



**AZ AFLATOXIN B1 EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉSRE
ÉS VELESZÜLETETT IMMUNRENDSZERRE
GYAKOROLT HATÁSAINAK VIZSGÁLATA
ZEBRADÁNIÓN (*DANIO RERIO*)**

Doktori értekezés tézisei

DOI: 10.54598/003660

Ivánovics Bence

Gödöllő, 2023.

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezetők: Dr. Urbányi Béla
egyetemi tanár, az MTA doktora
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Czimmerer Zsolt
tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
.....
A témavezetők jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

A mikotoxinok által szennyeződött élelmiszerek és takarmányok globális szintű humán és állategészségügyi, valamint gazdasági problémát jelentenek (Marroquín-Cardona et al., 2014). Az aflatoxin B1 (AFB1) az egyik legkiemelkedőbb akut és krónikus toxicitással rendelkező mikotoxin, amely viszonylag gyakran jelenik meg gabonafélékben, olajos magvakban, fűszerekben és az azokból előállított termékekben (Filazi & Tansel, 2013). Különböző prediktív modellek az AFB1 kontamináció fokozódását, illetve az abban érintett földrajzi régiók kiterjedését prognosztizálják egyes gabonafélék esetén, mivel a klímaváltozás hatására bekövetkező hőmérsékletnövekedés és időjárásbeli változások kedvezhetnek a toxint termelő penészgombák elterjedésének és toxintermelésének (Battilani et al., 2016; Battilani & Leggieri, 2015; Mitchell et al., 2016). Ez adott esetben növekvő humán- és állategészségügyi kockázatot vonhat maga után.

A terhesség, illetve vemhesség időszaka kiemelten veszélyeztetett periódus az AFB1-kitettség szempontjából, mivel a toxin átjut a placentán, potenciálisan károsítva a fejlődő utódot (Partanen et al., 2010; Wangikar et al., 2005). Az embrionális korban bekövetkező környezeti stresszhatások következményei az utódra nézve széles skálát ölelnek fel, megmutatkozhatnak egyrészt akut, pl. teratogén hatásokban, mindemellett felnőtt kori betegségekben, az azokra való fogékonyság növekedésében, vagy egyes patogénekkal szembeni ellenállóképesség csökkenésében egyaránt. E tekintetben a fejlődő immunrendszert befolyásoló környezeti hatások szerepe kiemelendő. Az embrionális vérképzés (hematopoézis) kritikus periódusaiban bekövetkező stresszhatások többek között autoimmun és krónikus gyulladós betegségek, valamint csökkent immunkompetencia kialakulását is magukkal vonhatják (Goldstein et al., 2020; Holladay, 1999; Holladay & Smialowicz, 2000; Landreth, 2002; Rychlik & Sillé, 2019; Zhang et al., 2005). Mindezért kiemelten fontos az embrionális xenobiotikum-kitettség biológiai hatásainak minél alaposabb megismerése. Noha az aflatoxikózis egyes kórképei madarakban, emlősökben és halakban már régóta ismeretesek, az embriotoxikus hatások azonban részletesebb feltérképezésre szorulnak. A humán *in utero* AFB1 kitettség leggyakrabban azonosított következményei között a csökkent születési tömeg és a posztnatális növekedésbeli problémák szerepelnek, amelyek háttérében álló biológiai folyamatok még nem teljesen ismertek (Lauer et al., 2019; Shuaib et al., 2010).

A zebradánió a biológiai tudományok számos ágának közkedvelt gerinces modellszervezete, amely megannyi előnyös tulajdonságából adódóan kiemelt helyen szerepel többek között a környezeti szennyező anyagok, illetve terápiás célú vegyületek embrionális hatásainak vizsgálatában. Számos molekuláris, sejt, szövet, illetve szerv szintű hasonlóság mutatkozik meg a zebradánió és az emlősök között, amely alkalmassá teszi a fajt magasabb rendű gerinceseket érő stresszhatások és betegségek bizonyos mértékű modellezésére (Howe et al., 2013; Lieschke & Currie, 2007; Scholz et al., 2008). A doktori munka részletes képet kíván nyújtani az AFB1 alacsony, nem-letális koncentrációinak embrionális fejlődésre és az embriók veleszületett immunrendszerére gyakorolt direkt hatásairól, különböző biokémiai, molekuláris biológiai, immunológiai és toxikológiai vizsgálmódszerek integrálása által, az alábbiakban felsorolt szempontokon keresztül.

Célkitűzések

Szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció hatásainak feltérképezése:

1. teljes embriókra/lárvákra kiterjedő morfológiai elváltozások detektálása
2. teljes transzkriptom szintű változások feltérképezése, az AFB1-expozíció által érintett legfontosabb biológiai útvonalak azonosítása
3. az embriók/lárvák veleszületett immunrendszerére gyakorolt hatások vizsgálata
 - a. neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás a teljes embriókban/lárvákban
 - b. nitrogén-monoxid termelődés *in vivo*
 - c. L-arginin tartalom
 - d. neutrofil granulociták viselkedése indukált lokális gyulladáshoz
 - e. immun- és gyulladás-specifikus markergének kifejeződése
4. az emésztőcsatornát érintő elváltozások detektálása
 - a. relatív bélhossz
 - b. emésztőcsatorna funkcionális/anatómiai eltérései
 - c. emésztőrendszer fejlődésében kulcsszerepet játszó gének kifejeződése
5. az embriók/lárvák energiaszerzésére gyakorolt hatások vizsgálata
 - a. szikzacskó lipid tartalmának mobilizációja
 - b. lipid transzportban és anyagcserében kulcsszerepet játszó géncsoportok érintettsége és kifejeződése

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A zebradániók tartási és szaporítási körülményei

A kísérletekbe vont embriókat szolgáltató laboratóriumi AB, valamint transzgenikus Tg(*mpx:EGFP*) típusú zebradánió vonalak a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szent István Campusán, az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetben található zebradániók számára kialakított és fenntartott Tecniplast ZebTEC recirkulációs haltartó rendszerben kerültek felnevelésre. A szülőállomány 14/10 világos/sötét szakaszú megvilágítás mellett, $25,5 \pm 0,5$ °C hőmérsékletű, $7,0 \pm 0,2$ pH értékű, 550 ± 50 μ S vezetőképességű áramoltatott vízben volt fenntartva. Az állomány takarmányozása/etetése naponta, életkornak megfelelő szemcseméretű haltáppal (SDS Zebrafeed), valamint tengeri sórákkal (*Artemia salina*) történt. Az ivarérett, felnőtt halak szaporítása erre a célra kialakított, válaszfalal ellátott rácsos aljú szaporítómedencékben zajlott. Az ívást követően a leadott ikratétel 10 cm átmérőjű, friss rendszervíz tartalmazó Petri csészékbe lett összegyűjtve.

2.2. Embrionális aflatoxin B1-expozíció szubletális koncentrációkkal

Annak érdekében, hogy kijelölhessem az alkalmazandó, viszonylag alacsony, szubletális AFB1 koncentráció értékeket, elsőként 120 órás intervallumra kiterjesztett Fish embryo toxicity (FET) tesztet végeztem az OECD 236 irányelv alapján. Ennek során a 8-16 sejtes stádiumban lévő zebradánió embriók egyedileg 24 lyukú sejtenyésző lemezekbe kerültek 2 ml/embrió végtérfogattal (N=2x3x10/csoport). A FET tesztben alkalmazott kezelési koncentrációk (0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25 és 0,5 mg/l) dimetil-szulfoxidban (DMSO) felvett 1 mg/ml-es AFB1 törzsoldat rendszervízben történő hígításával készültek. Az oldószeres kontroll csoport esetén az oldószer (DMSO) mennyisége nem haladta meg a 0,01 térfogatszázalékot. A teszt során naponta feljegyeztem az elpusztult embriók számát. A mortalitási értékek alapján a koncentráció-válasz összefüggést, valamint az 1, 10 és 50 % pusztulást eredményező AFB1 koncentrációkat (LC1, LC10, LC50) OriginPro szoftver segítségével határoztam meg. A további kísérletek során alkalmazott, szubletális koncentrációk (0,025; 0,05; 0,075 és 0,1 mg/l) felső határa az LC10 érték alapján került kijelölésre.

2.3. Morfológiai elváltozások értékelése

Az embrionális AFB1-expozíció végén, a termékenyülést követő 120. órát megelőzően (120 hours post fertilisation, hpf) a zebradánió lárvákat trikainmetánszulfonát (MS-222) rendszervízes oldatának (168 mg/l) segítségével altatásba vittem. Ezt követően mikroszkóp (Leica M205 FA, Leica DFC 7000 T kamera, Leica Application Suite X szoftver, Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) alatt oldalnézeti fényképeket készítettem a lárvákról (N=3x30/csoport). A teljes testhosszt, az úszóhólyag oldalnézeti területét és a relatív bélhosszt a fényképek alapján ImageJ szoftverrel határoztam meg. A lárvák érrendszerében bekövetkező morfológiai elváltozások megfigyeléséhez *Tg(gata1:dsRED;flkl:GFP)* vér-érrendszer specifikus transzgenikus zebradánió vonalat alkalmaztam.

2.4. RNS szekvenálás és teljes transzkriptom analízis

A teljes RNS szekvenálást és analízist a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végeztük. Ennél a vizsgálatnál az embrionális AFB1-expozíciót a kijelölt szubletális koncentráció sor legmagasabb, az LC10 értéket megközelítő, koncentrációjával (0,1 mg/l \approx LC10) végeztük el. Az AFB1-expozíció végén a lárvák 200 μ l Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csővekben (N=4x30/csoport) homogenizálásra kerültek. Az RNS izolálást kloroformos elválasztás/izopropanolos precipitáció/etanolos mosás módszerével végeztük. Az RNS integritását Eukaryotic Total RNA Nano Kit és Agilent BioAnalyzer automata gélelektroforézis készülék segítségével határoztuk meg. Az RNS könyvtár létrehozása Ultra II RNA Sample Prep kit segítségével történt. Ennek során elsőként a poli(A)farokkal rendelkező mRNS-t, mágneses gyöngyökkel konjugált deoxitimin szekvenciához (oligo-dT) kötöttük, eluáltuk, majd pedig fragmentáltuk. Ezt követően random primerek felhasználásával és reverz transzkripció által létrehoztuk a komplementer DNS-eket (cDNS). Adapter ligálást követően a szekvenálást Illumina NextSeq500 készülék segítségével végeztük el. A nyers szekvenálási adatokat HISAT2 algoritmus segítségével illesztettük a zebradánió referencia genomhoz (GRCz11). A differenciáltan expresszált géneket StrandNGS szoftver segítségével azonosítottuk. Az AFB1 kezelés hatására szignifikánsan érintett biológiai folyamatokat gén-ontológiai elemzéssel (Gene Ontology Enrichment Analysis, GOEA), Cytoscape/ClueGo szoftverrel (Bindea et al., 2009) értékeltük.

2.5. Génexpresszió meghatározása RT-qPCR segítségével

Az egyes, többek között a transzkriptom analízis eredményei alapján kijelölt, markergének kifejeződését reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) határoztam meg. Az AFB1-expozíció végén a lárvákat 200 µl Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csövekben (N=5x30/csoport) homogenizáltam. Az RNS izolálást kloroformos elválasztás/izopropanolos precipitáció/etanolos mosás módszerrel végeztem. Az izolált, nukleáz-mentes vízben felvett RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop One spektrofotométerrel értékeltem. A cDNS-ek létrehozásához High Capacity cDNA Reverse Transcription kit-et használtam. A PCR reakciókat 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix segítségével végeztem LightCycler 480 II készülékben. Az egyes kezelési/kontroll csoportokhoz tartozó eredményeket az *efla* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítva, normalizált mRNS szintben fejeztem ki.

2.6. Neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás meghatározása

A neutrofil granulociták számszerűsítéséhez és az embriókon/lárvákon belüli eloszlásának vizsgálatához Tg(mpx:EGFP) transzgenikus zebradánió reporter vonalat alkalmaztunk. A teljes lárvákra vonatkozó neutrofil granulocita sejtszám (EGFP⁺ sejtek gyakorisága) a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében, fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (fluorescence activated cell sorting, FACS) módszerével határoztuk meg. Az AFB1-expozíció végén (120 hpf) a lárvákat mikrocentrifuga-csövekbe helyeztük (N=2x3x15/csoport), amelyeket jéggel lehűtött vízbe állítottunk az egyedek túlaltatása érdekében. Ezt követően a lárvákat Ringer-oldatban átöblítettük, majd pedig 0.25 százalékos Tripszin-EDTA segítségével emésztettük. Az emésztést magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS) és kalcium-klorid hozzáadásával állítottuk le. A mintákat centrifugálást követően (400 g; 5 perc) 5 százalékos FBS/PBS oldatban reszuszpendáltuk és 40 µm pórusméretű sejtszűrő kosarakkal átszűrtük. Az egyes mintákban az EGFP⁺ sejtek gyakoriságát 10⁵ sejtre vonatkozóan NovoCyte Flow Cytometer készülékkel határoztuk meg.

A neutrofil granulociták lárvákon belüli eloszlásának értékeléséhez az AFB1-expozíció végén, altatásban (MS-222, 168 mg/l) oldalnézeti fényképeket készítettem a lárvákról GFP szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A granulociták eloszlását a fényképek alapján értékeltem, valamint a szik-

bélrendszer területén található EGFP+ sejteket ImageJ szoftver segítségével (manuálisan) összesítettem.

2.7. Nitrogén-monoxid termelődés in vivo meghatározása

Egy gyulladáshoz vezető mediátornak, a nitrogén-monoxidnak a lárvaon belüli termelődését fluoreszcens jelet szolgáltató diaminofluorescein-FM diacetát (DAF-FM-DA) próba segítségével határoztam meg. Az AFB1-expozíció végén a lárvaakat 96 lyukú, lyukanként 200 µl, 5 µM DAF-FM-DA oldatot tartalmazó sejtenyésztő lemezekbe helyeztem individuálisan és 25,5 °C-on, sötétben, 1 óráan keresztül inkubátorban tartottam. Ezt követően a lárvaakat rendszervízben átöblítettem, majd altatásban (MS-222, 168 mg/l) oldalnézeti fényképeket készítettem GFP szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A fényképek alapján ImageJ szoftver segítségével meghatároztam az egész lárvaára, valamint a szik-bélrendszer területére korlátozódo fluoreszcencia intenzitás értékeket.

2.8. Aminosav analízis

Az L-arginin tartalmat ultranagy-hatékonyságú folyadékromatográfiás (UPLC) módszerrel határoztuk meg. Az AFB1-expozíció végén a 120 óráas lárvaakat mikrocentrifuga-csővekbe gyűjtöttük, meghatároztuk a nedves tömeget majd homogenizáltuk a lárvaakat (3x30 csoport). A homogenizálást centrifugálás (20000 g, 10 perc), a felülúszó átszűrése (3kDa-os szűrő) majd vákuumos szárítása (SpeedVac, Thermo Scientific) követte. A derivatizálást AccQTag Ultra kit segítségével végeztük. A minták mérését és analízálást 2 belső ismétlésben UPLC készülékkel (H-Class, Waters) és Empower szoftverrel végeztük.

2.9. Farokúszó sebzésén alapuló gyulladáshoz vezető modell

A farokúszó sebzését Tg(mpx:EGFP) transzgenikus zebraadánió reporter vonalon végeztem, amely lehetővé teszi a neutrofil granulociták sebzés területére vándorlásának in vivo monitorozását. Az embrionális AFB1-expozíció követően, 108 hpf-nél a lárvaakat altatásba vittem (MS-222, 168 mg/l), majd mikroszkóp alatt steril borotvapengével a farokúszó-véget a lárva tengelyére merőlegesen, a gerinchúr vége és a farokúszó legtávolabbi pontja közötti szakasz középső régiójában, egyenes vonalú vágással eltávolítottam. Ez után a lárvaakat friss rendszervíz tartalmazó 24 lyukú sejtenyésztő lemezekbe kerültek, individuálisan. A sebzését követő 4. és 12.

órában a lárvákról oldalnézeti fényképeket készítettem GFP szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által (N=5x10/csoport).

2.10. A szikzacskó lipid tartalmának mérése

A lárvák, elsősorban azok szikzacskójának neutrális lipidtartalma közti különbségeket Oil-Red-O (ORO) festéssel határoztam meg. Az AFB1-expozíció végén (120 hpf) a lárvákat jéggel fokozatosan lehűtött rendszervízben túlalattam, PBS-el átöblítettem, majd 4 % (v/v) paraformaldehidben, 4 °C-on, 6 órán keresztül fixáltam. A fixálást követően 1 g/l ORO izopropanolos (60%) oldatában a lárvákat szobahőmérsékleten 2 órán keresztül mikrocentrifuga-csővekben inkubáltam. A festést PBS-el történő átöblítés követte, végül az egyedek lépcsőzetes módon, 95 százalékos glicerinbe kerültek. Az ORO által festett lárvákról, mikroszkóp (Leica M205 FA) alatt egységes megvilágítású (fehér) háttérrel oldalnézeti képeket készítettem (N=2x10/csoport). Az egyes csoportokhoz tartozó lárvák szikzacskóinak lipid tartalma közti különbségeket optikai denzitás méréssel határoztam meg ImageJ szoftver segítségével, „Rodbard”-kalibrációt követően (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>).

2.11. Emésztőcsatorna funkcionális in vivo vizsgálata fluoreszcens mikrogyönggyel

Az emésztőrendszer károsodásának egyik vizsgálatát a fluoreszcens mikrogyöngy-assay képezte. Ennek során reverz ozmózis (RO) vízzel átmosott, centrifugált és újra szuszpenzióba vitt (2,5 %), fluoreszcens jelet kibocsátó, átlagosan 2 µm átmérőjű mikrogyöngyöket (carboxylate-modified polystyrene latex beads, fluorescent red, Sigma-Aldrich) alkalmaztam. Az AFB1-expozíció végén a lárvákat 0,025 százalékos mikrogyöngy szuszpenziót tartalmazó mikrocentrifuga-csővekbe helyeztem (N=2x2x5/csoport) és 3 órán keresztül 25,5 °C-on, a centrifuga-csőveket nyitott állapotban hagyva inkubáltam. Az inkubálást követően a lárvákat friss rendszervízben többször átöblítettem, eltávolítva a mikrogyöngyöket a vizes közegből, majd pedig altatásban (MS-222, 168 mg/l) oldalnézeti fényképeket készítettem az állatokról mCherry szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A garat-régióban, valamint a bélcsatornában felhalmozódó

mikrogyöngyök által kibocsátott fluoreszcens jelet ImageJ szoftver által számszerűsítettem.

2.12. Statisztikai értékelés

A kísérletek során született adatok normalitás-vizsgálatát Shapiro-Wilk próbával végeztem. A csoportok közötti statisztikai különbségeket a normalitás-vizsgálat eredményétől függően egyszempontos paraméteres ANOVA-val és Dunnett-féle post hoc teszttel, vagy egyszempontos nem-paraméteres ANOVA-val (Kruskal-Wallis teszt) és Dunn-féle post hoc teszttel értékeltem. Az eredményeket átlag \pm szórás formában mutattam be. A transzkriptom analízis során a szignifikánsan differenciáltan expresszált géneket korrigált T-próba (Moderated T-test) és Benjamini-Hochberg FDR korrekció segítségével határoztuk meg. Statisztikailag igazoltan szignifikáns különbséget $p < 0,05$ szinten állapítottam meg.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A szubletális aflatoxin B1-expozíció lárvák morfológiájára és teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai

A szubletális AFB1 koncentrációk a 120 órára kiterjesztett FET teszt során tapasztalt mortalitási arányok alapján kerültek kijelölésre. A 120 órára vonatkoztatott letális koncentráció értékek az alábbiak szerint alakultak: LC1 = 0,081 mg/l; LC10 = 0,108 mg/l; LC50 = 0,141 mg/l. Az alkalmazott szubletális koncentráció-sorozatot az LC10 (0,108 mg/l) érték alapján az alábbiakban határoztuk meg: 0,025; 0,05; 0,075 és 0,1 mg/l.

Az embrionális AFB1-expozíció nem eredményezett drasztikus morfológiai elváltozásokat az embriókban/lárvákban, azonban enyhe, de statisztikailag már igazolható csökkenés mutatkozott a teljes testhosszban 0,1 mg/l koncentráció esetén. Mindemellett egy jelentősebb, koncentrációfüggő csökkenés volt tapasztalható az úszóhólyag méretében.

A teljes RNS szekvenálás és transzkriptom analízis 1216 szignifikáns differenciáltan expresszált gént (differentially expressed genes, DEGs) azonosított az AFB1 kezelés hatására (0.1 mg/l). Ezen differenciáltan expresszált gének közül 829 csökkent, míg 387 fokozott kifejeződést mutatott. A gén-ontológiai elemzés számos, szignifikáns mértékben indukált vagy gátolt biológiai folyamatot azonosított. Az indukált gének között az immunrendszer- és gyulladás-kapcsolt folyamatokban kulcsszerepet játszó géncsoportok kimagasló felülreprezentáltsága volt kimutatható. A gátolt gének esetén legjelentősebb mértékben a redox útvonalak és számos anyagcsere folyamat – különös tekintettel a lipid és szerves sav anyagcserére – érintettsége mutatkozott meg.

3.2. Az aflatoxin B1 veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatásai

A teljes transzkriptom analízis során született eredmények alapján a következőkben az embrionális AFB1-expozíció veleszületett immunrendszerre és gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokra gyakorolt hatásainak vizsgálatára fókuszáltunk. Ennek érdekében elsőként négy immunválasz-asszociált gén (il1 β , mmp9, cxcl8b.1, cxcl18b) kifejeződését vizsgáltam RT-qPCR segítségével. Összhangban az RNS-szekvenálás eredményeivel, az AFB1 kezelés a kiválasztott markergének jelentős mértékű, koncentrációfüggő indukálását vonta maga után.

A 120 órás lárvákról készült fényképek alapján megfigyelhetővé vált, hogy az AFB1 kezelés hatására a neutrofil granulociták eloszlása a

lárvaikon belül megváltozik, diffúz jellegű szóródást eredményezve. Mindemellett, a lárva szik-bélrendszerének területén a neutrofil granulociták fokozott felhalmozódása mutatkozott meg. Mivel az embriók/lárva ezen régiója jól lokalizálható és körül határolható, ezért összesítettem a szik-bélrendszer területén akkumulálódott granulocita sejtek számát, amely 0,025–0,075 mg/l koncentráció tartományban erőteljes növekedést mutatott. Emellett, az EGFP+ sejtek fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (FACS) által meghatározott gyakorisága csak a legmagasabb, 0,1 mg/l-es kezelési koncentráció esetén csökkent szignifikáns mértékben a kontrollhoz viszonyítva.

A farokúszó-sebzésen alapuló gyulladási modellben jelentős mértékű, koncentráció-függő csökkenés volt tapasztalható az AFB1-kezelt lárvaknál a sebzés területére vándorló granulociták mennyiségében, a sebzést követő 4., valamint 12. órában egyaránt. Mindez felvetette az érrendszer AFB1-által történő sérüléseinek, és ezen keresztül a granulocita vándorlás befolyásolásának a lehetőségét. A vér-érrendszer specifikus transzgenikus zebrafish vonal vizsgálata során azonban nem tapasztunk jelentős mértékű eltéréseket a kontroll és a kezelési csoport között az érrendszer morfológiájában.

3.3. Az aflatoxin B1-expozíció nitrogén-monoxid termelésre és L-arginin tartalomra gyakorolt hatásai

A 120 órás lárvaiban fluoreszcencia próba segítségével történő in vivo nitrogén-monoxid termelés detektálásakor erőteljes mértékű, koncentráció-függő növekedés mutatkozott az AFB1 kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest. Emellett, hasonlóképpen a neutrofil-granulociták szik-bélrendszer területén történő intenzív felhalmozódásához, a nitrogén-monoxid termelés kifejezetten nagy mértékű növekedést mutatott a lárva ezen régiójában a kezelt csoportokban. Összhangban a nitrogén-monoxid szint növekedésével, az AFB1 kezelésben részesült embrióknál szignifikáns mértékű csökkenés volt tapasztalható a nitrogén-monoxid szintáz szubsztrátjaként szolgáló L-arginin tartalomban.

3.4. Az aflatoxin B1 emésztőrendszerre gyakorolt hatásai

A granulocita felhalmozódás és nitrogén-monoxid termelődés tekintetében a szik-bélrendszer kifejezetten érintett területként mutatkozott meg az AFB1 kezelés hatására. Mindemellett, a mikroszkópos fényképek elemzése során a kezelt lárvák bélcsatornájának alulfejlettségére utaló jeleket is detektáltunk. Továbbá az RNS szekvenálás által felderített szignifikáns mértékben differenciáltan expresszált gének között számos, az emésztőrendszer fejlődésében kulcsszerepet játszó gén (*clda*; *aldh1a2*; *dhrs9*; *pllp*; *cdx1b*) szerepelt. Ez utóbbi két gén (*dhrs9*, *cdx1b*) jelentős mértékű redukciója mutatkozott meg azok RT-qPCR által történő validálása során a 0,05, 0,075 és 0.1 mg/l AFB1 koncentrációkkal kezelt csoportokban.

Az emésztőrendszer károsodásának további feltérképezése érdekében elsőként meghatároztam a lárvák nyelőcsőve és végbélnyílása közötti távolságot, mint „relatív bélhosszt” (nincs elkülönült gyomor), amely már a legalacsonyabb, 0,025 mg/l koncentrációnál is szignifikánsan csökkent. Ezt követően az emésztőrendszer bizonyos mértékű funkcionális-anatómiai eltéréseinek becslésére alkalmas vizsgálatot végeztem el fluoreszcens mikroyöngyök segítségével. Az AFB1 expozíció alatt tartott lárváknál a mikroyöngyök a legalacsonyabb kezelési koncentráció esetén (0,025 mg/l) csökkent mértékben, a többi koncentrációhoz tartozó csoport esetén pedig szinte alig kerültek be a bélcsatornába, ellentétben a kontroll csoporttal. Érdekes módon, a bélcsatorna drasztikusan alacsony mikroyöngy tartalma a magasabb koncentrációknál (0,075; 0,1 mg/l) a száj-garat régióban történő erőteljes – a lárvák legalább 55 százalékánál bekövetkező – mikroyöngy akkumulációval párosult.

3.5. Az aflatoxin B1 szikból történő lipid-mobilizációra gyakorolt hatása

Fraher és mtsai. (2016) által azonosított, a zebraadánió szik-lipid anyagcserében és transzportban kulcsszerepet játszó géncsoportot (gene set) alapul véve elsőként géncsoport dúsulási analízist (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) végeztünk el a teljes RNS-szekvenálás által nyert adatokon. A GSEA az AFB1 expozíció hatására alulexpresszált lipid metabolizmus és transzport-asszociált gének szignifikáns feldúsulását mutatta ki (False Discovery Rate, FDR <0,1; Normalized Enrichment Score, NES: -1,53) (14. A és B ábra). Ezek közül négy gén (mtp; apoa4a, apobb.1; fabp1b.1) mRNS szintű kifejeződését tovább vizsgáltuk RT-qPCR segítségével, validálva az RNS-szekvenálás eredményeit. Az mtp, apoa4a és apobb.1 gének esetén 0,025 mg/l koncentrációnál enyhe, míg 0,05, 0,075 és 0,1 mg/l koncentrációknál jelentősebb mértékű, szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a génkifejeződésben. A fabp1b.1 gén tekintetében már a 0,025 mg/l koncentrációnál is erőteljes, a magasabb értékeknél pedig drasztikus mértékű gátló hatás mutatkozott meg.

A teljes lárvák Oil-Red-O alapú lipidfestésével képet kaphattunk a neutrális lipidek lárvakon belüli eloszlásáról, amellyel lehetővé vált a szik-bélrendszer területének optikai-denzitáson alapuló lipid-tartalom becslése. Összhangban a molekuláris-biológiai vizsgálatok eredményeivel, az AFB1 kezelés hatására szignifikáns, koncentráció-függő növekvő tendenciát tapasztaltunk a szik-bélrendszer területén mért optikai denzitásban, amely a szikból történő lipid-felhasználás képességének csökkenésére utalt.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Doktori munkámban elsőként vizsgáltam a szubletális koncentrációkkal történő embrionális aflatoxin B1 (AFB1)-expozíció teljes RNS szekvenáláson alapuló, teljes transzkriptomra gyakorolt hatásait 120 órás zebradánió lárvákban, amelynek során kimutattam, hogy az AFB1-expozíció jelentős mértékben gátol számos energiaszerzésre irányuló anyagcsereútvonalat, valamint az immunválasz- és a gyulladás-asszociált géncsoportok erőteljes indukálását eredményezi.

2. Elsőként számoltam be a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció neutrofil granulocitákra gyakorolt – megváltozott eloszlásban, sejtszámban és lokális gyulladásra adott válaszreakcióban megmutatkozó – szignifikáns hatásairól 120 órás zebradánió lárvákban.

3. Elsőként mutattam ki a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíciónak az *in vivo* nitrogén-monoxid termelődésre és az L-arginin tartalomra gyakorolt ellentétes irányú hatását 120 órás zebradánió lárvákban.

4. Elsőként mutattam ki a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció zebradánió embriók/lárvák szik-lipid mobilizációjára gyakorolt gátló hatásait.

5. Elsőként számoltam be a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíciónak az emésztőrendszer fejlődését és funkcióját károsító hatásairól zebradánió embriókban/lárvákban.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az aflatoxin B₁ (AFB₁) az egyik legnagyobb humán- és haszonállategészségügyi kockázattal bíró mikotoxin. Embriotoxikus hatását ugyan már a 1960-as években kimutatták, de az emlősök és az ember esetén az embrionális AFB₁-kitettség által okozott káros hatások nem minden részlete ismert. Az AFB₁-kitettség jelenleg ismert pre- és posztnatális káros következményeit meghatározó faktorok közül kiemelik a pro-inflammatorikus mediátorok fokozott termelődését. Éppen ezért az embrionális fejlődésre gyakorolt hatások vizsgálata során alapvetően fontos az embrionális immunrendszer AFB₁ által történő befolyásolásának részletesebb vizsgálata is.

Az AFB₁ zebradánió embriókon történő ez idáig született vizsgálatai elsősorban a neurotoxikus és hepatotoxikus hatások feltérképezésére fókuszáltak (Park et al., 2020; Wu et al., 2019; Zhou et al., 2017; Zuberi et al., 2019). Ezen kutatások során megmutatózó mortalitási értékek a legtöbb esetben összhangban vannak az általunk tapasztaltakkal, mindemellett fontos megjegyezni, hogy ezek az értékek általában eltérő expozíciós ablakban végzett tesztek alapján születtek.

A szubletális AFB₁-expozíció nem eredményezte az embriók/lárvák számottevő torzulását a kezelési időszak alatt, hasonlóképpen a Wu és mtsai. (2019) által leírtakhoz. Mindazonáltal a teljes transzkriptom szintjén már jelentős eltéréseket detektáltunk. Az AFB₁ több, mint 1200 gén kifejeződését befolyásolta szignifikáns mértékben. A csökkent kifejeződést mutató gének között szignifikánsan feldúsultak azok a géncsoportok, amelyek pl. az oxidoreduktáz és monooxigenáz aktivitásban, illetve az energiaszerző metabolikus útvonalakban játszanak fontos szerepet. Az oxidoreduktáz aktivitású enzimek közül számos kulcsszerepet tölt be a reaktív oxigénszármazékok (ROS) eliminálásában (pl. szuperoxid dizmutáz, glutation-peroxidáz, NADPH-kinon-oxidoreduktáz) (Battelli et al., 2016; Ngoka, 2008). A transzkriptom analízis során 147, az oxidoreduktáz aktivitásban közreműködő gén kifejeződésének csökkenését mutattam ki 120 órás zebradánió lárvákban AFB₁ kezelés hatására, amely összhangban van a toxin ismert oxidatív stressz indukáló képességével.

Az embrionális AFB₁-kezelés következtében fokozott mRNS kifejeződést mutató gének között kimagasló mértékben dúsultak fel az immunválaszban és gyulladáshoz vezető folyamatokban közreműködő géncsoportok. Mindez együtt járt a teljes embriókon/lárvákon belüli neutrofil granulociták erőteljes diffúz szóródásával és emelkedett nitrogén-monoxid termelődéssel, amely

a szik-bélrendszer területén különösen intenzívnek bizonyult. Dey & Kang (2020) AFB1-kezelt 6 napos zebra-dánió lárvák vizsgálata során szintén a szik-bélrendszer területén detektált jelentős mértékű ROS képződést. Emellett, a megnövekedett nitrogén-monoxid termeléssel összhangban, csökkent L-arginin szintet tapasztaltam. Az AFB1 tehát egy szisztémás jellegű gyulladáshoz vezetett el a fejlődő embriókban/lárvákban. Továbbá, a lokális gyulladáson alapuló modellben szignifikáns mértékben csökkentette a neutrofil granulociták sebzés területén történő felhalmozódását. A granulociták teljes lárvákban belüli gyakorisága csak a legmagasabb alkalmazott (LC10 érték körüli) koncentráción mutatott csökkenést, ugyanakkor a lokális sebzésre adott „csökkent mértékű” válaszreakció már alacsonyabb koncentrációk esetén is számottevő volt. Mindemellett, a lárvák érrendszeréről készült fényképek értékelése során nem figyeltem meg szemmel látható, drasztikus morfológiai elváltozásokat. Hasonlóképpen az általam tapasztaltakhoz, a zebra-dánió embriók/lárvák farokúszójának sebzésén alapuló gyulladáshoz vezetett el alkalmazása során több xenobiotikum – pl. egy növényvédő szer keverék, a famoxadon-cimoxanil (Cheng et al., 2020), illetve az egyes kozmetikumokban is előforduló ezüst nanorészecskék (Chen et al., 2021) – hatására is megmutatkozott a neutrofil granulociták mozgósításának/vándorlásának megváltozása. Ide vonatkozó eredményeimet összefoglalva a szubletális, embrionális AFB1-expozíció pro-inflammatorikus és immunmoduláns hatásokat eredményezett a 120 órás zebra-dánió lárvákban.

A fejlődő embriók szik-bélrendszerének jelentős mértékű érintettsége volt megfigyelhető az AFB1 által indukált gyulladáshoz. Az embriók szikrendszere metabolikusan aktív és különböző transzport-folyamatokat felvonultató terület (Fraher et al., 2016). Park és mtsai. (2020) szignifikánsan nagyobb szik-átmérőket detektáltak az AFB1 kezelt zebra-dánió embriók esetén a kontrollhoz viszonyítva. Eredményeim emellett a szikben tárolt lipidek anyagcseréjében és transzportjában részt vevő géncsoportok gátolt mRNS szintű kifejeződését mutatták ki. Mindez felveti az embrionális tartalék táplálóanyagok felhasználásának/mobilizálásának sérülését. Ahogy az várható volt, a 120 órás lárvák lipid festése visszaigazolta az addigi eredményeket, a szik-bélrendszer területén lévő lipidek mennyisége koncentráció-függő növekedést (vagyis csökkent mértékű mobilizációt) mutatott a kezelés hatására. Eddig csak kevés kutatás jelent meg a szakirodalomban, amely az embrionális AFB1-expozíció lipid anyagcserére gyakorolt hatásait vizsgálta, ugyanakkor felnőtt patkányok vér- illetve májmintáinak analízise során beszámoltak a lipid metabolizmus AFB1 általi megzavarásáról

(Rotimi et al., 2017; Ugbaja et al., 2020). Az esetünkben megfigyelt, szik-bélrendszer területére vonatkozó emelkedett lipid-tartalom és gyulladás ok-okozati összefüggéséről további, részletesebb feltáró munka alapján vonhatunk le következtetéseket.

Több kutatómunka is beszámolt az AFB1 kezelést követő emésztőrendszeri elváltozásokról patkány, egér, illetve brojler csirke esetén. Az embrionális AFB1-kitettség bélrendszerre gyakorolt hatásairól és annak hátteréről azonban még viszonylag kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Vizsgálataim az embrionális/lárvális emésztőrendszer AFB1 általi károsodását mutatták ki, amely az emésztőrendszer morfogenezisében kulcsszerepet játszó gének kifejeződésének erőteljes gátlásában, a bélrendszer alulfejlettségében és funkcionális zavarában nyilvánultak meg. Mindez a szik-bélrendszer területén történő fokozott neutrofil-granulocita felhalmozódással és nitrogén-monoxid produkcióval járt együtt. Az embrionális emésztőrendszer AFB1 által indukált elváltozásai és az ahhoz asszociálódó gyulladásos folyamatok ok-okozati összefüggései és az azok hátterében álló mechanizmusok azonban további, részletesebb feltérképezésre szorulnak.

Az embrionális AFB1-expozíció biológiai következményei még nem teljesen ismertek. Az eddigi, *in vitro* tesztek és különböző modellszervezeteken végzett vizsgálatok, illetve a humán felmérések eredményei alapján feltételezhető, hogy a születés-, csecsemő-, illetve gyermekkori fejlődésbéli és immunológiai problémák kialakulásához jelentős mértékben hozzájárulhat az AFB1 pro-inflammatorikus, immunmoduláns, gasztrointesztinális rendszert károsító, valamint a szénhidrát, lipid és aminosav anyagcserét befolyásoló képessége (Smith et al., 2017). Vizsgálataimban az LC10 és az alatti AFB1 koncentrációk direkt embrionális hatásainak viszonylag átfogóbb feltérképezését végeztem el, amelyhez többek között a preklinikai gyógyszer-tesztelésben és humán betegség modellezésben is elterjedt modellszervezetet, a zebraadániót alkalmaztam. Eredményeim egymást kiegészítő morfológiai, transzkriptomikai, immunológiai, toxikológiai vizsgálatai alapvetően egymással összhangban lévő eredményeket szolgáltatottak. Összességében elmondható, hogy a szubletális, embrionális AFB1-expozíció során a veleszületett immunrendszer, az energiaszerzésre irányuló biológiai folyamatok, valamint az gasztrointesztinális rendszer kiemelt érintettsége mutatkozott meg. Mindez jelentős mértékben meghatározhatja a fejlődő utód későbbi életkimenetelét. Az akut gyulladásos folyamatokban, a gasztrointesztinális rendszer fejlődésében, és számos energiaszerző metabolikus útvonalban kulcsszerepet játszó gének és azok kifejeződésének szabályozása nagyfokú hasonlóságot mutat a zebraadánió

és az emlősök között (Flynn III et al., 2009; Forn-Cuní et al., 2017; Marza et al., 2005; Miyares et al., 2014; Quinlivan & Farber, 2017; Wallace & Pack, 2003). Az eredmények magasabb rendű gerincesek irányába történő extrapolálásakor ugyanakkor tekintetbe kell venni, hogy a zebraadánió embrió modell egy placentát nélkülöző, közvetett anyai hatásoktól mentes rendszert képvisel.

Javaslatok

Doktori munkám eredményei alapján az alábbi vizsgálatok javasolhatók a jövőben:

1. Immunmoduláns hatás további feltérképezése
 - a. makrofág-specifikus transzgenikus zebraadánió vonal bevonása
2. Szöveti regenerációra gyakorolt hatások vizsgálata
 - a. farokúszó-regenerációs modell
3. A bélcsatorna elváltozásainak és potenciális gyulladásának szövettani értékelése
4. Az embrionális kitettség hosszú távú következményeinek feltérképezése
 - a. juvenilis és felnőtt kori túlélés
 - b. felnőtt kori immunkompetencia
 - c. transzgenerációs hatások, epigenomban bekövetkező változások
5. Az általam alkalmazott vizsgálati-végpontok felhasználása olyan vegyületek teszteléséhez, amelyek alkalmasak lehetnek az AFB1 által okozott toxicitás mérséklésére.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

6.1. Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Ivanovics, B., Gazsi, G., Reining, M., Berta, I., Poliska, S., Toth, M., ... & Czimmerer, Z. (2021). Embryonic exposure to low concentrations of aflatoxin B1 triggers global transcriptomic changes, defective yolk lipid mobilization, abnormal gastrointestinal tract development and inflammation in zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125788. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125788>

Gazsi, G., Czimmerer, Z., **Ivánovics, B.**, Berta, I. R., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., & Ács, A. (2021). Physiological, developmental, and biomarker responses of zebrafish embryos to sub-lethal exposure of bendiocarb. *Water*, 13(2), 204. <https://doi.org/10.3390/w13020204>

Ács, A., Liang, X., Bock, I., Griffiths, J., **Ivánovics, B.**, Vásárhelyi, E., ... & Csenki, Z. (2022). Chronic Effects of Carbamazepine, Progesterone and Their Mixtures at Environmentally Relevant Concentrations on Biochemical Markers of Zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants*, 11(9), 1776. <https://doi.org/10.3390/antiox11091776>

Liang, X., Csenki, Z., **Ivánovics, B.**, Bock, I., Csorbai, B., Molnár, J., ... & Ács, A. (2022). Biochemical Marker Assessment of Chronic Carbamazepine Exposure at Environmentally Relevant Concentrations in Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Antioxidants*, 11(6), 1136. <https://doi.org/10.3390/antiox11061136>

6.2. Hazai folyóiratban megjelent közlemények

Ivánovics, B. (2017). A mikotoxinok, mint halegészségügyi kockázati tényezők. *HALÁSZAT - TUDOMÁNY* 3:2, pp. 3-7., ISSN 0133-1922

6.3. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

6.3.1. Előadás

Ivánovics, B., Gazsi, Gy., Póliska, S., Tóth, M., Csenki-Bakos, Z., Berta, I., Reining, M., Ács, A., Domokos, A., Bacsí, A. ... & Czimmerer, Z. (2022). Characterization of non-lethal aflatoxin B1 exposure-induced inflammation and immune modulation in zebrafish embryos In: Tóthová, M., Lidiková, J., Candráková, K., Hollý, D., Mihaľ, M. (Eds.). Scientific Conference of PhD Students of FAFR, FBFS and FHLE SUA in Nitra with international participation, Nitra, p. 49.

6.3.2. Poszter

Ivánovics, B., Gazsi, Gy., Csenki-Bakos, Z., Berta, I., Reining, M., Ács, A., Urbányi, B., Czimmerer, Z. (2020). Effects of embryonic exposure to non-lethal concentrations of aflatoxin B1 on zebrafish immune system In: 11th European Zebrafish Meeting. Program and abstract book. pp. 193-193.

Ivánovics, B., Csenki-Bakos, Z., Urbányi, B., Czimmerer, Z. (2020). Immunomodulatory effects of embryonic exposure to β -glucan in zebrafish embryos and larvae In: Csiszár, B., Hankó, Cs., Kajos, L.F., Kovács, O.B., Mező, E., Szabó, R., Szabó-Guth, K. (Eds.) 9th Interdisciplinary Doctoral Conference 2020 Book of abstracts, Magyarország, Pécs, p. 35

6.4. Hazai konferencia kiadványban megjelent közlemények

6.4.1. Előadás

Ivánovics, B., Gazsi, Gy., Ács, A., Csenki-Bakos, Zs., Reining, M., Sulyok, Z., Urbányi, B., Czimmerer, Zs. (2017). Xenobiotikumok gyulladásoos folyamatokra gyakorolt hatásainak vizsgálati lehetőségei zebradánió (*Danio rerio*) modellrendszeren In: Darvas, Béla; Bakonyi, Gábor; Székács, András; Szoboszlai, Sándor (szerk.) VII. Ökotoxikológiai konferencia Budapest, Magyarország, Magyar Ökotoxikológiai Társaság pp. 18-19.

Ivánovics, B., Gazsi, Gy., Reining, M., Ács, A., Csenki-Bakos, Zs., Berta, I., Urbányi, B., Czimmerer, Z. (2019). Embrionális aflatoxin B1-expozíció

gyulladásos folyamatokra gyakorolt hatásainak vizsgálata zebradánió In: Magyar, Toxikológusok Társasága (szerk.) TOX'2019 Tudományos Konferencia, Program, kivonatok 132 p. Paper: C2-5

Ivánovics, B; Gazsi, Gy., Póliska, S., Tóth, M., Staszny, Á., Ács, A., Kovács, R., Baska, F., Domokos, A., Varga, Zsófia ... & Czimmerer, Zs. (2022). Egy inszekticid karbamát, a bendiokarb embrionális hatásainak vizsgálata zebradánió In: TOX'2022 Tudományos Konferencia, Zalakaros, Magyarország, Magyar Toxikológusok Társasága, pp. 64-65.

6.4.2. Poszter

Garai, E., Gazsi, Gy., Kövesi, J., Balogh, E., Reining, M., Ráth, S., **Ivánovics, B.**, Kovács, R., Bálint, B., Ferincz, Árpád et al. (2016). Aflatoxin B1 és mikrobiális bomlástermékeinek vizsgálata zebradánió (*Danio rerio*) embrión mikroinjektálással In: Lehel, J. (szerk.) TOX'2016 Tudományos konferencia, Budapest, Magyarország, p. 70

Ivánovics, B., Gazsi, Gy., Ács, A., Csenki-Bakos, Z., Reining, M., Urbányi, B., Czimmerer, Zs. (2018). Szubletális, embrionális aflatoxin B1-expozíció hatása a zebradánió lárvális táplálékfelvételére és juvenilis túlélésére. In: Darvas, Béla (szerk.) VIII. Ökotoxikológiai Konferencia, Magyarország, Magyar Ökotoxikológiai Társaság, p. 14

Garai, E., Gazsi, Gy., Balogh, E., Reining, M., Kerekes, F., **Ivánovics, B.**, Urbányi, B., Risa, A., Cserhádi, M., Csenki, Zs. (2017). Ochratoxin A és mikrobiális bomlástermékeinek vizsgálata zebradánió (*Danio rerio*) embrión mikroinjektálással, In: Tox'2017 Tudományos Konferencia, p. 32

Bencsik, D., Czimmerer, Zs., **Ivánovics, B.**, Gazsi, Gy., Kovács, R., Bakos, K., Urbányi, B., Csenki, Zs (2017). Egy víztisztítási melléktermék vegyület, a 4-etilbenzaldehyd genotoxikus hatásainak vizsgálata zebradánió (*Danio rerio*) halfajon In: Tox'2017 Tudományos Konferencia, p. 36.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

7.1. Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Gazsi, G., **Ivánovics, B.**, Berta, I., Szabó, T., Daniel, Z., Kucska, B., ... & Müller, T. (2021). Artificial sperm insemination in externally fertilised fish as a novel tool for ex situ and in situ conservation of valuable populations. *Endangered Species Research*, 45, 169-179.

Gazsi, G., Butts, I. A., Zadmajid, V., **Ivánovics, B.**, Ruffilli, L., Urbányi, B., ... & Müller, T. (2021). Ovarian inseminated sperm impacts spawning success in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) even in the absence of a male stimulus. *Theriogenology*, 172, 315-321.

7.2. Hazai folyóiratban megjelent közlemények

Fodor, F., Bodnár, Á., Koltai, T., Müller, T., Juhász, V., Staszny, Á., Weiperth, A., Bokor, Z., Bernáth, G., Várkonyi, L. et al. (2021). A garda (*Pelecus cultratus* L., 1758) első sikeres szaporítása és lárwanevelése Magyarországon *HALÁSZAT*, 114:2, pp. 78-82.

Müller, T., Bogó, B., Ferincz, Á., Horváth, J., Staszny, Á., Weiperth, A., **Ivánovics, B.**, Lente, V., Specziár, A., Urbányi, B. (2022). A kivétel erősíti a szabályt? Hévízi törpenövésű vadponty egyedi ivarérese és ívása *HALÁSZATFEJLESZTÉS*, 39, pp. 105-106.

Bogó, B., Ferincz, Á., Horváth, J., Staszny, Á., Tóth, A., **Ivánovics, B.**, Specziár, A., Weiperth, A., Lente, V., Müller, T. (2022). Természetes pontyívás minden évben...télen *HALÁSZAT*, 115:1, pp. 22-22.

7.3. Hazai könyvfejezet

Müller, T., Braun, Á., Hegyi Á., **Ivánovics B.**, Zarski, D., Makk J., Varjú-Katona M., Ács É. (2022). A sügér szaporodásbiológiai sajátosságai. In: Bokor, Z., Csorbai, B., Urbányi, B. (szerk.) *A sügér biológiája és tenyésztése Gödöllő, Magyarország, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet*, pp. 81-90.

7.4. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

Gazsi, Gy., **Ivánovics**, B., Berta, I., Szabó, T., Zarski, D., Urbányi, B., Horváth, L., Kucska, B., Müller, F., Müller, T. (2019). A novel fish induced spawning method for ex situ and in situ conservation of population by using sperm injection into ovary In: Pintér, G., Csányi, Sz., Zsiborács, H. (Eds.) Innovation Challenges in the 21st Century. LXI. Georgikon Napok International Scientific Conference, Abstract volume, Keszthely, Magyarország, Pannon Egyetem Georgikon Kar, p. 35

Bernáth, G., Láng, L., Várkonyi, L., Fodor, F., Nagy, B., Bodnár, Á., Koltai, T., Csókás, E., Molnár, J., Csorbai, B. et al. (2022). The growth performance of pond reared larvae propagated using cryopreserved sperm in common carp (*Cyprinus carpio*) In: Ciereszko, A., Żarski, D. 8th International Workshop on the Biology of Fish Gametes Book of Abstracts, Gdansk, Poland, pp. 36-36.

7.5. Hazai konferencia kiadványban megjelent közlemények

Gazsi, Gy., Berta, I., **Ivánovics**, B., Luca, R., Szabó, T., Urbányi, B., Horváth, L., Müller, T. (2018). Külső megtermékenyítésű zebra-dánió (*Danio rerio*) ívatása tejes jelenléte nélkül. XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, p. 44

Gazsi, Gy., Berta, I., **Ivánovics**, B., Szabó, T., Urbányi, B., Horváth, L., Kucska, B., Müller, F., Müller, T. (2018). Tamás Genetikai sokszínűség növelésének lehetősége (indukált) ívatásos szaporítási módszer esetén. XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, 67 p.

IRODALOMJEGYZÉK

- Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M., Bolognesi, A., 2016. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.
- Battilani, P., Leggieri, C.M., 2015. Predictive modelling of aflatoxin contamination to support maize chain management. *World Mycotoxin J.* 8, 161–170.
- Battilani, P., Toscano, P., Van Der Fels-Klerx, H.J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T., 2016. Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci. Rep.* 6, 1–7.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093.
- Chen, R.J., Huang, C.C., Pranata, R., Lee, Y.H., Chen, Y.Y., Wu, Y.H., Wang, Y.J., 2021. Modulation of innate immune toxicity by silver nanoparticle exposure and the preventive effects of pterostilbene. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–19.
- Cheng, B., Zhang, H., Hu, J., Peng, Y., Yang, J., Liao, X., Liu, F., Guo, J., Hu, C., Lu, H., 2020. The immunotoxicity and neurobehavioral toxicity of zebrafish induced by famoxadone-cymoxanil. *Chemosphere* 247, 125870.
- Dey, D.K., Kang, S.C., 2020. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-dependent caspase-mediated apoptosis in normal human cells, inhibits *Allium cepa* root cell division, and triggers inflammatory response in zebrafish larvae. *Sci. Total Environ.* 737, 139704.
- Filazi, A., Tansel, U., 2013. Occurrence of Aflatoxins in Food, in: Razzaghi-Abyaneh, M. (Ed.), *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. InTech, pp. 143–170.
- Flynn III, E.J., Trent, C.M., Rawls, J.F., 2009. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Lipid Res.* 50, 1641–1652.
- Forn-Cuní, G., Varela, M., Pereiro, P., Novoa, B., Figueras, A., 2017. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N.A., Meikle, P.J., Sinclair, A.J., Gibert, Y., 2016. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Rep.* 14, 1317–1329.
- Goldstein, J.M., Hale, T., Foster, S.L., Tobet, S.A., 2020. Sex differences in major depression and comorbidity of cardiometabolic disorders : impact of prenatal stress and immune exposures. *Neuropsychopharmacology* 44, 59–70.
- Holladay, S.D., 1999. Prenatal immunotoxicant exposure and postnatal autoimmune disease. *Environ. Health Perspect.* 107, 687–691.
- Holladay, S.D., Smialowicz, R.J., 2000. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ. Health Perspect.* 108, 463–473.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., & Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
- Landreth, K.S., 2002. Critical windows in development of the rodent immune system. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 493–498. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht287oa>

- Lauer, J.M., Duggan, C.P., Ausman, L.M., Griffiths, J.K., Webb, P., Wang, J.S., Xue, K.S., Agaba, E., Nshakira, N., Ghosh, S., 2019. Maternal aflatoxin exposure during pregnancy and adverse birth outcomes in Uganda. *Matern. Child Nutr.* 15, e12701.
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367.
- Marroquín-Cardona, A.G., Johnson, N.M., Phillips, T.D., Hayes, A.W., 2014. Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food Chem. Toxicol.* 69, 220–230.
- Marza, E., Barthe, C., Andre, M., Villeneuve, L., Helou, C., Babin, P.J., 2005. Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 232, 506–518.
- Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C., Wu, F., 2016. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Addit. Contam. Part A* 33, 540–550.
- Miyares, R.L., De Rezende, V.B., Farber, S.A., 2014. Zebrafish yolk lipid processing: A tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *DMM Dis. Model. Mech.* 7, 915–927.
- Ngoka, L.C.M., 2008. Dramatic down-regulation of oxidoreductases in human hepatocellular carcinoma hepG2 cells: Proteomics and gene ontology unveiling new frontiers in cancer enzymology. *Proteome Sci.* 6, 1–21.
- Park, S., Lee, J.Y., You, S., Song, G., Lim, W., 2020. Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes in vitro and on glial cell development in zebrafish in vivo, *Journal of Hazardous Materials.* Elsevier B.V.
- Partanen, H.A., El-Nezami, H.S., Leppänen, J.M., Myllynen, P.K., Woodhouse, H.J., Vähäkangas, K.H., 2010. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. *Toxicol. Sci.* 113, 216–225.
- Quinlivan, V.H., Farber, S.A., 2017. Lipid uptake, metabolism, and transport in the larval zebrafish. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 8, 319.
- Rotimi, O.A., Rotimi, S.O., Duru, C.U., Ebebeinwe, O.J., Abiodun, A.O., Oyeniyi, B.O., Faduyile, F.A., 2017. Acute aflatoxin B1 – Induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats. *Toxicol. Reports* 4, 408–414.
- Rychlik, K.A., Sillé, F.C.M., 2019. Environmental exposures during pregnancy: Mechanistic effects on immunity. *Birth defects Res.* 111, 178–196.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394–404.
- Shuaib, F.M.B., Jolly, P.E., Ehiri, J.E., Yatich, N., Jiang, Y., Funkhouser, E., Person, S.D., Wilson, C., Ellis, W.O., Wang, J.S., Williams, J.H., 2010. Association between birth outcomes and aflatoxin B1 biomarker blood levels in pregnant women in Kumasi, Ghana. *Trop. Med. Int. Heal.* 15, 160–167.
- Smith, L.E., Prendergast, A.J., Turner, P.C., Humphrey, J.H., Stoltzfus, R.J., 2017. Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 770–776.
- Ugbaja, R.N., Okedairo, O.M., Oloyede, A.R., Ugwor, E.I., Akinloye, D.I., Ojo, O.P., Ademuyiwa, O., 2020. Probiotics consortium synergistically ameliorates aflatoxin B1-induced disruptions in lipid metabolism of female albino rats. *Toxicon* 186, 109–119.
- Wallace, K.N., Pack, M., 2003. Unique and conserved aspects of gut development in

- zebrafish. *Dev. Biol.* 255, 12–29. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00034-9)
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A.K., Telang, A.G., 2005. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 43, 607–615.
- Wu, T.S., Cheng, Y.C., Chen, P.J., Huang, Y.T., Yu, F.Y., Liu, B.H., 2019. Exposure to aflatoxin B1 interferes with locomotion and neural development in zebrafish embryos and larvae. *Chemosphere* 217, 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.058>
- Zhang, X., Sliwowska, J.H., Weinberg, J., 2005. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp. Biol. Med.* 230, 376–388.
- Zhou, H., George, S., Li, C., Gurusamy, S., Sun, X., Gong, Z., Qian, H., 2017. Combined toxicity of prevalent mycotoxins studied in fish cell line and zebrafish larvae revealed that type of interactions is dose-dependent. *Aquat. Toxicol.* 193, 60–71.
- Zuberi, Z., Eeza, M.N.H., Matysik, J., Berry, J.P., Alia, A., 2019. NMR-based metabolic profiles of intact zebrafish embryos exposed to aflatoxin b1 recapitulates hepatotoxicity and supports possible neurotoxicity. *Toxins (Basel)*. 11, 258.