

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

JÁRVÁNYTANI ÉS MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK



A cink-oxid által indukált immunológiai reakciók kiváltása egér állatmodellen

Induction of immunological reactions by zinc-oxide in mouse model

Készítette:

Tóth Fruzsina

Témavezetők:

Dr. Szűcs-Somlyó Éva

Járványtani és Mikrobiológia Tanszék

Dr. Kővágó Csaba

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

2022

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1 JELENTŐSÉG ÉS ELŐFORDULÁS	4
2.2 KÓRFEJLŐDÉS.....	5
2.2.1. <i>Allergiás háttér</i>	5
2.2.2. <i>Reaktív oxigén gyökök által okozott oxidatív stressz háttér</i>	7
2.3 TŰNETEK	8
2.4 TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK	9
3. CÉLKITŰZÉS	10
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	11
4.1 ÁLLATMODELL	11
4.2 ZNO FŰST ELŐÁLLÍTÁSA ÉS KEZELÉS.....	11
<i>Füstkoncentráció meghatározása</i>	12
4.3 LÁZAS ÁLLAPOT DETEKTÁLÁSA HŐKAMERÁS MOZGÁSAKTIVITÁS MÉRÉssel	12
4.4 VALIDÁLÓ KÍSÉRLET	13
4.5 KEZELÉS	13
4.6 BIOLÓGIAI MINTÁK GYŰJTÉSE	14
4.7 SZÉRUM AMILOID A ₃ (SAA) PCR	14
4.8 INFLAMMATORIKUS GÉNEK EXPRESSZIÓJA	15
<i>RNS kivonás</i>	15
<i>Komplementer DNS átírás</i>	15
<i>Kvantitatív polimeráz láncreakció</i>	15
<i>Adatelemzés</i>	16
5. EREDMÉNYEK	18
5.1 HEGESZTÉS ÉS FŰSTKONCENTRÁCIÓ.....	18
5.2 MOZGÁSMEGFIGYELÉS	18
5.3 KEZELÉS ÉS SAA PCR	19
5.4 KVANTITATÍV POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ ÉS ADATELEMZÉSE	20
6. MEGBESZÉLÉS	24
7. ÖSSZEFOGLALÁS	27
8. SUMMARY	28
9. IRODALOMJEGYZÉK	30

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CAT	kataláz (Catalase)
Ccl	Chemokine (C-C motif) ligand
Ccr	Chemokine (C-C motif) receptor
CRP	C-reaktív fehérje (C Reactive Protein)
Ct	ciklus küszöb (Cycle threshold)
Cxcl	Chemokine (C-X-C motif) ligand
Cxcr	Chemokine (C-X-C motif) receptor
Csf3	kolónia stimuláló faktor (Colony stimulating factor 3)
Fasl	Fas-ligand
GSH	glutation
GSSH	oxidált glutation
IFNγ	interferon-gamma
IgE	immunglobulin E
IL	interleukin
LETH	lizoszóma-erősített trójai faló (Lysosome Enhanced Trojan Horse)
Lta	Lymphotoxin A
MAPK	mitogén-aktivált proteinkináz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MDA	malondialdehid (Malondialdehyde)
MMP	mátrix metalloproteináz (Matrix Metalloproteinase)
MT	metallothionein
MPO	mieloperoxidáz (Myeloperoxidase)
NF-κB	nukleáris-faktor kappa-B (Nuclear Factor κ B)
NOEL	elváltozást nem okozó szint (No Observed Effect Level)
Osm	onkosztatin M (Oncostatin M)
PCR	polimeráz lánreakció (Polymerase Chain Reaction)
ROS	reaktív oxigén gyökök (Reactive Oxygen Species)
RT-PCR	kvantitatív polimeráz lánreakció (Real Time Polymerase Chain Reaction)
SAA	szérum amiloid A (Serum Amyloid A)
SOD	szuperoxid-dizmutáz (Superoxid Dismutase)
TIG	Tungsten Inert Gas
Tnfsf	tumor nekrosis faktor család (Tumor necrosis factor superfamily member)
TNFα	tumor nekrosis faktor-alfa
ZnO-NP	cink-oxid nanorészecske

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Jelentőség és előfordulás

Az öntőláz, hétfő reggeli láz vagy angol nevén Metal Fume Fever (fém-füst láz) egy olyan hirtelen fellépő, akut betegség, amely különböző fémek, olvadáspontjuknál magasabb hőfokra való hevítésekor keletkező fém/fém-oxid részecskéket tartalmazó füst belélegzésekor alakul ki. Első leírása az 1800-as években történt, azonban ez a kórkép már a fémmegmunkálás kezdete óta jelen lehet [1]. A fémek és különböző fémötvözetek olvasztásával és hevítésével járó megmunkálása során kisméretű fém-oxid részecskék keletkeznek, melyek a levegőbe jutva könnyen belélegezhetőek. Sokféle fém (például króm, vas, ólom, kadmium, szilícium, mangán), ötvözet, illetve galvanizált fém megmunkálása során kialakulhat ez a tünetegyüttes, de jellemzően cink- és réztartalmú fémekkel való munka után fordul elő. Cinket használnak különböző összetételű ötvözetek, például bronz előállítására, illetve használják többek közt acél bevonására, ezzel a korróziótól, meggyengüléstől való védelem kialakítására [1–7].

Több kutatás is foglalkozott azzal, hogy megállapítsák ez elváltozást nem okozó füstkoncentráció szintet ennél a kórképnél (NOEL – No Observed Effect Level). A kapott eredmény azt mutatta, hogy bizonyos szintig tüneti változás nem volt tapasztalható (0,5 mg/m³ füstkoncentráció), viszont 1-1,5 mg/m³ koncentrációnál már egyes önkéntesekben lázas állapot is kialakult, 2,5 mg/m³ és ennél magasabb füstkoncentrációnál pedig a kísérletben résztvevők közel 40 %-ában jelentkeztek az öntőláz tünetei [8–10]. Azonban a munkaegészségügyi biztonsági előírások több országban is 5 mg/m³ maximális füstkoncentrációt határoznak meg biztonságosnak [5, 6, 11].

Az öntőláz kialakulásában fontos szerepet játszik a keletkező cink-oxid részecskék mérete is. A hegesztési módszerek során a frissen keletkezett cink-oxid részecskék mérete általában 200 nm alatti, hegesztési módszertől függően. Azonban van olyan módszer (TIG – Tungsten Inert Gas), mely során a keletkező részecskék mérete nem haladja meg az 50 nm-t [8]. A 1-100 nm méretű részecskéknek nanorészecskéknek nevezzük. A nanorészecskék magasabb felület-tömeg aránnyal rendelkeznek, mint a nagyobb részecskék, emiatt a reaktivitásuk és a sejtekre gyakorolt toxikus hatásuk is nagyobb [12, 13]. Azok a részecskék, melyek mérete nem éri el az 1000 nm-t, könnyebben maradnak a levegőben, illetve a

légutakba jutva elérnek a egészen az alveolusokig, ahonnan könnyebben ki tudják fejteni hatásukat [14].

1.2 Kórfejlődés

Az öntőláz kórkép pontos kórfejlődése a mai napig nem tisztázott teljes mértékben. A betegség kialakulásának háttérében lévő folyamatokat elsőként 1910-ben Lehnmann írta le. Azt a hipotézist fogalmazta meg, miszerint a cink a légutak szöveteibe jutva sejtkárosodást és pusztulást eredményez, valamint a sejtekből kiszabaduló egyes fehérjék a szervezetbe jutott cinkkel komplexeket képeznek, melyeknek pirogén hatást feltételezett. A tünetek minősége szerint egy bakteriális fertőzéshez hasonlította a folyamatot, azonban pontosan nem tudta megmagyarázni a kórfejlődést. [15] Az első esetleírások az 1950-es évekből származnak, melyekben leírták, hogy a betegség egy személyben több alkalommal is visszatérhet. [16].

A tünetek és emelkedett markerek alapján a betegség kialakulása egyértelműen gyulladásos folyamat alapján zajlik. Több kutatás is beszámolt gyulladásos mediátorok mennyiségének a növekedéséről a cink-oxid füstnek kitett állatokban, illetve embereken. A kezelt egyedekben az IL-1, IL-5, IL-6, IL8, IL-13-nak, a TNF α -nak, IFN γ -nak, és akut fázis fehérjéknek, mint a C-reaktív protein (CRP) és szérum amiloid A (SAA) mennyisége növekedett. Ezen kívül emelkedést mértek a mátrix metalloproteináz (MMP), mieloperoxidáz (MPO), kataláz (CAT), szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek, a malondialdehid (MDA), valamint a neutrofil és eosinophil granulociták mennyiségében, az IgE ellenanyag szintje mellett [13, 17–23]. A TNF α , IL-1 és IL-6, mint endogén pirogénnek egyértelműen a láz háttérében állhatnak, valamint egymás termelődésére is jelentős pozitív hatással vannak [24].

A kórfolyamat további vizsgálata és a folyamatosan gyűjtött adatok elemzésével kialakult néhány elmélet a kórfejlődés magyarázatára. Az alábbiakban a szakirodalom által leginkább elfogadott hipotéziseket ismertetjük:

- **Allergiás háttér**

A feltevés szerint az öntőláz tünetegyüttese egy hiperimmun reakció tüneteit jelenti, melynek kialakításáért a belélegzett fémrészecskék gyulladáskeltő hatása felelős. A betegség klinikai lefolyása során két szakaszt különítenek el általában, a korai és a késői fázist. A korai fázist hirtelen kialakuló, a betegségre jellemző tünetek kísérik. A késői fázisban pedig

jellemzően allergiához hasonlító tünetek alakulnak ki, melyek súlyosabbak is lehetnek [17]. A jelenleg létező hipotézis szerint a cink-oxid hapténként viselkedik a szervezetbe jutva [25], mely a szervezet saját fehérjéivel kapcsolódva képes antigénként, és így allergénként funkcionálni. Ez a képződött cink-fehérje pedig antigénként képes immunválaszt indukálni, elindítva a rá specifikus ellenanyag termelését. Az ellenanyag, kapcsolódva a cink-fehérje antigénnel immunkomplexet képez, ez pedig alanya lehet a késői fázis reakciónak [5]. A képződő immunkomplex és keletkezésének folyamata pedig megfelel a IV. típusú túlérzékenységi reakciónak [17]. Az allergiás eredetű patogenezist az is valószínűsíti, hogy a cink-oxid részecskék inhalálása után megemelkedik a vérben az IgE típusú ellenanyagok mennyisége, mely az I. típusú túlérzékenységi reakcióra utalhat [17].

Az egyik legkorábbi leírást az öntőláz kórkép immunallergológiai eredetéről 1960-ban publikálták, melyben a korai szakasza a tünetegyüttesnek, mint „hisztamin sokk” került megnevezésre. A feltevés szerint a szervezetbe került cink-oxid, hisztamin és hisztamin-szerű anyagok felszabadulását eredményezi, ezzel váltja ki a korai fázis tüneteit. A légutak nyálkahártyájának gyulladása során a cink-oxid különböző fehérjékkel kapcsolódik, emiatt antigénként fog viselkedni, mely immunválaszt indukál. További cink-oxid füstnek való kitettség esetén az ellenanyagok mennyisége nő és immunkomplexek alakulnak ki, azonban ez az antigén-ellenanyag komplex szintén rendelkezik antigenitással. Az elsődleges immunkomplexre specifikus másodlagos ellenanyagot, úgynevezett anti-ellenanyagot termel a szervezet, ami egy másodlagos immunkomplexet képez az elsődleges immunkomplexhez kapcsolódva [7].

A betegség kórlefolyása során meghatározó tényező az elsődleges és másodlagos ellenanyagok mennyisége a szervezetben. Folyamatos cink-oxid füst inhaláció során a szervezetben a másodlagos ellenanyagok dominálnak, tehát az elsődleges immunkomplexek nem tudják kifejteni káros hatásukat, ezáltal egy tolerancia alakul ki, nem alakulnak ki túlérzékenységi reakciók. Azonban alkalmi kitettség, vagy a folyamatos expozíció megszakadása utáni, újbóli kitettség esetén az elsődleges immunkomplex van nagyobb mennyiségben a szervezetben, ki tud alakulni az allergiás reakció. Ugyanez a jelenség fordul elő akkor is, ha a folyamatos, azonos dózisu kitettség mellett hirtelen egy nagyobb mennyiségű cink-oxid részecske kerül a szervezetbe. Mivel a védekező mechanizmus túlterhelt, ezért ebben az esetben is jelentkezhetnek a tünetek. [7, 26] Ezt a jelenséget már 1927-ben felfedezték, mikor az első öntőlázzal kapcsolatos önkéntes kísérletek folytak. Észrevették, hogy a cink-oxid füsttel kezelt emberek a kezelés napján tüneteket mutattak,

azonban ha másnap újramezelték őket, a láz hirtelen alábbhagyott, egyfajta tolerancia alakul ki [27].

- **Reaktív oxigén gyökök által okozott oxidatív stressz háttér**

Először ezt a folyamatot az 1990-es években kezdték el részletesebben kutatni, mikor a ROS mennyiségének emelkedését cink-oxid inhalációt követően először alveoláris makrofágokból, majd neutrofil granulocitákból mutatták ki [28–30]. A cink mellett számos más fémnél is kimutattak hasonló elváltozást, az inhalációjuk után, többek közt vas, réz, szilícium vagy acél esetében [31, 32]. Azonban a fémek mellett a hevítés, égetés során keletkező korom, szulfátok, szén-hidrogének és akár azbeszt részecskék inhalálása esetén is kialakulhat ROS a szervezetben. A frissen keletkezett részecskék mérete 100 nm alatti, tehát nanorészecskék alakítják ki a folyamatot [33].

Egy másik hipotézis az öntőláz kórfejlődésének magyarázatára a cink-oxid indukálta reaktív oxigén gyökök (ROS) képződésének hatásaként írja le a folyamatot [34]. A feltevés azon alapul, hogy a cink-oxid nanorészecskék (ZnO-NP) toxikusabb hatással rendelkeznek, mint a nagyobb részecskék, amelyek keletkezhetnek pl. a hegesztési folyamat során [8]. Az inhalált cink-oxid nanorészecske endocitózissal jut be az intracelluláris térbe, ott pedig a savas kémhatású lizoszómákban nagymértékben képes bejutni, és a savas kémhatás miatt feloldódni. Az oldódás miatt szabad Zn^{2+} ionok keletkeznek és akumulálódnak a lizoszómákban, károsítva annak membránintegritását. A károsodott lizoszómák dezintegrációja sejtkárosodáshoz, illetve sejthalálhoz vezet reaktív oxigén gyökök keletkezése mellett, ezáltal oxidatív stressz alakul ki [20, 35]. Ezt „lizoszóma-erősített trójai faló” (LETH – Lysosome Enhanced Trojan Horse) folyamatnak nevezik, mivel a védekező funkcióval rendelkező savas kémhatású lizoszómák feladatuknak ellentmondóan nem csökkentik, hanem növelik a cink-oxid nanorészecskék károsító hatásait [35].

A cink-oxid nanorészecskék, mint redukáló hatású molekulák a Fenton reakció révén katalizálják a folyamatot, mely során oxigénből redukció hatására ROS keletkezik [36, 37].



Az így képződött ROS felgyülemlik a sejtekben, oxidatív stresszt okozva, ami a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvivő utakat aktiválja, ezzel elindítva egy kaskád folyamatot, aktiválva a nukleáris-faktor- κ -B-t (NF- κ B), ami a gyulladással kapcsolatos citokineket kódoló gének expresszióját indukálja, így ezeknek a citokineknek a mennyiségi növekedését segíti elő a szervezetben [38]. Ezen kívül a ROS mennyiségének emelkedése növeli az antioxidáns enzimek szintjét. Többek között a CAT, metallothionein (MT) és SOD mellett, a glutation (GSH) mennyisége növekszik cink-oxid hatására akut esetben, azonban krónikus, illetve nagy dózisban történő cink-oxid inhalációjánál csökken a szintje, mivel az antioxidációs folyamatok során átalakul oxidált glutationná (GSSH) [18, 39–41]. Valamint a MMP-k szintje is emelkedik a betegség során, ezt a p53 jelátviteli út aktivációjának eredményének gondolják, mely során ROS hatására növekszik a MMP szint és kialakul apoptózis [9, 12].

1.3 Tünetek

A betegség megjelenésekor nem specifikus, influenzaszerű tünetek alakulnak ki. A tünetek a fém-füst expozíció után 3-10 órával jelentkeznek, többnyire szájszárazsággal, fémes szájjal és száraz köhögéssel, erős szomjúságérzéssel kezdődik, ezután étvágytalanság, émelygés, akár hányás, fejfájás, izom- és ízületi fájdalom, hidegrázás és láz jelentkezik. Érdekes, hogy a folyamatos kitettség során, enyhe tolerancia alakul ki a szervezetben, ami miatt nem jelentkeznek tünetek, egészen addig, amíg pár nap nem telik el munkavégzés / expozíció nélkül. Emiatt leggyakrabban a hétvégét követően, hétfőn szoktak jelentkezni a tünetek, innen is ered a betegség egyik neve, hétfő reggeli láz. A kialakult tünetek általában 24-48 óra elteltével spontán enyhülnek vagy meg is szűnnek, de gyakran 4 nap is kell a felépüléshez [5, 6].

A betegség diagnosztikája nehézségekbe ütközik, mert nem specifikus tüneteket idéz elő. Emiatt sokszor olyan hamis diagnózisok keletkezhetnek, mint az influenza, vírusos felső légúti megbetegedés vagy a tüdőgyulladás. Elsősorban a kórelőzmény, ami alapján meg lehet határozni a betegséget valódi okát, mivel a foglalkozás, illetve munkahely feltárása sok hasznos információval szolgál az öntőláz diagnosztikájában. Ezen kívül, mivel legtöbbször nem súlyosak a tünetek és spontán enyhülnek pár nap alatt, így nem minden érintett keres orvosi segítséget, ezért a valós incidencia, tehát az érintettek száma sokkal nagyobb lehet, mint a hivatalos adatok [3]. Eddigi adatok szerint a kórkép előfordulása a kockázatnak kitett populációban hozzávetőleg 30 %, mivel a cink-oxid belélegzése nem okoz minden esetben

megbetegedést [5, 6, 42]. A betegségre való érzékenységnek az oka az eddigi vizsgálatok ellenére ismeretlen.

1.4 Terápiás lehetőségek

Az öntőláz pontos kórfejlődése még nem ismert, ezért célzott kezelési mód nem áll rendelkezésünkre. Tüneti kezelésként elsősorban lázcsillapítót, illetve nem-szteroid gyulladáscsökkentőket lehet alkalmazni, illetve nyugodt körülményeket, pihenőt javasolni az érintettnek. Súlyosabb esetben hörgőtágítók, illetve oxigén adagolása javasolt légzési nehézség esetén. Ezen kívül hányáscsillapítók segíthetnek émelygés, hányás esetén, valamint intravénás folyadékterápia, a folyadékvesztés és a szomjúságérzet csökkentésére.

Mindenekelőtt azonban fontos hangsúlyt fektetni a megelőzésre, mivel célzott kezelés egyelőre nem elérhető. A fémekkel foglalkozó munkások oktatása a munkakörrel járó veszélyekről, a betegség tüneteiről, egyéb jeleiről elengedhetetlen. Ezen kívül a biztonságos munkaterület megteremtése fontos, megfelelő szellőzéssel, a keletkező fém-füstök mielőbbi eltávolításával, illetve a munkások számára biztonságos öltözék biztosításával. Emellett a biztonsági munkavédelmi előírások betartása, miszerint a keletkező fém-füstök koncentrációja a levegőben a meghatározott határérték alatt maradjon [4, 6].

2. CÉLKITŰZÉS

A diplomamunkám során célunk volt az öntőláz betegséget okozó cink-oxid (ZnO) részecskék belélegeztetésével, a tünetegyüttes kiváltása egér állatmodellen, valamint a háttérben álló immunológiai események feltárása, a folyamatban feltehetőleg részt vevő, immunológiailag releváns gének expressziójának monitorozása a Zn-tartalmú füsttel több alkalommal kezelt állatok tüdejéből és mellüregi nyirokcsomóiból vett mintákban. Célunk volt továbbá, hogy a vizsgált gének expressziós változásai alapján következtessünk a kórfolyamatot kialakító immunológiai kaszkád egyes lépéseire.

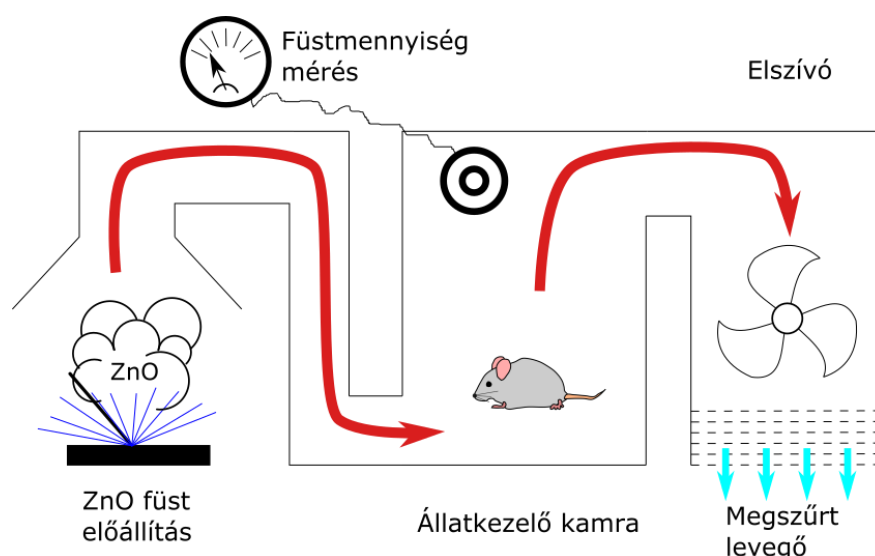
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Állatmodell

A kísérlet modelljeiként BALB/C törzsbe tartozó egereket (*Mus musculus*) alkalmaztunk, az állatkísérleti engedélyszám: PE/EA/1335-8/2019. Az állatok a kezeléseken kívül sztenderd körülmények között voltak elhelyezve. Szabvány méretű és anyagú dobozokban, forgács aljzattal, egységes rágcsálótáp és ivóvíz minőségű víz ad libitum elérhető volt számukra. A helyiség hőmérséklete 20-24 °C, 12 óra központi vezérlésű megvilágítás és 12 óra sötét ciklus mellett. Az állatok vizuális megfigyelését naponta legalább egyszer végeztük.

3.2 ZnO füst előállítása és kezelés

A kezelésekhöz felhasznált cink-oxidot analitikai minőségű cink fémforgácsból állítottuk elő (Merck Group, Darmstadt, Németország) a fémforgács magas hőmérsékleten történő elégetésével. A szükséges hőmérséklet előállításához TIG (Tungsten Inert Gas) hegesztési technológiát, egy (volfram elektródos semleges védőgázos ívhegesztés) alkalmaztunk. Védőgázként a technológia szabályainak megfelelően 99,99 % tisztaságú argon gázt használtunk fel (Linde Magyarország Kft., Répcalak, Magyarország). A művelethez egy Rehm TIGER 180 AC/DC High (Rehm GmbH., Uhingen, Németország) hegesztőgépet használtunk, valamint a keletkezett füst elszívásához és annak az állatokat is tartalmazó kamrán való keresztüláramoltatásához egy Kemper Smart Master (Kemper GmbH., Vreden, Németország) elszívó berendezést vettünk igénybe.



1. ábra: Az állatkezelő rendszer vázlatos felépítése. A vörös nyilak a ZnO-val szennyezett levegő áramlását mutatják, a kék nyilak pedig a megtisztított és a helyiségbe visszatáplált levegő áramlását

3.3 Füstkoncentráció meghatározása

A kísérlethez alkalmazott cink-oxid részecskék pontos mennyiségét Aeroqual Model 500 (Aeroqual, Auckland, Új-Zéland) levegőminőség ellenőrző műszer segítségével határoztuk meg, melyet hozzá tartozó PM_{10} és $PM_{2,5}$ optikai szenzorokkal szereltünk fel. Ezen kívül a füstkoncentráció meghatározásához szükségünk volt a keletkezett nanorészecskeszám ismeretére adott térfogatban, melyet a Testo DISCmini (Testo SE, Titisee-Neustadt, Németország) nanorészecske-szám mérő kéziműszer alkalmazásával határoztunk meg. A három mért adat közül a rendszert a $PM_{2,5}$ értékre állítottuk be, mégpedig úgy, hogy ez az érték hosszabb időtávon átlagosan 1,2 ppm legyen az állatok közelében. Ennek az értéknek a meghatározása a jelenleg hazánkban is hatályos jogszabályban előírt, a munkahelyek levegőjének maximális Zn szennyezettségi határértékének alkalmazásával történt, ami 2 mg/m³. Ezt a koncentrációértéket a ZnO molekuláris tömegének segítségével átszámolva ppm koncentrációra 1,2 ppm adódik. A füst kémiai összetételének ellenőrzése érdekében a kísérletek előtt a beállított körülmények között termelt ZnO füstöt ultratiszta vízben nyelettük el, és az így kapott szuszpenzió kémiai összetételét induktívan csatolt plazma optikai emissziós spektroszkópiai (ICP-OES) eljárással határoztuk meg az Egyetem Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszékén Dr. Bartha András segítségével.

3.4 Lázás állapot detektálása hőkamerás mozgásaktivitás méréssel

A kezeléseket követően egy nem-invazív megfigyelési rendszert alkalmaztunk, melynek az alapja az állatok vizsgálata a mozgásukban bekövetkezett változások alapján. A megfigyelő rendszerben egy Teledyne FLIR Duo R (Teledyne-FLIR, Wilsonville, Oregon, USA) hőkamerát használtunk, amellyel meghatározott időpillanatokban (6 percenként) rögzíteni tudtuk az állatok hőképét. A megszerzett képanyagot ezután R Studio statisztikai szoftver segítségével elemeztük, meghatározva a vizsgált egérdobozokban az állatok aktuális tartózkodási helyét a legmelegebb hőpontok megtalálásával (R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>). Az állatok pozícióadatait 6 órás időintervallumokban összesítettük.



2. ábra: A hőkamerás mozgásmegfigyelési berendezésének elrendezése

3.5 Validáló kísérlet

A használni kívánt termál kamerás megfigyelési rendszer ellenőrzéséhez egy előkísérletet terveztünk meg, mely során 4 egeret vizsgáltunk (2 hím, 2 nőstény, 1-1 kezelt, 1-1 negatív kontroll). Az állatokból lázat és gyulladós tüneteket váltottunk ki intraperitonealisan befecskendezett *Escherichia coli* (O127:B9) eredetű lipopoliszacharid (LPS) tartalmú injekcióval. Az injekció előállításához 1 mg/ml LPS koncentrátumot (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) használtunk, melyből 50 µg mennyiséget elegyítettünk 500 µl steril foszfát-puffer oldattal (PBS), majd egyszeri alkalommal alkalmaztuk az állatokon. Ezt követően az egereket 36 órán keresztül folyamatosan megfigyeltünk és adatokat gyűjtöttünk, amit elemeztünk.

3.6 Kezelés

Az állatok kezelése során a termikusan előállított cink-oxid füst inhalációja történt meg. Ehhez egy EMKA teljes test pletizmográfot (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) alkalmaztunk (3. ábra), valamint a gyártó által a rendszerhez ajánlott IOX2 adatgyűjtő- és elemző szoftvert.



3. ábra: A cink-oxid inhaláltatásához használt teljes test pletizmográf berendezés általános összeállítása.

A kezelések 4 db hím egér felhasználásával történtek, három egymást követő napon, naponta 4 óra időtartamban. Az állatok a kezelés alatt a teljes test pletizmográf kezelőkamráiban foglaltak helyet, takarmányhoz és ivóvízhez szabadon hozzáfértek. A kezelőrendszer vázlatos elrendezését az 1. ábra mutatja. Az állatokat ezután a hőkamerás rendszer segítségével megfigyeltük, majd kiválogattuk azon egyedeket, melyeknek lokomotors aktivitása csökkenést mutatott a megfigyelési időszakban, tehát egyedi érzékenységet mutatott a ZnO kezelésre. Ezeket az előkísérleteket addig folytattuk, amíg a főkísérlethez összegyűjtöttük az betegségekre hajlamos állatokat. Ezeket az állatokat 3 hetes kezelés nélküli periódus után bevontuk a főkísérletbe, mely során az előzőekben ismertetett paraméterekkel kezeltük és 2 állatot a kezelés utáni 3. órában, 2 állatból pedig a kezelés utáni 12. órában mintákat vettünk.

3.7 Biológiai minták gyűjtése

A kezelésen átesett és tüneteket mutató állatokon *post mortem* mintavételt hajtottunk végre. A további vizsgálatokhoz szükséges szervmintákat (máj, lép, tüdő, mellüregi nyirokcsomó, vér) a felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

3.8 Szérum Amiloid A₃ (SAA) PCR

A gyulladással kapcsolatos citokinek megjelenését első lépésben a SAA mennyiségének növekedésével kívántuk igazolni így a lázkeltéses előkísérletben részt vett állatokból mintát vettünk és ezekből a mintákból a SAA mRNS jelenlétét vizsgáltuk egy endpoint PCR

rendszerben. A állatokból tüdő, lép, máj, és vér mintákat vettünk, ezeket használatig -20 °C-on tároltuk. A szervmintákat homogenizáltuk, majd Qiagen RNAEasy Kit segítségével RNS-t vontunk ki belőlük, ami a PCR templátjaként szolgált. A PCR eljárást a Qiagen OneStep RT-PCR Kit alapján végeztük el, melyben a reakcióelegy a következők szerint alakult: 2,5 µl ribonukleáz-mentes víz, 10 µl Qiagen OneStep puffer, 2 µl dNTP mix, 0,5-0,5 µl primer, 2 µl Qiagen enzim keverék, és 2,5 µl templát RNS, melynek a végtérfogata 20 µl (Qiagen, Hilden, Németország).

Az átíráshoz szükséges, reverz-transzkriptáz szakasz 50 °C, 30 perc, majd ezt követően 95 °C, 5 perc, mely során a reverz-transzkriptáz enzim inaktiválódik és a DNS-polimeráz enzim aktiválódik. A lánreakció során az egyes ciklusok hőprofiljai a következők szerint alakultak, 25-40 cikluson keresztül ismétlődve: denaturáció 94 °C, 30-60 másodperc, annealáció 50-68 °C, 30-60 másodperc, elongáció 72 °C, 60 másodperc. A végső elongáció pedig 72 °C, 10 perc.

3.9 Inflammatorikus gének expressziója

- **RNS kivonás**

A kezelt egerekből tüdő és mellkasi nyirokcsomó mintákat vettünk, melyeket RNAlater stabilizáló oldatban tároltuk felhasználásig, -20 °C-on (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Ezután következett a ribonukleinsav kivonása a mintákból, melyhez a Qiagen RNEasy Mini Kit-et használtuk fel és a gyártó utasításai szerint jártunk el (Qiagen, Hilden, Németország). Használatig a kivont RNS-t -80 °C-on tároltuk.

- **Komplementer DNS átírás**

A kivont RNS-t a következő lépésben DNS-sé írtuk át, amihez a Qiagen RT² First Strand Kit segítségét vettük igénybe. A gyártó előírásainak megfelelően elvégeztük a protokollt és inkubáltuk a reakcióelegyet 42 °C-on 15 percig, majd 95 °C-on 5 percig, a reakció leállítása érdekében.

- **Kvantitatív polimeráz lánreakció**

A kezelt egerekből származó szervmintákból real-time PCR módszer segítségével, az egerekre jellemző gyulladásos mediátorokat kódoló gének expresszióját mértük. Ehhez egy Qiagen RT² Profiler PCR Array: Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors (PAMM-011ZA) nevű 96-lyukú lemezt alkalmaztunk, melyen 84 gyulladásos citokin, illetve receptor

gén expressziója mérhető, a lemezen gyárilag található primerek segítségével, melyekről a gyártó nem adott szekvencia-adatot. A RT-PCR reakcióelegy összeállításához felhasználtuk a Qiagen RT² SYBR[®] Green ROX FAST Mastermix-et, a gyártó utasítása alapján.

A használt módszerünk hőprofilja a következőképpen alakult: 10 perc 95 °C kezdeti denaturáció, ezután 40 cikluson keresztül, először 10 másodperc 95 °C annealáció, és 60 másodperc 60 °C elongáció.

A RT-PCR reakciókat Bio-Rad CFX96 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) készülék segítségével hajtottuk végre, valamint a kapott Ct (cycle threshold) értékeket a Bio-Rad CFX Maestro szoftverrel jelenítettük meg.

A RT-PCR módszert elvégeztük kezeletlen kontroll állatokon, valamint kezelt állatokon. A kezelt állatokból a mintavétel a kezelés utáni 3., illetve 12. órában történt, hogy figyelemmel tudjuk kísérni a génextpressziós változásokat cink-oxid hatására, a kontroll eredményekkel összehasonlítva. Minden csoportban 2-2 egérből történt a mintavétel.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Aimp1	Bmp2	Ccl1	Ccl11	Ccl12	Ccl17	Ccl19	Ccl2	Ccl20	Ccl22	Ccl24	Ccl3
B	Ccl4	Ccl5	Ccl6	Ccl7	Ccl8	Ccl9	Ccr1	Ccr10	Ccr2	Ccr3	Ccr4	Ccr5
C	Ccr6	Ccr8	Cd40lg	Csf1	Csf2	Csf3	Cx3cl1	Cxcl1	Cxcl10	Cxcl11	Cxcl12	Cxcl13
D	Cxcl15	Cxcl5	Cxcl9	Cxcr2	Cxcr3	Cxcr5	Fasl	Ifng	Il10ra	Il10rb	Il11	Il13
E	Il15	Il16	Il17a	Il17b	Il17f	Il1a	Il1b	Il1r1	Il1rn	Il21	Il27	Il2rb
F	Il2rg	Il3	Il33	Il4	Il5	Il5ra	Il6ra	Il6st	Il7	Lta	Ltb	Mif
G	Nampt	Osm	Pf4	Spp1	Tnf	Tnfsf11b	Tnfsf10	Tnfsf11	Tnfsf13	Tnfsf13b	Tnfsf4	Vegfa
H	Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

4. ábra: A Qiagen RT² Profuler PCR Array: Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors (PAMM-011ZA) lemez segítségével kimutatható gének hivatalos rövidítései, a lemezen elhelyezkedve. Kékkel a háztartási géneket, zölddel az egér genomikus DNS kontrollt, sárgával a rever-transzkriptáz kontrollokat és rózsaszínnel a pozitív PCR kontrollokat láthatjuk.

1.1.1. Adatelemzés

A RT-PCR során kapott Ct értékeket $\Delta\Delta Ct$ analízis [43] alapján értékeltük, mely során egy háztartási gént a használt Qiagen RT² Profiler PCR Array lemezen fixált gének közül kiválasztottunk referenciaként RefFinder online kereső segítségével (RefFinder

<http://blooge.cn/RefFinder/>). Az online program az alábbi módszerek segítségével valószínűsíti a vizsgálatokban alkalmazott több háztartási gént közül a legstabilabb génextpresszióval rendelkezőt:

- 1) RefFinder [44]
- 2) Genorm [45]
- 3) NormFinder [46]
- 4) BestKeeper [47]
- 5) The comparative delta-Ct method [48]

A lehetséges háztartási gének közül így kiválasztottuk a legmegfelelőbbet. Ezután ehhez hasonlítva számítottuk ki a változás mértékét az minden vizsgálni kívánt gén esetén, az alábbi egyenletet felhasználva:

$$\Delta Ct = Ct (\text{vizsgált gén}) - Ct (\text{háztartási gén})$$

A műveletet elvégeztük a kontroll és a kezelt minták esetén kapott értékekkel, a $\Delta\Delta Ct$ érték kiszámításához a következő egyenletet alkalmaztuk:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{kezelt minta}) - \Delta Ct (\text{kontroll minta})$$

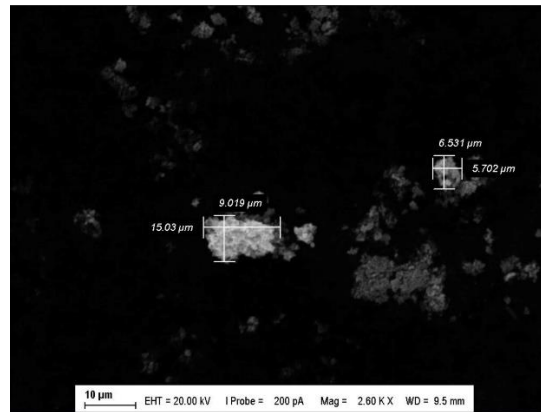
Végül, hogy megkapjuk a génextpresszió mértékének változását, minden vizsgált gén esetében, az alábbi műveletet kell végrehajtanunk:

$$\text{Génextpresszió változás} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. EREDMÉNYEK

4.1 Hegesztés és füstkoncentráció

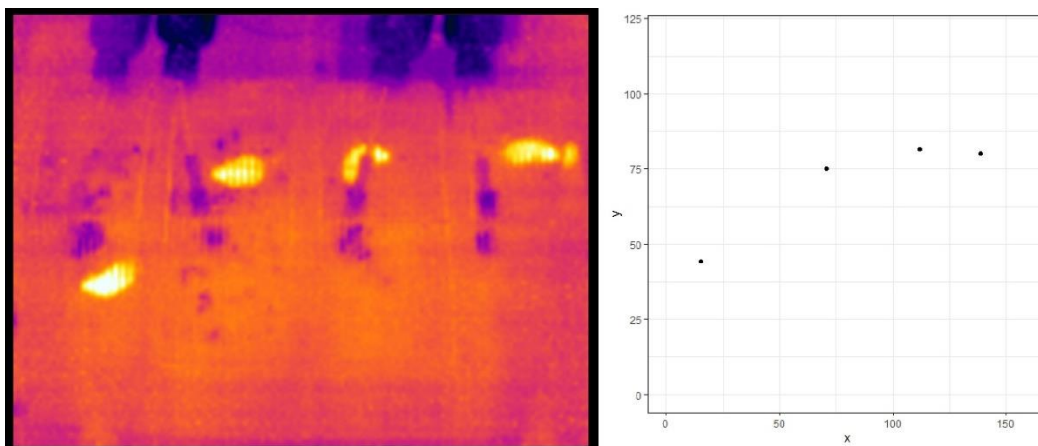
Vizsgálataink során a hegesztésből származó egyedülálló cink-oxid nanorészecskék mérete 10-20 nm-nek adódott, amik idővel konglomerátumokat formáltak, melyek mérete 500-3000 nm volt. A keletkezett füst spektroszkópiás vizsgálatakor kiderült, hogy a legfőbb összetevő a cink-oxid és egyéb szennyezők, mint kadmium, vas, minimális mennyiségben voltak jelen a kísérlet szempontjából.



5. ábra: A cink-oxid nanorészecskék, illetve konglomerátumok elektronmikroszkópos felvétele és feltüntetett méreteik. (Dr. Kővágó Csaba felvétele)

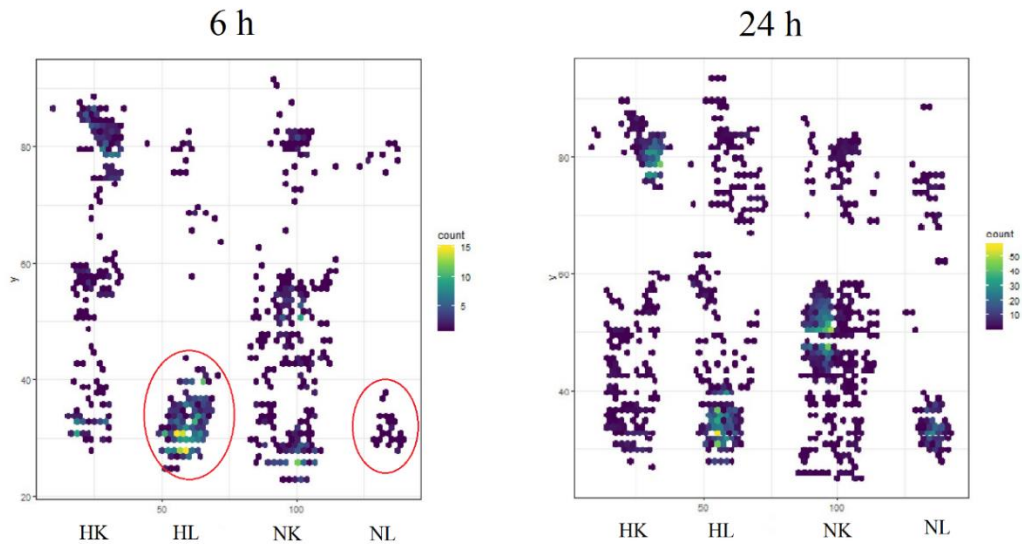
4.2 Mozgásmegfigyelés

Az LPS adminisztrálása után az egereket 36 órán keresztül megfigyeltük, mely során a kezelt egerek diszkomfortra jellemző tüneteket mutattak, gubbasztottak, a kontroll egerek pedig a cirkadián ritmusuknak megfelelő aktivitást mutattak. A kezelt egerekről készült hőkamerás felvételeket 6 órás periódusokban összegeztük.



6. ábra A hőkamera által készített képek (bal) alapján megállapítottuk az állatok pozícióját (jobb), a pozíciókat pedig 6 órás időintervallumokban összegeztük.

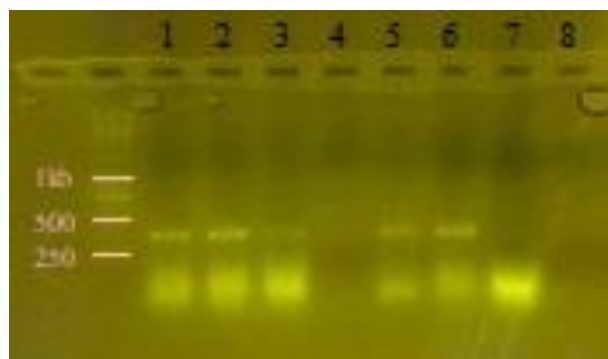
Ez alapján megfigyeltük az aktivitáscsökkenésüket a 6. órában kezelés után, mikor alig mozogtak, gubbasztottak. A kezelés utáni 12. órában kezdődött a felépülési szakasz, mikor már kisebb aktivitásnövekedést vettünk észre és a 24. órában bekövetkezett a teljes felépülés, a kontroll állatokkal együtt mozogtak.



7. ábra: A 36 órás hőkamerás megfigyelés alatt készült felvételekből, 6 órák időintervallumokban megállapított pozíciói az állatoknak, gyakorisági grafikonon ábrázolva; HL= hím kontroll, HL= hím LPS-el kezelt, NK= nőstény kontroll, NL= nőstény LPS-el kezelt. Az 6. órák időintervallumban a mozgásaktivitás csökkenése látható, a 24. óra periódusában pedig annak emelkedése figyelhető meg.

4.3 Kezelés és SAA PCR

Az előzetes kezelések során az egerek 30 %-a mutatott tüneteket a hőkamerás megfigyelés során. A tüneteket mutató egerekből újramezelés után mintát vettünk és PCR módszerrel végzett SAA kimutatás során pozitív eredményeket kaptunk.



8. ábra A SAA PCR termékeivel készített gélelektroforézis gélképe. Rózsaszínnel a marker vonalai láthatók (1000, 500 és 250 kb méretek megjelölve). Számokkal jelöltük a kontroll (1-4. oszlop) és a kezelt (5-6. oszlop) mintákat. Pozitív eredményt az 1-es, 5-ös (tüdő), 2-es, 6-os (lép), és 3-as (máj) számmal jelölt minták esetében kaptunk. A 4-es és 8-as (vér), illetve a 7-es (máj) számmal jelölt mintákból az SAA jelenlétét nem tudtuk kimutatni.

4.4 Kvantitatív polimeráz lánreakció és adatelemzése

A módszer során szerzett nyers adatokból a $\Delta\Delta Ct$ analízis alapján kiszámoltuk a génextpresszió mértékét minden vizsgált génhez, a kezelés utáni 3 órás és 12 órás mintavételnél (1. Táblázat).

A génextpresszió mértékének vizsgálata során jelentős emelkedést mutattak a vizsgált kemokinek közül, a Ccl1, Ccl2, Ccl7 (chemokine C-C motif ligand), Cxcl5, Cxcl12, valamint a Cxcl17 (chemokine C-X-C ligand), és a FasL (Fas-ligand), mind a korai (kezelés utáni 3. órás) és későbbi (12. órás) mintavételekhez származó mintákban is (1. Táblázatban, piros színnel). Ezen kívül növekedett az expressziója az ezen kemokinekhez tartozó receptoroknak is, többek között a Ccr2, Ccr4, Ccr8, Ccr1, Ccr3, Ccr5, Ccr10 (chemokine C-C motif receptor) és Cxcr2, Cxcr3 (chemokine C-X-C receptor) receptorok esetében (1. Táblázatban, zöld színnel).

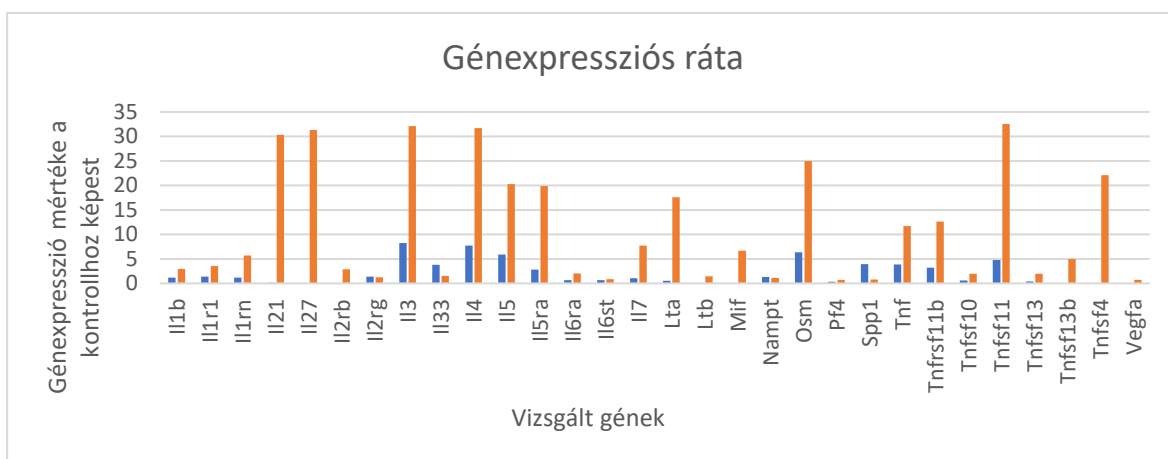
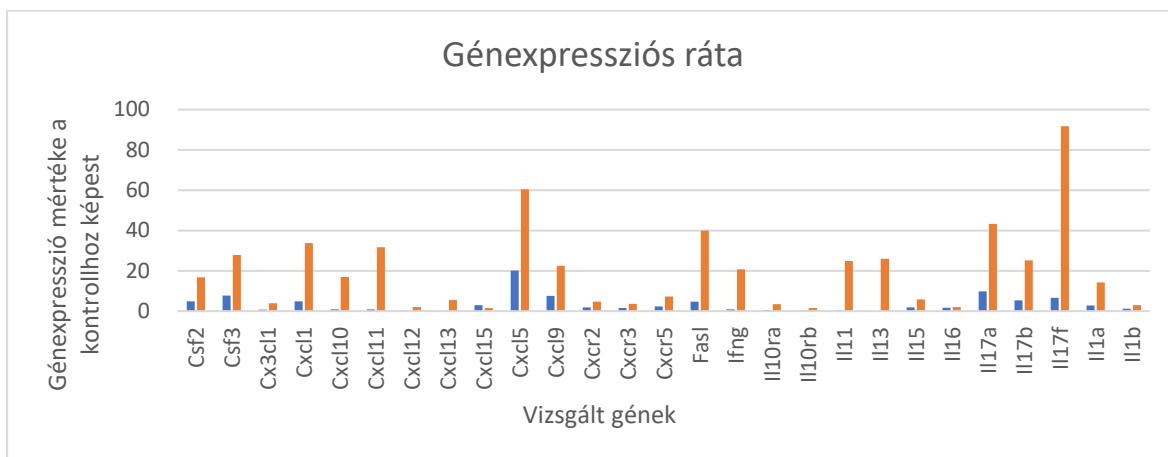
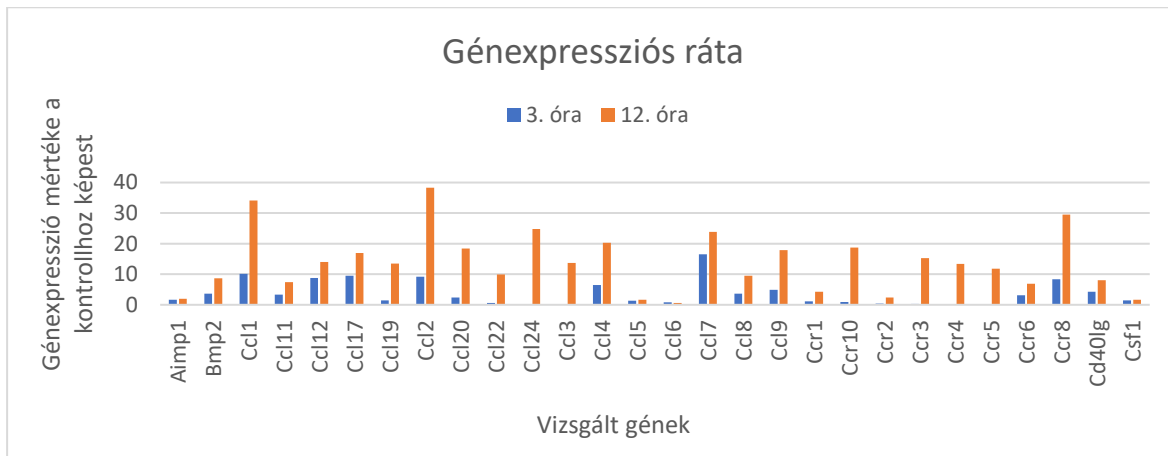
A vizsgált gyulladáshoz kapcsolódó mediátorok között kiemelkedően magas értékeket találtunk a citokineknek, mégpedig az IL3, IL4, IL5 és IL17a, IL17b esetében, a legmagasabb mértéket pedig az IL17f-nél találtuk, ahol a génextpresszió csaknem a kilencvenesére emelkedett (1. Táblázatban, piros színnel). Érdekes eredményként tapasztaltuk, hogy az IL21 és IL27 génextpressziójának a szintje a kezelés utáni 3. órás mintavételkor down-regulálódott, azonban a 12. órás mintavétel esetén jelentősen megnőtt (1. Táblázatban, kék színnel). Ezt egyetlen másik gén esetében sem tapasztaltuk ilyen mértékben.

Növekedést mutatott, azonban mérsékeltebb szinten a kemokinek közül a Ccl4, Ccl20, Ccl24, illetve a Cxcl1, Cxcl11 és Cxcl9, főként a 12. órás mintavételkor származó mintákban. A citokinek közül szintén mérsékeltebben, de növekedést mutatott az IL11 és IL13, szintén a 12. órában. Valamint hasonló dinamikát láttunk az IFN γ , Lta (Lymphotoxin A), Osm (oncostatin M), Csf3 (colony stimulating factor 3), illetve a Tnfsf4 és Tnfsf11 (Tumor necrosis factor superfamily member) esetében (1. Táblázatban, sárga színnel).

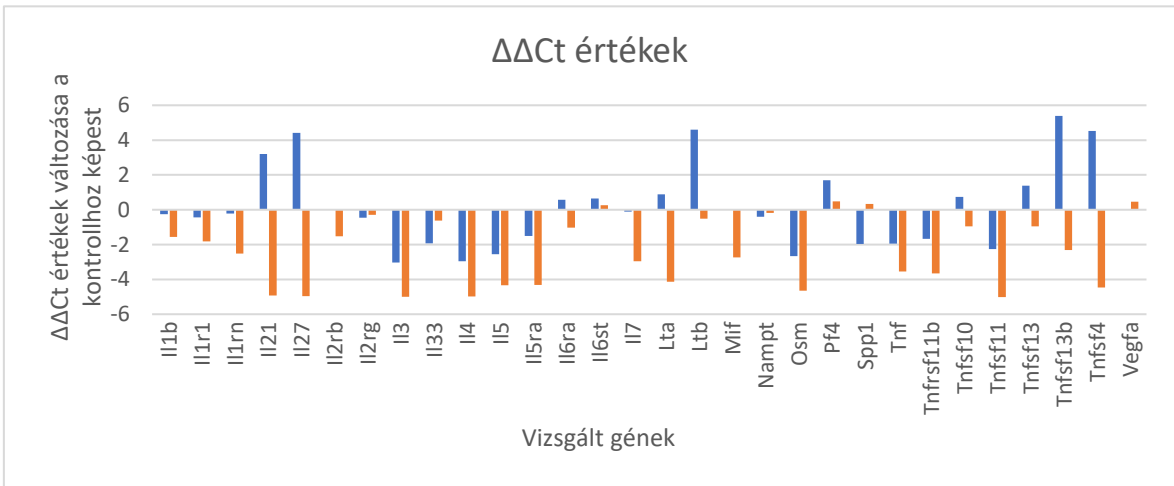
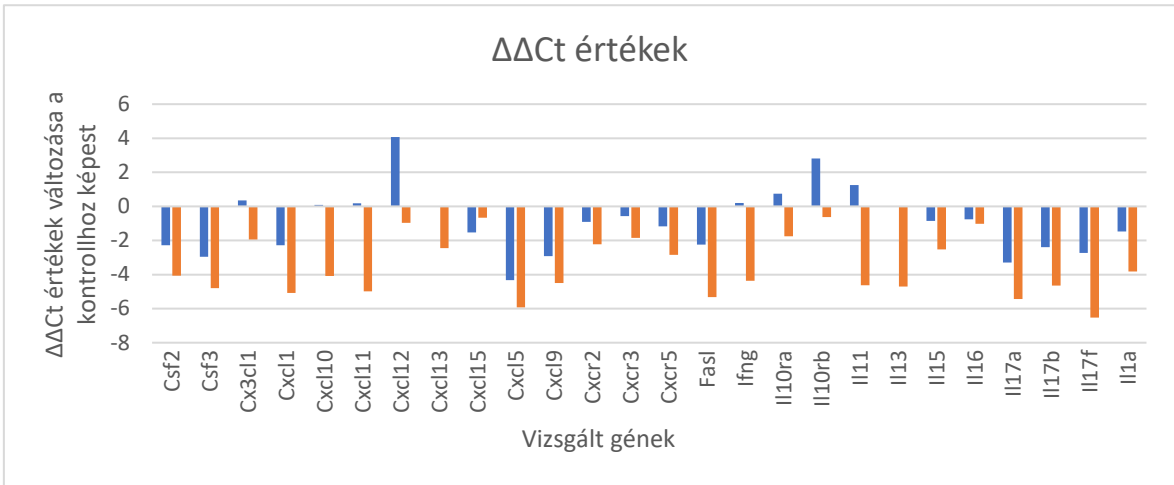
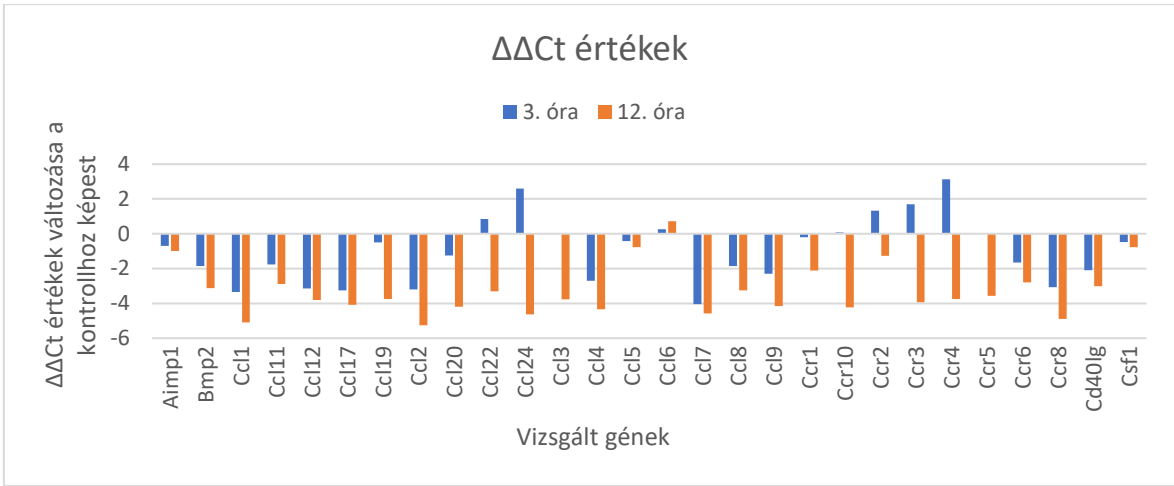
Gén	3. h	12. h
Aimp1	1,63	1,98
Bmp2	3,60	8,67
Ccl1	10,17	34,15
Ccl11	3,38	7,39
Ccl12	8,80	13,97
Ccl17	9,53	16,91
Ccl19	1,41	13,47
Ccl2	9,18	38,25
Ccl20	2,37	18,37
Ccl22	0,56	9,90
Ccl24	0,17	24,84
Ccl3	-	13,70
Ccl4	6,46	20,32
Ccl5	1,33	1,70
Ccl6	0,83	0,61
Ccl7	16,48	23,84
Ccl8	3,62	9,55
Ccl9	4,93	17,84
Cer1	1,15	4,32
Cer10	0,95	18,71
Cer2	0,40	2,40
Cer3	0,31	15,23
Cer4	0,12	13,43
Cer5	-	11,79
Cer6	3,16	6,89
Cer8	8,37	29,55
Cd40lg	4,27	8,04
Csf1	1,39	1,70
Csf2	4,87	16,77
Csf3	7,73	27,87
Cx3cl1	0,79	3,85
Cxcl1	4,88	33,79
Cxcl10	0,94	16,96
Cxcl11	0,88	31,70
Cxcl12	0,06	1,95
Cxcl13	-	5,43
Cxcl15	2,89	1,59
Cxcl5	20,10	60,45
Cxcl9	7,55	22,47
Cxcr2	1,89	4,67
Cxcr3	1,48	3,58
Cxcr5	2,25	7,21
Fasl	4,74	40,01
Ifng	0,87	20,76
Il10ra	0,60	3,39

Gén	3. h	12. h
Il10rb	0,14	1,55
Il11	0,42	24,80
Il13	-	26,05
Il15	1,81	5,75
Il16	1,69	2,04
Il17a	9,80	43,29
Il17b	5,28	25,23
Il17f	6,65	91,80
Il1a	2,79	14,22
Il1b	1,19	2,95
Il1r1	1,36	3,53
Il1rn	1,17	5,68
Il21	0,11	30,32
Il27	0,05	31,33
Il2rb	-	2,86
Il2rg	1,37	1,23
Il3	8,22	32,07
Il33	3,79	1,54
Il4	7,74	31,70
Il5	5,87	20,23
Il5ra	2,82	19,90
Il6ra	0,68	2,03
Il6st	0,64	0,83
Il7	1,08	7,74
Lta	0,54	17,57
Ltb	0,04	1,42
Mif	-	6,64
Nampt	1,32	1,13
Osm	6,36	24,96
Pf4	0,31	0,71
Spp1	3,91	0,79
Tnf	3,86	11,71
Tnfrsf11b	3,20	12,63
Tnfsf10	0,60	1,95
Tnfsf11	4,81	32,54
Tnfsf13	0,38	1,94
Tnfsf13b	0,02	4,96
Tnfsf4	0,04	22,07
Vegfa	-	0,73
Actb	1,27	0,72
B2m	1,00	1,00
Gapdh	2,60	8,08
Gusb	1,39	1,78
Hsp90ab1	1,40	0,67

1. Táblázat: A vizsgált géneket és a Ct értékeiből átszámított génexpressziót láthatjuk a kezelés utáni 3., illetve a 12. órában történt mintavételből származó mintákban. Piros színnel a mintkét mintavétel során erőteljes génexpressziót mutató ligandok, zöld színnel a hozzájuk tartozó receptoraik láthatók. Kékkel a 3. órában csökkenő és a 12. órában növekvő génexpressziót mutató gének láthatók. Sárgával pedig a mérsékelten, de növekvő génexpressziót mutató géneket látjuk.



9. ábra A kísérletben vizsgált gének génexpressziós rátái, a kontrollhoz viszonyítva.



10. ábra A kísérletben vizsgált gének génexpressziós változásai $\Delta\Delta Ct$ értékben kifejezve, a kontrollhoz képest.

5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során igyekeztünk mesterséges körülmények között kiváltani kísérleti egerekben az öntőláz néven ismert humán tünetegyüttest toxikus adagnál kisebb dózisú cink-oxid tartalmú füst több alkalommal történő belélegeztetésével. Előzetes vizsgálatokban kiválogattuk azokat az egyedeket, amelyek érzékenynek bizonyultak az említett betegségre. Ennek érdekében az állatkezeléses kísérlet után megfigyelt állatokban mértük a mozgásaktivitást, amelynek csökkenése a szakirodalom szerint indikátora lehet a hőemelkedéssel vagy lázzal járó állapotnak [49]. Ezt a mérőrendszert előzetesen teszteltük LPS-sel kezelt és kezeletlen kontrol állatok alkalmazásával, és ekkor jól elkülöníthetőek voltak a pirogén kezelés miatt lázas és gubbasztó egyedek a tünetmentes, így normál mozgásaktivitást mutató társaiktól. Így, az előkísérlet alapján úgy ítéltük meg, hogy a rendszer alkalmas a lázas és tünetmentes állatok elkülönítésére. A módszerrel a rendelkezésünkre álló egérpopuláció szűrővizsgálatakor a vizsgált egyedek ~40%-a bizonyult mérhetően érzékenynek az alkalmazott ZnO füstkoncentráció hatására kialakuló lázas állapotra. Ez az arány nagyon közel esik a humán populációban kimutatott 38%-os érzékenységre [9]. Így levonhatjuk azt a következtetést, hogy az általunk választott biológiai modell alkalmas releváns adatok gyűjtésére.

A termikusan felszabadított ZnO tartalmú füst előzetes elektronmikroszkópos vizsgálatok kiderült, hogy a részecskék között jelentős számban fordulnak elő 3 μm és ennél kisebb átmérőjű szemcsék, illetve az említett ICP-OES módszerrel végzett kémiai analízis kimutatta, hogy a cinken kívül egyéb kísérő illetve szennyező fématomok csak elhanyagolható mennyiségben voltak jelen. Így, a tervezett kezelési összeállításban való alkalmazására az előállított ZnO füst alkalmasnak bizonyult.

Immungenetikai vizsgálatainkban jelentős számú, gyulladás kialakításában részt vevő citokin, interleukin és ezek receptorait kódoló mRNS mennyiségét mértük az állatok tüdejében és mellüregi nyirokcsomóiból 3- és 12 órával a legutolsó kezelés után vett mintákban. A génexpressziós értékeket kezeletlen kontrol állatok adataihoz hasonlítottuk.

Eredményeink ismeretében általánosan elmondható, hogy a belélegeztetett ZnO részecskék gyulladáshoz vezető reakciót indukáltak a kísérleti állatokban. Ezt jól mutatja, hogy a génexpressziós változások a vizsgált gének elsősorban többségének esetében a 3- és 12 órás mintákban monoton up-reguláció mutattak. Jelen munka kereteit messze meghaladná az

összes ilyen gén funkciójának elemzése, így csak a legkiemelkedőbb eltérés mutató génekre koncentrálunk.

A kontroll adatoktól való legnagyobb eltérést a kezelt állatokban az IL-17f up-regulációja a 12-órás mintában (több, mint 90-szerese a kontrol értéknek) mutatta, de az IL-17 család többi vizsgált tagja is (IL-17a; IL-17b) is jelentős up-regulációt mutatott ugyanebben az időben. Ezeknek az interleukin géneknek az aktivációja a 3-órás mintákban is megfigyelhető, de akkor még csak kisebb (5 és 10-szeres génexpresszió a kontrolhoz képest). Mivel irodalmi adatokból ismert, hogy az IL-17 a gyulladási folyamatokban kulcsszerepet tölt be, extracelluláris pathogének megjelenésekor aktiválja a celluláris immunválaszt, és a Th17-es limfociták megjelenését és proliferációját segíti elő. Ez az eredmény egyértelműen megerősíti azt, hogy a tüdőben és a regionális nyirokcsomókban akut gyulladási folyamat alakult ki [50].

Az IL-3, IL-4 és IL-5 interleukinok mind korai, mind pedig a 12-órás mintákban látható up-regulációja jelentős. Ezek a citokinek részben a veleszületett immunrendszer sejtjeinek (dendritikus sejtek, monociták, és granulociták) érését és aktiválását segítik elő, másrészt az eozinofil granulociták aktiválása révén hozzájárulnak bizonyos hiperszenzitivitási reakciók kialakulásához. Az IL-4 további hatásai, hogy a leukotrién-szintetáz aktivitásának növelésével emeli a gyulladáskeltő anyagok mennyiségét az adott területen, illetve a hízósejtek felületi IgE receptorainak számbeli növekedését is eredményezi [51]. Ezek a változások nagyban hasonlítanak az I-es típusú hiperszenzitivitási reakció érzékenyítési fázisában lezajló eseményekhez, így arra következtetünk, hogy a ZnO által kiváltott biológiai hatás az allergiás folyamatok működését követheti, ez alátámasztja az öntőláz pathomechanikájában sejtett immuno-allergiás folyamatot. Ezt tovább erősíti az a tény, hogy a hiperszenzitivitási reakcióban szerepet játszó IL-13 gén expressziója a 12-órára szintén jelentősen megemelkedik. Jelen tudásunk szerint, az említett interleukinok génexpressziós változásait eddig még nem írták le az öntőláz kapcsán.

Az alfa-kemokinek, más néven a C-X-C motívum kemokinek funkciója elsősorban az immunválaszban részt vevő sejtek mozgásának szabályozása. Ezek közül méréseink alapján a 3-órás mintákban a legnagyobb up-regulációt (a kontrolhoz képest 20-szoros) a CXCL5 mutatta, amelyet főként az eozinofil granulociták termelnek akut gyulladási folyamatokban. Ez a kemokin kemotaktikus faktorként működik, melyet a neutrofil granulociták a felületükön megtalálható CXCR2 receptoron keresztül kötnek meg. A

CXCL5 hatására a neutrofil granulociták a helyszíntre gyülekeznek, és aktiválódnak. Ennek a citokinnek a folyamatban játszott fontos szerepére utal az, hogy a 12-órás mintákban kiemelkedő (a kontroll mintegy 60-szor meghaladó) up-regulációja tapasztalható, illetve a CXCR2, azaz a receptor génjének bizonyos fokú upregulációja is megfigyelhető a 12-órás mintákban. Ezek az eredmények ismét alátámasztják az eozinofil granulociták szerepét a folyamatban, A kemotaxis révén a helyszíntre gyűjtött neutrofil granulocitáknak pedig valószínűleg az exogén ZnO részecskék elsődleges eltávolításában lehet szerepe.

Az eddig bemutatott eredményektől néhány vizsgált gén eltérő módon viselkedett. Ezeknél általában az volt tapasztalható, hogy a 3-órás mintákban génexpressziójuk down-regulálódott, majd a 12-órás időszakra up-regulációt mutattak. Kiemelkedő ezek közül a gének közül az IL-21 és IL-27 gén viselkedése. Ezek a 3-órás mintavétel idejében nagyon jelentős mértékű downregulációt szenvedtek (IL-21 0,11-szerese, míg az IL-27 0,05-szöröse a kontroll génexpresszió értékéhez képest). A későbbi mintákban viszont az up-regulációjuk jelentős, 30-31-szerese a kontrollnak. Az IL-21 részben a Th17 autokrin faktora, azaz a Th17 sejt által termelt citokin saját magára hat vissza. Másrészt a regulátor T sejtek differenciálódását és aktivitását gátolja, ezáltal az IL-21 hatása fenntartja a gyulladós folyamatot. Ennek a citokinnek az up-regulálódása a 12-órás mintákban megerősíti a Th17-es sejtek szerepét, illetve a folyamat gyulladós jellegét is alátámasztja. Ellenben az az eredmény, mely szerint a 3-órás mintákban az IL-21 génexpressziója a kontroll töredékére esik vissza, a folyamat tükrében nehezen értelmezhető. Ez a folyamat gátolná az eddig vázolt gyulladós-hiperszenzitivitási reakciót, de a mért citokin gének nagy többségében nem ez látszik. További vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy ennek a korai down-regulációs folyamatnak köze lehet-e ahhoz a megfigyeléshez, miszerint az aktív, tünetekben mutatkozó öntőlázban szenvedő emberek esetén az újabb ZnO expozíció a tünetek gyors megszűnését, egyfajta tolerancia kialakulását idézte elő [15].

Kutatásunkban a ZnO belélegzést követő immunológiailag fontos gének széles körének vizsgáltuk az expresszióját. Összefoglalva az eddigi eredményeket azt mondhatjuk, hogy ezek alapján az öntőláz néven ismert betegség kórfejlődésének immunológiai-allergiás útját látjuk alátámasztottnak, illetve meg tudjuk erősíteni azokat az irodalmi adatokat, melyek bizonyos fémek, mint pl. a cink és réz immunrendszerre való komolyabb hatását írták le. A jelenség megértéséhez természetesen még további, mélyre ható kutatások szükségesek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A cink-oxid tartalmú füst vagy por hosszabb expozíciója után emberekben régóta ismert foglalkozási megbetegedés alakul ki, melyet öntőláznak is neveznek. A tünetek a megengedett foglalkozási határérték alatti tartományban, szubtoxikus koncentrációjú cink-oxid belélegzése után is kialakulnak. A korábbi kutatások ellenére a pontos patomechanizmus nem tisztázott, a háttérben immunrendszerrel összefüggő folyamatokat feltételeznek.

Vizsgálatunk célja ez volt, hogy felmérjük, a ZnO inhalációs expozíciója ilyen génexpressziós változásokat indít el a tüdőben és a mediasztinális nyirokcsomókban, amelyek kapcsolatban állhatnak immunológiai folyamatokkal.

Vizsgálataink során először meggyőződünk az általunk használni tervezett kísérleti anyag, kísérleti elrendezés, és biológiai tesztrendszer alkalmazhatóságáról. Ezután kialakítottuk a vizsgálati csoportokat, melyben egy kezelés alkalmával 4 hím BALB-C egér, esetenként 4 óra hosszú, 3 napon keresztül ismételt ZnO füst expozícióját hajtottuk végre átlagosan 1,2 ppm PM_{2,5} ZnO tartalmú levegővel, mely megfelel a hazánkban is érvényes 2 mg/m³ Zn levegőtisztasági határértéknek. A kezelés után 3- és 12-órával 2-2 állatból vettünk szervmintákat, tüdőket és mellüregi nyirokcsomókat, és felhasználtuk a génexpressziós vizsgálat elvégzésére. Ennek során a mintákból 84, a gyulladással szemben szerepet játszó mediátorok és receptorok génexpresszióját mértük, kezeletlen kontrollhoz képest.

A kapott eredmények akut gyulladással szemben mutatják, mivel a legtöbb citokin gén expressziós rátája mind a 3-, mind pedig a 12-órás mintákban emelkedett. Kiemelkedő ebben az IL-17f, IL-3, IL-4, és IL-5, valamint a CXCL5 gének up-regulációja a 12-órás mintákban. Néhány gén esetében ettől eltérő viselkedést láttunk, a korai mintákban down-regulációt mutattak, majd később ezek is up-regulálódtak. Ezek közül a gének közül megemlítendő az IL-21 és IL-27.

Eredményeink megerősítik azt a megfigyelést, hogy belégzés után a Zn gyulladáskeltő hatású. A génexpressziós mintázat arra is következtetni enged, hogy a folyamatban jelentős szerepe lehet az eozinofil granulocitáknak, ebből pedig arra következtethetünk, hogy az említett humán betegség kórfolyamatáról eddig felállított hipotézisek közül adataink az immunológiai-allergiás elgondolást támasztják alá.

7. SUMMARY

After prolonged exposure to smoke or dust containing zinc-oxide, people develop a long-known occupational disease, which is also called metal fume fever. Symptoms also develop after inhalation of subtoxic concentrations of zinc-oxide in the range below the permissible occupational limit. Despite previous research, the exact pathomechanism is not clear, the underlying processes are assumed to be related to the immune system.

The aim of our study was to assess whether inhalation exposure to ZnO triggers such gene expression changes in the lungs and mediastinal lymph nodes, which may be related to immunological processes.

In the course of our investigations, we first inspected the applicability of the experimental material, experimental arrangement, and biological test system we planned to use. We then formed the study groups, in which 4 male BALB-C mice were repeatedly exposed to ZnO smoke for 4 hours, over consecutive 3 days, with air containing an average of 1.2 ppm PM_{2.5} ZnO, which corresponds to the 2 mg/m³ Zn as air purity limit value in Hungary. Organ samples, lungs and thoracic lymph nodes were taken from 2 animals, 3 and 12 hours after the treatment and used for gene expression analysis. During this, we measured the gene expression of 84 different mediators and receptors involved in inflammatory processes, and we compared the results to an untreated control.

The results show the process of an acute inflammation, as the expression rate of most cytokine genes increased in both the 3- and 12-hour samples. The up-regulation of IL-17f, IL-3, IL-4, and IL-5, as well as CXCL5 genes in the 12-hour samples is prominent. In some cases genes showed a different behavior, in the early samples they showed down-regulation, and later they were also up-regulated. Among these genes, IL-21 and IL-27 should be mentioned.

Our results confirm the observation that Zn has an inflammatory effect after inhalation. The gene expression pattern also allows us to conclude that eosinophil granulocytes may play a significant role in the process, and from this we can conclude that our data support the immunological-allergic theory among the hypotheses set up so far about the pathogenesis of this disease.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Szűcs-Somlyó Évának és Dr. Kővágó Csabának a diplomadolgozatom elkészítésében nyújtott segítségükért, kedvességükért és a jó kedvért. Rengeteget tanulhattam tőlük, amiért örökké hálás leszek.

Köszönetet szeretnék mondani Földi Dorottyának, aki idejét és tapasztalatát áldozta ránk, valamint Dr. Bartha Andrásnak segítségéért munkánk során.

Szeretném megköszönni a végtelen támogatást és segítséget Anyának, Apának és Somának.

Köszönjük a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Iroda anyagi támogatását 129055 azonosítójú FK_18 pályázat útján nyújtottak a kutatás elvégzésére.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Stoke J (1977) Metal fume fever in ferro-chrome workers. *Cent Afr J Med* 23:25–28
2. Berlinger B, Ellingsen DG, Náray M, Záray G, Thomassen Y (2008) A study of the bio-accessibility of welding fumes. *J Environ Monit* 10:1448. <https://doi.org/10.1039/b806631k>
3. Blount BW (1990) Two Types of Metal Fume Fever: Mild vs. Serious. *Mil Med* 155:372–377. <https://doi.org/10.1093/milmed/155.8.372>
4. Merchant J, Webby R (2001) Metal fume fever: A case report and literature review: Metal fume fever. *Emerg Med* 13:373–375. <https://doi.org/10.1046/j.1035-6851.2001.00243.x>
5. Greenberg MI, Vearrier D (2015) Metal fume fever and polymer fume fever. *Clin Toxicol* 53:195–203. <https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1013548>
6. Ahsan SA, Lackovic M, Katner A, Palermo C Metal Fume Fever: A Review of the Literature and Cases Reported to the Louisiana Poison Control Center. *J La State Med Soc* 4
7. McCORD CP (1960) Metal Fume Fever As an Immunological Disease. *Industrial Medicine and Surgery* 29:101-107.
8. Brand P, Lenz K, Reisinger U, Thomas K (2012) Number Size Distribution of Fine and Ultrafine Fume Particles From Various Welding Processes. *Ann Occup Hyg*. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mes070>
9. Monsé C, Raulf M, Jettkant B, van Kampen V, Kendzia B, Schürmeyer L, Seifert CE, Marek E-M, Westphal G, Rosenkranz N, Merget R, Brüning T, Bünger J (2021) Health effects after inhalation of micro- and nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *Arch Toxicol* 95:53–65. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02923-y>
10. Monsé C, Hagemeyer O, Raulf M, Jettkant B, van Kampen V, Kendzia B, Gering V, Kappert G, Weiss T, Ulrich N, Marek E-M, Bünger J, Brüning T, Merget R (2018) Concentration-dependent systemic response after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *Part Fibre Toxicol* 15:8. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0246-4>
11. Vogel U, Cassee FR (2018) Editorial: dose-dependent ZnO particle-induced acute phase response in humans warrants re-evaluation of occupational exposure limits for metal oxides. *Part Fibre Toxicol* 15:7, s12989-018-0247–3. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0247-3>
12. Liu J, Feng X, Wei L, Chen L, Song B, Shao L (2016) The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. *Crit Rev Toxicol* 46:348–384. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137864>
13. Girardello F, Leite CC, Touguinha LB, Roesch-Ely M, da Silva CKH, de Oliveira RM, Borges DLG, Villela IV, Fernandes AN, Salvador M, Henriques JAP (2021) ZnO nanoparticles alter redox metabolism of *Limnoperna fortunei*. *Environ Sci Pollut Res* 28:69416–69425. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15257-8>
14. Schraufnagel DE (2020) The health effects of ultrafine particles. *Exp Mol Med* 52:311–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0403-3>
15. Lehmann K (1910) Studien über technisch und hygienisch wichtige Gase und Dämpfe. XIV. Das geiss- oder zinkfieber. *Archiv f Hygiene* 72:358-381.

16. Swiller AI, Swiller HE (1957) Metal fume fever. *Am J Med* 22:173–174. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(57\)90350-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(57)90350-9)
17. Farrell FJ Angioedema and urticaria as acute and late phase reactions to zinc fume exposure, with associated metal fume fever-like symptoms. 7
18. Jacobsen NR, Stoeger T, van den Brule S, Saber AT, Beyerle A, Vietti G, Mortensen A, Szarek J, Budtz HC, Kermanizadeh A, Banerjee A, Ercal N, Vogel U, Wallin H, Møller P (2015) Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories. *Food Chem Toxicol* 85:84–95. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.008>
19. Datau EA, Wardhana (2014) Metal Fume Fever among Galvanized Welders. *Acta Med Indones* 46:7
20. Cho W-S, Duffin R, Howie SE, Scotton CJ, Wallace WA, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K (2011) Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. 16
21. Huang K-L, Chang H-L, Tsai F-M, Lee Y-H, Wang C-H, Cheng T-J (2019) The effect of the inhalation of and topical exposure to zinc oxide nanoparticles on airway inflammation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 384:114787. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114787>
22. Reisinger M, Thomas K, Beilmann V, Markert A, Gerhards B, Krichel T, Schmidt K, Kraus T, Martin C, Brand P, Krabbe J (2020) Increased Neutrophil Granulocyte and Myeloperoxidase Levels Indicate Acute Inflammation Due to the Exposure of Zinc- and Copper-Containing Welding Fumes. *J Occup Environ Med* 62:618–627. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001905>
23. Pernis B, Vigliani E, Cavagna G, Finulli M (1960) Endogenous pyrogen in the pathogenesis of zinc-fume fever. 51 579–586
24. Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T (2004) Cytokines and Fever. 9 1433–1449
25. Ameille J, Brechot JM, Brochard P, Capron F, Dare MF (1992) Occupational Hypersensitivity Pneumonitis in a Smelter Exposed to Zinc Fumes. *Chest* 101:862–863. <https://doi.org/10.1378/chest.101.3.862>
26. Mueller EJ, Seger DL (1985) Metal fume fever—A review. *J Emerg Med* 2:271–274. [https://doi.org/10.1016/0736-4679\(85\)90106-4](https://doi.org/10.1016/0736-4679(85)90106-4)
27. Drinker KR, Thompson PK, Marsh MW (1927) An investigation of the effect of long-continued ingestion of zinc, in the form of zinc oxide, by cats and dogs, together with observations upon the excretion and the storage of zinc. 80 31-64.
28. Izumi Y, Murata T, Kobayashi H, Houbara T (1992) Zinc hydroxide stimulates superoxide production by rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 185:7
29. Ogino K, Izumi Y, Segawa H, Takeyama Y, Ishiyama H, Houbara T, Uda T, Yamashita S (1994) Zinc hydroxide induced respiratory burst in rat neutrophils. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol* 270:73–78. [https://doi.org/10.1016/0926-6917\(94\)90082-5](https://doi.org/10.1016/0926-6917(94)90082-5)
30. Takeyama Y, Ogino K, Segawa H, Kobayashi H, Uda T, Houbara T (1995) Effects of Zinc on Production of Active Oxygen Species by Rat Neutrophils. *Pharmacol Toxicol* 76:50–55. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1995.tb00102.x>

31. Kelleher P, Pacheco K, Newman LS (2000) Inorganic Dust Pneumonias: The Metal-Related Parenchymal Disorders. *Environ Health Perspect* 108:12
32. Antonini JM, Clarke RW, Krishna Murthy GG, Sreekanthan P, Jenkins N, Eagar TW, Brain JD (1998) Freshly generated stainless steel welding fume induces greater lung inflammation in rats as compared to aged fume. *Toxicol Lett* 98:77–86. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00103-9)
33. Mossman BT, Borm PJ, Castranova V, Costa DL, Donaldson K, Kleeberger SR (2007) Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. *Part Fibre Toxicol* 4:4. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-4>
34. Lindahl M, Leanderson P, Tagesson C Novel aspect on metal fume fever: zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils. 6
35. Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, Janes SM, Bakr OM, Cingolani R, Stellacci F, Pompa PP (2014) A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* 6:7052. <https://doi.org/10.1039/c4nr01234h>
36. Ntziachristos L, Froines JR, Cho AK, Sioutas C (2007) Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Part Fibre Toxicol* 4:5. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-5>
37. Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283:65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
38. Huang Y-W, Wu C, Aronstam RS (2010) Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. *Materials* 3:4842–4859. <https://doi.org/10.3390/ma3104842>
39. Luo L, Li D-Q, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC (2004) Experimental Dry Eye Stimulates Production of Inflammatory Cytokines and MMP-9 and Activates MAPK Signaling Pathways on the Ocular Surface. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 45:4293. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1145>
40. Krabbe J, Beilmann V, Gerhards B, Markert A, Thomas K, Kraus T, Brand P (2019) The Effects of Repeated Exposure to Zinc- and Copper-Containing Welding Fumes on Healthy Volunteers. *J Occup Environ Med* 61:8–15. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001455>
41. Gammoh N, Rink L (2017) Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* 9:624. <https://doi.org/10.3390/nu9060624>
42. Ross DS (1974) Welders' Metal Fume Fever. *Occup Med* 24:125–129. <https://doi.org/10.1093/occmed/24.4.125>
43. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
44. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* 80:75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>

45. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG (2006) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8:532–538. <https://doi.org/10.1038/ncb1403>
46. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 64:5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
47. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
48. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7:33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
49. Kozak W, Conn CA, Kluger MJ (1994) Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 266:R125–R135. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.1.R125>
50. Erdei A, Sármay G, Prechl J (2012) *Immunológia. Medicina, Budapest*
51. Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É (2007) *Az immunológia alapjai*, 1st ed. Semmelweis Kiadó, Budapest

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:Tóth Fruzsina.....

Elérhetőség (e-mail cím):.....

A feltöltendő mű címe: A cink-oxid által indukált immunológiai reakciók kiváltása egér állatmodellben.....

A mű megjelenési adatai:.....2022.....

Az átadott fájlok száma:1 db.....

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2022 . év ...11....hó ...18...nap

Tóth Fruzsina
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

Alulírott dr. Szűcs-Somlyó Éva és dr. Kővágó Csaba

Igazolom, hogy

Tóth Fruzsina (a hallgató neve)

”A cink-oxid által indukált immunológiai reakciók kiváltása egér állatmodellben”
című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.



dr. Szűcs-Somlyó Éva

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék



dr. Kővágó Csaba

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Budapest, 2022. november 18.