

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

mgr Konrad Wojnarowski

Rozprawa doktorska

**Ocena wpływu hormonów płciowych na wybrane
parametry fenotypu oraz ekspresję genu *cyp11b1*
potencjalnie związaną z procesem karcinogenezy u
danio pręgowanego (*Danio rerio*)**

Assessment of the influence of sex hormones on selected phenotype parameters
and *cyp11b1* gene expression potentially associated with the process of
carcinogenesis in zebrafish (*Danio rerio*)

Promotor:

dr hab. Ryszard Polechoński

Promotor pomocniczy

dr lek. wet. Małgorzata Bednarska

Wrocław 2022

Składam serdeczne podziękowania Panu dr hab. Ryszardowi Polechońskiemu za pomoc i cenne wskazówki w trakcie pisania niniejszej pracy.

Dziękuję również Pani dr lek. wet. Małgorzacie Bednarskiej za pomoc oraz wsparcie w trakcie prac nad doktoratem, którego efektem jest poniższa praca.

Serdeczne podziękowania dla:

*Prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego za cenne wskazówki na różnych etapach
pracy nad niniejszą dysertacją.*

*Prof. dr hab. inż. Ewy Łukaszewicz bez pomocy, której ta praca nie mogłaby
powstać.*

*Dr hab. Magdaleny Wołoszyńskiej za życzliwość oraz nieocenioną pomoc przy
przeprowadzaniu analiz genetycznych wykonywanych w ramach niniejszej pracy
oraz możliwość korzystania z RT-PCR.*

Dr Hanny Moniuszko za pomoc, nieocenione wsparcie, naukę oraz cierpliwość.

*Dr Przemysław Pokornego za pomoc oraz cenne wskazówki wykorzystane
podczas prowadzenia badań prowadzących do powstania niniejszej pracy.*

*Pani Grażyny Bojanek-Kacaper za nieustające wsparcie i wielokrotną
mobilizację, szczególnie w najtrudniejszym czasie.*

*Dziękuję wszystkim bliskim i przyjaciołom za pomoc, wielokrotnie potrzebne
podczas prac związanych z tematem niniejszej pracy doktorskiej, Bez Waszego
wsparcia nigdy bym tego nie osiągnął.*

„Człowiek jest uczniem, cierpienie jest jego nauczycielem” (Alfred de Musset)

Streszczenie

Dynamiczny rozwój cywilizacji generuje coraz więcej zanieczyszczeń fizycznych i chemicznych w środowisku. Wśród tych ostatnich szczególne znaczenie mają estrogeny, relatywnie trudne do usunięcia w czasie oczyszczania ścieków i z tego względu szeroko rozpowszechnione w wodach powierzchniowych i osadach dennych. Związki te cechuje wysoka biologiczna aktywność, mogąca szczególnie intensywnie oddziaływać na ryby - narażone na stały kontakt z tymi substancjami. Hormony te cechuje negatywny wpływ na wykształcenie drugorzędowych cech płciowych zwierząt, na układ krążenia, rozrodczy oraz immunologiczny, zaburzają szlaki metaboliczne i prowadzą do karcinogenezy. Celem pracy jest zbadanie wpływu estriolu, 17- β -estradiolu i estronu na wybrane parametry pigmentacji larw oraz na ekspresję genu *cyp1b1* (markera karcinogenezy u ludzi i ryb) na modelu danio pręgowanego (*Danio rerio*). W celu ustalenia relatywnego poziomu ekspresji genu *cyp1b1* zastosowano technikę RT-PCR, natomiast do określenia względnego poziomu pigmentacji wykorzystano autorską metodę analizy pigmentacji larw przy pomocy mikroskopu sprzężonego z kamerą wysokiej rozdzielczości oraz oprogramowania GIMP. Uzyskane wyniki wskazują na negatywny wpływ 17- β -estradiolu na wybarwienie larw. Potwierdzono zmiany ekspresji genu *cyp1b1* u ryb wyeksponowanych na testowane hormony. Wykazano istotny statystycznie wpływ estronu i estriolu, co stanowi pionierskie odkrycie w przypadku tych dwóch substancji. Spośród badanych estrogenów, w przypadku stężenia 10 ng/l, zaobserwowano zmniejszenie ekspresji w grupach badawczych, przy najwyższym poziomie relatywnej ekspresji w grupie kontrolnej, która istotnie ($p < 0,05$) różniła się od grup eksponowanych na 17- β -estradiol i estron i bardzo istotnie ($p < 0,01$) od grupy poddanej działaniu estriolu. W stężeniu 100 ng/l najwyższą ekspresję zaobserwowano w grupie wystawionej na działanie 17- β -estradiolu, natomiast najniższą w grupie kontrolnej. Zaobserwowano występowanie wysoko istotnych ($p < 0,01$) różnic między wszystkimi analizowanymi grupami. W przypadku stężenia 1000 ng/l najwyższą znormalizowaną relatywną ekspresją charakteryzowała się grupa wyeksponowana na estron, natomiast najniższą grupa kontrolna. Ponownie zaobserwowano występowanie wysoko istotnych ($p < 0,01$) różnic między wszystkimi analizowanymi grupami. Po raz pierwszy także stwierdzono istotną statystycznie pozytywną korelację (0,745455) między ogólną względną pigmentacją badanych ryb a ekspresją genu *cyp1b1*, co sugeruje potencjalną przydatność opracowanej metody analizy zmian wybarwienia ryb jako narzędzia do oceny wpływu substancji o wysokiej reaktywności biologicznej. Uzyskane wyniki, na tle powszechności rozmaitych estrogenów w środowisku, wskazują też na potrzebę prowadzenia szeroko zakrojonych badań nad różnymi substancjami o charakterze estrogenym, gdyż mogą one odgrywać istotną rolę w procesach karcinogenezy.

Słowa kluczowe: estrogeny, pigmentacja, qPCR, larwa, receptory estrogenów, marker genetyczny, analiza graficzna

Abstract

The dynamic development of civilization generates more and more physical and chemical pollutants in the environment. Among the latter, estrogens, relatively difficult to remove during wastewater treatment, and therefore widespread in surface waters and bottom sediments, are of particular importance. These compounds are characterized by high biological activity, which can have a particularly intense effect on fish - exposed to constant contact with these substances. These hormones have a negative impact on the development of secondary sexual characteristics of animals, on the circulatory, reproductive and immune systems, they disrupt metabolic pathways and lead to carcinogenesis. The aim of the study is to investigate the effect of estradiol, 17- β -estradiol and estrone on selected parameters of larvae pigmentation and on the expression of the *cyp1b1* gene (a marker of carcinogenesis in humans and fish) in the zebrafish model (*Danio rerio*). In order to determine the relative level of *cyp1b1* gene expression, the RT-PCR technique was used, while to determine the relative level of pigmentation, a proprietary method of larval pigmentation analysis was used using a microscope coupled with a high-resolution camera and GIMP software. The obtained results indicate a negative influence of 17- β -estradiol on the staining of the larvae. Changes in the expression of the *cyp1b1* gene in fish exposed to the tested hormones were confirmed. A statistically significant effect of estrone and estradiol has been demonstrated, which is a pioneering discovery for these two substances. Among the tested estrogens, at a concentration of 10 ng / l, a reduction in expression was observed in the research groups, with the highest level of relative expression in the control group, which significantly ($p < 0.05$) differed from the groups exposed to 17- β -estradiol and estrone and very significantly ($p < 0.01$) from the group treated with estradiol. At the concentration of 100 ng / L, the highest expression was observed in the group exposed to 17- β -estradiol, while the lowest in the control group. Highly significant ($p < 0.01$) differences were observed between all analyzed groups. In the case of the concentration of 1000 ng / l, the group exposed to oestrone was characterized by the highest normalized relative expression, while the control group was characterized by the lowest. Highly significant ($p < 0.01$) differences were again observed between all analyzed groups. For the first time, a statistically significant positive correlation (0.745455) was found between the overall relative pigmentation of the tested fish and the expression of the *cyp1b1* gene, which suggests the potential usefulness of the developed method of analyzing fish color changes as a tool for assessing the effect of substances with high biological reactivity. The obtained results, against the background of the prevalence of various estrogens in the environment, also indicate that we should not focus on one of them, but to conduct extensive research on various estrogenic substances, as they may play an important role in carcinogenesis.

Key words: estrogens, pigmentation, qPCR, larvae, estrogen receptors, genetic marker, graphical analysis

Spis treści

Wykaz skrótów i pojęć	9
Wstęp	11
Estrogeny	11
Definicja i podział	11
Zanieczyszczenie środowiska estrogenami	11
Charakterystyka <i>Danio rerio</i> Hamilton, 1822	14
Pozycja systematyczna	14
Występowanie i środowisko życia	15
Morfologia	16
Dymorfizm płciowy i determinacja płci	17
Danio pręgowany jako gatunek modelowy	18
Nowotwory i ich związek z estrogenami	20
Powszechność nowotworów	20
Karcinogeneza o podłożu estrogenowym	21
Cel pracy i hipotezy badawcze	22
Material i metody	23
Material zwierzęcy	23
Przygotowanie roztworów hormonów	24
System utrzymania larw	24
Analiza wybranych parametrów jakościowych wody	26
Procedura eutanazji larw	27
Przygotowanie materiału do izolacji RNA	28
Izolacja RNA	28
Synteza cDNA	30

Analiza real-time PCR	30
Analiza poziomu względnej pigmentacji larw	33
Analiza statystyczna	34
Wyniki	36
Ekspozycja na estrogeny a pigmentacja ryb	36
Ekspozycja na estrogeny a ekspresja genu <i>CYP1B1</i>	39
Dyskusja	44
Wnioski	50
Literatura	51
Spis rycin	65
Spis zdjęć	66
Spis tabel	67
Spis wykresów	68

Wykaz skrótów i pojęć

ER – receptor estrogenów

ER- α - receptor estrogenów alfa

ER- β - receptor estrogenów beta

ER γ -receptor estrogenów gamma

GPER1 (G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1) - receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G1

ER-X - receptor estrogenów X

Gq-mER - Błonowy receptor estrogenowy sprzężony z Gq

nER – jądrowe receptory estrogenów

mER – błonowe receptory estrogenów

AHR – receptory węglowodorów arylowych

VTG – owowitelina

E₁- estron

E₂- 17- β -estradiol

E₃ - estriol

MS-222 - metanosulfonian trikainy

E1,1 – grupa estron 10 ng/l

E1,2 – grupa estron 100 ng/l

E1,3 – grupa estron 1000 ng/l

E2,1 – grupa estradiol 10 ng/l

E2,2 – grupa estradiol 100 ng/l

E2,3 – grupa estradiol 1000 ng/l

E3,1 – grupa estriol 10 ng/l

E3,2 – grupa estriol 100 ng/l

E3,3 – grupa estriol 1000 ng/l

BPA – bisfenol A

EE2 - 17- α -etynyloestradiol

TBT - chlorek tributylocyny

PFOS - sól potasowa perfluorooktanosulfonianu

CPR- reduktaza NADPH-cytochromu P450

NP - nonylofenol

2-OHE₂ - 2-hydroksyestradiol

4-OHE₂ - 4-hydroksyestradiol

P.M_{2,5} - drobne cząstki stałe

Wstęp

Estrogeny

Definicja i podział

Istnieje wiele w pewnym stopniu różniących się definicji hormonów, jednak ujednolicając je można stwierdzić, że są one grupą związków organicznych produkowanych przez grupy komórek zwane gruczołami dokrewnymi bądź endokrynnymi w organizmach zwierząt, roślin i grzybów. Pełnią one funkcję regulatorów bardzo wielu procesów fizjologicznych. U zwierząt odpowiadają one za regulację wzrostu, rozwoju, metabolizmu, zachowań seksualnych, terytorialnych czy procesów związanych z rozrodem [1-7]. Hormony wpływają na odległe względem gruczołów komórki, wiążąc się z białkami receptorowymi w tych komórkach, w rezultacie powodując zmianę ich funkcji.

Szczególną grupę hormonów stanowią hormony płciowe. Dzieli się one na trzy grupy: androgeny, estrogeny i progestageny. Główną funkcją hormonów płciowych jest regulacja procesów fizjologicznych, jak i zachowań związanych z rozrodem kręgowców. Zarówno organizmy samic jak i samców produkują te związki, jednak ich funkcje i stężenia różnią się u obu płci [8-11]. Dodatkowo trzeba zauważyć, że hormony płciowe kręgowców, mimo ich wspólnego pochodzenia ewolucyjnego, mogą powodować zróżnicowane odpowiedzi u gatunków występujących w ramach jednej gromady, a nawet rodzaju [12]. Zjawisko powyższe może nieść za sobą zagrożenie o szczególnym znaczeniu w środowiskach wodnych, niejednokrotnie obejmujących swoimi zlewniami znaczne obszary terenu i w efekcie kumulujących związki o charakterze zanieczyszczeń estrogennych [13-15].

Zanieczyszczenie środowiska estrogenami

Źródłami hormonów płciowych w wodach powierzchniowych są duże aglomeracje miejskie, rzeźnie, ферmy zwierząt czy oczyszczalnie ścieków [16]. Trzeba również zaznaczyć, że hormony płciowe są jednymi z najtrudniejszych do usunięcia ze ścieków substancjami organicznymi [17] a stężenia obserwowane za odpływami oczyszczalni - najwyższymi obserwowanymi w środowisku wodnym [18-21]. Kolejnym aspektem stanowiącym bardzo duże zagrożenie związane z występowaniem hormonów płciowych w środowisku wodnym jest

mechanizm ich akumulacji w osadach dennych, gdzie związki te ulegają znacznie wolniejszemu rozpadowi i przy wystąpieniu określonych warunków fizyko-chemicznych może dojść do ich ponownego uwolnienia, w efekcie czego obserwowane jest gwałtowne zwiększenie się stężenia hormonów w wodzie [22-25]. Okres rozpadu hormonów płciowych na prostsze związki może wahać się w zakresie od 12 godzin do nawet 180 dni. Tempo tego procesu jest w dużej mierze zależne od ilości światła docierającego do zbiornika, temperatury w nim panującej oraz populacji zamieszkujących go mikroorganizmów [23]. Jak wskazuje dostępna literatura, istnieje cały szereg bakterii zdolnych do prowadzenia rozkładu estrogenów zanieczyszczających środowisko wodne, m. in. rodzaje: *Rhodococcus*, *Novosphingobium*, *Acinetobacter*, *Agromyces* czy *Sphingomonas*, których użycie może w przyszłości okazać się jednym z najefektywniejszych sposobów na wielkoskalowe usuwanie hormonów płciowych ze środowiska wodnego [22-24, 26, 27]. Dodatkowo trzeba podkreślić, że siła oddziaływania tych związków na zwierzęta może być dodatnio skorelowana z temperaturą wody. Zostało to potwierdzone badaniami dotyczącymi modulacji (wpływu temperatury wody na intensywność efektów) biologicznych efektów estrogenów, przeprowadzonych na rybach należących do gatunku strzebla grubogłowa *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820) [28]. Fakt ten, w dobie obecnego kryzysu klimatycznego, powinien jeszcze bardziej skupić uwagę badaczy na potencjalnych zagrożeniach płynących z zanieczyszczenia środowisk wodnych hormonami płciowymi. Istotne jest również potwierdzenie występowania synergistycznego efektu oddziaływania hormonów płciowych z innymi związkami organicznymi (takimi jak, bardzo często obecne w środowisku wodnym, bisfenole czy nonylofenole) na organizmy żywe [29-30].

Znaczenie estrogenów.

Grupę hormonów płciowych wskazywaną w literaturze jako najbardziej niebezpieczne stanowią estrogeny. Estrogeny to hormony płciowe charakteryzujące się budową sterydową - ich wspólną cechą jest obecność aromatycznego pierścienia A oraz brak właściwej dla innych steroidów grupy metylowej C10. Powstają z zsyntetyzowanych wcześniej z cholesterolu androgenów przy udziale enzymu aromatazy. Estrogeny są zróżnicowane pod względem liczby i umiejscowienia grup hydroksylowych. Głównym miejscem ich produkcji są gonady, jednak do tej pory poznano cały szereg innych narządów/tkanek (w tym: mózg, wątroba, nadnercza, jelito cienkie, skóra, naczynia krwionośne, tkanka tłuszczowa, tkanka kostna, trzustka), które

również prowadzą ich syntezę. Mechanizmy związane z tymi procesami oraz cel produkcji estrogenów w wymienionych tkankach i narządach nie zostały do końca poznane [31].

Estrogeny wywierają wpływ na ustrój organizmu poprzez różne izoformy białek zwanych receptorami estrogenów (ER). Białka te możemy zasadniczo podzielić na dwie klasy: 1./ receptory jądrowe zlokalizowane głównie w cytoplazmie i jądrze komórek (nER), do których należą najwcześniej opisane a zarazem najlepiej poznane receptory ER- α , ER- β oraz ER- γ [32,33] 2./ receptory błonowe (mER), których występowanie stwierdzono w błonach komórkowych [34-39]. Receptory jądrowe pośredniczą w działaniu estrogenów poprzez wiązanie się estrogenami (ligandami) poprzez palce cynkowe. Hormon, który przyłączy się do receptora tworzy z nim kompleks, który następnie jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie następuje powolna odpowiedź genomowa komórki prowadząca do ekspresji określonych genów [32,33]. Do receptorów mER zaliczamy: receptory GPER1, ER-X i Gq-mER [34-39]. Ich mechanizm działania opiera się na gwałtownej odpowiedzi niegenomowej, mającej miejsce praktycznie natychmiast po kontakcie ze estrogenami. W jej efekcie rozpoczyna się wewnątrzkomórkowy cykl kaskad sygnalizacyjnych [34-39]. Różnica w prędkości wspomnianych reakcji jest zasadnicza - w przypadku odpowiedzi genomowej są to godziny bądź dni, natomiast w odpowiedzi niegenomowej - sekundy. Co jednak istotne, w przypadku receptorów mER wiele ich funkcji oraz zachodzących między nimi interakcji jest nadal stosunkowo słabo poznanych [40-42]. Kolejną różnicą między wspomnianymi receptorami jest znacznie odmienny stopień powinowactwa wobec różnych estrogenów, niejednokrotnie warunkujący również siłę odpowiedzi w określonej tkance lub grupie komórek. Warto również nadmienić stosunkowo niedawno potwierdzony sposób działania wymienionych receptorów, w którym szlaki genomowe oraz niegenomowe wzajemnie na siebie wpływają, niejednokrotnie prowadząc do skutków odmiennych aniżeli w przypadku działania tylko jednego z ich rodzajów [43]. W miejscu tym należy również zaznaczyć, że estrogeny czy ksenoestrogeny mogą wywierać wpływ nie tylko poprzez wspomniane receptory estrogenów, ale również przez odmiennie od nich receptory węglowodorów arylowych (AHR), należących wraz z nimi do superrodziny receptorów bHLH-PAS. Niejednokrotnie, pod wpływem tych samych związków mogą one wywoływać znacznie silniejsze efekty [44] aniżeli wspomniane receptory estrogenów. Co istotne, mogą one również wpływać na intensywność reakcji receptorów estrogenów wywołaną przez przyłączające się do nich ligandy [45].

Charakterystyka oraz docelowe działanie estrogenów powodują, że są one efektywne już w bardzo niskich stężeniach. Tym samym zakres negatywnych oddziaływań na organizmy zwierząt narażonych na kontakt z wyższymi stężeniami jest bardzo szeroki. Do potencjalnych

skutków wpływu tych hormonów możemy zaliczyć zaburzenia: wykształcania pierwszo- i drugorzędowych cech płciowych [46-50], syntezy VTG (owowiteliny) [51-57], naturalnych zachowań o podłożu terytorialnym [58], układów drapieżnik-ofiara [59], stosunku płci w populacji [48,50,52,57], a także zmniejszenia ilości produkowanych komórek rozrodczych [52,54,60-62], zakłócenie rytmu okresowej migracji [63-65], feminizację gonad samców [55,66], rozregulowanie naturalnie występujących procesów apoptotycznych [67], zaburzenia funkcjonowania układu immunologicznego [68,69] czy nawet indukowanie procesów karcinogenezy [31,70-72].

Charakterystyka *Danio rerio* Hamilton, 1822

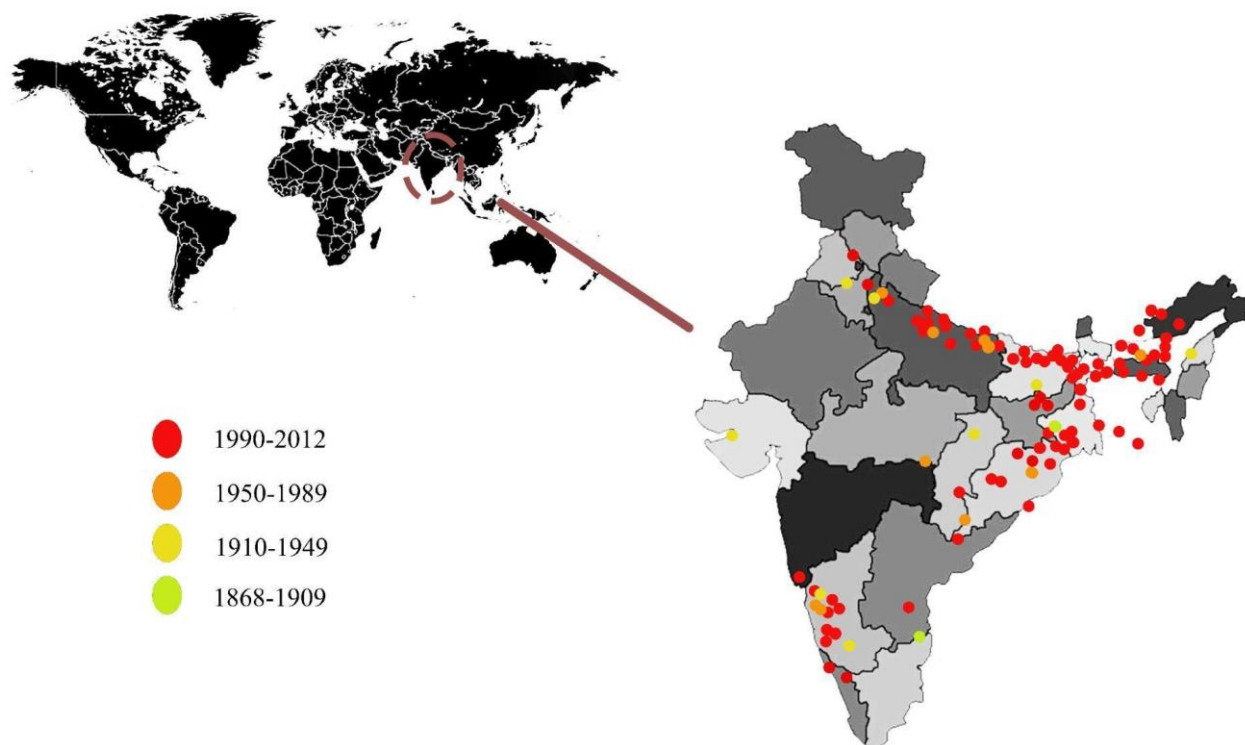
Do zwierząt najbardziej narażonych na skażenie środowiska wodnego estrogenami należą ryby. Ryby (Pisces) to tradycyjna nazwa określająca parafiletyczny takson zmiennocieplnych wodnych kręgowców, obejmujący gromady ryb kostnoszkieletowych (Osteichthyes), ryb chrzęstnoszkieletowych (Chondrichthyes) oraz minogów i śluzic (Cyclostomata). Stanowią obecnie najliczniejszą grupę kręgowców, których (z bardzo nielicznymi wyjątkami) każdy etap życia jest związany ze środowiskiem wodnym. W konsekwencji są narażone na ciągłą ekspozycję na znajdujące się w wodzie związki chemiczne. Poniekąd z tego względu, do badań laboratoryjnych jednym z najczęściej wykorzystywanych gatunków jest danio pręgowany (*Danio rerio*).

Pozycja systematyczna

Danio rerio należy do rzędu karpiokształtnych (Cypriniformes), obejmujących ponad 3250, przeważnie słodkowodnych gatunków, oraz do rodziny karpiowatych (Cyprinidae) - grupującej ponad 1270 gatunków i będącej obecnie najliczniejszą rodziną zwierząt kręgowych. Pierwszego opisu tego gatunku, w 1822 roku, dokonał w swoim dziele „*An Account of the Fishes Found in the River Ganges and its Branches*” szkocki lekarz pracujący dla Brytyjskiej Kompanii Wschodnioindyjskiej - Francis Hamilton. Przez wiele lat w środowisku naukowym toczyły się spory dotyczące pozycji systematycznej danio pręgowanego. W 1916 roku rodzaj *Danio* został podzielony na *Danio* i *Brachydanio*, do tego drugiego zaliczono *D. rerio* [73]. W 1991 roku taksony *Danio* i *Brachydanio* zostały powtórnie połączone [74]. W 2003 roku, na podstawie badań filogenetycznych, rodzaj *Danio* został rozdzielony na rodzaje *Devario* i *Danio*, w którym zawiera się gatunek *D. rerio* [75]. Ta wersja systematyki gatunku została przyjęta w niniejszej pracy.

Występowanie i środowisko życia

Dostępna literatura wskazuje, że naturalnym obszarem występowania tego gatunku jest subkontynent Indyjski, a dokładnie obszar pomiędzy wschodnim Pakistanem, północno-wschodnią granicą indyjsko-birmańską, południowym krańcem subkontynentu oraz regionem Dżammu i Kaszmiru [76,77, rycina 1].



Rycina 1. Obszar naturalnego występowania *D. rerio* w poszczególnych latach.

Preferowanym środowiskiem życia *D. rerio* są płytkie, stosunkowo niewielkie zbiorniki wodne o bogatej trofii, w których maksymalna widoczność wynosi około 30-40 cm. Najczęściej są to rezerwuary niezacienione, bogate pod względem występującej roślinności oraz o mulistym podłożu. Bardzo często występowanie *D. rerio* wiąże się z zalewowymi polami upraw ryżu [76,77], co prawdopodobnie można przypisać wykorzystywaniu przez rolników nawozów, których stosowanie powoduje znaczne zwiększenie ilości zooplanktonu - istotnego składnika diety tej ryby. *Danio rerio* należy do ryb wszystkożernych, z przewagą pokarmu pochodzenia zwierzęcego. Dieta ryb składa się głównie z zooplanktonu, owadów, fitoplanktonu oraz materiału roślinnego. W badaniach prowadzonych przez McClure'a oraz Spence'a [78,79]

wykazano ponadto, że układzie pokarmowym odłowionych osobników wykryto również jaja bezkręgowców, pajęczaki, rybie łuski, elementy detrytusy oraz piasek. Tak szerokie spektrum pokarmowe oraz inne wykryte substancje wskazują, że danio żeruje nie tylko na powierzchni zasiedlanych zbiorników, na co mylnie może wskazywać górne położenie aparatu gębowego, ale również w toni wodnej oraz przy dnie.

Morfologia

Danio rerio cechuje wrzecionowaty kształt o zauważalnym spłaszczeniu bocznym [Zdjęcie 1]. Rozmiar ciała dorosłej ryby mieści się w zakresie 1,7-5 cm, jednak osobniki osiągające ponad 4 cm długości są niezwykle rzadko spotykane.



Zdjęcie 1. Dorosłe osobniki *D. rerio* utrzymywane w Lehrstuhl für Fischkrankheiten und Fischereibiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München (fot. K. Wojnarowski)

Gatunek charakteryzuje się górnym położeniem otworu gębowego oraz żuchwą wystającą poza szczękę. Oczy są osadzone centralnie oraz niewidoczne podczas obserwacji prowadzonej z góry. Danio pręgowany posiada parzyste płetwy piersiowe i brzuszne. Ubarwienie *D. rerio* jest wynikiem obecności czterech rodzajów komórek barwnikowych. Za czarny, ciemny granat oraz ciemny niebieski odpowiadają melanocyty [80]; za złocisto-srebrne, bądź złociste ubarwienie odpowiadają ksantofory zawierające znaczne ilości karotenoidów [80,81]. Irydofory zawierają struktury odbijające światło, w związku z czym nadają obserwowanej rybie

srebrzystego połysku. Ostatnim rodzajem komórek są komórki tzw. „białe” występujące wyłącznie na końcach płetw i nadające im mlecznego-białego zabarwienia [82,83]. Cechą charakterystyczną gatunku jest obecność do pięciu czarnych bądź ciemnoniebieskich poziomych pasów, biegnących od wieczka skrzelowego do końca płetwy ogonowej, obecnych także na płetwie odbytowej, a także skrócona linia boczna - biegnąca do linii wyznaczonej przez płetwę brzuszną [82].

Dymorfizm płciowy i determinacja płci

Dymorfizm płciowy nie jest silnie zaznaczony. W literaturze przedmiotu można spotkać się z określeniami stwierdzającymi, że ubarwienie samców jest przesunięte w kierunku barwy żółto-żłotej, a samice są „bardziej matowe” oraz „pulchniejsze” od samców. W związku z tym u ryb nie przystępujących do rozrodu trudno jest rozpoznać płęć. Najpewniejszą przyżyciową metodą oznaczenia płci dorosłych ryb jest obserwacja ich zachowań oraz reakcji związanych z obecnością innych osobników i występowaniem zachowań rozrodczych. Natomiast określenie płci przed 28 dniem po zapłodnieniu ikry jest praktycznie niemożliwe bez wykorzystania metod genetyki molekularnej, jednak nawet wtedy bardzo utrudnione - ze względu nie do końca poznane mechanizmy determinacji płci [84]. *Danio rerio* w literaturze niejednokrotnie jest określane jako ‘młodociana hermafrodyta’. Jest to związane z faktem, że wszystkie gonady początkowo rozwijają się jako niezróżnicowane młode jajniki, które z czasem ulegają degradacji i przekształcają się w prawdziwe jajniki lub jądra [85-87]. Najnowsze wyniki badań wskazują, że determinacja płci u tego gatunku jest wieloczynnikowa, t.j. na wykształcenie płci u młodocianych osobników mają wpływ dieta, środowisko i odziedziczone geny [88,89]. Drugi proponowany model tj. poligeniczna determinacja płci gdzie płęć osobnika nie jest determinowana przez obecność lub brak specjalnego chromosomu, zamiast tego, o efekcie ostatecznym decydują alleliczne kombinacje *loci*, których produkty są zaangażowane w proces determinacji płci [88,89]. Badania przeprowadzone przez Kinga i współpracowników [90] wykazały, że w przypadku samic można zaobserwować wzmożoną ekspresję genów *cyp17a1*, *cyp19a1a*, *vgl* oraz *igf3*, natomiast w przypadku samców - genu *dmrt1*. Wyniki te mogą wskazywać jedną z potencjalnych dróg do rozpoznawania płci *D. rerio* na wczesnym etapie życia (t. j. przed 28 dniem od zapłodnienia ikry).

Danio pręgowany jako gatunek modelowy.

Charakterystykę najważniejszych obecnie linii laboratoryjnych danio pręgowanego zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Linie *D. rerio* utrzymywane w warunkach laboratoryjnych
(za: Spence i wsp. 2008 [75] oraz [91]).

Nazwa	Charakterystyka linii
WIK	pochodzi od dzikich osobników odłowionych na terenie Indii; wykorzystywana do mapowania genomowego; bardzo polimorficzna w stosunku do linii TU; po raz pierwszy opisana jako WIK11.
TU	typ dziki o krótkich płetwach; pochodzi ze sklepu zoologicznego w Tybindze; wykorzystana przez Sangera do projektu sekwencjonowania genomu <i>D. rerio</i> ; oczyszczona w celu usunięcia mutacji śmiertelnych z tła przed użyciem do mutagenezy i sekwencjonowania.
TL	uzyskana od akwarysty i prowadzona poprzez hodowlę mieszanych jaj z różnych zniesień, dobrze znoszących jaja samic; homozygotyczna pod względem <i>leot1</i> (recesywna mutacja powodująca plamistość u dorosłych ryb, znana również jako <i>tup</i>) i <i>lofdt2</i> (dominująca homozygotyczna mutacja powodująca długie płetwy); linia niewykorzystana w projekcie sekwencjonowania Sangera.
AB	wywodzi się z dwóch linii - A i B (pochodzących prawdopodobnie z wylęgarni na Florydzie) zakupionych przez Streisingera w różnym czasie w sklepie zoologicznym w Albany (Oregon); może być używana do partenogenezy (zmniejszono u niej liczbę mutacji letalnych poprzez sprawdzanie haploidalnego potomstwa poszczególnych samic pod kątem zdrowia i właściwej morfologii zarodków; do tworzenia kolejnych pokoleń krzyżowano samice z niewyselekcjonowanymi samcami).
SJD	pochodząca od pełnego rodzeństwa dzikich odmian Darjeeling, które poddano genotypowaniu w laboratorium Johnsona (stwierdzono, że około 14% genomu nadal wykazuje polimorfizm w obrębie stada); od tego czasu laboratorium Johnsona prowadzi hodowlę tych ryb, aby zachować ich różnorodność i wigor.

NHGR-1	wywodzi się z oryginalnego szczepu znanego jako "TAB-5" powstałego z krzyżówki hybrydowej pomiędzy rybami z dwóch najczęściej używanych linii: Tubingen i AB; pokolenie F1 zostało wyhodowane i przebadane pod kątem braku mutacji wpływających na pierwsze pięć dni rozwoju; szczep ten był hodowany w laboratorium Shawna Burgessa, bez wprowadzania innej różnorodności genetycznej, od momentu jego wstępnej izolacji w 1997 roku; z puli TAB-5 wybrano kilka par kojarzeniowych, a najbardziej odporną wybrano jako parę założycielską dla NHGRI-1; genom NHGRI-1 został zsekwencjonowany i zidentyfikowano ponad 10 milionów wariantów pojedynczych nukleotydów; zidentyfikowano prawie wszystkie regiony genomu NHGRI-1, które są niezmiennie w porównaniu z sekwencją referencyjną Zv9.
ABO	typ dziki; krzyżówka ryb zakupionych w sklepie zoologicznym ze szczepem AB; utrzymywana jako linia wsobna.
SJA	linia wsobna wyhodowana z linii AB; podlinia hodowana w celu zmniejszenia polimorfizmu (w przeciwieństwie do AB, która jest hodowana w celu zachowania polimorfizmu); monomorficzna w co najmniej 85%.
C32	obecnie C32bc9 są pochodną chowu wsobnego prowadzonego przez Johnsona w następujący sposób: samice C32 pochodzące z laboratorium Johnsona zostały skrzyżowane z samcami SJD, a otrzymane w ten sposób hybrydowe samice zostały skrzyżowane z samcami C32; laboratorium Johnsona kontynuuje krzyżowanie wsteczne w celu zmniejszenia udziału SJD.

Za powszechnym wykorzystaniem danio pręgowanego jako organizmu modelowego przemawia szereg czynników: niewielki rozmiar osobniczy, niski koszt utrzymania (w porównaniu do innych kręgowców modelowych), szybkie tempo rozwoju i przemiany pokoleń, wysokie podobieństwo genetyczne do człowieka (70 % genomu jest wspólne, a w przypadku znanych nam chorób o podłożu genetycznym – 84 %), wysokie podobieństwo funkcjonalne układów danio i człowieka oraz w pełni zsekwencjonowany genom [92]. Częsty wybór *D. rerio* jako modelu do badań genetycznych i embriologicznych jest determinowany także przez relatywnie wysoki stopień podobieństwa nukleotydowego (62,5-80 %) i białkowego (55-72,5 %) między tym gatunkiem a *Homo sapiens*. Zbieżność ta dotyczy wielu genów będących zarazem markerami nowotworowymi - takich jak m.in. CYP1B1 u ludzi, co jest także powodem zainteresowania tą kwestią w niniejszych badaniach.

Osobniki utrzymywane w laboratorium mogą przystępować do rozrodu przez cały rok, podczas gdy dzikie populacje rozmnażają się głównie sezonowo. Średnio, osiągają one dojrzałość płciową około 80 dnia po zapłodnieniu. Samiec i samica przystępują do tarła pod wpływem obecnych w wodzie stymulantów (hormony), wysokiej dostępności pokarmu oraz wzrostu temperatury wody [93]. Tarła odbywają się relatywnie często aczkolwiek nieregularnie - w 1-4 dniowych interwałach. Podczas jednego tarła samica może złożyć około kilkuset jaj [93], a pojedyncze komórki są średnicy około 0,7 mm. Jaja nie są klejące i składane są bezpośrednio na podłoże, bez przygotowania gniazda przez któregokolwiek z osobników rodzicielskich. Wylęg następuje od dwóch do trzech dób po zapłodnieniu, w zależności od temperatury. Nie zaobserwowano żadnej formy opieki nad ikrą i larwami.

Nowotwory i ich związek z estrogenami

Powszechność nowotworów.

Nowotworami (neoplazjami) nazywamy grupę schorzeń spowodowanych anormalnymi podziałami komórek, mogących prowadzić do upośledzenia pierwotnych funkcji narządu lub tkanki. Nowotwory cechuje zdolność do inwazji bądź przerzutów, co stało się kryterium ich zasadniczego podziału na nowotwory złośliwe (rak) oraz niezłośliwe (łagodne). W przypadku ludzi opisano już ponad 100 rodzajów nowotworów o różnej etiologii. Choroby nowotworowe, pomimo lat prowadzenia nad nimi badań oraz kolejnych przełomów zachodzących w opracowywaniu nowych terapii, nadal są drugą przyczyną zgonów w Polsce [94] oraz pierwszą globalnie [95].

W przypadku zwierząt, nowotwory także są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów. W badaniu wykonanym w 2006 roku dotyczącym występowania chorób nowotworowych wśród zwierząt na terenie Dolnego Śląska możemy znaleźć informacje o psach, kotach, koniach i bydło domowym, brak jednak jakichkolwiek informacji dotyczących ryb. Stan ten związany jest z odmiennym środowiskiem życia ryb, utrudniającym możliwość podjęcia pełnego diagnozowania oraz negatywnym stosunkiem kosztów do zysków w przypadku prób wykorzystania terapii. Dodatkowe znaczenie może mieć również fakt, że pojęcie dobrostanu ryb jest koncepcją stosunkowo młodą, a stopień przywiązania emocjonalnego właścicieli do tych zwierząt jest znacznie niższy aniżeli w przypadku ssaków czy ptaków [96].

Karcinogeneza o podłożu estrogenowym

Prawdopodobne mechanizmy stojące za karcinogenezą (lub kancerogenezą), czyli procesem prowadzącym do powstawania komórek nowotworowych, powodowaną przez hormony płciowe (w szczególności estrogeny) wyjaśnił w swojej publikacji Słowikowski [97]. Wskazuje on, że za zjawisko to mogą odpowiadać dwa specyficzne szlaki biochemiczne na drodze, których dochodzi do uszkodzenia materiału genetycznego komórek mających kontakt z estrogenami bądź do zniszczenia struktury ich białek [97]. Pierwsza droga jest związana z wytwarzaniem genotoksycznych semichinonów, natomiast druga - z wpływem reaktywnych form tlenu (ROS). Inne wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska proponuje Lam i jego zespół [98]. Wykonana przez nich analiza wykazała, że w komórkach w wyniku nad-stymulacji receptora estrogenowego dochodzi do stymulacji wysoce homologicznych i konserwatywnych genów związanych z regulacją cykli komórkowych, co skutkuje zwiększoną proliferacją komórek, uszkodzeniami DNA, a co za tym idzie - niestabilnością genomu oraz osłabieniem mechanizmów immunologicznych hamujących procesy nowotworowe.

Wymienione przesłanki wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań, ukierunkowanych na poznawanie genów ulegających nadmiernej ekspresji podczas ekspozycji na związki o charakterze estrogennym. Ponadto, wcześniej wspomniane, wskazywane przez wielu badaczy, wysokie podobieństwo funkcjonalne mechanizmów karcinogenezy o podłożu estrogenowym wśród ludzi oraz pewnych gatunków ryb (w tym *D. rerio*) jest powodem uwzględnienia tego gatunku w niniejszej dysertacji. Zarówno danio pręgowany jak i człowiek posiadają gen *cyp1b1*, który u ludzi jest dodatkowo markerem nowotworowym. Jego zwiększona ekspresja notowana była w przypadku wielu nowotworów, m.in: piersi, płuc, jąder, macicy, jelit, głowy, szyi, skóry, mózgu oraz układu limfatycznego i układu moczowego [99-105]. Potencjalne zwiększenie ekspresji genu *cyp1b1* także u danio pręgowanego narażonego na kontakt z estrogenami stanowi osiowy problem poruszony w tej pracy.

Cel pracy i hipotezy badawcze

Zanieczyszczenie środowiska wodnego estrogenami jest obecnie jednym z najpowszechniej występujących. Substancje te stanowią zagrożenie nie tylko poprzez negatywny wpływ na wykształcenie drugorzędowych cech płciowych, ale również mogą prowadzić do wystąpienia negatywnych następstw na poziomie metabolicznym, układu krążenia, rozrodczego, immunologicznego, z procesami karcinogenezy włącznie.

Znaczna część przeprowadzonych dotychczas badań skupiała się wyłącznie na określeniu wpływu 17- β -estradiolu (E2) jako biologicznie najaktywniejszego z naturalnych estrogenów, z pominięciem pozostałych dwóch – estronu estriolu (E1 i E3), które także z tego względu zostały ujęte w niniejszych badaniach.

Cel pracy: Ewaluacja wpływu estriolu, 17- β -estradiolu i estronu na wybrane parametry pigmentacji larw *Danio rerio* oraz na ekspresję genu *cyp11b1*.

Cele szczegółowe:

1. określenie wpływu różnych stężeń estriolu, 17- β -estradiolu i estronu na pigmentację larw danio przegowanego;
2. określenie wpływu różnych stężeń estriolu, 17- β -estradiolu i estronu na poziom ekspresji genu *cyp11b1*;
3. porównanie wpływu 17- β -estradiolu, estriolu i estronu na pigmentację oraz ekspresję genu *cyp11b1*;
4. analiza korelacji między ogólną pigmentacją badanych ryb a ekspresją genu *cyp11b1*.

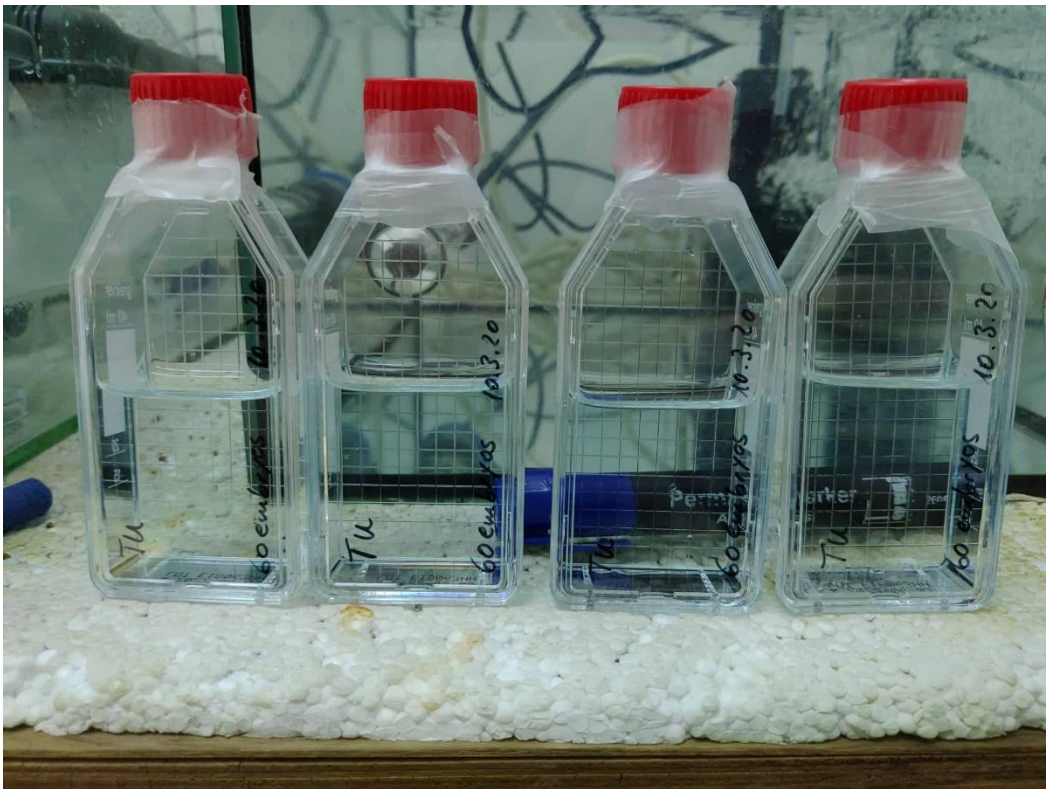
Testowano następujące hipotezy:

1. ekspozycja na estrogeny powoduje zmiany względnej pigmentacji larw danio przegowanego;
2. ekspozycja na estrogeny powoduje zmiany w poziomie ekspresji genu *cyp11b1* u badanego gatunku;
3. estriol, 17- β -estradiol i estron różnią się siłą biologicznego oddziaływania na larwy;
4. istnieje korelacja pomiędzy ogólną względną pigmentacją badanych ryb a ekspresją genu *cyp11b1*.

Material i metody

Material zwierzęcy

Material badawczy stanowiło 500 zapłodnionych jaj *D. rerio* linii TU dostarczonych przez European Zebrafish Resource Center (EZRC) (Karlsruhe Institute of Technology, Niemcy). Embriony przed wysyłką umieszczono w butelkach służących do hodowli komórkowych o powierzchni dna 25 cm², wypełnionych odpowiednim medium (zawierającym następujące sole - 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄) z dodatkiem błękitu metylowego w stężeniu 0,5 mg/dm³. Celem spowolnienia rozwoju larw znajdujących się w butelkach hodowlanych poddano je schłodzeniu. Zapłodnienie jaj miało miejsce około 12 godzin przed dostarczeniem materiału. Ikrę inkubowano na terenie Zakładu Limnologii i Rybactwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w specjalnie do tego celu przygotowanych zbiornikach (Zdjęcie 2).



Zdjęcie 2. Butelki hodowlane zawierające embriony *D. rerio* (fot. K. Wojnarowski).

Przygotowanie roztworów hormonów

Do przygotowania testowanych roztworów użyto wody RO (uzyskanej z procesu odwróconej osmozy) z dodatkiem komercyjnych soli Aquarium Systems – Instant Ocean (600 mg/L) (Instant Ocean, Blacksburg, USA). W badaniu wykorzystano estrogeny w formie sproszkowanej: estriol, estron oraz β -estradiol (Millipore-Sigma, Burlington, MA, USA). Eksperymentalne roztwory hormonów zostały przygotowane metodą rozcieńczeń z bazowych roztworów o stężeniu 100 mg/dm³. Na każdym etapie rozcieńczania roztwory sonifikowano za pomocą płuczki sonicznej Sonic 5 (Polsonic, Warszawa, Polska) w temperaturze 45 °C celem wyrównania stężenia estrogenów w całej objętości roztworu. Do naważania wykorzystywano wagę analityczną Radwag AS-220/X (Radwag, Radom, Polska). Testowane wartości stężeń poszczególnych hormonów zawiera tabela 2.

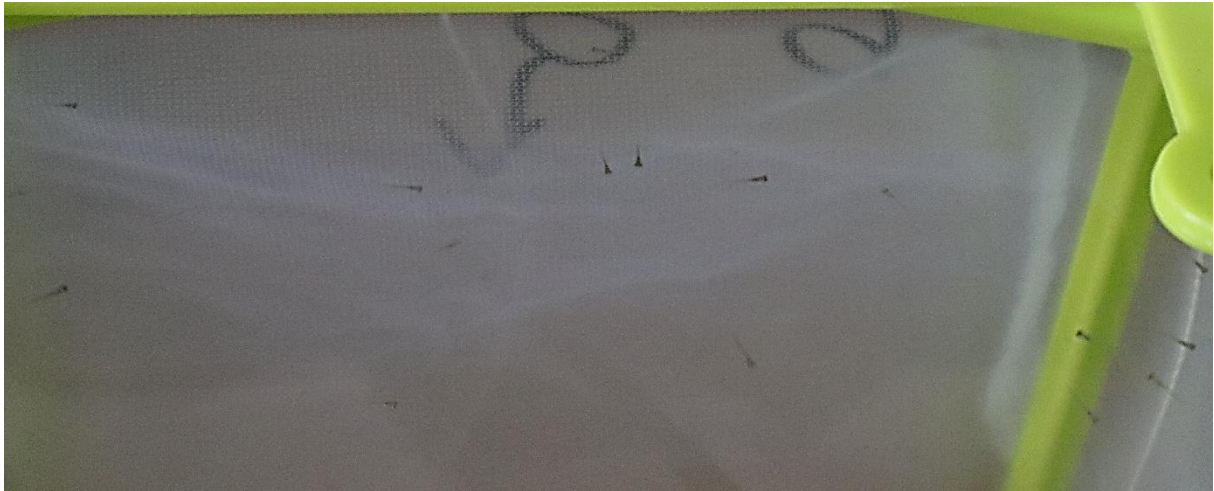
Tabela 2. Grupy badawcze i testowane stężenia estrogenów.

Nazwa grupy	Stężenie	Hormon
Kontrolna	-	-
E1.1	10 ng/dm ³	Estron
E1.2	100 ng/dm ³	
E1.3	1000 ng/dm ³	
E2.1	10 ng/dm ³	17- β -Estradiol
E2.2	100 ng/dm ³	
E2.3	1000 ng/dm ³	
E3.1	10 ng/dm ³	Estriol
E3.2	100 ng/dm ³	
E3.3	1000 ng/dm ³	

System utrzymania larw

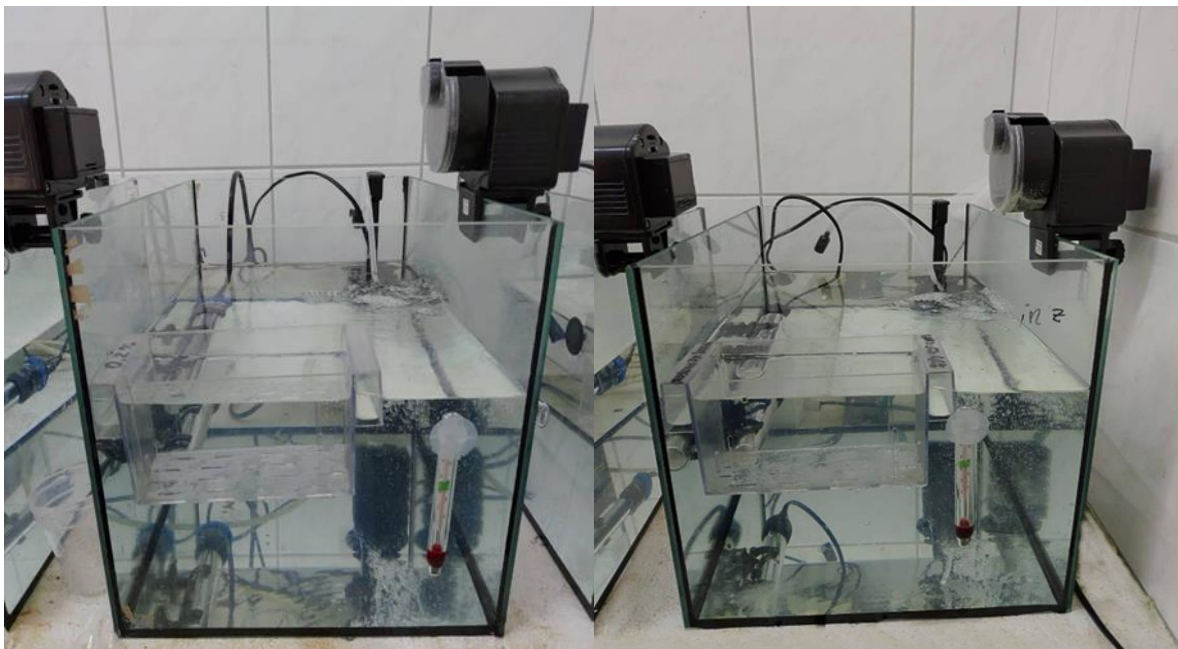
Inkubacja oraz ekspozycja embrionów, a następnie larw (Zdjęcie 3) na hormony była prowadzona w zbiornikach o objętości 20 litrów (Zdjęcie 4). Do utrzymywania temperatury wody oraz napowietrzania wykorzystywano komercyjnie dostępne grzałki Eheim Jager 25W Thermocontrol (Eheim, Deizisau, Niemcy) oraz napowietrzacze Miniboost 100 (Aquael,

Warszawa, Polska). Urządzenia grzewcze przed wykorzystaniem zostały skalibrowane oraz ustawione na utrzymywanie temperatury wody na poziomie 26 °C.



Zdjęcie 3. Larwy *Danio rerio* (fot. K. Wojnarowski).

W trakcie trwania doświadczenia wykorzystywano fotoperiod 14 h światła i 10 h ciemności. Do oświetlenia zbiorników wykorzystywano lampy Juwel MultiLux Blue LED T5 438 mm, 12 Watt (Juwel Aquariums, Rybnik, Polska). Ze względu na założenia badawcze, w zbiornikach nie zastosowano żadnych systemów filtracyjnych.



Zdjęcie 4. Zbiorniki doświadczalne Zakładu Limnologii i Rybactwa UPWr (fot. K. Wojnarowski).

Analiza wybranych parametrów jakościowych wody

W trakcie trwania doświadczenia woda w każdym ze zbiorników była kontrolowana w 8-godzinnych interwałach. Dokonywano pomiarów następujących parametrów:

- odczynu wody
- poziom natlenowania wody
- przewodnictwo elektryczne
- temperatura

Pomiarów odczynu wody, przewodnictwa oraz temperatury dokonywano za pomocą miernika multiparametrycznego HI9813 (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA), poziom tlenu rozpuszczonego w wodzie kontrolowano za pomocą tlenomierza przenośnego HI9147-04 (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA).



Zdjęcie 5. Miernik multiparametryczny do monitorowania parametrów wody (fot. K. Wojnarowski).

Tabela 3. Średnie wartości parametrów wody w trakcie trwania doświadczenia (118h).

Grupy badawcze	Średnie wartości parametrów			
	Odczyn wody pH	Zawartość tlenu (mg/dm ³)	Przewodnictwo (μS/cm)	Temperatura (°C)
Grupa kontrolna	7,3	7,9	530	26,4
Estron 10 ng/l	7,2	7,8	660	26,3
Estron 100 ng/l	7,3	7,6	710	26,3
Estron 1000 ng/l	7	7,6	640	26,4
17β-Estradiol 10 ng/l	7,2	7,5	600	26,2
17-β-Estradiol 100 ng/l	7,2	7,8	630	26,5
17-β-Estradiol 1000 ng/l	7,1	7,7	670	26,4
Estriol 10 ng/l	7,2	7,9	540	26,2
Estriol 100 ng/l	7,2	7,7	600	26,2
Estriol 1000 ng/l	7,1	7,6	620	26,6

Procedura eutanazji larw

Uśmiercenie larw przeprowadzono poprzez przeniesienie ich do wody o temperaturze 4 °C, zgodnie z metodyką przedstawioną przez Wilsona i wsp. [106] oraz Caporale i wsp. [107]. Następnie w dalszym ciągu obniżano temperaturę do -8 °C. W dostępnej literaturze metoda ta uznawana jest za bardziej humanitarną w porównaniu do wykorzystania MS-222 (metanosulfonianu trikainy) [108-110]. Ze względu na przeprowadzenie procedur przed upływem piątego dnia od zapłodnienia ikry (brak umiejętności samodzielnego pobierania

pokarmu przez larwy danio pręgowanego), nie była wymagana zgoda Lokalnej Komisji Etycznej.

Przygotowanie materiału do izolacji RNA

Larwy po uśmierceniu zostały zhomogenizowane za pomocą moździerza, przy wykorzystaniu ciekłego azotu. Następnie próbki zostały zamrożone w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na czas 24 godzin.

Izolacja RNA

Materiał został ujednolicony w ramach odpowiadających im grup badawczych (liczebność grupy $N=15$). Izolację wykonano za pomocą zestawu Total RNA Mini (Zdjęcie 6) (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Do każdej izolacji wykorzystano 30 mg tkanki ($\pm 0,05\text{ mg}$). Do załączonego protokołu wprowadzona została modyfikacja polegająca na dodatkowym oczyszczaniu próbek (płukanie przed elucją RNA).

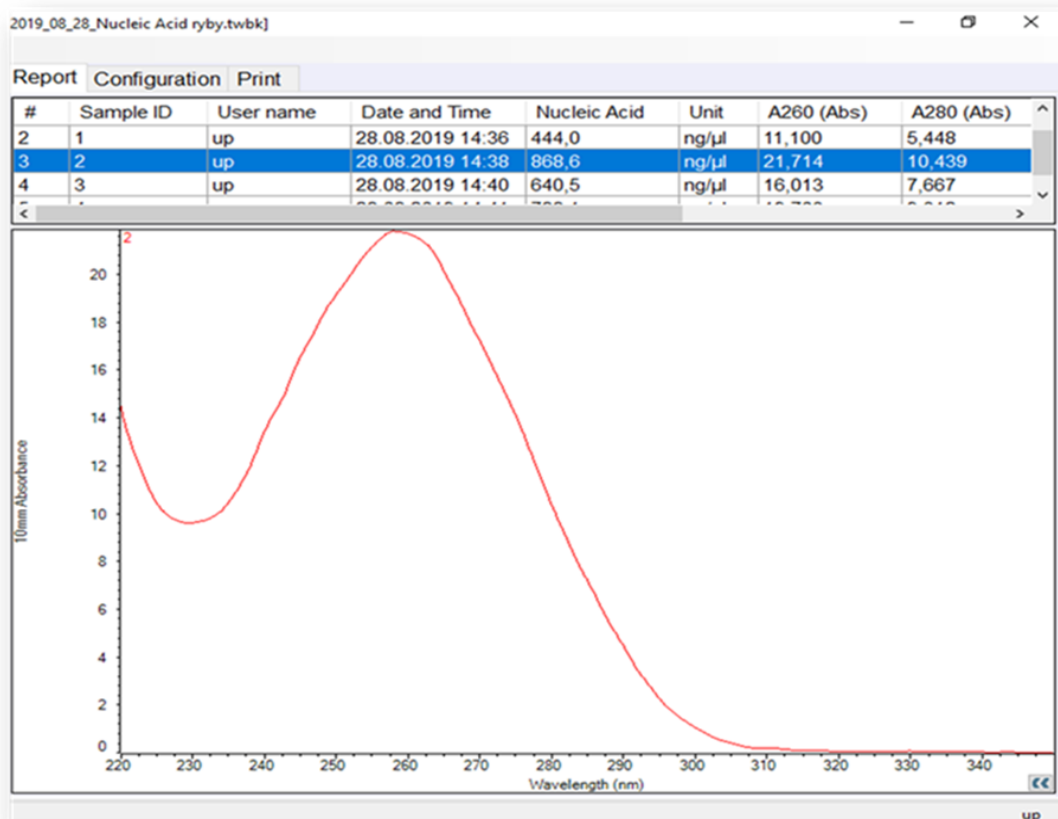


Zdjęcie 6. Zestaw do izolacji RNA (fot. K. Wojnarowski).

Jakość izolatów RNA została sprawdzona przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Zdjęcie 7) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Średnia zawartość materiału RNA w próbach wynosiła $50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($\pm 5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Współczynnik uzyskany ze stosunku fal 260/230 (zanieczyszczenie związane min. odczynnikami stosowanymi do izolacji) oraz 260/280 (zanieczyszczenie substancjami takimi jak enzymy, inhibitory) był prawidłowy – zgodny z normami urządzenia oraz zestawu do izolacji (Zdjęcie 8).



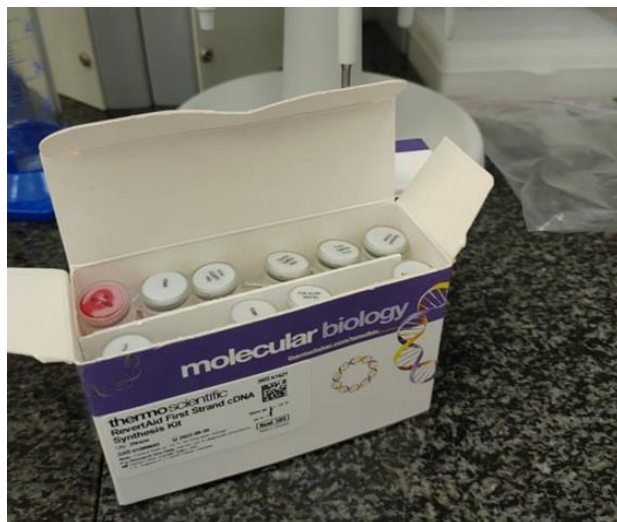
Zdjęcie 7. Spektrofotometr wykorzystany do analizy jakości izolatów (fot. K. Wojnarowski)



Zdjęcie 8. Poglądowa krzywa przedstawiająca wynik analizy spektrofotometrycznej otrzymanych próbek.

Synteza cDNA

Do syntezy cDNA z uzyskanego materiału RNA wykorzystano zestaw Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Zdjęcie 9) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) przy wykorzystaniu primeru oligo (dT) 18 załączonego do zestawu.



Zdjęcie 9. Zestaw do syntezy cDNA (fot. K. Wojnarowski).

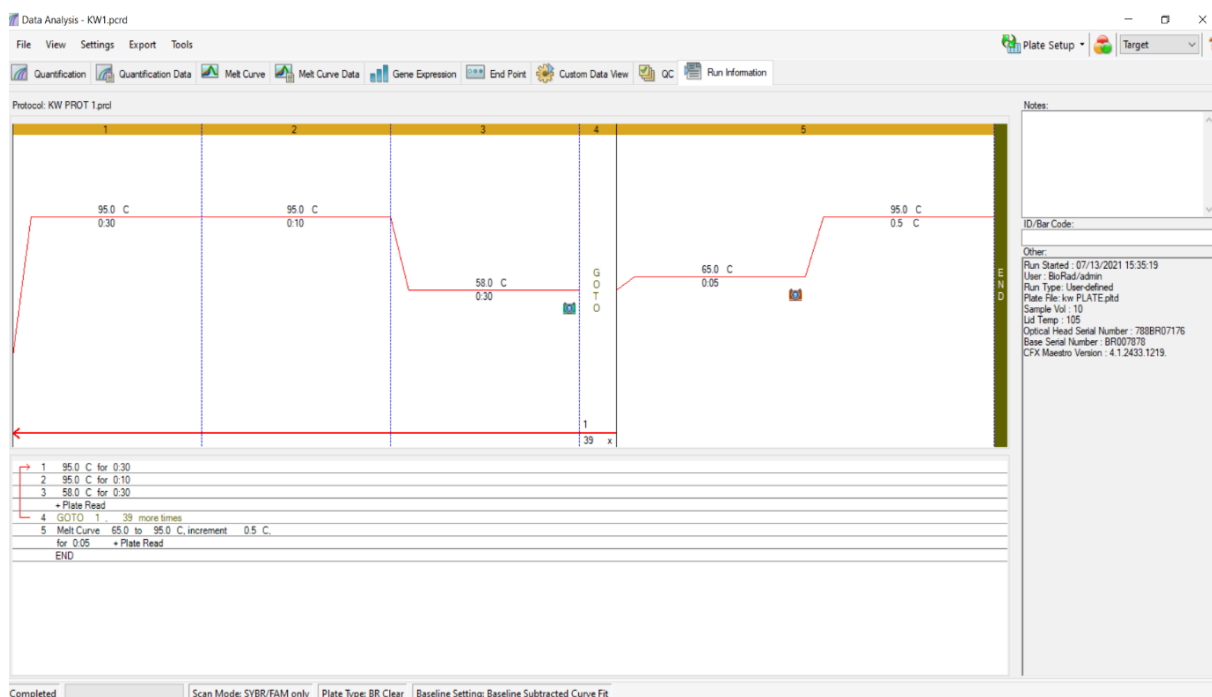
Analiza real-time PCR

Analizę real-time PCR wykonano w Katedrze Genetyki UPWr przy użyciu aparatu BIO – RAD CFX Connect 96 Touch za pomocą zestawu SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (firmy Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA) w objętości 10 µl, w trzech powtórzeniach technicznych, w proporcjach przedstawionych w tabeli 4.

Tabela 4. Proporcje składników mieszaniny reakcyjnej do PCR.

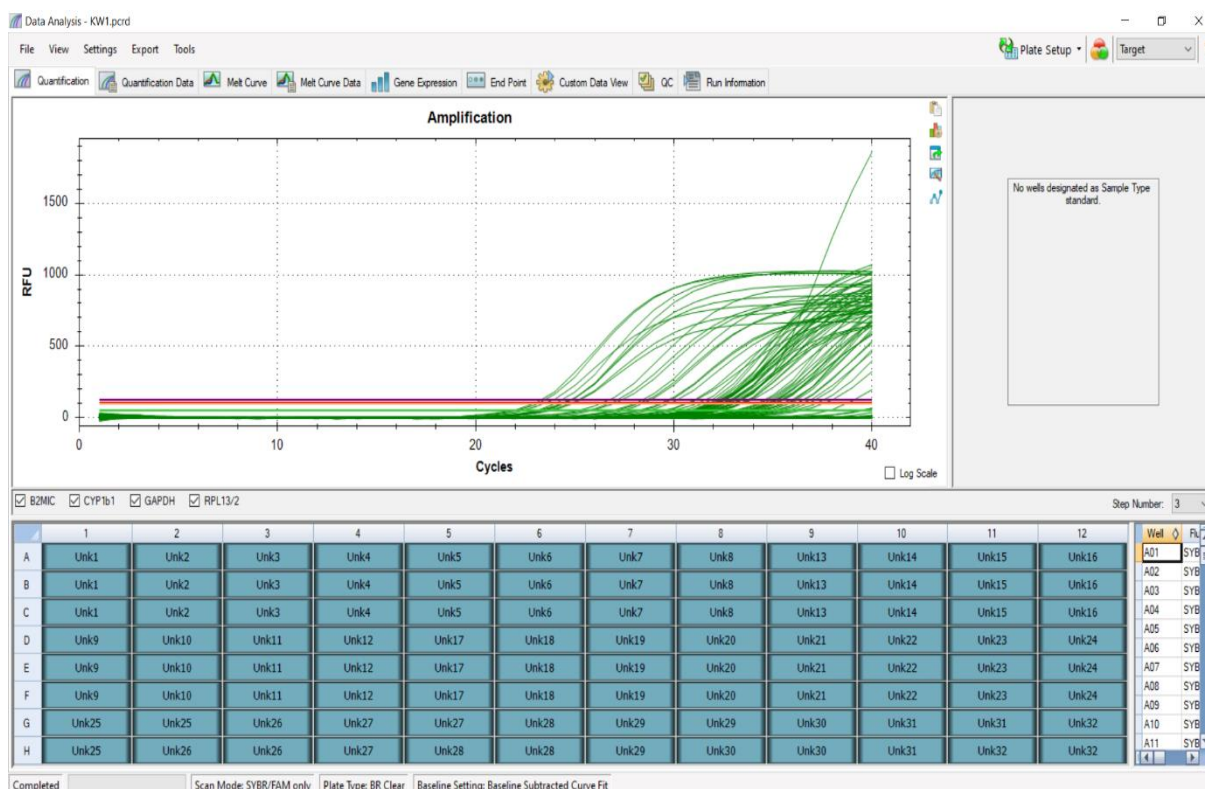
Komponent	Objętość w 10 µl reakcji
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	5 µl
Startery (F+R)	1 µl (0,8µM)
Matryca cDNA	2 µl (0,04-0,015x10 ⁻⁴)
Woda jałowa	2 µl

Analizę wykonano zgodnie z protokołem producenta. Łącuchowa reakcja polimerazy obejmowała 40 cykli: aktywację polimerazy i denaturację DNA w 95 °C (30 s), denaturację w 95 °C (10 s), annealing w 58 °C (30 s). Wykonana została także analiza krzywej topnienia dla prób w temperaturze od 65 °C (5 s) do 95°C (wzrost o 0,5 °C w czasie 2 s) (Zdjęcie 10).



Zdjęcie 10. Ustawienia protokołu przebiegu reakcji RT-PCR.

Do oceny ekspresji amplikonów wykorzystano startery przedstawione w tabeli 5. Amplikonem referencyjnym był *cyp1b1* (*F*: GGCCAGTCAAGACACTCTGT; *R*: CTGGATTCTGGATACCTGACAAG) oraz *RPL13- α /2* (*F*: GGCTGAAGGTGTTTGATGGC; *R*: ATCGTCCAAGCAGGGCAAAT). Do każdego badanego startera wykonano krzywe standardowe, gdzie poziom wydajności wyniósł dla: *CYP1B1* – 93 % (R=0,994), *RPL13- α /2* – 98,5 % (R=0,999), *BMIC* – 84 % (R=0,989). Pozostałe wykazały niższe poziomy wydajności (poniżej 70 %) i zostały odrzucone. Następnie dane uzyskane w trakcie procedury RT-PCR (Zdjęcie 11) zostały opracowane przy użyciu programu CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA). W tym celu pod uwagę wzięto tylko próby zawierające 50 ng/ μ l cDNA (+/- 10 ng/ μ l). Przy użyciu programu CFX Maestro wyliczony zostały poziom ekspresji genu referencyjnego w próbach.



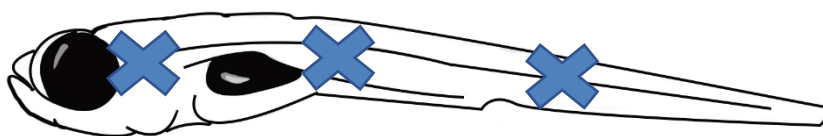
Zdjęcie 11. Przebieg amplifikacji materiału genetycznego w trakcie reakcji RT-PCR.

Tabela 5. Startery wykorzystane podczas wstępnej analizy wydajności.

Starter	Sekwencja	Źródło
Cyp1b1 Primer 1	F:GGCCAGTCAAGACACTCTGT R:CTGGATTTCTGGATACCTGACAAG	Zaprojektowano na podstawie [111]
RPL13a Primer 1	F:CCAACGTGCAGCGGCCTGAA R:CGTGGCCATCTTGAGTTCCT	[112]
RPL13a Primer 2	F:GGCTGAAGGTGTTTGATGGC R:ATCGTCCAAGCAGGGCAAAT	[113]
RPLP-2 Primer 1	F:GAACATCCTGGGGAGTGTGC R:GCTGGAACGGAGGCTAACTT	[114]
B2mic Primer 1	F:AGGATTGTCTGCTTGGCTCTCT R:CGCTGGCATCTCCCTCAA	[115]
GABDH Primer 1	F:CGCTGGCATCTCCCTCAA R:TCAGCAACACGATGGCTGTAG	[116]

Analiza poziomu względnej pigmentacji larw

Do analizy poziomu względnej pigmentacji larw wykorzystywano mikroskop Delta Optical Evolution 100 Trino Plan LED (Delta Optical, Katowice, Polska) wyposażony w kamerę o 48 bitowej głębokości kolorów, która zapewnia bardzo dobre odwzorowanie rzeczywistych barw. Uśmiercone wcześniej larwy (N=15) umieszczano na szalce Petriego o wymiarach 200 x 30 mm. Fotografie wykonywano w maksymalnej dostępnej rozdzielczości, t.j. 2592 x 1944 dpi. Zeskanowany obraz następnie przetworzono przy pomocy programu GIMP (GNU Image Manipulation Program, licencja freeware - program bezpłatny, otwartoźródłowy) do skali szarości. Wszystkie barwy zostały przetworzone do skali obejmującej 255 wartości (gdzie wartość 1 to idealna czerń a 255 to idealna biel). Następnie próbkowano wartość pigmentacji w trzech wcześniej ustalonych punktach (Zdjęcie 12) i wyliczono z nich wartość średnią dla osobnika.



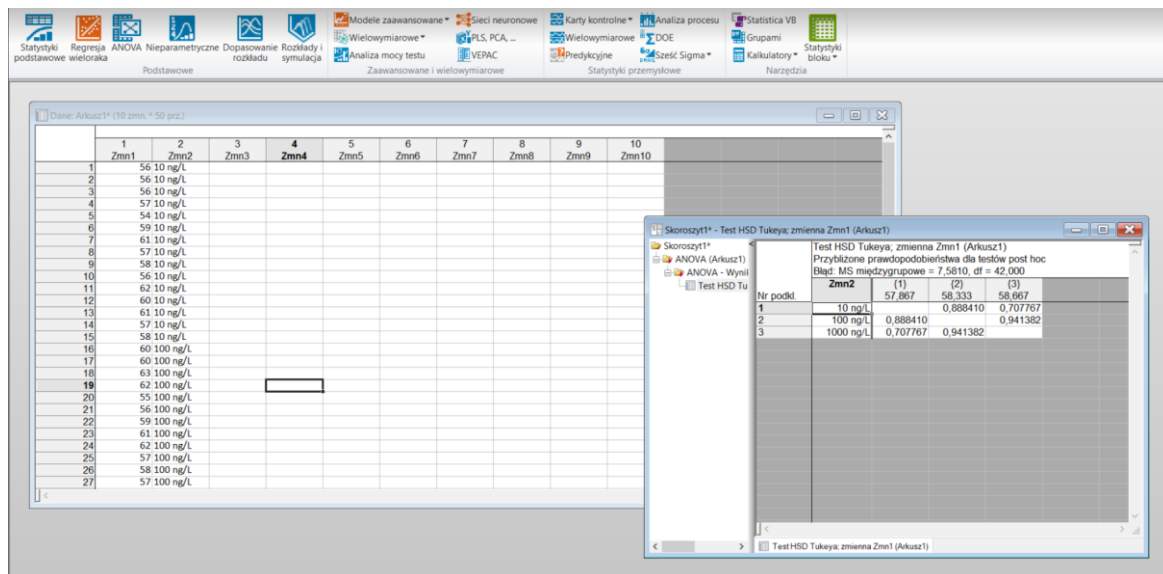
Rycina 2. Punkty próbkowania pigmentacji larw.



Zdjęcie 12. Przykładowa larwa badana poddana analizie relatywnego poziomu pigmentacji (fot. K. Wojnarowski).

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przeanalizowano przy pomocy programu Statistica (Zdjęcie 13) (v. 13.1., StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Normalność rozkładu danych została sprawdzona przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Wobec stwierdzonego rozkładu normalnego, zastosowano test *post-hoc* Tukeya ($P > 0,05$). Oszacowano również korelację Spearmana pomiędzy ekspresją badanego genu a poziomem średniej pigmentacji larw.



Zdjęcie 13. Analiza statystyczna uzyskanych wyników w programie Statistica 13.1

(fot. K. Wojnarowski)

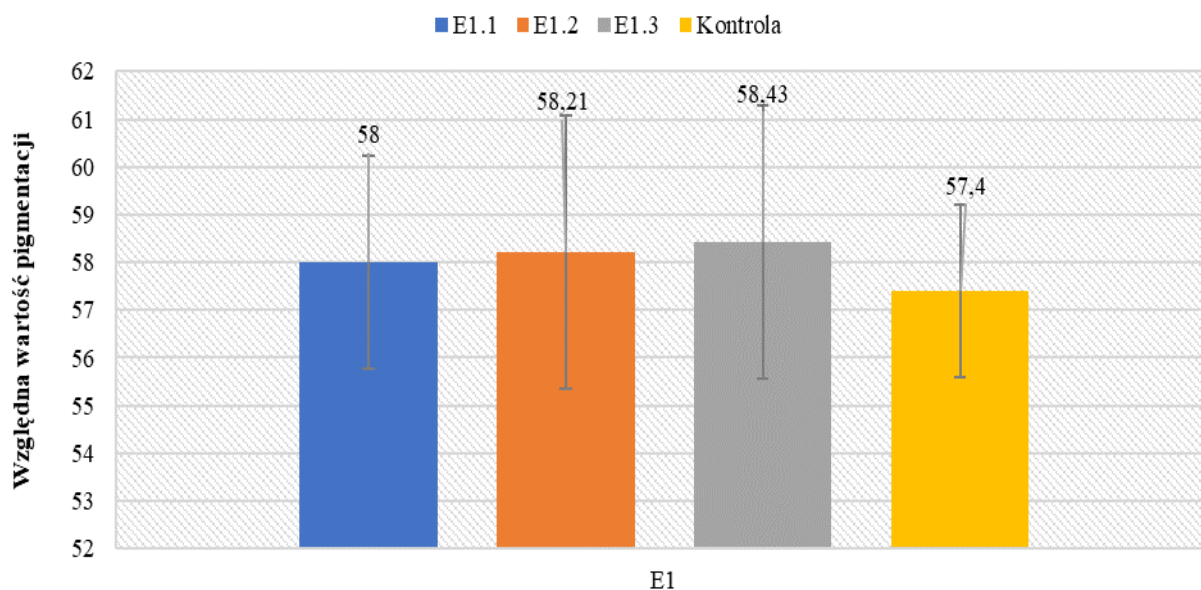
Wyniki

Ekspozycja na estrogeny a pigmentacja ryb

Analiza średniej wartości względnej pigmentacji w przypadku ekspozycji larw na działanie E1 wyniosła w grupie E1.1 - 58, E1.2 – 58,21 oraz w E1.3 – 58,43. W badanych grupach wartości były podobne jak w grupie kontrolnej, co zostało potwierdzone brakiem różnic statystycznych. Otrzymane wyniki analizy wartości względnej pigmentacji zostały przedstawione w tabeli 6. oraz na wykresie 1.

Tabela 6. Wartości względnej pigmentacji w grupach E1.

Względna wartość pigmentacji				
L.p.	E1.1	E1.2	E1.3	Kontrolna
1	56	60	62	59
2	56	60	60	57
3	56	63	61	58
4	57	62	58	59
5	54	55	56	60
6	59	56	54	59
7	61	59	57	56
8	57	61	59	57
9	58	62	57	54
10	56	57	58	56
11	62	58	59	58
12	60	57	64	58
13	61	54	62	54
14	57	55	60	57
15	58	56	53	59
Średnia	58	58,211	58,429	57,29
SD	2,236	2,858	2,871	1,805

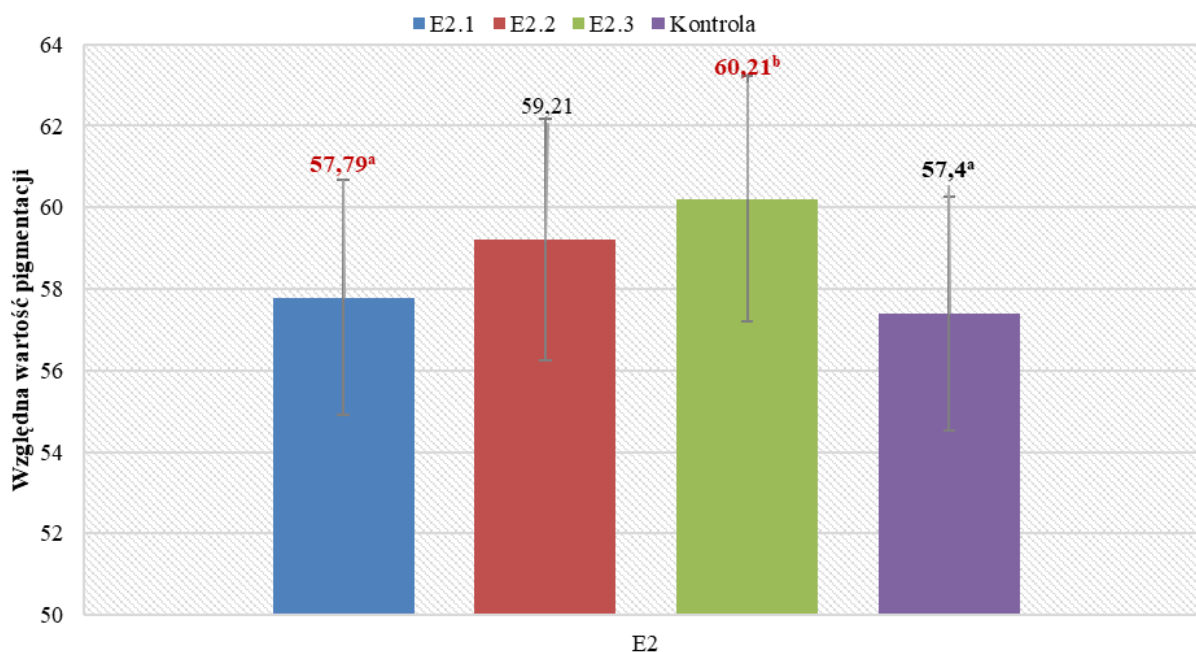


Wykres 1. Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla grup E1.

Wyniki analizy skutków ekspozycji na kolejny związek – E2, wykazały, że najwyższą wartością charakteryzowała się grupa E2.3, na poziomie 60,21, przy wartości z grupy kontrolnej na poziomie 57,4 (Tab.7, Wyk. 2.). Wykazane zostały również różnice statystyczne między grupą kontrolną i E2.1 ($p = 0.0407$) oraz E2.1 i E2.3 ($p = 0,0379$). Nie wykazano natomiast różnic statystycznych między grupą E2.2 a pozostałymi stężeniami E2. Średnia względna wartość pigmentacji dla tej grupy wyniosła 59,214.

Tabela 7. Względna wartość pigmentacji dla grup E2; małymi literami zaznaczono różnice istotne statystycznie.

Względna wartość pigmentacji				
L.p	E2.1	E2.2	E2.3	Kontrola
1	55	58	65	59
2	60	59	55	57
3	62	63	57	58
4	57	60	58	59
5	56	59	60	60
6	54	56	62	59
7	55	57	59	56
8	55	57	68	57
9	58	56	56	54
10	60	62	70	56
11	59	59	57	58
12	61	62	58	58
13	57	60	59	54
14	57	58	63	57
15	58	61	61	59
Średnia	57,786^a	59,214	60,214^b	57,29^a
SD	2,305	2,177	4,195	1,805

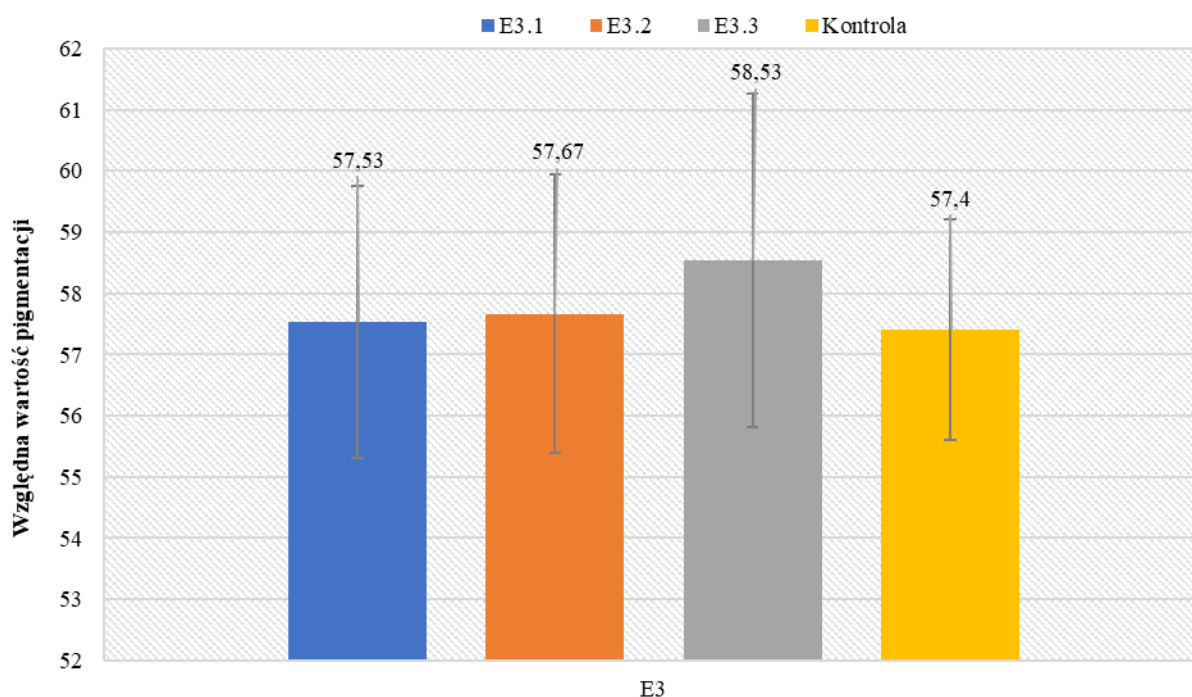


Wykres 2. Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla grup E2 (a,b – P<0,05).

Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla związku E3, podobnie jak w przypadku E1, nie wskazały na obecność istotnych różnic statystycznych pomiędzy stężeniami (Tab.8, Wyk. 3). Większość wartości była zbliżona do wartości kontrolnych, czyli na poziomie około 57,3.

Tabela 8. Względna wartość pigmentacji dla grup E3.

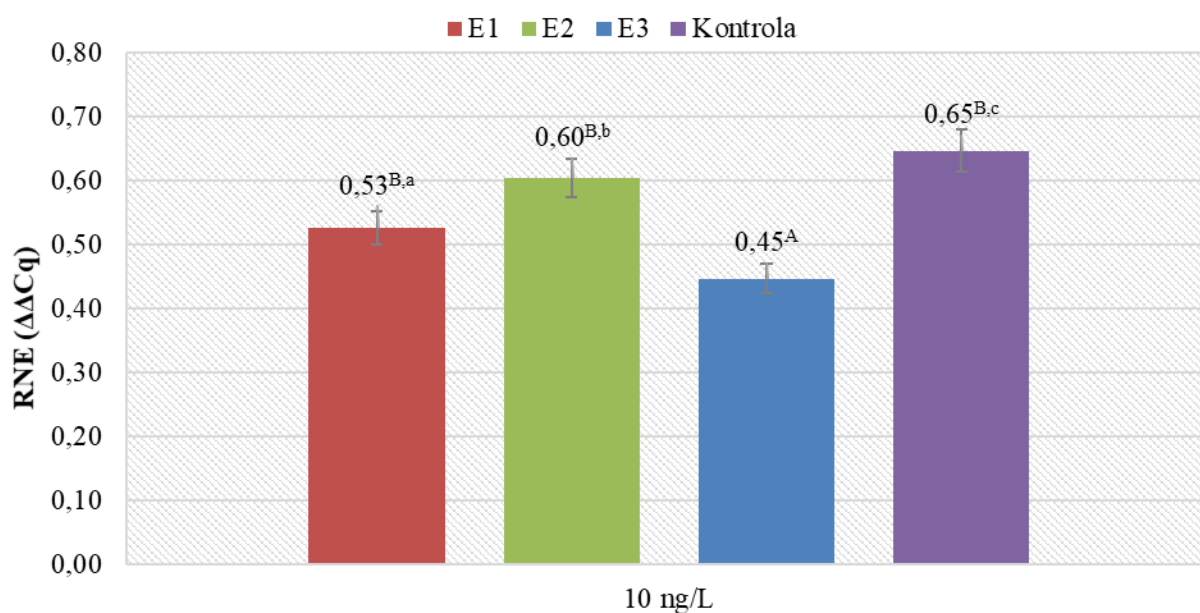
Względna wartość pigmentacji				
L.p	E3.1	E3.2	E3.3	Kontrola
1	60	59	61	59
2	57	60	62	57
3	58	58	56	58
4	54	56	57	59
5	55	57	63	60
6	55	54	59	59
7	57	55	54	56
8	58	57	57	57
9	61	62	56	54
10	62	60	55	56
11	59	61	57	58
12	57	57	58	58
13	57	56	60	54
14	55	55	62	57
15	58	58	61	59
Średnia	57,533	57,667	58,533	57,29
SD	2,217	2,271	2,729	1,805



Wykres 3. Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla grup E3.

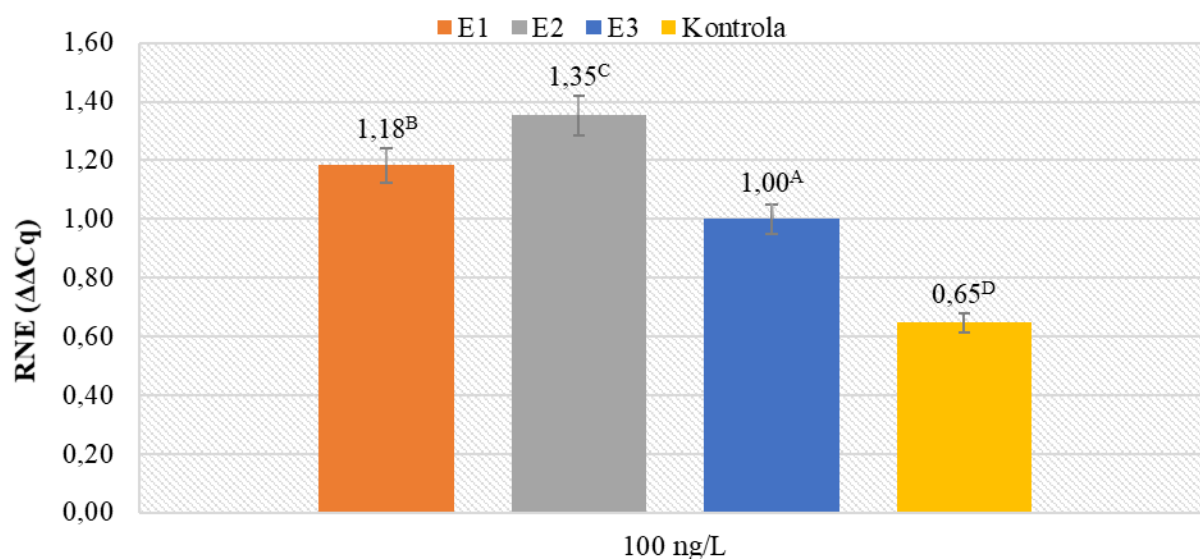
Ekspozycja na estrogeny a ekspresja genu *CYP1B1*

Wyniki analizy ekspresji genu *CYP1B1* w zależności od stężenia badanych estrogenów potwierdzają wpływ tych hormonów na poziom ekspresji. W przypadku stężenia 10 ng/dm³ osobniki poddane ekspozycji na E1, E2 i E3 charakteryzowały się niższym poziomem ekspresji niż grupa kontrolna (Wyk. 4). Najniższy poziom wystąpił w grupie E3 – 0,45 RNE. Wykazano również istotne różnice statystyczne między grupą E3 a pozostałymi grupami i kontrolną (odpowiednio: p=0,0001737 dla E1; p=0,000233 dla E2; p=0,000231 dla kontroli). Istotne różnice statystyczne wykazano również między grupą E1 a E2 (p= 0,01897), E1 i grupą kontrolną (p=0,0281) oraz między E2 i grupą kontrolną (p=0,0492).



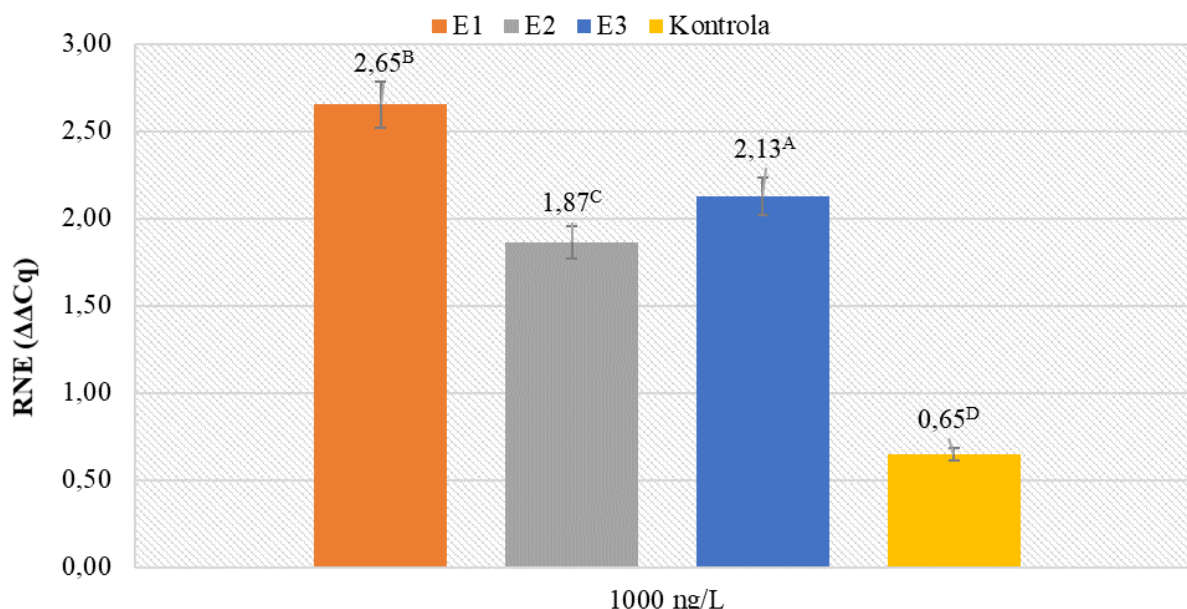
Wykres 4. Poziom ekspresji genu *cyp1b1* w tkankach larw poddanych ekspozycji na estrogeny o stężeniu 10 ng/dm³ (a, b – P<0,05; A, B – P<0,01).

Osobniki poddane ekspozycji na 100 ng/dm³ badanych estrogenów, charakteryzowały się znacznie wyższym poziomem ekspresji niż grupa kontrolna (0,65 RNE) (Wyk. 5). Najwyższy poziom ekspresji wykazano w grupie E2 (1,35 RNE), oraz kolejno w grupie E1 i E2 (odpowiednio: 1,18 RNE; 1,00 RNE). Wykazano również między grupą E1, E2, E3 i kontrolną wysoce istotne różnice statystyczne (p=0,00238 dla E3 i E2, p=0,000231 dla E1 i E2, E1 i kontroli, E3 i kontroli, p= 0,000234 w przypadku E3 i E1).



Wykres 5. Poziom ekspresji genu *cyp1b1* w tkankach larw poddanych ekspozycji na estrogeny w stężeniu 100 ng/dm³ (A, B – P<0,01).

Najwyższy poziom ekspresji wykazano natomiast przy ekspozycji larw na stężenie 1000 ng/dm³ badanych estrogenów. Najwyższą wartość RNE stwierdzono w grupie E1 (2,6 RNE), a najniższą w grupie kontrolnej - 0,65 RNE (Wyk. 6). Wysoki poziom wykryto również w grupie E2 (1,87 RNE) i E3 (2,13 RNE) w porównaniu do grupy kontrolnej, jednakże był on niższy niż w grupie E1. Między grupami wykazano również wysoce istotne różnice statystyczne (p= 0,00253 między E2 i kontrolą, p=0,00025 w przypadku E3 i E2, p=0,000251 dla E1 i E2 ,p= 0,000231 w przypadku E1 i E3).



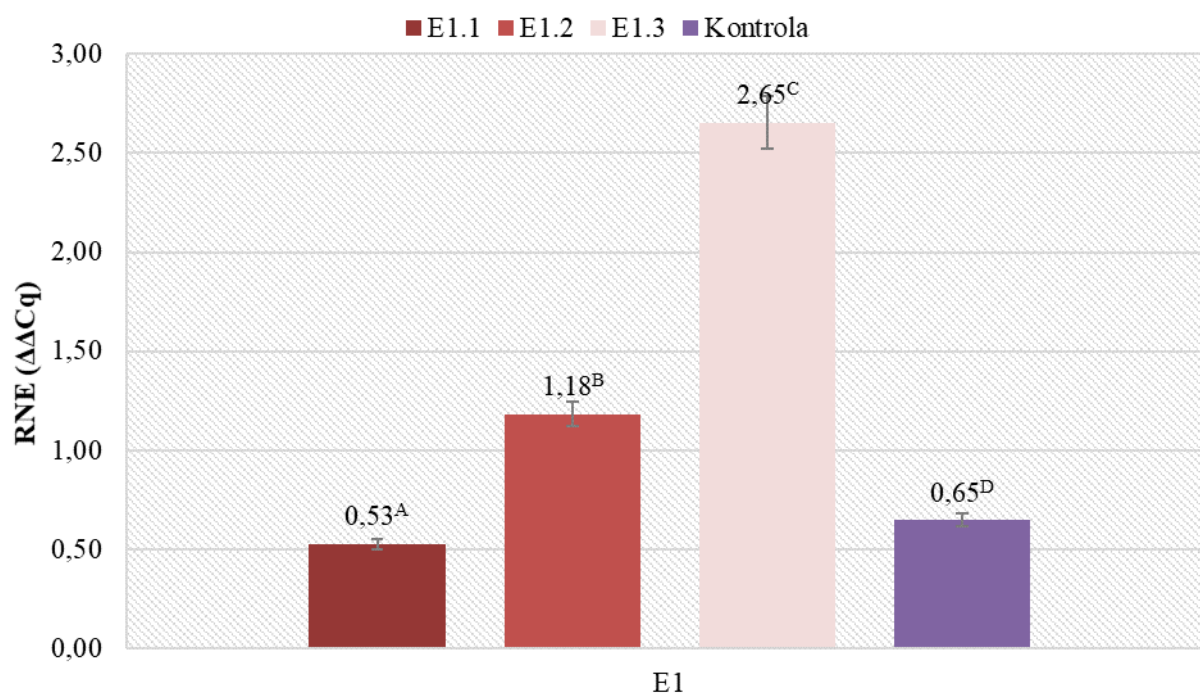
Wykres 6. Poziom ekspresji genu *cyp1b1* w tkankach larw poddanych ekspozycji na estrogeny w stężeniu 1000 ng/dm³ (A, B – P<0,01).

W następnym etapie zostały przeanalizowane różnice wewnątrz grup (Wyk. 7–9). W grupie E1 najwyższy poziom ekspresji wystąpił w podgrupie E1.3 a najniższy w podgrupie E1.1. Stwierdzone różnice były wysoce istotne różnice statystyczne w (p= w zakresie od 0,000281 do 0,000227) (Wyk. 7).

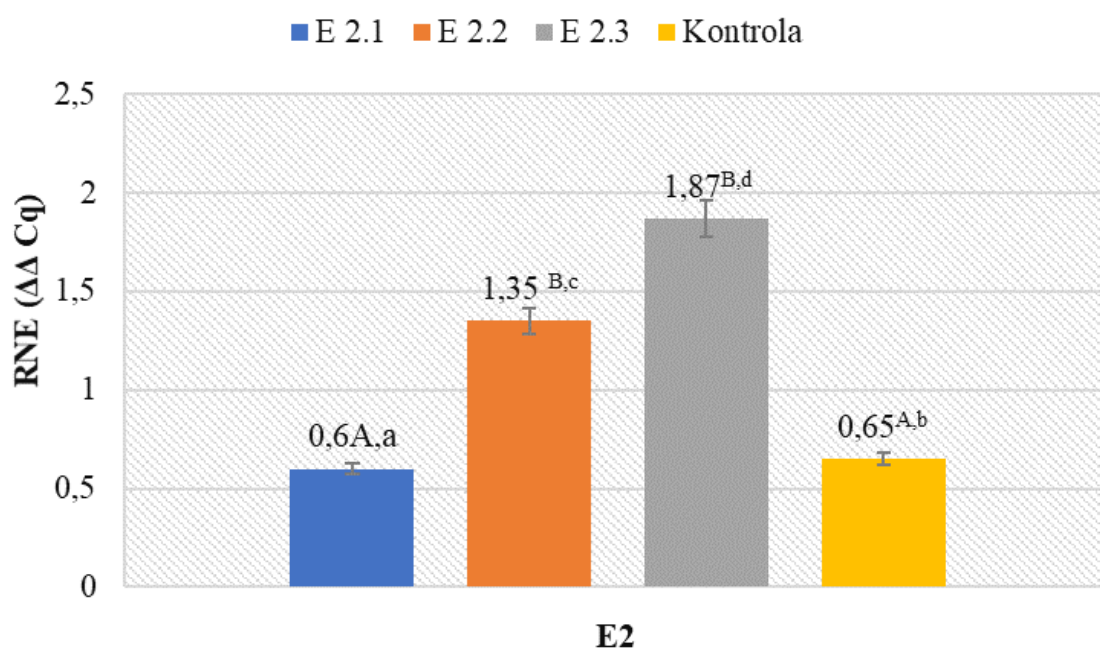
W obrębie grupy E2 wysoce istotne statystycznie różnice wystąpiły między grupą kontrolną i E2.1 a E2.2 i E2.3 (odpowiednio: p=0,00281, p=0,00189; p=0,000227). Między grupą kontrolną a E2.1 wystąpiły istotne różnice statystyczne (p=0,0492), podobnie jak między grupą E2.2 i E2.3 (p=0,01854). Dane przedstawiono na wykresie nr 8.

W grupie E3 wykazano najwyższy poziom ekspresji w podgrupie E3.3, natomiast najniższy w E3.1 (odpowiednio: 2,13 RNE; 0,45 RNE). W przypadku podgrup E3.1 był on

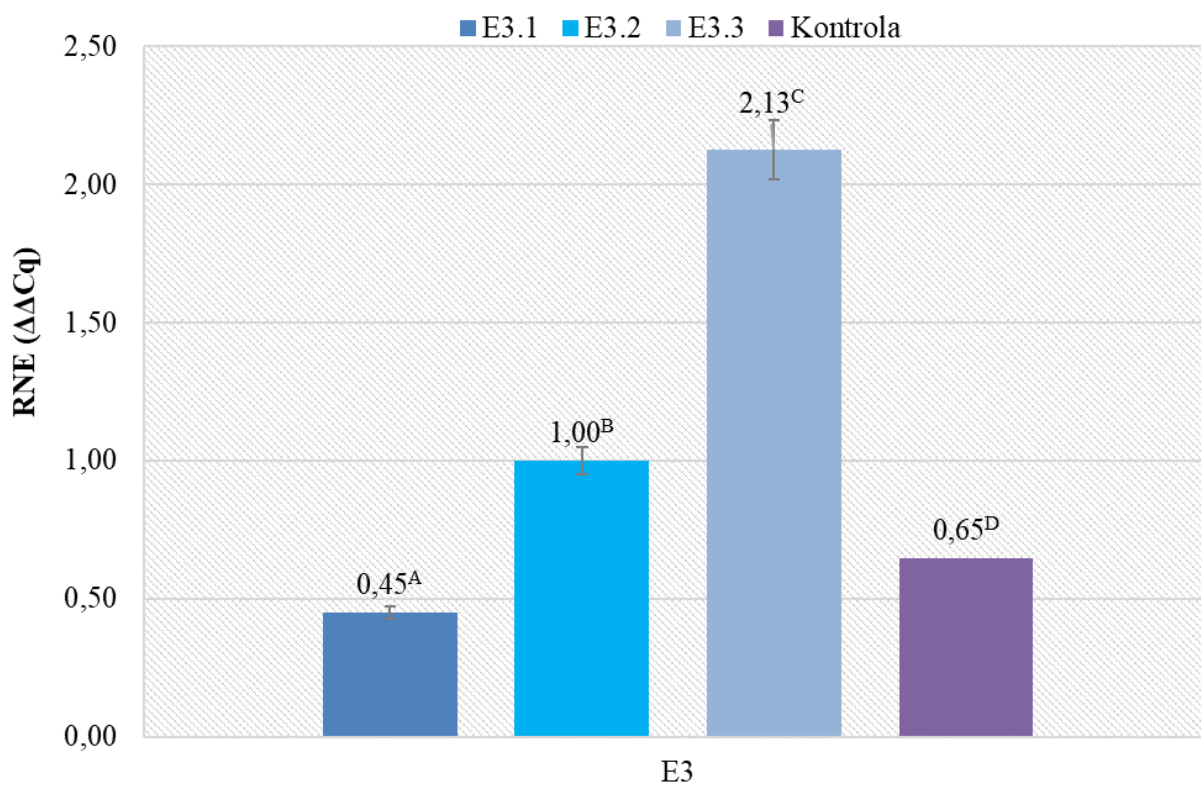
również znacząco niższy niż w grupie kontrolnej, co ukazano na wykresie nr 9. Różnice między grupami potwierdzono również statystycznie (dla E3.1 oraz kontroli $p=0,000231$; E3.2 oraz E3.1 $p=0,000227$, E3.1 oraz E3.3 = $0,00023$; E3.2 oraz E3.3 $p=0,0024$; E2.3, E2.2 oraz kontrolna $p=0,0023$).



Wykres 7. Poziomy ekspresji genu *cyp1b1* w grupach E1 (A, B – $P<0,01$).



Wykres 8. Poziomy ekspresji genu *cyp1b1* w grupach E2 (a, b – $P<0,05$; A, B – $P<0,01$).



Wykres 9. Poziomy ekspresji genu *cyp1b1* w grupach E3 (a, b – $P < 0,05$; A, B – $P < 0,01$).

Wykazano również pozytywną korelację (0,745455) między ogólnymi wartościami względnej pigmentacji oraz ekspresją badanego genu.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach określono względną pigmentację larw oraz poziom ekspresji genu *cyp11b1*, powiązanego w literaturze z występowaniem zwiększonego ryzyka karcinogenezy [117-119]. Gen ten jest powszechnym markerem nowotworowym w przypadku ludzi, jednak nie jest on częstym przedmiotem badań w przypadku danio pręgowanego, pomimo faktu potwierdzenia użyteczności tego gatunku jako modelu w badaniach nad procesami nowotworowymi, w tym związanych z działaniem związków endokrynnie czynnych. Jak już wspomniano, związki te wywierają wpływ głównie poprzez oddziaływanie na receptory estrogenów (ER) bądź receptory grup arylowo-hydroksylowych (AHR) [120-122]. Natomiast na istotne znaczenie pigmentacji i związanej z tym zmienności komórek a występowaniem procesów karcinogenezy wskazują w swojej opinii Marine i Soengas [123].

Związek między pigmentacją danio a receptorami estrogenów był pośrednio przedmiotem badań prowadzonych przez Tingaud-Sequeira i in. [124]. W swojej pracy wykazali oni, że w przypadku danio pręgowanego, ekspresja genu *esr2a* związanego z receptorem ER- α może odgrywać istotną rolę w procesach związanych z funkcjonowaniem skóry i wykształcaniem jej wytworów. Narażenie na kontakt ze związkami o charakterze endokrynnym może między innymi wpływać na zmianę liczby komórek śluzowych, pogrubienie naskórka oraz promować odkładanie/mobilizację jonów wapnia i fosforanów podczas morfogenezy/resorpcji łusek.

Wyniki analizy względnego poziomu pigmentacji larw przeprowadzonej w niniejszej pracy, wskazujące na istotny statystycznie wpływ 17- β -estradiolu, potwierdzają prawdziwość pierwszej hipotezy zakładającej istnienie związku pomiędzy tymi zmiennymi. Obecność istotnych różnic wyłącznie w przypadku E2 jest prawdopodobnie związana z faktem, że związek ten charakteryzuje się wyższą biologiczną aktywnością od estronu i estriolu [121,125]. Podobny wpływ zearalenonu, będącego jedynym znanym dotychczas mykoestrogenem, do odnotowanego w niniejszych badaniach wykazali Bakos i in. [126]. Zaobserwowali oni, że w przypadku trwającej 96 oraz 120 h ekspozycji larw danio pręgowanego na stężenie 50 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ tego związku, nastąpiło statystycznie istotne upośledzenie pigmentacji larw. Mimo iż stężenie zearalenonu wykorzystane przez badaczy było znacznie wyższe aniżeli stężenia estrogenów testowane w niniejszych badaniach, trzeba zwrócić uwagę, na to iż mykoestrogen cechuje znacznie niższy poziom aktywności aniżeli E1, E2 czy nawet najslabszy z nich - E3. Zbieżne

wyniki dotyczące wpływu bisfenolu A, kolejnego związku o charakterze endokrynnie czynnym, uzyskali Tohmé i in. [127]. Autorzy wykazali, że bisfenol A oraz bisfenol E w stężeniach 1 do 70 μM na 5 cm^3 medium doprowadziły do upośledzenia pigmentacji u embrionów danio pręgowanego. Obserwacje zaburzenia wybarwienia embrionów i larw danio pręgowanego wystawionych na kontakt z bisfenolami poczynili także Moreman i in. [128]. Fraser i in. [129] zaobserwowali zaburzenia pigmentacji u embrionów i larw danio pręgowanego pod wpływem działania E2, E3 oraz BPA (w stężeniach od 1 do 1000 ng/dm^3). Jeszcze jedną publikacją potwierdzającą negatywny wpływ estrogenów na wybarwienie larw danio pręgowanego jest praca Bogersa i in. [130]. W efekcie wystawienia embrionów i larw na trzy stężenia tj. 1, 3 oraz 10 ng/dm^3 17- α -etynyloestradiolu, przy najwyższym zaobserwowano osobniki o obniżonej pigmentacji w stosunku do grupy kontrolnej i pozostałych grup badawczych. Bardzo niewielkie stężenia, przy których Bogers i autorzy zaobserwowali wystąpienie różnic może wynikać z faktu, że EE2 charakteryzuje się od 11 do 27 razy wyższą aktywnością niż zastosowany w niniejszych badaniach E2 [131]. Zaprezentowane wyniki własne są zbieżne z większością obserwacji innych autorów. Jedyną pracą, w której autorzy prezentują odmienne rezultaty dotyczące wpływu E2 na pigmentację embrionów danio pręgowanego jest publikacja Martineza i in. [132]. Autorzy poddali ikrę działaniu roztworów (0,1 - 438 μM) E2, BPA, TBT oraz PFOS. Efektem ekspozycji był istotny statystycznie wzrost stopnia pigmentacji u ryb testowanych w stosunku do grupy kontrolnej. Badacze tłumaczą ten fakt ogólnym wystąpieniem zjawiska stresu i powiązaniem z nim efektem wzrostu pigmentacji larw. Jednakże, jak wskazuje przytoczona literatura, w większości przypadków larwy danio pręgowanego poddane działaniu negatywnie wpływających związków charakteryzują się niższą ogólną pigmentacją [133,134]. Dodatkowo należy zwrócić uwagę, że autorzy wykluczyli z analizy osobniki, u których wady anatomiczne utrudniały ułożenie larw (dorsalne bądź lateralne) na szalce Petriego [134], co potencjalnie mogło zaburzyć uzyskane przez nich wyniki.

W przypadku innych gatunków ryb doskonałokostnych (Teleostei) w dostępnej literaturze można odnaleźć też rezultaty sprzeczne z uzyskanymi w niniejszych oraz wyżej przytoczonych badaniach. Ardeshir i in. [135] poddali ekspozycji na różne stężenia (10^{-6} oraz 10^{-7} M) nonylofenolu (NP) niedojrzałe płciowo osobniki karasia złocistego *Carassius auratus* L., w efekcie czego zaobserwowali wzrost zawartości melaniny w komórkach ryb. Przyczyną rozbieżności wyników jest prawdopodobnie wykorzystanie zarówno innego gatunku jak i wiek osobników poddanych ekspozycji, gdyż to stadia młodociane są najbardziej narażone na negatywny wpływ związków o charakterze estrogenowym. Kolejną pracą wskazującą, że

czynnik gatunkowy może mieć znaczenie przy wpływie estrogenów bądź ksenoestrogenów na poziom pigmentacji larw jest publikacja autorstwa Krisfalusi'ego i in. [136]. Autorzy wskazują w niej, że embriony oraz larwy pstrąga tęczowego *Onchorynchus mykiss* (Walbaum, 1792) poddane ekspozycji na 17- β -estradiol (1, 2, 3 i 4 mg/dm³) charakteryzowały się wyższym poziomem pigmentacji aniżeli osobniki w grupie kontrolnej. W powyższym przypadku musimy jednak zwrócić uwagę na znaczne różnice w rozwoju pstrąga tęczowego, do których należą: dłuższa inkubacja ikry oraz odmienne optimum warunków inkubacji (niższa temperatura, większe zapotrzebowanie na tlen rozpuszczony w wodzie) w porównaniu do rozwoju i wymagań danio pręgowanego. Wymienione rozbieżności mogą potencjalnie wpłynąć na fizjologiczną i biochemiczną reakcję ryb w odpowiedzi na kontakt ze związkami reagującymi z receptorami estrogenów.

W wykonanym doświadczeniu zauważalny jest istotny wzrost ekspresji genu *cyp1b1* w przypadku każdego testowanego hormonu, co stanowi potwierdzenie prawdziwości drugiej z postawionych hipotez. Znaczenie badanego genu w metabolizmie estrogenów u danio pręgowanego wykazali Scornaienchi i in. [137]. Autorzy zmierzili poziom zawartości białkowych produktów ekspresji *cyp1b1*, przy wykorzystaniu zmodyfikowanych bakterii pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*), naturalnie niezdolnych do metabolizowania estrogenów, do których wprowadzili warianty genów *cyp1* należących do danio pręgowanego. W efekcie autorzy stwierdzili, że w stosunku do grupy kontrolnej CPR w grupie CYP1B1 doszło do statystycznie istotnego zwiększenia całkowitej zawartości białek (11,65 mg/ml vs 19,20 mg/ml) oraz jednoczesnego istotnego zmniejszenia aktywności cytochromu c (29,68 \pm 3,2 vs 16,27 \pm 0,68 nmol/mg na min.). W przypadku całkowitej zawartości białek P450 nie wykazano ich obecności w grupie kontrolnej, natomiast w grupie CYP1B1 całkowita zawartość cytochromu P450 wyniosła 0,278 nmol/mg. Dodatkowo podczas badania bakterii z wprowadzonymi genami CYP1 zaobserwowano powstawanie dwóch metabolitów 17- β -estradiolu (tj. 2-OHE₂ oraz 4-OHE₂), które zwyczajowo powstają podczas metabolizmu tego związku przez organizmy ssaków.

W badaniu Bräunig i in. [138] autorzy skupili się głównie na powiązaniu ekspresji *cyp1b1* z receptorami AHR, jednak jak wskazuje dostępna literatura geny te są również powiązane z receptorami estrogenów ER α , ER β , ER γ czy GPER [139-142]. Badacze przedstawili obraz ekspresji genu *cyp1b1* pod wpływem β -naftoflawonu w czasie, w stosunku do grupy kontrolnej. Przy podobnym czasie trwania doświadczenia (120 h od zapłodnienia), ekspresja genu *cyp1b1* wzrosła, w porównaniu do grupy kontrolnej, blisko 40-krotnie. Zaobserwowane przez badaczy różnice są znacznie wyższe aniżeli różnice stwierdzone

w niniejszym badaniu. Trzeba jednak zwrócić uwagę na powiązanie genu *cyp1b1* ze wspomnianymi wcześniej receptorami, wobec którego ekspresja wywołana przez związek będący węglowodorem aromatycznym może być znacznie silniejsza w porównaniu do efektów działania naturalnych estrogenów. Sami autorzy wskazują, że ekspresja tego genu była głównie regulowana przez AHR2, jak również, aczkolwiek w mniejszym stopniu przez receptory estrogenów. Odkrycie wskazuje na kolejną potencjalnie niebezpieczną synergii - między obecnymi w środowisku estrogenami a węglowodorami reagującymi z receptorami estrogenów, wywierającymi wspólnie efekt silniejszy aniżeli suma ich wpływów [143]. Wyniki podobne do przedstawionych przez zespół Braunig uzyskali także Lu i wsp. [143]. Po ekspozycji larw danio pręgowanego na działanie mieszaniny węglowodorów wieloaromatycznych autorzy zaobserwowali ponad 12-krotny wzrost poziomu ekspresji *cyp1b1* w stosunku do grupy kontrolnej. Przedstawione wyniki pozwalają przypuszczać, że regulacja ekspresji *cyp1b1* jest wieloczynnikowa, co także potwierdza wynik badania Duana i in. [144]. Badacze zaobserwowali zwiększoną ekspresję *cyp1b1* u embrionów danio pręgowanego wystawionych na 120-godziną ekspozycję na cząstki stałe P.M_{2,5}. Wartości poziomu ekspresji genu *cyp1b1* uzyskane przez autorów są zbliżone do wyników przedstawionych w ramach niniejszej pracy. Relatywna wartość ekspresji genu *cyp1b1* u larw poddanych działaniu roztworu cząstek stałych P.M_{2,5} w porównaniu do grupy kontrolnej była istotnie statystycznie zwiększona o około 175 %. Bezpośrednim wskazaniem powiązania *cyp1b1* nie tylko z receptorem AHR są badania przeprowadzone przez Timme-Laragy'ego i in. [145], w których ekspozycji na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne poddano młodociane stadia danio pręgowanych *cyp1b1* knockdown. Badacze nie zaobserwowali żadnych zmian w mechanizmach toksyczności wywołanych przez te związki co wskazuje, że zachodzą one również przy udziale innych szlaków. Warto również wziąć pod uwagę wyniki, które przedstawili w swojej pracy Liu i in. [146]. Autorzy wykorzystali komórki wątroby L8824 gatunku blisko spokrewnionego z danio pręgowanym, tj. amura zwyczajnego *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), które poddali działaniu 1, 5 i 10 nM roztworów BPA. Ten ksenoestrogen charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną. Po przeprowadzonej analizie badacze stwierdzili, że ekspresja genu *cyp1b1* po 24 h ekspozycji na ksenoestrogen wzrosła odpowiednio około: 4, 50 oraz 60-krotnie. Należy jednak wziąć pod uwagę, że przedstawione wyniki zostały uzyskane przy pomocy modelu komórkowego, którego ekstrapolacja na warunki *in vivo* może nie być dokładna w 100 %. W badaniach Chaube i in. [147], badacze poddali ekspozycji na 2-hydroksyestradiol (estrogen katecholowy) komórki jajnika długowąsa azjatyckiego *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794) w czasie 0-24 h.

W efekcie ekspozycji zaobserwowali 3-krotny w przypadku 8 h, 6-krotny w przypadku 16 h oraz 2-krotny w przypadku 24 h wzrost poziomu relatywnej ekspresji genu *cyp1b1*. Co istotne, wyniki te wskazują również, że wzrost relatywnej ekspresji genu nie zawsze jest liniowy w stosunku do stężenia oraz czasu ekspozycji.

Zaobserwowany w ramach niniejszych badań spadek ekspresji w przypadku grupy E2.3 może być potencjalnie związany z toksycznym działaniem tego związku w tak wysokim stężeniu. Larwy poddane ekspozycji w tej grupie wykazywały się znacznie niższą żywotnością oraz chęcią żerowania. Jest to prawdopodobnie przyczyną swoistego zaburzenia liniowej tendencji wzrostu ekspresji genu *cyp1b1* w rosnących stężeniach hormonów. Nie mniej, jest zgodne z wyżej przytoczonymi wynikami badań *in vitro* dotyczącymi komórek długowąsa azjatyckiego oraz potwierdza trzecią hipotezę, o zróżnicowanej sile oddziaływania badanych związków chemicznych na larwy danio.

Zarówno fakt syntezy tych samych białek jak i związanych z nimi metabolitów estronu, 17- β -estradiolu oraz estriolu wskazuje, że metabolizm tych hormonów w przypadku danio pręgowanego zachodzi w bliźniaczy sposób do organizmów ssaków, w tym przy udziale będącego w zainteresowaniu niniejszej pracy genu *cyp1b1*. Dodatkową przesłanką potwierdzającą podobieństwo metaboliczne ryb i ssaków jest przykład mechanizmu reakcji dwóch gatunków ryb doskonałokostnych - sardynki pacyficznej *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) i makreli kalias *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782, u których w efekcie ekspozycji na działanie EE₂ doszło do zaburzenia wielu szlaków biologicznych: KEGG 05230 (central carbon metabolism in cancer - centralny metabolizm węgla w nowotworach), KEGG 04370 (VEGF signaling pathway - szlak sygnalizacyjny czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego), KEGG 04664 (Fc epsilon RI signaling pathway - ścieżka sygnałowa Fc epsilon RI), KEGG 05205 (proteoglycans in cancer - proteoglikany w nowotworach), KEGG 05204 (chemical carcinogenesis-DNA adducts - chemiczna karcinogeneza-addukty DNA) [12]. Nowatorskie podejście autorów zaowocowało zestawieniem danych uzyskanych z sekwencjonowania wysokiej przepustowości (HTS - high throughput sequencing) a następnie porównaniem uzyskanych sekwencji do genomu człowieka. W efekcie uzyskano informacje na temat genów będących ortologami u porównywanych gatunków.

Praktycznym potwierdzeniem znaczenia podobieństwa mechanizmów procesów nowotworowych u danio i człowieka oraz istotności tego modelu w trakcie badań nad procesami nowotworowymi jest fakt szerokiego wykorzystywania ryby w najnowszych badaniach dotyczących genetycznego oraz molekularnego podłoża tych zjawisk [148,149].

Potwierdzeniem ostatniej postawionej hipotezy jest stwierdzenie istnienia pozytywnej korelacji między względnym poziomem pigmentacji larw oraz relatywnym poziomem ekspresji genu *cyp1b1*, aczkolwiek znaczący wpływ na ten fakt miały istotne statystycznie różnice zaobserwowane w przypadku grupy E2. Wydaje się zatem, że określanie wartości tego parametru może być przydatne podczas analizy wpływu najaktywniejszych biologicznie estrogenów obecnych w środowiskach wodnych świata.

Wobec wyżej zaprezentowanych wyników, za istotne można uznać przesłanki skłaniające ku wnioskowi, że ekspozycja ryb na estrogeny bądź związki o charakterze estrogennym istotnie zwiększać będzie ryzyko zapadalności tych zwierząt na choroby nowotworowe, podobnie jak ma to miejsce w przypadku ssaków [12, 142, 150, 151].

Należy również zwrócić uwagę na relatywnie niewielkie zainteresowanie środowiska badawczego wpływem, rozpowszechnionych w ciekach i zbiornikach wodnych świata, E1 oraz E3 na ekspresję genów związanych z cytochromem P450 u ryb doskonałokostnych. W efekcie, w literaturze zauważalna jest znaczna dysproporcja między publikacjami skupiającymi się na wpływie E2 na poziom ekspresji genów związanych z cytochromem P450 w porównaniu do prac dotyczących skutków wpływu E1 i E3. Prawdopodobnie taki stan rzeczy wynika z faktu najwyższej biologicznej aktywności E2 wśród naturalnych estrogenów, co w konsekwencji ułatwia otrzymanie jednoznacznych wyników.

Z drugiej strony, mniejsza koncentracja uwagi badaczy na ‘słabszych’ estrogenach, nie zmienia faktu, udowodnionej w niniejszej pracy, ich biologicznej aktywności - czy to w warunkach laboratoryjnych, czy zanieczyszczonych środowiskach naturalnych. Statystycznie istotne zwiększenie ekspresji zarówno w przypadku estronu jak i estriolu oraz skala tego wzrostu, wyraźnie wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań umożliwiających dokładniejsze poznanie mechanizmów zaburzenia przez nie szlaków metabolicznych także u innych gatunków ryb.

Wnioski

1. Poziomy względnej pigmentacji między E2.1 oraz E2.3 i E2.3 i grupą kontrolną wykazują istotne statystycznie różnice. .
2. W przypadku pozostałych estrogenów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic.
3. Najniższy poziom ekspresji genu *cyp1b1* zaobserwowano w przypadku 10 ng/dm³ stężenia estriolu.
4. Najwyższy poziom ekspresji genu *cyp1b1* zaobserwowano w przypadku estronu i stężenia 1000 ng/dm³.
5. W przypadku wszystkich badanych grup estrogenów (estriol, estron oraz 17-β-estradiol) przy stężeniach 100 ng/dm³ oraz 1000 ng/dm³ wykazano istnienie istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genu *cyp1b1*.
6. W przypadku stężenia 10 ng/dm³ wykazano istotne różnice statystyczne między grupą E3 a pozostałymi grupami i kontrolną, między grupą E1 a E2, E1 i grupą kontrolną oraz między E2 i grupą kontrolną.
7. Zbiorcza analiza korelacji między ogólną pigmentacją badanych ryb a ekspresją genu *cyp1b1* wykazała istnienie dodatniej, istotnej statystycznie korelacji między tymi parametrami.

Literatura

1. McEwen, B. S. (2020). Hormones and behavior and the integration of brain-body science. *Hormones and behavior*, 119, 104619.
2. Peper, J. S., & Dahl, R. E. (2013). The teenage brain: Surging hormones—Brain-behavior interactions during puberty. *Current directions in psychological science*, 22(2), 134-139.
3. Nelson, L. E., & Sheridan, M. A. (2006). Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. *General and comparative endocrinology*, 148(2), 116-124.
4. Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), 226-237.
5. Martínez-Sánchez, N., Alvarez, C. V., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., & López, M. (2014). Hypothalamic effects of thyroid hormones on metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(5), 703-712.
6. Straus, D. S. (1994). Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *The FASEB Journal*, 8(1), 6-12.
7. Pierce, A. L., Beckman, B. R., Shearer, K. D., Larsen, D. A., & Dickhoff, W. W. (2001). Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 255-264.
8. Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in male physiology. *Physiological reviews*, 97(3), 995-1043.
9. Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., & Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 1-6.
10. Ohlsson, C., & Vandenput, L. (2009). The role of estrogens for male bone health. *European journal of endocrinology*, 160(6), 883-889.
11. Navarro, G., Allard, C., Xu, W., & Mauvais-Jarvis, F. (2015). The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females. *Obesity*, 23(4), 713-719.
12. Renaud, L.; Agarwal, N.; Richards, D. J.; Falcinelli, S.; Hazard, E. S.; Carnevali, O.; Hardiman, G. Transcriptomic Analysis Of Short-Term 17 α -Ethinylestradiol Exposure In Two Californian Sentinel Fish Species Sardine (*Sardinops Sagax*) And Mackerel (*Scomber Japonicus*). *Environ. Pollut.* **2019**, 244, 926-937.

13. Domínguez, M. T., Alegre, J. M., Madejón, P., Madejón, E., Burgos, P., Cabrera, F., Marañón, T., Murillo, J. M. (2016). River banks and channels as hotspots of soil pollution after large-scale remediation of a river basin. *Geoderma*, 261, 133-140.
14. Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Petrovic, M., Giulivo, M., Aznar-Alemany, Ò., Eljarrat, E., Valle-Sistac, J., Molius-Delgado, D., Diaz-Cruz, S., Monllor-Alcaraz, L., Guillem-Argiles, N., Martinez, N., Alda-Miren, L., Llorca, M., Farre, M., Pena, J., Mandaric, L., Perez, S., Barceló, D. (2021). Priority and emerging organic microcontaminants in three Mediterranean river basins: Occurrence, spatial distribution, and identification of river basin specific pollutants. *Science of The Total Environment*, 754, 142344.
15. Schmitt, C., Balaam, J., Leonards, P., Brix, R., Streck, G., Tuikka, A., Bervoets, L., Brack, W., Hattum, B., de Deckere, E. (2010). Characterizing field sediments from three European river basins with special emphasis on endocrine effects—a recommendation for *Potamopyrgus antipodarum* as test organism. *Chemosphere*, 80(1), 13-19.
16. Praveena, S. M., Lui, T. S., Hamin, N., Raza, S., Aris, A. Z. (2016). "Occurrence of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of Langat River (Malaysia)." *Environmental Monitoring and Assessment* no. 188 (7):11. doi: 10.1007/s10661-016-5438-5.
17. Huang, Y., Li, W., Qin, L., Xie, X., Gao, B., Sun, J., Li, A. (2019). Distribution of endocrine-disrupting chemicals in colloidal and soluble phases in municipal secondary effluents and their removal by different advanced treatment processes. *Chemosphere*, 219, 730-739.
18. Zhang, X., Zhang, D., Zhang, H., Luo, Z., Yan, C. (2012). Occurrence, distribution, and seasonal variation of estrogenic compounds and antibiotic residues in Jiulongjiang River, South China. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1392-1404.
19. Emnet, P., Gaw, S., Northcott, G., Storey, B., Graham, L. (2015). "Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base." *Environmental Research* no. 136:331-342. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.019.
20. Furuichi, T., Kannan, K., Giesy, J. P., Masunaga, S. (2004). Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay. *Water Research*, 38(20), 4491-4501.

21. Lin, A. Y. C., Tsai, Y. T. (2009). Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment*, 407(12), 3793-3802.
22. Shore, L. S., M. Shemesh. (1992). Estrogen as an Environmental Pollutant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* no. 97 (4):447-448. doi: 10.1007/s00128-016-1873-9.
23. Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., Praveena, S. M. (2014). Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment international*, 69, 104-119.
24. Müller, A. K., Markert, N., Leser, K., Kämpfer, D., Crawford, S. E., Schäffer, A., Segner, H., Hollert, H. (2020). Assessing endocrine disruption in freshwater fish species from a “hotspot” for estrogenic activity in sediment. *Environmental pollution*, 257, 113636.
25. Müller, A. K., Markert, N., Leser, K., Kämpfer, D., Schiwy, S., Riegraf, C., Buchinger S., Gan, L., Abdallah, A., Denecke, B., Segner, H., Brinkmann, M., Crawford, S., Hollert, H. (2021). Bioavailability and impacts of estrogenic compounds from suspended sediment on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 231, 105719.
26. Abdellah, Y. A. Y., Zang, H., Li, C. (2020). Steroidal Estrogens During Composting of Animal Manure: Persistence, Degradation, and Fate, a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(11), 1-19.
27. Pratush, A., Ye, X., Yang, Q., Kan, J., Peng, T., Wang, H., Tongwang, H., Guangming, X., Hu, Z. (2020). Biotransformation strategies for steroid estrogen and androgen pollution. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(6), 2385-2409.
28. Cox, M. K., Peterson, K., N., Tan, D., Paige J., Novak, H. L., Schoenfuss, J., Ward, L. (2018). Temperature modulates estrone degradation and biological effects of exposure in fathead minnows. *Science of the Total Environment* no. 621, 1591-1600.
29. Ribeiro, E., Ladeira, C., Viegas, S. (2017). EDCs mixtures: a stealthy hazard for human health?. *Toxics*, 5(1), 5.
30. Thrupp, Tara J., Tamsin J. Runnalls, Martin Scholze, Subramaniam Kugathas, Andreas Kortenkamp, and John P. Sumpter. (2018). "The consequences of exposure to mixtures of chemicals: Something from ‘nothing’ and ‘a lot from a little’ when fish are exposed to steroid hormones." *Science of the total environment* no. 619:1482-1492.
31. Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., & Ko, C. J. (2016). Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB reports*, 49(9), 488.

32. Jensen, E. V.; Jordan, V. C. (2003). The Estrogen Receptor: A Model For Molecular Medicine. *Cli. Can. Res.*, 9(6), 1980-1989.
33. Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. (1996). Cloning Of A Novel Receptor Expressed In Rat Prostate And Ovary. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1996, 93(12), 5925-5930.
34. Olde, B.; Leeb-Lundberg, L. F. (2009). GPR30/GPER1: Searching For A Role In Estrogen Physiology. *Trends In Endocrinology & Metabolism*, 20(8), 409-416.
35. Ignatov, T.; Modl, S.; Thulig, M.; Weißenborn, C.; Treeck, O.; Ortmann, O.; Ignatov, A. (2013), GPER-1 Acts As A Tumor Suppressor In Ovarian Cancer. *J. Ovar. Res.* 6(1), 1-10.
36. Toran-Allerand, C. D.; Guan, X.; Maclusky, N. J.; Horvath, T. L.; Diano, S.; Singh, M.; Tinnikov, A. A. (2002). ER-X: A Novel, Plasma Membrane-Associated, Putative Estrogen Receptor That Is Regulated During Development And After Ischemic Brain Injury. *J. Neurosci.*, 22(19), 8391-8401.
37. Micevych, P. E.; Kelly J. M. (2021). Membrane Estrogen Receptor Regulation Of Hypothalamic Function. *Neuroendocrin.*, 96.2: 103-110.
38. Prossnitz, E. R.; Barton, M. (2011). The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER In Health And Disease. *Nat. Rev. Endocrin.*, 7(12), 715-726.
39. Qiu, J.; Bosch, M. A.; Tobias, S. C.; Grandy, D. K.; Scanlan, T. S.; Rønnekleiv, O. K.; Kelly, M. J. (2003). Rapid Signaling Of Estrogen In Hypothalamic Neurons Involves A Novel G-Protein-Coupled Estrogen Receptor That Activates Protein Kinase C. *J. Neurosci.*, 23(29), 9529-9540.
40. Gao, X., Cai, Y., Wang, Z., He, W., Cao, S., Xu, R., Chen, H. (2019). Estrogen receptors promote NSCLC progression by modulating the membrane receptor signaling network: a systems biology perspective. *Journal of translational medicine*, 17(1), 1-15.
41. Fuentes, N., Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135-170.
42. Wilkenfeld, S. R., Lin, C., Frigo, D. E. (2018). Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. *Steroids*, 133, 2-7.
43. Ruhs, S., Nolze, A., Hübschmann, R., Grossmann, C. (2017). 30 Years of the mineralocorticoid receptor: nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *Journal of Endocrinology*, 234(1), T107-T124.
44. Gong, P., Madak-Erdogan, Z., Flaws, J. A., Shapiro, D. J., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S. (2016). Estrogen receptor- α and aryl hydrocarbon receptor

- involvement in the actions of botanical estrogens in target cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 437, 190-200.
45. Gräns, J., Wassmur, B., Celander, M. C. (2010). One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 100(3), 263-270.
46. Sumpter, J. P. (1995). Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology letters*, 82, 737-742.
47. Filby, A. L., Shears, J. A., Drage, B. E., Churchley, J. H., Tyler, C. R. (2010). Effects of advanced treatments of wastewater effluents on estrogenic and reproductive health impacts in fish. *Environmental science & technology*, 44(11), 4348-4354.
48. Jackson, L., Klerks, P. (2020). Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on *Heterandria formosa* populations: Does matrotrophy circumvent population collapse?. *Aquatic Toxicology*, 229, 105659.
49. Martinez-Bengochea, A., Doretto, L., Rosa, I. F., Oliveira, M. A., Silva, C., Silva, D. M. Z. A., Santos G. R., Santos, J. S. F., Avelar, M. M., Silva, L. V., Lucianelli-Junior, D., Souza, E. R. B., Silva, R. C., Stewart, A. B., Nakaghi, L. S., Valentin, F. N., Nóbrega, R. H. (2020). Effects of 17 β -estradiol on early gonadal development and expression of genes implicated in sexual differentiation of a South American teleost, *Astyanax altiparanae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 248, 110467.
50. Karki, Neeta Parajulee, Robert E. Colombo, Karen F. Gaines, and Anabela Maia. (2021). "Exposure to 17 β estradiol causes erosion of sexual dimorphism in Bluegill (*Lepomis macrochirus*)." *Environmental Science and Pollution Research* no. 28 (6):6450-6458.
51. Jones, P. D., De Coen, W. M., Tremblay, L., Giesy, J. P. (2000). Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Science and Technology*, 42(7-8), 1-14.
52. Hill Jr, R. L., Janz, D. M. (2003). Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic toxicology*, 63(4), 417-429.
53. Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C., van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G. (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 32-39.
54. Brian, J. V., Harris, C. A., Scholze, M., Kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A., Sumpter, J. P. (2007). Evidence of estrogenic mixture

- effects on the reproductive performance of fish. *Environmental science & technology*, 41(1), 337-344.
55. Filby, A. L., Shears, J. A., Drage, B. E., Churchley, J. H., Tyler, C. R. (2010). Effects of advanced treatments of wastewater effluents on estrogenic and reproductive health impacts in fish. *Environmental science & technology*, 44(11), 4348-4354.
56. Song, J., Nagae, M., Takao, Y., Soyano, K. (2020). Field survey of environmental estrogen pollution in the coastal area of Tokyo Bay and Nagasaki City using the Japanese common goby *Acanthogobius flavimanus*. *Environmental Pollution*, 258, 113673.
57. Vajda, A. M., Barber, L. B., Gray, J. L., Lopez, E. M., Woodling, J. D., Norris, D. O. (2008). Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environmental science & technology*, 42(9), 3407-3414.
58. Zubizarreta, L., Silva, A. C., Quintana, L. (2020). The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish. *Physiology & behavior*, 220, 112883.
59. Ward, J. L., Korn, V., Auxier, A. N., Schoenfuss, H. L. (2020). Temperature and Estrogen Alter Predator–Prey Interactions between Fish Species. *Integrative Organismal Biology*, 2(1), obaa008.
60. Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. (2007). Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70(9), 768-779.
61. Thorpe, K. L., Maack, G., Benstead, R., Tyler, C. R. (2009). Estrogenic wastewater treatment works effluents reduce egg production in fish. *Environmental science & technology*, 43(8), 2976-2982.
62. Gutjahr-Gobell, R. E., Zaroogian, G. E., Horowitz, D. J. B., Gleason, T. R., Mills, L. J. (2006). Individual effects of estrogens on a marine fish, Cunner (*Tautoglabrus adspersus*), extrapolated to the population level. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(2), 244-252.
63. Munakata, A., Amano, M., Ikuta, K., Kitamura, S., Aida, K. (2012). Involvement of sex steroids and thyroid hormones in upstream and downstream behaviors in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture*, 362, 158-166.
64. Madsen, S. S., Skovbølling, S., Nielsen, C., Korsgaard, B. (2004). 17- β estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquatic toxicology*, 68(2), 109-120.

65. Bangsgaard, K., Madsen, S. S., Korsgaard, B. (2006). Effect of waterborne exposure to 4-tert-octylphenol and 17 β -estradiol on smoltification and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquatic Toxicology*, 80(1), 23-32.
66. Pacheco Passos Neto, O., Bezerra dos Santos, A., Feitosa Silva, J. R., Mota, S. (2021). Alterations in the Development and Gonadal Structure of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Natural and Synthetic Estrogens. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(11), 1-13.
67. Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Lu, X., Lin, M., Lin, A. Y. (2020). A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish. *International journal of endocrinology*, 2020.
68. Szejser, E., Verburg-van Kemenade, B. L., Maciuszek, M., Chadzinska, M. (2017). Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. *Hormones and behavior*, 88, 15-24.
69. Cabas, I., Chaves-Pozo, E., Mulero, V., García-Ayala, A. (2018). Role of estrogens in fish immunity with special emphasis on GPER1. *Developmental & Comparative Immunology*, 89, 102-110.
70. Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environment international*, 99, 107-119.
71. Henderson, B. E., Feigelson, H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427-433.
72. Snoj, T., Majdič, G. (2018). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Estrogens in consumer milk: is there a risk to human reproductive health?. *European journal of endocrinology*, 179(6), R275-R286.
73. Weber, M. W. C., de Beaufort, L. F. (1916). *The Fishes of the Indo-Australian Archipelago*. (Vol. 3). EJ Brill Limited.
74. Meyer, A., Biermann, C. H., Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 252(1335), 231-236.
75. Fang, F. (2003). Phylogenetic analysis of the Asian cyprinid genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). *Copeia*, (4), 714-728.
76. Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, 10(1), 1-14.

77. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), 13-34.
78. Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F., Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71(1), 304-309.
79. McClure, M. M., McIntyre, P. B., McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69(2), 553-570.
80. Parichy, D. M., Ransom, D. G., Paw, B., Zon, L. I., Johnson, S. L. (2000). An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 127(14), 3031-3044.
81. Odenthal, J., Rossnagel, K., Haffter, P., Kelsh, R. N., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammersmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kane, D. A., Mullins, M. C., Nüsslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 391-398.
82. Sugimoto, M., Yuki, M., Miyakoshi, T., Maruko, K. (2005). The influence of long-term chromatic adaptation on pigment cells and striped pigment patterns in the skin of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303(6), 430-440.
83. Singh, A. P., Schach, U., Nüsslein-Volhard, C. (2014). Proliferation, dispersal and patterned aggregation of iridophores in the skin prefigure striped colouration of zebrafish. *Nature cell biology*, 16(6), 604-611.
84. Nagabhushana, A., Mishra, R. K. (2016). Finding clues to the riddle of sex determination in zebrafish. *Journal of biosciences*, 41(1), 145-155.
85. Yang, Y. J., Wang, Y., Li, Z., Zhou, L., Gui, J. F. (2017). Sequential, divergent, and cooperative requirements of *Foxl2a* and *Foxl2b* in ovary development and maintenance of zebrafish. *Genetics*, 205(4), 1551-1572.
86. Maack, G., Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of fish biology*, 62(4), 895-906.
87. Crowder, C. M., Romano, S. N., Gorelick, D. A. (2018). G protein-coupled estrogen receptor is not required for sex determination or ovary function in zebrafish. *Endocrinology*, 159(10), 3515-3523.

88. Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A. M. (2017). Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 191, 141-163.
89. Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., Orban, L. (2012). Polygenic sex determination system in zebrafish. *PloS one*, 7(4), e34397.
90. King, A. C., Gut, M., Zenker, A. K. (2020). Shedding new light on early sex determination in zebrafish. *Archives of toxicology*, 94(12), 4143-4158.
91. <https://zfin.org/action/genotype> - stan na 2022.01.10
92. Khan, F. R., Alhewairini, S. S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. *Current Trends in Cancer Management*, 3-18.
93. Westerfield, M. (2007) *THE ZEBRAFISH BOOK*, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press. Paperback
94. Wojciechowska, U., Czaderny, K., Ciuba, A., Olasek, P., Didkowska, J. (2018). Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów, Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Narodowy Program Zwalczenia Chorób. Warszawa: Nowotworowych, Ministerstwo Zdrowia.
95. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> - stan na 2022.01.10
96. Hastein, T., Scarfe, A. D., Lund, V. L. (2005). Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 24(2), 529.
97. Słowikowski, B. K., Lianeri, M., Jagodziński, P. P. (2017). Exploring estrogenic activity in lung cancer. *Molecular biology reports*, 44(1), 35-50.
98. Lam, S. H., Lee, S. G., Lin, C. Y., Thomsen, J. S., Fu, P. Y., Murthy, K. R., Li, H., Govindarajan, R., Nick, L., Bourque, G., Gong, Z., Lufkin, T., Liu, .E, Mathavan, S. (2011). Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, hormonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human cancer cell lines. *BMC medical genomics*, 4(1), 1-15.
99. Jacenik, D., Beswick, E. J., Krajewska, W. M., Prossnitz, E. R. (2019). G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis. *World journal of gastroenterology*, 25(30), 4092.
100. Egloff, A. M., Rothstein, M. E., Seethala, R., Siegfried, J. M., Grandis, J. R., Stabile, L. P. (2009). Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 15(21), 6529-6540.

101. Yager, J. D., Davidson, N. E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(3), 270-282.
102. Murray, G. I., Taylor, M. C., McFadyen, M. C., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D., Melvin, W. T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer research*, 57(14), 3026-3031.
103. Alsubait, A., Aldossary, W., Rashid, M., Algamdi, A., Alrfaei, B. M. (2020). CYP1B1 gene: implications in glaucoma and cancer. *Journal of Cancer*, 11(16), 4652.
104. Gajjar, K., Martin-Hirsch, P. L., Martin, F. L. (2012). CYP1B1 and hormone-induced cancer. *Cancer letters*, 324(1), 13-30.
105. Al-Sarairah, Y. M., Alshammari, F. O., Youssef, A. M., Al-Sarayreh, S., Almuhausen, G. H., Alnawaiseh, N., Alrawashdeh, H. M. (2021). Profiling of CYP4Z1 and CYP1B1 expression in bladder cancers. *Scientific Reports*, 11(1), 1-8.
106. Wilson, J. M., Bunte, R. M., Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6), 785-789.
107. Caporale N., Leemans M., Birgersson L., Germain P.L., Cheroni C., Borbély G., Engdahl E., Lindh C., Bressan R.B., Cavallo F., Chorev N.E., D'Agostino G.A., Pollard S.M., Rigoli M.T., Tenderini E., Tobon A.L., Trattaro S., Troglio F., Zanella M., Bergman Å., Damdimopoulou P., Jönsson M., Kiess W., Kittraki E., Kiviranta H., Nånberg E., Öberg M., Rantakokko P., Rudén C., Söder O., Bornehag C. G., Demeneix B., Fini J.B., Gennings C., Rüegg J., Sturve J., Testa G. (2022). From cohorts to molecules: Adverse impacts of endocrine disrupting mixtures. *Science*. Feb 18;375(6582):eabe8244. doi: 10.1126/science.abe8244
108. Strykowski, J. L., Schech, J. M. (2015). Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(1), 81-84.
109. Ferreira, J. M., Olsson, I. A. S., Valentim, A. M. (2018). Adult zebrafish euthanasia: efficacy of anaesthesia overdose versus rapid cooling (No. e27432v1). *PeerJ Preprints*.
110. Chen, K., Wang, C. Q., Fan, Y. Q., Xie, Y. S., Yin, Z. F., Xu, Z. J., Song, D. Q. (2014). The evaluation of rapid cooling as an anesthetic method for the zebrafish. *Zebrafish*, 11(1), 71-75.
111. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NLM_001145708.1

112. Rojas-Hernandez, N., Véliz, D., Vega-Retter, C. (2019). Selection of suitable reference genes for gene expression analysis in gills and liver of fish under field pollution conditions. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
113. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_212784.1
114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/335629>
115. Xu, H., Li, C., Zeng, Q., Agrawal, I., Zhu, X., Gong, Z. (2016). Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR. *Journal of Fish Biology*, 88(6), 2095-2110.
116. Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W. C., Love, D. R. (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(5), 384-390.
117. Gajjar, K., Martin-Hirsch, P. L., Martin, F. L. (2012). CYP1B1 and hormone-induced cancer. *Cancer letters*, 324(1), 13-30.
118. Ware, W. R. (2009). P450 CYP1B1 mediated fluorescent tumor markers: A potentially useful approach for photodynamic therapy, diagnosis and establishing surgical margins. *Medical hypotheses*, 72(1), 67-70.
119. Ware, W. R. (2009). Nutrition and the prevention and treatment of cancer: association of cytochrome P450 CYP1B1 with the role of fruit and fruit extracts. *Integrative Cancer Therapies*, 8(1), 22-28.
120. Moretti, S., Nucci, N., Menicali, E., Morelli, S., Bini, V., Colella, R., Mandarano, M., Sidoni, A., Puxeddu, E. (2020). The aryl hydrocarbon receptor is expressed in thyroid carcinoma and appears to mediate epithelial-mesenchymal-transition. *Cancers*, 12(1), 145.
121. McCarthy, M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiological reviews*, 88(1), 91-134.
122. Salole, E. (1986). Estradiol. In *Analytical profiles of drug substances 15*, 283-318. Academic Press.
123. Marine, J., Soengas, M. Cell position matters in tumour development. *Nature*. 2022 Apr;604(7905):248-250. doi: 10.1038/d41586-022-00856-3. PMID: 35354976.
124. Tingaud-Sequeira, A., Fogue, J., André, M., Babin, P. J. (2006). Epidermal transient down-regulation of retinol-binding protein 4 and mirror expression of apolipoprotein Eb and estrogen receptor 2a during zebrafish fin and scale development. *Developmental dynamics*, 235(11), 3071-3079.
125. Dorabawila, N., Gupta, G. (2005). Endocrine disrupter—estradiol—in Chesapeake Bay tributaries. *Journal of hazardous materials*, 120(1-3), 67-71.

126. Bakos, K., Kovács, R., Staszny, Á., Sipos, D. K., Urbányi, B., Müller, F., Kovács, B. (2013). Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 136, 13-21.
127. Tohmé, M., Prud'homme, S. M., Boulahtouf, A., Samarut, E., Brunet, F., Bernard, L., Bourguet, W., Gibert, Y., Balaguer, P., Laudet, V. (2014). Estrogen-related receptor γ is an in vivo receptor of bisphenol A. *The FASEB Journal*, 28(7), 3124-3133.
128. Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C. R. (2017). Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environmental science & technology*, 51(21), 12796-12805.
129. Fraser, T., Khezri, A., Lewandowska-Sabat, A. M., Henry, T., Ropstad, E. (2017). Endocrine disruptors affect larval zebrafish behavior: testing potential mechanisms and comparisons of behavioral sensitivity to alternative biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 193, 128-135.
130. Bogers, R., Mutsaerds, E., Druke, J., De Roode, D. F., Murk, A. J., Van Der Burg, B., Legler, J. (2006). Estrogenic endpoints in fish early life-stage tests: luciferase and vitellogenin induction in estrogen-responsive transgenic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(1), 241-247.
131. Thorpe, K. L., Cummings, R. I., Hutchinson, T. H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2003). Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental science & technology*, 37(6), 1142-1149.
132. Martínez, R., Herrero-Nogareda, L., Van Antro, M., Campos, M. P., Casado, M., Barata, C., Pina, B., Navarro-Martín, L. (2019). Morphometric signatures of exposure to endocrine disrupting chemicals in zebrafish eleutheroembryos. *Aquatic Toxicology*, 214, 105232.
133. Nogueira, A. F., Pinto, G., Correia, B., Nunes, B. (2019). Embryonic development, locomotor behavior, biochemical, and epigenetic effects of the pharmaceutical drugs paracetamol and ciprofloxacin in larvae and embryos of *Danio rerio* when exposed to environmental realistic levels of both drugs. *Environmental toxicology*, 34(11), 1177-1190.
134. Cedron, V. P., Weiner, A. M., Vera, M., Sanchez, L. (2020). Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochemical Pharmacology*, 174, 113816.

135. Ardeshir, R. A., Rastgar, S., Salati, A. P., Zabihi, E., Movahedinia, A., Feizi, F. (2022). The effect of nonylphenol exposure on the stimulation of melanomacrophage centers, estrogen and testosterone level, and ER α gene expression in goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 254, 109270.
136. Krisfalusi, M., Eroschenko, V. P., Cloud, J. G. (1998). Methoxychlor and estradiol-17 β affect alevin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality, growth, and pigmentation. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 61(4), 519-526.
137. Scornaienchi, M. L., Thornton, C., Willett, K. L., Wilson, J. Y. (2010). Cytochrome P450-mediated 17 β -estradiol metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of endocrinology*, 206(3), 317.
138. Bräunig, J., Schiwy, S., Broedel, O., Müller, Y., Frohme, M., Hollert, H., Keiter, S. H. (2015). Time-dependent expression and activity of cytochrome P450 1s in early life-stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16319-16328.
139. Chourasia, T. K., Pang, Y., Thomas, P. (2015). The catecholestrogen, 2-hydroxyestradiol-17beta, acts as a G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) antagonist to promote the resumption of meiosis in zebrafish oocytes. *Biology of Reproduction*, 92(3), 69-1.
140. Ruggeri, B., Ubaldi, M., Lourdusamy, A., Soverchia, L., Ciccocioppo, R., Hardiman, G., Baker, M.E, Palermo, A.P., Polzonetti-Magni, A. M. (2008). Variation of the genetic expression pattern after exposure to estradiol-17 β and 4-nonylphenol in male zebrafish (*Danio rerio*). *General and comparative endocrinology*, 158(1), 138-144.
141. Shi, Y., Liu, X., Zhu, P., Li, J., Sham, K. W., Cheng, S. H., Li, S., Zhang, Y., Cheng, C., Lin, H. (2013). G-protein-coupled estrogen receptor 1 is involved in brain development during zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 435(1), 21-27.
142. Wojnarowski K, Cholewińska P, Palić D, Bednarska M, Jarosz M, Wiśniewska I. Estrogen Receptors Mediated Negative Effects of Estrogens and Xenoestrogens in Teleost Fishes—Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(5):2605. <https://doi.org/10.3390/ijms23052605>
143. Lu, Y., Zhang, Y., Zhong, C., Martin, J. W., Alessi, D. S., Goss, G. G., He, Y. (2021). Suspended solids-associated toxicity of hydraulic fracturing flowback and produced water on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 287, 117614.

144. Duan, J., Hu, H., Zhang, Y., Feng, L., Shi, Y., Miller, M. R., Sun, Z. (2017). Multi-organ toxicity induced by fine particulate matter PM_{2.5} in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Chemosphere*, 180, 24-32.
145. Timme-Laragy, A. R., Noyes, P. D., Buhler, D. R., Di Giulio, R. T. (2008). CYP1B1 knockdown does not alter synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine environmental research*, 66(1), 85-87.
146. Liu, Q., Wang, W., Zhang, Y., Cui, Y., Xu, S., Li, S. (2020). Bisphenol A regulates cytochrome P450 1B1 through miR-27b-3p and induces carp lymphocyte oxidative stress leading to apoptosis. *Fish & shellfish immunology*, 102, 489-498.
147. Chaube, R., Rawat, A., Inbaraj, R. M., Joy, K. P. (2021). Cloning and characterization of estrogen hydroxylase (*cyp1a1* and *cyp1b1*) genes in the stinging catfish *Heteropneustes fossilis* and induction of mRNA expression during final oocyte maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 253, 110863.
148. El-Sahli, S., Hua, K., Sulaiman, A., Chambers, J., Li, L., Farah, E., McGarry, S., Liu, D., Zheng, P., Lee, S., Cui, J., Ekker, M., Cote, M., Alain, T., Li, X., D'costa, V., Wang, L., Gadde, S. (2021). A triple-drug nanotherapy to target breast cancer cells, cancer stem cells, and tumor vasculature. *Cell death & disease*, 12(1), 1-10.
149. Yao, Y., Wang, L., & Wang, X. (2020). Modeling of solid-tumor microenvironment in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Tumor Microenvironment*, 413-428.
150. Chaturantabut, S., Shwartz, A., Evason, K. J., Cox, A. G., Labella, K., Schepers, A. G., Yang, S., Acuna, M., Houvras, Y., Mancio-Silva, L., Romano, S., Gorelick, D., Cohen, D., Zon, L., Bhatia, S., North, T., Goessling, W. (2019). Estrogen activation of G-protein-coupled estrogen receptor 1 regulates phosphoinositide 3-kinase and mTOR signaling to promote liver growth in zebrafish and proliferation of human hepatocytes. *Gastroenterology*, 156(6), 1788-1804.
151. Cervantes-Camacho, I.; Guerrero-Estévez, S.M.; López, M.F.; Alarcón-Hernández, E.; López-López, E. (2020) Effects of Bisphenol a on Foxl2 gene expression and DNA damage in adult viviparous fish *Goodea atripinnis*. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, 83, 95–112.

Spis rycin

Rycina 1. Obszar naturalnego występowania *Danio rerio*.

Rycina 2. Miejsca próbkowania pigmentacji larw.

Spis zdjęć

Zdjęcie 1. Dorosłe osobniki *Danio rerio* utrzymywane w Lehrstuhl für Fischkrankheiten und Fischereibiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München (fot. K. Wojnarowski)

Zdjęcie 2. Butelki hodowlane zawierające embriony *Danio rerio* wykorzystywane w trakcie eksperymentu (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 3. Zbiorniki doświadczalne Zakładu Limnologii i Rybactwa (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 4. Larwy *Danio rerio* (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 5. Miernik multiparametryczny wykorzystywany w trakcie monitorowania parametrów wody (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 6. Zestaw Total RNA Mini służący do izolacji RNA (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 7. Spektrofotometr NanoDrop 2000 wykorzystywany do analizy jakości izolatów (fot. K. Wojnarowski)

Zdjęcie 8. Poglądowa krzywa przedstawiająca wynik analizy spektrofotometrycznej otrzymanych próbek.

Zdjęcie 9. Zestaw Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 10. Ustawienia protokołu przebiegu reakcji RT-PCR.

Zdjęcie 11. Przebieg amplifikacji materiału genetycznego w trakcie reakcji RT-PCR.

Zdjęcie 12. Przykładowa larwa badana poddana analizie relatywnego poziomu pigmentacji (fot. K. Wojnarowski).

Zdjęcie 13. Analiza statystyczna uzyskanych wyników w programie Statistica 13.1 (fot. K. Wojnarowski)

Spis tabel

Tabela 1. Linie D. rerio utrzymywane w warunkach laboratoryjnych

(za: Spence i wsp. 2008 [75] oraz [91]).

Tabela 2. Średnie wartości parametrów wody w trakcie trwania doświadczenia (118h).

Tabela 3. Proporcje składników mieszaniny reakcyjnej do PCR.

Tabela 4. Primery wykorzystane podczas wstępnej analizy wydajności

Tabela 5. Startery wykorzystane podczas wstępnej analizy wydajności.

Tabela 6. Wartości względnej pigmentacji w grupach E1.

Tabela 7. Względna wartość pigmentacji dla grup E2.

Tabela 8. Względna wartość pigmentacji dla grup E3.

Spis wykresów

Wykres 1. Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla grup E1.

Wykres 2. Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla grup E2 (a,b – P<0,05).

Wykres 3. Wyniki analizy względnej wartości pigmentacji dla grup E3.

Wykres 4. Poziom ekspresji genu *cyp1b1* w tkankach larw poddanych ekspozycji na estrogeny o stężeniu 10 ng/dm³ (a, b – P<0,05; A, B – P<0,01).

Wykres 5. Poziom ekspresji genu *cyp1b1* w tkankach larw poddanych ekspozycji na estrogeny w stężeniu 100 ng/dm³ (A, B – P<0,01).

Wykres 6. Poziom ekspresji genu *cyp1b1* w tkankach larw poddanych ekspozycji na badane estrogeny – 1000 ng/dm³ (A, B – P<0,01).

Wykres 7. Poziomy ekspresji genu *cyp1b1* w grupach E1 (A, B – P<0,01).

Wykres 8. Poziomy ekspresji genu *cyp1b1* w grupach E2 (a, b – P<0,05; A, B – P<0,01).

Wykres 9. Poziomy ekspresji genu *cyp1b1* w grupach E3 (a, b – P<0,05; A, B – P<0,01).