

Vízbázisunk gyógyszer-szennyezettségi állapota az endokrin diszruptorokra fókuszálva - A krónikus EDC szennyezések fiziológiai hatásai

Dr. Pirger Zsolt

Adaptációs Neuroetológiai Kutatócsoport
Kísérletes Állattani Osztály
MTA ÖK BLI



Problémafelvetés, előzmények

biológiailag aktív gyógyszer hatóanyagok és azok metabolitjai

kiválasztás

szennyvíz

szennyvíz tisztítók

tisztított szennyvíz

felszíni vizek (tavak, folyók) → vízi ökoszisztémák



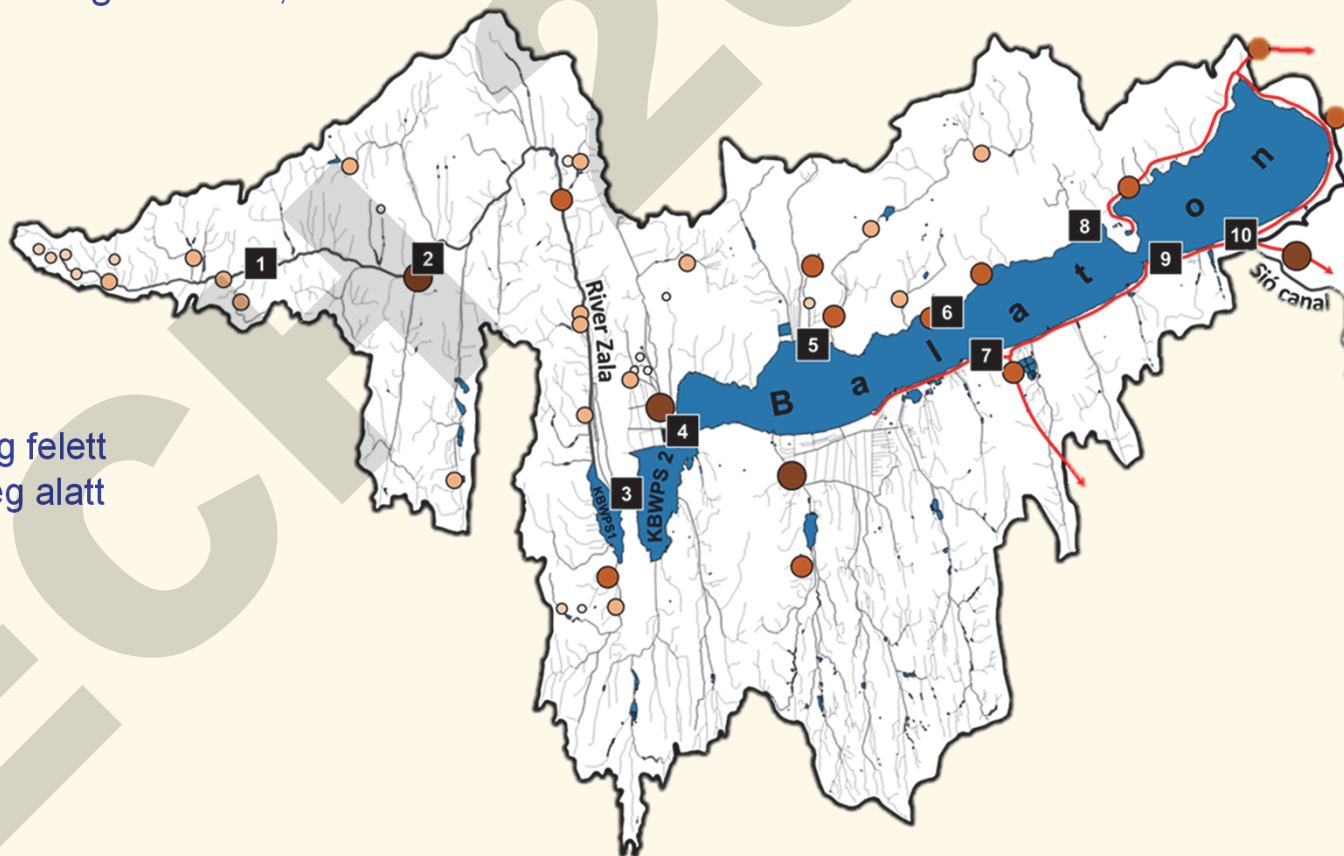
nem a szintetikus
gyógyszerhatóanyagok eltávolítására
tervezték őket – csak 10-50%-os a
tisztítási hatékonyságuk hatóanyagtól
függően!

Problémafelvetés, előzmények

- 4 db regionális szennyvíztisztító telep üzemel a Balaton vízgyűjtő területén.
 - Keszthely [4]; Nemesgulács [5]; Kéthely; Révfülöp [6]
- Évente közel 16 millió m³ tisztított szennyvíz éri el a Balatont (OVF adat).
 - ez a tó teljes víztérfogatának 0,84%-a

Mintavételezési pontok:

1. Zala - Zalaegerszeg felett
2. Zala – Zalaegerszeg alatt
3. Kis-Balaton 1-2
4. Zala torok
5. Szigliget
6. Révfülöp
7. Balatonlelle
8. Tihany - Sajkod
9. Zamárdi
10. Siófok



Analitikai felmérés

Belső standardok - szilárd fázisú extrakció (SPE) alapú HPLC-MS technikával

- gyógyszerértári és gyógyszergyári eladási adatok alapján,
134 db hatóanyagot céloztunk meg

- Alkaloidok
- Antiepileptikumok
- Antipszichotikumok/antidepresszánsok
- Szorongásoldó szerek
- Kardiovaszkuláris szerek
- Disszociatív anesztetikumok/Pszichedelikus szerek
- Hormonok/ Hormonszármazékok
- Helyi érzéstelenítők
- Kábítószeres/Nyugtatók/ Görcsoldók
- Nem szteroid gyulladásgátló szerek
- Ópiát- és Morfinszármazékok
- Stimulánsok/Hallucinogének

A vizsgált hatóanyagok közül 69-et találtunk meg a Balatonban és/vagy a vízgyűjtőjén, ezeket a hatóanyagokat 9 csoportba soroltuk

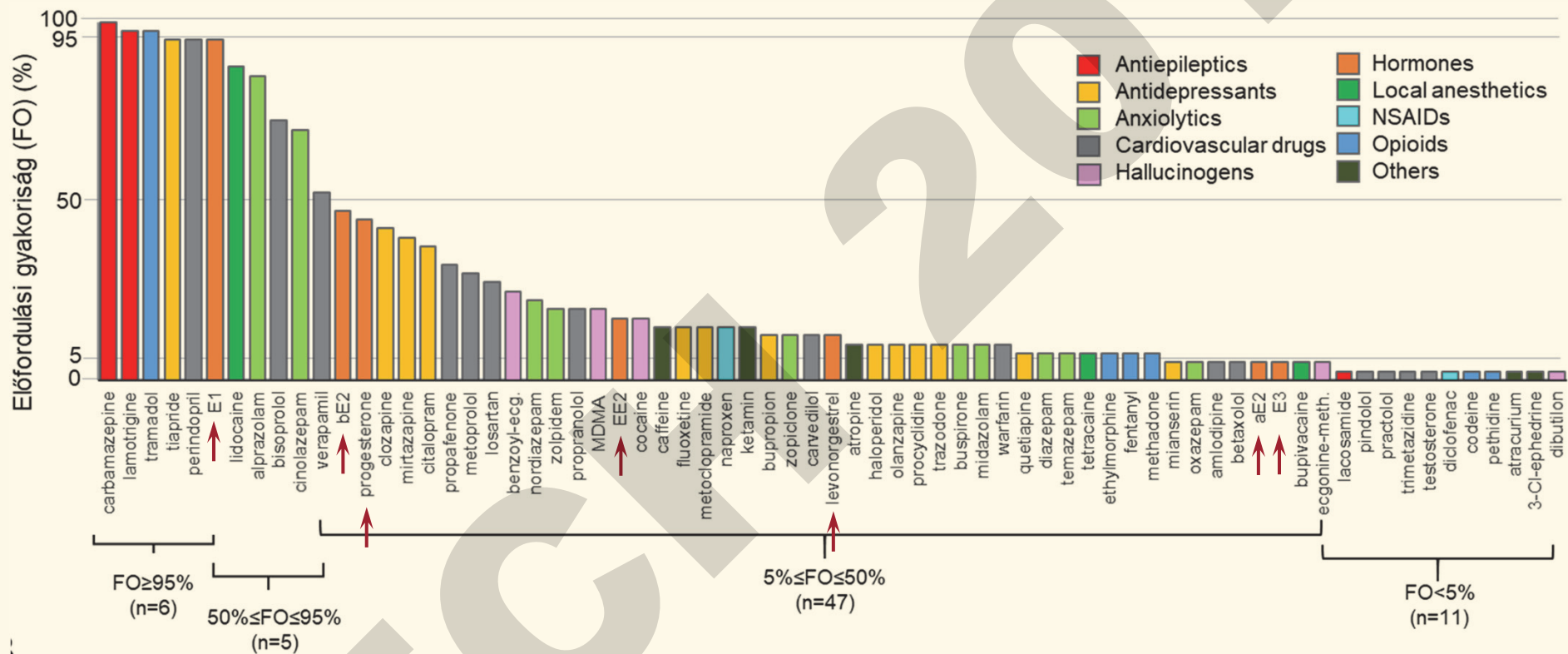
Hatóanyag csoport	Kiemelt hatóanyag	Min	Max	Átlag	Előfordulási	Nemzetközi adatok ng/l
		ng/l	ng/l	ng/l	gyakoriság, %	
Alkaloidok	koffein	15,6	138,7	73,9	15	max630 (USA), 31.3-2714 (China)
Antiepileptikumok	karbamazepin	4,7	804,6	115,5	100	25 (D), 78 (F), 75 (A), 138 (Balti), max1705 (Finl.)
	lamotrigin	5,7	1734,8	156,1	98	190 (D-Afrika)
Antipszichotikumok/Antidepresszánsok	citalopram	0,1	17,7	3,9	38	30 (Balti), 6-219 (USA), max274 (Finl.)
	fluoxetin	0,5	3,4	1,8	15	5.6-48 (USA), 1-2 (Port.)
Szorogásoldószer	alprazolam	0,1	12,6	1,3	85	2.9-9.1 (S)
Kardiovaszkuláris szerek	verapamil	0,1	27,1	2,5	53	max 3810 (Balti), max633 (Finl.)
	perindopril	0,1	386,0	27,0	95	
	bisoprolol	0,5	84,4	11,1	73	
Hormonok/hormon származékok	bE2	0,1	19,6	6,7	48	2.4 (F, USA), 0.015 (Balti)
	E1	0,2	10,5	1,8	95	0.2 (Balti), 2.35 (F), 1.35 (USA), 4.1-25.1 (Port.)
	EE2	0,2	2,7	1,2	18	2.1 (F, USA), 0.025 (Balti), 4.6-42.2 (Port.)
	progeszteron	0,6	9,3	2,4	45	9.15 (USA)
Helyi érzéstelenítők	lidocain	0,1	141,3	20,1	88	
Opiátok	tramadol	0,2	279,9	22,2	98	256 (Balti)
Egyéb	diclofenac	221,4	221,4	221,4	3	1080 (CZ), 0.96-253 (Engl.), 13-700 (Finl.), 5-370 (D)
	naproxen	2,2	56,1	20,6	15	1424 (CZ), 27-1687 (Finl.)
	benzoyl-ecgonine	0,1	2,3	1,1	25	1.06-107 (Engl.), 50-183 (Italy)
	ecgonine-methylester	21,6	34,8	28,2	5	
	MDMA (Ecstasy)	0,5	26,8	7,5	20	1.1-1.7 (Italy)
	ketamin	1,6	15,9	6,9	15	

A kimutatott hatóanyagok koncentrációja európai viszonylatban átlagos 😊

A koncentrációk nem kiugróan magasak → akut ökológiai hatás **nem** feltételezhető,

DE az ökoszisztémát krónikus hatások érik!

A 69 gyógyszerhatóanyag előfordulási gyakorisága (FO %) a Balaton és a vízgyűjtő 10 mintagyűjtési pontján



EDCs

progesztogének - levonorgestrel (LNG)
 progeszteron (PRG)
 drospirenon (DRG)

ösztrogének - ethinil-ösztradiol (EE2)
 öszttron (E1)
 β -ösztradiol (E2)

Sampling site	Dates	LEV	PRG	DRO	EE2	E1	E2
Zala, above Zalaeg.	2017.06.26		1,21		2,74	3,26	17,04
	2017.08.10	49,39	0,94	1,21	0,46	1,26	0,19
	2017.11.02		0,66		0,25	0,78	0,22
Zala, under Zalaeg.	2017.06.26	42,74	1,12	2,41	1,82	10,53	19,33
	2017.08.10		0,81			7,51	
	2017.11.02		1,43		0,74	5,4	
Kis-Balaton I-II	2017.06.26	44,69	1,26	2,84		1,56	19,12
	2017.08.10				0,57	0,51	0,41
	2017.11.02					0,98	
Zala torok	2017.06.26	38,2	3,27		2,13	9,76	17,95
	2017.08.10		0,82			2,18	0,67
	2017.11.02					1,25	
Szigliget	2017.06.26		2,25			5,52	3,96
	2017.08.10					0,86	0,2
	2017.11.02				0,18	0,43	
Révfülöp	2017.06.26		0,88			3,6	2,93
	2017.08.10		0,96			0,94	
	2017.11.02					0,29	
Sajkod	2017.06.26		0,94			0,92	3,44
	2017.08.10		0,61			0,46	
	2017.11.02					0,17	
Balatonlelle	2017.06.26		0,74			1,02	19,6
	2017.08.10					1,23	
	2017.11.02				0,18	0,33	
Zamárdi	2017.06.26					0,65	16,96
	2017.08.10	2,24	1,14		0,46	0,72	
	2017.11.02					0,19	
Siófok	2017.06.26						3,73
	2017.08.10		1,31			0,49	0,14
	2017.11.02					0,16	



- progesztogének: ~1 – 50 ng/L

- ösztrogének: ~ 0.1 – 20 ng/L

- **0.66 ng/L** DRO szignifikánsan csökkenti az ivarérett fürge csele fertilitását



- **3.3 ng/L** LNG hatására a nőstény karmosbéka androgenikus jeleket mutat



- **6.5 ng/L** LNG gátolja a hím tuskés pikó androgén-függő reprodukív ciklusát



- **13 ng/L** LNG hatást gyakorol a bodorka reprodukív rendszerére



- SOC képesek bioakkumulálódni a halakban és a kagylókban

Zeilinger és mtai 2009; Liu és mtai, 2011; Kroupova és mtai, 2014; Svesson és mtai, 2014; Zrinyi és mtai, 2017

E1:

tűzcsele (*P. promelas*) -LOEL = **31 ng/L**
zebradánió (*D. reiro*) -LOEL = **49 ng/L**
medaka (*O. latipes*) -LOEL = **100 ng/L**

E2:

zebradánió (*D. reiro*) -LOEL = **1.1 ng/L**
medaka (*O. latipes*) -LOEL = **4 ng/L**
-EC₅₀ = **200 ng/L**
tűzcsele (*P. promelas*) -LOEL = **9 ng/L**
-EC₅₀ = **120 ng/L**

EE2:

medaka (*O. latipes*) -LOEL = **0.1 ng/L**
zebradánió (*D. reiro*) -LOEL = **1.5 ng/L**
-EC₅₀ = **2.51 ng/L**
tűzcsele (*P. promelas*) -LOEL = **2 ng/L**

LOEL – Lowest Observed Effect Level

EC₅₀ – half maximal effective concentration

Célkitűzés

- vizsgálni a kimutatott progesztogén fogamzásgátlók vízi gerinctelen modellszervezetre (**nagy mocsári csiga**, *Lymnaea stagnalis*) gyakorolt életteni hatásait a viselkedéstől egészen a molekuláris szintekig

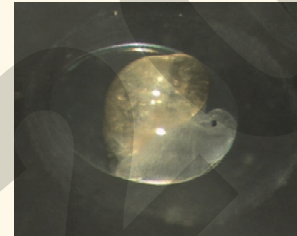
Miért a *Lymnaea*?

- a *Lymnaea* „agy” körülbelül 20.000 idegsejtet tartalmaz
- az idegdúcok felszínén elhelyezkedő idegsejtek relatív nagyok (50-100 μm) és narancsosan pigmentáltak
- a *Lymnaea* számos jól meghatározott viselkedési (táplálkozás, légzés, tanulás, stb.) mintázatot mutat, melyek kialakításában olyan reflexívek és mintázatgenerátor központok vesznek részt, amelyek a gerincesekben is azonosíthatók
- azonosított neurális hálózatok és szinaptikus kapcsolatok jellemzik
- a *Lymnaea* reprodukciós és fejlődési szakaszai részleteiben ismertek
- az idegsejtek szintjén, a gerincesekkel azonos molekuláris folyamatok jellemzik
- viszonylag jól ismert az endokrin rendszere, bár sok a kérdéses pont
- nem szükséges etikai engedély



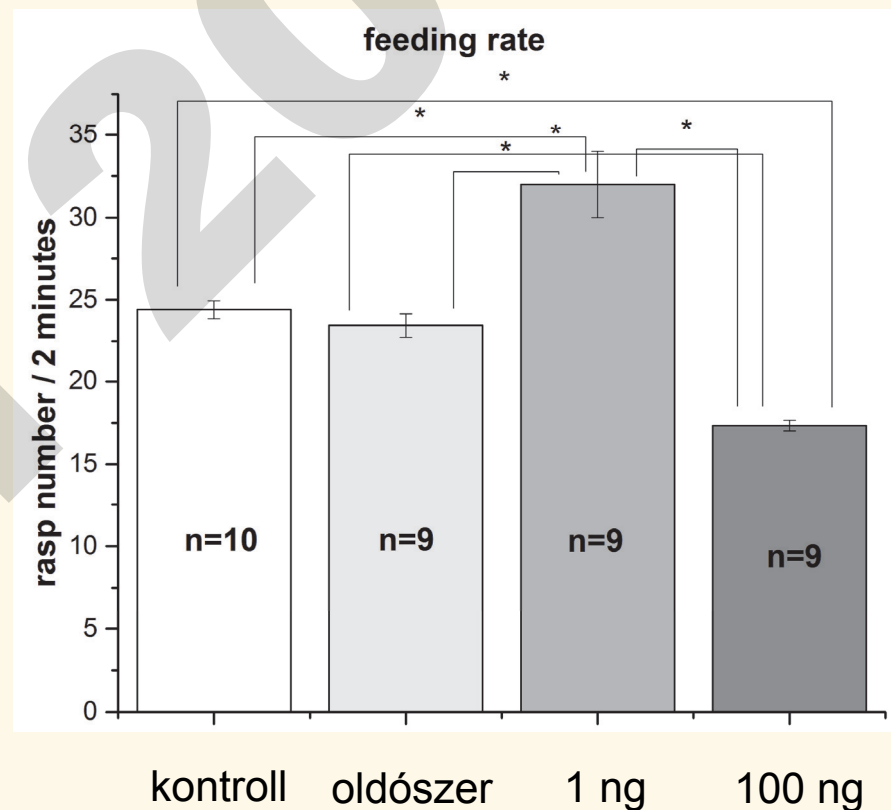
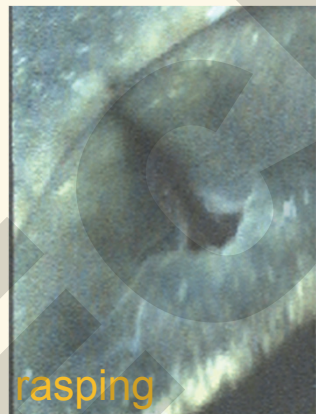
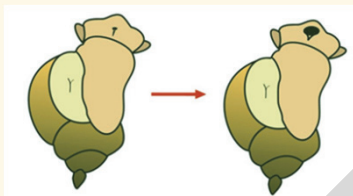
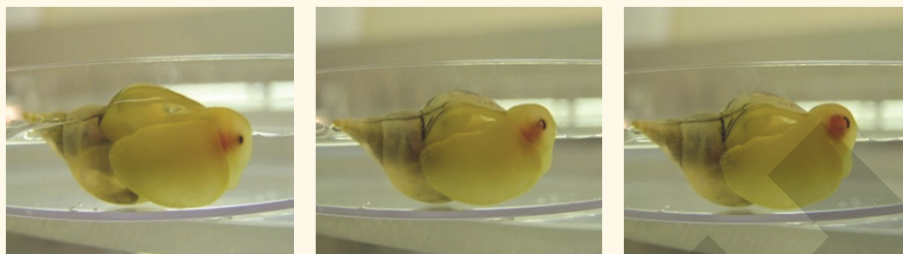
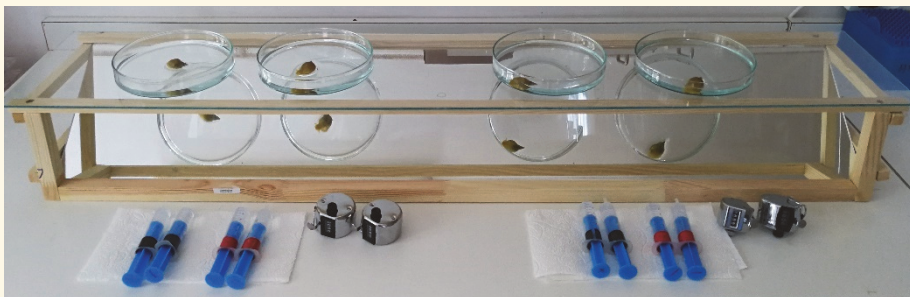
Komplex vizsgálatok

1, 10, 100, 500 ng/L **krónikus** (21 nap) progesztogén mix
(DRO, LNG, PRG) hormonkezelés



- **Viselkedési vizsgálatok** – táplálkozás (reszelőnyelv öltögetés), mozgás
- **Elektrofiziológiai vizsgálatok** – táplálkozást szabályozó idegsejtek aktivitása
- **Szövettani vizsgálatok** – GnRH IHC a CNS-ben
- **Molekuláris vizsgálatok** – GnRH mennyiségi meghatározás a CNS-ben
- **Testindexek vizsgálata** – spermium szám, peteszám, embrionális növekedés
- **Biokémiai vizsgálatok** – energia szintek mérése a zigótában (AEC, hexóz)

Progesztogén kezelés hatásai – táplálkozási tesztek



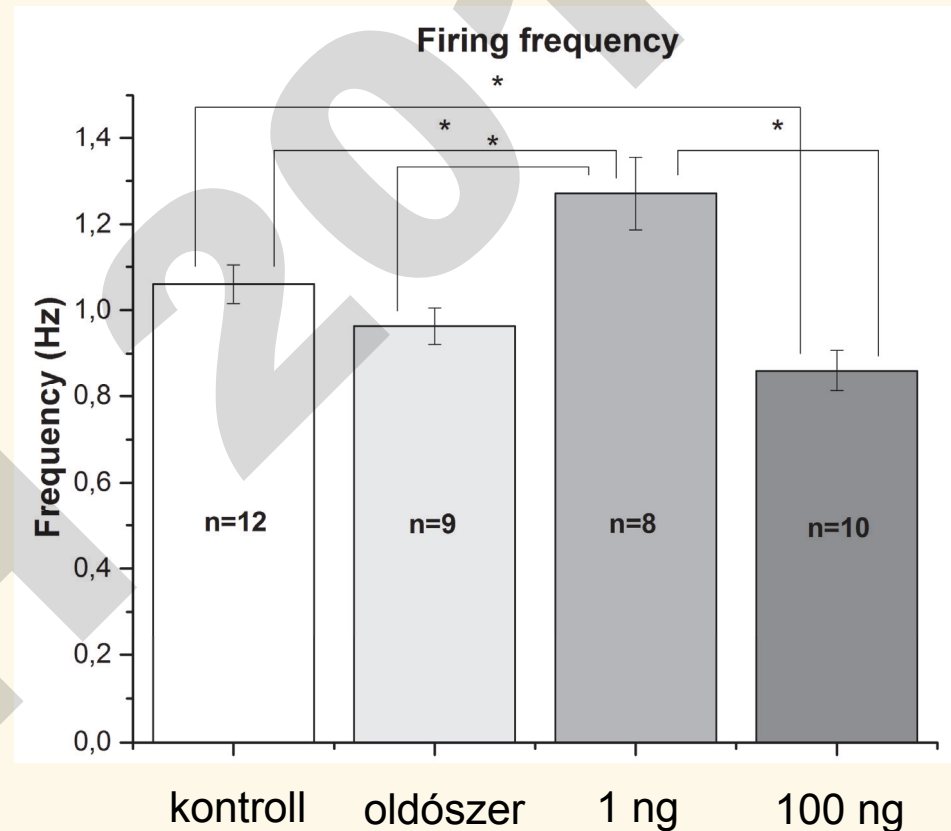
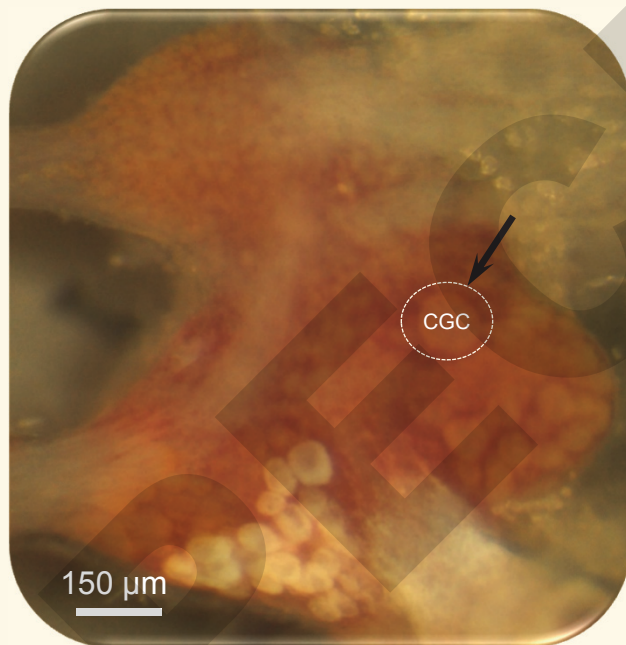
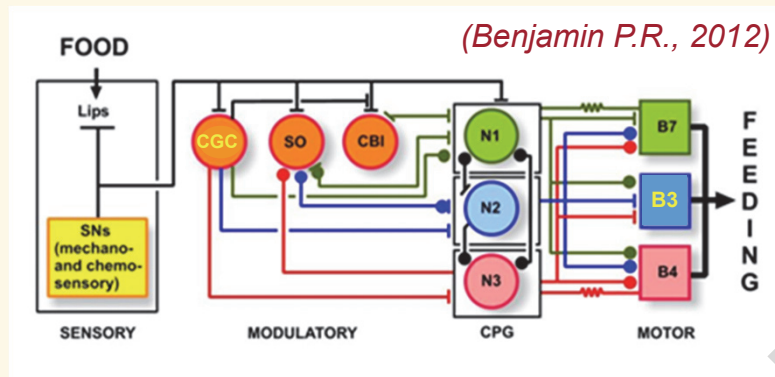
- a táplálkozási aktivitás koncentráció függő mértékben **változik** a hormonkezelés után

Progesztogén keverék hatása a táplálkozást moduláló interneuronban (CGC)

Lymnaea táplálkozási hálózat:

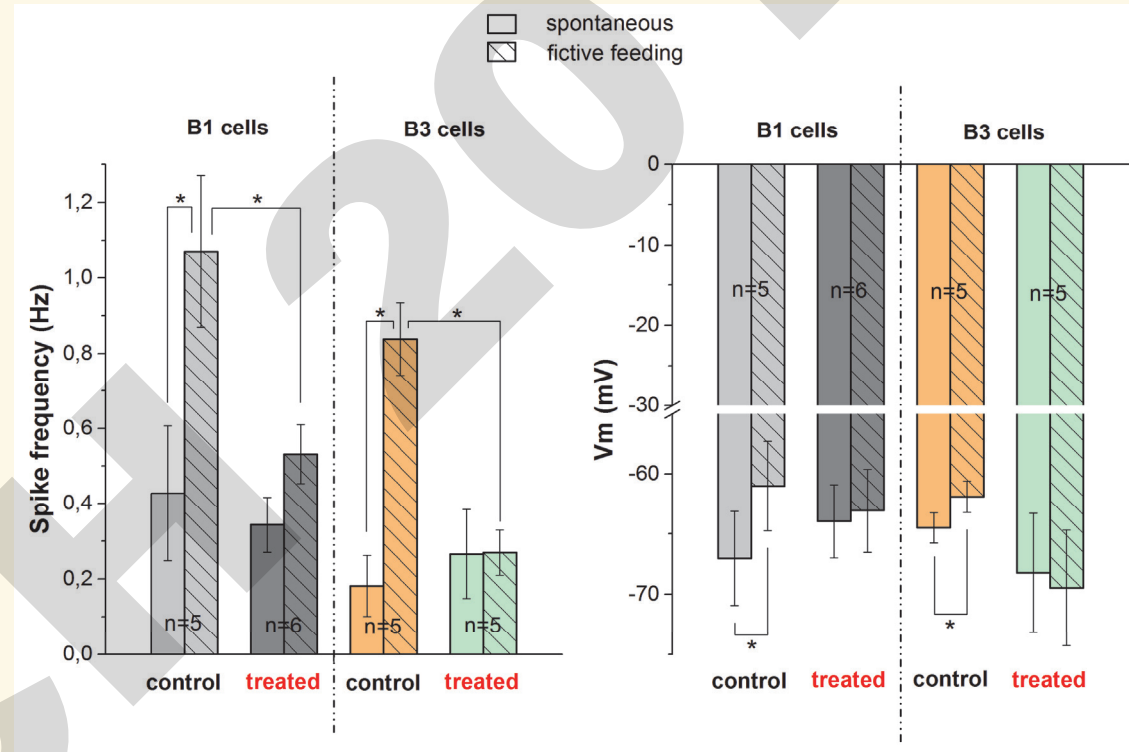
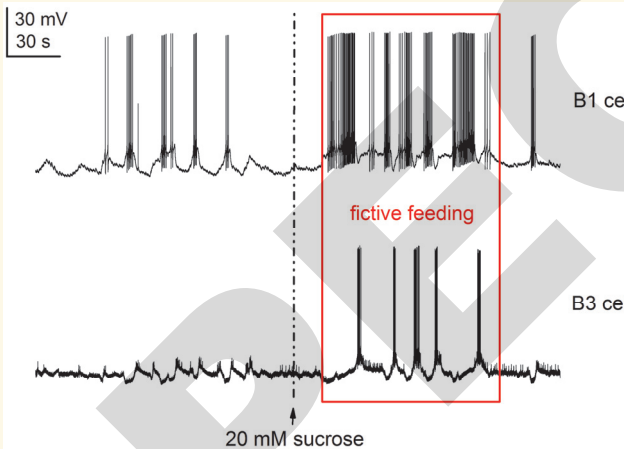
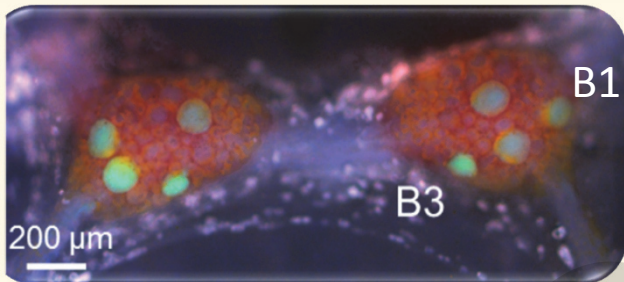
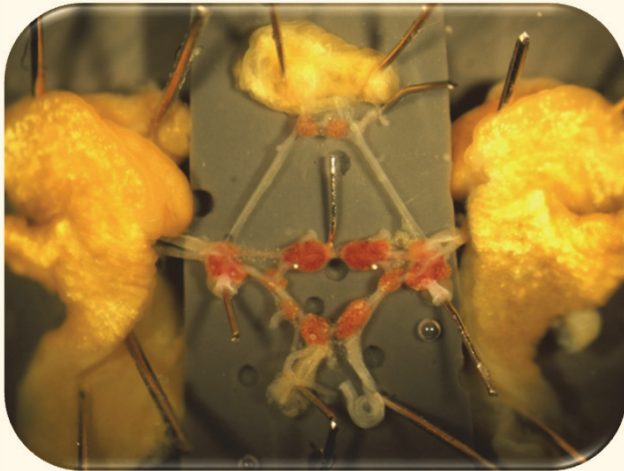
CGC – táplálkozási interneuron

B3 – táplálkozási motoneuron



- a táplálkozást moduláló interneuron tüzelési mintázata, hasonlóan a táplálkozási viselkedéshez, koncentráció függő mértékben **változik** a hormonkezelés után

Progesztogén keverék hatása a táplálkozást kialakító motoros neuronokban

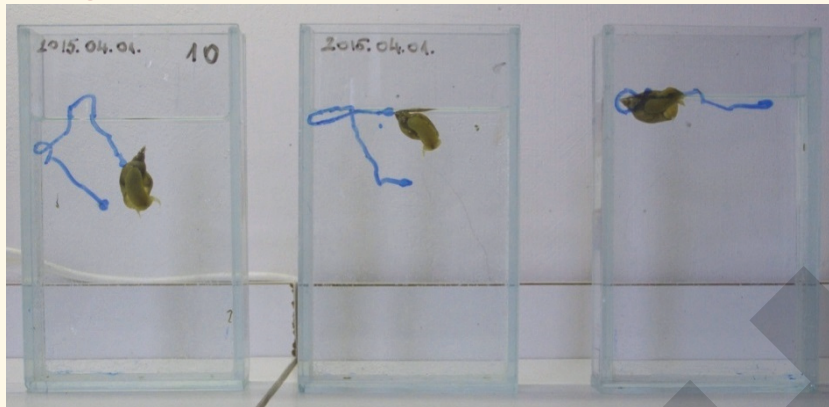


- a cukoroldat által indukált „fiktív táplálkozás” tüzelési frekvenciája **csökken** a (B1, B3) motoros idegsejtekben a 100 ng/L progesztogén kezelés hatására

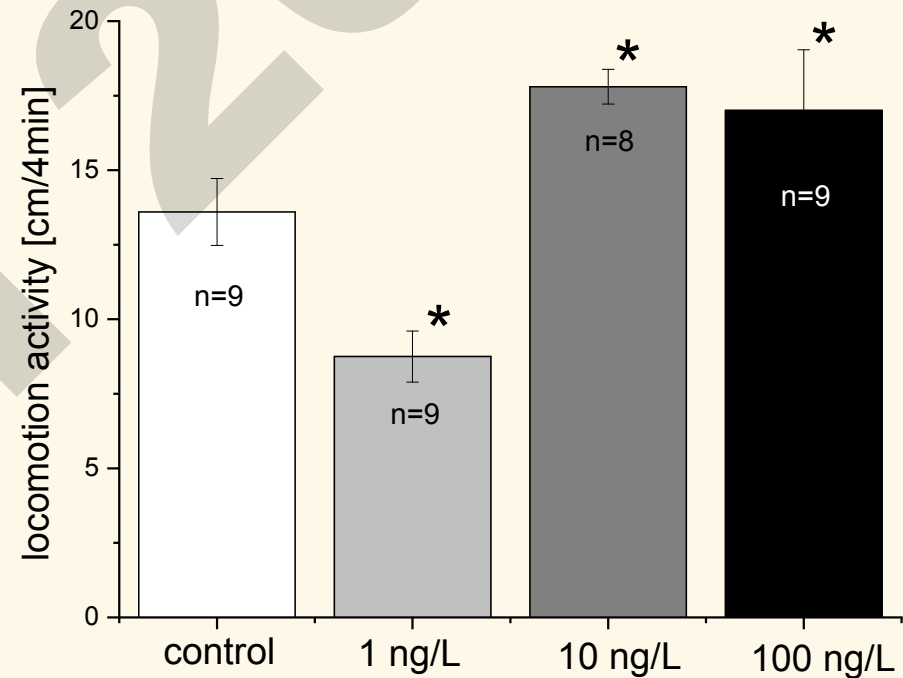
Progesztogén kezelés hatásai – mozgási tesztek

- a mozgási aktivitás, ugyan ellentétesen a táplálkozási viselkedéssel, de koncentráció függő mértékben **változik** a hormonkezelés hatására

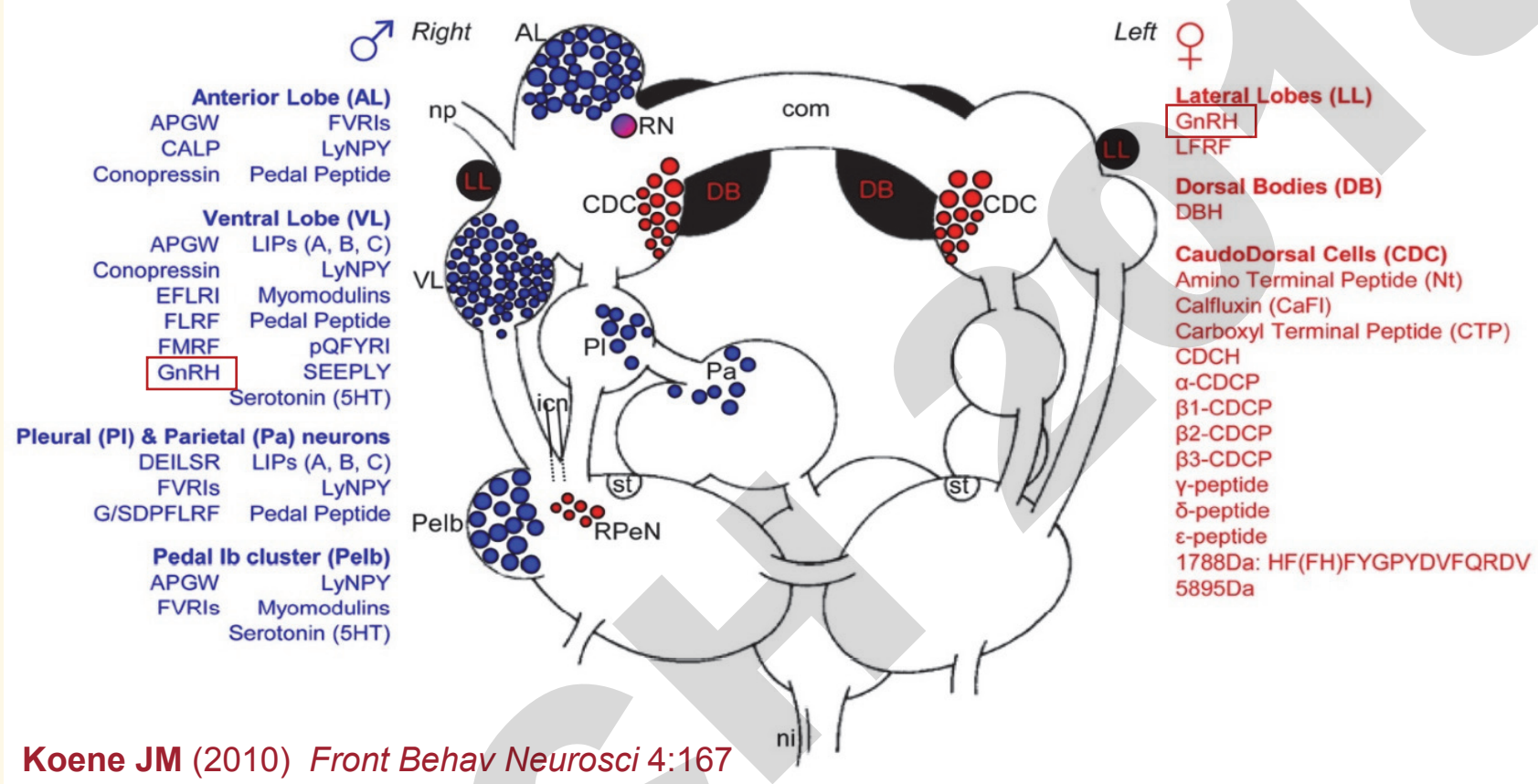
10 ng/L



500 ng/L



A szaporodás neuroendokrin szabályozása – a GnRH központi szerepe



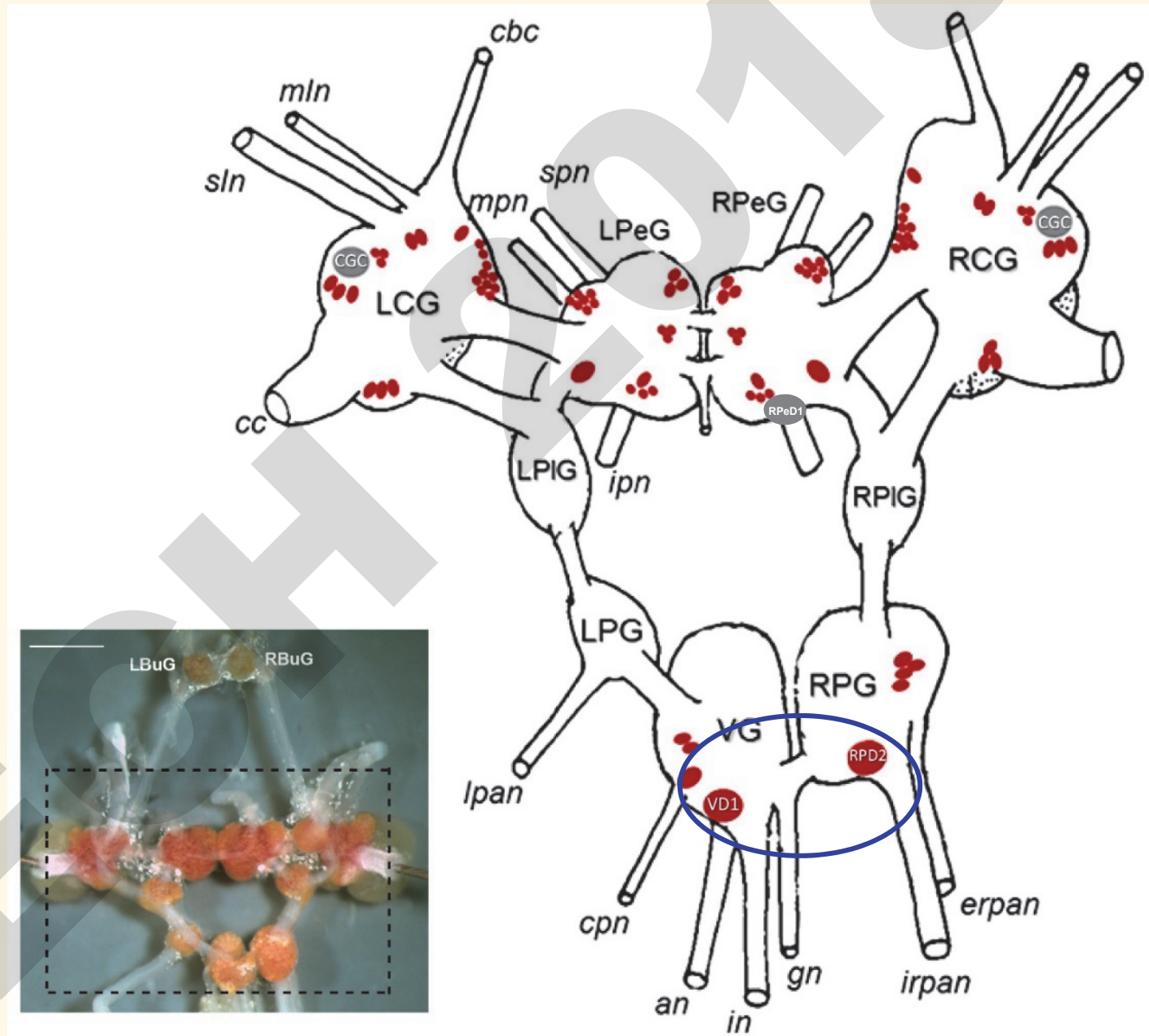
A GnRH központi szabályozó szerepet játszik minden gerinces szervezett reprodukciós folyamatában (pl. spermatogenezis, ovuláció), de mi a helyzet a gerinctelenekkel, pl. a csigákkal?



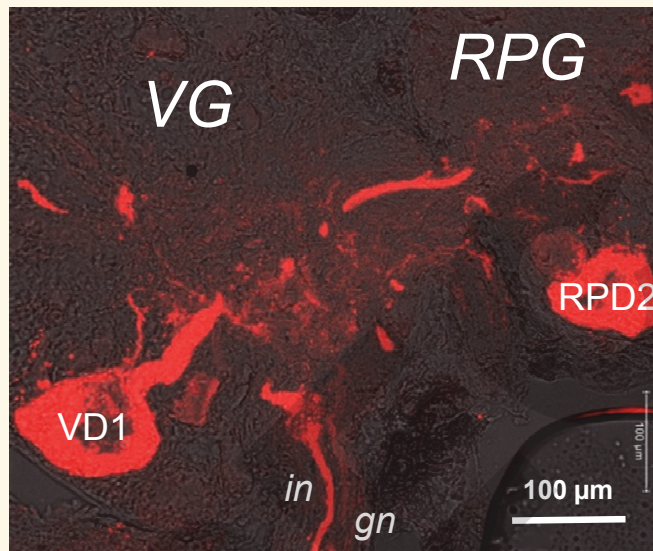
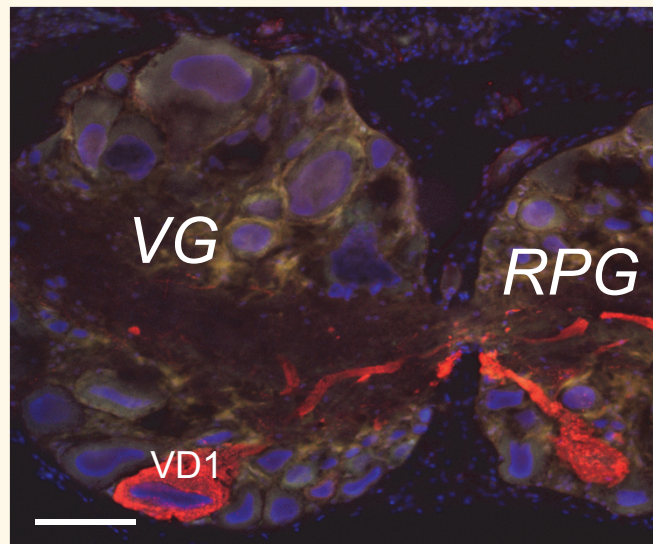
A GnRH-szerű hormon eloszlás és lokalizációja a *Lymnaea* CNS-ben

Nincs hipotalamusz,
de vannak IHC pozitív
idegsejtek, pl. a VD1
és RPD2 idegsejtek

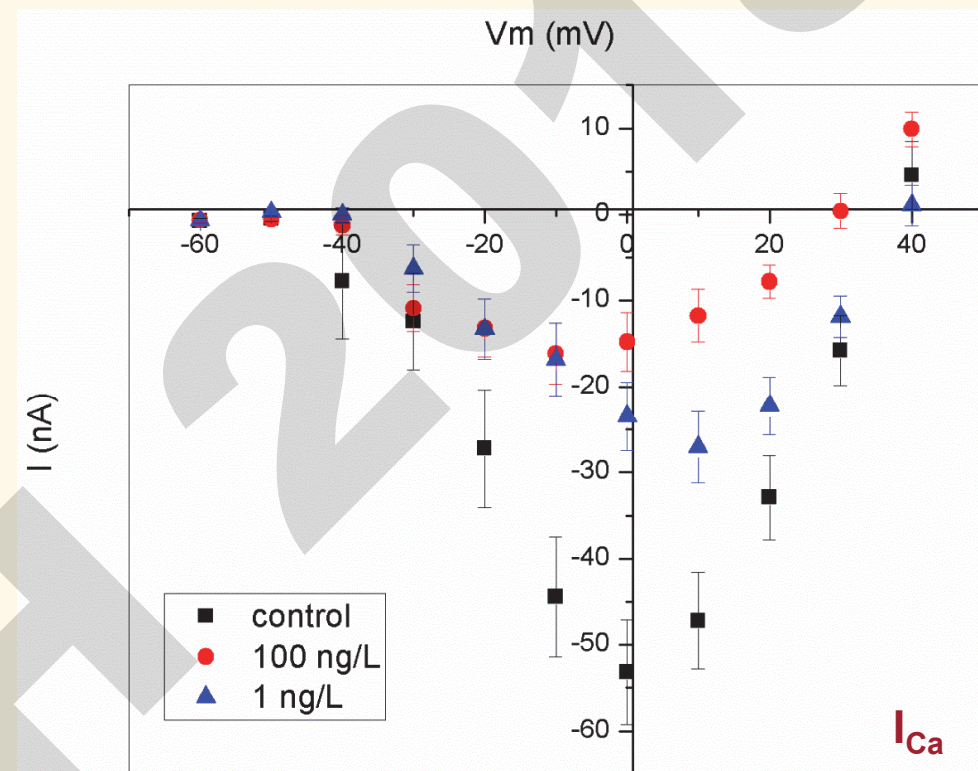
a VD1 – RPD2
neuronok viszont
kulcs szerepet
játszanak a
Lymnaea
szaporodásban
(irodalmi adat)



Progesztogén kezelés hatásai – változások a VD1 idegsejtben



a VD1 GnRH immunpozitív sejt



- inward Ca-áram csökken a progesztogén kezelés után



LyGnRH szekréció is csökken a VD1-ből (?)



a LyGnRH szint csökken a CNS-ben (?)

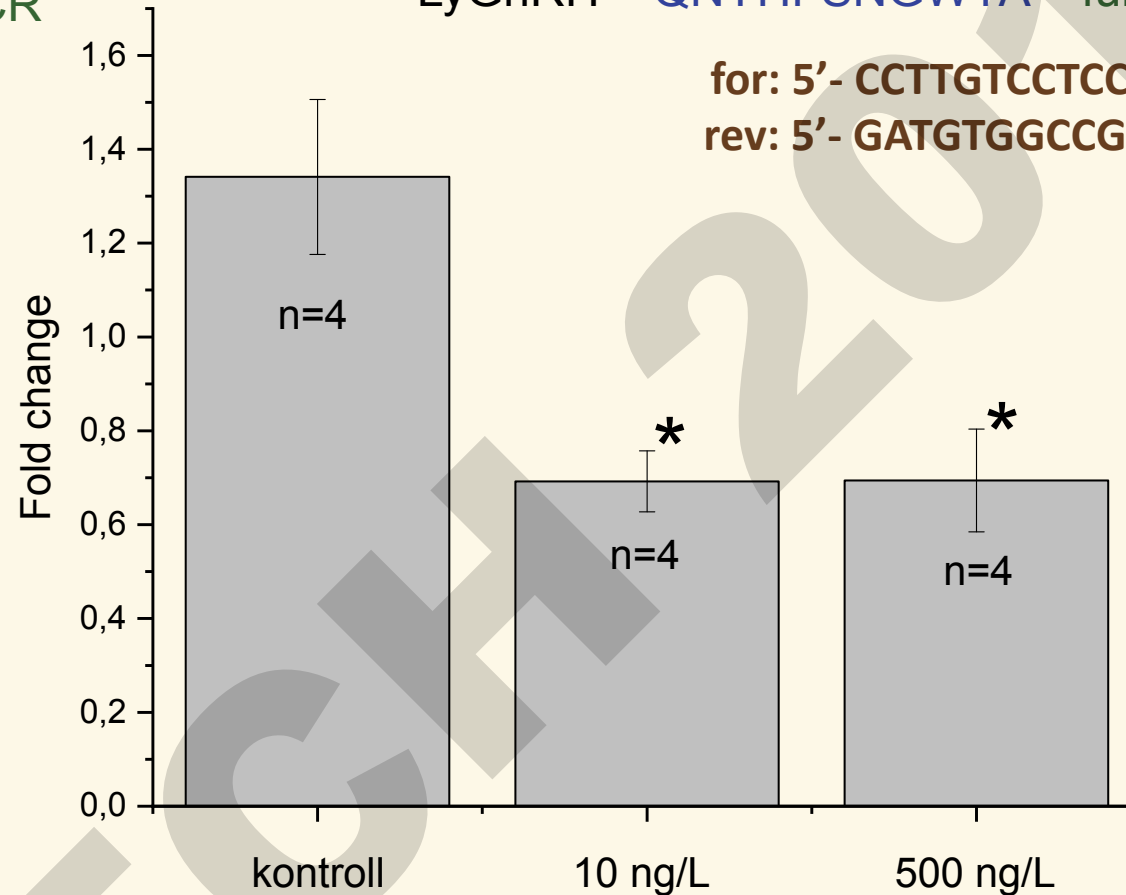
Progesztogén kezelés hatásai – LyGnRH expresszió a VD1-ben

qRT-PCR

LyGnRH – QNYHFSNGWYA – funkcionális hormon

for: 5'- CCTTGTCCTCCTGGCTGTAGTG - 3'

rev: 5'- GATGTGGCCGGTGTACGATGG - 3'



- a LyGnRH expresszió csökken a progesztogén kezelések hatására a VD1-ben

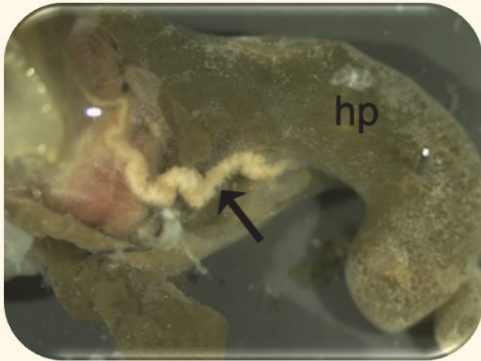


csökken a GnRH szint a CNS-ben és a vérnyirokban (hemolimfa)

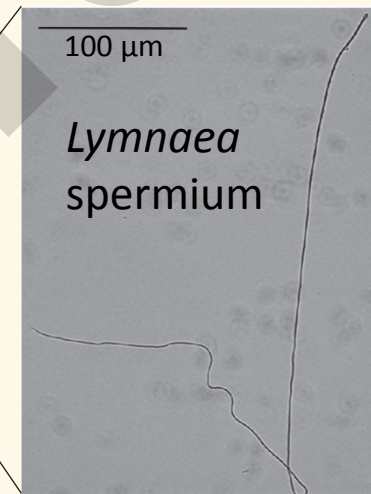
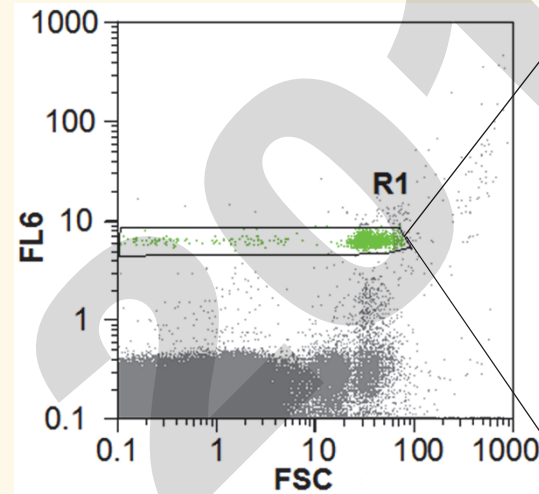
Fodor et al, *in preparation*

Progesztogén kezelés hatásai – reprodukció a „hím” vonalon

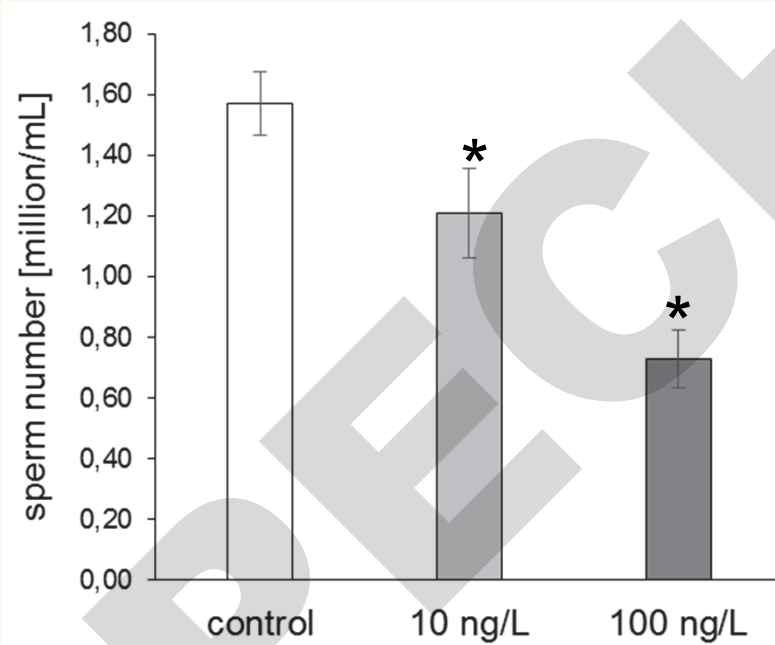
szeminális vezikulum



áramlási citometria

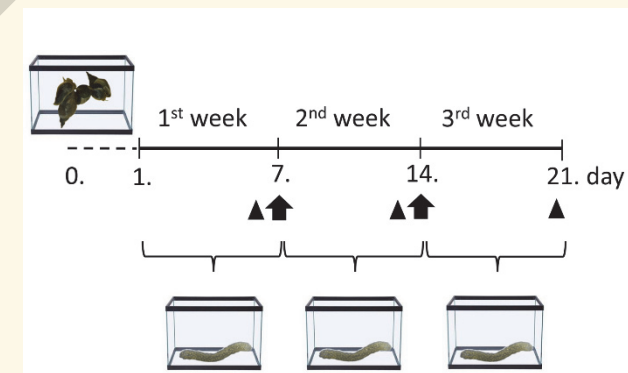
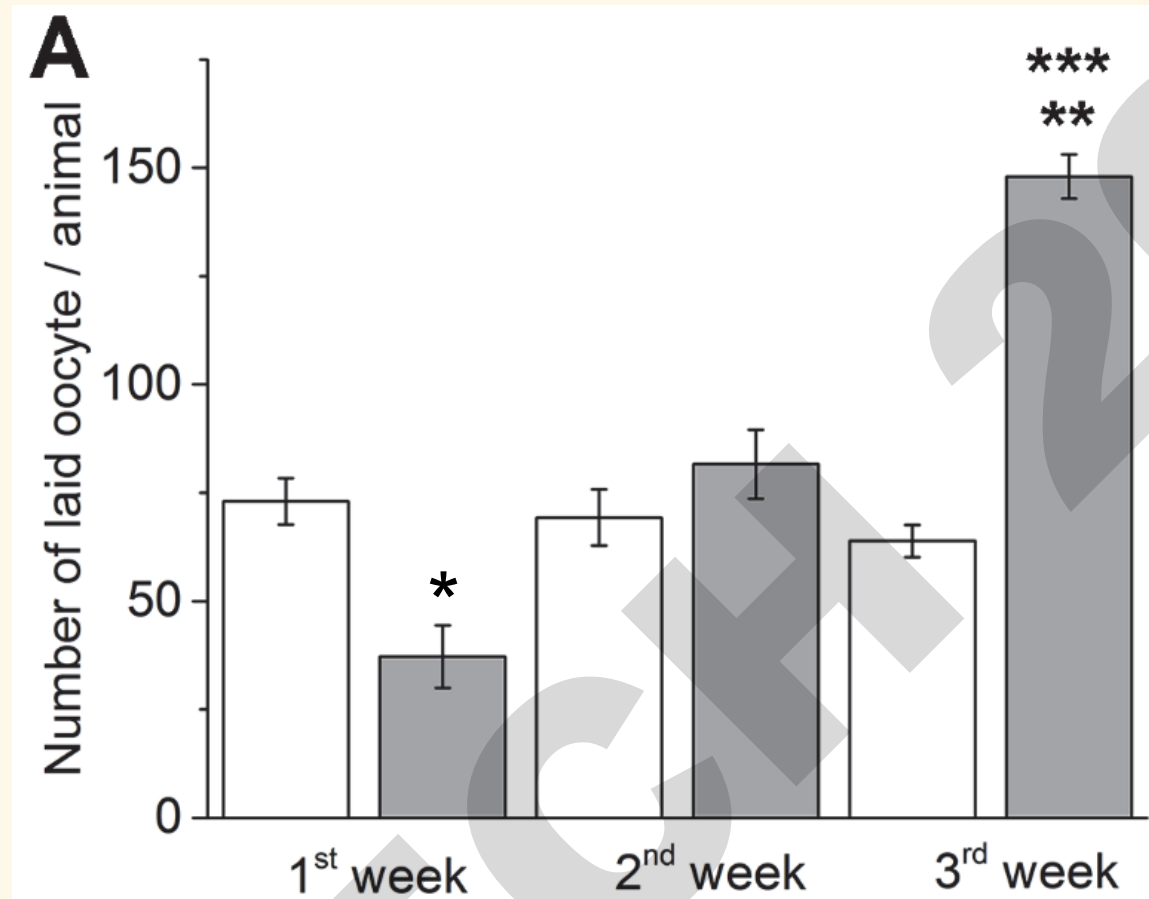


R1 gate



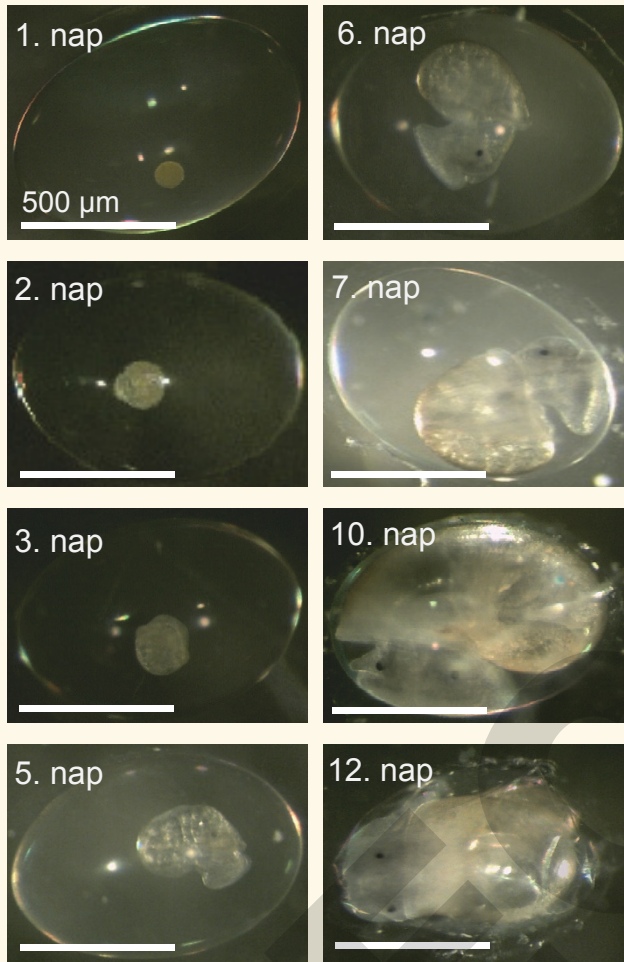
- a totál spermium szám is lecsökken a GnRH szinthez hasonlóan a progesztogén kezelés után

Progesztogén kezelés hatásai – reprodukció a „női” vonalon

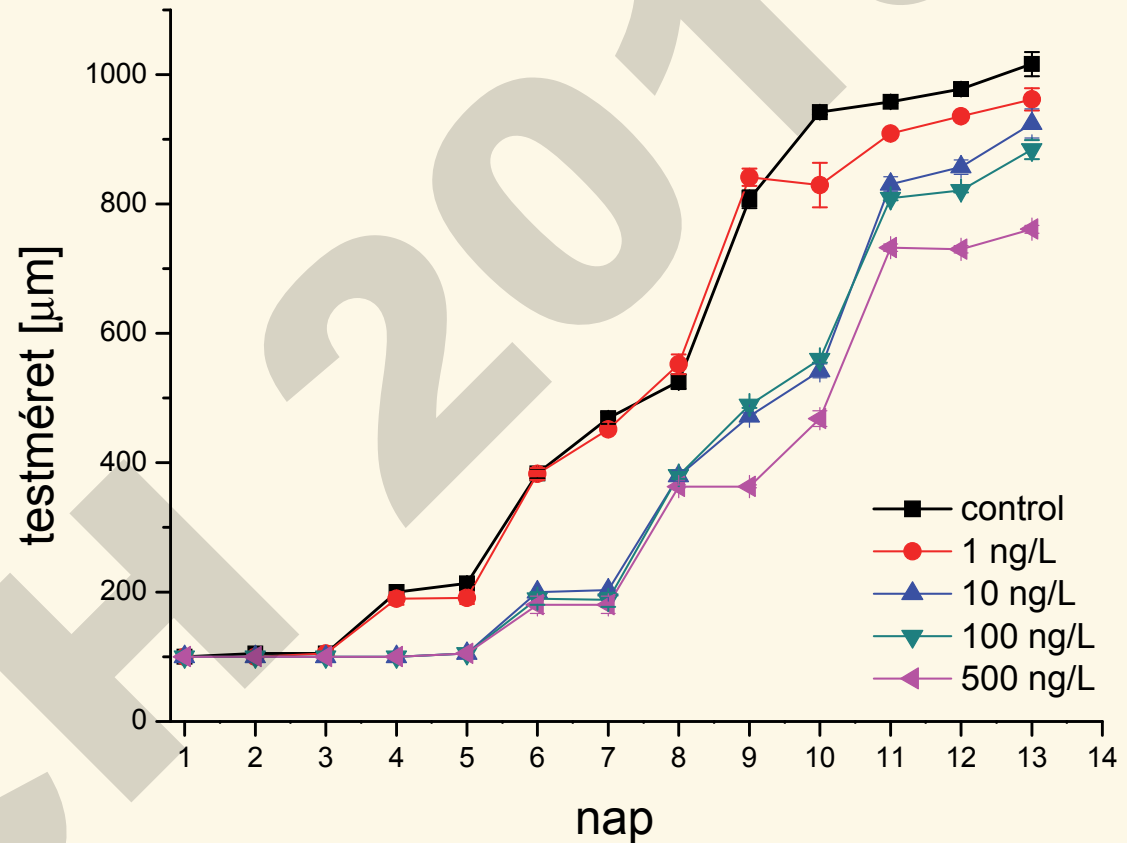


- az oocyta produkció szignifikánsan csökkent, vagy nőtt a 10 ng/L-es hormonkezelés hosszától függően a kontroll értékhez képest

Progesztogén kezelés hatása az embrionális fejlődésre



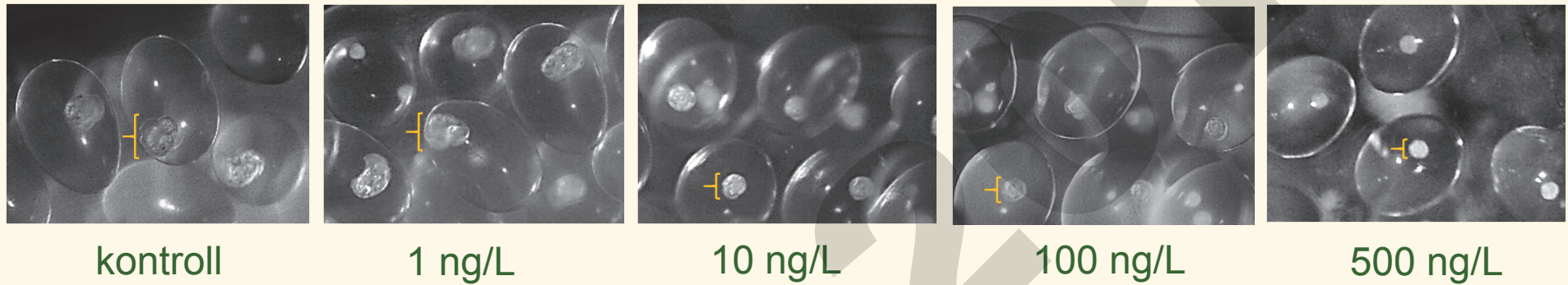
normál fejlődési stádiumok



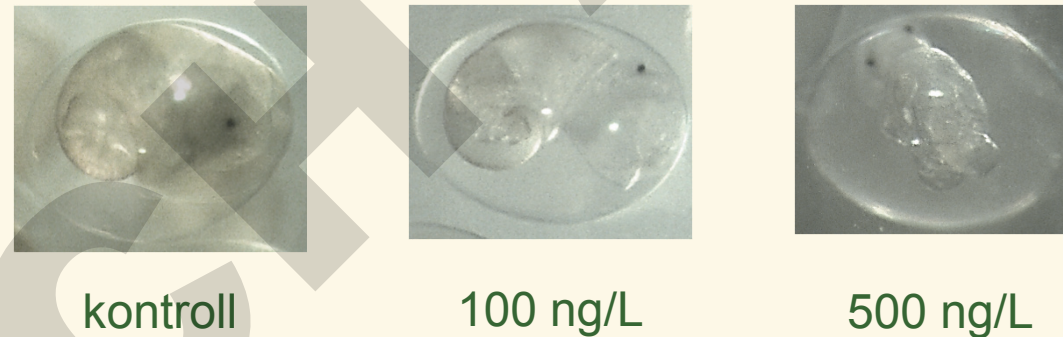
- az **embrionális fejlődés** üteme az egyes megfigyelési napokon koncentrációfüggő mértékben **szignifikánsan csökken** a hormonkezelés hatására

Progesztogén kezelés hatása az embrionális fejlődésre

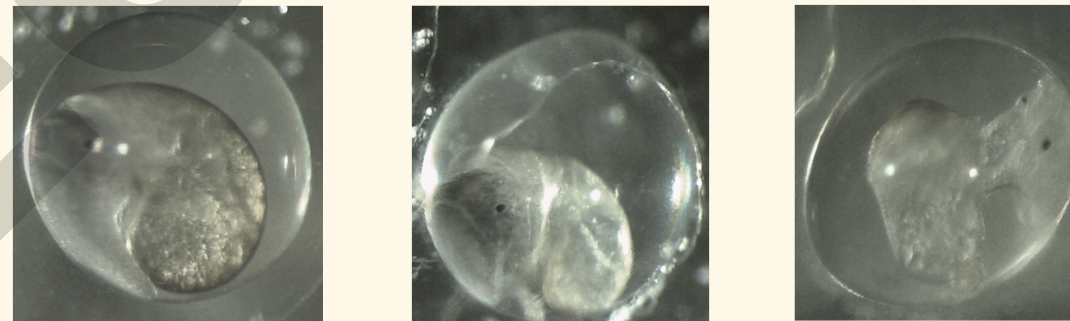
Ikerembriók, egy petezsákból kiindulva – fejlődés 4. napja:

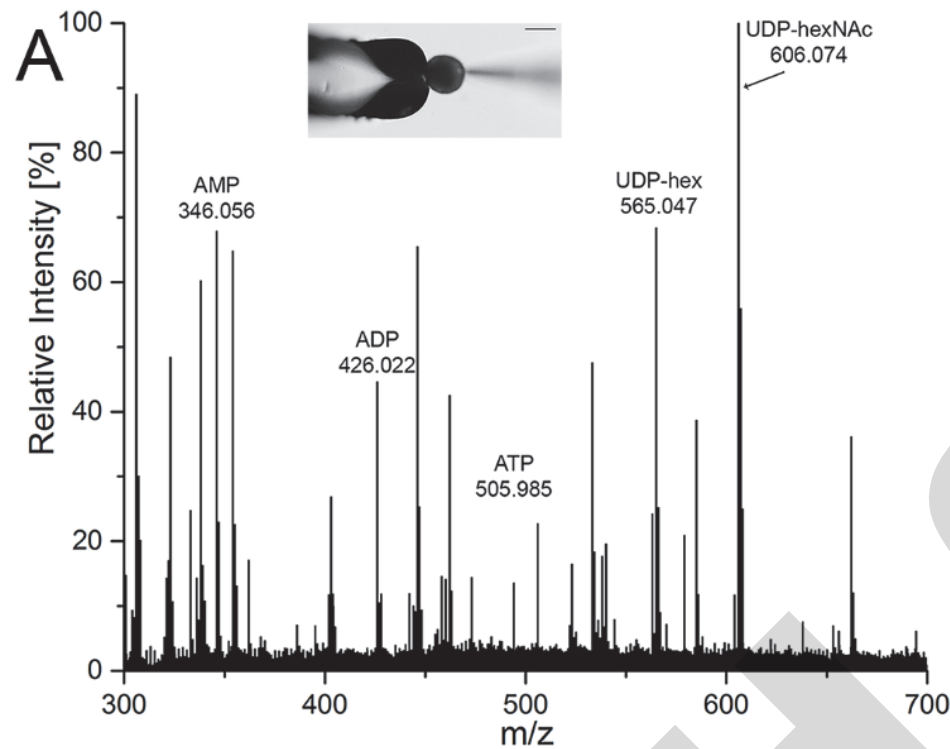


10 napos ikerembriók:



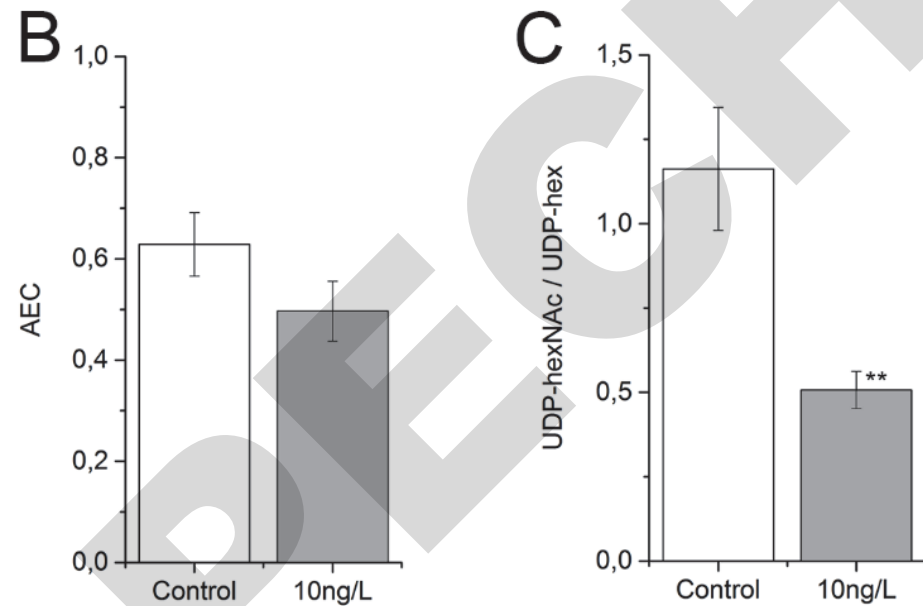
11 napos ikerembriók:





Egy sejtés zigótában meghatároztuk az energia hordozó molekulák (AMP, ADP, ATP) relatív arányát.

Majd ezek ismeretében kiszámoltuk az adenilált energia töltést (AEC) és a hexóz felhasználást



A progesztogén kezelés hatására az energia háztartás (cukor felhasználás) jelentősen lecsökkent (C)

Köszönöm a megtisztelő figyelmet!

