



**A *BENDIOCARB* EXPOZÍCIÓ KOMPLEX HATÁSVIZSGÁLATA A ZEBRADÁNIÓ
(*DANIO RERIO*) KORAI ÉLETSZAKASZÁBAN, SZUBLETÁLIS KONCENTRÁCIÓKON**

DOI: 10.54598/004640

Doktori értekezés

Gazsi Gyöngyi

GÖDÖLLŐ, 2024.

A doktori iskola megnevezése: Állatbiotechnológiai és állattudományi doktori iskola

Tudományága: mezőgazdaság-tudomány

Vezetője:

Dr. Mézes Miklós

Egyetemi tanár, MTA rendes tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani
Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezető:

Dr. Csenki-Bakos Zsolt

Tudományos főmunkatárs

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Környezettoxikológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés és célkitűzések	8
2. Irodalmi Áttekintés	10
2.1 A növényvédőszer	10
2.1.1 A növényvédőszer csoportosítása	11
2.1.2 A különböző növényvédőszer a környezetben	12
2.1.2.1 A különböző növényvédőszer hatása a vizekre	14
2.2 Rovarölő szer	14
2.2.1 Inszekticid karbamátok	16
2.2.2 Inszekticid karbamátok hatása zebradánió lárvákra	18
2.2.3 <i>Bendiocarb</i>	20
2.3 Halmodellek a toxikológiában/ökotoxikológiába	24
2.3.1 Zebradánió a toxikológiában/ökotoxikológiába	25
2.3.2 Zebradánió végezhető akut kitettség vizsgálatok	26
2.3.3 Zebradánió végezhető krónikus kitettség vizsgálatok	27
2.3.4 A zebradánió korai életciklusában végezhető vizsgálatok	28
2.3.4.1 A zebradánió korai életciklusában végezhető kardiotoxicitási vizsgálatok	28
2.3.4.2 A zebradánió korai életciklusában végezhető viselkedés vizsgálatok	29
2.3.4.3 A zebradánió korai életciklusában végezhető enzimaktivitási vizsgálatok	30
2.3.4.4 A zebradánió korai életciklusában végezhető genotoxicitás vizsgálatok	30
2.3.4.5 A zebradánió korai életciklusában végezhető regenerációs vizsgálatok	31
3. Anyag és Módszer	33
3.1 A kísérletek helyszíne, az állatok tartása	33
3.2 Bioetikai állásfoglalás	33
3.3 A kísérletek során felhasznált zebradánió vonalak jellemzése	33
3.4 Felhasznált anyagok	34
3.5 Akut embrió tesztek	34
3.6 A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció káros hatásainak feltérképezésére irányuló embrionális vizsgálatok	35
3.6.1 Morfológiai vizsgálatok	35
3.6.2 Pulzusszám mérés	36
3.6.3 Enzimaktivitás vizsgálatok zebradánió embriókon	36
3.6.3.1 Szövet-előkészítés és biokémiai marker mérések	36
3.6.3.2 Lipid-peroxidáció mérése	36
3.6.3.3 AChE aktivitásmérés	37
3.6.3.4 CAT aktivitásmérés	37
3.6.3.5 GST aktivitásmérés	37

3.6.3.6	Glutation-peroxidáz aktivitásmérés.....	38
3.6.3.7	SOD aktivitásmérés.....	38
3.6.4	Viselkedés vizsgálatok.....	38
3.6.5	RNS szekvenálás és transzkriptom analízis.....	39
3.6.6	Génexpressziós szintek meghatározása.....	39
3.6.7	Szövettani vizsgálat.....	41
3.6.8	Nitrogén-monoxid termelődés mérése, <i>in vivo</i>	41
3.6.9	A neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás meghatározása.....	41
3.6.10	Farokúszó sebzésén alapuló elváltozások.....	42
3.7	Statisztikai értékelés.....	42
4.	Eredmények.....	44
4.1	A halembrió toxicitás teszt eredményei.....	44
4.2	A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció káros hatásainak feltérképezésére irányuló embriónális vizsgálatok eredményei.....	45
4.2.1	A morfológiai vizsgálatok eredményei.....	45
4.2.2	Az acetilkolin-észteráz aktivitás és a pulzusszám értékelése.....	46
4.2.3	Az enzimaktivitás meghatározása zebradánió lárvákban.....	48
4.2.4	A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció a lárvák viselkedésére gyakorolt hatásai.....	51
4.2.5	A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció lárvák teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai.....	55
4.2.6	A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció lárvák vizuális érzékelésére gyakorolt hatásai.....	57
4.2.7	A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció lárvák izom szövetére gyakorolt hatásai.....	59
4.2.8	A szubletális <i>bendiocarb</i> expozíció a lárvák immunrendszerével kapcsolatos hatásai.....	61
5.	Következtetések és javaslatok.....	66
6.	Javaslatok.....	74
7.	Új tudományos eredmények.....	75
8.	Összefoglalás.....	76
9.	Summary.....	78
10.	Mellékletek.....	80
11.	Irodalomjegyzék.....	82
12.	Köszönetnyilvánítás.....	101

Jelölések, rövidítések jegyzéke

3R	Az állatkísérletek kiváltására, a felhasznált állatok számának csökkentésére és az állati szenvedés minimalizálására (Replacement-az állatmodellek helyettesítése, Reduction-a kísérleti állatok számának csökkentése, Refinement-az állati szenvedés minimalizálása) irányuló stratégia
AB	Vad típusú, rövidúszójú zebraadánió vonal
ACh	Acetilkinolin
AChE	Acetilkinolin-észteráz
ASTM	Amerikai Anyagvizsgáló Társaság (American Society for Testing and Materials)
<i>Bax</i>	BCL2 asszociált X, apoptózis szabályozó
<i>Bcl2</i>	BCL2 apoptózis szabályozó
BPCA	Egyesült Királyság Kártevőirtó Szövetsége (British Pest Control Association)
CAS szám	„Chemical Abstracts Service” regisztrációs szám
caspase3	Caspase family protein
caspase9	Caspase family protein
CAT	Kataláz enzim
<i>cxcl18b</i>	Kemokin (C-X-C motívum) ligand 18b
<i>cxcl8b.1</i>	Kemokin (C-X-C motívum) ligand 8b1
DAF-FM-DA	Diaminofluorescein-FM-diacetát
DDT	Diklór-difenil-triklóretánt, klórfonetán
DEG	Diffenciáltan expresszált gén (differentially expressed genes)
<i>desma</i>	Dezmin
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav (Deoxyribonucleic acid)
dpf	A hal embriók korának meghatározására szolgáló mértékegység, amely az ikra termékenyülésétől eltelt napokat adja meg (day post fertilization)
DTT	Ditiotreitol
EC _x	Az a koncentráció, ami a vizsgált populáció x%-nál vált ki hatást
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGFP	Enhanced green fluorescent protein- módosított GFP változat
elavl3	ELAV-szerű neuron-specifikus RNS-kötő fehérje 3

EPA	Az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency)
FACS	Fuorescence Activated Cell Sorting
FAO	Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FET	Halembrió toxicitás teszt (Fish Embryo Toxicity Test)
<i>fn1b</i>	Fibronectin 1b
<i>foxo3a</i>	Forkhead box O3A
gfap	Glia fibrilláris savas fehérje
GFP	Zöld fluoreszcens protein (green fluorescent protein)
<i>gh</i>	Növekedési hormon
GPx	Glutation-peroxidáz
GST	Glutation-S-transzferáz
hpf	Az ikra megtermékenyítését követő órák száma (hours post fertilization)
<i>hspb11</i>	Hő sokk fehérje, alfa-kristályhoz kapcsolódó, b11
<i>IL-6</i>	Interleukin-6 receptor ligand
<i>IL-8</i>	Interleukin-8 receptor activity
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization)
LCx/LDx	Az egyedek x%-ának pusztulását okozó koncentráció vagy dózis
LOEC	Az a legkisebb koncentráció, amelynek hatása már megfigyelhető. (Lowest Observed Effect Concentration)
LPO	lipidperoxidáció
mAChR	Muszkarinos acetilkolin receptor
MDA	Malonaldehid
MS222	Trikain-metánszulfonát
<i>myh6</i>	Miozin, nehéz lánc 6, szívizom, alfa
<i>myoD</i>	Miogén differenciálódás
nAChR	Nikotinos acetilkolin receptor
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
<i>nkx2.4b</i>	NK2 homeobox 4b
NOEC	Az a legnagyobb koncentráció, amelynek nincs megfigyelhető hatása (No Observed Effect Concentration)
NOS	Nitrogén-monoxid-szintáz

OECD	Európai Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development)
<i>opn1mw2</i>	Közepes hullám érzékelés 2
PBS	Foszfát pufferes sóoldat
<i>pck1</i>	Foszfoenolpiruvát karboxikináz 1 (oldható)
<i>pdlim3b</i>	PDZ and LIM domain 3b
RASFF	Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Riasztási Rendszer (Rapid Alert System for Food and Feed)
REACH	Az Európai Unió anyagok regisztrációjára, vizsgálatára, engedélyezésére és korlátozására (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) vonatkozó irányelve
<i>rho</i>	Rodopszin
RNS	Ribonukleinsav (Ribonucleic acid)
ROS	reaktív oxigén intermedierek (Reactive <i>Oxygen</i> Species)
<i>sny2a</i>	Idegrendszeri fejlődéssel kapcsolatos gén
SOD	Szuperoxid-diszmutáz
<i>sox19b</i>	SRY-box transzkripció faktor 19b
<i>TNFα</i>	Tumornekrózis faktor a (TNF superfamily, member 2)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
<i>xirp1</i>	Xin actin binding repeat containing 1
ZFIN	Zebrafish Information Network

1. Bevezetés és célkitűzések

A különböző növényvédő szerek (peszticid) használata ma már a mindennapjaink részévé vált. Ezek a vegyületek fontos szerepet játszanak a mezőgazdaságban, a hozam növelése és az élelmiszer-előállítás költségeinek csökkentésében. Segítik az intenzív gazdálkodást, támogatják a védekezést a különböző kártevőkkel, kórokozókkal és gyomnövényekkel szemben. A peszticidek felhasználásában további növekedés várható, részben az emberi populáció globális növekedése, részben az éghajlatváltozásból adódó fertőző ágensek megjelenése, terjedése miatt. A megnövekedett alkalmazással párhuzamosan pedig folyamatosan növekszik a környezetbe kerülő vegyületek mennyisége is.

A peszticidek globális használata kockázatot jelent a környezetre. Felhalmozódhatnak a növényekben és bekerülhetnek a táplálékláncba. A kijuttatás helyétől távolabbi területeken jelenhetnek meg növényvédőszer-maradékként. A légi kijuttatás során szinte lehetetlen a hatáskörük korlátozása, hiszen szétterülnek a levegőben, felszívódnak a talajban, vagy bejutnak a különböző víztestekbe. Ezenkívül a beltéri (otthoni, irodai, közintézményi) kártevőirtás közvetlen emberi növényvédőszer-expozícióhoz vezethet. Alkalmazásukból adódóan többféle élelmiszerben jelenhetnek szermaradványként. Az Európai Unió Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Riasztási Rendszerében (RASFF) a harmadik leggyakrabban jelentett szennyező és napjainkra az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a peszticid mérgezéseket jelentős közegészségügyi és környezetegészségügyi problémaként azonosította. Pontosán ezért elengedhetetlen a vizsgálatuk, hogy megismerjük biológiai hatásukat.

Világviszonylatban napjainkban is több mint 2 millió tonna növényvédőszer kerül felhasználásra, amelynek 29,5%-a rovarirtó szer. A rovarölő szereknek mechanizmustól függően több alcsoportja létezik és felhasználásukat tekintve népszerűek a neonikotinoidok, a szerves foszforsav-észterek, a karbamátok és a piretroidok. Hatásuk többnyire a célszervezetekre korlátozódnak, azonban hasonlóan a többi növényvédőszer csoporthoz jelentős terhelést jelentenek a környezet számára.

A rovarirtók csoportjába tartozó inszekticid karbamátok fejlesztése és használata az 1950-es években kezdődött. Szerkezetileg hasonlóak a szerves foszforsav-észterekhez, azonban alacsonyabb toxicitással rendelkeznek, így egyre népszerűbb alternatívát kínálnak a felhasználók számára. Rovarölő hatásuk mellett egy-egy képviselőjük a klinikai gyakorlatban is megtalálható. Hatásukat tekintve az idegmérgek (kolinészteráz-gátlók) csoportjába tartoznak.

A *bendiocarb* a karbamátok csoportjába tartozó széles spektrumú rovarölő. Napjainkban is egyike a WHO által ajánlott anyagnak, amely hatásosan felhasználható az *IRS - Indoor Residual Spraying* (beltéri permetezés) technika során elősegítve a szúnyogok számának kontrollálását, a

malária terjedésének csökkenését. Ennek ellenére nagyon korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre a *bendiocarb* expozíció okozta biológiai hatásokról. Elterjedt alkalmazása miatt, világszerte kimutathatóvá vált különféle vizekben és az otthoni felhasználásból adódóan humán mintákból is. Az emberi szervezetbe felszívódva átjut a placentán és megjelenhet a születendő csecsemőkben. Az embrionális fejlődés időszakában történő *bendiocarb* kitettség, hasonlóan más xenobiotikumokhoz jelentős következményekkel járhat az élő szervezetre, mind a morbiditás mind a halálozás tekintetében. Ennek következtében szükségessé vált a részletesebb feltáró munkák elvégzése, amelyek segítségével átfogóbb képet kaphatunk az embrionális *bendiocarb* kitettség biológiai következményeiről.

Az akvarisztikából is jól ismert zebraadánió (*Danio rerio*) az egyik legelterjedtebb gerinces modellszervezet számos tudományterületen (pl. élettan, fejlődésbiológia, genetika, etológia, toxikológia, farmakológia). Népszerűségének oka, hogy a különböző vizsgálatok számára megfelelő tulajdonságokkal rendelkezik, alacsony tartási költségek mellett. Élettani folyamatai nagyfokú hasonlóságokat mutatnak az emlősökkel, beleértve az embert is. A zebraadánióról rendelkező háttértudás lehetőséget biztosít egy komplex modellrendszer kialakításához, ezáltal részletes és extrapolálható információk nyerhetők a különböző környezetbe kerülő szennyező anyagok hatásáról.

Vizsgálataim központjában az embrionális fejlődés időszakában bekövetkező *bendiocarb* expozíció hatásának feltérképezése volt, zebraadánió modellszervezet felhasználásával. Ennek során elsőként klasszikus akut toxikológiai kísérleteket végeztem. Szerettem volna meghatározni a vegyület LC_{50} értékét, valamint az embriókon/lárvákon megjelenő morfológiai elváltozásokat. Ezt követően a fajra adaptált, korai életciklusban végezhető vizsgálatok segítségével feltárni a *bendiocarb* hatását a zebraadánió embrionális fejlődésre. Vizsgálataim kiindulópontja az anyag fő hatásmechanizmusa, az acetilkolin-észteráz gátlás (AChE) volt, így a szubletális vizsgálatok elsődleges végpontjai között szerepelt a AChE-gátlással szoros összefüggésben álló:

- szív működés vizsgálata,
- az antioxidáns rendszerben szerepet játszó enzimek aktivitásának feltérképezése,
- az esetleges viselkedésben megjelenő eltérések feljegyzése,
- a teljes transzkriptom analízis elvégzése, amellyel szerettem volna feltárni, hogy melyek a *bendiocarb* expozíció által jelentősebb mértékben érintett biológiai útvonalak. A kapott eredmények alapján tovább vizsgáltam:
 - a lárvák vizuális észleléséhez,
 - az izomszövethez, izomrendszerhez,
 - az immunrendszerhez kapcsolódó folyamatokban bekövetkező elváltozásokat

2. Irodalmi Áttekintés

2.1 A növényvédőszer

Az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) a növényvédő szereket a következőképpen definiálja: olyan biológiai, kémiai anyagok, vagy anyagkeverékek melyekkel bármilyen kártevőnek minősített élő szervezet visszaszorítható, elriasztható, elpusztítható, vagy szabályozható. A kifejezés magába foglalja a gyomirtó, rovarirtó, puhatestűirtó, rágcsálóirtó szerek mellett a gombaölő, atkaölő, a talajban élő fajok ellen szolgáló feregölő készítményeket is (Bordás 2006., Akashe et al. 2018., Abubakar et al. 2020).

A különböző peszticidek használata segíti az intenzív gazdálkodást, előnyt jelentenek a különböző mezőgazdasági kártevők ellen, támogatják a védekezést a növényi, az állati és az emberi kórokozókkal szemben. Használatuk biztosítja a fokozott élelmiszertermelést, és az élelmiszerellátás biztonságát (1. táblázat, Cooper & Dobson 2007). Becslések szerint, a peszticidek használata nélkül, a termés egyharmada elveszne (Ismail et al. 2010), így napjainkra a világ népességének életszínvonalának fenntartása és javítása érdekében kiemelkedő szerephez jutottak. Világviszonylatban évente több mint 2 millió tonna növényvédőszer kerül felhasználásra, amelynek 47,5%-a gyomirtó szer, 29,5%-a rovarirtó szer, 17,5%-a gombaölő szer és 5,5%-a egyéb növényvédő szer (Lehel & Laczay 2011, De et al. 2014, Sharma et al. 2019, Syafrudin et al. 2021). A legnagyobb felhasználó országok közé sorolható Argentína, Brazília, az Egyesült Államok, az Egyesült Királyság, Franciaország, India, Japán, Kanada, Kína, Mexikó, Németország, Olaszország és Thaiföld. (Sharma et al. 2019, Zhang 2018). Feltételezések szerint pedig 2050-re a növényvédőszer termelés 2,7-szeresére fog növekedni, a 2000-es évekhez képest (Nieder et al. 2018).

Elsődleges előnyök

Kártevők és növénybetegségek vektorainak kontrollálása	Kártevők és állati megbetegedések vektorainak kontrollálása	Az egyéb emberi tevékenységeket és létesítményeket károsító szervezetek szabályozása
Jobb termés/haszonállat hozam	Emberi élet védelme	Közlekedésbiztonság
Jobb termés/haszonállat minőség	Humán megbetegedések csökkenése	Mesterséges zöld felületek védelem
Gombatoxinok mennyisége csökken	Állati élet védelme	Kerti kártevők elleni védelem
Javul a termékek eltarthatósága	Állatok megbetegedésének csökkenése	Épületek kártevők elleni védelme

Forgalmazáshoz kapcsolódó kereskedelmi hálózatok alapítása/ellátása	Állattenyésztés javuló hozama	Közterületek kártevők elleni védelme
Alacsonyabb munkaigény a gyomirtás során	Javul az állati termékek minősége	Műemlékek védelme
Csökkent üzemanyag felhasználás	Betegségek kontrollálása	Fa épületek/létesítmények védelme
Kisebb talajbolygatás		
Invazív fajok kontrollálása		
<i>Másodlagos előnyök</i>		
Közösségi szinten	Nemzeti szinten	Világszinten
Javul a mezőgazdasági vállalkozások bevétele	Vidéki lakosság elvándorlásának csökkentése	Biztonságos és változatos élelmiszerkínálat
Élelmiszerbiztonság javulása	Növekvő exportbevétel	Biodiverzitás megőrzése
Élelmiszerminőség javulása	Agronómiai tanácsadás javítja a növénytermesztést	Globális felmelegedés csökkentése
Jobb életminőség	Csökkent talajerózió	Globális betegségek terjedése alacsonyabb
Csökkenő munka terhelés egyes feladatkörökben	Csökkent migráció	Csökkenő üvegházhatású gáz termelés
Magasabb várható élettartam	Közlekedési balesetek csökkenése	Javuló faanyag ellátás
Egészségügyi költségek csökkenése	Javuló városi környezet	Lakóterületek növekedése
Csökkent stressz szint	Termelékenység növekedése	Nemzetközi turizmus
Egészségesebb lakosság		Csökkenti az élelmiszerellátás bizonytalanságát
Életképesebb növények		Csökkenti a mezőgazdasági termelésbe nem bevont területekre gyakorolt nyomást
Stressz csökkenése		
Fenntartási költségek csökkenése		

1. táblázat: A növényvédőszer előnyei (Cooper & Dobson 2007. és Rani et al. 2021. alapján)

2.1.1 A növényvédőszer csoportosítása

Jelenleg nincs egységes felosztása a különböző növényvédő szereknek. Csoportosításuk, besorolásuk történhet a kémiai szerkezet, a felhasználás módja, alkalmazás helye, a veszélyesség, környezeti kockázat, kereskedelmi, forgalmi, illetve a hatás- és hatásmechanizmus alapján történhet (Bordás 2006, Souza et al 2020).

Csoportosításuk egyik legelterjedtebb módja a hatásspektrum alapján történik. Ez a típusú csoportosítás azonban a célszervezet jellemzőitől is függ aszerint, hogy milyen mezőgazdasági

kártevőcsoport ellen használatos. A legtöbb esetben azonban a felhasználás több irányú is lehet. Hatásuk és felhasználási céljuk alapján az 2. táblázatban található módon oszthatóak fel a növényvédőszer (Bordás 2006, Souza et al 2020, Pirsahab & Moradi 2020, Garcês et al. 2020).

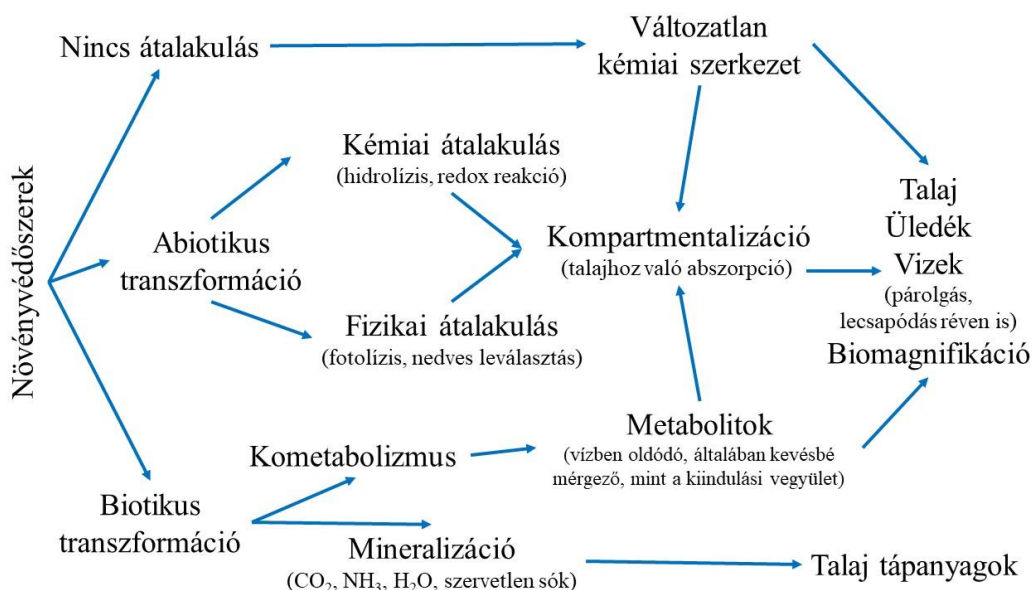
Aficid	levéltetű irtószer
Akaricid vagy miticid	atkaölő szer
Algicid	algák ellen alkalmazható szer
Atraktánsok	csalogató, vonzó szer – egyes esetekben a peterakást ösztönzi, vagy csalogatja az ellentétes nemű kártevőket
Avicid vagy Korvicid	madárirtó szer
Baktericid	baktériumok ellen használatos szer
Bakteriosztatikus peszticid	fertőtlenítő szer
Defoliánsok	lombtalanító szer
Deszikánsok	szárító szer
Fumigánsok	füstölő
Fungicid	gombaölő szer
Herbicid	gyomirtó szer
Inszekticid	rovarölő szer
Larvicid	lárvaölő szer
Molluscid vagy Limacid	csigairtó szer (házas és házatlan, növénytermesztésben kártevő és betegségeket terjesztő csigák)
Nematocid	féregölő szer, talajban élő fajok ellen
Növényi növekedés regulátorok	a növények életfolyamatait lassító, gyorsító vagy módosító szer (inhibitorok, stimulatorok, retardánsok)
Ovicid	rovarpeték ellen használatos szer
Piscicid	nem kívánatos halak ellen használt szer
Rodenticid	rágcsálóirtó szer
Repellens és repulzív szer	kártevő riasztó szer
Sterilánsok	sterilizáló szer
Viricid	vírusölő szer

2. táblázat: A növényvédőszer hatás és felhasználási cél alapú csoportosítása (Pirsahab & Moradi 2020, Garcês et al. 2020 és Bordás 2006 alapján)

2.1.2 A különböző növényvédőszer a környezetben

A peszticideket elsődlegesen a terméshozam növelésére és a termelés biztonság fenntartására alkalmazzák, azonban idővel a folyamatos és széleskörű, olykor megdölgő használatuk, károsíthatja az egyébként nem célzott szervezeteket, a környezetet és a kijuttatás helyétől távolabbi

területeken jelenhetnek meg növényvédőszer-maradékként, köszönhetően a bioakkumulációs és perzisztens tulajdonságaiknak. A peszticidek elsodródásának megakadályozása szinte lehetetlen, ugyanis kis területű alkalmazás során is szétterülnek a levegőben, emellett kiülepedhetnek a légkörből, a csapadékkal bemosódhatnak a talaj mélyebb rétegeibe, a felszín alatti vizekbe. Bejuthatnak a felszíni vizekbe is kiülepedéssel, bemosódással, run-off vizekkel, illetve szennyezett felszín-alatti vizekkel is (Yadav & Devi 2017), ahogy azt az 1. ábra is szemlélteti. Schulz (2004) becslése alapján a talajra kijuttatott növényvédőszer 10 %-a nem a célterületekre jut el, főleg, ha a kijuttatást követően csapadékos az időjárás.



1. ábra: A növényvédőszer általános sorsa a környezetben. (Syafrudin et al. 2021 alapján)

A peszticidek használata kockázatot jelent a felszíni és talajvizek minőségére, felhalmozódhatnak a növényekben és bekerülhet a táplálékláncba (Taylor et al 2002, Sharma et al. 2017). Hatást gyakorolhatnak a különböző mikroorganizmusokra, a kártevők természetes predátoraira, a növényi beporzókra, a házi és a vadon élő állatokra, valamint az emberi egészségre is (Nieder et al. 2018). Alkalmazásukból adódóan napjainkra többféle élelmiszerben (pl. csapvízben, gyümölcsökben, zöldségekben, tejben, halakban, mézben, gyógynövényekben, fűszerekben és tojásban) kimutathatók. A RASFF-ban a növényvédő szereket a harmadik leggyakrabban jelentett szennyezőként tartják számon. A határérték feletti szermaradékot tartalmazó élelmiszerek tartós fogyasztása pedig komoly egészségügyi következményeket okozhatnak (El-Nahhal & El-Nahhal 2021, Pięłowski 2022). A WHO a peszticid mérgezéseket közegészségügyi problémaként azonosította, amely világszerte jelentős morbiditást és halálozást okozhat (Chittrakul et al. 2021). Fizikai és kémia tulajdonságaiktól, alkalmazási eljárásuktól függően képesek légszennyezővé is válni (Donal et al. 2001, Waite et al. 2005). A nehezen lebomló vegyületek felhalmozódhatnak a talajban vagy akár a bomlástermékeik mobilizálódhatnak is. Felhalmozódásukat a mezőgazdasági felhasználáson túl az egyéb alkalmazási területek

(közegészségügy, háztartások, közterületek) is elősegítik. A városi felhasználás, főleg a háztáji kertek kártevő irtása miatt, jelentős szennyező forrás (El-Nahhal & El-Nahhal 2021). Az ilyen területeken a rovarirtó szerek mellett mennyiségben kimutathatóak még például a herbicidek, fungicidek is (Syafudin et al. 2021).

Egyes növényvédő szerekre jellemző, hogy a környezetben tartósan megmaradhatnak, biológiailag nem lebonthatók, hosszú a felezési idejük és felhalmozódhatnak a táplálékláncban, kockázatot jelentve a talaj, a vizek, a levegő minősége mellett a biológiai sokféleségre, az ökoszisztémára és az emberi egészségre egyaránt. Hatásuk sokszor még a betiltásukat követően is megfigyelhetők (Christos 2009, Garcês et al. 2020).

2.1.2.1 A különböző növényvédőszerek hatása a vizekre

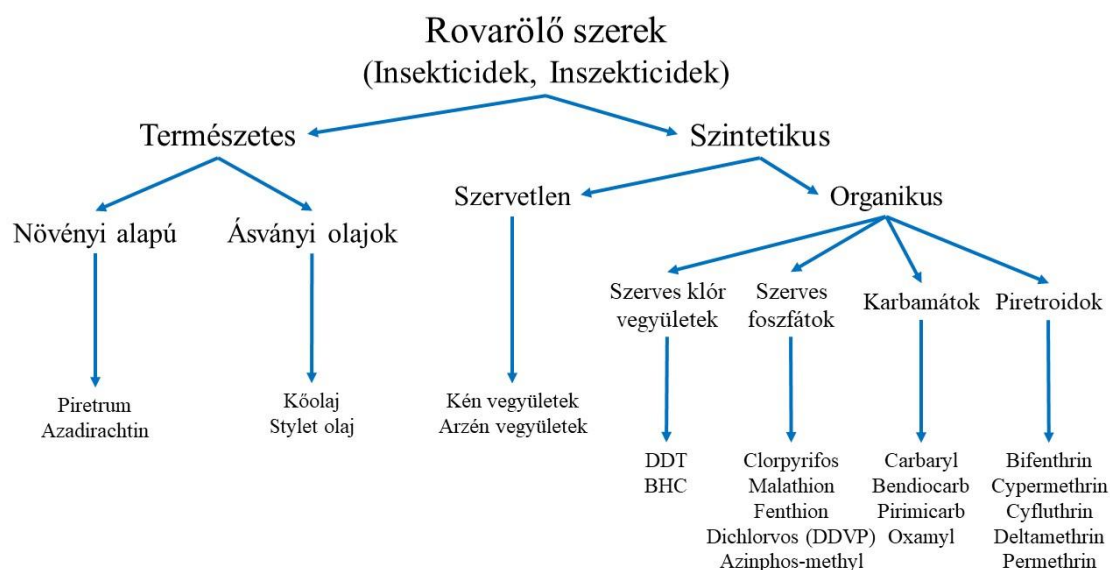
A peszticidek jelentősebb része a felszíni vizekben található, mivel a csapadékkal könnyen mobilizálódnak. A talajon keresztül a víztartó rétegekbe lassú a beszivárgás sebessége, azonban így lehetőségük van átalakulni. A talajhoz kevésbé adszorbeált peszticidek kisebb valószínűséggel szivárognak be a talaj alsóbb rétegeibe, azonban az erodált talajrészecskék könnyen átvihetik őket a felszíni lefolyáson keresztül, így a felszíni vizekbe juthatnak (National Research Council 1993). A vízdékony molekulák elszállíthatók, különösen csapadékos időben, leszivároghatva a talajrétegekbe és végül a talajvízbe. A talajrészecskékhez kötődő oldhatatlan vegyszerek felhalmozódhatnak a talaj felső rétegében majd beszivároghatnak a felszíni vizekbe, ami további szennyeződést jelenthet (Syafudin et al. 2021). A permetező berendezések tisztítása során, illetve a helytelen tárolás miatt is kialakulhat környezeti terhelés (Yadav & Devi 2017, de Souza et al. 2020, Syafudin et al. 2021). A vizek peszticid szennyeződésének mértékét befolyásolják a talaj jellemzői, területi adottságok, a növényvédőszerek fizikai és kémiai tulajdonságai, alkalmazási, illetve kijuttatási módja.

A vízben megtalálható növényvédőszerek alacsony koncentrációja a táplálékláncon keresztül felhalmozódhat és bejuthat az emberi fogyasztásra is alkalmas vízi szervezetekbe. A szennyezett vizek felhasználása, fogyasztása további expozíciót jelenthet (Sharma et al 2019).

2.2 Rovarölő szerek

Az inszekticidek a vegyi anyagok azon csoportja, amelyet a rovarok taszítására, vonzására, megzavarására, elpusztítására alkalmaznak. A kívánt céltól, mechanizmustól függően több alcsoportja létezik (2. ábra) a csoportnak. Felhasználásukat tekintve a legrepresentatívabbak a neonicotinoidok, a szerves foszforsav-észterek, a karbamátok (inszekticid karbamátok), a klórozott szénhidrogének, a piretrinek és a piretroidok (Belzunces et al., 2012, Costa et al. 2008). Ezeket az anyagokat széleskörűen alkalmazzák a növényvédelemben, a köz- és állategészségügy

területein. A trópusi éghajlaton, ahol kedvezőbbek az életfeltételek a rovarok számára, intenzívebb a felhasználásuk (Carazo-Rojas et al. 2018, Sumon et al. 2018).



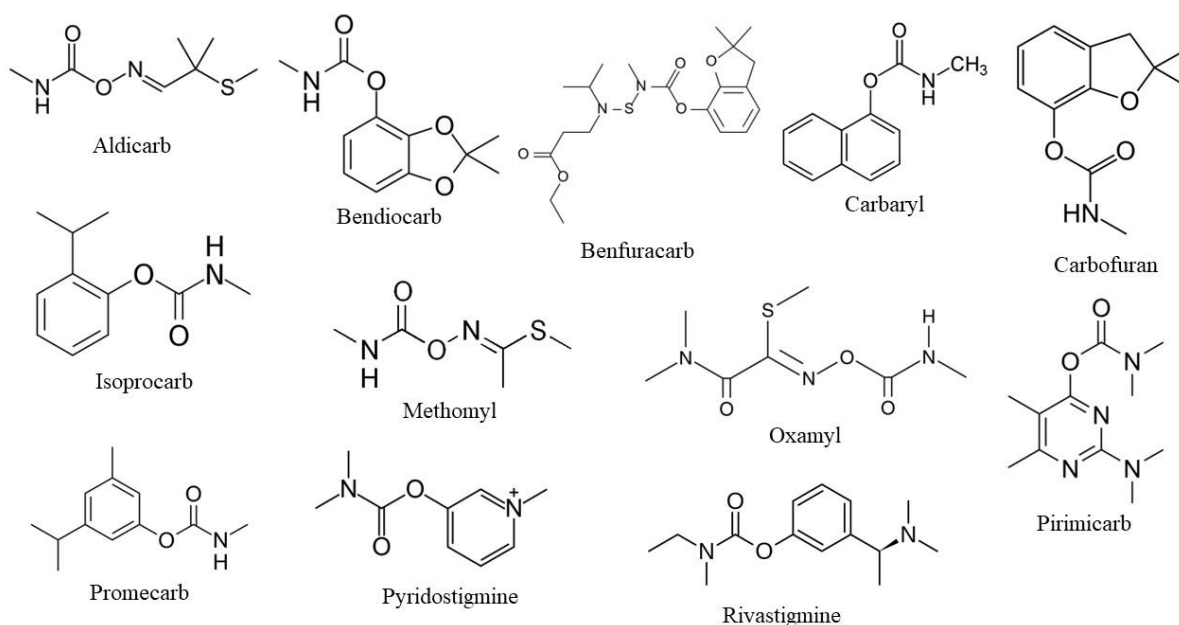
2. ábra: A rovarirtó szerek általános osztályozása. (Yadav & Devi 2017.alapján)

Napjainkban a világ számos részén tiltott a klórozott szénhidrogének, mint pl. a DDT használata, mivel ezen vegyületek többsége perzisztens és akkumulációra hajlamos (Aloizou et al. 2020). A piretrinek természetes eredetű insekticidok, melyek a *Chrysanthemum*-fajok megszártított és porított fészekvirágzatából származnak és rövid ideig tartó taglóhatással rendelkeznek. A piretrinekhez közel álló szintetikus analógok a piretroidok. A piretrinek és a piretroidok az idegsejtmembrán Na^+ -csatornáira hatnak, gátolják az ioncsatornák záródását, így folyamatos Na^+ beáramlást idéznek elő az idegsejtekbe (Lehel & Laczay 2011). A neonicotinoidok a nikotinreceptorok aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat (Costa et al. 2008). A szerves foszforsav-észterek és a karbamátok egyaránt gátolják az AChE enzim működését, így a szervezetben endogén acetyl-kolin-intoxikációt idéznek elő (Lehel & Laczay 2011). A klórozott szénhidrogének visszaszorulását követően, manapság ezeket a vegyületeket használják a legszélesebb körben (Costa et al. 2008).

Bár a rovarölő szerek többnyire a célszervezetekre korlátozódnak, de környezeti hatásuk nem elhanyagolható. Hasonlóan a többi növényvédőszer csoporthoz, számos felszíni vízben kimutatható a jelenlétük, mely a széleskörű felhasználásuknak köszönhető (Arnal et al. 2019, Liu et al. 2014). Világviszonylatban a magasabb koncentrációban megtalálható vegyületek pl. a *diazinon* (0,03-24465 ng/l, Zhang et al. 2012, Köck-Schulmeyer et al. 2019), a *dimethoate* (351-61200 ng/l, Carazo-Rojas et al. 2018), a *chlorpyrifos* (1,01-3100 ng/l, Ccancapa et al. 2016, Sumon et al. 2018), az *imidacloprid* (1-1886,88 ng/l, Gonzalez-Rey et al. 2015, Peng et al. 2018).

2.2.1 Inszekticid karbamátok

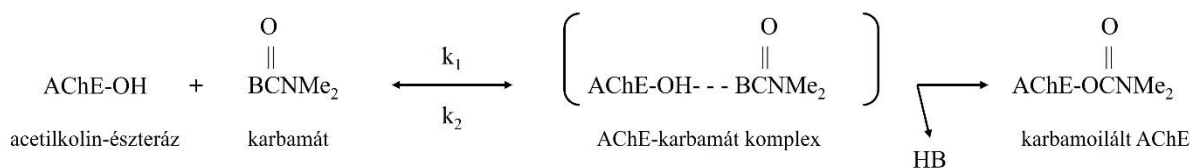
Az inszekticid karbamátok fejlesztése és használata az 1950-es években kezdődött (Lehel & Laczay 2011, Vale & Lotti 2005). Szerkezetileg hasonlóak a szerves foszforsav-észterekhez, azonban a karbamátok a karbaminsav észter származékai (Lehel & Laczay 2011, Yadav & Devi 2017., Abubakar et al. 2020). Az általános képletük $ROC(O)NHCH_3$ és általában az R szubsztituált fenol vagy heterociklus (Vale & Lotti 2005). Rovarölő hatásuk mellett atkaölő, gyomirtó és csigairtó tulajdonsággal is rendelkezhetnek és bizonyos karbamátok (*pyridostigmine*, *physostigmine*) a klinikai gyakorlatban általánosan használt gyógyszerek (pl. Mestinon 60 mg drázsé) is (Lehel & Laczay 2011, Vale & Lotti 2005). Több ismert (3. ábra) és széleskörben alkalmazott képviselője van a csoportnak, amelyek nem csak a mezőgazdasági gyakorlatban használatosak.



3. ábra: Globálisan elterjedt inszekticid karbamátok szerkezeti képlete (Bhatt et al. 2021. alapján).

Az inszekticid karbamátok különböző fokú akut orális toxicitást mutathatnak az alacsonytól (*carbaryl*: LD_{50} 250-850 mg/kg, patkány - *Rattus norvegicus*) a rendkívül magasig (*aldicarb*: LD_{50} 0,46-0,93 mg/kg, patkány) (Costa et al. 2008). Az emésztőcsatornából jól, dermálisan eltérő mértékben szívódnak fel. A szervezetbe kerülve közel egyenletesen elosznak, és gyorsan metabolizálódnak. Nagyobb koncentrációban általában a gyomor és a bél falából, az agyból, a csontvelőből és a tejmirigyekből mutathatók ki (Lehel & Laczay 2011). Hatásmechanizmusukat tekintve az idegmérgek csoportjába tartoznak és úgynevezett kolinészteráz-gátlók (Lehel & Laczay 2011., Yadav & Devi 2017., Abubakar et al. 2020).

Az AChE az idegrendszerben a kolinerg transzmisszió kulcsfontosságú enzimje, amely számos gerinces és a gerinctelen szervezetben jelen van. Az enzim működésének gátlása acetilkolin (ACh) felhalmozódásához vezet a szinapszisokban (Bocquené et al. 1997, De la Torre et al. 2002, Yi et al. 2006). Két reaktív csoporttal rendelkezik: az egyik csoport az úgynevezett észterifikálható vagy másnéven a katalikus csoport és a szubsztrát elektrofil C- atomjával kapcsolódik, a másik a negatív töltésű anionos csoport, amely a szubsztrát kationos részéhez kötődik (Lehel & Laczay 2011). Az AChE egy rendkívül hatékony enzim, az ACh-t kolinra és ecetsavra hidrolizálja, olyan sebességgel, amely megközelíti a szubsztrát diffúziója által meghatározott felső határt, majd pedig regenerálódik (Kuhr & Dorrough 1976, Shi et al. 2002, Roes et al 2003, Lehel & Laczay 2011). Az ACh receptoroknak két típusát különböztetjük meg, az egyik az úgynevezett metabotrop muszkarinos acetilkolin receptor (mAChR), a másik pedig az iontróp nikotinos acetilkolin receptor (nAChR). Mindkét típust az ACh bekötődése hozza működésbe és számos helyen előfordulnak a szervezetben (Albuquerque et al. 2009). A terhesség alatt az AChE aktivitás szintje alacsonyabb, ami magasabb ACh koncentrációt és hiperaktivitást eredményezhet az idegrendszeren belül (Gupta 2009). Az ACh a gerinces és gerinctelen szervezetek idegrendszerének az egyik fő serkentő neurotranszmittere, amely a jelen van a központi, perifériás, autonóm és enterális idegrendszerben is. Szabályozó szerepet tölt be az egész ontogenetikus folyamatban, beleértve az idegrendszer fejlődését megelőző szakaszokat is (Buznikov et al., 1996). A karbamátok és a szerves foszforsav-észterek toxicitását az AChE progresszív gátlása okozza az idegszövetben. Az inszekticid karbamátok, az AChE észterifikálható csoportjában, a szerin primer alkoholos hidroxilcsoportjával lépnek reakcióba. Az így létrejött karbamoilált enzim hidrolízise lényegesen lassul (4. ábra). Ennek következtében az ACh felhalmozódik a szinaptikus résben és az ACh receptorok túlzott stimulálása neurotoxikus tünetekhez vezet. Az ACh a szervezetben négy helyen tölt be ingerületátvivő szerepet: a központi idegrendszer kolinerg szinapszisa, a motoros idegvégződések (nikotinszerű hatás), a vegetatív ganglionok (nikotinszerű hatás), a paraszimpatikus postganglionális idegvégződések (muszkarinszerű hatás). Mind a négy támadásponton azonos az ACh hatásmódja, depolarizációt okoz az effektorsejtmembrán felületén, így az érintett effektorsejt ingerületbe kerül (Lehel & Laczay 2011).



4. ábra: Az AChE gátlása karbamát peszticidekkel. (Jin et al. 2004. alapján)

A szerves klór és foszforsav-észterek alkalmazása az elmúlt két évtizedben csökkent, az inszekticid karbamátok javára (Piel et al. 2019), melyek toxicitása hasonló a szerves foszforsav-észterekhez, azonban a felezési idejük rövidebb a környezetben és a bioakkumulációs potenciáljuk is alacsonyabb (Bird et al. 2014, Vichapong et al. 2011). Monitoring vizsgálatok során megállapították, hogy kimutathatóak maradnak az emberi vér és/vagy vizeletmintákban foglalkozási expozíciót (Bouchard et al. 2008, Hardt et al. 1999) és kisebb mértékben környezeti terhelést követően (Lunchick et al. 2007, Meeker et al. 2005, Putman et al. 2008). Számos tanulmány igazolta, hogy az inszekticid karbamátok oxidatív stresszt indukálnak és befolyásolják a központi idegrendszer működését (Habib et al. 2013, Jaiswal et al. 2016, Leomanni et al. 2015, Milatovic et al. 2006, Rai et al. 2007). Kolinészteráz-gátlóként feltehetően rákkeltő és mutagén tulajdonságokkal is rendelkezhetnek, ezért fokozódó használatuk potenciális veszélyt jelenthet a környezetre, illetve az emberi egészségre (Marrazza 2014, Vichapong et al. 2011). Pontosan ezért elengedhetetlen ezen vegyületek környezet, egészségügyi és ökotoxikológiai megismerése, ellenőrzése, kutatása. A neonikotinoidok, a szerves foszforsav-észterek és a szerves klór alapú növényvédő szerek mellett számos inszekticid karbamát (3. táblázat) vált kimutathatóvá az elmúlt évek során (Stuger et al. 2016, Wolfram et al. 2018, Casado et al. 2019, de Souza et al. 2020, Guarda et al. 2020, Bhuiyan et al. 2021).

Hatóanyag	Koncentráció	Kimutatási hely	Referencia
<i>carbaryl</i>	0,19-949 ng/L	Kanada, Dél-Ontário, felszíni víz	Struger et al. 2016
<i>carbaryl</i>	0,095-0,714 µg/L	Bangladesh, Feni ker., horgásztó, csatorna	Bhuiyan et al. 2021
<i>carbofuran</i>	0,26-286ng/L	Kanada, Dél-Ontário, felszíni víz	Struger et al. 2016
<i>carbofuran</i>	0,546-4,820 µg/L	Bangladesh, Feni ker., horgásztó, csatorna	Bhuiyan et al. 2021
<i>methomyl</i>	0,46-899 ng/L	Kanada, Dél-Ontário, felszíni víz	Struger et al. 2016
<i>oxamyl</i>	0,2-292 ng/L	Kanada, Dél-Ontário, felszíni víz	Struger et al. 2016
<i>pirimicarb</i>	0,24-16,4 ng/L	Kanada, Dél-Ontário, felszíni víz	Struger et al. 2016
<i>pirimicarb</i>	4,9 ng/L	Ausztria, Sankt Georgen an der Stiefing (Steiermark), Stiefing folyó	Casado et al. 2019
<i>pirimicarb</i>	1,8 ng/L	Belgium, Zedelgem (West-Vlaanderen), Moubek csatorna	Casado et al. 2019
<i>pirimicarb</i>	2,3 ng/L	Belgium, Ledegem (West-Vlaanderen), Wulfdambeek csatorna	Casado et al. 2019
<i>propoxur</i>	0,025 µg/L	Brazília, Formoso folyó	Guarda et al. 2020

3. táblázat: Különböző inszekticid karbamátok megjelenése a környezetben

2.2.2 Inszekticid karbamátok hatása zebra-dánió lárvákra

A környezetünkben növekvő számban megjelenő szennyező anyagok, mint pl. az inszekticid karbamátok komoly problémákat okozhatnak az infra- és szupraindividuális szinteken. Az

inszekticid karbamátok felhasználásukból kifolyólag hatással lehetnek azokra a populációkra, amelyek nem elsődleges célpontjai ezeknek az összetett kémiai anyagoknak. Káros hatást (viselkedés változás, szaporodás, szervek fejlődése) gyakorolva a nem célszervezetekre, pl. a gerinctelenekre, a kétéltűekre, vagy a halakra (Guo et al. 2022, Jablonski et al. 2022, von Wyl et al. 2023), így előtérbe kerülnek azok a modellszervezetek, amelyek a trofikus hálózat egyik kulcsszereplőjét képviselik, viszonylag nagy mintaszámmal vizsgálhatóak, vagy olyan tulajdonságokat hordoznak, amelyek kiindulási alapot szolgáltathatnak a vizsgálati eredmények akár emberi irányba történő extrapolálásában. A zebradánió szerepe kettős, hiszen egyrészt az édesvízi ökoszisztémák egyik fontos ökotoxikológiai modellszervezete, másrészt számos jól konzervált tulajdonságából adódóan fontos szerepet tölt be az emlős és humán expozíció okozta betegségek modellezésében is, így számos vizsgálat során alkalmazzák a fajt (Nagel 2002, Sipes et al. 2011, Geisler et al. 2016).

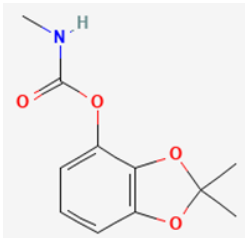
An és munkatársai (2023) a fonálféreg elleni védekezés során használatos *oxamyl* nevű inszekticid karbamát hatását vizsgálták. Az anyag egy széleskörben használatos rovarirtó szer, azonban az egyedfejlődési szakaszokra gyakorolt toxikus hatásairól, az esetleges mögöttes mechanizmusokról korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre. Vizsgálataik során megállapították, hogy az *oxamyl* toxikus hatást gyakorol a fejlődő zebradánió lárvák neuronjaira, a notochord (gerinchúr) és az érrendszer fejlődésére. Jablonski és munkatársai (2022) a *methomyl* nevű karbamát rovarirtót tanulmányozták. Arra a következtetésre jutottak, hogy befolyásolja a zebradániók kelését, morfológiáját és viselkedését, különösen az általuk vizsgált (0,5; 1,0; 2,2; 4,8; 10,6; 23,3 mg/l) magasabb koncentráció tartományokban. Kisebb test- és szemméretet állapítottak meg, továbbá észleltek hypo-lokomotoros aktivitást és koncentráció függő AChE enzim szint csökkenést. Könemann és munkatársai (2022) különböző rovarirtó szereket vizsgáltak neurotoxikológiai megközelítésből. Tanulmányuk célja a mozgási hibák összekapcsolása volt a neuromuszkuláris struktúrákra gyakorolt hatásokkal, beleértve a neuronokat, a szinapsziseket és az izmokat. A *methomyl* esetében megállapították, hogy toxikus hatással lehet az axonélágazásokra és az izomintegritásra. Von Wyl és munkatársai (2023) a zebradánió embriók idegrendszeri fejlődését vizsgálták hat, különböző kolinerg hatású rovarirtó szer expozíciója mellett. A *pirimicarb* és a *methomyl* kezelés is szignifikáns növekedést okozott a korai embrionális motoros viselkedés, a spontán farkmozgás számában. A *methomyl* kapcsán megfigyelték, hogy a kontroll csoporthoz képest a spontán farkmozgás időtartama csökkent. A lárvák farkának érintése által kiváltott elmozdulási távolság mérése során is a *methomyl* okozta a legdrasztikusabb csökkenést. Lin és munkatársai (2007) a *carbaryl* szívre, szív működésre gyakorolt hatásait tanulmányozták korai fejlődési stádiumban lévő zebradánió lárvákon. Megerősítették az anyag acetilkolin-észteráz gátlását, leírták a vörösvérsejtek felhalmozódást, a késleltetett kelést és

szívburok ödémát. Nem figyeltek meg szívfejlődési rendellenességet, de a *carbaryl* által kiváltott *bradycardiát* igen, ami az kolinészteráz-gátlók gyakori hatása az ACh felhalmozódása miatt. A *benfuracarb* is egy népszerű, széles spektrumú karbamát rovar- és féregirtó szer, amelynek a vízi élőlényekre vonatkozó kockázati szintje még nem tisztázott (Guo et al. 2022). A zebra-dánió lárvákon végzett vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy redukálja a testhosszt, és a szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitása szignifikánsan növekedett a kezelés hatására. A korai embrionális fejlődéshez kapcsolódó markergének (*gh*, *myoD*, *myh6*, *nkx2.4b*) transzkripció szintjein zavart okozott, így a kapott eredmények teratogén hatást valószínűsítene. Az *isoprocarb* elterjedt gombaölő, rovarölő és gyomirtó (Ni et al. 2008) szer, amely számos természetes vízből származó mintában megtalálható (Xu et al. 2020, Chen et al. 2021), ám vízi szervezetekre gyakorolt hatása szintén kevésbé ismert. Wang és munkatársai (2022) zebra-dánió embriókon végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy az *isoprocarb* csökkenti a kelés sikerességét, valamint a pulzusszámot. Redukálta a neurális tubus sejtek számát, ezenfelül agykamra tágulás volt mérhető a kezelés alatt a lárvákon. Az idegi fejlődésben szerepet játszó gének (*elavl3*, *foxo3a*, *gfap*, *sox19b*, *sny2a*) expresszióját mérsékelte, valamint a viselkedés vizsgálatok alatt is negatív irányba befolyásolta a viselkedési indexet. Csökkentette az AChE, a SOD, a kataláz (CAT) és a malonaldehid (MDA) szintjét. Növelte az apoptózissal kapcsolatos és a gyulladáshoz kapcsolódó faktor gének (*Bax*, *Bcl2*, *TNF α* , *IL-6*, *IL-8*, *caspase3*, *caspase9*) szintjét.

A doktori munka során vizsgált *bendiocarb*-bal végzett hal tesztek elsődlegesen a klasszikus toxikológiai paraméterekre (NOEC, LD₅₀, LC₅₀) irányultak. A halakra, kiváltképp a zebra-dánióra, vonatkozó szakirodalmi ismeretek csekély számúak, így azok kiegészítése, az anyag pontosabb vizsgálata nem hagyható figyelmen kívül.

2.2.3 Bendiocarb

A *bendiocarb* (2,2-dimethyl-1,3-benzodioxol-4-yl-N-methylcarbamate, 4. táblázat) a karbamátok csoportjába tartozó széles spektrumú rovarölő.

 <p style="text-align: center;">C₁₁H₁₃NO₄</p>	Molekula tömeg:	223,22 g/mol
	Olvadáspont:	129-130°C
	Szín:	szilárd, fehér anyag
	Vízoldékonyság:	mérsékelt/rosszul
Termékek:	Ficam, Ficam D, Ficam W Turcam, Multimet, Multimat Dust, Sudoxin, Garvox, Bendiocarb DP 01W, Bendiocarb DP 1.25, Bendiocarb DP1	

4. táblázat: A *bendiocarb* tulajdonságai (*Bendiocarb*-Technical Fact Sheet 2002)

Az Egyesült Államokban 1980-ban került forgalomba, majd 1999-ben, jóval a korlátozások előtt, a gyártó kivonta a forgalomból. 2001-ig azonban a készleten lévő termékek felhasználásra kerülhettek (*Bendiocarb*-Technical Fact Sheet 2002). Az EU 2002/2076 rendeletét követően az Európai Unió tagországaiban fokozatosan korlátozásra, majd betiltásra került a *bendiocarb* mezőgazdasági felhasználása. A Garvox 3 G (Hoechst Schering AgrEvo) márkanévű 3%-os *bendiocarb* talajfertőtlenítő szer, kukoricában, napraforgóban és cukorrépában, talajlakó kártevők ellen 1991-től kezdődően volt használatban Magyarországon. Azonban a gyártó megszüntette a készítmény előállítását, majd ezt követően 2003. február 24-én visszavonták a hazai engedélyét (Garvox 3 G, engedélyokirata). Az EU 2012/3-as rendelete azonban engedélyezte a hatóanyag biocid felhasználását. Ezen rendeletet a FAO 2024-ben helyezte hatályon kívül. Jelenleg az Európai Vegyianyag-ügynökség (European Chemicals Agency-ECHA) adatbázisa alapján, Finnországban engedélyezett a *bendiocarb* tartalmú készítmény felhasználása (5. táblázat).

Kereskedelmi név	Ország	Az engedélyezés kezdete	Az engedélyezés vége	Engedélyezés állapota
Ficam D	Egyesült Királyság	2018.07.18.	2020.12.31	Lejárt
	Ausztria	2019.04.15.	2029.05.15.	Törölt
	Belgium	2018.07.18.	2028.07.17.	Törölt
	Dánia	2018.07.18.	2028.07.17.	Törölt
	Finnország	2018.09.25.	2028.07.17.	Engedélyezett
	Franciaország	2018.07.18.	2028.07.17.	Törölt
	Írország	2019.02.06.	2028.07.17.	Törölt
	Luxemburg	2018.09.17.	2028.07.17.	Törölt
	Málta	2018.09.25.	2028.07.17.	Törölt
	Németország	2018.09.04.	2028.07.17.	Törölt
	Hollandia	2018.11.02.	2028.07.17.	Törölt
	Norvégia	2019.10.14.	2028.07.17.	Törölt
	Spanyolország	2019.02.25.	2028.07.17.	Törölt
	Swédország	2018.09.28.	2028.07.17.	Törölt
Svájc	2018.07.18.	2028.07.17.	Törölt	
Bendiocarb DP 01W		2018.09.04.	2028.07.17.	Törölt
Bendiocarb DP 1,25	Németország	2018.09.04.	2028.07.17.	Törölt
Bendiocarb DP 1		2018.09.04.	2028.07.17.	Törölt
Eporal Polvere	Olaszország	2019.02.25.	2028.07.17.	Törölt
Multimata Dust	Olaszország	2019.02.25.	2028.07.17.	Törölt

5. táblázat: A *bendiocarb* biocid termék adatlapja, engedélyezési információk (<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/biocidal-products/-/disbp/factsheet/UK-0003702-0000/authorisationid> alapján)

Hazánkban 1990-1994 között a csípőszúnyog gyérités során alkalmazott légi permetezésnél használatos szerek között szerepelt, és 1990-2000 között népszerű volt a szúnyog-imágóirtó szerek között (Gero 2007, Kenyeres & Tóth 2018). 2017-ben történt az utolsó felülvizsgálata a *bendicarb* hatóanyag tartalmú Ficam D rovarirtó porozószernek és ezt követően 2020-ra fokozatosan kivonásra került a piacról. Ausztráliában jelenleg is forgalomban van és az Egyesült Királyság területin a BPCA (British Pest Control Association-Egyesült Királyság Kártevőirtó Szövetsége) 2025-ig engedélyezte a felhasználását.

Napjainkban is egyike a WHO által ajánlott azon anyagnak, mely segíti a szúnyogok számának kontrollálását, így az érintett területeken a malária terjedésének csökkenését (Holovska et al., 2014, Polláková et al., 2012, Sadasivaiah et al., 2007). Toxikokinetikáját különböző állatfajokon elsősorban orális expozícióon keresztül vizsgálták. Magas a zsírolékonysága, így a felszívódását követően az egész szervezetben eloszlik, majd gyors és teljes metabolizáció után kiválasztódik. Egyes tanulmányok szerint az emlős szervezetekben nem akkumulálódik (Holovska et al. 2014, Polláková et al. 2012), ezzel szemben patkányokon végzett etetési vizsgálatnál a kezelést követően is kimutatható volt a májban, vesében, izomban, az agyban és a zsírszövetekben (Holovska et al. 2014). Korábbi tanulmányok leírták, hogy a *bendiocarb* különféle morfológiai elváltozásokat indukál emlős szövetekben, szervekben. Hasonlóan más karbamátokhoz a *bendiocarb* reverzibilis AChE inhibitor, de hatása nem csak a gátláson alapszik, hanem a reaktív oxigén származékok termelődését is befolyásolja (Apaydin et al., 2017, Capracova et al., 2010, Sobeková et al. 2009).

A különböző növényvédő szerekkel számos módon kerülhetnek kapcsolatba a különböző szervezetek, beleértve a peszticid termékek háztartási használatát, vagy a növényvédő szer-maradékok jelenlétét a növényi és állati eredetű élelmiszerekben, takarmányokban. A malária évente félmillió halálesetet okoz, az agresszív védekezési intézkedések ellenére is. A *bendiocarb* egyike azon kevés növényvédő szernek, amely hatásosan felhasználható az IRS technika során, a malária elleni védekezésben. Ennek ellenére nagyon korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésünkre, a *bendiocarb* expozíció okozta biológiai hatásokról (Prahl et al. 2021). A *bendiocarb* bőrön keresztüli felszívódása a leggyorsabb (Whyatt et al. 2003). Monitoring vizsgálatok kimutatták, hogy háztartási kártevőirtást végző, vagy végeztető nők (beleértve a várandósokat is) vérplazmája 0,005-0,040 ng/ml, és kilélegzett levegő mintája <0,2-27,5ng/m³ koncentrációban tartalmazott *bendiocarbot* (Whyatt et al. 2003, Whyatt et al. 2007, Berman et al. 2011). Barr és munkatársai (2002) New Yorkban élő nők vérplazma és szérum mintájának elemzése közben azt találták, hogy a vett minták több mint 20 %-ában kimutatható volt többek között a *chlorpyrifos*, a *diazinon*, *phthalimide* és a *bendiocarb* is. Általánosságban elmondható, hogy a köldökzsínórból vett vérminták peszticid szintje hasonlóan alakul az anyai vér peszticid szintjéhez és a legtöbb esetben szignifikánsan korrelál (Perera et al. 2002). Prahl és munkatársai

(2021) megállapították, hogy a *bendiocarb* képes felszívódni az emberi szervezetbe és a terhes nőket ért kitétség vizsgálatok során megállapították, hogy átjut a fejlődő embriókba és kimutatható marad a születendő csecsemőkben is. A méhen belüli expozíció dózisfüggő biológiai hatásokat váltott ki a fejlődésben lévő magzatok immunrendszerében. Valószínűsíthetőleg a magzati T sejtek homeosztázisában eltolódás alakul ki a gyulladáshoz vezető válaszok irányába, de a pontos hatásmechanizmus nem ismert (Prah et al. 2021).

A *bendiocarb* elterjedt használata miatt, világszerte kimutatható számos vízmintában. 2009-ben detektálták Japán felszíni vizeiben 0,16-5,68 µg/l közötti koncentráció tartományokban (Tatarazako & Iguchi 2012). El-Saeid és munkatársai (2011) Szaúd-Arábia közép-keleti, északi és déli részének 15 régióját választották ki a talajvizet érintő növényvédőszer-maradványok monitoring vizsgálatához. A talajvízminták elemzése során 0,181 mg/l mennyiségben találtak *bendiocarb*-ot az Abha-ból származó mintákban. Casado (2019) és munkatársai 10 európai ország csatorna és folyó vizeiből gyűjtött minták elemzése során, detektálták a *bendiocarb* (5,6±0,3 ng/l) jelenlétét az Egyesült Királyság területén található Tale-folyóból. Lahr és munkatársai (2000) a *deltamethrin*, a *fenitrothion*, a *diflubenzuron* és a *bendiocarb* ökológiai hatásait vizsgálták terepi körülmények között, természetesen létrejött ideiglenes tavaknál Senegál szavanna területein. A kijelölt területen 16 tavat választottak ki és 10 tavat kezeltek a kiválasztott rovarirtó szerekkel. Megállapították, hogy a *bendiocarb* pseudo-elsőrendű felezési ideje 17 nap. Az *Anisops* spp., vagy a *Streptocephalus* spp. populációiban és a makrogerinctelenek számában a *bendiocarb* kezelés nem okozott jelentős csökkenést, azonban a felszínen élő rovarokat elpusztította és csökkentette az ágascsapú rákok (*Diplostraca/Cladocera* spp.) sűrűségét. A *bendiocarb* felezési idejének terepi körülmények közötti elemzése azonban azt mutatta, hogy a maradékok az alkalmazást követő hatodik hónapban még kimutathatóak (Maharaj et al. 2004). A vadállatok vélhetően szándékos mérgezésével kapcsolatos tanulmányokban is beszámoltak a *bendiocarb* jelenlétéről Középnnyugat-Lengyelországban és hazánkban is. Deák (2020) és munkatársai a vadon élő állatokra vonatkozó mérgezési esetek vizsgálata kapcsán, beszámoltak egy áramütést szenvedett mûholdas jeldóval jelölt parlagi sasról (*Aquila heliaca*). Az elpusztult állat szervezetében kimutatták a *bendiocarb* hatóanyagot, amit valószínűsíthetőleg Ausztriában vehetett fel az állat. A kutatók feltételezése szerint, a hatóanyag hozzájárulhatott a madár viselkedésének a megváltozásához, ami későbbi halálozás okához, az áramütéshez vezetett. Chłopaś-Konowalek és munkatársai 2020 május végén elhullott ragadozómadarokból származó máj mintákból mutatták ki a *bendiocarb* (1808-7721 ng/g, 6. táblázat.) jelenlétét.

Faj	Koncentráció a májban
Holló (<i>Corvus corax</i>)	7721 ng/g

Barna rétihéja (<i>Circus aeruginosus</i>)	2266 ng/g
Vörös kánya (<i>Milvus milvus</i>)	4963 ng/g
Rétisas (<i>Haliaeetus albicilla</i>)	1808 ng/g

6. táblázat: Ragadozó madarak máj mintáiban kimutatott *bendiocarb* koncentrációk (Chłopaś-Konowalek et al. 2020 alapján)

Különböző halfajok esetében is vizsgálták a *bendiocarb* hatását. Hayes & Lawes (1990) az akut orális toxicitását (LD₅₀) 0,7-1,8 mg/kg⁻¹ tartományban állapították meg a halakban. A *Cyprinodon variegatus* esetében az akut LC₅₀ érték 0,86 mg/l. A szivárványos pisztrágnál (*Oncorhynchus mykiss*) az LC₅₀ 0,87-1,55 mg/l közötti tartományba esik. A kékkopoltyús naphal (*Lepomis macrochirus*) esetében az LC₅₀ tartomány 0,47-1,65 mg/l értékhatárok közé esik (*Bendiocarb*-Technical Fact Sheet 2002). Tatarazako és Iguchi (2012) krónikus haltoxicitási tesztet végzett zebradániókon és megállapították, hogy a nem táplálkozó lárva stádiumban a NOEC (No Observed Effect Concentration) érték 12,5 mg/l.

Számos publikáció leírta a *bendiocarb* emlősökre és az alsóbb rendű szervezetekre gyakorolt hatását. A halakkal kapcsolatos vizsgálatok elsődlegesen a klasszikusnak számító toxikológiai paraméterekre (NOEC, LD₅₀, LC₅₀) összpontosultak.

2.3 Halmodellek a toxikológiában/ökotoxikológiában

A különböző vegyületek (pl. növényvédőszer) engedélyezésének, forgalomba hozatalának szerves részét képezik a toxikológiai vizsgálatok. Bizonyos anyagok kockázatának a megismerése, felmérése több lépcsős folyamat (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*), melybe különböző teszt típusok kerülnek alkalmazásra.

A halak elsősorban a környezeti kockázatbecsléshez kapcsolódó ökötoxikológiai vizsgálatok során kerülnek előtérbe. Az emlősöknél taxonómiai alacsonyabb rendűek, így a 3R stratégiába is jól beilleszthetőek (Russell és Burch 1959). Előszeretettel alkalmazzák az embriókat különböző vizsgálatokban, mert a táplálkozás megkezdéséig a 2010/63/EU direktíva alapján nem minősülnek állatnak. A halakat és az embriókat egyre elterjedtebben alkalmazzák a kutatók, hiszen nem csak költséghatékonyabbak, hanem az inhalációs kezeléssel kívül minden olyan expozíciós forma is alkalmazható náluk, mint az emlősöknél. Teljes testfelületükkel érintkezhetnek a környezetben előforduló vegyi anyagokkal, így a kísérletek során a vegyületek a tartóvizükben is feloldhatóak. A legváltozatosabb gerinces csoportként számos faj (guppi-*Poecilia reticulata*, ponty-*Cyprinus carpio*, nílusi tilápia-*Oreochromis niloticus*, pisztráng félék, japán medaka-*Oryzias latipes*, rózsás díszmárna-*Pethia conchonius*, stb.) bevonható a különböző vizsgálatokba, így több toxikológiai szabvány létezik (7. táblázat) rájuk.

Vizsgálatokhoz javasolt halfajok	Szabványok	
zebradánió, medaka, szivárványos piszráng, tarka fogasponty, ponty, tűzceselle, háromtűskés pikó, kék naphal, szivárványos guppi	OECD Test No.:	203, 205, 210, 212, 215, 229, 230, 234, 236, 240, 250, 305
	ISO 7346-1-2-3:	1996, 1984, 1999, 2000
	ASTM:	E1711-20, E1241-22, E-1022-22, E729-23e1
	EPA OPPTS 850.:	1075, 1400, 1730

7. táblázat: Különböző toxikológiai szabványok és az általuk javasolt halfajok

2.3.1 Zebradánió a toxikológiában/ökötoxicológiába

Az akvarisztikából is jól ismert zebradánió a pontyfélék (*Cyprinidae*) családjába tartozó, kisméretű (4–5 cm), trópusi halfaj (5. ábra).



5. ábra: Zebradánió (*D. rerio*)

Elterjedési területe Dél-Ázsia, India, Banglades, Pakisztán, Nepál, Mianmar területe. A faj az álló és a lassú folyású, növényekkel gazdag helyeket, ártereket kedveli, ezért is tartható jól akváriumi és laboratóriumi átfolyó vizes rendszerekben egyaránt (Lawrence 2007). Kisebb csoportokban él (Pritchard et al. 2001) és táplálkozás szempontjából egy generalista faj, mivel a planktonikus, bentikus élőlények mellett a vízbe hullott rovarokat, lárvákat is elfogyasztja (Dutta 1993).

Napjainkra a legelterjedtebb modell szervezetté vált, számos tudományterületen (pl. élettan, fejlődésbiológia, genetika, etológia, toxikológia, gyógyszer hatásvizsgálatok) alkalmazzák. Népszerűségének oka, hogy a különböző vizsgálatok számára is megfelelő tulajdonságokkal rendelkezik, alacsony tartási költségek mellett. Toxikológia szempontjából kedvező a kis testmérete, békés természete és nagy egyedsűrűségben való tarthatósága. Teratológiai vizsgálatoknál az átlátszó ikrahéj lehetővé teszi az embrionális fejlődés során bekövetkező rendellenességek azonosítását. Szaporodásbiológiai vizsgálatoknál is jól alkalmazható, mivel kevésbé érzékeny a beltenyésztésre és egész évben szaporítható. Jellemző rá a magas fekunditás, rövid a generációs intervalluma, illetve a fejlődése *ex utero* módon nyomon követhető. Többek között ezen tulajdonságainak köszönhetően a teljes életciklust célzó, vagy a több generációs vizsgálatok számára is jó választás, mint modell-szervezet (Lele & Krone 1996, Hill et al. 2005). Az évek során különböző, könnyen kivitelezhető és költséghatékony kísérleti eljárásokat

dolgoztak ki zebradánióra és az emlősöknél használt módszerek egy részét is sikerült adaptálni rá. Zebradániók esetében is van lehetőség például a kísérleti anyag takarmánnyal történő orális adagolásra vagy akár az intraperitoneális térbe való bejuttatásra. Élettani folyamatai nagymértékű hasonlóságot mutatnak az emlősökével, illetve a humán és zebradánió genom között is nagyfokú homológia figyelhető meg. (Howe et al. 2013, Phillips & Westerfield, 2020) Előfordulhat azonban, hogy az összehasonlító toxikológiai vizsgálatok eredményei ennek ellenére eltérőek (Winn 2001, Ducharme et al. 2015). Jól beilleszthető a 3R stratégiába és megfelel a 2010/63/EU direktívának is, hiszen a zebradánió embrió a termékenyüléstől számítva 5 napig (120 hpf), a nem táplálkozó lárva korig, nem tekinthető kísérleti állatnak (Strähle et al. 2012).

2.3.2 Zebradánión végezhető akut kitétség vizsgálatok

Különböző halfajokon elterjedten alkalmaznak akut teszteket, mert hozzájárulnak a különböző vegyületek (pesticidok, biocidok, gyógyszerek) környezeti kockázatának megismeréséhez (Commission of the European Communities 1967, 1991, 1992, 1993a, b, 1994; CVMP/VICH 2000; EMEA/CHMP 2006; VICH 2004). A leggyakrabban előírt tesztek az OECD szabványokon alapulnak. A protokollok között megtalálhatóak a felnőtt halakra és a halembriókra kidolgozott előírások is. Az ajánlások között több halfaj is szerepel és külön-külön megfogalmazásra kerültek a különböző fajokra vonatkozó követelmények (testméret, kezelőoldat, hőmérsékelt stb.) is. Javaslatként megjelenik még a limit teszt (100 mg/l) és a határérték kereső teszt, amelyek hozzájárulnak a 3R-hez és a fő teszt elvégzéséhez.

A felnőtt halakon végzett akut vizsgálat (OECD 203) 96 óra hosszú és végpontja a halak túlélési arányának megállapítása. Az akut felnőtt halas vizsgálatok elfogadott alternatívája a halembrió teszt (Domingues et al 2010, Scholz et al. 2008., Wedekind et al. 2007). Az Európai Unió jelenlegi szabályozása szerint a halembriók felhasználása nem szabályozott a táplálkozás megkezdéséig, ezért az embrionális vizsgálatokat az állat-kísérletek alternatíváinak tekintik (Commission of the European Communities 1986., Fleming 2007). A sejtvonalakkal szemben azonban összetett, többsejtű rendszert képeznek és integrálják a különböző szövetek kölcsönhatását és a differenciálódási folyamatokat. Az OECD 212. több halfaj embrióinak a használatát is ajánlja, azonban az OECD 236. csak a zebradánió embriókat jelöli meg teszt szervezatként. A dolgozat szempontjából is releváns OECD 236. - Halembrió akut toxicitási vizsgálat (*Fish Embryo Acute Toxicity*, röviden FET) célja 24 óránként megállapítani azt a koncentrációt, amely az embriók felének pusztulását (LC_{50}) okozza. A protokoll előírása alapján a mortalitás mellett leíró jelleggel fel lehet jegyezni a különböző deformitásokat, fejletlenségeket, azonban statisztikailag ezeket nem kell igazolni. A szabvány által ajánlott 24 lyukú szövettenyésztő lemezekon található vájatok egy-egy ismétlésnek felelnek meg és az előírt elrendezés szerint koncentrációként 20 db ikra kerül a

lemezekbe. A *plate*-hatás kiszűrésének érdekében a szélső négy mélyedésbe negatív kontroll kerül. Hasonlóan a felnőtt halas tesztekhez, a kontroll csoport mellett legalább öt koncentrációt kell alkalmazni mértani sorozatban nem nagyobb, mint 2,2 faktoral.

Az akut hal tesztek elsődleges célja a letális hatás megállapítása. A pontosabb szubletális tünet, dózis-hatás összefüggések megállapításához krónikus tesztekre van szükség.

2.3.3 Zebradánióon végezhető krónikus kitétség vizsgálatok

A krónikus hal tesztek az akut vizsgálati eredményeken alapulnak, azonban időben hosszabbak és a végpontjuk eltérő. A zebradánió mellett több más halfaj használatát is javasolják, sőt az OECD 240. (*Medaka Extended One Generation Reproduction Test*) a medakát jelöli meg modellállatként, azonban zebradánióra is adaptálható a szabvány. Általában egy jól ismert szubletális tünet megjelenését vizsgálják figyelembe véve a dózis-hatás összefüggéseket. Az OECD (210., 212., 229., 230., 234., 240.) szabványok nagy része leginkább a halak növekedésére, vagy a szaporodásbiológiai folyamataikra fókuszálnak. A végpontok között szerepel az elhullás, a lerakott ikraszám, a testparaméterek, illetve a különböző fejlődési rendellenességek vizsgálata, vagy nagyon gyakran a vitellogenin szint mérése.

A hosszabb teszteket előszeretettel alkalmazzák környezeti kockázatbecslésre különböző vegyületcsoportok tanulmányozására, szennyvíztelepek elfolyó vizeinek vizsgálatára (Villeneuve et al. 2014, Sowers et al. 2009). A tesztek felépítése változatos és általában magukba foglalják a halak legérzékenyebb fejlődési stádiumait, ami megnehezíti a tesztek kivitelezését is. Fontos a megfelelő etetési módszer kiválasztása, ami egy fél-statikuss rendszer esetében további nehézségként jelentkezhet az oldatcsere során. A halak számára a legideálisabb körülményt az átfolyóvízes tesztrendszerek biztosítják, azonban ezeknél a rendszereknél nagy mennyiségű szennyezett víz keletkezik, amely megfelelő kezelést igényel utólagosan. A vizsgálatok tervezésére, kivitelezésére is több lehetőség kínálkozik, akár, ha a javasolt ismétlés számokat nézzük, akár a kezeléseket kiindulási pontját (szülői generáció előkezelése, embrionális kezelés), vagy a kísérlet hosszát (Fassbender & Braunbeck 2013, Kim et al. 2014, Nakamura et al. 2015, OECD 240.).

A krónikus tesztek segítik a pontosabb szubletális tünet, dózis-hatás összefüggések feltérképezését, de az akut tesztekhez képest kivitelezésük idő-, eszköz-, és munkaigényes. A vizsgálatok tervezése, kivitelezése nagy precizitást és gyakorlatot igényel szem előtt tartva a 3R stratégiát is.

2.3.4 A zebradánió korai életciklusában végezhető vizsgálatok

Napjainkra a zebradánió a számos kedvező tulajdonsága miatt elterjedt modell szervezetté vált és Európában is több mint 360 laboratóriumban tartják fent kutatási célokra (Geisler et al. 2016). A fajt, számos más tudományterület mellett, elterjedten használják a környezeti toxikológia területén is (Nagel 2002, Sipes et al. 2011).

A zebradánió embriók a korábban már felsorolt tulajdonságaik (jól illeszkedik a 3R stratégiába, alternatív modell) miatt közkedvelt teszt szervezetek. Sikeresen végezhetőek rajtuk a különböző genetikai és gyógyszerészterületek a teljes szervezetre alapozva. (Amsterdam et al. 1999, North et al. 2007, Ou et al. 2010). A környezetbe kerülő vegyi anyagok kockázatértékelésének pedig reprezentatív modellje, köszönhetően érzékenységének (Melo et al. 2015, Yang et al. 2009, Scholz et al. 2008). Szubletális végpontok széles skálája mérhető a fajon, akár korai életszakaszban is, így egy-egy szennyező anyag kapcsán többlet információ nyerhető a klasszikusnak számító paraméterek mellett.

A korai életszakaszban végezhető vizsgálatok kivitelezése nehézkes az emlősmodelleken, pedig az élőlények ebben az életszakaszban a legérzékenyebbek a vegyi anyagok káros hatásaira. Azonban a zebradánión ezek a vizsgálatok is könnyen elvégezhetőek. Kimmel és munkatársai (1995) részletes ábrákkal kiegészítve leírták a faj embriófejlődését, így az átlátszó ikrahéjon keresztül pontosan megállapítható, hogy a fejlődés mely fázisában tart az adott egyed. Nyomon követhető és szabályozható, hogy a vizsgálatokba bevont egyedek azonos fejlődési stádiumba kerüljenek kontaktba a tesztelendő anyaggal. Megállapítható, hogy a vizsgálandó anyag milyen hatással van az embriók fejlődésére, befolyásolja-e a fejlődés sebességét, okoz-e szemmel látható elváltozást az egyedekben vagy a fejlődő szervekben. Az ő munkájukon alapulva különítjük el az embrió (termékenyüléstől számítva 3 napos korig) és a lárva (3 napos kortól, függetlenül attól, hogy kikelt-e vagy sem) kort egymástól. Az akut embrionális tesztek a termékenyüléstől kezdve vizsgálják az embriókat egészen 96 hpf korukig, mivel ekkorra tehető a főbb szervek kifejlődése (Rubinstein 2003, Scholz et al. 2008).

2.3.4.1 A zebradánió korai életciklusában végezhető kardiotoxicitási vizsgálatok

A kardiotoxicitási vizsgálatok számára is megfelelő modell szervezet a zebradánió mivel az emlősökhöz hasonló a fiziológiája (Howe et al. 2013, Cornet et al. 2017, Zakaria et al. 2018, Wang et al. 2019), ráadásul a zebradánió elektrokardiogramján mérhető szakaszok nagyban hasonlítanak az emberi elektrokardiogramhoz (Staudt & Stainier 2012, Milan et al. 2006, Sedmera et al. 2003). A zebradánió embriók szívének fiziológiája, nagy hasonlóságot mutat a három hetes humán embriók szívének működésével (Shen & Zuo 2020). A zebradánió embrionális pulzusszáma 140-180 bpm (bpm= Beat Per Minute: ütés/perc), ami közelebb áll az emberi magzati

szívfrekvenciához (130-170 bpm) (Luca et al. 2014, Sarmah & Marrs 2016) mint az egér magzaté (300-600 bpm) (Luca et al. 2014). A különböző anyagok szív- és érrendszerre gyakorolt hatásai könnyen megfigyelhetők. A zebradánió *ex utero* fejlődése lehetővé teszi az embriók szívének tanulmányozását, mikroszkóp segítségével (Teixidó et al. 2019). Az embriókban a szív az egyik első fejlődő és működő szerv. A termékenyülést követően 22 órával már a szívverés is kialakul. A 36. órára fokozatosan beindul a keringés és a 48. órára a teljes szív-és érrendszer kifejlett és működőképes, beleértve az anyagcsere-folyamatokat továbbá az ionszatórnák komplex működését is (Liu et al. 2017, Shen et al. 2019). A zebradánió embriók akár 7 napig is életben maradhatnak passzív oxigénszállítás mellett, keringés nélkül. Ezen tulajdonságának köszönhetően számos, korábban ismeretlen gén szerepét azonosították a gerincesek szívfejlődésben és működésében (Shen et al. 2019, Stainier 2001). Az elmúlt években pedig tovább növelte a faj népszerűségét a szívének regenerációs képessége (Foglia & Poss 2016), ami a szívserülések terápiás vizsgálatában bírhat jelentőséggel.

2.3.4.2 A zebradánió korai életciklusában végezhető viselkedés vizsgálatok

Napjainkra egyre több vizsgálat irányul a szennyezőanyag okozta viselkedés változásokra, annak ellenére, hogy ezen vizsgálatok ökológiai relevanciája nehezebben megítélhető. Az élő szervezetek változatos viselkedést mutatnak, amelyeket általában nehéz számszerűsíteni és összehasonlítani (Dutra Costa et al. 2020), azonban a viselkedés vizsgálatok során vizsgált végpontok (úszás, táplálkozás) szintén érzékenyebb végpontnak minősülnek, mint a mortalitás. A zebradánió viselkedése sok tekintetben hasonlít az emberi viselkedéshez, reagál a fény és hőmérséklet változására, a zajszennyezésre, és a különböző vegyületekre. Elkülönül a napi ritmusuk szerint a sötét/világos ciklus és hasonlóan egyes emlősökhöz, a sötét fázis a pihenő fázis (Dutra Costa et al. 2020, Kopp et al. 2018, Kokel et al. 2010). A zebradánió idegrendszerének a szerkezetére és funkciójára magas konzerváció jellemző (Ingebretson & Masino 2013). A termékenyülést követő 20. órára az embrió reagál a fényre, 24 órát követően a rövid fényvillanásokra erőteljes farokrándulásokkal válaszol (Kopp et al. 2018, Kokel et al. 2010.). A termékenyülést követő 5. napra (dpf) kifejlődik a komplex idegrendszere és elkülönül a nappali, éjszakai aktivitási minta (Woods et al. 2014). Kezdetben a lárvák a sötét ciklusban mutatnak nagyobb aktivitást (Dutra Costa et al. 2020). Az 1 hetes lárvák már a felnőttekre jellemző összetett viselkedési mintázatot mutatnak (Burgess & Granato 2007, Blader & Strahle 2000). Napjainkra automatizáltan vizsgálható a zebradánió viselkedése, mind embrionális, mind felnőtt korban. A tesztek történhetnek többlyukú és méretű szövettényesztő lemezeken, petricsészékben, vagy akár kisebb haltartó medencékben. Az ilyen típusú méréseket gyakran használják a különböző neurotoxicitási vizsgálatok során, valamint a neurológiai betegségeket (pl. Alzheimer-kór,

demencia) célzó kutatásokban (Ton et al. 2006, Legradi et al. 2014 Willlemsen et al. 2010 Newman et al. 2014).

2.3.4.3 A zebradánió korai életciklusában végezhető enzimaktivitási vizsgálatok

Az ökotoxikológiában a biomarkerek használata egyre népszerűbb, hiszen korai választ adnak, a xenobiotikumok okozta károsító hatások detektálásában. A szervezetet ért toxikus kitétség számos fiziológiai és biokémiai reakciót válthat ki, például a reaktív oxigénmolekulák (ROS) termelődésével modulálhatja az anyagcserét, ami oxidatív károsodást okoz a különböző szervezetekben, beleértve a halakat is. Ha a ROS termelés és a sejt antioxidáns enzimaktivitása kiegyensúlyozatlan, az antioxidáns rendszer nem tudja semlegesíteni, vagy megszüntetni a ROS felesleget, így oxidatív stressz jelentkezik (Nishida, 2011). A magas ROS-szint DNS-károsodást, lipid-peroxidációt, fehérjeoxidációt okozhat, és a sejtek redox állapotában és a génexpresszióban bekövetkező változásokhoz vezethet (Vinodhini és Narayanan 2009). A biokémiai markerek segítenek felmérni a szervezet stresszor-indukálta választ (Hernández-Moreno et al. 2010) és fontos szerepet játszanak a környezetszennyezés értékelésében. A halakban az első vonalbeli ROS védelmi antioxidánsok a kataláz (CAT), a glutation-peroxidáz (GPx), a lipid-peroxidáció (LPO) és a szuperoxid-diszmutáz (SOD) (Filho 1996). A SOD katalizálja a szuperoxid gyökök oxigénné és hidrogén-peroxiddá történő átalakulását, a CAT pedig a hidrogén-peroxid bomlását. A peroxidált lipiddtartalom (LPO) mérése segít az oxidatív sejt-károsodás értékelésében (Magni et al. 2017). A glutation-S-transzferáz (GST) egy II. fázisú biotranszformációs enzim, amely fontos szerepet játszik a xenobiotikumok kiválasztásában és méregtelenítésében, és a glutationon keresztül a szervezet peroxidációs állapotát is befolyásolja. A biomarker aktivitás az embriókban és a kifejlett zebradánió egyedek különböző szöveteiben is mérhetőek kidolgozott eljárások (Wills 1987, Ellman et al. 1961, Aebi 1984, Habig et al. 1974, Crapo et al 1978, Paglia & Valentine 1967) segítségével (Oliveira et al 2013).

2.3.4.4 A zebradánió korai életciklusában végezhető genotoxicitás vizsgálatok

A környezetbe kerülő xenobiotikumok hatására bekövetkező élettani változások egyik következménye lehet a genotoxicitás (Chakravarthy et al. 2014, Canedo & Rocha 2021). A genotoxicitás magába foglalja a mutagenitást és a DNS-károsodást (Canedo & Rocha 2021). Az OECD 487-es szabvány iránymutatása alapján genotoxikus hatások közé tartozik minden olyan kromoszóma-, vagy DNS-károsodás, mint például a nukleotid-módosulások és kapcsolódások, a génmutációk, a kromoszóma-rendellenességek, az aneuploidia, vagy a törések, deléciók.

A különböző vegyületek zavarhatják a fehérjék működését, befolyásolhatják a DNS replikációt és DNS károsodást okozhatnak. A genotoxicitás káros mutációk kialakulásához vezethet, amelyek

az utódokban veleszületett rendelleneségeket vagy betegségekre való fogékonyságot eredményezhet (Chakravarthy et al. 2014). Howe és munkatársai (2013) kimutatták, hogy a különböző humán betegségekkel összefüggésbe hozható emberi gének körülbelül 84%-ának az ortológja zebradánióban is jelen van. Halakon, beleértve a zebradániót is, végezhető eljárások közé tartozik a comet assay, a mikronukleusz teszt, a microarray, vagy a polimeráz-láncreakción (PCR, polymerase chain reaction) alapuló vizsgálatok (Chakravarthy et al. 2014). A génexpressziós vizsgálatokat gyakran használják a szennyezőanyagok hatásmechanizmusainak feltérképezésére. Napjainkra számos modellállat teljes genomja ismert, valamint számos gén/génkaszkád működése is. A kapott adatokat bioinformatikai módszerekkel értékelik, az elérhető adatbázisokkal összevetve pedig megállapítható, mely biokémiai útvonal érintett a károsodás során (Lettieri 2006).

A biotechnológia fejlődésének köszönhetően a riporter gének alkalmazásával napjainkra számos transzgénikus vonal elérhető a vad típusú és a mutáns vonalak mellett (Chakravarthy et al. 2014). Előszeretettel használják őket a toxikológiai vizsgálatok során (da Silva Brito et al. 2022), hiszen többlet információk nyerhető a transzgénikus vonalak alkalmazása által, így nő a tesztek hatékonysága, érzékenysége (Dai et al. 2014). A ZFIN (Zebrafish Information Network, <https://zfin.org>) adatbázis egy központi adattár, amely összegyűjti és tárolja a különböző vonalak genetikai, genomika és fenotípusos kutatásaiból származó eredményeket, így segítve a kutatók munkáját.

2.3.4.5 A zebradánió korai életciklusában végezhető regenerációs vizsgálatok

Az élő szervezeteket ért környezeti terhelés befolyásolhatja az esetleges sérülések okozta felépülést, így akár a túlélést is. A sérült szervek kétféle (hegesedés, regeneráció) mechanizmus mentén képesek gyógyulni. A hegesedés során a seb helyén kollagénben gazdag kötőszöveti heg képződik, általában erős gyulladás, fibrózis mellett. A regeneráció azonban egy olyan folyamat, amelynek során a sérült, vagy esetleg hiányzó szerkezet tökéletesen, vagy majdnem tökéletesen pótlódik. Az emlősökben a legtöbb szerv hegesedéssel gyógyul, azonban a máj regenerálódik. Az alacsonyabb gerinces szervezetek között azonban számos faj képes a regenerációra, így képesek újranoveszteni akár a végtagjaikat vagy a farkukat is (Poss et al. 2003, Dinsmore 2007). A zebradánió számos struktúrája (úszók, látóideg, pikkelyek, szív) képes regenerálódni, így jó modellállata az ilyen típusú vizsgálatoknak (Poss et al. 2003). A leggyakrabban a farokúszót használják a regeneráció vizsgálatok során, mivel könnyen hozzáférhető, a létrejött sérülés nem befolyásolja a túlélést, viszonylag egyszerű, szimmetrikus szerkezetű (Poss et al. 2003). Az uszony csontváza bőr eredetű, nem tartalmaz vázizmot, vagy a porcok mineralizációjával létrejövő endochondralis csontot, így közvetlenül csontként mineralizálódik. A farokúszó több csontos

végből, úgynevezett lepidotrichiából áll, sugarakat alkotva. A sugarak közötti mezenchinális kompartmentekben és a sugarak közötti terekben találhatóak az erek, idegek, pigmentsejtek és a fibroblasztszerű sejtek (Géraudie & Singer 1992). A zebradánió úszói folyamatosan nőnek, állandó hosszúságú szegmensek adódnak hozzá az úszósugár végéhez (Iovine & Johnson 2000, Poss et al. 2003). A regenerációs folyamatot a hőmérséklet befolyásolja. Johnson és Weston (1995) megállapították, hogy 33 °C fokon közel kétszer gyorsabban végbemegy a folyamat és az amputációt követő 12 órán belül vékony epitélium réteg fedi a sebet, mint 25°C-on. Számos munka elérhető, amely pontosan ismerteti adult egyedeken és lárvákon is az eljárás lépéseit (Poss et al. 2003, Schebesta et al. 2006, Lebedeva et al. 2020).

3. Anyag és Módszer

3.1 A kísérletek helyszíne, az állatok tartása

A kísérleteket az egykori Szent István Egyetem, MKK-KTI, Halgazdálkodási Tanszékén (ma Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet) végeztem. A vizsgálataim során zebradánió halfaj AB vad típusát és transzgenikus vonalait használtam. A halakat, állandó vízminőségi paramétereken (rendszervíz: $25\pm 0,5$ °C, pH $7,0\pm 0,2$, vezetőképesség 500 ± 50 μS , 0 mM CO_3^{2-} , $0,4$ mM HCO_3^{2-} , keménység $< 0,5^\circ$ dH; DOC $> 90\%$) tartottam, a folyamatos vízátfolyást biztosító recirkulációs rendszerben (Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Italy). Az állatok számára a 14 órás nappali megvilágítást és a 10 órás éjszakai időszakot egy fényprogram biztosította. A halakat naponta kétszer etettük ZEBRAFEED (Sparos, $400\text{--}600$ μm) táppal és hetente kétszer kaptak frissen kelt sórák lárvákat (*Artemia* spp) (Ocean Nutrition > 230000 NPG).

A vizsgálatok során felhasznált zebradánió embriókat a felnőtt egyedek ivásából nyertem. Az ivást megelőző nap délutánján az anyahalakat 1 literes, speciálisan kialakított szaporító edénybe (Tecniplast) helyeztem, ami biztosította a halak számára a közös víztestet. Az ikrás és a tejes egyedeket egy átlátszó polikarbonát lemez segítségével szeparáltam el egymástól. Az ivás reggelén, a válaszfalak egyidejű eltávolításával szinkronizáltan elkezdődött a halak szaporodása. Az ivatást követően az ikrákat összegyűjtöttem és szétválogattam sztereómikroszkóp (Leica M205 FA, Wetzlar, Germany) alatt. A megtermékenyült és normális sejtosztódást mutató embriók kerültek kiválogatásra az OECD 236 szabvány ajánlása alapján.

3.2 Bioetikai állásfoglalás

Az elvégzett vizsgálatok az Európai Parlament és a Tanács tudományos célra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU irányelveiben foglaltak szerint zajlottak. A doktori munka során önállóan nem táplálkozó stádiumban lévő zebradánió embriók, lárvák kerültek felhasználásra.

3.3 A kísérletek során felhasznált zebradánió vonalak jellemzése

AB: Vad típusú, rövidúszójú vonal. Streisinger György által vásárolt, 2 különböző állományából létrejött vonal, amit több különböző speciális keresztezési eljárás során mentessítettek az embriókori letális mutációktól.

2.2*shh:gfp:ABC#15*: Az AB vad típusú vonalán alapuló, rövidúszójú transzgenikus vonal. A vonal egy zöld fluoreszcens (*gfp*) fehérjét hordoz, mely a sonic hedgehog (*shh*) promoterének

szabályozása alatt, és a gerincvelő fenéklemezében és a gerinchúrbán (notochord) fejeződik ki (Müller et al. 1999, Shkumatava et al. 2004, Hadzhiev et al. 2007).

Tg(*mpx*:EGFP): Az AB vad típusú vonalán alapuló, rövidúszójú vonal. A transzgenikus vonalban a fokozott zöld fluoreszcens protein (*egfp*) transzgén expressziója a neutrofil granulocita-specifikus mieloperoxidáz (*mpx*) promotor szabályozása alatt áll (Renshaw et al. 2006).

3.4 Felhasznált anyagok

A *bendiocarb* (C₁₁H₁₃NO₄, Sigma-Aldrich Hungary, Budapest, Pestanal®, analitikai standard, CAS-szám: 22781-23-3) hatását vizsgáltam. A tesztanyagból a vizsgálatokat megelőzően friss törzsoldatokat készítettem, amelyeket közvetlenül a felhasználás előtt készítettem.

A törzsoldat készítése során a *bendiocarb*ot dimetil-szulfoxidban (C₂H₆OS vagy, (CH₃)₂ SO, DMSO, Sigma-Aldrich Hungary, Budapest, CAS- szám: 67-68-5) oldottam fel.

3.5 Akut embrió tesztek

A *bendiocarb* kapcsán nem állt rendelkezésemre zebradánió embriókra vonatkozó akut toxicitási adat, így egy szélesebb koncentráció tartománnyal dolgoztam (8. táblázat).

Teszt anyag	Vizsgált koncentrációk (mg/L)
<i>bendiocarb</i>	200; 100; 50; 41,60; 34,60; 28,80; 25; 24; 20; 16,60; 13,80; 12,50; 11,50; 9,58; 7,98; 6,65; 6,25; 3,12; 1,56; 1,30; 1,08; 0,78; 0,39

8. táblázat: Az akut embrionális vizsgálatoknál alkalmazott *bendiocarb* koncentrációk.

A 96 órás akut embrió toxicitási vizsgálatokat az OECD 236-os iránymutatása alapján terveztem. A tesztekhez szükséges ikrákat az anyahalak szinkronizált szaporítása után összegyűjtöttem, szétválogattam és a 8 sejtes állapotot megelőzően a tesztedényekbe helyeztem. A teszt időtartalma 96 óra volt, napi oldatcserével biztosítottam az állandó koncentrációt. A tesztek 24-es szövettényesztő lemezekben végeztem, minden koncentráció esetében 20 embriót vizsgáltam, három ismétlésben. A tesztek egymástól független időpontban kétszer megismételtem. Negatív kontrollként rendszervizet használtam és oldószeres kontroll (0,026 v/v% DMSO rendszervízben oldva) csoport is beállításra került. Az akut embrió toxicitás teszteléskor 200 mg/L-es törzsoldatot alkalmaztam, majd az alkalmazott koncentrációkat ezen törzsoldat hígításával állítottam elő, biztosítva az egységes DMSO koncentrációt.

A 96 órás akut embrió toxicitási vizsgálat során meghatároztam a mortalitást és embrionális fejlődési rendellenességeket kerestem az OECD 236 irányelve alapján. Vizuálisan összehasonlítottam a melanociták számát és méretét a kontroll csoportokkal. 72 órával a

termékenyülés után, a lárvák kelését követően digitális felvételeket készítettem az embriókról laterális orientációval a Leica M205 FA sztereomikroszkóp segítségével (LAS X szoftver, zoom 30X, exp. idő: 4,0 ms). A teszt végpontjaként kiszámoltam az LC/EC_{1, 10, 50, 90}-es értékeket probit-analízissel az OECD-irányelv szerint.

3.6 A szubletális *bendiocarb* expozíció káros hatásainak feltérképezésére irányuló embrionális vizsgálatok

Az akut embrionális vizsgálatok eredményei alapján szubletális *bendiocarb* koncentrációkat (9. táblázat) választottam ki, a *bendiocarb* expozíció szubletális következményeinek meghatározására. Negatív kontrollként rendszervizet használtam és oldószeres kontroll (DMSO) csoport is beállításra került. A DMSO-expozíció az OECD 236 irányelve alapján határérték alatt volt (0,01 v/v%).

Teszt anyag	Vizsgált koncentrációk (mg/L)
<i>bendiocarb</i>	3, 1,5; 0,75; 0,4; 0,07

9. táblázat: A szubletális embrionális vizsgálatoknál alkalmazott koncentrációk

A kísérleteket 10 cm-es Petri csészékben végeztem, napi oldatcsere mellett. A szubletális vizsgálatok során 3 mg/L-es törzsoldatot alkalmaztam, majd az alkalmazott koncentrációkat ezen törzsoldat hígításával állítottam elő, biztosítva az egységes DMSO koncentrációt. Minden vizsgálati koncentráció esetében három párhuzamos lett beállítva és a tesztek egymástól független időpontban kétszer megismétlésre kerültek. A vizsgálati edényekbe 50 ml teszt-, vagy kontrolloldat került. A tesztek során felhasznált ikrák az anyahalak szinkronizált szaporítása után, átválogatást követően (8 sejtes állapotot megelőzően) kerültek a Petri csészékbe. A tesztek hossza 96 óra volt, hasonlóan az akut teszthez és ezt követően történtek a további vizsgálatokhoz szükséges mintavételek.

3.6.1 Morfológiai vizsgálatok

Az akut embrió toxicitási eredmények alapján morfológiai vizsgálatot végeztem, hogy megállapítsam a *bendiocarb* hatását a teljes testhosszra és a notochord régió hosszára. A 2.2*shh:gfp:ABC#15* transzgenikus vonal (*shh:GFP*) alkalmas a gerincvelő fenéklemezét és az agyat érintő morfológiai vizsgálatokhoz, így ezen a vonalon határoztam meg a teljes test- és notochord hossz alakulását.

96 órával a termékenyülés után digitális felvételeket készítettem az embriókról laterális orientációval a Leica M205 FA sztereomikroszkóp alatt (LAS X szoftver, zoom: 30X, exp. idő: 5.67 ms, GFP2 ET exp. idő 800,534 ms). Minden koncentráció esetében 10 lárváról készült

felvétel ismétlésenként. Az elkészült fényképeket az Image J szoftver segítségével, méretskála alkalmazásával elemeztem (Rasban 2020).

3.6.2 Pulzusszám mérés

A pulzusszám mérés 48 órával a termékenyülést követően történt. Minden kezelési párhuzamosban 10 lárva szív működése lett rögzítve (20 sec), laterális orientációval, a Leica M 205 FA mikroszkóppal (szoftver LAS V 3.8, zoom: 9,5 exp. idő: 40,1 ms). Az elkészült felvételeket lassítottam, majd manuálisan leszámoltam a lárvák szívverését. A mérési biztonság érdekében az embriók szívfrekvenciáját minden felvételen háromszor számoltam meg, ezt követően átlagoltam a kapott eredményeket.

3.6.3 Enzimaktivitás vizsgálatok zebradánió embriókon

3.6.3.1 Szövet-előkészítés és biokémiai marker mérések

A termékenyülést követően 48, 72 és 96 órával mintát vettem a kezelésekből. 20 lárvát helyeztem az Eppendorf- csövekbe (két részmintát, minden ismétléshez) és homogenizáltam (TissueLyser LT, Qiagen, Germantown, MD, USA). Ismétlésenként három párhuzamosban értékeltem az enzimaktivitást 25 °C-on, Thermo Varioskan™ LUX szövettenyésztő (plate) leolvasó spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. Az összegyűjtött mintákból egy részmintát általános pufferben (25 mM Hepes-NaOH, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.4) homogenizáltam 1:5 tömeg/térfogat arányban. A homogenizátumokat -80°C-on lefagyasztottam a lipid-peroxidáció (LPO) és a teljes fehérjetartalom méréshez. A fennmaradó részmintákat 100 mM foszfátpufferben (pH 7,4) homogenizáltam, amely 100 mM KCl-t, 1 mM EDTA-t, ditiotreitolt (DTT), 0,5 M szacharózt és 40 µg/ml aprotinint tartalmazott majd 12,000 G-n 30 percig, 4°C-on centrifugáltam. A felülúszókat összegyűjtöttem, és az alikvot részeket -80 °C-on tartottam az AChE, a GPx, a GST, a CAT és a SOD aktivitásának méréséig. A minták fehérjekoncentrációját három párhuzamosban határoztam meg a Bradford módszer segítségével (Bradford 1976), mikrolemezre (microplate) adaptálva. Standartként szarvasmarha szérumalbumint használtam, az abszorbanciát 595 nm-en rögzítettem 15 perces inkubációt követően.

3.6.3.2 Lipid-peroxidáció mérése

A lipid-peroxidációt a szövet homogenizátumokban a malonaldehid képződése alapján értékeltem a Wills által kidolgozott tiobarbitursav módszerrel (Wills 1987). 150 µl-es homogenizátumot összekevertem 300 µl 10%-os 1 mM FeSO₄ tartalmú TCA-val és 150 µl 0,67%-os tiobarbitursavval. A kapott elegyet 10 percen keresztül 80°C-on melegítettem, majd a képződött

csapadékot centrifugálással (10,000 G, 10 sec) eltávolítottam. A felülúszót fluoreszcencia mérésnek vettem alá 516 nm/600 nm (abszorpció/emisszió) mellett. A vak és a tetrametoxi-propán standardok homogenizáló pufferből készültek. Az eredményeket a tiobarbitursav reaktánsok (TBARS) mikromoljaiban adtam meg, a homogenizált fehérje milligrammjára vonatkoztatva.

3.6.3.3 AChE aktivitásmérés

Az AChE aktivitás meghatározását Ellman et al. 1961. szerint végeztem, mikrolemezre adaptálva azt (Guilhermino et al. 1996). 96-os szövettenyésztő lemezbe, 3 ismétlésben 50 μ l homogenizált felülúszót és 250 μ l (0,075 M acetil-tiokolin-jodid és 10 mM 5,5 ditio-bisz (2-nitrobenzoe sav) foszfátpuffer (0,1 M, pH 7,2) oldatot helyeztem. A mérések során a vak mintákat foszfát pufferrel helyettesítettem és pozitív kontrollként elektromos angolna acetilkolin-észterázt használtam. Az abszorbanciát 414 nm-en mértem, 15 perc hosszan percenként. Az enzimaktivitást az abszorbancia görbe meredekségéből számítottam ki és egységben (U, unit) adtam meg a fehérjetartalom mg-ra vonatkoztatva (1U 1 μ mol hidrolizált szubsztrát/ perc).

3.6.3.4 CAT aktivitásmérés

A kataláz enzim aktivitását szintén 3 párhuzamosban mértem Aebi (1984) módszerét alkalmazva. Egy 50 mM H₂O₂ oldat ($\epsilon = -0.0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 50 mM foszfátpufferben (pH 7,8) 10 μ l szövet felülúszó abszorbanciájának a csökkenését a rendszer folyamatosan rögzítettem 240 nm-en, 1 percen keresztül 10 másodpercenként. Az eredményeket U/mg fehérje jelöléssel fejeztem ki: a CAT egységét az enzim mennyiségként határoztam meg, amely katalizálja 1 mmol H₂O₂/ min.

3.6.3.5 GST aktivitásmérés

A glutation-S-transzferáz aktivitást Habig et al. (1974) módszerével határoztam meg, mikrolemezre adaptálva. A folyamat során 100 mM glutation (GSH) oldatot foszfát pufferben (pH 6,5) közvetlenül a mérés előtt készítettem el. Hasonlóan jártam el a 60 mM 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB, $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) etanolban történő oldása során. A reakcióhoz szükséges keveréket az alábbiak szerint állítottam össze: 4,95 ml foszfát puffer, 0,9 ml GSH-oldat és 0,15 ml CDNB-oldat. 0,1 ml mennyiségű mintához 0,2 ml reakcióelegy lett adva és azonnali mérés következett. A GST aktivitást 20 másodpercenként, 340 nm-en, az első 5 percben mértem. Pozitív kontrollként lómájából származó GST-t használtam. Az enzimaktivitás az abszorbancia görbe meredekségéből lett kiszámítva és egységben (U, unit) lett megadva a fehérjetartalom milligrammjára vonatkoztatva (1 U 1 μ mol hidrolizált szubsztrát/ perc)

3.6.3.6 Glutation-peroxidáz aktivitásmérés

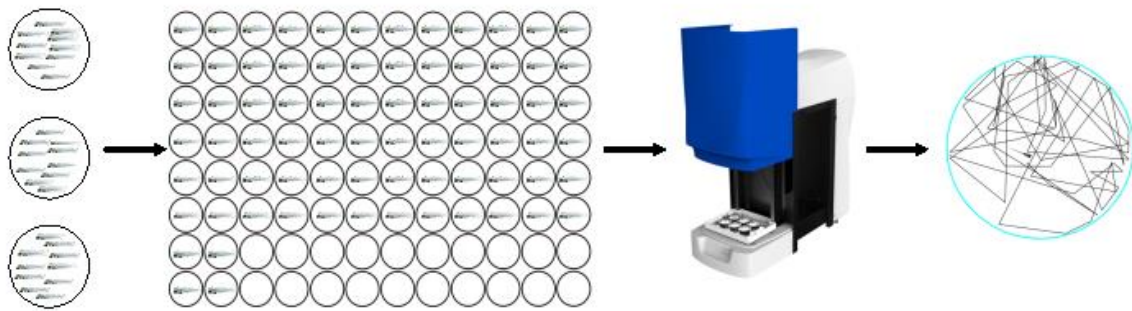
A glutation-peroxidáz aktivitás méréshez Paglia & Valentine (1967) módszerét vettem alapul, Lawrence & Burk (1976) általi módosításokkal, amit 96 lyukú szövettenyésztő lemezre adaptáltam (Faria et al. 2009). A reakcióhoz szükséges keverék a következőképpen tevődött össze: 100 mM foszfát puffer (pH 7,5), 2 mM GSH, 2 U glutation reduktáz, 0,12 mM NADPH, 0,5 mM nátrium-azid és 0,2 mM H₂O₂ vagy 3 mM kümén-hidroperoxid (CHP) oldat. A GPx aktivitását a NADPH koncentráció csökkenésével állapítottam meg 340 nm-en. A NADPH csökken ahogy a GSH oxidált glutationból ($\epsilon = 6,2 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) képződik, felhasználva szubsztrátként a hidrogén-peroxidot (H₂O₂, Se-függő aktivitás) vagy kümén-hidroperoxidot (CHP, teljes GPX). A GPx aktivitás U/mg fehérje egységbe került kifejezésre (egy U megfelel 1 M hidrolizált NADPH / perc).

3.6.3.7 SOD aktivitásmérés

A teljes szuperoxid-diszmutáz aktivitást 3 párhuzamosban mértem a xantin-oxidáz/citokróm c módszerrel (Crapo et al. 1978). A xantin-oxidáz/hipoxantin reakció által indukált szuperoxid-anionok általi citokróm c redukcióját 550 nm-en detektáltam, szobahőmérsékleten. A reakció keverék összetétele: 46,5 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 8,6), 0,1 mM EDTA, 195 mM hipoxantin, 16 mM citokróm c és 2,5 mU xantin-oxidáz. Az enzim aktivitását az abszorbancia görbe meredekségéből számítottam és egységben (U) került megadásra a fehérje milligrammjára vonatkoztatva (1 U a citokróm redukció sebességének 50%-os gátlását okozza).

3.6.4 Viselkedés vizsgálatok

A 96 órás *bendiocarb* kitettséget követően viselkedés vizsgálatokat végeztem. A viselkedés vizsgálatok során lapos aljú 96 lyukú szövettenyésztő lemezbe helyeztem az állatokat. Minden koncentráció esetén 10 lárvát vizsgáltam ismétlésenként (1 lárva/lyuk) a Zebrabox rendszer (ViewPoint Life Science, Franciaország, 6. ábra) segítségével. A rendszer videofelvételeket készített a lárvákról későbbi elemzések céljából. A vizsgálat hossza 40 perc volt, és a lárvák a szabad mozgásukban nem voltak akadályozva. A vizsgálat során a fotoperiódus stimulálás érte a lárvákat: 10 perc világos (nappali fény) szakasz, 20 perc sötét (éjszakai fény) szakasz és 10 perc világos szakasz. A kísérlet során vizsgáltam az átlagos úszási távolságot, a nagy és kis mozdulatokkal megtett teljes távolságot és az időt, amelyet ezen mozgásformákkal töltenek a lárvák.



6. ábra: A viselkedés vizsgálat kísérleti beállítása a Zebrabox rendszerbe

3.6.5 RNS szekvenálás és transzkriptom analízis

A Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végeztük a teljes RNS szekvenálást és a későbbi analízist is. A vizsgálat során az embrionális *bendiocarb* expozíciót a szubletális koncentráció sor egy alacsonyabb (0,4 mg/l) és a legmagasabb (3 mg/l) koncentrációival végeztük el. A kezelés végén 4 ismétlésben, ismétlésenként 30 lárva került 200 µl Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csőbe. A minták homogenizálását követően 400 µl-re kiegészítettük és -80 °C hőmérsékleten tároltuk. Az RNS izolálás kloroformos elválasztással, izopropanolos precipitációval és etalonos mosással végeztük, majd az integritást Eukaryotic Total RNA Nano Kittel és Agilent BioAnalyzer készülékkel határoztuk meg. Azok a minták kerültek szekvenálásra, ahol az RNS integritás értéke (RNA integrity number, RIN) nagyobb volt 7-nél. Az Ultra II RNA Sample Prep Kit felhasználásával készült az RNS könyvtár. Első lépésben a poli(A)farokkal rendelkező mRNS-t a mágneses gyöngyökkel konjugált deoxitimin szekvenciához kötöttük, majd eluáltuk és végül fragmentáltuk. Reverz transzkripció és random primerek használatával létrehoztuk a cDNS-eket. A szekvenálást Illumina NextSeq500 készülékkel végeztük el, az adapter ligálását követően. A nyers adatokat HISAT2 algoritmus felhasználásával illesztettük a zebradániónál használt referencia genomhoz (GRCz11). StrandNGS szoftver használatával azonosítottuk a differenciálisan expresszálódó géneket. Végül a kapott eredményeket gén-ontológiai elemzéssel (*Gene Ontology Enrichment Analysis*, GOEA) és a Cytoscape/ClueGo szoftver segítségével (Bindea et al., 2009) értékeltük.

3.6.6 Génexpressziós szintek meghatározása

A transzkriptom analízis eredményei és a szakirodalmak alapján különböző markergének kerültek kiválasztásra. Kifejeződésüket reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) mértem meg. A *bendiocarb* expozíciót követően csoportonként 5 ismétlésben, ismétlésenként 30 lárva 200 µl Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csőbe helyeztem, majd homogenizáltam (30 lárva/cső). A homogenizátumokat 400 µl-re kiegészítettem

és -80 °C hőmérsékleten tároltam. Az RNS izolálás, a korábbiakhoz hasonlóan, kloroformos elválasztással, izopropanolos precipitációval és etanolos mosással végeztem. A nukleáz-mentes, izolált vízben felvett RNS mennyiségét, minőségét NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) spektrofotométerrel értékeltem. A komplementer DNS-ek létrehozásához High Capacity cDNA Reverse Transcription kit került alkalmazásra. A reakciókat LightCycler 480 II (Roche) készülékben, 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix használatával végeztem (7. ábra).



7 ábra: Az szubletális vizsgálatoknál alkalmazott RT-qPCR hőmérsékleti ciklus

A kapott eredményeket az *efla* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítottam és normalizált mRNA szinten fejeztem ki. A gén-ontológiai elemzés számos, szignifikáns mértékben gátolt, vagy indukált biológiai folyamathoz kapcsolódó géneket azonosított. A vizsgált folyamatok során a teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltan expresszált gének azonosításra kerültek. Ezt követően olyan gének kerültek kiválasztásra, amelyek indukálódása/represszálása kiemelkedő volt a kezelés hatására. Ezen gének vizsgálata egyrészt az eredmények validálására szolgáltak, másrészt a kiválasztott koncentráció tartomány hatását vizsgáltam általuk. A vizsgált génekhez tartozó primerek szekvenciáit az 10. táblázat tartalmazza.

	Primer szekvencia	Humán ortológ gének
<i>cxcl8b.1</i>	F AAACGACAAGTACTCGGACTGAA R GACAAATCTGTCCCTTTCTTAAGTGTG	CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8)
<i>cxcl18b</i>	F AACAGCAGGGCCAATTACTG R TCTTCAGCGAGTCGGTGT TA	-
<i>rho</i>	F GTCTTCCAGCTCCGTGTCTC R GTCGCTGCTTCGAGAGTGT	RHO (rhodopsin)
<i>desma</i>	F GCAGTCCTTTTCATCCCTGA R AGCGTTGTGGTTGCTGCT	DES (desmin)
<i>fn1b</i>	F TCAGGGGTCAAGTGTAGATCC R GGTAGGAACGTGCGTTGAAT	FN1 (fibronectin 1)
<i>hspb11</i>	F TCGGAAAGGAAGGAAGCCAT R TTCTTCTCCGTCTTCCGCT	HSPB11 (heat shock protein family B (small) member 11).
<i>opn1mw2</i>	F ATGGCTCTAGGTCCTACAGG R TTCCCATTTGGCTTGCAAACC	-

10. táblázat: Az RT-qPCR által vizsgált génekhez tartozó primer szekvenciák.

3.6.7 Szövetteni vizsgálat

96 órás *bendiocarb* expozíciót követően mintát vettem szövetteni vizsgálatokhoz. A szövetteni metszetek elkészítése és elemzése Állatorvos-Tudományi Egyetem Patológiai Tanszékén történt. A 8%-os pufferolt formaldehydhen rögzített halakat felszálló alkoholsorban, majd abszolút etanolban történt víztelenítés után xilollal impregnáltuk 56 °C-on. A mintákat ezt követően Paraplast-ba ágyasztuk, majd szánkamikrótommal metszeteket készítettünk. A metszeteket kétszer váltott xilolban deparafináltuk, majd leszálló alkoholsorozatban (abszolút etanol, 96 %, 90%, 80%, 70%, 50%-os etanol) történt mosást követően, desztillált vízzel mostuk. Végül hematoxilinnel és eozinnal festettünk a későbbi mikroszkópos vizsgálatokhoz.

3.6.8 Nitrogén-monoxid termelődés mérése, *in vivo*

A nitrogén-monoxid lárvákon belüli termelődését a diaminofluoreszcein-FM diacetát (DAF-FM-DA) fluoreszcens próba felhasználásával értékeltem és Lepiller et al. (2007) protokollját vettem alapul. A 96 órás *bendiocarb*os kezelést követően a lárvákat egyenként egy 96 lyukú szövettenyészti lemezre helyeztem át. A mikrolemez vájataiba előzetesen 200 µl 5 µM DAF-FM-DA oldat volt pipettázva. Az inkubálást (25,5 °C, 1 óra, sötét) követően a lárvákat rendszervízzel átmostam és elaltattam trikain-metánszulfonát oldat hozzáadásával (MS222, 168 mg/l). Az altatás után a lárvákat laterálisan pozicionáltam és a Leica M205 FA sztereomikroszkóp alatt (LAS X szoftver, zoom 3X) GFP szűrővel fotóztam. A fluoreszcens intenzitást a lárvák notochord régiójában az Image J szoftver segítségével mértem (Rasban 2020). A nitrogén-monoxid termelődés mértéke egyenesen arányos a fluoreszcencia intenzitásával (Lepiller et al. 2007).

3.6.9 A neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás meghatározása

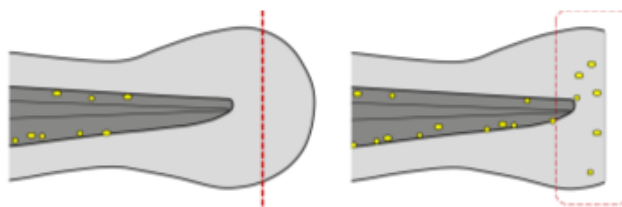
A Tg(*mpx:EGFP*) transzgenikus zebradánió vonal utódai kerültek a vizsgálat során felhasználásra, mert alkalmasak a neutrofil granulociták számszerűsítésére, eloszlás vizsgálatára. A Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében végeztük a teljes lárvákra vetített neutrofil granulocita sejtszám meghatározást, fluoreszcencia aktivált sejtválogatással (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). A minták két független kísérletből származtak, csoportonként három ismétlésben. Ismétlésenként 15 lárvá került jeges vízzel lehűtött mikrocentrifuga-csővekbe. Ezután a lárvákat Ringer-oldatban átmostuk, majd 0,25 % -os Tripszin-EDTA hozzáadásával emésztettük. Az emésztés leállítására magzati szarvasmarha szérum (FBS, fetal bovine serum) és kalcium-klorid hozzáadásával történt. Centrifugálást (400 G, 5 min) követően a minták reszuszpendálása 5 %-os FBS/PBS-ben történt és 40 µm pórusméretű sejtszűrő kosarakkal szűrtük

át őket. NovoCyte Flow Cytometer készülék használatával határoztuk meg az EGFP+ sejtek gyakoriságát, 10^5 sejtre vonatkozóan.

A lárvákon belüli neutrofil granulocita eloszlás megállapításához laterális orientációval, GFP szűrővel fényképeket (Leica M205 FA, LAS X, zoom:3X) készítettem a lárvákról, a *bendiocarb* kezelés végén. A fényképezés előtt a lárvákat elaltattam trikain-metánszulfonáttal (MS222, 168 mg/l). A neutrofil granulocita eloszlást az elkészült fényképek alapján értékeltem, majd a notochord régióban található EGFP+ sejteket az Image J szoftver segítségével összesítettem (Rasban 2020).

3.6.10 Farokúszó sebzésén alapuló elváltozások

A farokúszó metszés Cheng et al. (2020) módszere alapján végeztem kisebb módosításokkal (8. ábra). A *bendiocarb* kezelést követően a 84 hpf Tg(*mpx:EGFP*) lárvákat érzéstelenítettem trikain-metánszulfonáttal (MS222, 168 mg/l) majd a notochord és a farokvég között, egy egyenes vonal mentén farokmetszést végeztem steril borotvapengével. Ezt követően a lárvákat friss rendszervíz tartalmazó 24 lyukú sejtenyészítő lemezekbe helyeztem. A sérülés helyére történő neutrofil vándorlást GFP szűrővel felszerelt Leica M205 FA sztereomikroszkóp (LAS X szoftver) segítségével rögzítettem, a sérülést követően 4 és 12 órával. A seb környékén megjelenő neutrofilek számát az Image J szoftver segítségével számoltam (Rasban 2020).



8. ábra: Farokúszó sebzés sematikus ábrája. A piros vonal jelöli a metszés helyét. A piros téglalappal jelölt rész pedig a neutrofil vándorlás során vizsgált területet.

3.7 Statisztikai értékelés

Az akut embrionális teszt során kapott adatokat a Prism 6.0 (6.01 for Windows) statisztikai szoftvercsomaggal elemeztem (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Nem lineáris regressziót alkalmaztam, az elemzések során és 95 %-os konfidencia intervallumot használtam.

A szubletális vizsgálatok során kapott eredmények normalitás-vizsgálatát Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Smirnov próbával végeztem. A csoportok közötti statisztikai különbségeket a normalitás-vizsgálattól függően egyszempontos nem-paraméteres ANOVA-val (Kruskal-Wallis teszt és Dunn-féle post hoc teszt) vagy egyszempontos paraméteres ANOVA-val és Dunnett-féle post hoc testtel értékeltem. A kapott eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltam.

Az enzimaktivitás vizsgálatok során kapott adatokat az OriginPro (2019-es verzió, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) szoftvercsomag segítségével elemeztem. A biokémiai marker aktivitások koncentrációfüggésének kimutatására nemlineáris regressziót alkalmaztam (a dózis-hatás görbe illesztése változó Hill meredekséggel, amelyet a „p” paraméter adja, a görbék konfidencia szintje: 95%). A különböző *bendiocarb* koncentrációk és az expozíciós idő biokémiai markerekre gyakorolt interaktív hatásának vizsgálatára kétirányú varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam, ahol az idő (t = 48; t = 72 és t = 96 hpf), a kezelés (kontroll, DMSO, 3, 1,5, 0,75, 0,4 és 0,07 mg/l), és ezek kölcsönhatása kategorikus prediktor faktor volt, míg a mért biomarkereket függő változónak tekintettük. Amikor a *bendiocarb* koncentráció és az expozíciós idő kölcsönhatását észleltem, egyirányú ANOVA-t végeztem, hogy megvizsgáljam az egyik fő tényező hatását a másik fő tényező meghatározott szintjén. A szignifikánsnak talált tényezőket tovább elemeztem post-hoc Tukey-teszttel. A statisztikai elemzések előtt a nyers adatokat az eloszlás normalitása és a variancia homogenitása tekintetében Kolmogorov-Smirnov teszttel, illetve Levene's teszttel elemeztem.

A transzkriptom analízis során korrigált T-próba (Moderated T-test) és Benjamini-Hochberg FDR korrekció került alkalmazásra.

A vizsgálatok elemzése során, ha a p értéke kisebb volt 0,05-nél, akkor statisztikailag szignifikánsnak tekintettem a kapott eredményeket.

4. Eredmények

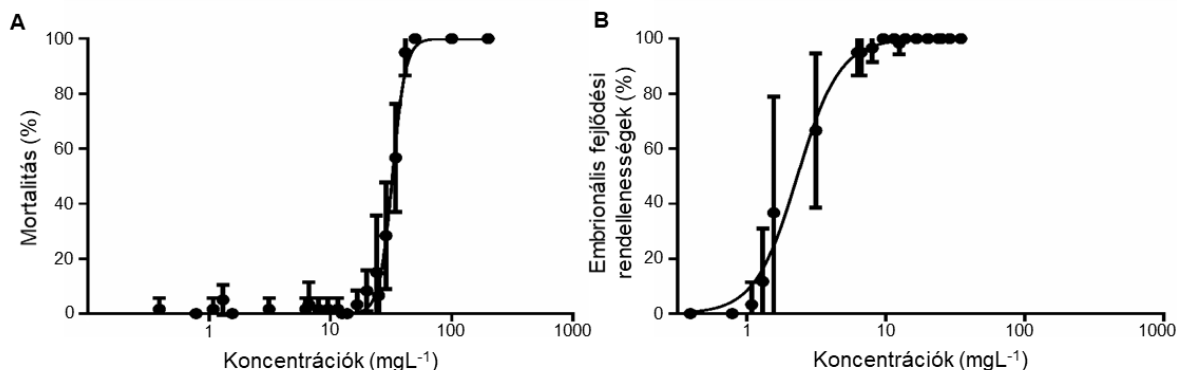
4.1 A halembrió toxicitás teszt eredményei

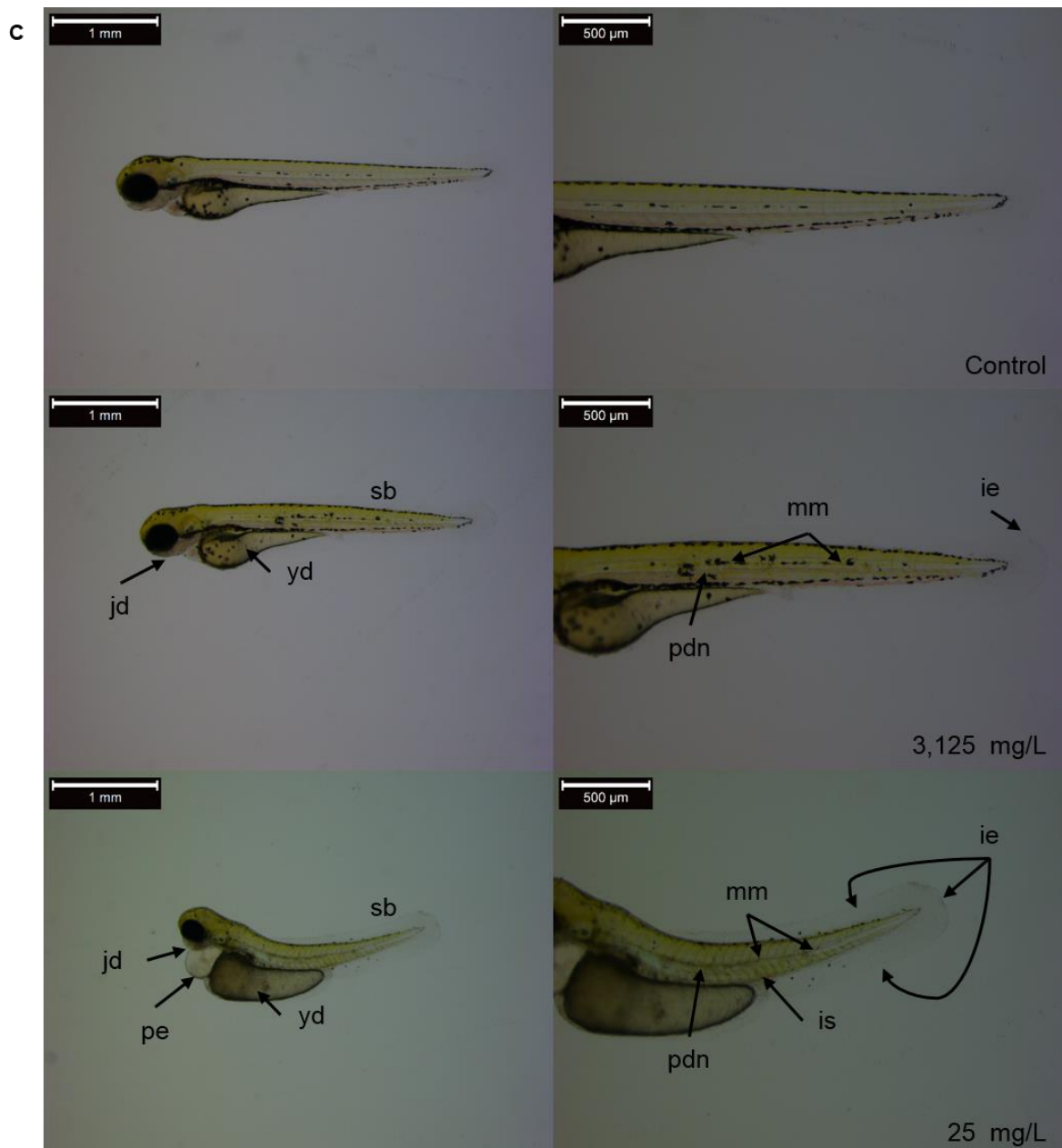
A 96 órás *bendiocarb* kezelést követően kiszámoltam az LC/EC_{1, 10, 50, 90}-es értékeket (11. táblázat). A mortalitási adatok alapján a *bendiocarb* fél-halálos koncentrációja 96 órával a termékenyülés után 32,52 mg/l (9. A. ábra).

	LC/EC értékek (mg/L)			
	90	50	10	1
Mortalitás	42,73	32,52	24,74	18,36
Embrionális fejlődési rendellenességek	4,98	2,30	1,06	0,46

11. táblázat: Az akut vizsgálatok LC/EC_{1, 10, 50, 90} eredményei 96 órás *bendiocarb* expozíciót követően.

A *bendiocarb* embriókra gyakorolt hatásának vizsgálatokor különböző deformitásokat tapasztaltam, melyek megjelenése dózis-hatás összefüggést mutatott. Ezen deformitások alapján számított EC₅₀ 2,30 mg/l volt 96 órás kitettség esetében (9. B. ábra). A legjellemzőbb megfigyelt deformitások a 3,12 mg/l feletti koncentrációk esetében a farokfejlődési rendellenességek voltak és a 0,39 mg/l feletti kezeléseknél a lárvák testhossza csökkent. Ezeken kívül megfigyelhetőek voltak egyéb fejlődési rendellenességek (deformálódott szikhólyag, rövidebb test, perikardiális ödéma, kissé szabálytalan szomita határok, mérsékelt, szabálytalan élű has-és farokúszó) a 96 órás kezelés során és a melanociták száma, mérete, elhelyezkedése is jelentősen változott a kontroll (negatív, oldószeres) csoportokhoz képest. 25 mg/l és feletti kezeléseknél azonban nem voltak láthatóak melanociták (9. C. ábra). Ilyen elváltozásokat sem a negatív, sem pedig az oldószeres kontroll csoportban nem találtam.





9. ábra: (A) Különböző koncentrációjú *bendiocarb* hatásának kitett zebradánió embriók mortalitása és (B) embrionális deformitásai 96 órás teszt során. A hibásávok a tényleges végpont szórását jelzik. (C) Néhány észlelt rendellenesség (jd: nem jól azonosítható állkapcsok; yd: a szikhólyag alakja deformálódott; sb: rövidebb test; pe: perikardiális ödéma; mm: a szabálytalan melanociták száma és mérete; ie.: has- és farokúszó mérsékelt, szabálytalan éllel; pdn: a notochord egy része nehezen meghatározható szerkezetű; is: szomita határok kissé szabálytalanok) a 96 órás kezelés során. Méretskála: 1 mm és 500 μm.

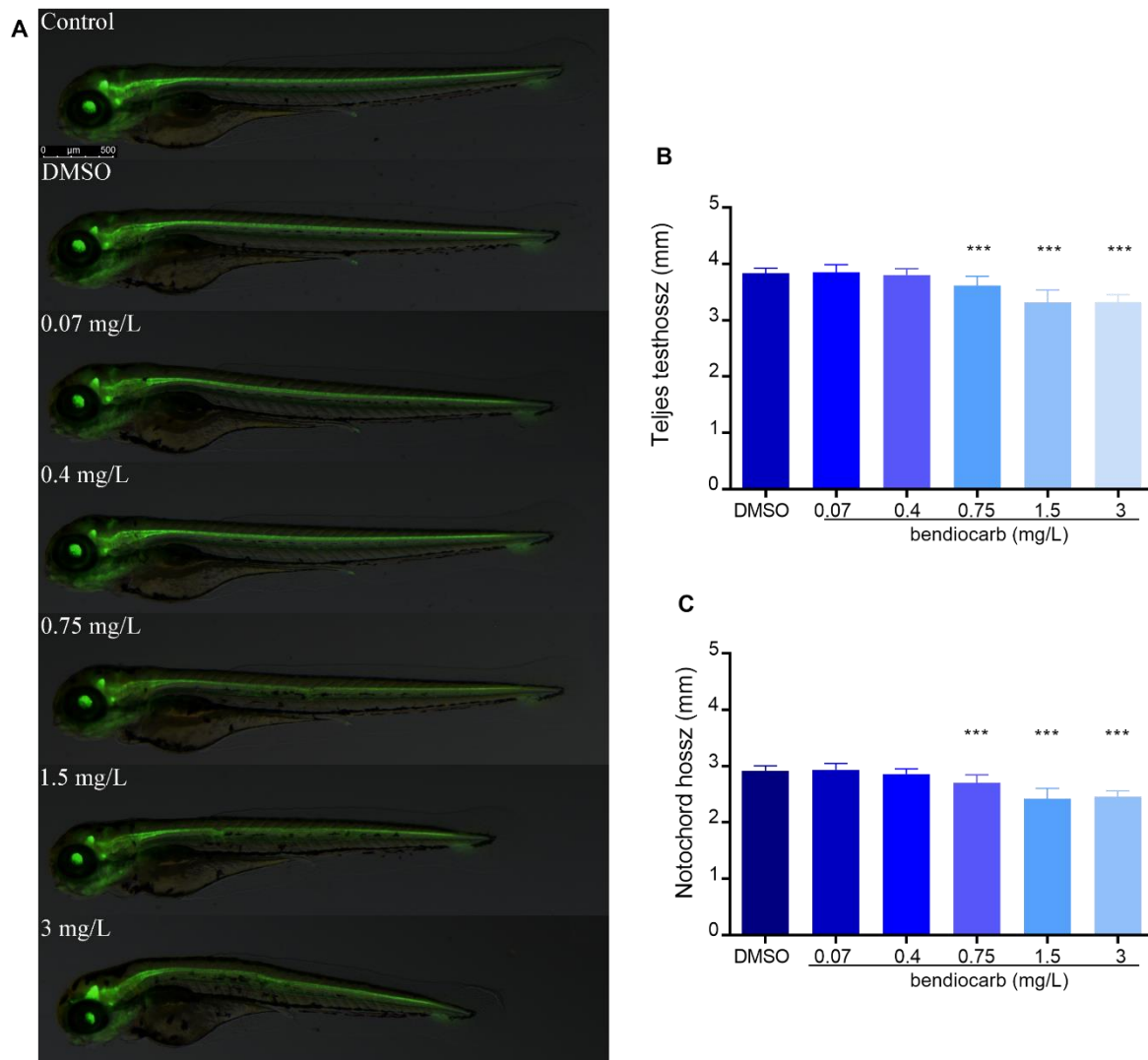
4.2 A szubletális *bendiocarb* expozíció káros hatásainak feltérképezésére irányuló embrionális vizsgálatok eredményei

4.2.1 A morfológiai vizsgálatok eredményei

Az akut embrionális kísérletek eredményei alapján egy szűkebb koncentráció tartományban folytattam a további vizsgálatokat. A kapott eredmények alapján megvizsgáltam, hogy a *bendiocarb* kitettség hogyan befolyásolja a teljes testhossz és notochord régió fejlődését. Ezen

végpontokat célzó vizsgálatok során egy transzgenikus vonallal (Tg(*shh*:GFP)) dolgoztam. Ez a vonal alkalmas a gerincvelő fenéklemez, valamint az idegrendszer fejlődésének vizsgálatára is.

Az eredmények tükrözték a korábbi megfigyeléseimet. Szignifikánsan csökkent a teljes testhossz és a notochord hossz is a 0,75 mg/l, és az az feletti koncentrációk esetében a negatív és az oldószeres kontroll csoportokhoz képest ($p < 0,05$; $N=60$). Egyéb elváltozásokat nem tapasztaltam a kísérlet során (10. A-C. ábra).

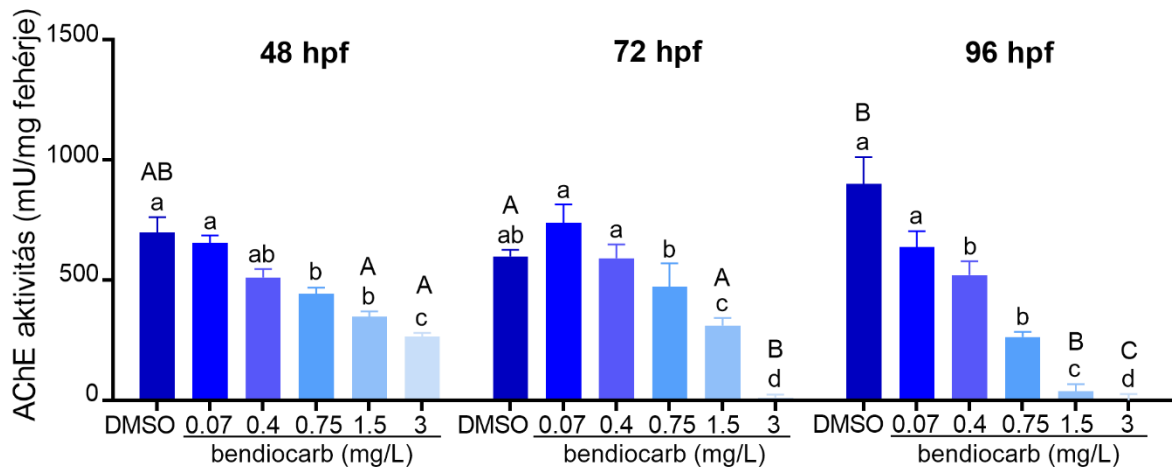


10. ábra: (A) A transzgenikus (2.2*shh*:gfp:ABC#15) zebradánió lárvák 96 hpf- korban, *bendiocarb* kitétséget követően. A zebradánió teljes testhossza (B) és notochord hossza (C) különböző koncentrációjú *bendiocarb* 96 órás kitétséget követően. Az adatok két ismételt teszt átlagos SD-jét jelentik. A * jelöli a szignifikanciát (az egyirányú ANOVA, majd a post-hoc Tukey-féle teszt; $N=30$; $***p < 0.001$). Méretskála: 500 μm .

4.2.2 Az acetilkolin-észteráz aktivitás, a pulzusszám értékelése és a *hspb 11* gén kifejeződésének változása

Hasonlóan más karbamátokhoz a *bendiocarb* reverzibilis AChE inhibitor, így megvizsgáltam, az AChE aktivitás alakulását a lárvák fejlődése során, állandó *bendiocarb* kitétség mellett.

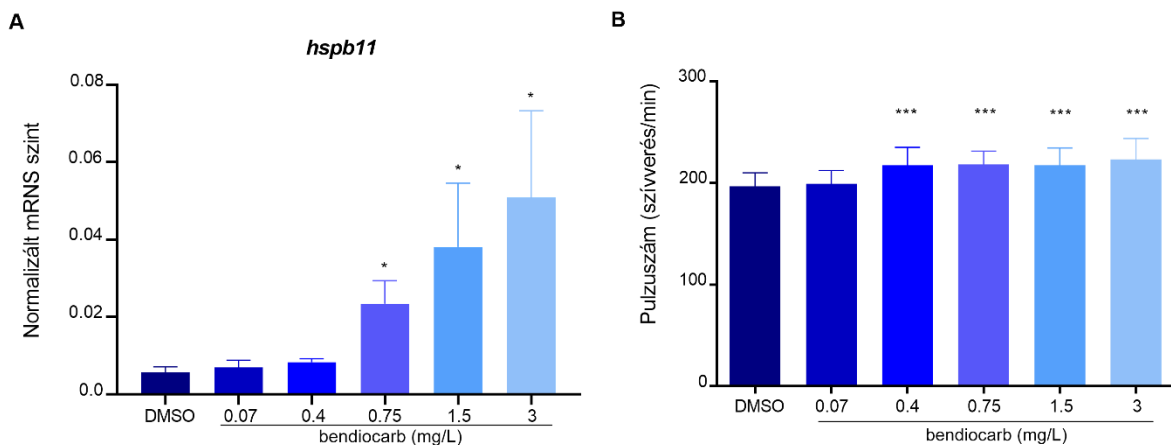
Az AChE aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott (11. ábra), mind a három vizsgálati fázisban (48 hpf, 72 hpf, 96 hpf). A kiváltott gátlás a vizsgált időpontokban koncentrációfüggőnek - 48 h ($p = 0,0086$) $EC_{10} = 0,22 \pm 0,026$ mg/L, $EC_{50} = 5,9 \pm 0,23$ mg/L; 72 h ($p = 0,0087$) $EC_{10} = 0,084 \pm 0,011$ mg/L, $EC_{50} = 1,1 \pm 0,099$ mg/L; 96 h ($p = 0,0019$) $EC_{10} = 0,076 \pm 0,081$ mg/L, $EC_{50} = 0,9 \pm 0,057$ mg/L; $N = 18$) – és időfüggőnek ($p = 0,02495$, two-way ANOVA) bizonyult.



11. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása az AChE aktivitás 48, 72 és 96 óras korban. Különböző kisbetűk jelzik a szignifikáns különbségeket a koncentrációk között, az egyes időpontokon belül (one-way, ANOVA, majd post-hoc Tukey's teszt; $p < 0,05$, $N = 42$). A különböző nagybetűk jelentős különbségeket jeleznek az egyes koncentrációkon belüli időpontok között (Tukey's teszt, one-way ANOVA; $p < 0,05$).

A hősokk-fehérjék (HSP) azonnali válaszreakciót adnak a különféle kémiai stresszorokkal szemben. A *bendiocarb* kezelés a *hspb11* gén szignifikáns mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után, a 0,75-3 mg/l tartományban (12. A. ábra).

Azonban a pulzusszám vizsgálat során ellentétes eredményt kaptam. Szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a 0,4-3 mg/l-es koncentráció tartományban a kontroll csoportokhoz képest (12. B. ábra).



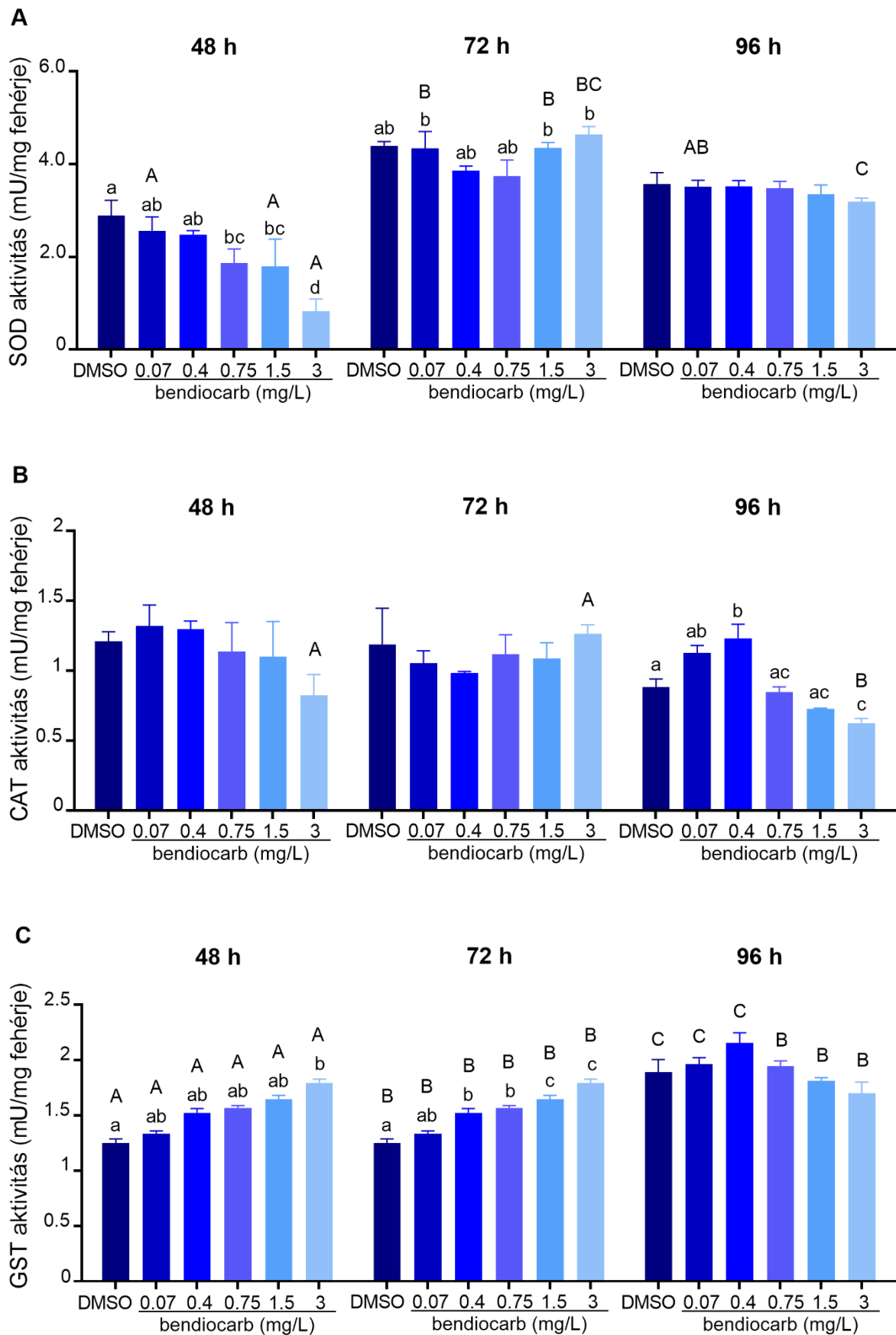
12. ábra: A különböző koncentrációjú *bendiocarb* kezelés hatása a *hspb 11* gén kifejeződésére és a zebra-dánió lárvák átlagos pulzusszámára. Az adatok két ismételt teszt átlagos \pm SD-jét jelentik. (A) A *hspb 11* gén indukálódása a *bendiocarb* kezelés hatására 96 órás lárvákban. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$). (B) A különböző koncentrációjú *bendiocarb* kezelés hatása a zebra-dánió lárvák átlagos pulzusszámára 48 órás korban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelentenek a kontroll értékekhez képest (Tukey's teszt, one-way ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$)

Összegezve a kapott eredményeket, a szubletális *bendiocarb* expozíció csökkenti az AChE aktivitását, ezzel ellentétben emeli a *hspb 11* gén kifejeződését és a fejlődő embriók pulzusszámát.

4.2.3 Az enzimaktivitás meghatározása zebra-dánió lárvákban

A *bendiocarb* által kiváltott káros hatások további jellemzésére megmértem, hogy hogyan változik néhány stressz marker aktivitása a zebra-dánió embriógenézise során. A mérések során vizsgáltam a SOD, CAT, GST, GPxTOT és LPO aktivitását, amelyek a különböző xenobiotikumok biotranszformációjában vesznek részt.

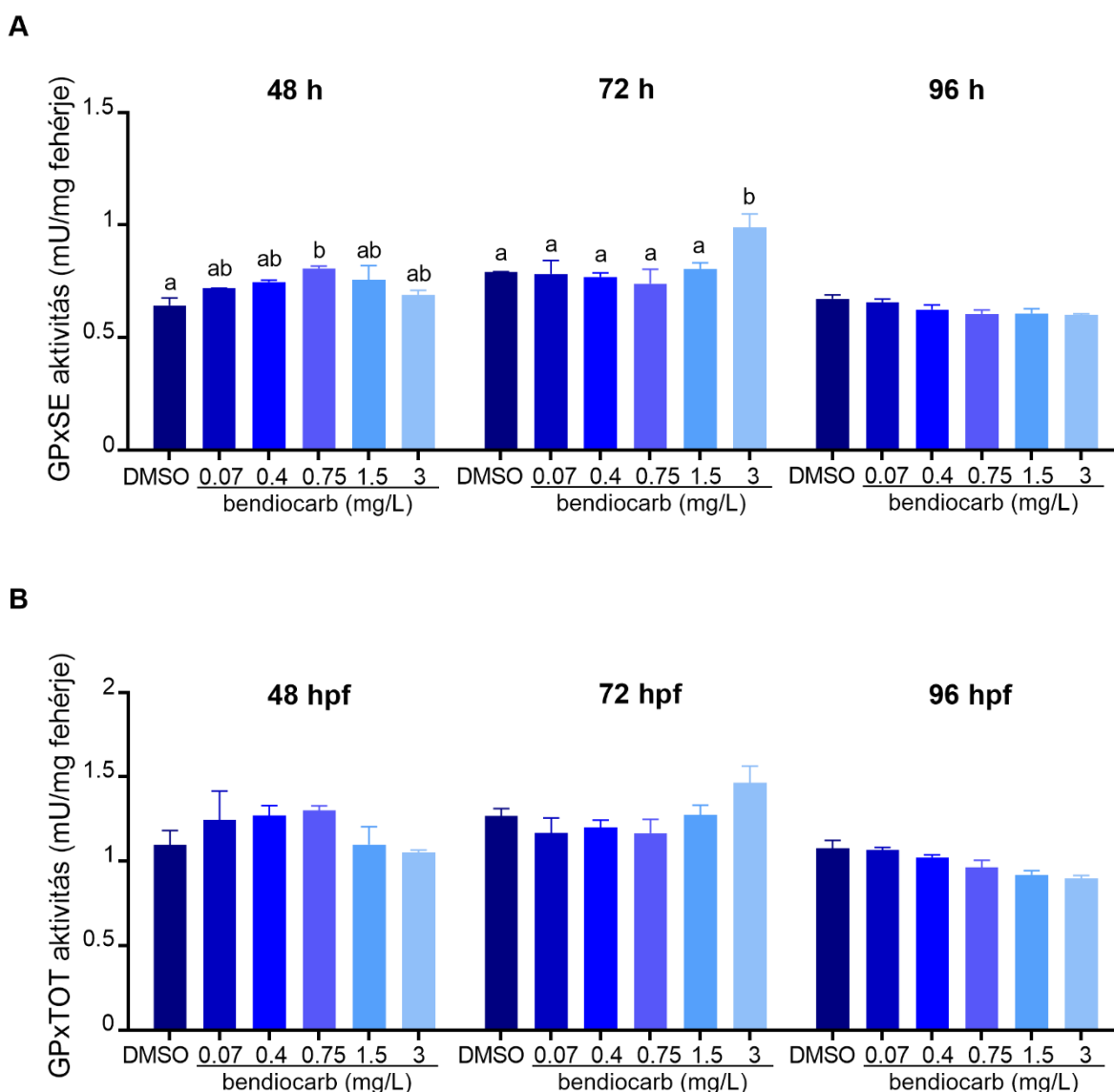
A méréseim azt mutatták, a SOD esetében (13. A. ábra), hogy szignifikáns koncentrációfüggő gátlás (48 h ($p = 0,03605$) $EC_{10} = 0,62 \pm 0,094$ mg/l, $EC_{50} = 0,79 \pm 0,084$ mg/L) alakul ki a 48 hpf idős lárvákban a *bendiocarb* kezelés során. Ezzel ellentétes eredményt kaptam a 72 hpf-es fázisban, ugyanis a SOD aktivitás szignifikánsan emelkedett a 0,07; 1,5 és a 3 mg/l-es *bendiocarb* kezelés során. A CAT enzim aktivitása nem mutatott szignifikáns változást a *bendiocarb* kezelést követő 48 hpf és 72 hpf korban. Szignifikáns növekedés a 0,4 mg/l kezelési csoportban volt csak megfigyelhető 96 órával a termékenyülést követően, szignifikáns csökkenést pedig a 3 mg/l *bendiocarb* kezelési koncentrációnak kitett lárvák esetében tapasztaltam (13. B. ábra). A *bendiocarb* kezelés hatására a GST aktivitása koncentráció- és időfüggőséget mutatott a 48 hpf és a 72 hpf fejlődési fázisban (48 h ($p < 0,04317$) $EC_{10} = 6,76 \pm 0,36$ mg/l, $EC_{50} = 6,92 \pm 0,13$ mg/l; 72 h ($p < 0,001$) $EC_{10} = 2,38 \pm 0,088$ mg/l, $EC_{50} = 2,7 \pm 0,046$ mg/l). A GST aktivitása szignifikánsan növekedett a 48 hpf korban, 3 mg/l *bendiocarb* kezelést követően, 72 órás fázisban pedig szintén szignifikáns növekedés volt megfigyelhető már a 0,4 mg/l-es *bendiocarb* kezeléstől (13. C. ábra). Érdekes módon a CAT és a GST aktivitása a 0,4 mg/l-es *bendiocarb* kezelést követően a 96 hpf fázisban mutatta a legmagasabb aktivitást, de ennek a trendnek az ellenére szignifikáns különbség ($p < 0,05$) és koncentráció-függés csak a CAT esetében volt kimutatható (13. B és C ábra).



13. ábra: (A) SOD aktivitásra, (B) CAT aktivitásra és (C) GST aktivitása 48, 72 és 96 órás tesztben. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. A különböző kisbetűk szignifikáns különbségeket jeleznek a koncentrációk

között az egyes időpontokon belül ($p < 0,05$; $N = 42$). A különböző nagybetűk szignifikáns különbségeket jeleznek az egyes koncentrációkon belüli időpontok között ($p < 0,05$).

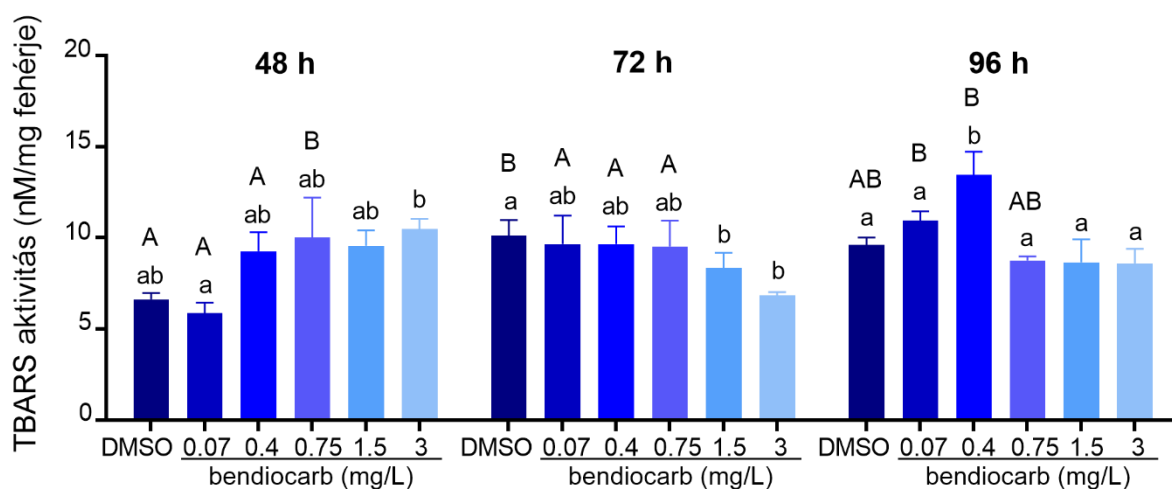
A teljes glutation-peroxidáz (GPxTOT) és a Se-függő glutation-peroxidáz (GPx-Se) aktivitása hasonló mintát követett. A kontroll csoportokhoz képest szignifikáns növekedést csak a GPx-Se esetében mértem, a 48 hpf fázisban, 0,75 mg/l koncentrációjú *bendiocarb*-al kezelt embrióknál, illetve a 3 mg/l-es koncentráció esetében 72 órás korban (14. A-B. ábra). Mind a GPxTOT, mind a GPx-Se aktivitása fokozatosan csökkent 96 órás kezelési fázisban, de ezt a koncentrációfüggő tendenciát statisztikai elemzés nem támasztotta alá.



14. ábra: A különböző koncentrációjú *bendiocarb* expozíció hatása a (A) GPx-SE és a (B) GPx-TOT aktivitásra 48, 72 és 96 órás testben. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. A különböző kisbetűk szignifikáns különbségeket jeleznek a koncentrációk között az egyes időpontokon belül ($p < 0,05$; $N = 42$).

A lipidperoxidáció (LPO) szintek nem mutattak szignifikáns változást sem a 48 hpf, sem a 72 hpf fázisban *bendiocarb* expozíciót követően. Azonban szignifikáns növekedés volt tapasztalható a 96 órával a termékenyülést követően, a 0,4 mg/l *bendiocarb* koncentrációval kezelték

csoportoknál (15. ábra). Ez az emelkedés ugyanazt a trendet mutatta, mint a GST és a CAT aktivitásnál is megfigyeltem. A többi kezelési csoportnál nem volt statisztikailag igazolható változás.



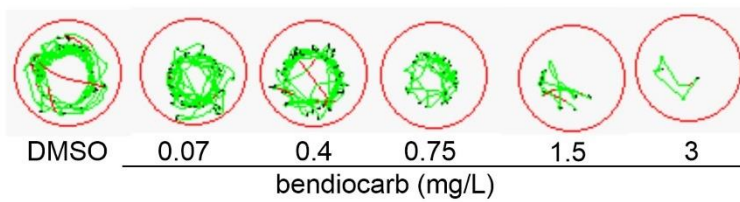
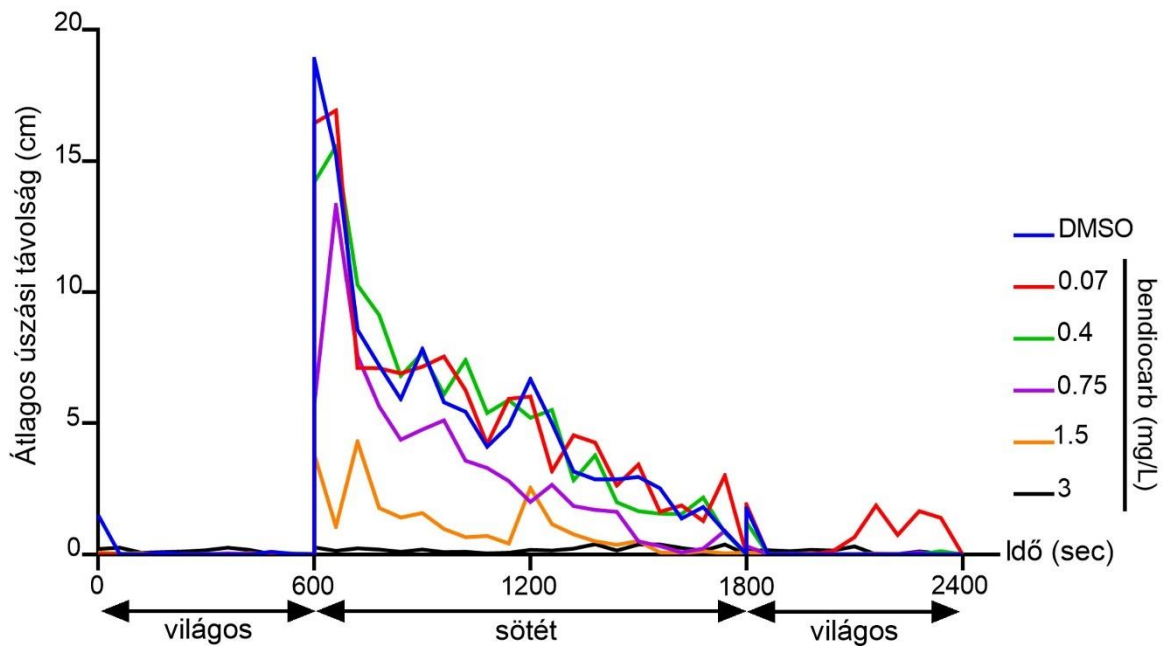
15. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása TBARS-ben kifejezett LPO-szintekre 48, 72 és 96 órást tesztben. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. A különböző kisbetűk szignifikáns különbségeket jeleznek a koncentrációk között az egyes időpontokon belül ($p < 0,05$; $N = 42$). A különböző nagybetűk szignifikáns különbségeket jeleznek az egyes koncentrációkon belüli időpontok között ($p < 0,05$).

Összegezve a fenti eredményeket, a szubletális *bendiocarb* expozíció befolyásolja a ROS termelődését a fejlődő embriókban.

4.2.4 A szubletális *bendiocarb* expozíció a lárvák viselkedésére gyakorolt hatásai

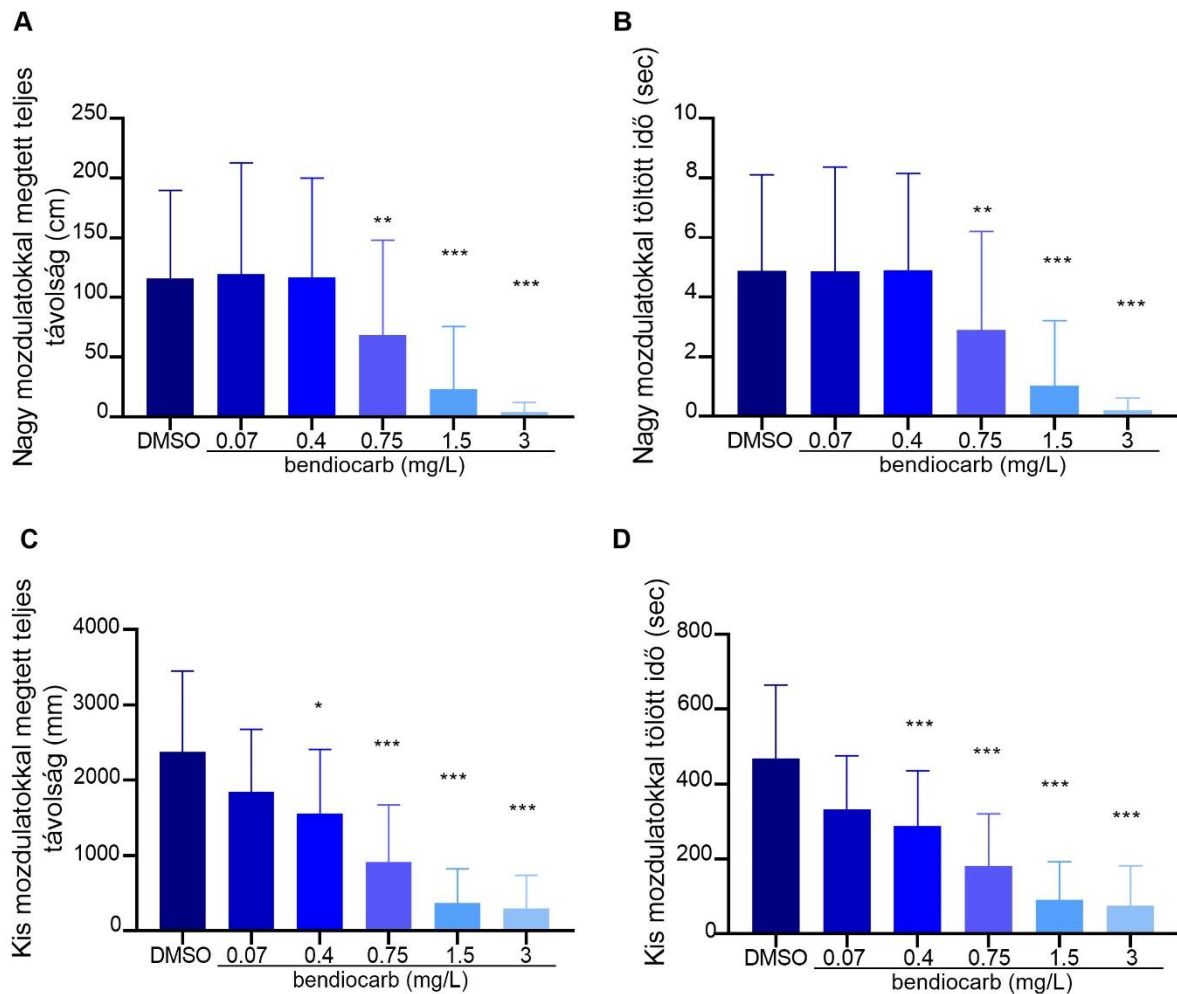
A viselkedéssel kapcsolatos ökotoxikológiai kutatások igen népszerűek, mivel érzékeny végpontnak tekinthető és laboratóriumi körülmények között is felhasználható. A *bendiocarb* reverzibilis kolinészteráz-gátló, ezért a viselkedésre gyakorolt hatásainak vizsgálatára fókuszáltam, fotoperiódus stimulálást követően.

A lárvák mozgásának percnkénti feljegyzései azt jelezték, hogy a *bendiocarb* expozíció csökkentette a mozgással összefüggő viselkedést, különösen a magasabb koncentrációk esetén (16. A. ábra). A zebradánió lárvák a fejlődés kezdeti szakaszában magasabb aktivitást mutatnak a sötét ciklusokban, így a vizsgálat során is ezt a periódust vizsgáltam alaposabban. Az átlagos úszási távolság folyamatos, percnként rögzített változásai is jól mutatják (16. B. ábra), hogy a sötét fázis alatt a lárvák aktivitása nőtt a világos fázisokhoz képest, azonban a magasabb koncentrációk esetén ez a változás alacsonyabb volt.

A**B**

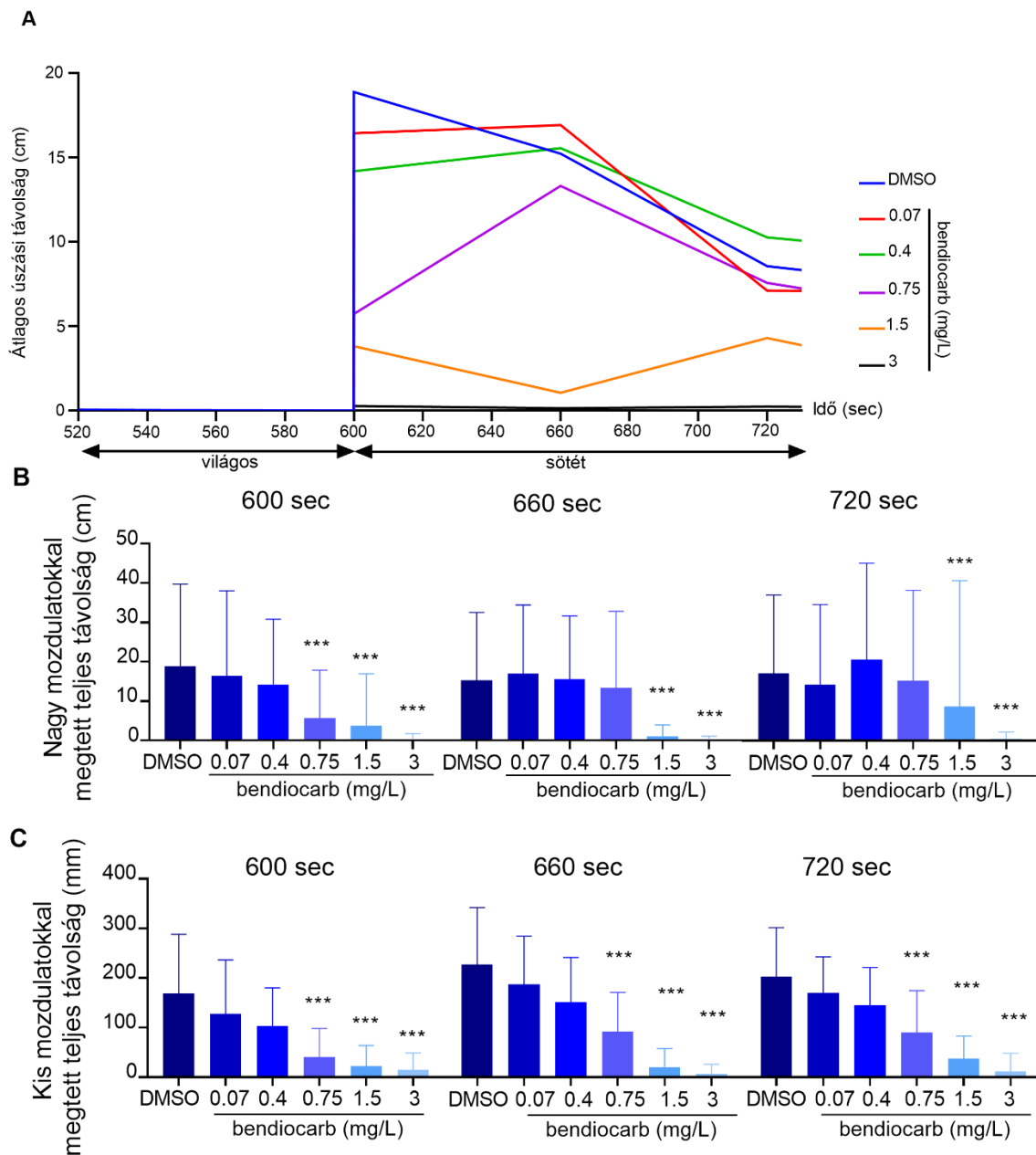
16. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása a lárvák viselkedésére. (A) A lárvák mozgásának percnkénti rögzített képe. A fekete szín jelöli a <4 mm/sec, a zöld szín a 4-20 mm/sec, a piros szín >20 mm/sec gyorsaságú mozgásokat. (B) Az átlagos úszási távolság percnként rögzített alakulása.

A 17. A-B. ábrán látható, hogy a sötét fázis alatt, hogyan változott a lárvák által nagy mozdulatokkal megtett teljes távolság (A) és az idő, amelyet ezen mozgásformával tölt (B). Mindkét esetben megfigyelhető egy szignifikáns csökkenés a 0,75 mg/l-es koncentrációtól felfelé a kontroll csoporthoz képest. A 17. C-D. ábra szemlélteti a sötét ciklus során hogyan alakul a lárvák kis mozgásformával töltött ideje (D) és a távolságot, amelyet ezen kis mozdulatokkal tesz meg (C). Hasonló trend figyelhető meg, mint a nagy mozdulatok során, azonban a koncentráció függő gátlás már a 0,4-3 mg/l tartományban kialakul.



17. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása a lárvák viselkedésére. (A) A lárvák által nagy mozdulatokkal megtett teljes távolság a sötét ciklus alatt. (B) Az idő, amit a lárvák a nagy mozgásformákkal töltött a sötét fázis alatt. (C) A lárvák által kis mozdulatokkal megtett teljes távolság a sötét ciklus alatt. (D) A lárvák kis mozgás formával töltött ideje a sötét ciklus alatt. Az adatok a két ismételt teszt átlagos \pm SD-jét jelentik. A csillagok szignifikáns különbségeket jelentenek a kontroll értékekhez képest (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$)

A lárvák mozgási aktivitását tovább értékeltem, a fény inger közvetlen jelentkezése előtt és után (18. A.). Kíváncsi voltam, hogy a morfológiai eltérések tükrében hogyan alakul az állatok mozgása és a fény érzékelése a különböző csoportok esetében. Jól látható, hogy az állatok reagálnak a fotoperiódus változására a magasabb kezelési koncentrációk esetében is. A sötét fázis során megfigyelt trendek azonban a percenkénti változások alatt is megfigyelhetőek voltak, mind a nagy mozgással mind a kis mozgással megtett távolságok esetén (18. B-C. ábra).



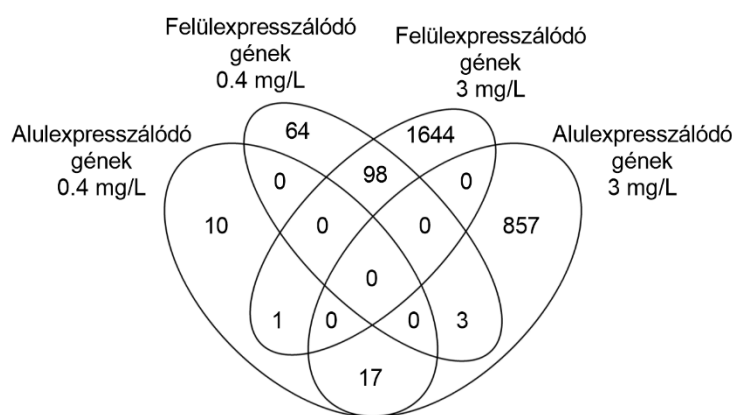
18. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása a lárvák viselkedésére. (A) A lárvák mozgásának percenkénti rögzített képe közvetlenül fény stimuláció előtt és után. (B) A lárvák által nagy mozdulatokkal megtett teljes távolság közvetlenül a sötét fázis megkezdését követően. (C) A lárvák által kis mozdulatokkal megtett teljes távolság közvetlenül a sötét fázis megkezdését követően. Az adatok a két ismételt teszt átlagos \pm SD-jét jelentik. A csillagok szignifikáns különbségeket jelentenek a kontroll értékekhez képest (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$)

Közvetlenül a sötét fázis beállta után (600 sec) már mérhető egy szignifikáns csökkenés a kontroll csoporthoz képest a 0,75 mg/l-es koncentrációtól felfelé. A következő két percben azonban a szignifikáns gátlás csak a 1,5-3 mg/l tartományban volt kimutatható. A kis mozdulatokkal végzett mozgás során a sötét fázis alatt is megemelkedtek a különböző csoportok mozgás aktivitása. Jól látható a korábban is megfigyelhető trend, miszerint szignifikánsan csökkent a 0,75 mg/l-es koncentrációtól felfelé a lárvák mozgás aktivitása.

A viselkedést célzó vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a szubletális *bendiocarb* expozíció csökkenti a fejlődésben lévő lárvák mozgás intenzitását.

4.2.5 A szubletális *bendiocarb* expozíció lárvák teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai

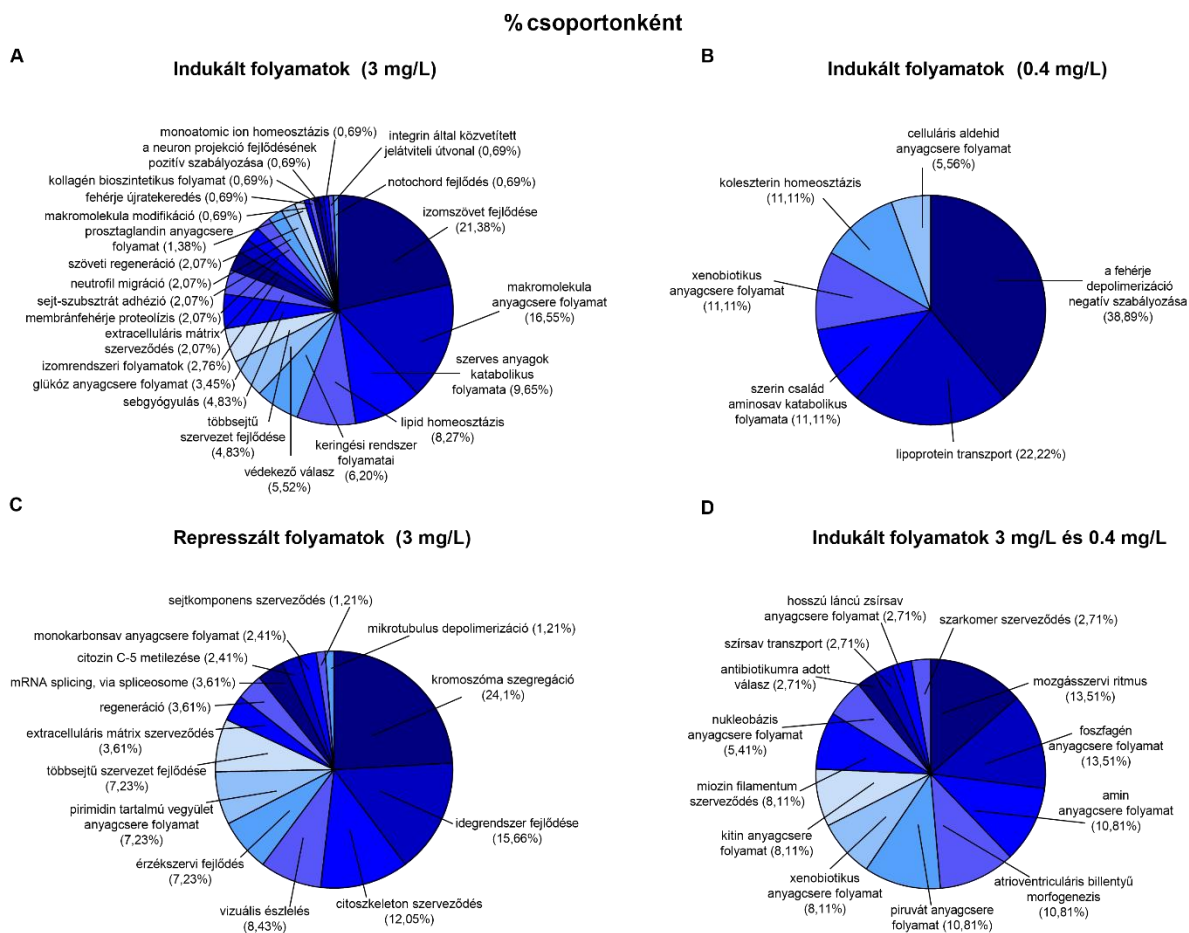
A teljes RNS szekvenálás és transzkriptom analízis segítségével mélyebb betekintést nyertem a lárvák *bendiocarb* által befolyásolt különböző biológiai folyamataiba. Megfigyeltem, hogy a kezelés hatására 2694 gén mRNS szintű kifejeződése változott meg szignifikáns mértékben (19. ábra). Ezen differenciáltan expresszált gének közül 1806 fokozott, míg 884 csökkent kifejeződést mutatott a *bendiocarb*bal kezelt lárvákban. 0,4 mg/l *bendiocarb* expozíció esetén a gátolt gének száma 10 volt. Ezzel szemben a felülreprezentált gének száma 64. A 3 mg/l-es koncentráció esetén az alulreprezentálódó gének száma 857, az indukálódott gének száma pedig 1644. A 0,4 és a 3 mg/l-es *bendiocarb* expozíciót követően egyaránt indukálódott gének száma 98 és 17 gén mutatott csökkent kifejeződést mindkét kezelési csoportnál. Egy gén mutatott 0,4 mg/l-nél csökkent kifejeződést, ezzel szemben ez a gén a 3 mg/l-es koncentráció esetében felülreprezentált volt. Három gén azonban a 0,4 mg/l-es kezelés esetében mutatott fokozott kifejeződést és 3 mg/l-es *bendiocarb* kezelést követően alulreprezentálódott.



19. ábra: Venn-diagram: a *bendiocarb* expozíció gének kifejeződésére gyakorolt hatása

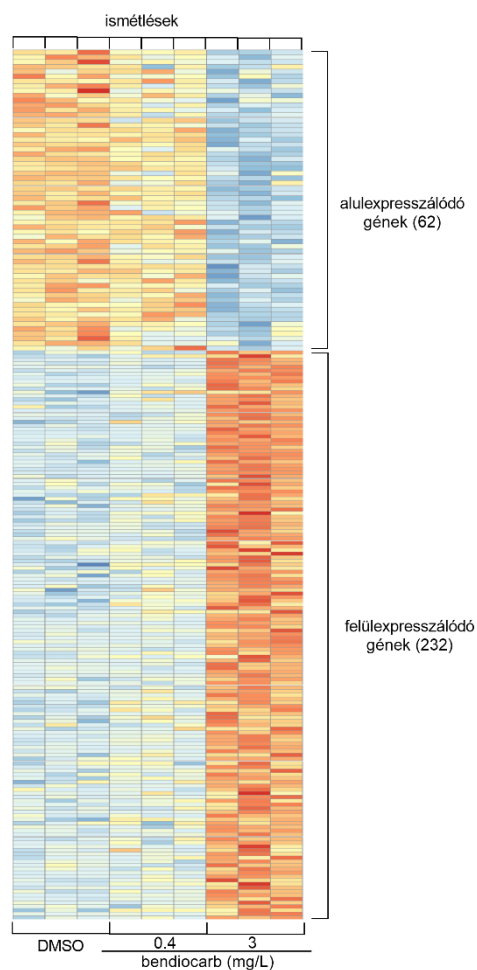
A gén-ontológiai elemzés számos, szignifikáns mértékben gátolt, vagy indukált biológiai folyamatot azonosított (20. ábra). A gátolt gének esetén szignifikánsabb mértékben a sejtciklust érintő folyamatok, a vizuális észleléssel, az érzékszervi fejlődéssel és az idegrendszer fejlődésével kapcsolatos gének érintettsége mutatkozott meg a 3 mg/l-es koncentráció esetén. A 0,4 mg/l-es *bendiocarb* koncentrációval kezelt lárváknál az indukált gének között számos anyagcsere folyamatokban kulcsszerepet játszó géncsoportok felülreprezentáltsága volt megfigyelhető. A 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentrációnál indukálódott folyamatok között kiemelkedik az

izomszövethez, izomrendszerhez kapcsolódó folyamatok és az immunrendszerhez-kapcsolt folyamatok. Mind a 3 mg/l-es és a 0,4 mg/l-es koncentráció esetében indukálódnak különböző anyagcsere folyamatok, az izomműködésben és az immunrendszerhez-kapcsolt folyamatokban résztvevő gének.



20. ábra: A *bendiocarb* expozíció teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai 96 órás zebradánió lárvákban. (A) A 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentráció által szignifikáns mértékben indukált (B) a 0,4 mg/l-es *bendiocarb* koncentráció által szignifikánsabb mértékben indukált (C) a 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentráció által legszignifikánsabb mértékben represszált biológiai folyamatok. (D) A 3 mg/l-es és a 0,4 mg/l-es *bendiocarb* koncentrációk által legszignifikánsabb mértékben indukált folyamatok. Az ábra nagyított képét az 1. és 2. melléklet tartalmazza.

A gén-ontológiai elemzés során azonosított folyamatokból megvizsgáltam az immunrendszerhez, az izomrendszerhez és a látáshoz kapcsolódó gének kifejeződését. A vizuális észleléssel, az érzékszervi fejlődéssel kapcsolatban 62 gén mutatott csökkent kifejeződést a 3 mg/l-es *bendiocarb* kezelés hatására. Az immunrendszerhez kapcsolódó gének közül 100 gén indukálódott, az izomrendszerhez kapcsolható gének közül 132 gén mutatott represszáladást a 3 mg/l-es *bendiocarb* expozíciót követően (21. ábra).

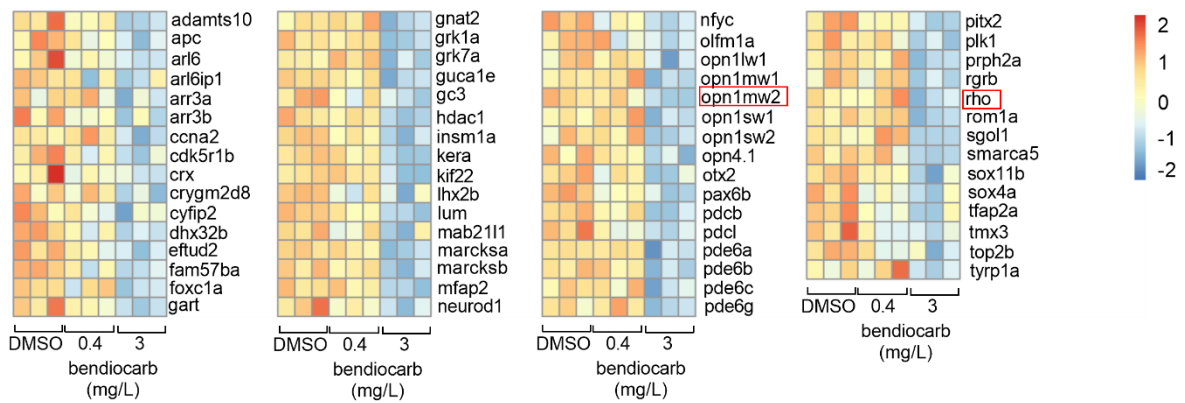


21. ábra: A szubletális embrionális *bendiocarb* expozíció immunrendszert, izomrendszert és látást érintő génekre gyakorolt hatása a 96 órás zebradánió lárvákban. A teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciálisan expresszált gének „hő térképe”.

Összességében elmondható, hogy a *bendiocarb* teljes transzkriptom szintű változásokat eredményezett az embrionális fejlődés végére a zebradánió lárvákban.

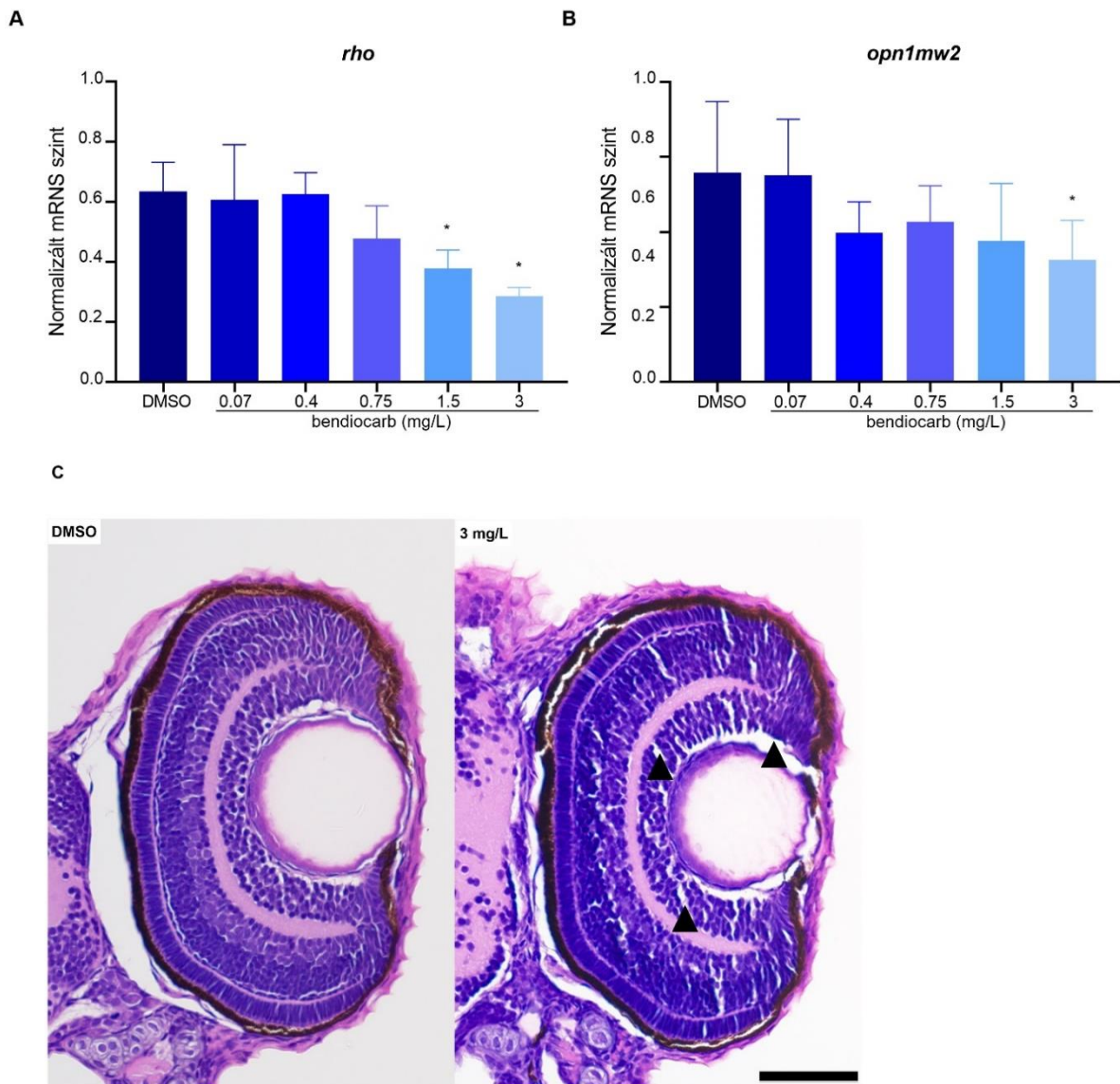
4.2.6 A szubletális *bendiocarb* expozíció lárvák vizuális érzékelésére gyakorolt hatásai

A teljes transzkriptom analízis során született eredmények alapján az embrionális *bendiocarb* expozíció vizuális észlelésére gyakorolt hatását vizsgáltam (22. ábra). Ennek érdekében elsőként két, a fény érzékelésben és a fototranszdukcióban szerepet játszó gén (rodopszin, *rho*; opsin 1 (cone/tölcser pigmentek), közepes hullám érzékelés 2, *opn1mw2*) kifejeződését vizsgáltam RT-qPCR segítségével. A *bendiocarb* kezelés a kiválasztott markergének szignifikáns represszállását vonta maga után (23. A-B. ábra).



22. ábra: Teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltan expresszált vizuális észlelés asszociált gének „hőterképe”. A piros téglalapok jelölik az RT-qPCR-hez kiválasztott géneket.

A kapott eredmények tükrében a szövettani vizsgálatok során többek között a zebradánió lárvák szemét ért változásokra koncentráltam. A kórszövettani elemzések során a 3 mg/l-es koncentrációval kezelt egyedek esetében találtam eltérést (23. C. ábra). A lárvák szemének retina rétegei között vakuolizáció alakult ki. Az alacsonyabb *bendiocarb* kezelési csoportok esetében ez az eltérés nem volt kimutatható.



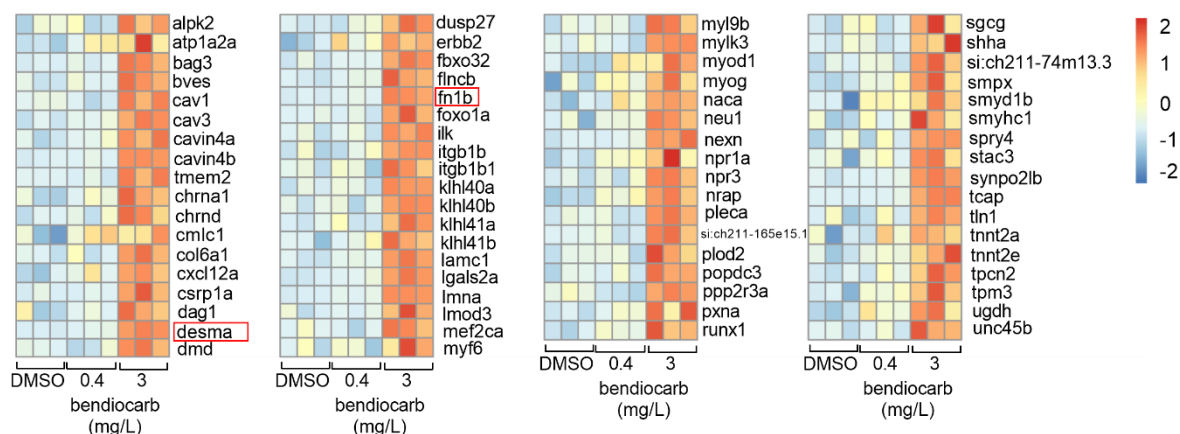
23. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása két a fény érzékelésben és a fototranszdukciónban szerepet játszó gén kifejeződésére, illetve a 96 órás zebradánió lárvák szemének szövettani metszete. (A) A *rho* gén és a (B) *opn1mw2* gén represszáltága a *bendiocarb* kezelés hatására. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$). (C) Az oldószeres kontroll és 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentrációval kezelt zebradánió lárva szemének szövettani metszete. H&E festés. Méretskála:300 μ m. A fekete háromszög a tapasztalt elváltozásokat mutatja. \blacktriangle : vakuolizáció.

A kapott eredmények tükrében elmondható, hogy a *bendiocarb* expozíció negatív irányba befolyásolja a fejlődő embriók vizuális észlelését.

4.2.7 A szubletális *bendiocarb* expozíció lárvák izom szövetére gyakorolt hatásai

A doktori munka kapcsán az AChE-gátló *bendiocarb*ra adott toxikogenomikus választ vizsgáltam, zebradánió embriókat használva. A teljes transzkriptom analízis megmutatta, hogy az

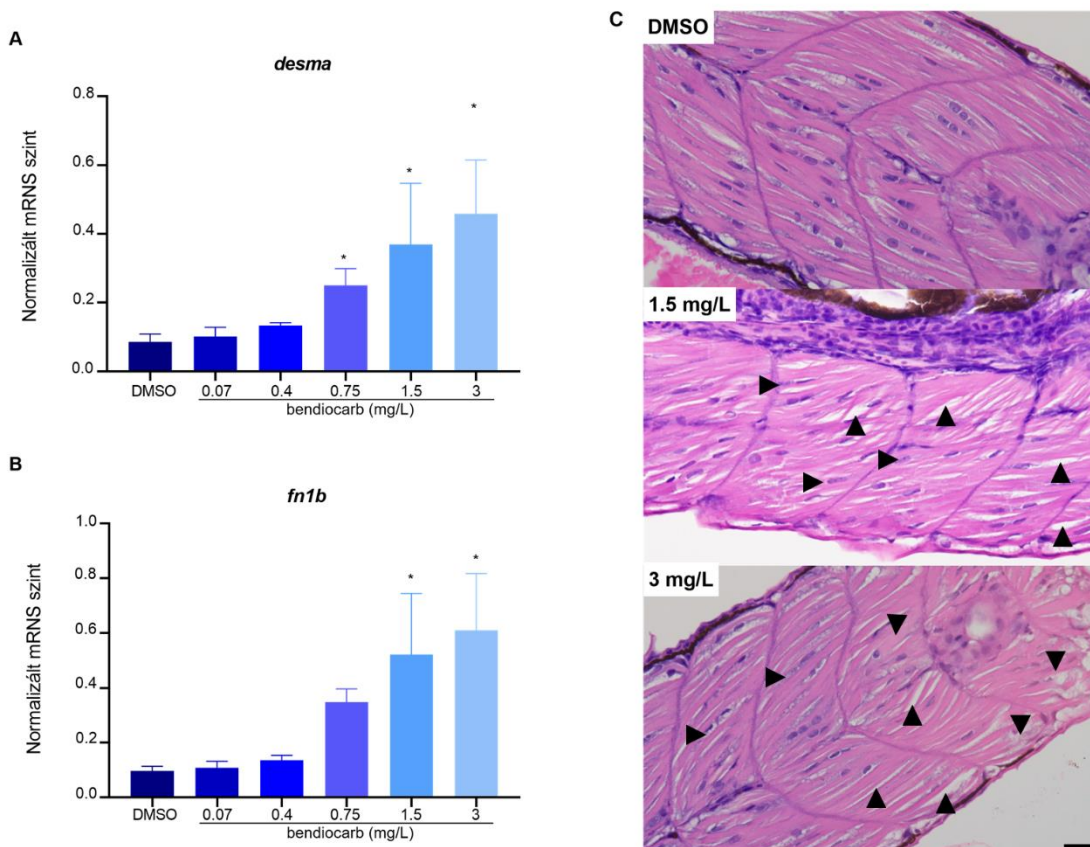
izomszövethez, izomrendszerhez kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó gének indukálódtak (24. ábra).



24. ábra: Teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltnan expresszált harántcsíkolt izom összehúzódnásban és az izomfejlődésben szerepet játszó asszociált gének „hő térképe”. A piros téglalapok jelölik az RT-qPCR-hez kiválasztott géneket.

Kíváncsi voltam, hogy a gerincesekben megtalálható két izomspecifikus gén (dezmin a, *desma*; fibronectin 1b, *fn1b*) kifejeződése hogyan változik a *bendiocarb* expozíciót követően. A *bendiocarb* kezelés a *desma* gén jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után a 0,75-3 mg/l-es koncentráció tartományban (25. A. ábra). A *bendiocarb* kezelés az *fn1b* gén jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után az 1,5-3 mg/l-es koncentráció tartományban (25. B. ábra).

A kórszöveti vizsgálatok során a 0,75 mg/l *bendiocarb* expozíció esetén nem tapasztaltam szöveti eltéréseket a kontroll csoporthoz képest. Azonban a 1,5 mg/l esetében már enyhe mag- és sarcoplasma elváltozásokat (vizenyő, vakuolizáció) tapasztaltam. A 3 mg/l-es koncentráció esetén ezek az elváltozások súlyosbodtak discoid elfajulás is megfigyelhető volt (25. C. ábra).

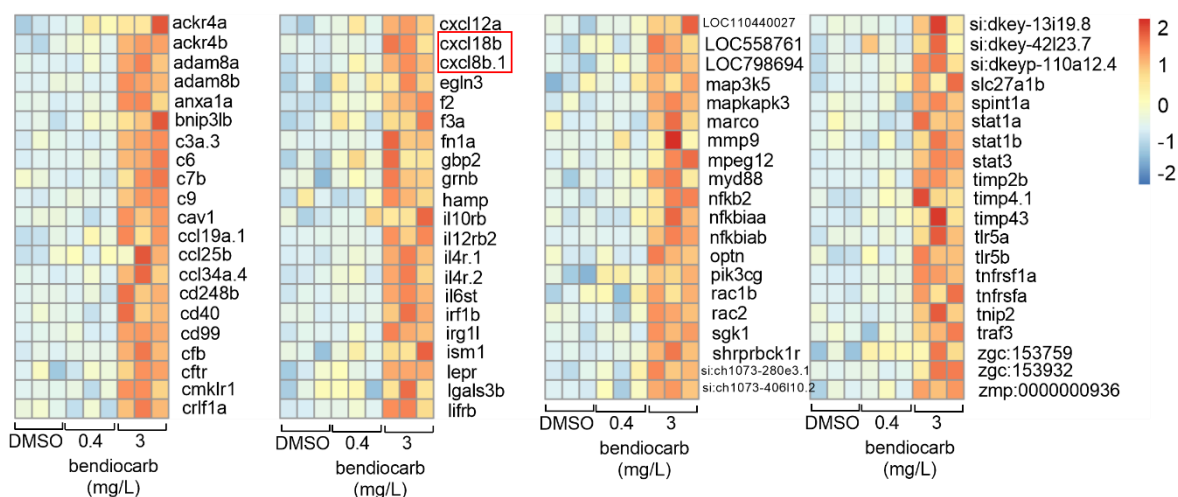


25. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása két izom specifikus gén kifejeződésére, illetve a a 96 órás zebradánió lárvák izomszövetének kórszövettani metszete. (A) A *desma* gén és a (B) *fn1b* gén indukálódása a *bendiocarb* kezelés hatására. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$). (C) Az oldószeres kontroll, 1,5 mg/l-es és a 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentrációval kezelt zebradánió lárvák izomszövetének kórszövettani metszete. H&E festés. Méretskála: 150 μ m. A fekete háromszögek a tapasztalt elváltozásokat mutatják. \blacktriangle : intercelluláris vízenyő, \blacktriangleright : vakuolizáció, \blacktriangledown : discoid elfajulás.

Összegezve a kapott eredményeket, a szubletális *bendiocarb* expozíció hatást gyakorol a fejlődő embriók izomsejtjeire.

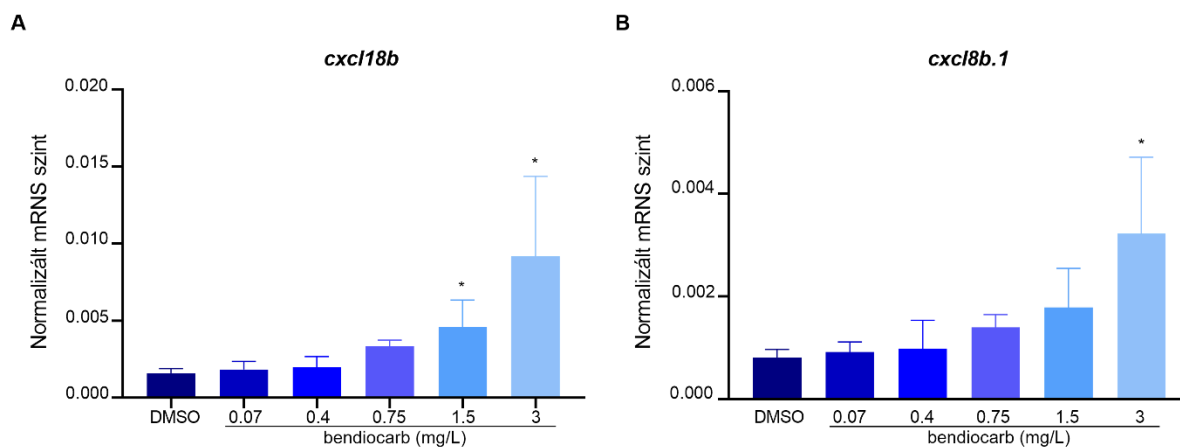
4.2.8 A szubletális *bendiocarb* expozíció a lárvák immunrendszerével kapcsolatos hatásai

A teljes transzkriptom analízis során kapott eredmények alapján (26. ábra) megvizsgáltam az embrionális *bendiocarb* expozíció immunrendszerre és a gyulladásos folyamatokra gyakorolt hatását.



26. ábra: Teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltan expresszált immun- és gyulladás asszociált gének „hőterképe”. A piros téglalapban található a RT-qPCR-hez kiválasztott gének.

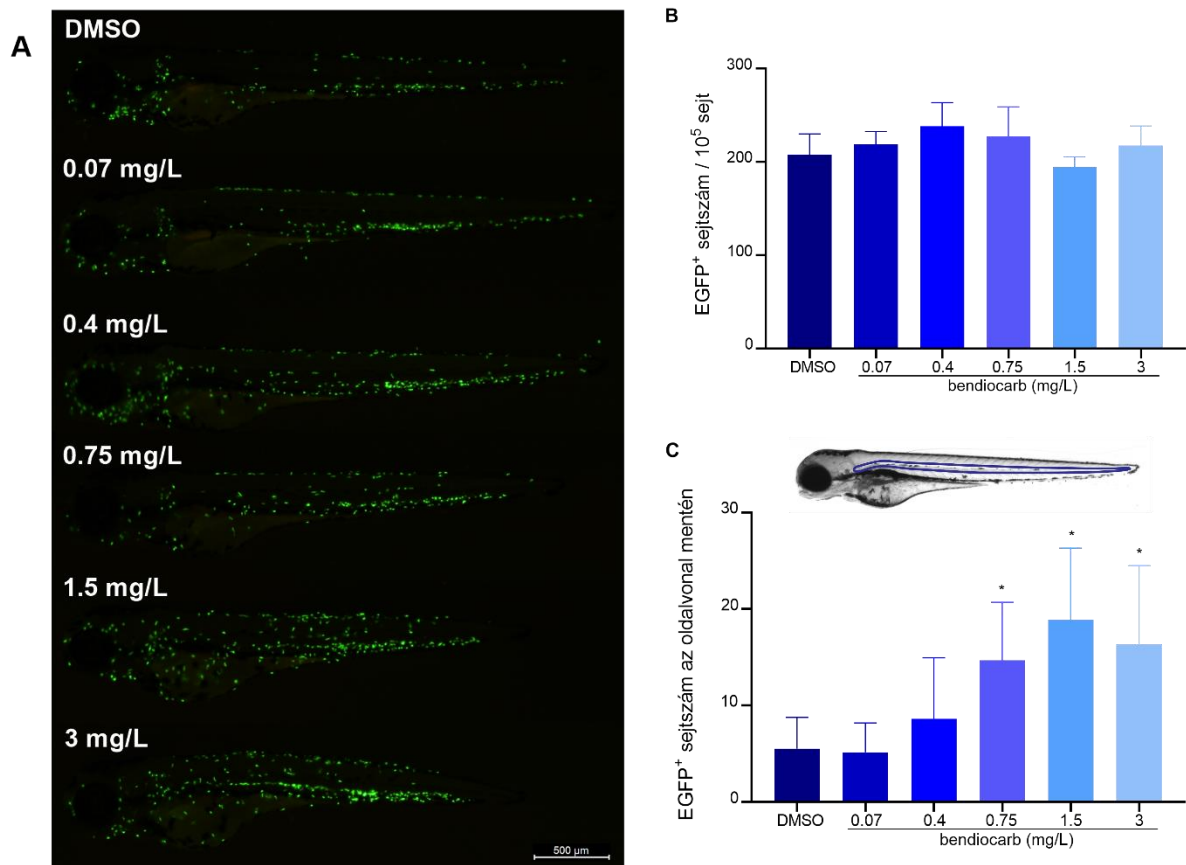
Ennek érdekében először két immunválasz-asszociált gén (kemokin (C-X-C motívum) ligand 18 b, *cxcl18b*; kemokin (C-X-C motívum) ligand 8b 1, *cxcl8b.1*) kifejeződését vizsgáltam RT-qPCR segítségével. A kiválasztott markergének jelentős mértékű koncentráció-függő indukálása volt megfigyelhető az 1,5 mg/l és a 3 mg/l-es *bendiocarb* expozíció esetében (27. A-B. ábra).



27. ábra: A *bendiocarb* expozíció hatása két immunválasz-asszociált gén kifejeződésére. (A) A *cxcl18b* gén és a (B) *cxcl8b.1* gén indukálódása a *bendiocarb* kezelés hatására. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

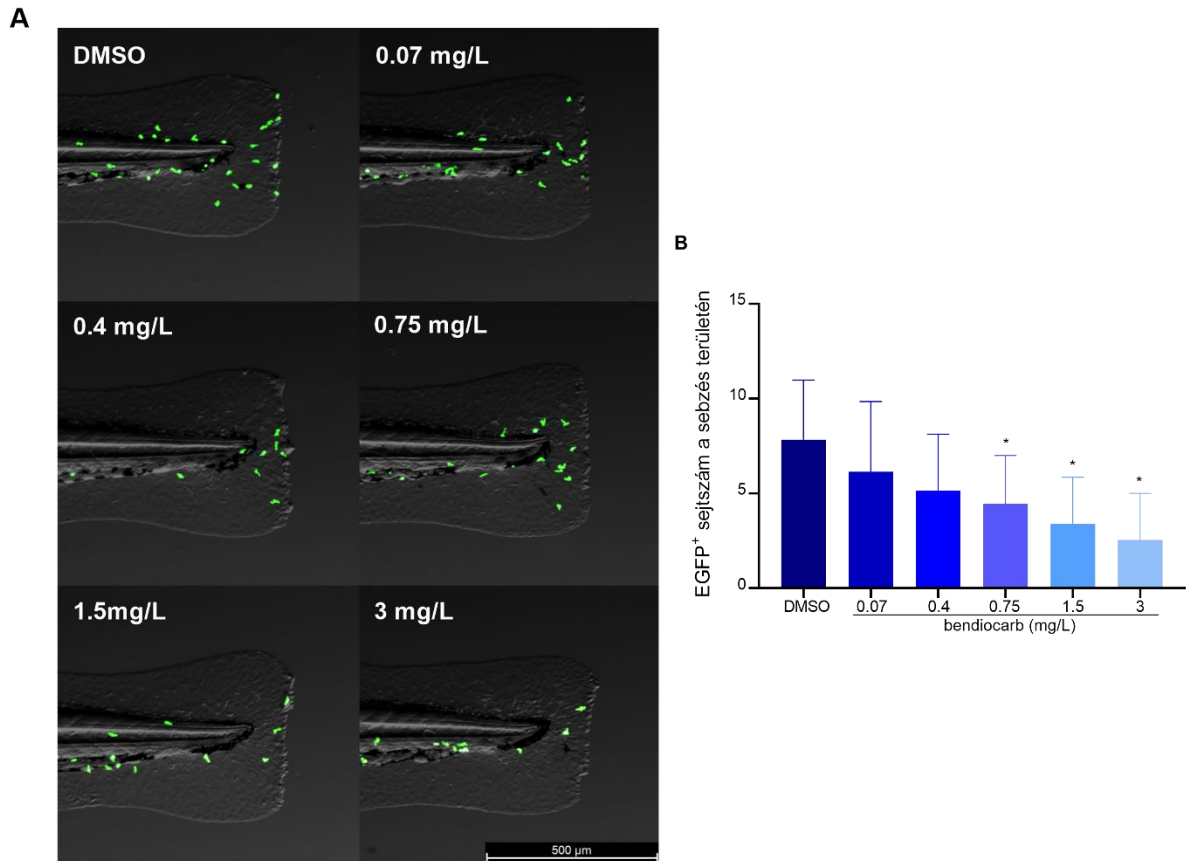
A *cxcl18b* és a *cxcl8b.1* gén többek között neutrofil granulocita kemoattraktáns faktor, így a szignifikáns indukciójuk alapján feltételezhetővé vált, hogy a *bendiocarb* terhelés modulálhatja granulociták eloszlását, mennyiségét viselkedését. Ezen feltételezést tovább erősítette, hogy a teljes transzkriptom analízis alapján, a neutrofil sejtek migrációjáért felelős gének kifejeződése is indukálódott, így a rendelkezésünkre álló neutrofil granulocita specifikus transzgenikus zebradánió vonal bevonásával folytattam kutatásaimat. A 96 órás lárvákról készült felvételek alapján megfigyelhetővé vált, hogy a *bendiocarb* kezelés megváltoztatja a neutrofil granulociták

eloszlását a lárvákban belül (28. A. ábra). Fokozott felhalmozódást figyeltem meg az oldalvonal mentén. Először megvizsgáltam, hogy a teljes neutrofil granulocita sejtszám változik-e a *bendiocarb* kezelés hatására. A fluoreszcencia aktivált sejtválogatás segítségével megállapítottam, hogy az EGFP⁺ sejtek meghatározott gyakorisága nem mutat szignifikáns eltérést (28. B. ábra). Ezt követően az oldalvonal mentén tapasztalt felhalmozódás miatt összesítettem a granulocita sejtek számát, amely 0,75-3 mg/l tartományban szignifikáns növekedést mutatott (28. C. ábra).



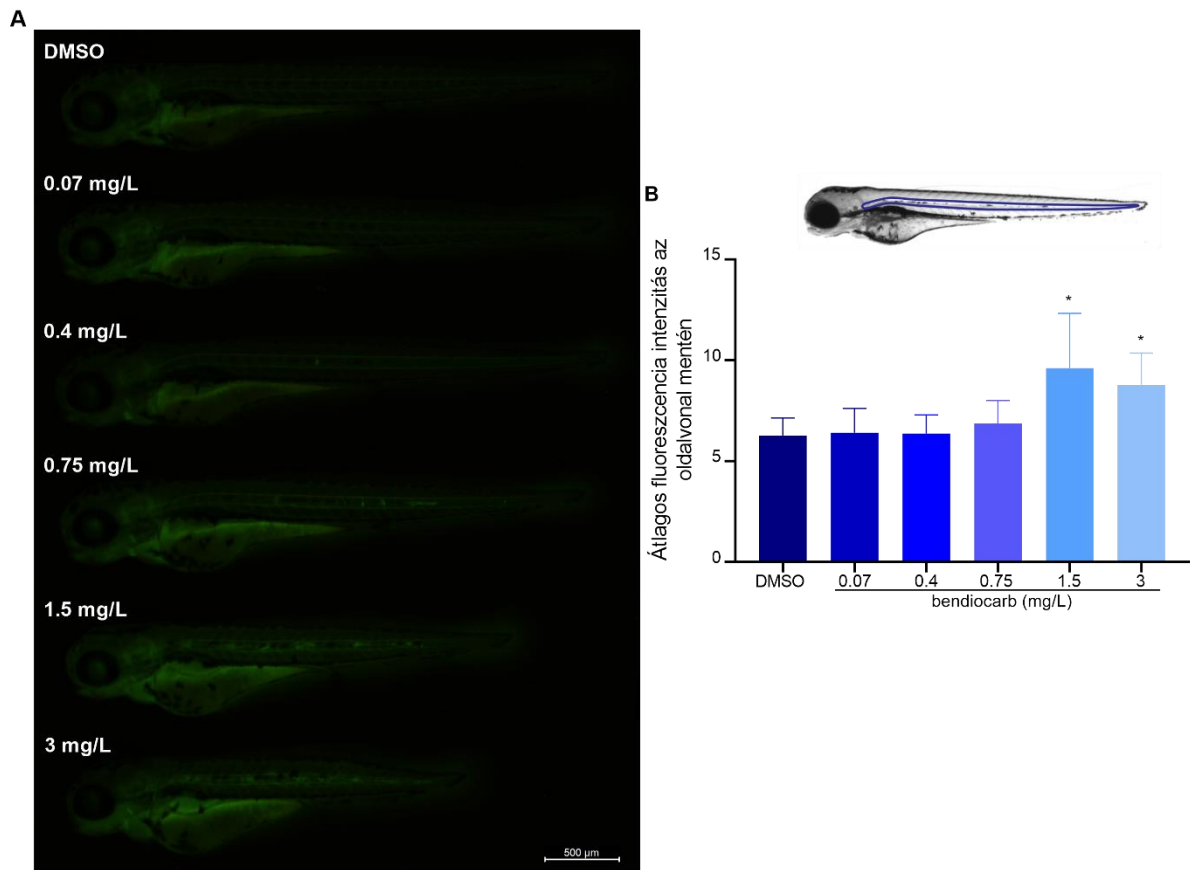
28. ábra: Szubletális, *bendiocarb* expozíció neutrofil granulociták eloszlására és mennyiségére gyakorolt hatása a 96 órás zebradánió lárvákban. (A) A Tg(mpx:EGFP) lárvákról laterális orientációval készült felvételek *bendiocarb* kezelést követően. (B) A *bendiocarb* hatása a neutrofil granulociták teljes lárvákban belüli gyakoriságára. (C) A *bendiocarb* hatása a neutrofil granulociták felhalmozódására, az oldalvonal területén. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

A neutrofil granulocita kemoattraktáns faktorok és az *fn1b* szignifikáns indukciója és a neutrofil granulociták eloszlásának változása indokoltá tette, hogy tovább vizsgáljam a granulociták válaszreakcióját farokúszó-sebzésen alapuló helyi, steril gulladós modell felhasználásával. Az „Anyag és Módszer” fejezetben ismertetett kísérleti rendszer eredményei egy szignifikáns, koncentráció-függő csökkenést mutattak a *bendiocarb*bal kezelt lárvák esetében. A sebzést követő 4. órában a sérülés területére vándorló granulociták mennyisége csökkent a 0,75-3 mg/l tartományban (29. A-B. ábra).



29. ábra: Szubletális, *bendiocarb* expozíció hatása a neutrofil granulociták lokális gyulladásra adott válaszára a 96 órás zebradánió lárvákban. (A) A Tg(mpx:EGFP) lárvák farokúszójáról laterális orientációval készült felvételek a *bendiocarb* kezelést és sebzést követően. (B) A *bendiocarb* hatása a neutrofil granulociták sebzés területén történő felhalmozódására. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

Ezt követően a NO termelődésének vizsgálatára került sor. A 96 órás lárvákban fluoreszcens próba segítségével történő NO termelés tanulmányozásakor koncentráció-függő növekedés volt tapasztalható a *bendiocarb* hatására. A NO produkció növekedést mutatott a lárvák oldalvonala, a notochord régió mentén (30. A-B. ábra). A megfigyelt trend hasonlóképpen alakult, mint a neutrofil-granulociták eloszlásánál.



30. ábra: Szubletális, *bendiocarb* expozíció hatása a NO termelődésére a 96 órás zebradánió lárvákban. (A) A lárvákról laterális orientációval készült felvételek a *bendiocarb* kezelést és NO-próba alkalmazását követően. (B) A *bendiocarb* hatása a NO termelődésre az oldalvonal területén. Az adatok két ismételt kísérlet átlagos \pm SD-jét jelölik. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

Összegezve a kapott eredményeket, a szubletális *bendiocarb* expozíció immunmoduláns potenciállal rendelkezik. Egyrészt egy szignifikáns mértékű lokális gyulladást indukál fejlődő embriókban, amely együtt jár a neutrofil granulociták eloszlásának megváltozásával, fokozva a NO termelődését, másrészt pedig befolyásolja az immunsejtek egy indukált, lokális gyulladásra adott válaszreakcióját.

5. Következtetések és javaslatok

Számos növényvédőszerrel kapcsolatosan megállapították, hogy összefüggésbe hozható egészségügyi és környezeti problémákkal (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016). A növényvédőszer expozíció lehet akut, szubkrónikus, krónikus (Roberts et al. 2012) és az egészségre gyakorolt hatásuk függ a peszticid típusától, illetve további befolyásoló tényező lehet a növényvédőszer toxicitása, veszélyessége és az expozíció hossza. Az ismétlődő, alacsony esetleg kombinált peszticid kitettség további egészségkárosító hatásokat rejthet magában (Tagne-Fotso et al. 2023). Bizonyos növényvédőszerek, mint pl. a szerves foszforsav-észterek, az inszekticid karbamátok befolyásolhatják az idegrendszer fejlődését, működését (Petrovova et al. 2011). Más peszticidek irritálhatják a bőrt vagy akár a szemet, lehetnek mutagének és befolyásolhatják a szervezet endokrin rendszerét (Tagne-Fotso et al. 2023). Az epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy egyes peszticideknek való kitettség bizonyos betegségek (non-Hodgkin limfóma, prosztataraák, Parkinson kór, mielóma multiplex) kialakulásával szoros kapcsolatot mutatnak és ez különösen igaz, azoknál az embereknél, akik a foglalkozásukból adódóan rendszeresen érintkeznek az anyagokkal (Luo et al. 2016, Wiklund et al. 1987, Brouwer et al. 2017, Wang et al. 2014, Freire et al. 2013, Mazur et al. 2015). Megállapították továbbá azt is, hogy a gyermekeknél az akut limfoid (vagy limfoblasztos) leukémia kialakulása összefüggésbe hozható az anyák terhesség alatti peszticid használatával (Tagne-Fotso et al. 2023). A gyermekeket ért krónikus növényvédőszer expozícióból következő egészségügyi hatások változatosak, tükrözve ezen vegyi anyagok toxikológiai tulajdonságainak sokféleségét (Roberts et al. 2012). Az évek során betiltásra kerülő peszticidekkel kapcsolatos rendeletek nem szüntetik meg azonnal a növényvédőszer expozíciót, különösen a perzisztens anyagok esetében (Tagne-Fotso et al. 2023).

A *bendiocarb* a karbamátok csoportjába tartozó rovarölő szer, mely eredményesen felhasználható napjainkban is a malária elleni védekezés során (Holovska et al. 2014, Polláková et al. 2012, Sadasivaiah et al. 2007). Népszerűségéből adódóan világszerte kimutathatóvá vált különféle vizekben és alkalmazásából fakadóan pl. a terhes anyák véréből is, ami komoly kockázatot jelenthet a születendő gyermekek számára (Whyatt et al. 2003, Whyatt et al. 2007, Berman et al. 2011, Barr et al. 2002, Tatarazako & Iguchi 2012, El-Saeid et al. 2011). A *bendiocarb* expozíció okozta esetleges hatásokról azonban limitált mennyiségű eredmény áll rendelkezésünkre, éppen ezért egészségkárosító hatásának, hatásmechanizmusának nem minden részlete ismert. Emiatt olyan vizsgálatok elvégzésére van szükség, amelyek részletesebb módon hozzájárulnak a *bendiocarb* kitettség biológiai következményeinek megismeréséhez.

A zebradánió egy széles körben elterjedt és alkalmazott gerinces modellszervezet a biológiai kutatásokban. A felhasználható modellek között alkalmas alternatívát nyújt a *bendiocarb*

embrionális kitettségének komplex feltárásához, hiszen a direkt hatások jól nyomon követhetőek a segítségükkel (Nagel 2002, Sipes et al. 2011, Geisler et al. 2016). Jelen doktori munka a szubletális *bendiocarb* átfogó, többek között morfológiai, kardiotoxikológiai, enzimaktivitási, molekuláris biológiai és immunológiai tanulmányozását végezte el.

A kísérletek során megállapítottam, hogy a *bendiocarb* LC₅₀ értéke 96 órával a megtermékenyülés után 32,52 mg/l a zebraadánió embriók esetében. Ez az érték jelentősen magasabbnak bizonyult, mint amit korábban a szakirodalomban (*Cyprinodon variagatus*: 0,86 mg/l, szívárványos pisztráng: 0,87-1,55 mg/l, kékkopoltyús naphal: 0,47-1,65 mg/l) azonosítottak más halfajoknál (Hayes & Lawes 1990, Bendiocarb-Technical Fact Sheet 2002), viszont hasonlóságot mutat Visser és Linders (1999) által feljegyzett LC₅₀ értékekkel (32-150 mg/l) a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) esetében.

A szubletális *bendiocarb* expozíció különféle embrionális rendellenességeket (farokfejlődési rendellenességek, csökkentett testhossz, eltérés a melanociták számában, méretében, eloszlásában) eredményezett az embriók/lárvák kezelési időszaka alatt. A magasabb koncentrációknál (25 mg/l felett) azonosított pigmenthiányhoz hasonló tünetleírásokat a *physostigmine* terhelés vagy a szintén kolinészteráz-gátlók csoportjába tartozó szerves foszforsav-észter metabolitok kapcsán találunk (Fischer et al. 2015). Ugyanakkor a melanociták számával, méretével, eloszlásával, hiányával kapcsolatos eredmények nem korlátozódnak a kolinészteráz-gátlók csoportjára. Számos egyéb xenobiotikum, mint például a fungicid csoportba tartozó *boscalid*, vagy oldószerként használatos *etanol* esetében leírtak már hasonló tüneteket (Qian et al. 2019). A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a melanociták száma, mérete, eloszlása, esetleges hiánya érzékeny a kolinészteráz-gátlók csoportjába tartozó anyagokra, de a pontos molekuláris háttér még bizonytalan. A *bendiocarb* kitettség okozta redukált testhossz jól korrelál más karbamát vegyületek által okozott testméret csökkenéssel, amit japán medaka, zebraadánió, nílusi tilápia esetében figyeltek meg (Kashiwada et al 2008, Mensah et al. 2012, Meng et al. 2014a) a kutatók.

A *bendiocarb* hatás mechanizmusát tekintve az idegmérgek csoportjába tartozik. Gátolja az AChE aktivitását reverzibilis karbamoilizáció által. A folyamat az ACh felhalmozódásához vezet a szinaptikus hasadékban és a túlzott mértékű receptor stimulálás következtében neurotoxikus tünetek alakulnak ki (Jin et al 2004, Yi et al. 2006, Lehel & Laczay 2011, Korockova et al. 2012, Holovska et al. 2014, Apaydin et al. 2018). A *bendiocarb* expozíció a várakozásnak megfelelően koncentráció- és időfüggő gátlást okozott az AChE aktivitásában. Van den Beukel és munkatársai (1998) leírták, hogy az inszekticid karbamátok eltérő hatást gyakorolhatnak a nAChR-ra. Smulders és munkatársai (2003) összehasonlító vizsgálatot végeztek, melynek során megállapították, hogy a $\alpha 4\beta 4$ nAChR-ra gyakorolt hatások kapcsán egy sorrendiség figyelhető meg a vizsgált karbamátok esetében, mely az alábbi módon alakult a Dél-afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*)

petesejtjeiben: *fenoxycarb* > *EPTC* (*S-ethyl N,N dipropylthiocarbamate*) > *carbaryl*, *bendiocarb* > *propoxur* > *aldicarb*. Ezzel szemben a patkányagyon végzett AChE aktivitás vizsgálatok során kapott sorrend: *physostigmine*, *bendiocarb* > *propoxur*, *aldicarb* > *carbaryl* >> *EPTC*, *fenoxycarb*. A kapott eredmények alapján megfigyelhető, hogy a nAChR-rel erősebb kölcsönhatást mutató vegyületek kevésbé gátolják az AChE működését. A kutatók, a kapott eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a karbamátok nAChR-ra gyakorolt hatása eltérő toxicitást eredményezhet (Smulders et al. 2003, Gupta 2017). A hősokk fehérjék közé tartozó *hspb11* gén jelen van a zebradánió izomszövetében, specifikusan reagál az izomhiperaktivásra, közvetve szabályozzák az intracelluláris kalciumszintek és a hősokk közvetlenül nem indukálja a kifejeződését. Expressziója összefüggést mutat a nAChR aktivitásával (Shahid et al. 2016., Klüver et al. 2011). A nAChR funkcióját tekintve a központi és a perifériás idegrendszer változatos működésében tölt be szerepet. Az ACh kötődése a posztzinaptikus nAChR komplexhez gyors depolarizációt eredményez az izomvégi lemezek membránjában. Ez a depolarizáció aktivál egy csoport, feszültség-vezérelt nátriumcsatornát a neuromuszkuláris kötőhelyeken, átalakítja a helyi lemezdepolarizációt akciós potenciállá. Ez egy további eseménysorozatot indít el, melynek során izomösszehúzódás alakul ki, a szarkoplazmás retikulum kalciumionok átmeneti felszabadulásán keresztül (Shahid et al. 2016.,). A *bendiocarb* kezelés a *hspb 11* gén jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után, a 0,75-3 mg/l tartományban. Az AChE gátlása kihatással van a szívritmusra is (Watson et al. 2014). A fejlődésben lévő zebradánió embrió első szívverései szabálytalanságot, aritmiát mutatnak, de a termékenyülést követő 36. órára, ahogy fokozatosan beindul a keringés, szabályozódik (Kimmel et al. 1995, Barrionuevo & Burggren 1999). A zebradánióban a muszkarin M2 ACh receptor (mAChR) létfontosságú szerepet tölt be a szívverés szabályozásában és a fejlődési fázis ezen szakaszában már teljesen működőképes (Hsieh & Liao 2002). Mint ismeretes az ACh felhalmozódása az M2 ACh receptor túlzott stimulálása révén alacsony pulzusszámot, úgynevezett *bradycardiát* okoz (Hsieh & Liao 2002, Li et al 2007, Watson et al. 2014), ugyanakkor a nikotin receptorok ingerlése szapora szív működéshez (*tachycardia*) vezethet (Küster & Altenburger 2007). A muszkarinszerű tünetek megjelenése előtt ugyancsak tapasztalható egy megemelkedett pulzusszám (Ecobichon 2001b). A *bendiocarb* expozíció a 48 órás zebradánió embriók esetében 0,4-3 mg/l tartományban a pulzusszám szignifikáns fokozódását eredményezte. Küster és Altenburger (2007) munkája nagyon hasonló eredményeket közöl az *aldicarb* és metabolitja (*aldicarb-szulfoxid*) kapcsán. Zebradánión végzett vizsgálatuk során megfigyelték, hogy az *aldicarb-szulfoxid* alacsonyabb kezelési koncentrációi szignifikáns pulzusszám növekedést indukálnak, azonban a magasabb koncentrációknál szignifikáns csökkenés alakul ki. A karbamátok szívritmusra gyakorolt hatása változatos és a *tachycardia* ugyanolyan gyakran előfordulhat, mint a hatásmechanizmus alapján a

valószínűsíthető *bradycardia* (Vale & Lotti 2015). A kapott eredményeim arra engednek következtetni, hogy a vizsgált *bendiocarb* koncentrációtartomány *tachycardia* kialakulását okozza. Ezt a következtetést tovább erősíti, hogy a nAChR aktivitással összefüggést mutató *hsyb* 11 gén kifejeződése megemelkedett, így feltételezhető, hogy a nikotinreceptorokhoz kapcsolódó hatások (remegés, izomrángások, görcsök, izomgyengeség, bénulás, általános gyengeség, csökkent bél perisztaltika, magas vérnyomás, megváltozott mentális állapot, *mydriasis*, *tachycardia*, hiperglikémia) érvényesülnek (Gupta 2017, Vale & Lotti 2015, Lehel & Laczay 2011, Petrovova et al. 2011).

Ahogy fentebb is említésre került a szervezetet ért toxikus kitétség számos fiziológiai és biokémiai reakciót válthat ki a ROS termelődésével (Nishida, 2011), így vizsgálatuk elengedhetetlen a szervezetet ért stresszor-indukálta válaszok feltérképezésében, a környezetszennyezés értékelésében. Segítenek többlet információt szerezni a megváltozott szervi funkciókról és megbecsülni a szervezetet ért károsodás szintjét. Korábban kimutatták, hogy a karbamátok oxidatív stresszt váltanak ki, ami károsítja a mitokondriális funkciókat. Ezen felül kóros elváltozásokat okoznak az idegrendszerben és a hormonrendszerben is (Filho 1996). A korábban végzett tanulmányok arról számoltak be, hogy a *bendiocarb* módosítja az antioxidáns és méregtelenítő enzimaktivitást az emlősökben (Lahr et al 2000, Flesarova et al. 2007, Capcarova et al 2010, Karami-Mohajeri & Abdollahi 2011, Apaydin et al 2017). A termékenyülést követő 48 órában a lárvák SOD-aktivitása jelentősen csökkent a 3 mg/l-es *bendiocarb* kezelés hatására. Azonban a későbbi expozíciós ablakokban nem volt tapasztalható ez a gátlás. Valószínűsíthetőleg a fejlődés előrehaladtával megnövekedett az enzimszintézis és a szervezet kompenzálta a SOD aktivitásának csökkenését. Meng és munkatársai (2014b) is hasonló eredményre jutottak a nílusi tilápia kapcsán, a *methomyl* kezelést követően, ami arra enged következtetni, hogy a SOD gátlása jellemző lehet az inszekticid karbamátokra. Az embrionális *bendiocarb* kezelés a CAT működésében egy speciális mintázatot mutatott a 96 hpf expozíciós ablakban. A 0,4 mg/l-es kezelési csoport esetében mértük a legmagasabb szignifikáns CAT-aktivitást, ami a magasabb koncentráció tartományokban jelentősen csökkent. Ugyancsak indukálódott a CAT aktivitása *methomyl* terhelés hatására a nílusi tilápia máj mintáiban, valamint a *carbaryl* terhelés is emelte ez enzim szintjét juvenilis szivárványos pisztrángoktól származó máj mintákban (Meng et al 2014b, Ferrari et al 2007). Ellentétben a rövid 24 és 48 órás *carbaryl* expozíció által kiváltott hepatikus CAT aktivitással, a 96 órás kezelés csökkenti az enzim szintjét. Összességében megállapítható, hogy a CAT enzim aktivitása összetett, koncentráció- és expozíciós idő függő. Korábbi tanulmányok beszámoltak arról, hogy a *bendiocarb* kezelés fokozhatja a máj és a vese GST aktivitását patkányokban (Sobeková et al. 2009). A kapott eredményeim hasonlóan alakultak a termékenyülést követő 48. és 72. órában, koncentráció függően fokozódott a GST enzim

aktivitása. Az inszekticid karbamátok indukálhatják a GST aktivitását a halakban (Kimmel et al 1995, Li et al. 2008), viszont a 96 órás *carbaryl* expozíció csökkenti a máj GST aktivitását fiatal szivárványos pisztrángokban (Ferrari et al 2007). Ugyancsak csökkent enzim aktivitást találtak 96 órás *methomyl* expozíciót követően kínai razbórán (*Pseudorasbora parva*) végzett vizsgálatok során és a 24 órás *carbofuran* kitettség is csökkentette a Jucatáni gambúzia (*Gambusia yucatana*) májának GST aktivitását (Rendon-von Osten et al. 2005, Li et al 2008). Összegezve a kapott eredményeket és az irodalmi adatokat az ellentétes eredmények azt mutatják, hogy a GST aktivitása függ a szennyező vegyülettől, a halfajtól és az expozíciós időtől. A lipidperoxidáció szintje hasonló trendet követett, mint a CAT enzim aktivitása. A legmagasabb LPO szintet 0,4 mg/l-es koncentráció esetében detektáltuk és a magasabb koncentráció tartományokban csökkent a LPO. Hernández-Moreno és munkatársai (2010, 2011) hasonló jelenséget figyeltek meg a *carbofuran*-nak kitett tengeri sügerek (*Dicentrarchus labrax*) esetében. A 31, 63, 125 és 250 ug/l *carbofuran* expozíciót követően az LPO szintek csak 63 ug/l koncentrációnál mutattak szignifikáns növekedést. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a LPO hormetikus választ mutat a karbamátokra a különböző halfajokban.

A viselkedésmódokkal kapcsolatos tanulmányok fokozott népszerűségnek örvendenek, mivel érzékeny végpontnak tekinthetőek és jól beilleszthetőek a különböző vizsgálatokba. A környezetbe kerülő különböző xenobiotikumok befolyásolják az élőlények természetes cirkadián viselkedési ritmusát és fiziológiáját (Estela et al. 2023). Jelen doktori munka vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a szubletális *bendiocarb* expozíció csökkenti a fejlődésben lévő lárvák mozgás intenzitását a magasabb koncentráció tartományokban. Eredményeim párhuzamot mutatnak számos korábbi tanulmánnyal, ahol különböző inszekticid karbamátok viselkedésre gyakorolt hatását vizsgálták (Sousa & Nunes 2020., Jablonski et al. 2022., Liu et al. 2020., Wang et al. 2022.). A vízi szervezetek neurotoxicitását megváltozott úszási viselkedés is jellemzi (Little & Finger 1990; Little & Brewer 2001), amely komoly ökológiai jelentőséggel bír, hiszen károsan befolyásolhatja a táplálkozást, a menekülési reakciót és a szociális viselkedést. A megváltozott mozgásszervi aktivitás jól tükrözi az idegrendszert ért változásokat. Összességében elmondható, hogy a *bendiocarb* képes megzavarni a viselkedést és valószínűsíthetőleg az ACh felhalmozódása, a receptorok túlzott stimulálása okozhatja a neurotoxikus tüneteket. Az inszekticid karbamátok hatásmechanizmusukat tekintve reverzibilis AChE inhibitorok. Ettől függetlenül a korai kitettség különböző viselkedési változásokat indukálhatnak a felnőtt kori szervezetben is, amelyek negatív irányba befolyásolhatják a kifejlődött egyedek túlélését (Correia et al. 2019).

A szubletális *bendiocarb* expozíciót követően teljes transzkriptom szinten is jelentős eltéréseket találtam, több, mint 2694 gén kifejeződését befolyásolta szignifikáns mértékben. A represszált gének között szignifikánsan feldúsultak azok a gén csoportok, amelyek az érzékszervi fejlődésben

és a vizuális észlelésben játszanak fontos szerepet. A növényvédő szerek, beleértve az inszekticid karbamátokat is, befolyásolhatják a halak retinájának fejlődését, későbbi funkcióját, működését és morfológiáját (Chen 2020). A karbamátok csoportjába tartozó *methomyl* csökkenti a zebra-dánió lárvák szemméretét (Jablonski et al. 2022). Pessoa és munkatársai (2011) megállapították, hogy a *carbofuran* expozíció jelentősen csökkentette a nílusi tilápa látásélességét. Korábban Petrovova és munkatársai (2009) vizsgálták a *bendiocarb* embrió toxicitását csirkeembriókon. Enyhe, de nem szignifikáns növekedést figyeltek meg az embriók szemében az apoptotikus sejtek számát illetően, azonban nem találtak specifikus rendellenességeket, amelyek arra engedtek volna következtetni, hogy a *bendiocarb* potenciális teratogén hatással rendelkezne a madár embriók esetében. Az embrionális *bendiocarb* kitettség a fény érzékelésben és a fototranszdukcióban szerepet játszó két markergén (*rho*, *opn1mw2*) szignifikáns represszálasát vonta maga után. A legmagasabb koncentrációval kezelt egyedek szemének a retina rétegei között vakuolizáció alakult ki. Valószínűsíthetőleg a *bendiocarb*, hasonlóan más inszekticid karbamátokhoz, befolyásolja a retina fejlődését. A viselkedés vizsgálatok eredményei kapcsán azonban megállapítható, hogy a kezeléssel átesett lárvák érzékelik a sötét-fény ciklus változását.

Az embrionális *bendiocarb* expozíció teljes transzkriptom analízise során megállapítottam, hogy a fokozott kifejeződést mutató gének között kiemelkedtek az izomszövethez, izomrendszerhez kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó géncsoportok. Az acetilkolin gátlásán alapuló rovaritató szerek az ideg- és izomszövetekben változásokat indukálhatnak, ami a különböző fiziológiai folyamatok zavarához vezethet. A gerincesek embrionális fejlődés során az idegi aktivitás és az intracelluláris *downstream* folyamatok kritikusak az izomrostképződés szabályozásában. Az ACh inhibitorok hatására túlzott stimulálás alakul ki, megfigyelhető izomhiperaktivitás, *myopathiához* hasonló fenotípusok, görcsök, befolyásolhatják az ion csatornák működését, az izomspecifikus (*desma*, *fn1b*, *pdlim3b*, *pck1*, *xirp1*) gének kifejeződését (Klüver et al. 2011, Otten et al. 2012, Shahid et al. 2016). Az embrionális *bendiocarb* expozíció hatására a két izomspecifikus gén (*desma*, *fn1b*) kifejeződése indukálódott, illetve a kórszöveti vizsgálatok szöveti eltéréseket mutattak a két legmagasabb koncentráció esetében. A *bendiocarb* kitettség hasonló tüneteket eredményez, mint amit az AChE gátlók kapcsán korábbi tanulmányok említettek.

A teljes transzkriptom analízis elemzése során arra a következtetésre jutottam, hogy az izomhoz kapcsolt géncsoportok mellett az immunrendszerhez- kapcsolt folyamatokban közreműködő géncsoportok kifejeződése is megemelkedett. Ez együtt járt két immunválasz-asszociált gén (*cxcl18b*, *cxcl8b.1*) koncentráció-függő indukálásával, a neutrofil granulociták megváltozott eloszlásával, emelkedett nitrogén-monoxid termeléssel, amely az oldalon mentén különösen intenzívnek bizonyult. A lokális gyulladáson (farokúszó sebzés) alapuló modellben csökkentette

a neutrofil granulociták felhalmozódását a sebzés területén. A kapott eredmények alapján a *bendiocarb* kitettség immunmoduláns hatásokat eredményezhet és valószínűsíthetőleg a *bendiocarb* kezelés egy szisztémás jellegű gyulladáshoz vezet, ami a fejlődésben lévő lárvákban. Az immunrendszer kölcsönhatásban lévő sejtek rendkívül összetett hálózatából áll és felosztható veleszületett (nem antigén specifikus), és adaptív (antigén specifikus) immunrendszerekre vagy humorális immunitásra és sejtközvetített immunitásra (Dhouib et al. 2016, Lee & Choi 2020). Fő feladata, hogy megvédje a szervezetet a behatoló kórokozótól, ideértve a fertőző ágenseket, a rosszindulatú sejteket, valamint az előregedett vagy genotípusosán megváltozott sejteket (Dhouib et al. 2016). Az immunrendszert alkotó immunsejteket fehérvérsejteknek vagy leukocitáknak is nevezik. A leukociták tovább oszthatók neutrofilekre, eozinofilekre, bazofilekre, limfocitákra és monocitákra. Minden immunsejtípusnak saját funkcionális jellemzői vannak, és az immunrendszerben meghatározott módon lépnek kölcsönhatásba egymással (Lee & Choi 2020). A karbamátok hatásmechanizmusa az AChE gátláson alapul és a szerin primer alkoholos hidroxilcsoportjával lépnek reakcióba. Azonban a szerin-hidroláz aktivitása valószínűsíthetőleg több immunfunkcióhoz is kapcsolódik (Fukuto 1990, Vaknine & Soreq 2020). Banks & Lein (2012), kimutatták, hogy a karbamát peszticidek az AChE gátlásán keresztül megváltoztathatják a limfocita kolinerg jelátvitelt, az immunociták sejtmembránjához kapcsolódó észteráz-aktivitásokat. Ezenkívül a gátlás strukturális és funkcionális változásokhoz vezethet az immunocitákban, módosíthatja a jelátviteli utakat, gátolhatja vagy éppen stimulálhatja az immunsejtek aktivációját, proliferációját, majd effektor funkcióját (Chambers & Oppenheimer 2004). Továbbá valószínűsíthető, hogy a karbamátok által generált szabad oxigénradikálok gátolják a T-sejtek működését a membrán lipidperoxidációján keresztül (Gao et al. 2015), azonban az inszekticid karbamátok specifikus hatásai az immunrendszer működésére továbbra is kevésbé ismertek (Dhouib et al. 2016). A legtöbb *in vivo* vizsgálat a karbamátokat immunmodulátorként mutatja be, miszerint zavart okozhatnak a veleszületett immunrendszerben, krónikus gyulladások kialakulásához vezethetnek, immunválaszt indukálhatnak azáltal, hogy megváltoztatják a tumorantigénekre, az allergénekre, a saját antigénekre és mikrobiális antigénekre adott szabályozott immunválaszokat (Dhouib et al. 2016, Vaknine & Soreq 2020) Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok során kapott eredmények általában megegyeznek és jól extrapolálható információkat szolgáltatnak a humán immunológia számára. azonban további munkálatok szükségesek a kísérleti adatok és az emberi immunotoxicitás kockázata közötti távolság csökkentéséhez.

A prenatális fejlődés alatt a gerinces embriók különösen érzékenyek azon anyagokra, amelyek befolyásolják a kolinerg-receptorok vagy a AChE működését. A neurotranszmitterek a fejlődő szövetekben növekedésszabályzó és morfogenetikai funkciókat látnak el (Petrovova et al. 2011).

Részt vesznek az ontogenezis szakaszaiban és alapvető szerepet játszanak az agy sejt- és szerkezeti fejlődésében (Whitaker-Azmitia, 1984, Buznikov et al. 1996, Slotkin 1999). A fejlődési időszakban a kolinerg receptorok stimulálása szabályozza a sejtek replikációját, differenciálódását. A receptorstimuláció egyedi módon kommunikál a sejt differenciálódást szabályozó génekkel, befolyásolva a sejt végső sorsát (replikáció, differenciálódás, növekedés, apoptózis). Az esetleges stimuláció változás (időzítés, intenzitás) azonban befolyásolhatja az idegrendszer fejlődését (Petrovova et al. 2011). A fejlődő neurotranszmitter-rendszer különösen sebezhető pl. a szerves foszforsav-észterek és a karbamát peszticidek akut kolinerg toxicitására, amelyeket úgy terveztek, hogy hatást gyakoroljanak a receptorokra. A fejlődésben lévő szervezetek érzékenyebbek az ilyen típusú toxicitásra és ha az idegrendszer fejlődésének kritikus időszakaiban történik az expozíció módosulhat az AChE nem-kolinerg szerepe (Bigbee et al., 1999). A doktori munka során betekintést nyertem az LC₁₀ alatti *bendiocarb* koncentrációk okozta tünetekbe, korai életszakaszban. A vizsgálatok a humán betegség modellezésben és a preklinikai gyógyszer tesztelésben is használatos modellszervezeten, a zebradánió embriókon történtek. Az egymást kiegészítő toxikológiai, morfológiai, enzimaktivitási, viselkedési, transzkriptomikai, hisztopatológiai, immunológiai vizsgálatok egymással és a szakirodalommal összhangban lévő eredményeket szolgáltatottak. Összességében elmondható, hogy az embrionális *bendiocarb* kitettség az AChE gátlásán keresztül számos biológiai folyamatra hatást gyakorolt, amelyek jelentős mértékben meghatározhatják a fejlődő szervezet későbbi életfolyamatait. A *bendiocarb* a rovarok idegrendszerét célozza, azonban a neurokémiai folyamatok hasonlósága miatt valószínűsíthetőleg neurotoxikus lehet az emberre is. Számos gén kifejeződésében okozott változást a *bendiocarb* kezelés, olyanokban is, amelyek rendelkeznek humán ortológ génnel. Ugyanakkor a kapott eredmények fejlettebb gerincesek irányába történő extrapolálásakor körültekintően kell eljárni és további vizsgálatok elvégzése szükséges, azonban a zebradánió embrión kapott eredmények jó alapot szolgáltathatnak.

6. Javaslatok

A doktori munka során kapott eredmények alapján érdemes a krónikus kitétség vizsgálatok elvégzése, az embrionális/adult kori, akár generációkon átívelő hatásának megismerése, a hosszú távú következmények feltérképezése. A legtöbb többgenerációs vizsgálat fontos végpontja, a halak szaporodásbiológiai paramétereinek vizsgálata, hiszen jól mutatja populáció szinten történő hatásokat. Az inszekticid karbamátok befolyásolhatják az endokrin rendszer működését, amely kihatással lehet a szaporodásra is. Így javasolt az esetleges hormonmoduláns hatás feltérképezése. Reprodukciós képességet vizsgáló toxikológiai tesztek elvégzése.

Munkám során kapott eredmények tükrében érdemes lenne a további kardiotoxicitás vizsgálatok elvégzése, kiegészítve szív-regenerációs modell használatával. A teljes transzkriptom analízis során kapott eredmények alapján a bendiocab kezelés befolyásolhatja a szöveti regenerációt és a sebgyógyulást. Így érdemes a szívizomszövet regenerációját megvizsgálni, illetve az immunmoduláns hatás további feltárása, akár egy makrofág-specifikus transzgenikus zebradánió vonal bevonásával.

A természetben előforduló szennyezők értékelése azon alapul, hogy a különböző szervezeteket egyedi peszticid szennyezésnek teszik ki, azonban a valóságban a növényvédő szerek ritkán fordulnak elő önmagukban, így javasolt a keverék vizsgálatok elvégzése

7. Új tudományos eredmények

1. Elsőként vizsgáltam akut toxicitási tesztek segítségével a bendiocarb fél-letális és effektív koncentrációját zebraadánió lárvákra 96 órás expozíció mellett. A 96 órás LC50 érték 32,52 mg/l. Megállapítottam, hogy a bendiocarb expozíció a 3,12 mg/l feletti koncentrációk esetében jelentősen befolyásolja a lárvák fejlődését.
2. Elsőként mutattam ki, hogy a szubletális koncentrációkkal történő embrionális bendiocarb expozíció hatására a pulzusszám és mozgásintenzitás csökken, az AChE, SOD, CAT, GST és GPxSe aktivitása és a LPO szintje csökken 96 órás zebraadánió lárvákban a 0,4-3 mg/l-es koncentráció tartományban.
3. Elsőként írtam le a szubletális koncentrációkkal történő embrionális bendiocarb expozíció teljes RNS szekvenáláson alapuló, teljes transzkriptomra gyakorolt hatásait 96 órás zebraadánió lárvákban. A 3 mg/l-es bendiocarb expozíció indukálta az izomrendszerhez és az immunrendszerhez kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó gének, illetve csökkentette a vizuális észleléssel, az érzékszervi fejlődéssel és az idegrendszer fejlődésével kapcsolatos gének kifejeződését.
4. Megállapítottam, hogy a bendiocarb negatív irányba befolyásolja a fejlődő embriók vizuális észlelését és 3 mg/l-es koncentráció tartományban, kórszövettani eltéréseket eredményez a szemben, de fokozza a fejlődő embriók izom működését, és kórszövettani elváltozásokat okoz a szöveten belül.
5. Elsőként számoltam be arról, hogy a szubletális koncentrációkkal történő embrionális bendiocarb kitettség megváltoztatja a neutrofil granulociták eloszlását a zebraadánió lárvákban és csökkenti a gyulladásokra adott válaszreakciójukat. Megállapítottam továbbá, hogy a bendiocarb növeli a nitrogén-monoxid produkciót a lárvák oldalvonalala mentén.

8. Összefoglalás

Napjainkra a különböző növényvédő szerek a mindennapjaink természetes része, hiszen meghatározó szerepet töltenek be a mezőgazdaságban, a köz-, és állategészségügyben, az élelmezésben és szerepet játszanak a jobb életminőség fenntartásában. Intenzív felhasználásuknak köszönhetően fokozódik a környezetben, az élelmiszerekben, a növényi-, állati-, humán eredetű mintákban való megjelenése. Ezek a vegyületek sok esetben igen erőteljes biológia hatással rendelkeznek, ezért elengedhetetlen a jelenlétükből fakadó következmények feltárása, megismerése.

A *bendiocarb* a karbamátok csoportjába tartozó széles spektrumú rovarölő, amely hatás mechanizmusát tekintve kolinészteráz-gátlók közé tartozik. Egyike WHO által manapság is ajánlott vegyületeknek, amelyek segítik a szúnyogok számnak kontrollálását így az érintett területeken a malária terjedésének csökkenését. Elterjedt használata ellenére csekély számú eredmény áll rendelkezésre a *bendiocarb* terhelés okozta biológiai hatásokról. Emiatt a jelen doktori munka elsődleges célját az alacsony, szubletális koncentrációkkal történő embrionális *bendiocarb* expozíció komplex hatásvizsgálata képezte zebraadánió embriókon, lárvákon. A zebraadánió közkedvelt gerinces modellszervezet, mely számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik így részletes és extrapolálható információk nyerhetők a felhasználásával.

A szubletális, embrionális *bendiocarb* expozíció fél- halálos koncentrációja (LC₅₀) 96 órával a termékenyülés után 32,52 mg/l a zebraadánió embriók esetében. A *bendiocarb* kitettség különféle embrionális rendellenességeket (farokfejlődési rendellenességek, csökkentett testhossz, eltérés a melanociták számában, méretében, eloszlásában, pigmenthiány) eredményezett az embriókban/lárvákban. A magasabb koncentráció tartományokban (25 mg/l felett) pigmenthiány alakult ki. A vegyület elsődleges hatása a kolinészteráz-gátláson alapul, ennek megfelelően koncentráció-, idő függő gátlást okozott az AChE enzim aktivitásában. Az így kialakult neurotoxikus tünetek muszkarinszerű, nikotinszerű, központi idegrendszeri hatásúak lehetnek. Valószínűsíthetőleg a *bendiocarb* a vizsgált koncentrációtartományban a szív működés tekintetében a nikotin receptorok stimulálását okozta, ami *tachycardia* kialakulásához vezet. Ezen túlmenően a szubletális *bendiocarb* expozíció befolyásolja a reaktív oxigénmolekulák (ROS) termelődését a fejlődő embriókban/lárvákban, mindemellett igen jelentős, teljes transzkriptom szintű eltérések mutatkoztak meg a kezelést követően. A represszált gének között szignifikánsan feldúsultak azok a gén csoportok, amelyek a vizuális észlelésben és az érzékszervi fejlődésben játszanak fontos szerepet. Az ilyen irányú további vizsgálataim során a fény érzékelésben és a fototranszdukcióban szerepet játszó két markergén (*rho*, *opn1mw2*) erőteljes gátlása alakult ki a *bendiocarb* kezelés hatására, és kórszövettani eltéréseket figyeltünk meg a legmagasabb

koncentráció esetében a zebraadánió lárvák retinájában. Valószínűsíthető, hogy a *bendiocarb* hasonlóan más inszekticid karbamátokhoz befolyásolja a halak retina fejlődését. Azonban a lokomotoros aktivitás eredményei arra engednek következtetni, hogy a vizuális érzékelés megtartott, csökken ugyan a kezelésen átesett lárvák mozgásaktivitása, de a kontroll csoporthoz hasonlóan a sötét fázis megkezdésével indukálódik a helyváltoztatás és az ismételt fényciklus beálltát követően redukálódik az aktivitás. Az embrionális *bendiocarb* expozíció teljes transzkriptom analízise azt mutatta, a vegyület fokozza az izomszövethez, izomrendszerhez kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó géncsoportok kifejeződését. Kórszöveti eltéréseket okoz az izomszövetben, valamint a kiválasztott két izomspecifikus markergén (*desma*, *fn1b*) kifejeződését szignifikáns mértékben indukálja. Ezen végpontok pedig párhuzamot mutattak a transzkriptom analízis során kapott eredményekkel. Az izomhoz kapcsolt géncsoportok mellett az immunrendszerhez kapcsolt folyamatokban közreműködő géncsoportok kifejeződése is indukálódott a teljes transzkriptom analízis során. Ezenkívül megfigyelhető volt a neutrofil granulociták lárvákban belüli diffúz szóródása, a nitrogén-monoxid szint emelkedése, valamint a két immunválasz-asszociált markergén (*cxcl18b*, *cxcl8b.1*) erőteljes indukálása. A *bendiocarb* kezelés befolyásolta a neutrofil granulociták lokális sebzésre adott válaszreakcióját is. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a *bendiocarb* kezelés egy szisztémás gyulladást okoz a zebraadánió lárvákban és nem kizárt az immunmoduláns hatása sem.

Összefoglalva az eredményeket, jól látható, hogy a rövid *bendiocarb* kitettség is jelentős hatást gyakorol az állatok embrionális fejlődésére. Habár a kapott eredmények extrapolálása során körültekintően kell eljárni, bízunk abban, hogy a zebraadánió, mint elfogadott gerinces modell szervezeten született eredmények jó alapot szolgáltatnak a további kutatásokhoz.

9. Summary

In today's world, various pesticides have become a natural part of our daily lives, as they play a crucial role in agriculture, public and animal health, food production, and contribute to maintaining a better quality of life. Due to their intensive use, their presence is increasing in the environment, in food, and in samples of plant, animal, and human origin. These compounds often possess powerful biological effects, which is why it is essential to explore and understand the consequences arising from their presence.

Bendiocarb belongs to the group of carbamates, and it is a broad-spectrum insecticide with a mechanism of action classified among cholinesterase inhibitors. It is one of the compounds currently recommended by the World Health Organization (WHO) to assist in controlling the mosquito population, thereby reducing the spread of malaria in affected areas. Despite its widespread use, there is limited information available on the biological effects caused by *bendiocarb* exposure. For this reason, the primary objective of this doctoral thesis was to conduct a comprehensive impact assessment of embryonic *bendiocarb* exposure at low, sublethal concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Zebrafish is a popular vertebrate model organism with numerous advantageous properties, allowing for detailed and extrapolatable information to be obtained through its utilization.

The sublethal embryonic exposure to *bendiocarb* resulted in a half-lethal concentration (LC₅₀) of 32.52 mg/l 96 hours after fertilization in zebrafish embryos. *Bendiocarb* exposure led to various embryonic abnormalities, including tail developmental disorders, reduced body length, variations in the number, size, distribution, and pigment deficiency of melanocytes in embryos/larvae. Pigment deficiency occurred in the higher concentration range (above 25 mg/l). The primary effect of the compound is based on cholinesterase inhibition, causing concentration- and time-dependent inhibition of acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity. The neurotoxic symptoms that ensued could be like muscarinic, nicotinic, or central nervous system-related. Presumably, *bendiocarb* in the examined concentration range stimulated nicotine receptors in terms of cardiac function, leading to the development of tachycardia. Furthermore, sublethal *bendiocarb* exposure influenced the production of reactive oxygen species (ROS) in developing embryos/larvae. In addition, significant, whole-transcriptome-level differences were observed following treatment. Among the repressed genes, gene groups significantly enriched in those involved in visual perception and sensory development were identified. Further investigations revealed robust inhibition of two marker genes (*rho*, *opn1mw2*) involved in light perception and phototransduction upon *bendiocarb* treatment. Histopathological alterations were observed in the retinas of zebrafish larvae at the highest concentration. It is likely that *bendiocarb*, similar to other insecticidal carbamates, affects

fish retina development. However, results of locomotor activity suggest that visual perception is retained. Although the movement activity of treated larvae decreases, similar to the control group, movement is induced with the onset of the dark phase, and activity is reduced after the establishment of repeated light-dark cycles. The whole transcriptome analysis of embryonic *bendiocarb* exposure indicated that the compound enhances the expression of gene groups involved in processes related to muscle tissue and the musculoskeletal system. This leads to histopathological changes in muscle tissue, and the expression of the selected two muscle-specific marker genes (*desma*, *fn1b*) is significantly induced. These endpoints were parallel to the results obtained during the transcriptome analysis. In addition to the muscle-associated gene groups, the expression of gene groups involved in immune system processes was induced during the whole transcriptome analysis. Furthermore, diffuse scattering of neutrophil granulocytes within larvae, an increase in nitric oxide levels, and robust induction of two immune response-associated marker genes (*cxcl18b*, *cxcl8b.1*) were observed. *Bendiocarb* treatment also affected the local response of neutrophil granulocytes to injury. The results suggest that *bendiocarb* treatment induces a systemic inflammation in zebrafish larvae, and its potential immunomodulatory effect is not excluded.

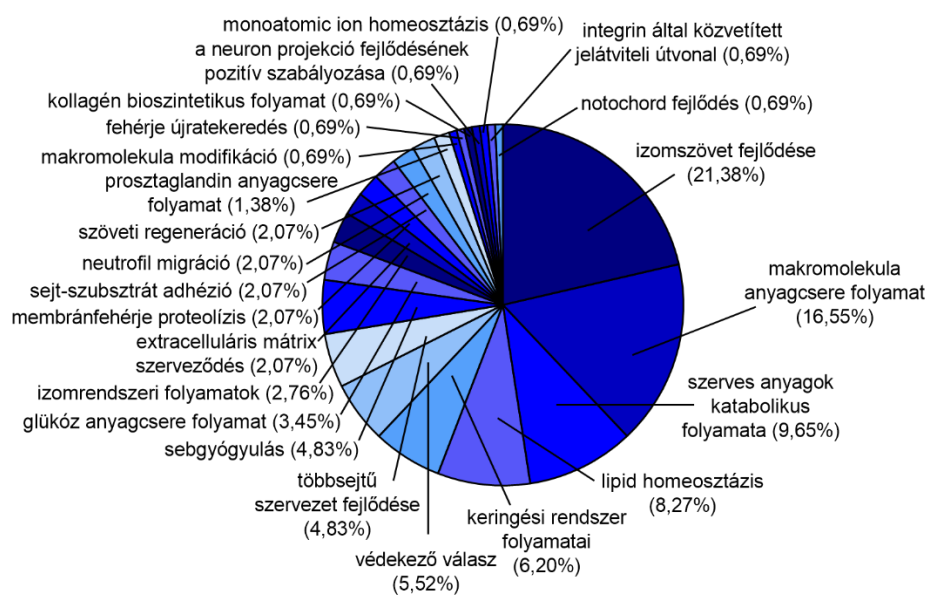
In summary, it is evident that even brief exposure to *bendiocarb* has a significant impact on the embryonic development of animals. While caution must be exercised in extrapolating the results, we are optimistic that the findings obtained in the accepted vertebrate model organism, zebrafish, provide a solid foundation for further research.

10. Melléklet

1. melléklet: A 20. ábra nagyított képe. A *bendiocarb* expozíció teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai 96 órás zebra-dánió lárvákban. (A) A 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentráció által szignifikáns mértékben indukált (B) a 4 mg/l-es *bendiocarb* koncentráció által legszignifikánsabb mértékben indukált folyamatok.

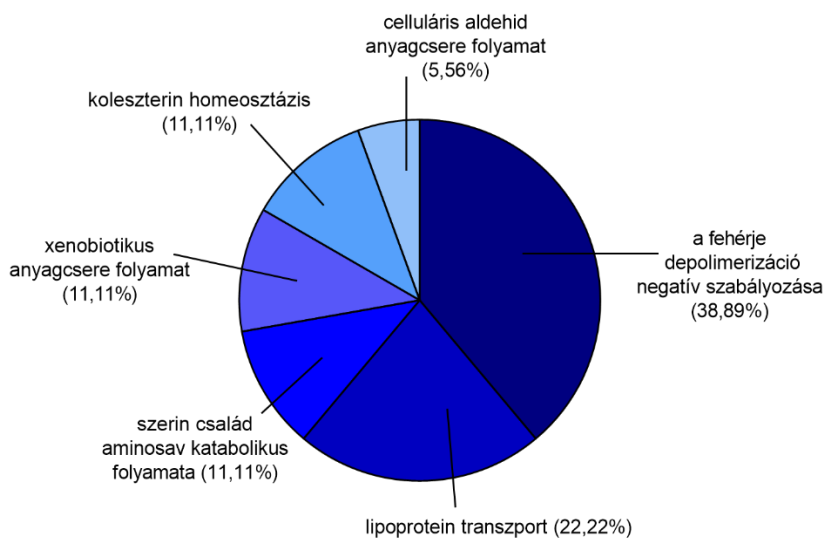
A

Indukált folyamatok (3 mg/L)



B

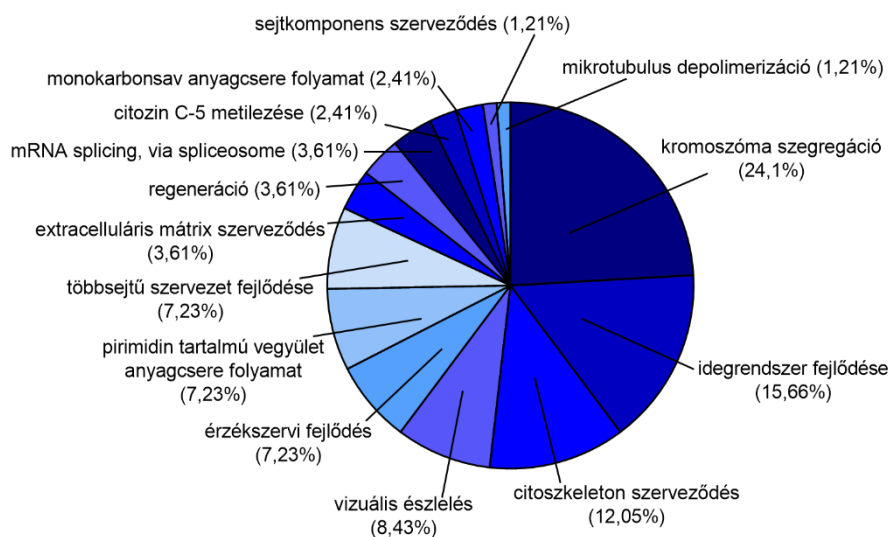
Indukált folyamatok (0.4 mg/L)



2. melléklet: A 20. ábra nagyított képe. A *bendiocarb* expozíció teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai 96 órás zebra-dánió lárvákban. (C) a 3 mg/l-es *bendiocarb* koncentráció által legszignifikánsabb mértékben represszált biológiai folyamatok. (D) A 3 mg/l-es és a 4 mg/l-es *bendiocarb* koncentrációk által legszignifikánsabb mértékben indukált folyamatok.

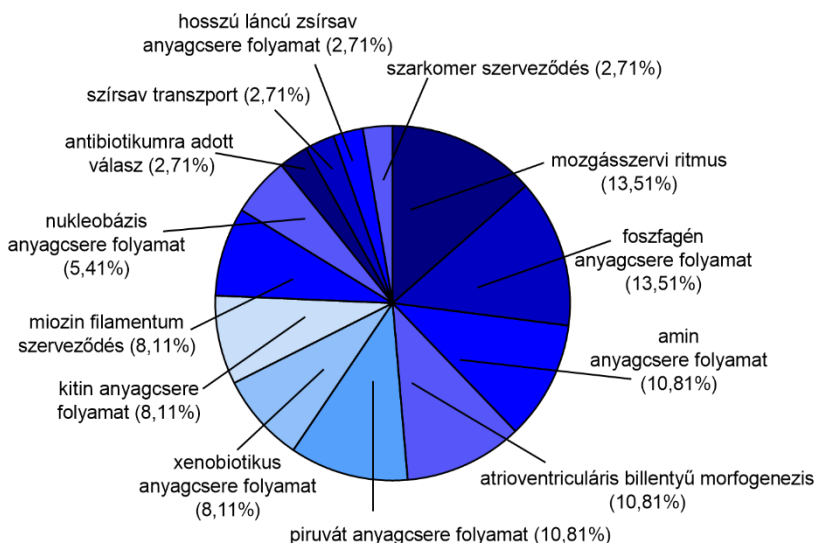
C

Represszált folyamatok (3 mg/L)



D

Indukált folyamatok 3 mg/L és 0.4 mg/L



11. Irodalomjegyzék

Abubakar Y., Tijjani H., Egbuna C., Adetunji C. O., Kala S., Kryeziu T. L., Ifemeje J. C., & Patrick-Iwuanyanwu K. C. 2020: Pesticides, history, and classification. In Nat. rem. for pe., dis. and wee. cont. (pp. 29-42). Academic Press.

Aebi H. 1984: Catalase in Vitro. Meth. Enzymol. 105, 121–126.

Akashe M. M., Pawade U. V., Nikam A. V. 2018: Classification of pesticides: a review. Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 2018;9(4):144-150

Albuquerque E. X., Pereira E. F., Alkondon M., & Rogers, S. W. 2009: Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiological reviews.

Aloizou A. M., Siokas V., Vogiatzi C., Peristeri E., Docea A. O., Petrakis D., Provatas A., Folia V., Chalkia C., Vincenti M., Wilks M., Izotov B. N., Tsatsakis A., Bogdanos D. P., Dardiotis E. & Dardiotis, E. 2020: Pesticides, cognitive functions and dementia: A review. Tox. lett., 326, 31-51.

Amsterdam A., Burgess S., Golling G., Chen W. B., Sun Z. X., Townsend K., Farrington S., Haldi M., Hopkins N. 1999: A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. Gen. Dev. 13:2713–2724

An G., Hong T., Park H., Lim W., & Song G. 2023: Oxamyl exerts developmental toxic effects in zebrafish by disrupting the mitochondrial electron transport chain and modulating PI3K/Akt and p38 Mapk signaling. Sci. of The Tot. Environ., 859, 160458.

Apaydin F. G., Baş H., Kalender S., & Kalender Y. 2017: Bendiocarb induced histopathological and biochemical alterations in rat liver and preventive role of vitamins C and E. Environ. Tox. and Pharm., 49, 148-155.

Arnal N., Morel G., Marra C. A., & Astiz M. 2019: Pro-apoptotic effects of low doses of dimethoate in rat brain. Tox. and app. pharm., 363, 57-63.

Banks C. N., & Lein P. J. 2012: A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. Neurotox., 33(3), 575-584.

Barr D. B., Barr J. R., Maggio V. L., Whitehead Jr, R. D., Sadowski M. A., Whyatt R. M., & Needham L. L. 2002: A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. Jou. of Chromat. B, 778(1-2), 99-111.

Barrionuevo W. R., & Burggren W. W. 1999: O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O₂. Am. Jou. of Phy.-Reg., Integ. and Comp. Phy., 276(2), R505-R513.

Belzunces L. P., Tchamitchian S., & Brunet J. L. 2012: Neural effects of insecticides in the honey bee. Apid., 43, 348-370.

Bendiocarb (Technical Fact Sheet) NPIC Technical Fact Sheets. (2002) Available online: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/bendiotech.pdf> (accessed on 30 December 2020).

- Berman T., Hochner-Celnikier D., Barr D. B., Needham L. L., Amitai Y., Wormser U., & Richter E. 2011: Pesticide exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: results of a pilot study. *Environ. inter.*, 37(1), 198-203.
- Bhatt P., Zhou X., Huang Y., Zhang W., & Chen S. 2021: Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. *Jou. of haz. mat.*, 411, 125026.
- Bhuiyan M. A. H., Rahman M. H., Uddin M. A., Chowdhury M. A. Z., Rahman M. A., Saha B. B., & Didar-Ul Islam S. M. 2021: Contamination of pond and canal water by residues of organophosphorus and carbamate pesticides in Feni district, Bangladesh. *Environ. Sustain.*, 4, 191-197.
- Bigbee J. W., Sharma K. V., Gupta J. J., & Dupree J. L. 1999: Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ. hea. persp.*, 107(suppl 1), 81-87.
- 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. *Bioinf.*, 25(8), 1091-1093.
- Bird S., Traub S. J., & Grayzel J. 2014: Organophosphate and carbamate poisoning. *UpToDate*, 14, 339.
- Blader P., Strahle U. 2000: Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Hum. Mol. Genet.* 9:945–951
- Bocquené G., Galgani F., & Walker C. H. 1997: Les cholinestérasés, biomarqueurs de neurotoxicité. *Bio. en éco.. Aspects fondamentaux*, 43, 209-240.
- Bordás Imre 2006: Veszélyes anyagok, készítmények-Peszticidok, Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Budapest
- Bouchard M., Carrier G., & Brunet R. C. 2008: Assessment of absorbed doses of carbaryl and associated health risks in a group of horticultural greenhouse workers. *Inter. Arch. of Occup. and Environ. Hea.*, 81, 355-370.
- Bradford M. 1976: A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 772, 242–264
- Brouwer M., Huss A., van der Mark M., Nijssen P. C., Mulleners W. M., Sas A. M., van Laar T., de Snoo G. R., Kromhout H. & Vermeulen R. C. 2017: Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environ. inter.*, 107, 100-110.
- Burgess H. A., Granato M. 2007: Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *Jou. Exp. Bio.* 210:2526–2539
- Buznikov G. A., Shmukler Y. B., & Lauder J. M. 1996: From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development?. *Cell. and mol. neurobio.*, 16, 533-559.

- Canedo A., & Rocha T. L. 2021: Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Sci. of The Tot. Environ.*, 762, 144084.
- Capcarova M., Petrovova E., Flesarova S., Dankova M., Massanyi P., & Danko J. 2010: Bendiocarbamate induced alterations in selected parameters of rabbit homeostasis after experimental peroral administration. *Pest. biochem. and phy.*, 98(2), 213-218.
- Carazo-Rojas E., Pérez-Rojas G., Pérez-Villanueva M., Chinchilla-Soto C., Chin-Pampillo J. S., Aguilar-Mora P., Alpizar-Marín M., Masís-Mora M., Rodríguez-Rodríguez C. E. & Vryzas Z. 2018: Pesticide monitoring and ecotoxicological risk assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem. *Environ. poll.*, 241, 800-809.
- Casado J., Brigden K., Santillo D., & Johnston P. 2019: Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Sci. of the tot. environ.*, 670, 1204-1225.
- Ccancapa A., Masiá A., Navarro-Ortega A., Picó Y., & Barceló D. 2016: Pesticides in the Ebro River basin: occurrence and risk assessment. *Environ. Poll.*, 211, 414-424.
- Chakravarthy S., Sadagopan S., Nair A., & Sukumaran S. K. 2014: Zebrafish as an in vivo high-throughput model for genotoxicity. *Zebraf.*, 11(2), 154-166.
- Chambers J., Oppenheimer S. F. 2004: Organophosphates, serine esterase inhibition, and modeling of organophosphate toxicity. *Tox. Sci.* 77:185–187
- Chen L. 2020: Visual system: An understudied target of aquatic toxicology. *Aquat. Tox.*, 225, 105542.
- Chen Y., Huang R., Guan Y., Zhuang T., Wang Y., Tan R., Wang J., Zhou R., Wang B., Xu J., Zhang X., Zhou K., Sun R., & Chen M. 2021: The profiling of elements and pesticides in surface water in Nanjing, China with global comparisons. *Sci.of The Tot. Environ.*, 774, 145749.
- 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. *Chem.*, 247, 125870.
- Chittrakul J., Sapbamrer R., & Sirikul W. 2021: Insecticide exposure and risk of asthmatic symptoms: A systematic review and meta-Analysis. *Tox.*, 9(9), 228.
- Chłopaś-Konowalek A., Zawadzki M., Kurach Ł., Wachelko O., Ciaputa R., Tusiewicz K., & Szpot P. 2022: Simultaneous poisoning of 48 birds of prey-bendiocarb determination with the use of UHPLC-ESI-MS/MS method in fatal case from Eastern Europe. *Arch. Medy. Sado. i Krym.* 72(2), 67-80
- Christos A. D. 2009: Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scie. Res. and Ess.*, 4(10), 945-949.
- Commission of the European Communities (1967) Council Directive 67/548/EEC of 18 August 1967 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Official Journal of the European Communities* L96/1

Commission of the European Communities (1986) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal L 358 , 18/12/1986 P. 0001–0028

Commission of the European Communities (1991) Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal of the European Communities L 230/1

Commission of the European Communities (1992) Council Directive 92/32/EEC of 30 April 1992 amending for the seventh time Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances

Commission of the European Communities (1993a) Council Regulation 793/93/EEC of 23 March 1993 on the evaluation and control of risks of existing substances. Official Journal of the European Communities L84/1

Commission of the European Communities (1993b) Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993, laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC. Official Journal of the European Communities L227/9

Commission of the European Communities (1994) Regulation 1488/94/EEC of 28 June 1994, laying down the principles for the assessment of risks to man and the environment of existing substances in accordance with Council Regulation 793/93/EEC. Official Journal of the European Communities L161/3

Cooper J, Dobson H. 2007: The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.* 2007, 26, 1337-1348.

Cornet C., Calzolari S., Miñana-Prieto R., Dyballa S., van Doornmalen E., Rutjes H., Savy T., D'Amico D., Terriente J. 2017: ZeGlobalTox: an innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. *Int. Jou. Mol. Sci.* 18:864

Correia D., Almeida A. R., Santos J., Machado A. L., Uzun O. K., Žlábek V., Oliveire M., & Domingues, I. 2019: Behavioral effects in adult zebrafish after developmental exposure to carbaryl. *Chem.*, 235, 1022-1029.

Costa L. G., Giordano G., Guizzetti M., & Vitalone A. 2008: Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front. in Biosci-Landm.*, 13(4), 1240-1249.

Crapo J. D., McCord J. M., Fridovich I. 1978: Preparation and assay of superoxide dismutases. *Meth. Enzymol.* 53, 382–393.

CVMP/VICH (2000) Guideline on environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products—phase I. VICH Topic GL6 (Ecotoxicity Phase I) Step 7 (CVMP/VICH/592/98)

da Silva Brito R., Pereira A. C., Farias D., & Rocha T. L. 2022: Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Sci. of The Tot. Environ.* 157665.

- Dai Y. J., Jia Y. F., Chen N., Bian W. P., Li Q. K., Ma Y. B., Chen Y. L., Pei D. S. 2014: Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Tox. Chem.* 2014 Jan;33(1):11-7
- De A., Bose R., Kumar A., & Mozumdar S. 2014: Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles (pp. 5-6). New Delhi: Springer India.
- De la Torre F. R., Ferrari L., & Salibián A. 2002: Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp. Biochem. and Phy. P. C: Tox. & Pharm.*, 131(3), 271-280.
- de Souza R. M., Seibert D., Quesada H. B., de Jesus Bassetti F., Fagundes-Klen M. R., & Bergamasco R. 2020: Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Pro. Safe. and Environ. Prot.*, 135, 22-37.
- Deák G., Juhász T., Árvay M., & Horváth M. 2020: Vadon élő állatokat érintő mérgezéses esetek alakulása Magyarországon 2017 és 2019 között [Trends in wildlife poisoning cases in Hungary between 2017 and 2019]. *Helia.* 16, 60-69.
- Dhouib I., Jallouli M., Annabi A., Marzouki S., Gharbi N., Elfazaa S., & Lasram M. M. 2016: From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. *Environ. Sci. and Poll. Res.*, 23, 9448-9458.
- Dinsmore C. E. (Ed.). 2007: A history of regeneration research: milestones in the evolution of a science. Cambridge University Press.
- Domingues I., Oliveira R., Lourenço J., Grisolia C. K., Mendo S., Soares A.M.V.M. 2010: Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp. Biochem. and Phy. P. C: Tox. & Pharm.*, 152 (3): 338-345
- Donal P. F., Gree R. E., Heath M. F. 2001: Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proc. Biol. Sci.* 268(1462):25–29.
- Ducharme N. A., Reif D. M., Gustafsson J.-A., Bondesson M. 2015: Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. *Rep.Tox.*, 55: 3-10.
- Dutra Costa B. P., Aquino Moura L., Gomes Pinto S. A., Lima-Maximino M., & Maximino C. 2020: Zebrafish models in neural and behavioral toxicology across the life stages. *Fish.* 5(3), 23.
- Dutta S. P. S. 1993: Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting Gadigarh stream, Jammu. *J. Freshw. Biol.*,(5): 165–168.
- Ecobichon D.J. 2001: Carbamate insecticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology-Agents*, 2nd ed.; Krieger, R., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA; pp. 1087–1106
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. 1961: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 7, 88–95.
- El-Nahhal Y., & El-Nahhal I. 2021: Cardiotoxicity of some pesticides and their amelioration. *Environ. Sci. and Poll. Res.*, 28, 44726-44754.
- El-Saeid M. H., Al-Turki A. M., Al-Wable M. I., & Abdel-Nasser G. 2011: Evaluation of pesticide residues in Saudi Arabia ground water. *Res. Jou. of Environ. Sci.* 5(2), 171.

EMEA/CHMP (2006) Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc. ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00

Estela S. L. B., Carolina M. T., & Manue, M. A. 2023: The daily locomotor activity profile of Zebrafish *Danio rerio* is affected when exposed to polluted water from Lerma River (Guanajuato, Mexico). *Bio.Rhy. Res.*, 54(4), 385-398.

Faria M., Carrasco L., Diez S., Riva M. C. Bayona J. M. Barata C. 2009: Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Phys. C.* 149, 281–288.

Fassbender C. & Braunbeck T. 2013: Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. *Ecotox.*, 22(5): 825-837.

Ferrari A., Venturino A., & de D'Angelo A. M. P. 2007: Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pest. Biochem. and Phy.*, 88(2), 134-142.

Filho D. W. 1996: Fish antioxidant defenses--a comparative approach. *Bra. Jou. of Med. and Bio. Res.* 29(12), 1735-1742.

Fischer A., Wolman M., Granato M., Parsons M., McCallion A. S., Proescher J., & English E. 2015: Carbamate nerve agent prophylactics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. *Neurotox. and terat.*, 50, 1-10.

Fleming A. 2007: Zebrafish as an alternative model organism for disease modelling and drug discovery: implications for the 3Rs. *NC3Rs*, 10(1), 1-7.

Flesarova S., Lukac N., Danko J., & Massanyi P. 2007: Bendiocarbamate induced structural alterations in rabbit thymus after experimental peroral administration. *Jou. of Environ. Sci. and Hea., P. B*, 42(3), 329-334.

Foglia M. J., Poss K. D. 2016: Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Dev.* 143(5):729-40.

Freire C., Koifman R. J., Sarcinelli P. N., Rosa A. C. S., Clapauch R., & Koifman S. 2013: Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. *Environ. res.*, 127, 7-15.

Fukuto T. R. 1990: Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. hea. persp.*, 87, 245-254.

Gao H, Wang D, Zhang S, Xu M, Yang W, Yan P, Liu Y, Luo X, Wu H, Yao P, Yan H, Liu L 2015: Roles of ROS mediated oxidative stress and DNA damage in 3-methyl- 2-quinoxalin benzenevinylketo-1, 4- dioxide-induced immunotoxicity of Sprague Dawley rats. *Reg.Tox. and Pharm. Art. in press.*

Garcês A., Pires I., & Rodrigues P. 2020: Teratological effects of pesticides in vertebrates: A review. *Jou. of Environ. Sci and Hea, P. B*, 55(1), 75-89.

GARVOX 3 G talajfertőtlenítő szer engedélyének visszavonása, Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium Növény- És Talajvédelmi Főosztály, Szám: 15153/2003. (2003)

Geisler R., Borel N., Ferg M., Maier J. V., Strahle U. 2016: Maintenance of Zebrafish Lines at the European Zebrafish Resource Center. *Zebraf.*, 13 Suppl 1: S19-23.

Géraudie J., & Singer M. 1992: The fish fin regenerate. *Monog in dev. bio.*, 23, 62-72.

Gero J. 2007: 30 years of aerial mosquito control in Hungary. Budapest, 11-12th September, 2007. http://www.fvm.hu/doc/upload/200709/03_hu_mosquito_control_presentation_aerial_application.pdf

Gonzalez-Rey M., Tapie N., Le Menach K., Devier M. H., Budzinski H., & Bebianno M. J. 2015: Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Mar. Poll. Bull.*, 96(1-2), 384-400.

Guarda P. M., Pontes A. M., de S. Domiciano R., da S. Gualberto L., B. Mendes D., A. Guarda E., & da Silva J. E. 2020: Determination of carbamates and thiocarbamates in water, soil and sediment of the Formoso river, TO, Brazil. *Chem. & biodiv.*, 17(4), e1900717.

Guilhermino L., Lopes M.C., Carvalho A.P., Soares, A. M. V. M. 1996: Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chem.* 32, 727–738.

Guo S., Wu Y., Xiao P., & Li W. 2022: Benfuracarb inhibits body growth and causes oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Chem.*, 291, 132955.

Gupta R. C. 2009: Toxicology of the placenta. General, applied and systems toxicology, third ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 2003-2040.

Gupta R. C., Mukherjee I. R. M., Doss R. B., Malik J. K., & Milatovic D. 2017: Organophosphates and carbamates. In *Repro. and dev. tox.* (pp. 609-631). Academic Press.

Habib K., Manikar N., Ansari S., & Fatma T. 2013: Carbaryl stress induced cellular changes in *Calothrix brevisissima*. *Environ. Sci. and Poll. Res.*, 20, 862-871.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. 1974: Glutathione S-transferases—The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Jou. Bio. Chem.* 249, 7130–7139.

Hadzhiev Y., Lele Z., Schindler S., Wilson S.W., Ahlberg P., Strähle U., Müller F. 2007: Hedgehog signaling patterns the outgrowth of unpaired skeletal appendages in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* 2007, 27, 7–75.

Hardt J., Appl U., & Angerer J. 1999: Biological monitoring of exposure to pirimicarb: hydroxypyrimidines in human urine. *Tox. lett.*, 107(1-3), 89-93.

Hayes W.J.; Laws E.R. 1990: Classes of pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*; Academic Press: New York, NY, USA, Volume 3, p. 1576.

Hernández-Moreno D., Soler F., Míguez M. P., & Pérez-López M. 2010: Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Sci.of the Tot. Environ.*, 408(21), 4976-4983.

Hill A. J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. 2005: Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Tox. Sci*, 86(1): 6-19.

Holovska K., Almasiova V., & Cigankova V. 2014: Ultrastructural changes in the rabbit liver induced by carbamate insecticide bendiocarb. *Jou. of Environ. Sci. and Hea.*, P. B, 49(8), 616-623.

Howe K., Clark M. D., Torroja C. F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J. E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., McLaren S., Sealy I., Caccamo M., Churcher C., Scott C., Barrett J. C., Koch R, Rauch G. J., White S., Chow W., Kilian B., Quintais L. T., Guerra-Assuncao J. A., Zhou Y., Gu Y., Yen J., Vogel J. H., Eyre T., Redmond S., Banerjee R., Chi J., Fu B., Langley E., Maguire S. F., Laird G. K., Lloyd D., Kenyon E., Donaldson S., Sehra H., Almeida-King J., Loveland J., Trevanion S., Jones M., Quail M., Willey D., Hunt A., Burton J., Sims S., McLay K., Plumb B., Davis J., Clee C., Oliver K., Clark R., Riddle C., Elliott D., Threadgold G., Harden G., Ware D., Mortimer B., Kerry G., Heath P., Phillimore B., Tracey A., Corby N., Dunn M., Johnson C., Wood J., Clark S., Pelan S., Griffiths G., Smith M., Glithero R., Howden P., Barker N., Stevens C., Harley J., Holt K., Panagiotidis G., Lovell J., Beasley H., Henderson C., Gordon D., Auger K., Wright D., Collins J., Raisen C., Dyer L., Leung K., Robertson L., Ambridge K., Leongamornlert D., McGuire S., Gilderthorp R., Griffiths C., Manthavadi D., Nichol S., Barker G., Whitehead S., Kay M., Brown J., Murnane C., Gray E., Humphries M., Sycamore N., Barker D., Saunders D., Wallis J., Babbage A., Hammond S., Mashreghi-Mohammadi M., Barr L., Martin S., Wray P., Ellington A., Matthews N., Ellwood M., Woodmansey R., Clark G., Cooper J., Tromans A., Grafham D., Skuce C., Pandian R., Andrews R., Harrison E., Kimberley A., Garnett J., Fosker N., Hall R., Garner P., Kelly D., Bird C., Palmer S., Gehring I., Berger A., Dooley CM., Ersan-Urun Z., Eser C., Geiger H., Geisler M., Karotki L., Kirn A., Konantz J., Konantz M., Oberlander M., Rudolph-Geiger S., Teucke M., Osoegawa K., Zhu B., Rapp A., Widaa S., Langford C., Yang F., Carter NP., Harrow J., Ning Z., Herrero J., Searle SM., Enright A., Geisler R., Plasterk RH., Lee C., Westerfield M., de Jong PJ., Zon L I., Postlethwait J. H., Nusslein-Volhard C., Hubbard TJ., Roest Crollius H., Rogers J., Stemple DL. 2013: The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nat.* 496:498–503.

Hsieh D. J. Y., & Liao C. F. 2002: Zebrafish M2 muscarinic acetylcholine receptor: cloning, pharmacological characterization, expression patterns and roles in embryonic bradycardia. *Brit. jou. of pharm.*, 137(6), 782-792.

Ingebretson J. J., Masino M. A. 2013: Quantification of locomotor activity in larval zebrafish: considerations for the design of high-throughput behavioral studies. *Front. Neu. Circ.* 7:109

Iovine M. K., Johnson S. L. 2000: Genetic analysis of isometric growth control mechanisms in the zebrafish caudal Fin. *Gen.* 155:1321–1329.

Ismail B., Reuhs B.L., Nielsen S.S. 2010: Analysis of Food Contaminants, Residues, and Chemical Constituents of Concern. In: *Food Analysis*. Food Analysis. Springer, Boston, MA.

Jablonski C. A., Pereira T. C. B., Teodoro L. D. S., Altenhofen S., Rübensam G., Bonan C. D., & Bogo M. R. 2022: Acute toxicity of methomyl commercial formulation induces morphological and behavioral changes in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotox. and Tera.*, 89, 107058.

Jaiswal S. K., Sharma A., Gupta V. K., Singh R. K., & Sharma B. 2016: Curcumin mediated attenuation of carbofuran induced oxidative stress in rat brain. *Biochem. Res. Inter.*, 2016(1), 7637931.

- Jin S., Xu Z., Chen J., Liang X., Wu Y., & Qian X. 2004: Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe. *Anal. Chim. Act.*, 523(1), 117-123.
- Johnson S. L., Weston J. A. 1995: Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. *Gen.* 141:1583–1595.
- Karami-Mohajeri S., & Abdollahi M. 2011: Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum. & exp. tox.*, 30(9), 1119-1140.
- Kashiwada S., Tatsuta H., Kameshiro M., Sugaya Y., Sabo-Attwood T., Chandler G. T., Ferguson P. L., & Goka K. 2008: Stage-dependent differences in effects of carbaryl on population growth rate in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Tox. and Chemistry: An Inter. Jou.*, 27(11), 2397-2402.
- Kenyeres Z. & Tóth S. 2018: A csípőszúnyog-gyérítések hazai evolúciója. A petróleumtól a CRY4-toxinfehérjéig: *Él. és tud.* 73. évf. 11. sz. 336-339
- Kim S., Jung D., Kho Y., Choi K. 2014: Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)--a two generation exposure study. *Aquat Tox.*, 155: 244-252.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling TF. 1995: Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203(3):253-310.
- Klüver N., Yang L., Busch W., Scheffler K., Renner P., Strähle U., & Scholz S. 2011: Transcriptional response of zebrafish embryos exposed to neurotoxic compounds reveals a muscle activity dependent hspb11 expression. *Plo. o.*, 6(12), e29063.
- Köck-Schulmeyer M., Postigo C., Farré M., Barceló D., & de Alda M. L. 2019: Medium to highly polar pesticides in seawater: analysis and fate in coastal areas of Catalonia (NE Spain). *Chem.*, 215, 515-523.
- Kokel D., Bryan J., Laggner C., White R., Cheung C. Y., Mateus R., Healey D., Kim S., Werdich A. A., Haggarty S. J., MacRae C. A., Shoichet B., Peterson R. T. 2010: Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat. Chem. Bio.* 6:231–237.
- Könemann S., von Wyl M., & Vom Berg C. 2022: Zebrafish larvae rapidly recover from locomotor effects and neuromuscular alterations induced by cholinergic insecticides. *Environ. Sci. & Tech.*, 56(12), 8449-8462.
- Kopp R., Legler J., & Legradi J. 2018: Alterations in locomotor activity of feeding zebrafish larvae as a consequence of exposure to different environmental factors. *Environ. sci. and poll. res.*, 25(5), 4085-4093.
- Krockova J., Massányi P., Toman R., Danko J., & Roychoudhury S. 2012: In vivo and in vitro effect of bendiocarb on rabbit testicular structure and spermatozoa motility. *Jou. of Environ. Sci. and Hea.*, P. A, 47(9), 1301-1311.
- Kuhr R. J., & Dorough H. W. 1976: Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology. CRC Press, Inc.

- Küster E., & Altenburger R. 2007: Suborganismic and organismic effects of aldicarb and its metabolite aldicarb-sulfoxide to the zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Chem.*, 68(4), 751-760.
- Lahr J., Diallo A. O., Gadjji B., Diouf P. S., Bedaux J. J., Badji A., Ndour K.B., Andreasen J.E., & van Straalen N. M. 2000: Ecological effects of experimental insecticide applications on invertebrates in Sahelian temporary ponds. *Environ. Tox. and Chem.: An Inter. Jou.*, 19(5), 1278-1289.
- Lawrence C. 2007: The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aqua.*, 269(1-4): 1-20.
- Lawrence R. A.; Burk R. F. 1976: Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958.
- Lebedeva L., Zhumabayeva B., Gebauer T., Kisselev I., & Aitasheva Z. 2020: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for understanding the process of caudal fin regeneration. *Zebraf.*, 17(6), 359-372.
- Lee G. H., & Choi K. C. 2020: Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comp. Biochem. and Phy. P. C: Tox. & Pharm.*, 235, 108789.
- Legradi J., El Abdellaoui N., Van Pomeran M., & Legler J. 2015: Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ. Sci. and Poll. Res.*, 22(21), 16277-16289.
- Lehel J., Laczay P. 2011: *Toxikológia. Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő*, pp: 111-143
- Lele Z., Krone P. H. 1996: The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotech. Adv.* 14(1): 57-72.
- Leomanni A., Schettino T., Calisi A., Gorbi S., Mezzelani M., Regoli F., & Lionetto M. G. 2015: Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide Carbaryl. *Comp. Biochem. and Phy. P. C: Tox. & Pharm.*, 168, 20-27.
- Lepiller S., Laurens V., Bouchot A., Herbomel P., Solary E., & Chluba J. 2007: Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe. *Free Rad. Bio. and Med.*, 43(4), 619-627.
- Lettieri T. 2006: Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ. hea. perspec.*, 114(1), 4-9.
- Li H., Jiang H., Gao X., Wang X., Qu W., Lin R., & Chen J. 2008: Acute toxicity of the pesticide methomyl on the topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*): mortality and effects on four biomarkers. *Fish phy. and biochem.*, 34, 209-216.
- Lin C. C., Hui M. N., & Cheng S. H. 2007: Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Tox. and app. pharm.*, 222(2), 159-168
- Little E. E., & Brewer S. K. 2001: Neurobehavioral toxicity in fish. *Targ. org. tox. in mar. and freshw. teleo.*, 141-176.

- Little E. E., & Finger S. E. 1990: Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Tox. and Chem.: An Inter. Jou.*, 9(1), 13-19.
- Liu H. C., Chu T. Y., Chen L. L., Gui W. J., Zhu G. N. 2017: The cardiovascular toxicity of triadimefon in early life stage of zebrafish and potential implications to human health. *Environ. Poll.* 231(1):1093–1103
- Liu P., Wu C. H., Chang X. L., Qi X. J., Zheng M. L., & Zhou Z. J. 2014: Assessment of chlorpyrifos exposure and absorbed daily doses among infants living in an agricultural area of the Province of Jiangsu, China. *Int. arch. of occup. and environ- hea.*, 87, 753-762.
- Liu S., Yu M., Xie X., Ru Y., & Ru S. 2020: Carbofuran induces increased anxiety-like behaviors in female zebrafish (*Danio rerio*) through disturbing dopaminergic/norepinephrinergic system. *Chem.*, 253, 126635.
- Luca E. D., Zaccaria G. M., Hadhod M., Rizzo G., Ponzini R., Morbiducci U., Santoro M. M. 2014: Zebrateat: A flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. *Sci. Rep.* 4 4898
- Lunchick C., Driver J. H., & Ross J. C. 2007: Evaluation of potential carbaryl exposures associated with residential lawn and garden product use: results of a biological monitoring program.
- Luo D., Zhou T., Tao Y., Feng Y., Shen X., & Mei S. 2016: Exposure to organochlorine pesticides and non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Sci. repo.*6(1), 25768.
- Magni S., Parolini M., Della Torre C., de Oliveira, L. F., Catani M., Guzzinati R., Cavazzini A., & Binelli A. 2017: Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Sci. of the Tot. Environ.*, 578, 452-459.
- Maharaj R., Casimiro S., Mthembu S. D., & Sharp B. L. 2004: The residual life of bendiocarb: a field-based evaluation from Mozambique. *Jou. of med. entom.*, 41(1), 130-132.
- Marrazza G. 2014: Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. *Biosen.*, 4(3), 301-317.
- Mazur C. S., Marchitti S. A., & Zastre J. 2015: P-glycoprotein inhibition by the agricultural pesticide propiconazole and its hydroxylated metabolites: Implications for pesticide–drug interactions. *Tox. lett.*, 232(1), 37-45.
- Meeker J. D., Barr D. B., Ryan L., Herrick R. F., Bennett D. H., Bravo R., & Hauser R. 2005: Temporal variability of urinary levels of nonpersistent insecticides in adult men. *Jou. of Exp. Sci. & Environ. Epidem.*, 15(3), 271-281.
- Melo K. M., Oliveira R., Grisolia C. K., Domingues I., Pieczarka J. C., Filho J. D. S., Nagamachi C. Y. 2015: Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13926e13938
- Meng S. L., Chen J. Z., Hu G. D., Song C., Fan L. M., Qiu L. P., & Xu P. 2014a: Effects of chronic exposure of methomyl on the antioxidant system in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotox. and environ. safe.*, 101, 1-6.

- Meng S. L., Chen J. Z., Xu P., Qu J. H., Fan L. M., Song C., & Qiu L. P. 2014b: Hepatic antioxidant enzymes SOD and CAT of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to pesticide methomyl and recovery pattern. *Bull. of environ. cont. and tox.*, 92, 388-392.
- Mensah P. K., Okuthe G. H., & Onani M. 2012: Sublethal effects of carbaryl on embryonic and gonadal developments of zebrafish *Danio rerio*. *Afr. jou. of aquat. sci.*, 37(3), 271-275.
- Milan D. J., Giokas A. C., Serluca F. C., Peterson R. T., MacRae C. A. 2006: Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue. *Dev.* 133(6):1125-32.
- Milatovic D., Gupta R. C., & Aschner M. 2006: Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *The Sci. Wor. Jou.*, 6(1), 295-310.
- Müller F., Chang B., Albert S., Fischer N., Tora L., Strahle U. 1999: Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Dev.* 1999, 126, 2103–2116.
- Nagel R. 2002: DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19(Suppl 1):38–48.
- Nakamura A., Tamura I., Takanobu H., Yamamuro M., Iguchi T., Tatarazako N. 2015: Fish multigeneration test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Appl. Tox.*, 35(1): 11-13.
- National Research Council. 1993: Soil and water quality: An agenda for agriculture. National Academies Press.
- Newman M., Ebrahimie E., & Lardelli M. 2014: Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front. in gen.*, 5, 189.
- Ni Y., Liu G., & Kokot S. 2008: Fluorescence spectrometric study on the interactions of Isoprocarb and sodium 2-isopropylphenate with bovine serum albumin. *Talanta*, 76(3), 513-521.
- Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P. & Hens L. 2016: Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. in pub. hea.*, 4, 148.
- Nieder R., Benbi D. K., Reichl F. X., Nieder R., Benbi D. K., & Reichl F. X. 2018: Health risks associated with pesticides in soils. *Soil comp. and hum. hea.*, 503-573.
- Nishida Y. 2011: The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatsh. für Chem.-Chem. Month.*, 142(4), 375-384.
- North T. E., Goessling W., Walkley C. R., Lengerke C., Kopani K. R., Lord A. M., Weber G. J., Bowman T. V., Jang I., Grosser T., FitzGerald G. A., Daley G. Q., Orkin S. H., Zon L. I. 2007: Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nat.* 447: 1007–1011
- Oliveira R., McDonough S., Ladewig J. C., Soares A. M., Nogueira A. J., & Domingues I. 2013: Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. tox. and pharm.*, 36(3), 903-912.

- Otten C., van der Ven P. F., Lewrenz I., Paul S., Steinhagen A., Busch-Nentwich E., Eichhorst J., Wiesner B., Stemple D., Strähle U., Fürst D. O. & Abdelilah-Seyfried S. 2012: Xirp proteins mark injured skeletal muscle in zebrafish. *Plo. o.*, 7(2), e31041.
- Ou H. C., Santos F., Raible D. W., Simon J. A., Rubel E. W. 2010: Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Disc. Tod.* 15(7-8):265–271
- Paglia D. E., & Valentine W. N. 1967: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Jou. of lab. and clin. med.*, 70(1), 158-169.
- Peng Y., Fang W., Krauss M., Brack W., Wang Z., Li F., Zhang X., 2018: Screen-ing hundreds of emerging organic pollutants (EOPs) in surface water from the Yangtze River Delta (YRD): occurrence, distribution, ecological risk. *Environ.Poll.* 241, 484–493.
- Perera F. P., Illman S. M., Kinney P. L., Whyatt R. M., Kelvin E. A., Shepard P., Evans D., Fullilove M., Ford J., Miller R. L., Meyer I. H. & Rauh, V. A. 2002: The challenge of preventing environmentally related disease in young children: community-based research in New York City. *Environ. hea. persp.*, 110(2), 197-204.
- Pessoa P. C., Luchmann K. H., Ribeiro A. B., Veras M. M., Correa J. R. M. B., Nogueira, A. J., Bairy A. C. D., & Carvalho, P. S. M. 2011: Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat Tox.* 105(3-4), 312-320.
- Petrovova E., Luptakova L., Mazensky D., Danko J., & Sedmera D. 2011: Morphogenetic activities of bendiocarb as cholinesterase inhibitor on development of the chick embryo. *Pesticides in the Modern World; Stoytcheva, M., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia*, 469-494.
- Petrovova E., Sedmera D., Misek I., Lesnik F. & Luptáková L. 2009: Bendiocarbamate toxicity in the chick embryo. *Fol. bio.*, 55(2), 61.
- Phillips J. B., & Westerfield M. 2020: Zebrafish as a model to understand human genetic diseases. In *The Zebraf. in Biomed. Res.* (pp. 619-626). Aca. Press.
- Piel C., Pouchieu C., Migault L., Béziat B., Boulanger M., Bureau M., Carles C., Grüber A., Lecluse Y., Rondeau V., Schwall X., Tual S., Lebailly P. & Baldi, I. 2019: Increased risk of central nervous system tumours with carbamate insecticide use in the prospective cohort AGRICAN. *Inter. jou. of epidem.*, 48(2), 512-526.
- Piğłowski M. 2022: Notifications on pesticide residues in the rapid alert system for food and feed (RASFF). *Int. Jou. of Environ. Res. and Pub. Hea.*, 19(14), 8525.
- Pirsaheb, M, Moradi N. 2020: Sonochemical degradation of pesticides in aqueous solution: investigation on the influence of operating parameters and degradation pathway – a systematic review. *RSC Advances.* 10. 7396-7423
- Polláková J., Kovalkovičová N., Csank T., Pistl J., Kočíšová A., & Legáth J. 2012: Evaluation of bendiocarb cytotoxicity in mammalian and insect cell cultures. *Jou. of Environ. Sci. and Hea., P. B* 47(6), 538-543.
- Poss K. D., Keating M. T. & Nechiporuk A. 2003: Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. dyn.: an of. pub. of the Am. Ass. of Anat.*, 226(2), 202-210.

- Prahl M., Odorizzi P., Gingrich D., Muhindo M., McIntyre T., Budker R., Jagannathan P., Farrington L., Nalubega M., Nankya F., Sikyomu E., Musinguzi K., Naluwu K., Auma A., Kakuru A., Kanya M. R., Dorsey G., Aweeka K., & Feeney, M. E. 2021: Exposure to pesticides in utero impacts the fetal immune system and response to vaccination in infancy. *Nat.comm.*, 12(1), 132.
- Pritchard V. L., Lawrence J., Butlin R.K., Krause J. 2001: Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Ani. Behav.* 62, 1085– 1088.
- Putnam R. A., Doherty J. J., & Clark J. M. 2008: Golfer exposure to chlorpyrifos and carbaryl following application to turfgrass. *Jou. of agr. and foo. chem.*, 56(15), 6616-6622.
- Qian L., Qi S., Cao F., Zhang J., Li C., Song M. & Wang C. 2019: Effects of penthiopyrad on the development and behaviour of zebrafish in early-life stages. *Chem.*, 214, 184-194.
- Rai D. K., & Sharma B. 2007: Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain. *Mol. Biotech.*, 37, 66-71.
- Rani L., Thapa K., Kanojia N., Sharma N., Singh S., Grewal AS., Srivastav AL., Kaushal J. 2021: An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Jou. of clea. prod.*, 283, 124657.
- Rasband W.S.; ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997–2018. Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/> (accessed on 30 December 2020)
- Rendón-von Osten J., Ortiz-Arana A., Guilhermino L., & Soares A. M. V. M. 2005: In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chem.*, 58(5), 627-636.
- Renshaw S. A., Loynes C. A., Trushell D. M., Elworthy S., Ingham P. W., & Whyte M. K. 2006: A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 108(13), 3976-3978.
- Roberts J. R., Karr C. J., Council on Environmental Health, Paulson, J. A., Brock-Utne, A. C., Brumberg, H. L., Campbell C. C., Lenphear B. P., Osterhoudt K. C., Sandel M. T., Trasande L. & Wright R. O. 2012: Pesticide exposure in children. *Pediat.*, 130(6), e1765-e1788.
- Rubinstein A. L. 2003: Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Cur. opi. in dru. disc. & dev.*, 6(2), 218-223.
- Russell W. M. S., Burch R.L. 1959: *The principles of humane experimental technique*, Methuen, London.
- Sadasivaiah S., Tozan Y., & Breman J. G. 2007: Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for indoor residual spraying in Africa: how can it be used for malaria control?. *Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives: Supplement to Volume 77 (6) of Am. Jou. of Trop. Med. and Hyg.*
- Schebesta M., Lien C. L., Engel F. B. & Keating M. T. 2006: Transcriptional profiling of caudal fin regeneration in zebrafish. *The sci. w. jou.*, 6, 38-54.
- 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. Poll. Res. Int.* 15(5):394-404.

Schulz R. 2004: Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A review. *Jou. of environ. qual.*, 33(2), 419-448.

Sedmera D., Reckova M., deAlmeida A., Sedmerova M., Biermann M., Volejnik J., Sarre A., Raddatz E., McCarthy R. A., Gourdie R. G., Thompson R. P. 2003: Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am. Jou. Phy. Hea. Circ. Phy.* 284(4):H1152-60.

Shahid M., Takamiya M., Stegmaier J., Middel V., Gradl M., Klüver N., Mikut R., Dickmeis T., Scholz S., Rastegar S., Yang L. & Strähle, U. 2016: Zebrafish biosensor for toxicant induced muscle hyperactivity. *Sci. Rep.*, 6(1), 23768.

Sharma A, Kumar V, Bhardwaj R, Thukral A. K. 2017: Seed presoaking with 24-epibrassinolide reduces the imidacloprid pesticide residues in green pods of *Brassica juncea* L. *Tox. Environ. Chem.* 99(1):95–103

Sharma A., Kumar V., Shahzad B 2019: Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1, 1446

Shen C., Zuo Z.. 2020: Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 27(35):43599-43614.

Shen R., Yu Y. C., Lan R., Yu R., Yuan Z., Xia Z. N. 2019: The cardiovascular toxicity induced by high doses of gatifloxacin and ciprofloxacin in zebrafish. *Environ. Poll.* 254:112861

Shi M. A., Yuan J. Z., Wu J., Zhuang P. J., Wu X. F., & Tang Z. H. 2002: Kinetic analysis of acetylcholinesterase in a propoxur-resistant strain of housefly (*Musca domestica*) from Shanghai, China. *Pest. Biochem. and Phy.*, 72(2), 72-82.

Shkumatava A., Fischer S., Muller F., Straehle U., Neumann C. J. 2004: Sonic Hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Dev.* 2004, 131, 3849–3858.

Sipes NS., Padilla S., Knudsen TB. 2011: Zebrafish as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Bir. Def. Res. C Emb.To.* 93:256–267.

Slotkin, T. A. 1999: Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Hea. Persp.*, 107(suppl 1), 71-80.

Smulders C. J., Bueters T. J., Van Kleef R. G., & Vijverberg H. P. 2003: Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. *Tox. and app. pharm.*, 193(2), 139-146.

Sobeková A., Holovská K., Lenártová V., Flešárová S., & Javorský P. 2009: The another toxic effect if carbamate insecticides. *Ac. Biol. Hung.*, 60(1), 45-54.

Sousa B., & Nunes B. 2020: Reliability of behavioral test with fish: How neurotransmitters may exert neuromodulatory effects and alter the biological responses to neuroactive agents. *Science of the Total Environment*, 734, 139372.

Sowers A.D., Gaworecki K. M., Mills M. A., Roberts A. P., Klaine S. J. 2009: Developmental effects of a municipal wastewater effluent on two generations of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquat Tox.*, 95(3): 173-181.

Stainier D. Y. 2001: Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat. Rev. Genet.* 2001, 2, 39-48

Staudt D., & Stainier D. 2012. Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish. *Ann. rev. of gen.*, 46, 397.

Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A., Selderslaghs I., Weiss C., Witters H., Braunbeck T. 2012: Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Rep. Tox.*, 33(2): 128-132.

Struger J., Grabuski J., Cagampan S., Sverko E., & Marvin C. 2016: Occurrence and distribution of carbamate pesticides and metalaxyl in southern Ontario surface waters 2007–2010. *Bull. of environ. cont. and tox.*, 96, 423-431.

Sumon K. A., Rashid H., Peeters E. T., Bosma R. H., & Van den Brink P. J. 2018: Environmental monitoring and risk assessment of organophosphate pesticides in aquatic ecosystems of north-west Bangladesh. *Chem.*, 206, 92-100.

Syafrudin M., Kristanti, R. A., Yuniarto A., Hadibarata T., Rhee J., Al-Onazi W. A., Algarni T. S., Almarri A. H. & Al-Mohaimed A. M. 2021: Pesticides in drinking water—a review. *Int. Jou. of Environ. Res. and Pub. Hea.*, 18(2), 468.

Tagne-Fotso R., Zeghnoun A., Saoudi A., Balestier A., Pecheux M., Chaperon L., Oleko O., Marchand P., Le Bizec B., Vattier L., Bouchart V., Limon G., Le Gléau F., Denys S. & Fillol C. 2023: Exposure of the general French population to herbicides, pyrethroids, organophosphates, organochlorines, and carbamate pesticides in 2014–2016: Results from the Esteban study. *Inter. Jou. of Hyg. and Environ. Hea.*, 254, 114265.

Tatarazako N., & Iguchi T. 2012: Evaluation of toxicities of herbicides using short-term chronic tests of alga, daphnid and fish. *Herbicides-Environmental Impact Studies and Management Approaches*. Alvarez-Fernandez R.(Ed.), In Tech, Shanghai, China, 1-18.

Taylor M. D., Klaine S. J., Carvalho F. P., Barcelo D. 2002: Pesticide residues in coastal tropical ecosystems: distribution, fate and effects. CRC Press, Boca Raton

Teixidó E, Barenys M, Piqué E, Llocbet J. M, Gómez-Catalán J. 2019: Cardiovascular effects of PCB 126 (3,3', 4,4', 5 -pentachlorobiphenyl) in zebrafish embryos and impact of coexposure to redox modulating chemicals. *Int. Jou. Mol. Sci.* 20(5):1065

Ton C., Lin Y., Willett C. 2006: Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Def. Res. A Clin. Mol. Teratol.* 76:553–567

Vaknine S., & Soreq H. 2020: Central and peripheral anti-inflammatory effects of acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharm.*, 168, 108020.

Vale A., & Lotti M. 2015: Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. *Handbook of clinical neurology*, 131, 149-168.

Van den Beukel I., van Kleef R. G., & Oortgiesen M. 1998: Differential effects of physostigmine and organophosphates on nicotinic receptors in neuronal cells of different species. *Neurotox.*,19(6), 777-787.

VICH (2004) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: environmental impact assessment for veterinary medicinal products. Phase II guidance. VICH Topic GL 38 (Ecotoxicity Phase II) Step 7 (CVMP/VICH/790/03-Final)

Vichapong J., Burakham R., Srijaranai S., & Grudpan K. 2011: Sequential injection-bead injection-lab-on-valve coupled to high-performance liquid chromatography for online renewable micro-solid-phase extraction of carbamate residues in food and environmental samples. *Jou. of sep. sci.*, 34(13), 1574-1581.

Vichapong J., Burakham R., Srijaranai S., & Grudpan K. 2011: Sequential injection-bead injection-lab-on-valve coupled to high-performance liquid chromatography for online renewable micro-solid-phase extraction of carbamate residues in food and environmental samples. *Jou. of sep. sci.*, 34(13), 1574-1581.

Villeneuve D., Volz D.C., Embry M. R., Ankley G. T., Belanger S. E., Léonard M., Schirmer K., Tanguay R., Truong L., Wehmas L. 2014: Investigating alternatives to the fish early-life stage test: A strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development. *Environ. Tox. Chem.*, 33(1): 158-169.

Vinodhini R., & Narayanan M. 2009: Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure. *Turk. Jou. of Vet. & Ani. Sci.*, 33(4), 273-278.

Visser J. T., Linders J. 1999: Bendiocarb. Milieu-Fiche; Advisory Report 90/670101/007; College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen: Wageningen, The Netherlands

von Wyl M., Könemann S., & Vom Berg C. 2023: Different developmental insecticide exposure windows trigger distinct locomotor phenotypes in the early life stages of zebrafish. *Chem.*, 137874.

Waite D. T., Bailey P., Sproull J. F., Quiring D. V., Chau D. F., Bailey J., Cessna A. J. 2005: Atmospheric concentrations and dry and wet deposits of some herbicides currently used on the Canadian Prairies. *Chem.* 58(6):693–703

Wang A., Cockburn M., Ly T. T., Bronstein J. M., & Ritz B. 2014: The association between ambient exposure to organophosphates and Parkinson's disease risk. *Occup. and environ. med.*, 71(4), 275-281.

Wang H. L., Zhou L, Q., Meng Z., Su M. L., Zhang S. H., Huang P. Z., Jiang F., Liao X. J., Cao Z. G., Lu H. Q. 2019: Clethodim exposure induced development toxicity and behaviour alteration in early stages of zebrafish life. *Environ. Poll.* 255(1):113218

Wang S., Han X., Yu T., Liu Y., Zhang H., Mao H., Hu C. & Xu X. 2022: Isoprocab causes neurotoxicity of zebrafish embryos through oxidative stress-induced apoptosis. *Ecotox. and Environ.Safe.* 242, 113870.

Watson F. L., Schmidt H., Turman, Z. K., Hole, N., Garcia, H., Gregg, J., Tilghman J., & Fradinger, E. A. 2014: Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and

decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ. tox. and chem.*, 33(6), 1337-1345.

Wedekind C., von Siebenthal B., Gingold R. 2007: The weaker points of fish acute toxicity tests and how tests on embryos can solve some issues. *Environ. Poll.*, 148(2): 385-389.

Whyatt R. M., Barr D. B., Camann D. E., Kinney P. L., Barr J. R., Andrews H. F., Hoepner L. A., Garfinkel R., Hazi Y., Reyes A., Ramirez J., Cosme Y., & Perera F. P. 2003: Contemporary-use pesticides in personal air samples during pregnancy and blood samples at delivery among urban minority mothers and newborns. *Environ. hea. persp.*, 111(5), 749-756.

Whyatt R. M., Garfinkel R., Hoepner L. A., Holmes D., Borjas M., Williams M. K., Reyes A., Rauh V., Perera F. P., & Camann D. E. (2007). Within-and between-home variability in indoor-air insecticide levels during pregnancy among an inner-city cohort from New York City. *Environ. hea. persp.*, 115(3), 383-389.

Wiklund K., Dich J., & Holm L. E. 1987: Risk of malignant lymphoma in Swedish pesticide applicators. *Brit. Jou. of Canc.*, 56(4), 505-508.

Wills E. D. 1987a: Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In *Biochem. Tox.: A Practical Approach*; Snell, K., Mullock, B., Eds.; IRL Press: Washington, DC, USA, pp. 127–152.

Wills E. D. 1987b: Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*; Snell, K., Mullock, B., Eds.; IRL Press: Washington, DC, USA, pp. 127–152.

Winn R. N. 2001: Transgenic fish as models in environmental toxicology. *Har j*, 42(4): 322-329.
Wolfram J., Stehle S., Bub S., Petschick L. L. & Schulz R. 2018: Meta-analysis of insecticides in United States surface waters: status and future implications. *Environ. sci. & tech.*, 52(24), 14452-14460.

Woods I. G., Schoppik D., Shi V. J., Zimmerman S., Coleman H. A., Greenwood J., Soucy E. R., Schier A. F. 2014: Neuropeptidergic signaling partitions arousal behaviors in zebrafish. *Jou. Neu.* 34:3142–3160

Xu L., Granger C., Dong H., Mao Y., Duan S., Li J., & Qiang Z. 2020: Occurrences of 29 pesticides in the Huangpu River, China: Highest ecological risk identified in Shanghai metropolitan area. *Chem.*, 251, 126411.

Yadav I. C., & Devi N. L. 2017: Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environ. Sci.0 Eng.*, 6, 140-158.

Yang L., Ho N. Y., Alshut R., Legradi J., Weiss C., Reischl M., Mikut R., Liebel U., Müller F., Strähle U. 2009: Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Repr. Tox.* 28(2):245-53.

Yi M. Q., Liu H. X., Shi X. Y., Liang P., & Gao X. W. 2006: Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. *Comp. Biochem. and Phy. P. C: Tox. & Pharm.*, 143(1), 113-116.

Zakaria Z. Z., Benslimane F. M., Nasrallah G. K., Shurbaji S., Younes N. N., Mraiche F., Da'as S. I., Yalcin H. C. 2018: Using zebrafish for investigating the molecular mechanisms of drug-induced cardiotoxicity. *BioMed. Res Int*:1642684

Zhang W. 2018: Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. *Proceed of the Int Acad of Ecol and Environ Scie*, 8(1), 1.

Zhang X., Starner K., Goh K. S., & Gill S. 2012: Analysis of diazinon agricultural use in regions of frequent surface water detections in California, USA. *Bull. of environ. cont. and tox.*, 88, 333-337.

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik közvetve, vagy közvetlenül hozzájárultak doktori munkámhoz, és akik nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak, aki végig támogatott a munkám során.

Szeretném megköszönni Dr. Czimmerer Zsoltnak, Dr. Kovács Róbertnek, a rengeteg tanítást, a feltétlen támogatást, hogy tanácsaikkal, szakmai tapasztalatukkal folyamatosan segítették munkámat, és kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Hálával tartozom Prof. Dr. Müller Tamásnak, Dr. Ács Andrásnak, Dr. Baska Ferencnek, Prof. Dr. Bakonyi Gábornak a tanulmányaim és a doktori munkám során kapott számos szakmai tanácsért, segítségnyújtásért.

Köszönet illeti az egykori Szent István Egyetem, MKK-KTI, Halgazdálkodási Tanszék, napjainkban Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársát, kiemelt mértékben: Prof. Dr. Urbányi Bélának, Dr. Horváth Ákosnak, Dr. Ferincz Árpádnak, Dr. Ivánovics Bencének, Dr. Kollár Tímeának, Dr. Szepesi-Bencsik Dórának, Dr. Staszny Ádámnak, Kövesi Juditnak, Csepeli Andreának, Berta Roberta Izabellának, Reining Mártának, Vásárhelyi Ernának, Makádiné Farkas Anasztáziának.

Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem alábbi munkatársainak, hogy nagymértékben hozzájárultak a doktori munkám létrejöttéhez: Dr. Póliska Szilárdnak, Dr. Tóth Mártának, Prof. Dr. Bácsi Attilának, Domokos Apolkának.

Köszönettel tartozom a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont alábbi munkatársainak, hogy munkájukkal támogatták a doktori munkám létrejöttét: Dr. Varga Zsófia, Váradi Eszter Anna

Végezetül szeretném megköszönni Családomnak, Barátaimnak és Kollegáimnak azt a rengeteg támogatást és áldozatot, amit értem hoztak. Köszönöm nagyszüleimnek, különösen Kiss Istvánné, Lestyán Zsuzsannának a hitet, a sok biztatást, bátorítást. Köszönöm szüleimnek és a húgomnak végtelen türelmüket és támogatásukat. Köszönöm Bartos Viktor Pálnak és Bajnógel Jánosnak, hogy kivétel nélkül mindig támaszkodhattam rájuk és nap mint nap segítették a napi teendőik mellett a doktori munkám elkészültét.