemutatása

3.6 In vivo vizsgálatok

3.6.1. Állatok tartása és kezelése

Az AB zebra danió törzset használtuk vizsgálataink során (11. ábra). A felnőtt halakat 25°C-on, 7.0 ± 0.2pH-n tartottuk, a víz vezetőképessége 525±50 µS volt és 14 órás nappali, ill. 10 órás éjszakai megvilágítási ritmust alkalmaztunk. A halakat víz visszaforgató rendszerrel ellátott tartályokban tartottuk a kísérletek előtt (Zebtec,

Tecniplast S.p.a., Olaszország). A halakat naponta kétszer etettük egy kifejezetten nekik készült teljes értékű táppal (SDS Small Gran, Dietex International Limited Special Diets Services G.B.) igény szerinti mennyiségben, illetve heti két alkalommal frissen kelt artemia lárvát (*Artemia salina*, sórák, 11. ábra) is kaptak az állatok. Az alkalmazott protokoll a hatályos magyar és intézményi törvényeknek és jogszabályoknak megfelelt (22.1/518/003/2008).

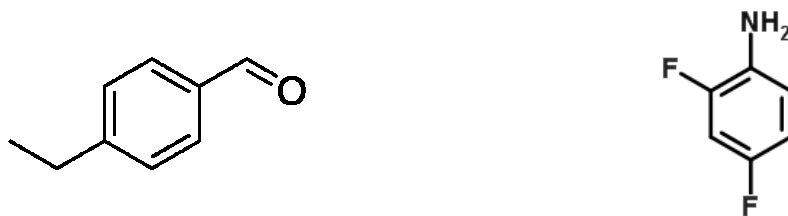


11. ábra. A kísérletek során használt zebraadánió (*Danio rerio*, balra; forrás: SZIE, Halgazdálkodási Tanszék) és a legfőbb tápanyagforrásuk a kísérletek során, a sórák naupliusza (*Artemia salina*, jobbra; forrás: SZIE, Halgazdálkodási Tanszék)

3.6.2 Akut toxicitás vizsgálat

Az LC_{50} értékét az OECD iránymutatásoknak megfelelően határoztuk meg (OECD, 1992), amely a halakra vonatkozó akut toxicitási tesztek leírását tartalmazza. Az általunk vizsgált két anyag az EBA és a DFA (12. ábra) előzetes vizsgálatok alapján került kiválasztásra. A törzsoldat 1000 mg/l volt. A dózis-hatás összefüggést leíró függvények illetve a hozzájuk kapcsolódó R^2 értékek a következők voltak: DFA: $y=94.538 \ln(x)-277.77$ $R^2 =0.95$; EBA: $y= 72.135 \ln(x)-180.38$ $R^2 =0.80$. Az R^2 négyzet érték az eredmény megbízhatóságát adja meg. Azt jelenti, hogy a kapott eredmények (az adott koncentrációhoz tartozó elhullási értékek) a számolt egyenesre/görbére (dózis-hatás görbe vagy egyenes) mennyire illeszkednek. Tehát minél nagyobb az R négyzet érték, annál pontosabb az eredményünk. Semi-statisztikus tesztként az oldatokat 48 óránként cseréltük. A halakat 96 órán keresztül inkubáltuk az adott vizsgálandó anyagban. Az elpusztult állatokat a 96 óra leteltével számoltuk, és meghatároztuk azt a koncentrációt, amely éppen a halak 50%-át pusztította el (LC_{50}). Az esetlegesen előforduló és megfigyelhető látható elváltozásokat feljegyeztük (e.g.

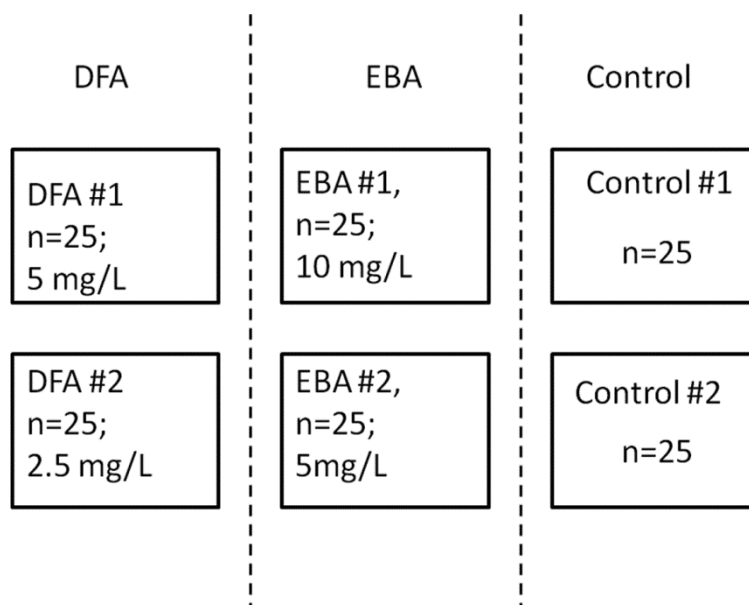
egyensúlyvesztés, úszási viselkedés, légzőfunkciók épsége, pigmentáció, stb.). A pH, az oldott oxigén és hőmérsékleti értékeket naponta mértük.



12. ábra. A 4-etilbenzaldehydEBA (bal) és a 2,4-difluoroanilinDFA (jobb oldal) kémiai szerkezete

3.6.3 A zebradániók kezelése

A haltenyészeteket egymástól függetlenül kezeltük minden hatóanyag két különböző koncentrációjával, dupla csoportokban. A kísérletekben alkalmazott oldatkonzentrációk a következők voltak: 2.5 mg/l és 5 mg/l EBA ill. 5 mg/l és 10 mg/l DFA. Az alkalmazott koncentrációkat *in situ* alkalmaztuk, a korábban meghatározott szubakut LC10 érték alatt (ld. LC50 meghatározás). A kontroll csoportokat – szintén dupla csoportokban – EBA és DFA mentes médiumban tartottuk. Minden kísérleti és kontroll csoportban 25 felnőtt hal volt, nemre tekintet nélkül, a halak denzitása a tartóedényben pedig 0.4-0.5 g/l volt (13. ábra). Általánosságban elmondható, hogy egy adott kísérleti elrendezés során a halak denzitása nem darabszám alapján kerül megállapításra. A szabványosított (ISO vagy OECD) (nagy)halas tesztekben (ahol nem embriókat használnak) általánosan használják a g hal/liter értéket a kísérlet beállításakor. A szabványosított teszteknel a maximális halasításnak 1g hal/ liter érték alatt kell lennie. Ez a telepítési mutató a halas kísérleteknél általánosan elfogadott. A halakat a telepítés előtt csoportosan megmértük így kaptuk az értéket. Egyébként egy felnőtt zebradánió átlagosan 0,3-0,4 g.



13. ábra. Az egyes halcsoportok kezelési kondícióinak egyszerűsített sémája

Az oldatokat 96 óránként cseréltük; a halakat naponta kétszer etetjük egy kifejezetten nekik készült teljes értékű táppal (SDS Small Gran) igény szerinti mennyiségben, ezt a tápos etetést egészítjük ki hetente kétszer frissen keltetett sórák lárvákkal (sórák, *artemia salina*). A vizet nem levegőztettük, a kísérletek alatt a víz oxigén-telítettségi értéke végig 80% fölött volt. A halak viselkedését naponta kétszer regisztráltuk, majd hetente minden csoportból két halat további vizsgálatok végett eltávolítottunk, és feldolgoztunk. Eutanázia előtt a halakat MESAB (0.4% Trikain Metáneszulfonát, 1% Na₂HPO₄ 10% Hanks' oldatban) felhasználásával anaesthetisáltuk.

3.6.4 Zebradánió szövettan

A halakat 4%-os, PBS-ben oldott paraformaldehid oldatban fixáltuk 24-48 órán keresztül, majd PBS mosást követően felszálló alkohol sorban és xilolban dehidráltuk, végül paraffinba ágyztuk. A halakat sagittális síkban elvágtuk a középvonaltól kissé laterálisan, majd minkét halrészről 4–6 µm vastag metszeteket készítettünk. Az így készült metszeten a szöveti alkotóelemeket klasszikus hematoxilin-eozin (HE) ill. Kongóvörös (CR) festéssel, vagy PAS-reakcióval (Periodic Acid-Schiff) vizualizáltuk.

3.6.5 A víztisztítási melléktermékek okozta zsíros májkárosodás kvantitatív vizsgálata digitális mikroszkópiával

A két vizsgált DBP molekula, az EBA és DFA májra gyakorolt hatását digitális mikroszkópiával vizsgáltuk. Röviden, automata képanalízist alkalmaztunk a hepatocytákban végbemenő zsíros degeneráció meghatározásához és kvantifikációjához (Mulrane *et al.*, 2008). Mindegyik DBP esetében két koncentrációt alkalmaztunk (2.5 és 5 mg/l az EBA esetében és 5 ill. 10 mg/l DFA esetében). A hematoxilin-eozin festéssel készült zebradánió-máj metszeteiről digitális (optikai) metszettelvételeket készítettünk. Ezek a digitális metszetek alkalmasak arra, hogy a megfelelő mikroszkópos információkat kinyerjük belőlük, bármekkora nagyításon, továbbá rendkívül könnyű a tájékozódás rajtuk, az adott struktúrák jelölhetőek, és pontos mérések végezhetőek a metszeten. A digitális formában tárolt adatokból lehetséges további szegmentáció is, akár színre, akár szín-intenzitásra, vagy az adott objektumok formájára vonatkozóan.

További előnye a módszernek, hogy rendkívül jó minőségűek az ilyen formában tárolt szövettani képek, és a kvantifikáció az egymást követő mintákon automatikusan elvégezhető. Az értekezésben bemutatott vizsgálatokat a 3DHISTECH által kifejlesztett PANNORAMIC rendszerrel végeztük. (Krenacs *et al.*, 2010). Mindkét koncentráció alkalmazása során két-két csoport halat vizsgáltunk az adott kísérleteknél jelzett időtartamig. A kontroll csoportba tartozó halakat EBA és DFA mentes médiumban tartottuk. A mintaként kiválasztott halak májából véletlenszerűen választottunk ki területeket, melyeket a megfelelő szövettani előkészítés után 450x-es nagyításon vizsgáltunk, a szövettani képet digitálisan rögzítettük, majd a nem-festett lipid-cseppek által elfoglalt területeket - szintén digitális képanalízist követően - kvantifikáltuk a hepatocytákban.

4. Eredmények

4.1 A vízminták klór-, ózon- és szerves széntartalmának mérési eredménye

A klór adag $0,5 \text{ g/m}^3$ és az alkalmazott kontaktus ideje legalább 30 perc volt.

A fertőtlenítés (oxidálás) során az ózon (O_3) adag: $0,75 \text{ g/m}^3$, a kontaktus ideje pedig 7 perc volt. A vízben $0,04 \text{ g O}_3/\text{l}$ koncentráció maradt a kontaktus idő végén.

A nyers, kezeletlen víz $2,56\text{-}3,95 \text{ mg/l}$ szerves szénvegyületeket tartalmazott, a kezelt víz pedig $1,91\text{-}2,90 \text{ mg/l}$ szerves szénvegyületeket tartalmazott. Ezek az értékek a nyers vízben mintegy kétszeresen-, a kezelt vízben majd' másfélszer nagyobbak voltak, mint az ajánlott 2 mg/l érték.

4.1. In vitro vizsgálatok I.:Kezeletlen vízminta mutagén aktivitása

A kezeletlen vízminta adag és a revertáns baktériumszám vizsgálati adatai Serdolit PAD III. gyantaoszlopon, TA-98 és TA-100 teszter törzs esetén, aktiválás nélkül és aktiválással az 3. és 4. táblázatban láthatók. A mutagén aktivitás összefoglaló értékelése a TA-98 teszter törzsnél a 11. táblázatban, a TA-100 teszter törzsnél a 12. táblázatban szemlélhető.

Az említett táblázatok adatai szerint a kezeletlen kútvíz a TA-98 teszter törzs esetén a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrációval aktiválás nélkül, ill. aktiválással sem mutagén.

A TA-100 teszter törzsnél azonban aktiválással mutagenitás mutatható ki. A revertáns baktériumszám és a vízminta adag között lineáris regressziós összefüggés, igen szoros korreláció van. A vízminták a pozitív mutagén aktivitás kritériumait kielégítik.

A vízminta adag és a revertáns baktériumszám vizsgálati adatait Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon a TA-98 és a TA-100 teszter törzseknél aktiválás nélkül és aktiválással a 5. és 6. táblázat tartalmazza. A mutagén aktivitás összefoglaló értékelését a TA-98 teszter törzsnél a 11. táblázatban, a TA-100 teszter törzsnél a 12. táblázatban mutatjuk be.

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-100/ -S9 Mix				
0,00*	171	153	143	156
0,09	154	161		158
0,28	184	178		181
0,83	175	182		179
2,5	189	153		171
TA-100/ +S9 Mix				
0,00*	177	201	199	192
0,09	191	212		202
0,28	278	222		250
0,83	523	556		540
2,50	1020	937		979
<p>4. táblázat. A kezeletlen csápos- kútvíz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai SERDOLIT PAD III. töltetű gyantaoszlopon TA-100 baktériumtörzs esetében, -S9 Mix: aktiválás nélkül, +S9 Mix: aktiválással. 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll</p>				

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-98/ -S9 Mix				
0,00*	31	37	34	34
0,09	52	38		45
0,28	78	63		71
0,83	45	27		36
2,5	30	26		28
TA-98/ +S9 Mix				
0,00*	51	56	40	49
0,09	66	60		63
0,28	91	107		99
0,83	167	141		154
2,50	93	102		98
<p>5. Táblázat. A kezeletlen csápos- kútvíz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai AMBERLITE XAD-2 töltetű gyantaoszlopon TA-98 baktériumtörzs esetében, -S9 Mix: aktiválás nélkül, +S9 Mix: aktiválással. 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll</p>				

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-100/ -S9 Mix				
0,00*	171	153	143	156
0,09	219	210		215
0,28	103	127		115
0,83	78	84		81
2,5	43	60		52
TA-100/ +S9 Mix				
0,00*	177	201	199	192
0,09	241	265		253
0,28	391	398		395
0,83	542	603		573
2,50	201	199		200
6. táblázat. A kezeletlen csápos- kútvíz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai AMBERLITE XAD-2 töltetű gyantaoszlopon TA-100 baktériumtörzs esetében, -S9 Mix: aktiválás nélkül, +S9 Mix: aktiválással. 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll				

4.2. In vitro vizsgálatok II. A kezelt vízminta mutagén aktivitása

A kezelt kútvíz adag és a revertáns baktériumszám vizsgálati adatát a Serdolit PAD-III. gyantaoszlopon a TA-98 és a TA-100 teszter törzsnél aktiválás nélkül és aktiválással az 7. és 8. táblázat mutatja. A TA-98 teszter törzsre vonatkozó összefoglalást a 11. táblázat és a TA-100 teszter törzset illetően a 12. táblázat tünteti fel.

A kezelt kútvíz a TA-98 teszter törzsnél a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrációt követően aktiválás nélkül, és aktiválás után sem mutatott mutagén aktivitást (7. és 11. táblázat). Ugyanakkor az Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt koncentráció után aktiválás nélkül és aktiválás után is mutagén hatást észleltünk (9. és 12. táblázat).

A TA-100 teszt törzs esetében a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrációt követően a vízminta extrakció után csak aktiválással váltott ki pozitív mutagén hatást

(8. és 12. táblázat). Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt koncentráció után a minta mind aktiválással, mind aktiválás nélkül mutagén hatással rendelkezett (10. és 12. táblázat).

Mindezek alapján a kezelt vízmintákból származó víztisztítási reakciótermékek az általunk vizsgált víz esetében mutagénnek bizonyultak (14.ábra).

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-98/ -S9 Mix				
0,00*	31	37	34	34
0,09	35	29		32
0,28	38	33		36
0,83	33	34		34
2,5	35	36		36
TA-98/ +S9 Mix				
0,00*	51	56	40	49
0,09	50	53		52
0,28	49	53		51
0,83	68	44		56
2,50	79	78		79
7. Táblázat. A kezelt csápos- kútvíz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai SERDOLIT PAD-III. töltetű gyantaoszlopon TA-98 baktériumtörzs esetében. 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll				

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-100/ -S9 Mix				
0,00*	171	153	143	156
0,09	186	179		183
0,28	147	197		172
0,83	160	174		157
2,5	168	191		180
TA-100/ +S9 Mix				
0,00*	177	201	199	192
0,09	198	188		193
0,28	194	161		178
0,83	241	230		236
2,50	488	512		500
8. Táblázat. A kezelt csápos- kútvíz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai SERDOLIT PAD III. töltetű gyantaoszlopon TA-100 baktériumtörzs esetében, -S9 Mix: aktiválás nélkül, +S9 Mix: aktiválással. 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll				

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-98/ -S9 Mix				
0,00*	31	37	34	34
0,09	43	32		38
0,28	36	28		32
0,83	40	33		37
2,5	69	75		72
TA-98/ +S9 Mix				
0,00*	51	56	40	49
0,09	59	64		62
0,28	64	71		68
0,83	69	77		73
2,50	124	136		130
<p>9.Táblázat. A kezelt csápos- kút víz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai AMBERLITE XAD-2 töltetű gyantaoszlopon TA-98 baktériumtörzs esetében, -S9 Mix: aktiválás nélkül, +S9 Mix: aktiválással, 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll</p>				

Víz minta (l/lemez)	Revertáns baktériumok száma			Átlag
TA-100/ -S9 Mix				
0,00*	171	153	143	156
0,09	207	214		211
0,28	201	171		186
0,83	294	323		309
2,5	417	397		407
TA-100/ +S9 Mix				
0,00*	177	201	199	192
0,09	152	160		156
0,28	155	182		169
0,83	291	335		313
2,50	472	469		471
<p>10.Táblázat: A kezelt csápos- kút víz mutagén potenciáljának vizsgálati adatai AMBERLITE XAD-2 töltetű gyantaoszlopon TA-100 baktériumtörzs esetében, -S9 Mix: aktiválás nélkül, +S9 Mix: aktiválással, 0,00*: Negatív, oldószeres kontroll</p>				

SERDOLIT PAD III GYANTAOSZLOP			AMBERLITE XAD-2 GYANTAOSZLOP	
KEZELETLEN VÍZ			KEZELETLEN VÍZ	
S9-Mix aktiválás	-	+	-	+
Számítások paraméterei				
A	-	-	33,77	52,98
B	-	-	130,60	125,91
y	-	-	$y=33,77+130,60*x$	$y=52,98+125,91*x$
r	-	-	0,94	0,97
p	-	-	<0,01	<0,001
KEZELT VÍZ			KEZELT VÍZ	
S9-Mix aktiválás	-	+	-	+
Számítások paraméterei				
A	-	-	53,38	24,24
B	-	-	30,25	18,77
y	-	-	$y=53,38+30,25*x$	$y=24,24+18,77*x$
r	-	-	0,97	0,97
p	-	-	<0,001	<0,001

11. Táblázat: A kezeletlen és kezelt víz mutagén aktivitásának összefoglaló értékelése a **TA-98** teszter törzsnél

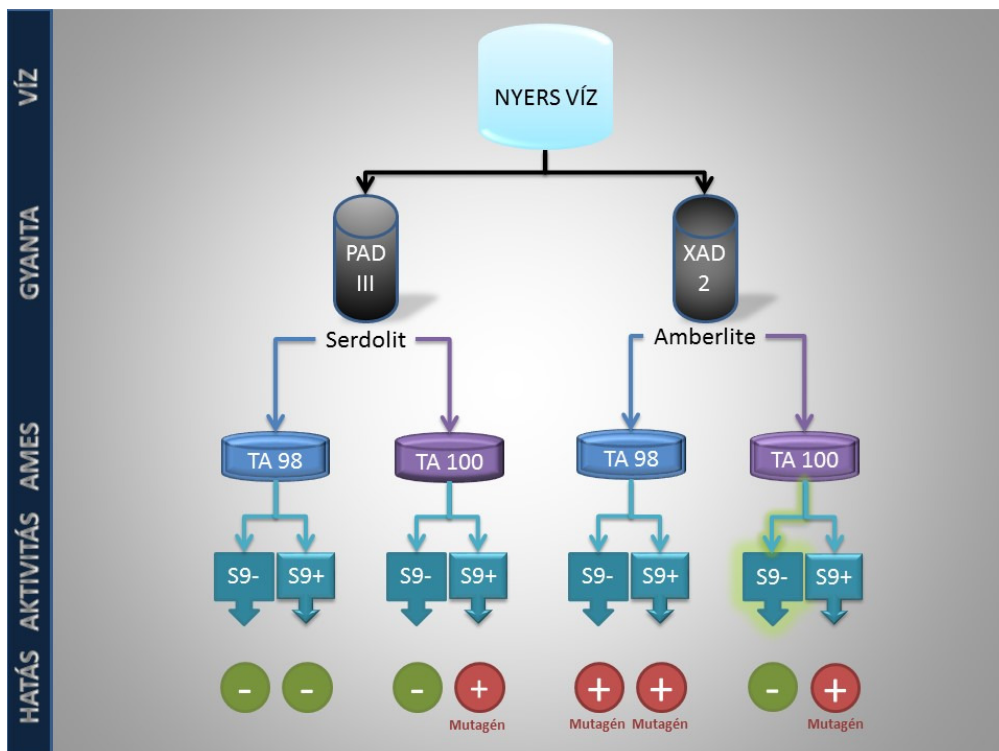
Betűjelölések:
 $y=A+B*x$, ahol y a revertáns baktériumszám,
 "A" a regressziós állandó,
 "B" a regressziós együttható,
 "x" a vízminta (l/lemez),
 "r" korrelációs együttható,
 "p" a szignifikancia szint.

SERDOLIT PAD III GYANTAOSZLOP			AMBERLITE XAD-2 GYANTAOSZLOP	
KEZELETLEN VÍZ			KEZELETLEN VÍZ	
S9-Mix aktiválás	-	+	-	+
Számítások paramétere				
A	-	193,56	-	3,14
B	-	322,54	-	35,31
y	-	$y=193,56+322,54*x$	-	$y=3,14+35,39*x$
r	-	0,99	-	0,88
p	-	<0,001	-	<0,01
KEZELT VÍZ			KEZELT VÍZ	
S9-Mix aktiválás	-	+	-	+
Számítások paramétere				
A	-	125,84	192,10	155,73
B	-	148,32	90,10	131,11
y	-	$y=125,84+148,32*x$	$y=192,18+90,10*x$	$y=155,73+131,11*x$
r	-	0,99	0,93	0,97
p	-	<0,001	<0,01	<0,001

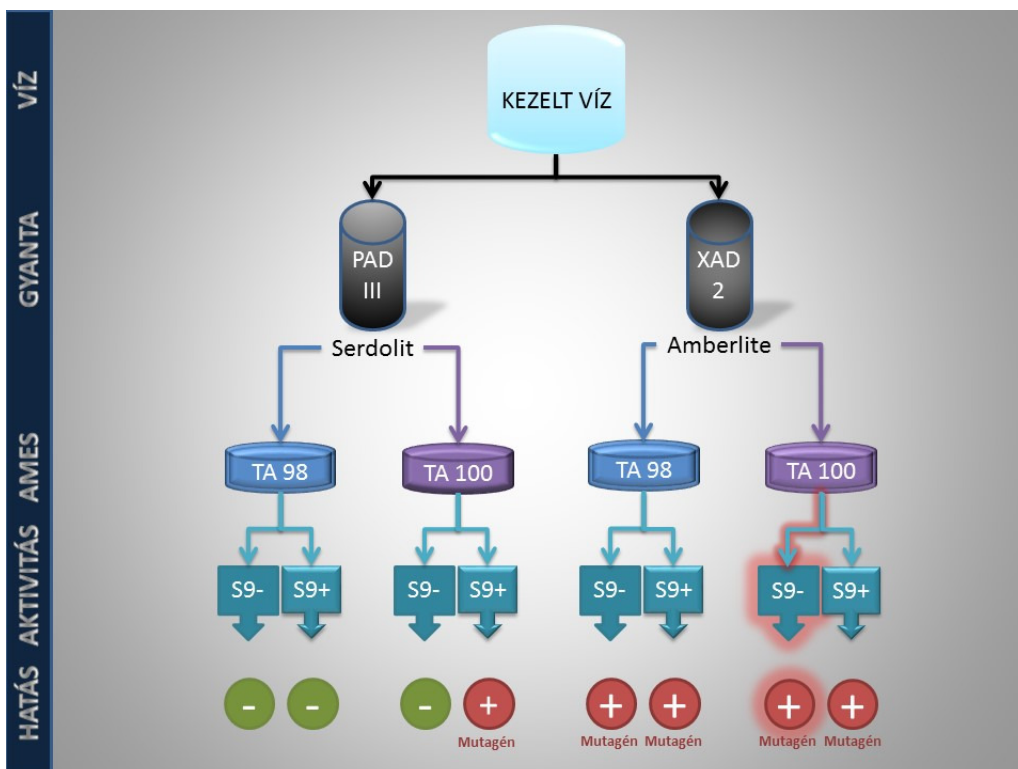
12. Táblázat: A kezeletlen és kezelt víz mutagén aktivitásának összefoglaló értékelése a **TA-100** teszter törzsnél

Betűjelölések:

$y=A+B*x$, ahol y a revertáns baktériumszám,
 "A" a regressziós állandó,
 "B" a regressziós együttható,
 "x" a vízminta (l/lemez),
 "r" korrelációs együttható,
 "p" a szignifikancia szint.



13. ábra. A kezeletlen víz mutagén aktivitásának és vizsgálati sémájának egyszerűsített bemutatása.

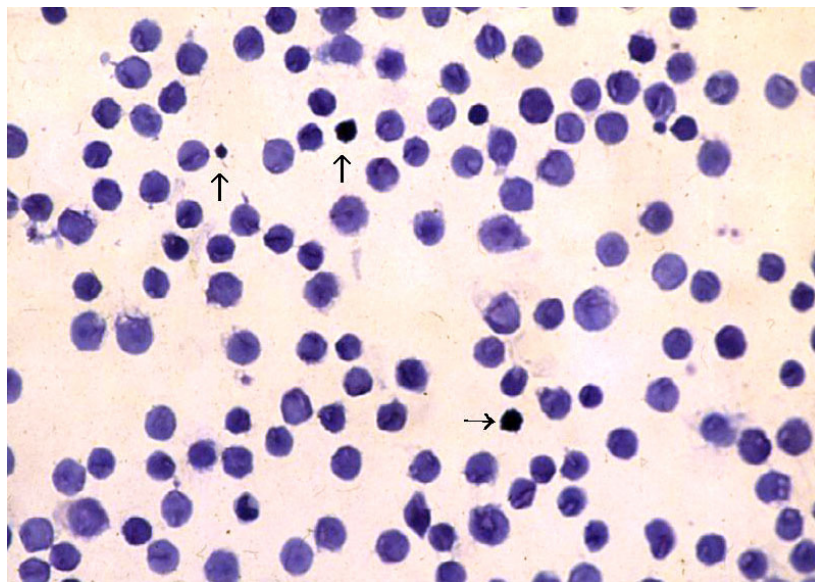
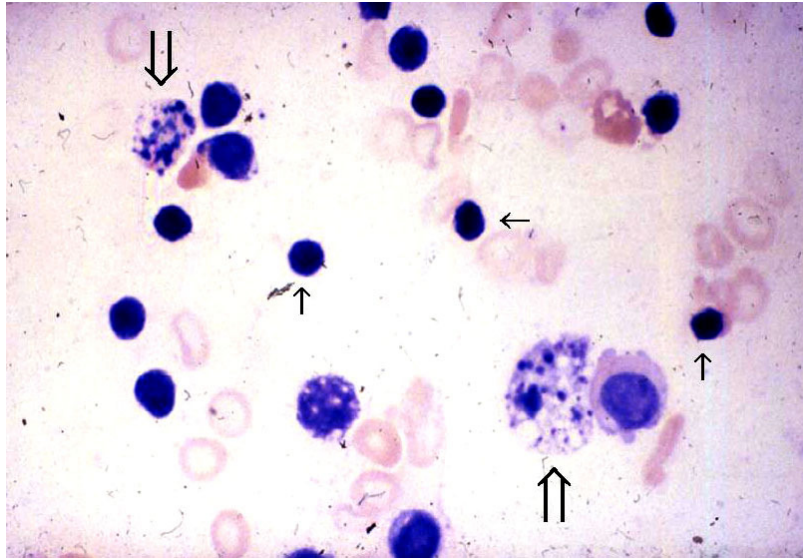


14. ábra. A kezelt víz mutagén aktivitásának és vizsgálati sémájának egyszerűsített bemutatása.

4.3. *In vitro* vizsgálatok III.: Apoptózis indukció a vízkoncentrátumok hígítási sorával

Az *in vitro* sejt kultúrában tartott humán lymphocyták apoptotikus aktivitását mutatjuk be az 13. táblázatban különböző kezelések hatására (DMSO, ill. koncentrált fertőtlenítési melléktermékek (Concentrate of Disinfection Byproducts - CDBP) valamint koncentrált kezeletlen víz-üledék (Concentrate of Sediment of Raw Water - CSRW). A RPMI-1640 médiumban tartott lymphocyták apoptózisarányának kontroll értéke 4.37 ± 2.27 volt. Egyszeri DMSO kezelés megnövelte az apoptotikus sejtek arányát (15. ábra).

Ez a növekedés $50\mu\text{l/ml}$ DMSO mennyiségnél volt szignifikáns és $100\mu\text{l/ml}$ DMSO értéknél volt a legmagasabb (ld. még 10. ábra). Mivel a kezeletlen víz-üledék és a fertőtlenítési melléktermékek is DMSO-ban lettek feloldva a további vizsgálatokhoz, a kapott apoptózis értékeket is csak akkor tekinthetjük szignifikánsnak, ha meghaladják a $100\mu\text{l/ml}$ DMSO kezelésnél kapott értékeket, ill. ezeket is hasonló koncentrációban alkalmazzuk. Ezt figyelembe véve mind $100\mu\text{l/ml}$ CDBP kezelést követően, mint pedig $100\mu\text{l/ml}$ CSRW kezelést követően az apoptotikus arány szignifikánsan magasabb volt, mint amit a DMSO kezelés önmagában képes volt kiváltani.



15. ábra. Pyknosis (→) ill. karyorrhexis (⇒) megjelenése apoptotikus lymphocytákban víztisztítási melléktermék (CDBP) kezelést követően (100 mg/ml)

Eredményeink azt mutatják, hogy mind a nyers, tisztítatlan víz, mind pedig a fertőtlenítésen átesett víztartalmaz olyan anyagokat, amelyek megfelelően magas koncentrációban előidézhetik az apoptózis index emelkedését, *in vitro* humán perifériás lymphocytákban.

Kezelési mód	Koncentráció ($\mu\text{l/ml}$)	Apoptotikus index
Kontroll (RPMI médium)	1 ml	4.37 ± 2.27
DMSO	100	$22.42 \pm 4.78^*$
DMSO	50	$16.98 \pm 0.48^*$
DMSO	25	$10.68 \pm 0.62^*$
DMSO	12.5	5.04 ± 1.05
CDBP	100	$61.02 \pm 4.18^*$ ** ***
CDBP	50	$35.03 \pm 1.56^*$ **
CDBP	25	$13.60 \pm 0.62^*$
CDBP	12.5	8.80 ± 4.41
CSRW	100	$44.19 \pm 0.76^*$ **
CSRW	50	$22.97 \pm 10.47^*$
CSRW	25	9.82 ± 0.62
CSRW	12.5	6.32 ± 2.83

13. Táblázat. *In vitro* humán perifériás lymphocyták apoptotikus aktivitása 5 órás DMSO, CDBP ill. CSRW kezelést követően.

DMSO: dimetilszulfoxid

CDBP: Koncentrált fertőtlenítési melléktermékek

CSRW: Koncentrált kezeletlen víz-üledék

* $p < 0,05$ vs. kontroll;

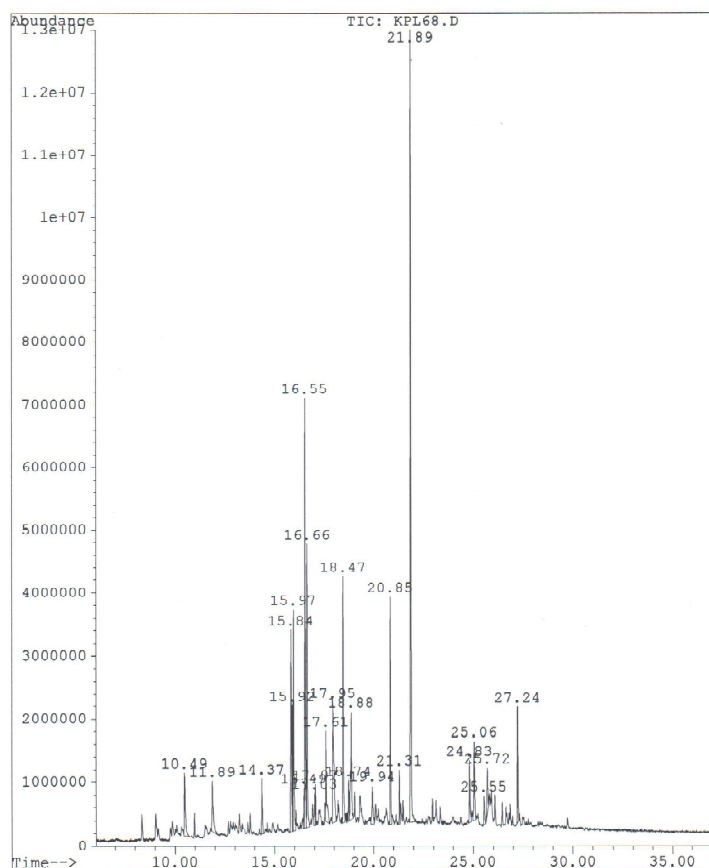
** $p < 0,05$ vs DMSO;

*** $p < 0,05$ vs CSRW

4.4. Analitikai kémiai vizsgálatok: szerves mikroszennyezők azonosítása

A vízmintákban GC/Ms vizsgálattal közel 200 vegyületet azonosítottunk, melyek a csatolt mellékletben áttekinthetők (16. ábra). A kémiai analízis alkalmával kapott eredmények alapján, a talált mintegy 200 organikus vegyületből kémiai struktúrájuk alapján kiválasztott 2 anyagot elemeztünk, mivel azok mutagén, apoptózist indukáló illetve carcinogen hatása feltételezhető. **A két anyag: a 2,4-difluoroanilin és a 4-etilbenzaldehyd.**

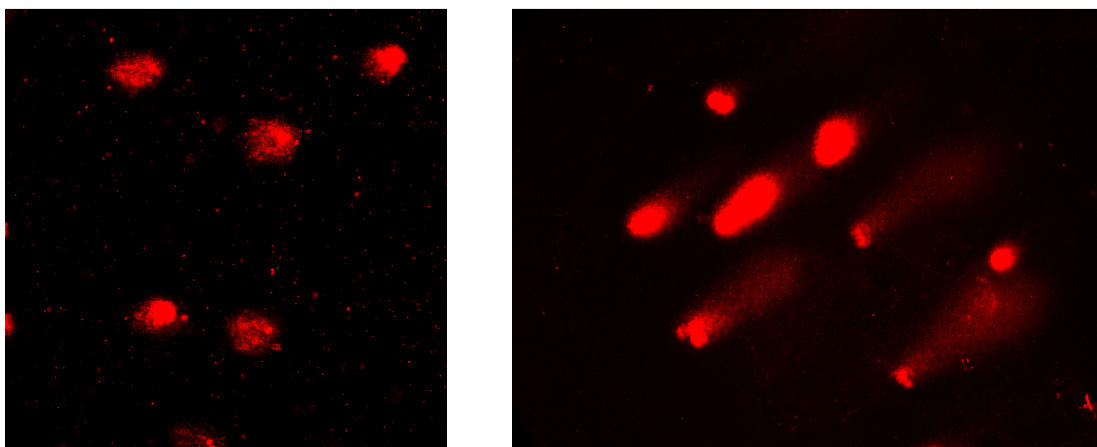
```
File       : D:\MOLT\SOTE\KPL68.D
Operator   : Dr. Kárpáti
Acquired   : 5 Apr 10 8:18 am using AcqMethod MAPI
Instrument  : 5971 - In
Sample Name: KPL68 (4M 4.oszlop) amberlit xad-2, serva
Misc Info  : 4x95,5mLMeOH+10mL hex. extr. 1mL-re szűkítve
Vial Number: 5
```



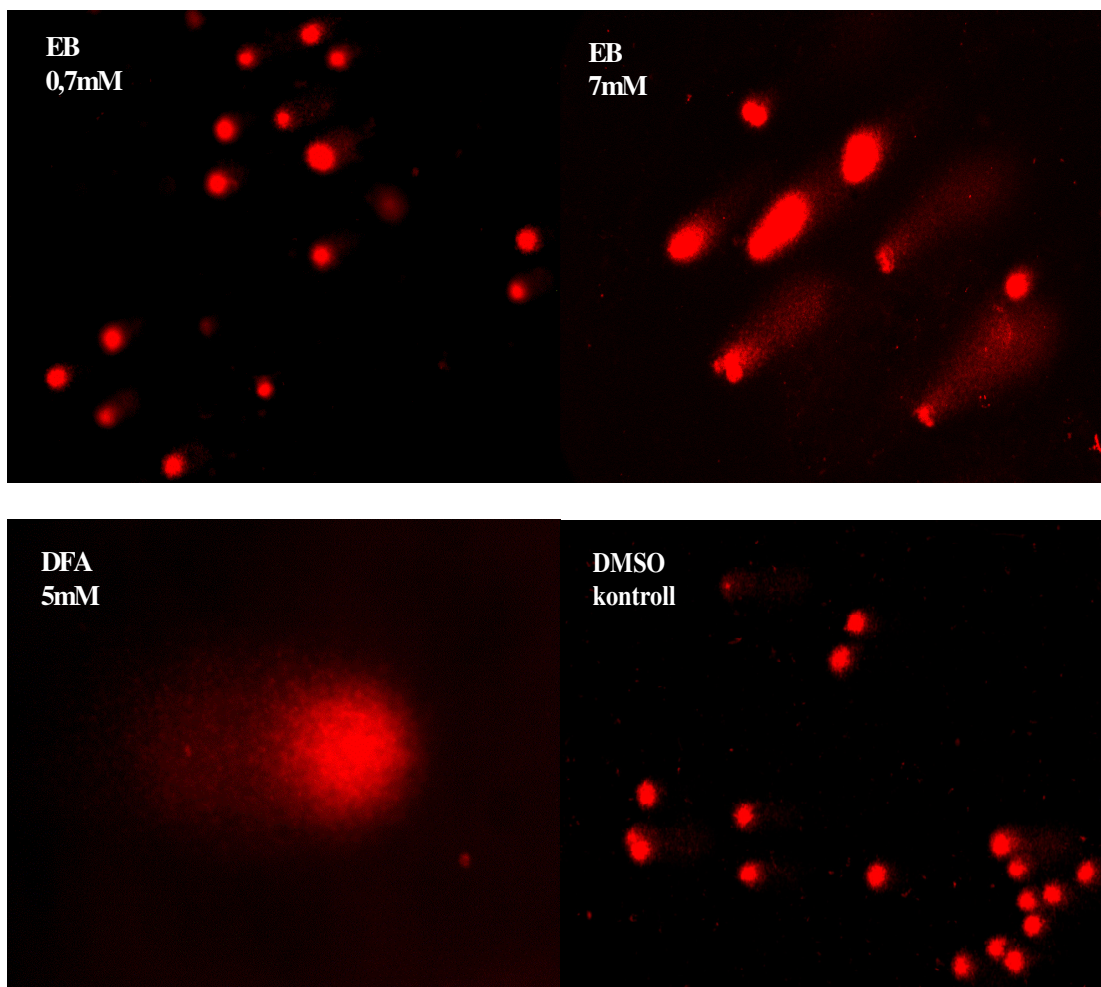
16. ábra. Részlet a vízminták GC-MS módszerrel történő vizsgálati jegyzőkönyvből. A listában több ismeretlen szerves szennyezőhöz tartozó ún. „peak” figyelhető meg.

4.5. *In vitro* vizsgálatok V.: Comet-teszt a CDBP-vel és a két kiválasztott vegyülettel: 2,4-difluoroanilin és a4-etilbenzaldehyd

A koncentrált víztisztítási melléktermékekkel kapott első vizsgálatok pozitív eredményt hoztak Comet-teszttel humán lymphocitákon történő, 5 órás 100µl/ml CDBP kezelést követően (17.ábra).



17. ábra. Comet teszt eredménye kontroll (bal panel) és 5 órás 100µl/ml CDBP alkalmazása esetén

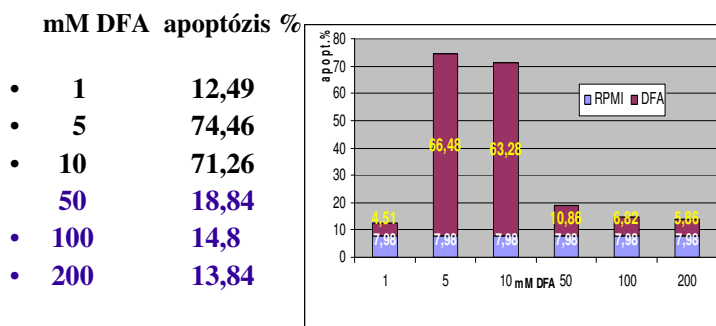


18. ábra Fluoreszcens mikroszkópból kifényképezett mintákat mutat, lymphocytáknak a vizsgált anyagokkal különböző koncentrációkban való kezelés után.

4.6. *In vitro* vizsgálatok VI.: Apoptózis indukció a két kiválasztott vegyülettel: 2,4-difluoroanilin és a4-etilbenzaldehyd

Kísérleteink során az alkalmazott dózisok 1-200 mM-ig terjedtek a 2,4-difluoroanilin esetében, valamint 0,7-140 mM-ig az 4-etilbenzaldehyd esetében. Megállapítottuk, hogy 2,4-difluoroanilinnel kezelve a sejteket 10 mM felett a hatás már cytotoxikus. Apoptózist 1-10 mM dózistartományban észleltünk. Kontrollként az RPMI-t használtuk, az ehhez korrigált értékek a 19. ábrán láthatóak.

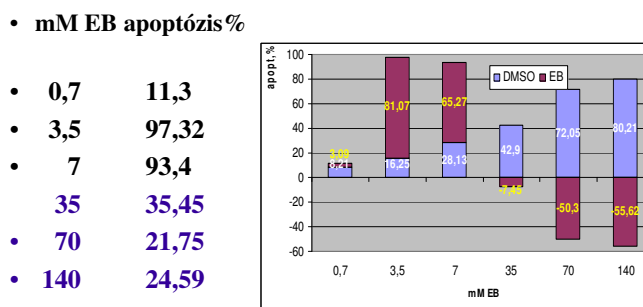
Az apoptózis index változása flowcytométerrel vizsgálva a DFA emelkedő dózisaival mellett



19. ábra. DFA apoptózis indexe

4-etilbenzaldehyddel kezelve a sejteket 7 mM felett felett a hatás már cytotoxikus, apoptózist a 0,7-7 mM dózistartományban észleltünk. Kontrollnak itt DMSO-t, egy szerves oldószert használtunk, miután az EB RPMI-ben nem oldódik. Az oldat minden mintában arányosan tartalmazott EB-t és DMSO-t. A kontrollal korrigált értékek az 20. ábrán láthatóak. A grafikon értelmezésekor több következtetést is le tudunk vonni. 1. a DMSO dózisfüggő apoptózist okozó hatással rendelkeznek, 2. A DMSO még nagyobb dózisoknál sem volt cytotoxikus, továbbá az EBA apoptózist okozó dózisának megfelelő DMSO hatás viszonylag kicsi, ezért a DMSO kiválóan alkalmazható ebben a kísérleti rendszerben. A látszólag paradox negatív értékek magyarázata az EB cytotoxikus, valamint a DMSO nagyobb koncentrációknál sem jelentkező, hiányzó cytotoxikus hatásában rejlik.

Az apoptózis index változása flowcytométerrel vizsgálva EBA emelkedő dózisai mellett



20. ábra EBA apoptózisindexe

4.7 *In vivo* vizsgálatok: Zebradánió toxicitás

4.7.1 Az akut toxicitás vizsgálat eredménye

Az adult halas akut toxicitási vizsgálatnál a kezelés dózis-hatás összefüggését leíró függvények illetve a hozzájuk kapcsolódó R^2 értékek a következőképpen alakultak: DFA: $y=94.538 \ln(x)-277.77$ $R^2 =0.95$; EBA: $y= 72.135 \ln(x)-180.38$ $R^2 =0.80$.

Az EBA-ra vonatkozó LC_{50} érték adult zebradánió esetén 96 órás kitettség után:23.49mg/l volt. A DBA-ra vonatkozó LC_{50} érték adult zebradánió esetén 96 órás kitettség után29.36mg/l volt.

A kísérlet ideje alatt a tesztre vonatkozó OECD szabvány által meghatározott vízminőségi paraméterek a megadott határértékeken belül maradtak.

4.7.2 Általános viselkedésélettani megfigyelések

Mindkét EBA-al kezelt csoportban megfigyeltük, hogy a kezelés 3 hónapos időtartama alatt letargikus állapotban voltak, és nem próbáltak meg kitérni a begyűjtési próbálkozások elől. Ezen túlmenően azonban nem figyeltünk meg változást a halak egyensúlyozóképességben és orientációjában.

A DFA-al kezelt halak viselkedése jellegzetesen eltért kontroll társaikhoz képest: megváltozott a domináns úszási mintázat és szorongási viselkedésre jellemző mintázatokat figyelhettünk meg (Blaser *et al.*, 2010). Jellemző volt erre a csoportra a gyakori és gyors irányváltató úszás, ami a kontroll csoportokban egyáltalán nem jelentkezett.

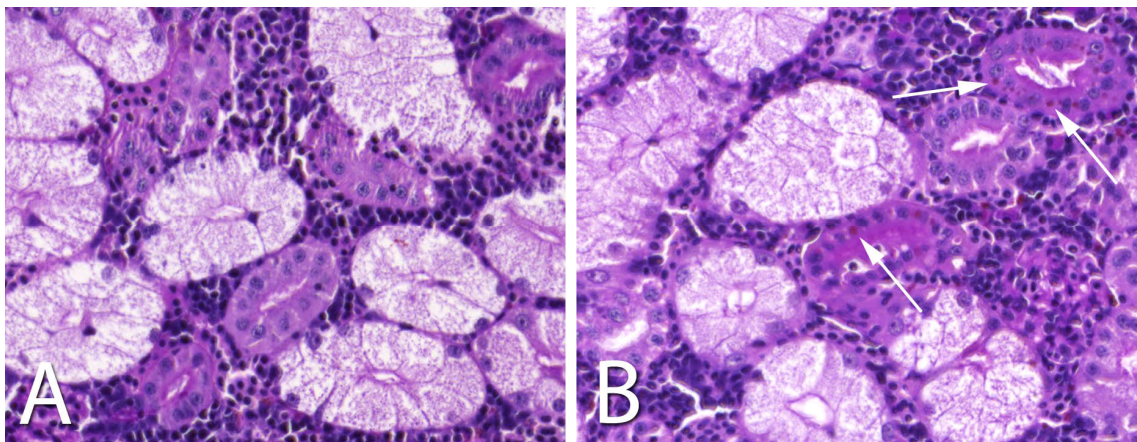
4.7.3. Kórszövettani jellemzés

A kísérletkezdetétől számított 3 hét múlva szövettani elváltozásokat figyeltünk meg a vizsgált állatok májában, veséjében és kültakaróján. A magas-DBP koncentrációt tartalmazó vízben élő halaknál (10 mg/l EBA és 5 mg/lDFA), a megfigyelt elváltozások

mértéke fokozatosan nőtt és a második hónapra érte el maximumát. Az alacsonyabb DBP koncentrációt tartalmazó vízben tartott állatoknál a megfigyelt koncentráció-függő elváltozások kevésbé voltak konzisztensek és nem mutattak időfüggést sem (2.5 mg/l DFA és 5 mg/l EBA).

EBA előidézte máj-elváltozások: a májparenchyma sejtek relatív zsírtartalmában és a zsírvakuólumok eloszlásában eltéréseket figyeltünk meg a kezelt és kontroll halak között. A kezelt állatokban a zsírvakuólumok változatos méretűek és alakúak voltak a kísérletek teljes időtartamában a kontrollhoz képest, azonban a megfigyelés végpontjára a zsírcseppek kitöltötték a teljes májsejt-cytoplasmát (23. ábra), továbbá a kontroll állatok májsejtjeihez képest a sejtek glycogen tartalma csökkent. Ezeket a megfigyeléseket mind a hím, mind a nőstény állatokban megfigyeltük és hasonlóan találtuk. Nem találtunk azonban hepatocytá megalocytosisra, adenofibrosisra vagy egyéb hepatocelluláris elváltozásra utaló jelet.

EBA előidézte vese-elváltozások: A kezelt állatok disztális vesetubulusainak hámsejtjeiben hematoxilin-eozin festés ill. PAS reakció alkalmazásával apró, PAS pozitív vakuólumok felhalmozódását figyeltük meg. Piknotikus kromatin kondenzációt is megfigyeltünk ezen sejtek 5-10 százalékában. A proximális tubulusok hámsejtjeiben ugyanakkor nagyobb méretű, szupranuclearisan elhelyeződő PAS pozitív cseppecskék voltak láthatóak, azonban a sejtmagokban nem találtunk elváltozást (21. ábra).



21. ábra. 3 hónapos EBA-kezelés okozta vese-elváltozások. **A.** Kontroll állat veséjének nagy nagyítású képe. **B.** A distális vesetubulusok hámsejtjeiben piknotikus sejtmagok és PAS pozitív granulumok tűnnek fel. (HE és PAS reakció, 300x nagyítás).

DFA előidézte máj-eltérések: a teljes kísérleti időtartam alatt diffúz zsírosodás volt megfigyelhető a májsejtekben, jellemzően apró zsírvakuólumok megjelenése volt jellemző. A hepatocyták glycogen tartalma is jelentősen megnőtt a kontroll állatokhoz képest. Preneoplázia nem volt megfigyelhető, és nem tapasztaltunk különbséget a nemek között az eltérések tekintetében.

DFA előidézte veseeltérések: az EBA vizsgálatok során már megfigyelt eltérésekhez hasonló kórszövettani képet tapasztaltunk.

Sem az EBA sem a DFA kezelt állatok szerveiben nem volt megfigyelhető amyloid congo-vörös festést alkalmazásával, továbbá nem figyeltünk meg preneopláziára vagy tumorra utaló eltéréseket sem a különböző szervekben.

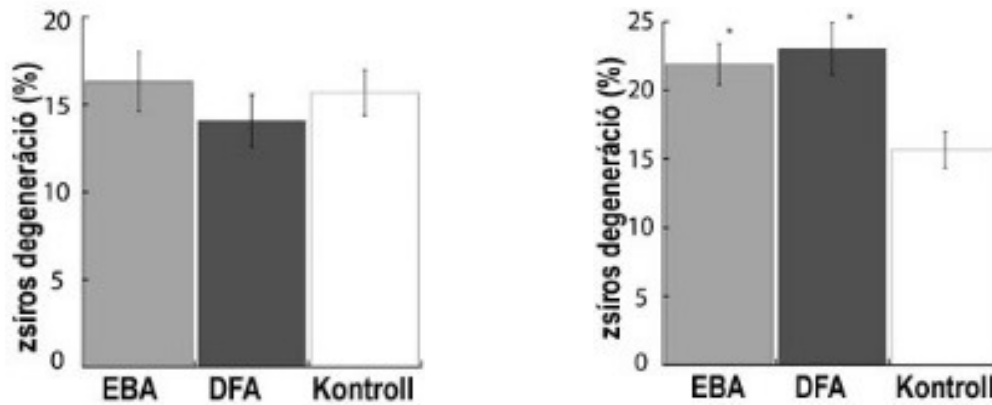
4.7.4. A víztisztítási melléktermékek májsejtek zsíros elfajulására gyakorolt hatásának kvantitatív vizsgálata

Első lépésben megvizsgáltuk a hasonló DBP koncentrációnak kitett két különböző halpopuláció májában megfigyelhető eltéréseket (hasonló DFA és EBA koncentráció; n = 25 hal per populáció). A hasonló kezelésnek kitett halcsoportok között nem találtunk szignifikáns eltérést a zsíros elfajulást mutató sejtek mennyiségét tekintve. (14. táblázat). Így, mivel a hasonló kezelést kapott csoportokból származó adatok nem mutattak szignifikáns különbséget, ezekből a hasonló csoportokból származó adatokat összevontuk, és így vizsgáltuk a két DBP koncentráció okozta eltérések hatásait.

	Kezelés típusa	zsíros degeneráció %-ban kifejezett értéke	P-érték	
Alacsony dózis	5 mg/l EBA Acsoport	18.47±2.99	P>0.65	
	5 mg/l EBA Bcsoport	16.94±2.47		
	2.5mg/l DFA Acsoport	11.90±1.87	P>0.15	
	2.5mg/l DFA Bcsoport	16.36±2.4		
	Magas dózis	10 mg/l EBA Acsoport	22.88±2.18	P>0.35
		10 mg/l EBA Bcsoport	18.91±2.29	
5 mg/l DFA Acsoport		24.77±3.09	P>0.4	
5 mg/l DFA Bcsoport		21.522±2.52		
Kontroll		Acsoport	17.6±2.1	P>0.5
		Bcsoport	15.26±3.0	

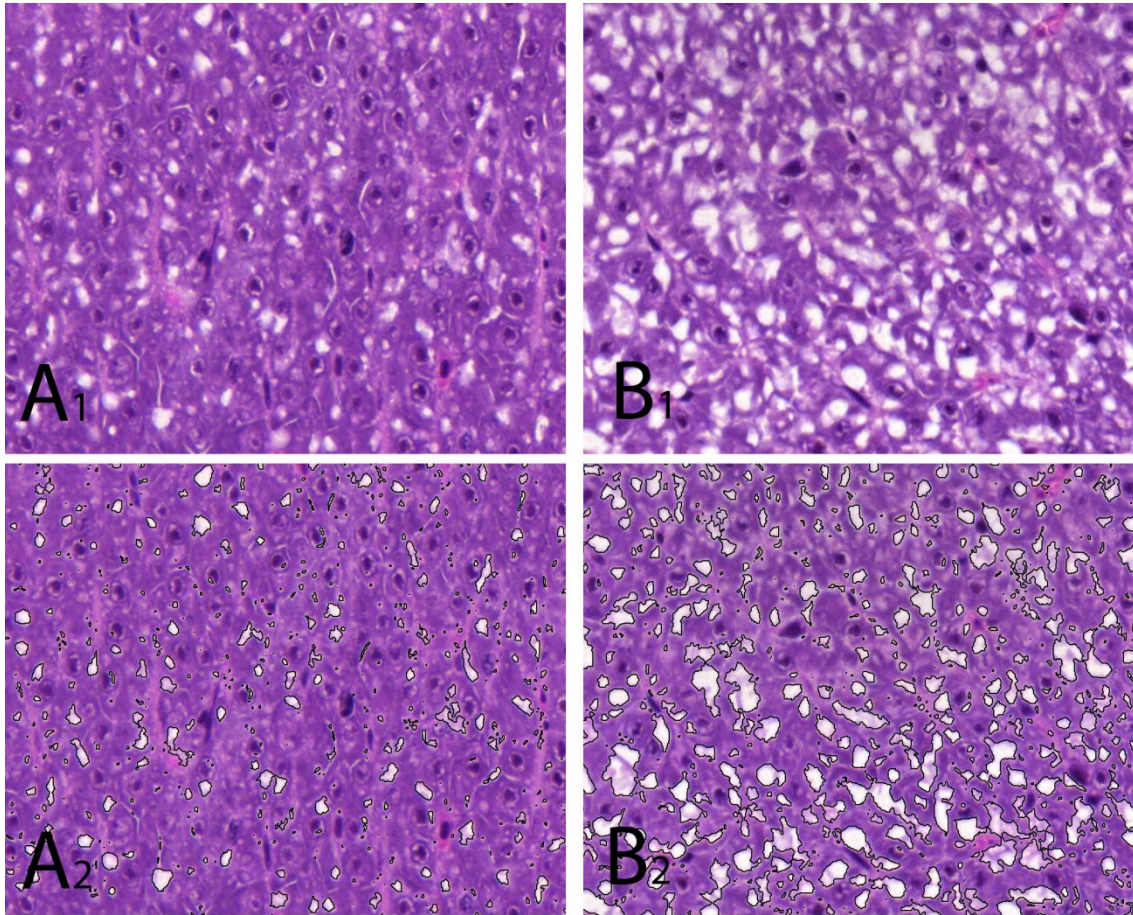
14. táblázat. Hasonló kezelésnek alávetett halcsoportok májzsírosodásának kvantitatív vizsgálata. Az adatok átlag +/- standard hiba-ként vannak megadva. Minden csoportban 25 hal volt

Alacsony EBA és DFA kezelés nem változtatta meg a zsírosodás mértékét szignifikánsan a májparenchymában ($P>0.7$ EBA és $P>0.4$ DFA). Ugyanakkor a két DBP magas koncentrációja már szignifikánsan megemelte a májsejtek zsírtartalmát (22. ábra, $P<0.002$ mindkét csoportra nézve, $n=50$ csoportonként; Student- t test).



22. ábra. Alacsony (bal panel) és magas (jobb panel) koncentrációban alkalmazott EBA ill. DFA hatása a májsejtek zsíros elfajulására. Az egyes oszlopok a kezelés hatására bekövetkező zsíros elfajulás %-ban kifejezett értékét mutatja (% zsíros degeneráció).
* = $P < 0.002$

A magasabb DBP koncentráció szignifikánsan megnövelte a zsírosodás mértékét a májsejtekben. A megfigyelt dóziszfüggő májváltozások a máj enzimszisztémáinak méregtelenítő aktivitásával magyarázható: feltehetően csak a magasabb koncentrációban alkalmazott DBP-k telítették az enzimszisztéma kapacitását, amely a megfigyelt zsírosodást eredményezte.



23. ábra. Zebradánio májában megfigyelt zsíros elfajulás és digitális mikroszkópos analízise. **A1.** A képek kontroll halból származó máj szövettani képét mutatják, a parenchymában minimális zsírosodás figyelhető meg. **B1.** Súlyos zsíros elfajulás szövettani képe 3 hónapos EBA kezelést követően. Az **A2** és **B2** panelek mutatják be a felettük látható területek elzsírosodásának digitális analízisét (H-E, $\times 360$).

5. Az eredmények megbeszélése

5.1. Kezeletlen és tisztított víz *in vitro* mutagenitásának vizsgálata

AMES-teszttel

A különböző forrásokból származó vízminták lehetséges mutagenitását igen széles körben vizsgálták, és vizsgálják napjainkban is (Sujbert *et al.*, 1993; Bull *et al.*, 1995; Plewa *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2007). Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy különböző eredetű ivóvíz (talajvíz, felszíni vizek) rendelkezhet mutagén aktivitással (Sujbert *et al.*, 1999). Az ilyen vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a vízben található fertőtlenítési melléktermékeknek hasonlóan káros, mutagén, esetleg karcinogén hatása lehet az azt fogyasztó humán populációra is. Azonban ennek a lehetőségnek a pontos megítéléséhez, regionális ill. lokális feltérképezéséhez szükségyszerűen meg kell vizsgálni az adott területről származó ivóvízmintákat. Az ivóvíz minták olyan vízműből származtak (Fővárosi Vízművek Rt. Csepeli Vízkezelőműben vett, Dunaparton elhelyezkedő csápos kút), amely a tisztítási eljárás során a következő fő eljárásokat alkalmazta: a nyers víz levegőztetése, oxigénnel dúsítás; ózonozás, (előfertőtlenítés, oxidálás); permanganát adagolás (oxidálás); flokkulálás, gyors homok és aktív szén szűrés; klóradagolás (utófertőtlenítés). Vizsgálatainkban e folyamatok során képződött víztisztítási melléktermékeket és azok lehetséges káros hatásait vizsgáltuk.

Eredményeink szerint a Serdolit PAD III gyantaoszlopok segítségével nyert kezeletlen és a kezelt vízminták a TA-98 és a TA-100 Salmonella teszter törzseknél patkánymáj frakció hozzáadása nélkül negatív mutagén aktivitást indukálnak. Patkánymáj frakció jelenlétében azonban a tisztításon és fertőtlenítésen már átesett víz hatására a TA-100 teszter törzs pozitív mutagén aktivitást mutatott. A vízkezelési technológia folyamán a kezeletlen vízhez viszonyítva a kezelt víz revertáns baktériumszáma a TA-100 teszter törzsnél, aktiválás után, jelentősen emelkedett. Az Amberlite XAD-2 gyantaoszlop vízadszorbeátuma a TA-98 teszter törzsnél aktivitással és aktiválás nélkül is pozitív mutagenitást indukált. A TA-100 teszter törzs aktiválás

nélkül a kezeletlen vízmintára negatív, a kezelt vízmintára pozitív mutagén aktivitással reagált.

Ezen vizsgálataink eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a vízfertőtlenítés során keletkező melléktermékek az alkalmazott vízkezelési technológiával nem távolíthatók el az ivóvízből. Erre utal az Amberlite XAD-2 gyantaoszlop adszorbeátumának adagolására során megfigyelt pozitív,aktivitással és aktivitás nélkül is kiváltott mutagén aktivitás mindkét teszt törzsnél. Kiemelten fontos az is, hogy a kezelt víz Amberlite XAD-2 gyantaoszlop adszorbeátuma aktiválásra pozitív aktivitást eredményezett, amíg a kezeletlen víz adszorbeátuma negatív mutagén aktivitást indukált.

A lehetséges humán mutagén/karcinogén expozíció miatt mérlegelendő, hogy a pozitív mutagén eredményt hány liter víz adszorbeátuma idézte elő. Adataink szerint: 0,28-0,83 liter nyers vízből nyert szerves anyag indukált mutációt a lemezeken. A kezelt víz esetében ehhez 0,83-2,5 liter vízminta adszorbeátumra volt szükség, tehát a vízkezelés a vízmintában levő mutagén kapacitásátcsökkentette, de teljesen nem szüntette meg. A kezelt kútvíz a TA98 teszter törzsnél Amberlile XAD-2 gyantaoszlopon történt adszorbcíót követően aktiválás nélkül, és aktíválással mutatott pozitív mutagenitást (6. 8. és a 9. táblázat). Eredményeink szerint ez esetben is – a lineáris regresszó és a szoros korreláció alapján - pozitív mutagén akivitás feltételezhető (9. táblázat). A kezelt kútvíz a TA-100 teszter törzsnél az Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt adszorpcíót követően aktivitás nélkül, és aktiválással is mutagén hatást jelzett (8. és 10. táblázat). A statisztikai vizsgálatok lineáris regressziót, szoros korrelációt mutatnak, amely egyértelműen pozitív mutagén aktivitásra utal (10. táblázat). Jelentős megfigyelés, hogy a kezelt, tisztított víz mutagén rátája mintegy háromszoros a kezeletlen vízéhez képest. Mindezek figyelembevételével mindenképpen szükséges a fertőtlenítés során keletkező melléktermékek mennyiségét kedvezőtlen egészségügyi hatásuk miatt csökkenteni.

Az elmúlt években a budapesti ivóvíz bázisokon termelt, klórozott és ózonozott ivóvíz fertőtlenítési melléktermékeinek mutagén aktivitását teszteltük. Megfigyeltük,

hogy a vízből kivont és koncentrált adszorbeátumok (töményített szerves prekursor) makroretikuláris gyantaoszlopokon (szilárd adszorbens) az Ames Salmonella/patkány máj mikroszóma kísérleti rendszerben mutációt indukáltak. Az Ames-teszt a víz esetleges mutagén-promutagén ill. karcinogén szennyezésének kvalitatív vizsgálatára alkalmas és széles körben alkalmazott eljárás, jól használható az ivóvíz minőségének, mutagén/promutagén szennyezésének indikációjára.

A vizsgált vízminták mutagén potenciálja talajvízből, csapvízből, a felszíni vízből termelt ivóvíz sorrendjében emelkedett, ezért kísérleti eredményeink szerint valószínűsíthető a humán mutagén/karcinogén kockázat is (Sujbert és munkatársai, (1993) Sujbert és munkatársai, (1999) Sujbert és munkatársai, (2000)). Ennek a kockázatnak a becsléséhez azonban további kiegészítő vizsgálatokat kell igénybe venni.

Eredményeink figyelembevételével a következő ajánlásokat fogalmazhatjuk meg a hazai víztisztítási folyamatok során fellépő nem kívánt melléktermékek képződésének elkerülésére vonatkozóan: A szennyvíztisztítási technológia során a vízben található szerves anyagok eltávolítási hatásfokát mindenképpen célszerű lenne növelni, amely a létrehozott ivóvízbázisban nagymértékben csökkentené a szerves anyag-prekursorok szintjét, és ennek megfelelően a DBP-k-csökkenésével jár.

Továbbá ajánlatos lenne modern, kombinatív ivóvíztisztítási technológiák alkalmazását bevezetni, valamint megfontolandó az alternatív ivóvízfertőtlenítési technológiák alkalmazása is (pl. UV fény). Az alternatív kémiai ivóvízfertőtlenítési eljárásokban a fertőtlenítőszer adagjainak és a fertőtlenítési időtartam további optimalizálása lenne kívánatos, valamint elengedhetetlen az ivóvízfertőtlenítés hatásfokának folyamatos felügyelete annak érdekében, hogy az ivóvízfogyasztása biztonságos legyen, és kiváló minőségű ivóvíz álljon az azt fogyasztó humán populáció rendelkezésére (Betancourt & Rose, 2004).

5.2 Ivóvíz-tisztítási melléktermékek *in vitro* apoptózis indukáló képessége

A víztisztítási melléktermékek mutagén illetve lehetséges karcinogén hatásáról számos tanulmány beszámolt (Plewa *et al*, 2002;(Cantor, 1997; 2010)). Ugyanakkor az irodalomban igen kevés adat található arra vonatkozóan, hogy ezek az egészségre többnyire bizonyítottan káros melléktermékek képesek-e apoptózist indukálni, vagy az apoptózis gyakoriságát befolyásolni. Vizsgálataink egyértelműen kimutatták, hogy a koncentrált vízminták nemcsak tisztítás után, de érdekes módon kezelést megelőzően is koncentráció-függő, szignifikáns apoptózis-indukáló hatással voltak a humán perifériás lymphocytákra. Kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányában is hasonló, koncentráció-függő mutagén hatásról számolt be (Sujbert *et al.*, 1999).

Ismert, hogy a sérült DNS-el rendelkező sejteket a szervezet képes apoptotikus folyamatok beindításával eliminálni, eltávolítani (Benitez-Bribiesca & Sanchez-Suarez, 1999). Felvetődik a kérdés, hogy a megfigyelt mutagén ill. apoptózis indukáló hatást vajon ugyan azok a víztisztítási melléktermékek fejtik ki, vagy esetleg más-más anyagok felelősek a két folyamat kiváltásáért.

A tisztított víz esetleges karcinogén aktivitásának tanulmányozása során elengedhetetlen, hogy megvizsgáljuk az adott minták mutagén és apoptózis indukáló képességét is. Ezen vizsgálatok előre jelezhetik, hogy egy esetleges megnövekedett apoptotikus aktivitás hatékonyan meg tudja-e gátolni azon sejtek felhalmozódását, amelyek irreverzibilis DNS károsodást szenvedtek és fokozottan hajlamosak karcinogén aktivitásra.

A megnövekedett apoptotikus aktivitás olyan szöveti károsodást eredményezhet, amely nem jellemző a karcinogenesis folyamatára. A cardiovascularis- és idegrendszerben számos olyan elváltozás figyelhető meg, amelyek endothel-, myocardialis- vagy idegsejtek apoptózisával hozhatók összefüggésbe (Pollack *et al.*, 2002). Ezen elváltozások kialakulásában mindenképpen vizsgálni kellene a víztisztítási melléktermékek esetleges szerepét. Figyelemre méltó megfigyelésünk az is, hogy a nyers, kezeletlen vízből készített koncentrátumok is szignifikáns apoptózis indukáló hatással bírtak. Azt azonban nem vizsgáltuk, és így adataink sem utalnak egyértelműen erre, hogy vajon ez utóbbi vízminta apoptózis indukáló hatása esetlegesen különböző

eredetű bakteriális termékekkel vagy vízszennyezéssel függhet össze. Mivel azonban általában tisztított víz kerül fogyasztásra, ezért a további vizsgálatokban mindenképpen a víztisztítási melléktermékekre kell koncentrálni.

5.3 **Víztisztítási melléktermékek vizsgálata *in vivo* zebradánió modellen**

A fent részletezett *in vitro* vizsgálataink során kapott eredmények (Ames-teszt) azt mutatták, hogy a víztisztítás során kialakult melléktermékek koncentráció-függő mértékben fejtettek ki mutagén aktivitást (Sujbert *et al.*, 2006), továbbá hasonló, szintén koncentráció-függő apoptózis indukáló hatást figyeltünk meg akkor, amikor ezeket a DBP-et humán perifériás lymphocytákkal inkubáltuk együtt (Racz *et al.*, 2004).

További, *in vivo* vizsgálataink során egy széles körben alkalmazott gerinces állatot, a zebradániót használtuk, hogy a két, víztisztítási melléktermékként már beazonosított molekula esetleges mutagén, ill. esetleges karcinogén hatását megvizsgáljuk. A mutagén hatás vizsgálata hal embriók felhasználásával a SZIE Halgazdálkodási Tanszékével kollaborációban folyamatban vannak, előzetesen pozitív eredménnyel. A zebradániót napjainkban igen széles körben alkalmazzák toxicitási (Lele & Krone, 1996; Lammer *et al.*, 2009), ill. karcinogenezis indukciójának a vizsgálatára (Peterson & Freeman, 2009), továbbá fertőző megbetegedések és immunológiai vizsgálatok során is gyakran használják, mint modell állatot (Sullivan & Kim, 2008; Mione & Trede, 2010).

Igen nagy előnye a zebradániónak, hogy nagyon gyorsan szaporodik, könnyű és olcsó a halakat fenntartani még igen nagy mennyiségben is. Kórszövetteni vizsgálatokhoz is különösen jól használható, mivel a halak viszonylag kis méretűek (2-4 cm hosszúak), így relatív kevés metszetből viszonylag sok szerv tanulmányozható, és egy tárgylemezre igen sok metszet felhúzható egy állatból, meggyorsítva a szövettani analízist. Továbbá nem elhanyagolható az a tény sem, hogy a halak viszonylag átlátszóak, a pigmentált területek nem zavaróak, így nagyobb anatómiai elváltozások sztereomikroszkópos vizsgálatokkal minden további nélkül detektálhatóak.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatainak során számos olyan víztisztítási melléktermék-komponensre derült fény, amelyek felelőssé tehetőek a megfigyelt *in vitro* mutagén hatásokért. (Sujbert *et al.*, 2006). Ezek közül két molekula *in*

vivotoxicitási vizsgálatát végeztük el és ismertetjük jelen értekezésben (2,4-difluoroanilin (DFA) és 4-etilbenzaldehyd (EBA)).

A két kiválasztott anyaggal történő három hónapos kezelést követően nem figyeltünk meg hepatocytá megalocytosis-t, hepatocelluláris elváltozási gócot, adenofirosist vagy egyéb olyan léziókat, amelyek karcinogenezis során általában megjelennek a zebradánió-máj szövettani képén.

Korábbi megfigyeléseink, valamint irodalmi adatok szerint karcinogén anyagok három hónapos inkubációs idő alatt képesek praeneoplasticus léziót ill neopláziát kialakítani laboratóriumi körülmények között tartott halakban (Khudoley, 1984).

Eredményeink szerint sem a DFA, sem az EBA a három hónapos kezelés alapján nem rendelkezik karcinogén hatással, nem indukáltak a megfigyelési időszak alatt preneopláziás léziókat a zebradániókban. Hosszabb ideig tartó inkubálás (1 év – több évig terjedő időszak) azonban elképzelhető, hogy már előidézhethet karcinogén aktivitásra utaló jeleket. Az értekezés megírásának időpontjában az ezirányú vizsgálatok folyamatban vannak. Az mindenestre biztosan állítható, hogy a víztisztítás során keletkező, általunk vizsgált melléktermékek toxikusak a zebradániókra, elváltozásokat okoznak a májban, vesében és a halak kültakarójában mind idő- mind pedig koncentráció-függő módon.

Érdekes, hogy ezek az elváltozások nem specifikusak egyik vegyületre sem, azonban felhívják a figyelmet a lehetséges toxikus hatás szerv-specifikuks megjelenésére. További vizsgálatokra érdemes azon megfigyelésünk is, miszerint a kísérletek során alkalmazott anyagok befolyásolták a halak viselkedését és a külső stimulusokra adott reakcióikat is. Mivel a két anyag alkalmazása során jellemzően különböző viselkedésbeli változásokat produkáltak a halak, és egyértelműnek látszik az idegrendszer normál funkcióinak érintettsége, feltételezhető, hogy a két anyag idegrendszeri háttérmechanizmusokra gyakorolt hatása eltérő. A vizsgálatok alapján egyértelmű volt a halak viselkedésében bekövetkezett változás a kezelést követően, ezért ez a megfigyelés különösen fontos lehet a humán toxikológiai vizsgálatokkal összefüggésben, esetleges klinikai vonatkozások is felmerülhetnek.

Ahogy az gyakran megfigyelhető állatokat felhasználó kísérleti modellek esetében, a halak felhasználásával történő toxicitási vizsgálatok esetében is látható, hogy a kísérletek során alkalmazott anyagok koncentrációja akár nagyságrendekkel is

magasabb lehet ahhoz a koncentrációhoz képest, amit az adott anyag elméletileg elérhet a humán populáció által fogyasztott tisztított vízben. Figyelembe kell azonban venni az ivóvíz fogyasztásának 'krónikus' természetét, és azt, hogy a vízzel történő érintkezésnek speciális 'humán' aspektusai is vannak. Ez tulajdonképpen nem jelent mást, mint napi kb. 1,5 liter ivóvíz vagy egyéb, étel-készítés során felhasznált víz bevitelét, továbbá figyelembe kell venni a tisztálkodás során történő dermális kontaktust, valamint az ekkor felszabaduló és belégzett vízpárából származó anyagok potenciális károsító hatását is. Ez a mennyiségű napi vízadag már jelentős toxikus aktivitással rendelkezhet, ha figyelembe vesszük, hogy a fertőtlenítésen és tisztításon átesett víz mintegy 200 különböző víztisztítási mellékterméket tartalmazhat, többek között az általunk vizsgált DFA-t és EBA-t is. Éppen ezért nem szabad figyelmen kívül hagyni ezen anyagok károsító hatását, hiszen az ember folyamatosan érintkezik tisztított vízzel. Annak a lehetőségét sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy ezek a melléktermékek felhalmozódhatnak bizonyos szövetekben és szinergista vagy antagonista kölcsönhatásba léphetnek azon anyagok millióival, amelyekről már tudjuk, hogy egyéb környezeti forrásokból származhatnak és szintén hasonló módon felhalmozódhatnak (pl. gondoljunk csak a nagyvárosi levegőből származó szennyezőanyagokra, hogy csak egy evidens példát említsünk). Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a tisztított ivóvízben előforduló tisztítási melléktermékek jelentős rizikófaktort jelentenek a humán populáció egészségére.

Mivel az ivóvíz tisztítása alapvető és kulcsfontosságú lépés számos akut- és hirtelen fellépő, esetenként halálos betegség kialakulásának megelőzéséhez, ezért további részletes vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megelőzzük a víztisztítási melléktermékek kialakulását, vagy ha már kialakultak, akkor ezeket el tudjuk távolítani a vezetékes vízből. Ezen vizsgálatok alapvetően hozzájárulnának ahhoz, hogy lecsökkentsük a DBP-okozta nemkívánatos egészségkárosodást. Vizsgálataink és eredményeink egyértelműen rámutattak arra, hogy nem elég az ivóvizet fertőtleníteni és megtisztítani, a biztonságos vízfogyasztás elengedhetetlen feltétele a tisztítási eljárások során keletkezett potenciálisan egészségkárosító melléktermékek eltávolítása is. Ennek érdekében további vizsgálatokat végzünk a zebra-dánió, mint modellállat felhasználásával.

6. Következtetések

- Magyarországon elsőként mutattuk ki, hogy a tisztított ivóvíz tartalmaz a víztisztítás során keletkező melléktermékeket.
- A melléktermékeket tartalmazó anyagkeverék mutagén hatását állapítottuk meg Ames teszt segítségével.
- A humán lymphocita tenyészetekben a melléktermékeket tartalmazó anyagkeverék apoptózist indukáló és fokozó hatással rendelkezik. Hasonló eredményt tudomásunk szerint az irodalomban nem közöltek.
- A víztisztítás során kialakuló melléktermékek kémiai analízise számos vegyület jelenlétét igazolta, ezen adatok alapján választottunk ki két vegyületet további vizsgálatokra.
- Mindkét kiválasztott molekulahumán perifériás lymphocita-tenyészetében apoptózis- indukáló és fokozó hatással rendelkezik.
- A két anyag zebradanio halakban végzett, három hónapos toxicitási tesztje daganatot, vagy daganat megelőző állapotot nem eredményezett, de máj és vese léziókat, illetve a halak viselkedési zavarait okozta.
- Az eddigi kísérleti eredmények indokoltá teszik a víztisztítási reakció melléktermékek biológiai hatására vonatkozó vizsgálatok folytatását és más anyagokra történő kiterjesztését is.

7. Összefoglalás

Az ivóvíz fertőtlenítése nyomán keletkezett melléktermékek (water disinfection by-products-DBPs) feltételezett biológiai károsító hatását vizsgáltuk mutagén, apoptogén, toxicus, illetve carcinogén hatás szempontjából. Megállapítottuk, hogy

- Egy budapesti vízmű által előállított ivóvíz a nemzetközi szinten közölt értékeknek megfelelő mértékben kis mennyiségben tartalmaz DBP-t.
- A DBP koncentráció függően pozitív Amestesztet eredményezett két baktérium törzs esetében, mely mutagén hatásra utal.
- A DBP koncentráció függően apoptózist fokozó hatással rendelkezett humán lymphocyták esetében. Hasonló eredményt az irodalomban tudomásunk szerint nem közöltek.
- A DBP-ben kollaboráló partnerünk több mint kétszáz kémiai jól meghatározható vegyületet mutatott ki, ezek közül a kémiai szerkezet alapján két, feltételezhetően mutagén vagy carcinogén vegyületet választottunk ki (2,4-difluoroanilin (DFA) és a 4-etil benzaldehid (EBA)) és használtuk következő kísérleteinkben.
- Kimutattuk, hogy humán lymphocytáknak dózis függően fokozott apoptózist mutattak mind DFA, mind EBA kezelés után.
- Zebradanio kísérleti akváriumi halak 3 hónapos kezelése DFA-val, illetve EBA-val a máj, illetve a vese degeneratív elváltozásait eredményezte. Daganatra, vagy daganat megelőző állapotra utaló jelek az alkalmazott dózisok nyomán három hónap alatt nem alakultak ki.
- A két vizsgált anyag egymással ellentétes irányú viselkedési zavart keltett a halpopulációban.
- A továbbiakban szükségesnek tartjuk a kezelési idő meghosszabbítása mellett a kísérleti halakon végzett vizsgálatok folytatását, DFA és EBA alkalmazásával.

Eddigi kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy közegészségügyi szempontból fokozott figyelmet érdemelnek a vízfertőtlenítés során keletkezett mutagénnek, apoptózist fokozónak és toxicusnak bizonyult termékek. Az eddigiektől eltérő fertőtlenítő eljárások és a fertőtlenített víz további tisztítására irányuló technikai megoldások bevezetése eredményezhetné a fenti veszélyek mérséklését.

8. Summary

The putative biological damaging effect of water disinfection by-products (DBPs) was investigated regarding mutagenity, apoptogenity, toxicity and cancerogenity with the following results.

- Drinking water produced by one of the Budapest water works contained DBPs within the range of the internationally published quantities.
- DBP caused concentration dependent positive Ames test following its administration to two bacterium strains, pointing to mutagenic activity.
- DBP administration to cultured human peripheral lymphocytes caused concentration dependent enhancement of apoptosis. According to our knowledge similar results have not been published in the literature.
- More than 200 chemically well-defined compounds were found in the DBP by our collaborating partner. Out of these two were selected as potentially mutagenic or cancerogenic on the base of their chemical structure (2,4-difluoroaniline (DFA) and 4-ethylbenzaldehyde (EBA)) and were tested in our experiments.
- Cultured human lymphocytes showed dose dependently enhanced apoptotic activity after DFA or EBA administration.
- Three months DFA as well as EBA administration to Zebra danio aquarium fish resulted in degenerative alterations in the liver and kidney. Tumors or preblastomatous lesions were not found.
- DFA and EBA caused abnormalities regarding the behaviour of the fish cohorts.
- Long term administration of DFA and EBA as well as the other eight compounds to Zebra danios is planned.
- The results of the present studies point to the fact that water disinfection by-products proved to be mutagenic, apoptosis enhancing and hepato/nephrotoxic. These effects may be prevented or ameliorated by new water disinfecting methods or by introducing techniques aiming further elimination of water pollutants.

9. Irodalomjegyzék

- Allard, S., Nottle, C.E., Chan, A., Joll, C. & von Gunten, U. (2013) Ozonation of iodide-containing waters: Selective oxidation of iodide to iodate with simultaneous minimization of bromate and I-THMs. *Water Res*, **47**, 1953-1960.
- Ashbolt, N.J. (2004) Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, **198**, 229-238.
- Attias, L., Contu, A., Loizzo, A., Massiglia, M., Valente, P. & Zapponi, G.A. (1995) Trihalomethanes in drinking water and cancer: risk assessment and integrated evaluation of available data, in animals and humans. *Sci Total Environ*, **171**, 61-68.
- Badawy, M.I., Gad-Allah, T.A., Ali, M.E. & Yoon, Y. (2012) Minimization of the formation of disinfection by-products. *Chemosphere*, **89**, 235-240.
- Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J. & Kroner, R.C. (1974) Determining volatile organics at microgram-per-litre levels by gas chromatography. *J. Am. Water Works Assoc.*, **66**, 703-706.
- Benitez-Bribiesca, L. & Sanchez-Suarez, P. (1999) Oxidative damage, bleomycin, and gamma radiation induce different types of DNA strand breaks in normal lymphocytes and thymocytes. A comet assay study. *Ann N Y Acad Sci*, **887**, 133-149.
- Betancourt, W.Q. & Rose, J.B. (2004) Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol*, **126**, 219-234.
- Bingham, P., Verlander, N.Q. & Cheal, M.J. (2004) John Snow, William Farr and the 1849 outbreak of cholera that affected London: a reworking of the data highlights the importance of the water supply. *Public Health*, **118**, 387-394.
- Blaser, R.E., Chadwick, L. & McGinnis, G.C. (2010) Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*, **208**, 56-62.
- Borisover, M. & Graber, E.R. (2004) Hydration of natural organic matter: effect on sorption of organic compounds by humin and humic acid fractions vs original peat material. *Environ Sci Technol*, **38**, 4120-4129.
- Brody, H., Vinten-Johansen, P., Paneth, N. & Rip, M.R. (1999) John Snow revisited: getting a handle on the Broad Street pump. *Pharos Alpha Omega Alpha Honor Med Soc*, **62**, 2-8.
- Bull, R.J., Birnbaum, L.S., Cantor, K.P., Rose, J.B., Butterworth, B.E., Pegram, R. & Tuomisto, J. (1995) Water chlorination: essential process or cancer hazard? *Fundam Appl Toxicol*, **28**, 155-166.

- Cantor, K.P. (1997) Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control*, **8**, 292-308.
- Cantor, K.P. (2010) Carcinogens in drinking water: the epidemiologic evidence. *Rev Environ Health*, **25**, 9-16.
- Catto, C., Charest-Tardif, G., Rodriguez, M. & Tardif, R. (2013) Accounting for the impact of short-term variations in the levels of trihalomethane in drinking water on exposure assessment for epidemiological purposes. Part II: biological aspects. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, **23**, 60-66.
- Chowdhury, S., Champagne, P. & McLellan, P.J. (2009) Models for predicting disinfection byproduct (DBP) formation in drinking waters: a chronological review. *Sci Total Environ*, **407**, 4189-4206.
- Chuang, Y.H., Lin, A.Y., Wang, X.H. & Tung, H.H. (2013) The contribution of dissolved organic nitrogen and chloramines to nitrogenous disinfection byproduct formation from natural organic matter. *Water Res*, **47**, 1308-1316.
- Crittenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J. & Tchobanoglous, G. (2005) *Water Treatment: Principles and Design. . 2nd Edition. Hoboken, NJ:Wiley. ISBN 0-471-11018-3.*
- Daignault, S.A., Noot, D.K. & Williams, D.T. (1988) A review of the use of XAD resins to concentration organic compounds in water. *Water Res.*, **22**, 808-813.
- Dawson, D.J. & Sartory, D.P. (2000) Microbiological safety of water. *Br Med Bull*, **56**, 74-83.
- Dotson, A., Westerhoff, P. & Krasner, S.W. (2009) Nitrogen enriched dissolved organic matter (DOM) isolates and their affinity to form emerging disinfection by-products. *Water Sci Technol*, **60**, 135-143.
- Esrey, S.A., Collett, J., Miliotis, M.D., Koornhof, H.J. & Makhale, P. (1989) The risk of infection from *Giardia lamblia* due to drinking water supply, use of water, and latrines among preschool children in rural Lesotho. *Int J Epidemiol*, **18**, 248-253.
- Fawell, J. & Nieuwenhuijsen, M.J. (2003) Contaminants in drinking water. *Br Med Bull*, **68**, 199-208.
- Ferranti, P., Fabbrocino, S., Cerulo, M.G., Bruno, M., Serpe, L. & Gallo, P. (2008) Characterisation of biotoxins produced by a cyanobacteria bloom in Lake Averno using two LC-MS-based techniques. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, **25**, 1530-1537.
- Ganesh, A. & Lin, J. (2013) Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *Int J Environ Health Res*.

- Gong, H., You, Z., Xian, Q., Shen, X., Zou, H., Huan, F. & Xu, X. (2005) Study on the structure and mutagenicity of a new disinfection byproduct in chlorinated drinking water. *Environ Sci Technol*, **39**, 7499-7508.
- Hasan, A., Thacker, N.P. & Bassin, J. (2010) Trihalomethane formation potential in treated water supplies in urban metro city. *Environ Monit Assess*, **168**, 489-497.
- Ho, L., Croue, J.P. & Newcombe, G. (2004) The effect of water quality and NOM character on the ozonation of MIB and geosmin. *Water Sci Technol*, **49**, 249-255.
- Hong, Y., Song, H. & Karanfil, T. (2013) Formation of haloacetic acids from dissolved organic matter fractions during chloramination. *Water Res*, **47**, 1147-1155.
- Howard-Jones, N. (1984) Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary. *Br Med J (Clin Res Ed)*, **288**, 379-381.
- Hrudey, S.E. (2009) Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. *Water Res*, **43**, 2057-2092.
- Hua, G., Reckhow, D.A. & Kim, J. (2006) Effect of bromide and iodide ions on the formation and speciation of disinfection byproducts during chlorination. *Environ Sci Technol*, **40**, 3050-3056.
- Humbert, H., Gallard, H., Jacquemet, V. & Croue, J.P. (2007) Combination of coagulation and ion exchange for the reduction of UF fouling properties of a high DOC content surface water. *Water Res*, **41**, 3803-3811.
- Ikner, L.A., Gerba, C.P. & Bright, K.R. (2012) Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food Environ Virol*, **4**, 41-67.
- Jones, D.B., Saglam, A., Triger, A., Song, H. & Karanfil, T. (2011) I-THM formation and speciation: preformed monochloramine versus prechlorination followed by ammonia addition. *Environ Sci Technol*, **45**, 10429-10437.
- Kanarek, M.S. & Young, T.B. (1982) Drinking water treatment and risk of cancer death in Wisconsin. *Environ Health Perspect*, **46**, 179-186.
- Khudoley, V.V. (1984) Use of aquarium fish, *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*, as test species for evaluation of nitrosamine carcinogenicity. *Natl Cancer Inst Monogr*, **65**, 65-70.
- King, W.D. & Marrett, L.D. (1996) Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes Control*, **7**, 596-604.

- Kitis, M., Kilduff, J.E. & Karanfil, T. (2001) Isolation of dissolved organic matter (DOM) from surface waters using reverse osmosis and its impact on the reactivity of DOM to formation and speciation of disinfection by-products. *Water Res*, **35**, 2225-2234.
- Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Scilimenti, M.J., Onstad, G.D. & Thruston, A.D., Jr. (2006) Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environ Sci Technol*, **40**, 7175-7185.
- Krenacs, T., Ficsor, L., Varga, S.V., Angeli, V. & Molnar, B. (2010) Digital microscopy for boosting database integration and analysis in TMA studies. *Methods Mol Biol*, **664**, 163-175.
- Krishnan, K., Paterson, J. & Williams, D.T. (1997) Health risk assessment of drinking water contaminants in Canada: the applicability of mixture risk assessment methods. *Regul Toxicol Pharmacol*, **26**, 179-187.
- Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S. & Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol In Vitro*, **23**, 1436-1442.
- Landi, S., Hanley, N.M., Warren, S.H., Pegram, R.A. & DeMarini, D.M. (1999) Induction of genetic damage in human lymphocytes and mutations in Salmonella by trihalomethanes: role of red blood cells and GSTT1-1 polymorphism. *Mutagenesis*, **14**, 479-482.
- Lawrence, J. & Cappelli, F.P. (1977) Ozone in drinking water treatment: a review. *Sci Total Environ*, **7**, 99-108.
- Leenheer, J.A. (2009) Systematic approaches to comprehensive analyses of natural organic matter. *Annals of Environmental Science*, **3**, 1-130.
- Lele, Z. & Krone, P.H. (1996) The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol Adv*, **14**, 57-72.
- Locas, A., Barthe, C., Barbeau, B., Carriere, A. & Payment, P. (2007) Virus occurrence in municipal groundwater sources in Quebec, Canada. *Can J Microbiol*, **53**, 688-694.
- Lu, J., Zhang, T., Ma, J. & Chen, Z. (2009) Evaluation of disinfection by-products formation during chlorination and chloramination of dissolved natural organic matter fractions isolated from a filtered river water. *J Hazard Mater*, **162**, 140-145.
- Macalady, D.L., Carpenter, J.H. & Moore, C.A. (1977) Sunlight-induced bromate formation in chlorinated seawater. *Science*, **195**, 1335-1337.

- Malcolm, M.S., Weinstein, P. & Woodward, A.J. (1999) Something in the water? A health impact assessment of disinfection by-products in New Zealand. *N Z Med J*, **112**, 404-407.
- Maron, D.M. & Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, **113**, 173-215.
- Michaud, D.S., Kogevinas, M., Cantor, K.P., Villanueva, C.M., Garcia-Closas, M., Rothman, N., Malats, N., Real, F.X., Serra, C., Garcia-Closas, R., Tardon, A., Carrato, A., Dosemeci, M. & Silverman, D.T. (2007) Total fluid and water consumption and the joint effect of exposure to disinfection by-products on risk of bladder cancer. *Environ Health Perspect*, **115**, 1569-1572.
- Mione, M.C. & Trede, N.S. (2010) The zebrafish as a model for cancer. *Dis Model Mech*, **3**, 517-523.
- Momba, M.N. & Kaleni, P. (2002) Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Res*, **36**, 3023-3028.
- Mulrane, L., Rexhepaj, E., Penney, S., Callanan, J.J. & Gallagher, W.M. (2008) Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, **8**, 707-725.
- Musikavong, C., Wattanachira, S., Marhaba, T.F. & Pavasant, P. (2005) Reduction of organic matter and trihalomethane formation potential in reclaimed water from treated industrial estate wastewater by coagulation. *J Hazard Mater*, **127**, 48-57.
- Nasser, A.M., Vaizel-Ohayon, D., Aharoni, A. & Revhun, M. (2012) Prevalence and fate of giardia cysts in wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol*, **113**, 477-484.
- Ngwenya, N., Ncube, E.J. & Parsons, J. (2013) Recent advances in drinking water disinfection: successes and challenges. *Rev Environ Contam Toxicol*, **222**, 111-170.
- Nwachuku, N. & Gerba, C.P. (2006) Health risks of enteric viral infections in children. *Rev Environ Contam Toxicol*, **186**, 1-56.
- OECD (1992) OECD 203, 1992 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1992. Effects on Biotic Systems. Method 203. Fish, Acute Toxicity Test. Adopted July 17, 1992.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S., 3rd, Moisander, P.H. & Dyble, J. (2001) Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Sci World Journal*, **1**, 76-113.
- Payment, P., Berube, A., Perreault, D., Armon, R. & Trudel, M. (1989) Concentration of Giardia lamblia cysts, Legionella pneumophila, Clostridium perfringens,

- human enteric viruses, and coliphages from large volumes of drinking water, using a single filtration. *Can J Microbiol*, **35**, 932-935.
- Peterson, S.M. & Freeman, J.L. (2009) Cancer cytogenetics in the zebrafish. *Zebrafish*, **6**, 355-360.
- Pilotto, L.S. (1995) Disinfection of drinking water, disinfection by-products and cancer: what about Australia? *Aust J Public Health*, **19**, 89-93.
- Plewa, M.J., Kargalioglu, Y., Vanker, D., Minear, R.A. & Wagner, E.D. (2002) Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environ Mol Mutagen*, **40**, 134-142.
- Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A. & Leeuwenburgh, C. (2002) The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci*, **959**, 93-107.
- Racz, G., Sujbert, L., Bocsi, J. & Szende, B. (2004) Rapid communication: water disinfection by-products enhanced apoptotic activity in human lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A*, **67**, 1315-1319.
- Rahman, M.B., Driscoll, T., Cowie, C. & Armstrong, B.K. (2010) Disinfection by-products in drinking water and colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*, **39**, 733-745.
- Ranmuthugala, G., Pilotto, L., Smith, W., Vimalasiri, T., Dear, K. & Douglas, R. (2003) Chlorinated drinking water and micronuclei in urinary bladder epithelial cells. *Epidemiol*, **14**, 617-622.
- Reemtsma, T. (2009) Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry: status and needs. *J Chromatogr A*, **1216**, 3687-3701.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R. & Demarini, D.M. (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat Res*, **636**, 178-242.
- Rook, J.J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat. Exam.*, **23**, 234-243.
- Rook, J.J. (1976) Haloforms in Drinking Water. *J. Americ. Water Works Assoc.*, **68**.
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B. & Sztajn bok, P. (2001) Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Water Res*, **35**, 23-32.

- Schmidt, C.K. & Brauch, H.J. (2008) N,N-dimethylsulfamide as precursor for N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation upon ozonation and its fate during drinking water treatment. *Environ Sci Technol*, **42**, 6340-6346.
- Schuler, D., Szende, B., Borsi, J.D., Marton, T., Bocsi, J., Magyarossy, E., Koos, R. & Csoka, M. (1994) Apoptosis as a possible way of destruction of lymphoblasts after glucocorticoid treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, **11**, 641-649.
- Smit, P. & Heniger, J. (1975) Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) and the discovery of bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **41**, 219-228.
- Smith, E.M., Plewa, M.J., Lindell, C.L., Richardson, S.D. & Mitch, W.A. (2010) Comparison of byproduct formation in waters treated with chlorine and iodine: relevance to point-of-use treatment. *Environ Sci Technol*, **44**, 8446-8452.
- Stanger, M., Agutter, P.A., Lake, R.C., Ashbolt, N.J. & Roser, D.J. (2006) Microbial risk and removal--a utility perspective. *Water Sci Technol*, **54**, 253-259.
- Sujbert, L., Kollár, G., Öllös, G., Müller, W.E.G. & Schröder, H.C. (1999) Genotoxic by-products in drinking water and human exposure. *Toxicol. Environ. Chem.*, **71**, 331-340.
- Sujbert, L., Kollar, G., Ollos, G. & Ribari, L. (1993) Measuring the genotoxic potential in two drinking water resources of Budapest in Salmonella/microsome system. *Bull Environ Contam Toxicol*, **51**, 349-355.
- Sujbert, L., Racz, G., Szende, B., Schroder, H.C., WE, G.M. & Torok, G. (2006) Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test. *Toxicology*, **219**, 106-112.
- Sullivan, C. & Kim, C.H. (2008) Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol*, **25**, 341-350.
- Symons, J.M., T.A. Bellar, J.K. Carswell, J. DeMarco, K.L. Kropp, G.G. Robeck, D.R. Seeger, C.J. Slocum, B.L. Smith & A.A. Stevens (1975) National organics reconnaissance survey for halogenated organics. *J. Am. Water Works Assoc.*, **67**, 634-647.
- Tardiff, R.G., Carson, M.L. & Ginevan, M.E. (2006) Updated weight of evidence for an association between adverse reproductive and developmental effects and exposure to disinfection by-products. *Regul Toxicol Pharmacol*, **45**, 185-205.
- Thurman, E.M. & Malcolm, R.L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ Sci Technol*, **15**, 463-466.

- Villanueva, C.M., Cantor, K.P., Grimalt, J.O., Malats, N., Silverman, D., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Castano-Vinyals, G., Marcos, R., Rothman, N., Real, F.X., Dosemeci, M. & Kogevinas, M. (2007) Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering, and swimming in pools. *Am J Epidemiol*, **165**, 148-156.
- von Gunten, U., Driedger, A., Gallard, H. & Salhi, E. (2001) By-products formation during drinking water disinfection: a tool to assess disinfection efficiency? *Water Res*, **35**, 2095-2099.
- Watson, S. (2004) Aquatic taste and odor: a primary signal of drinking-water integrity. *J Toxicol Environ Health A*, **67**, 1779-1795.
- Williams, D.T., Otson, R., Bothwell, P.D., Murphy, K.L. & L., R.J. (1980) Trihalomethane Levels in Canadian Drinking Water. *Environ Sci Res*, **16**, 503-512.
- Wright, M.S. & Collins, P.A. (1997) Waterborne transmission of *Cryptosporidium*, *Cyclospora* and *Giardia*. *Clin Lab Sci*, **10**, 287-290.
- Wu, Q.Y., Li, Y., Hu, H.Y., Ding, Y.N., Huang, H. & Zhao, F.Y. (2012) Removal of genotoxicity in chlorinated secondary effluent of a domestic wastewater treatment plant during dechlorination. *Environ Sci Pollut Res Int*, **19**, 1-7.
- Zoeteman, B.C. (1985) Drinking water and health hazards in environmental perspective. *Sci Total Environ*, **47**, 487-503.

10. Dr. Rácz Gergely publikációs jegyzéke

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Rácz G, Csenki Z, Kovács R, Hegyi A, Baska F, Sujbert L, Zsákovics I, Kis R, Gustafson R, Urbányi B, Szende B. (2012) Subacute toxicity assessment of water disinfection byproducts on zebrafish. *Pathol Oncol Res.* 18(3):579-84.

Sujbert L, **Rácz G**, Szende B, Schröder HC, G Müller WE, Török G. (2006) Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test. *Toxicology* 219(1-3):106-12.

Rácz G, Sujbert L, Bocsi J, Szende B. (2004) Rapid communication: water disinfection by-products enhanced apoptotic activity in human lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A* 10;67(17):1315-9.

(kumulált impakt faktor: 5,716)

Egyéb közlemények

Tömböl Z, Eder K, Kovács A, Szabó PM, Kulka J, Likó I, Zalatnai A, **Rácz G**, Tóth M, Patócs A, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol.* 23(12):1583-95.

Szabó J, Végh A, **Rácz G**, Szende B. (2005) Immunohistochemical demonstration of gonadotropin-releasing hormone receptors in prostate carcinoma. *Urol Oncol.* 23(6):399-401

Szende B, Paku S, **Rácz G**, Kopper L. (2005) Effect of Fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Res.* 25(4):2869-72.

Kéri G, **Rácz G**, Magyar K, Orfi L, Horváth A, Schwab R, Hegymegi BB, Szende B.(2003)Pro-apoptotic and anti-apoptotic molecules affecting pathways of signaltransduction.*Ann NY Acad Sci.* 1010:109-12.

Tyihák E, Bocsi J, Timár F, **Rácz G**, Szende B.(2001)Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour andendothelial cells.*Cell Prolif.* 34(3):135-41.

Összesített IF: 16.072 (ld. még könyvtári igazolás és MTMT)

11. Köszönetnyilvánítás

Prof. Dr. Szende Béla
Prof. Dr. Sujbert László
Prof. Dr.Kopper László
Prof. Dr.Matolcsy András
Prof. Dr. Nagy Péter
Prof. Dr. Urbányi Béla
Dr. Csenki Zsolt
Dr. Fónyad László
Dr. Teleki Ivett
Dr. Szegedi zsolt
Asszisztensek
Család