

Állatorvostudományi Egyetem

Élelmiszer-higiéniai Tanszék

**Zebradánión kialakított gyulladáshoz vezető modellek alkalmazási lehetőségei toxikológiai
vizsgálatokban**

Szerző: Boda Zsófia, hallgató, Állatorvostudományi Egyetem

Témavezetők:

Ivánovics Bence

tudományos segédmunkatárs

**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Környezettoxikológiai Tanszék**

Dr. habil. dr. LEHEL József CSc/Ph.D.

egyetemi docens/egyetemi magántanár, állatorvos, toxikológus

Állatorvostudományi Egyetem Élelmiszer-higiéniai Tanszék

2022

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
CÉLKITŰZÉSEK	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 IMMUNTOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATOK	6
2.2 INSZEKTICID KARBAMÁTOK	11
2.2.1 Bendiokarb	12
2.3 A ZEBRADÁNIÓ-EMBRIÓ, MINT TOXIKOLÓGIAI MODELL	13
2.3.1 Különböző gyulladáshoz vezető modellek zebradánión	15
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	19
3.1 A ZEBRADÁNIÓ SZÜLŐÁLLOMÁNY FENNTARTÁSI ÉS SZAPORÍTÁSI KÖRÜLMÉNYEI	19
3.2 EMBRIONÁLIS BENDIOKARB-EXPOZÍCIÓ	19
3.3 NEUTROFIL GRANULOCITÁK ELOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ EMBRIÓKON BELÜL	20
3.4 NEUTROFIL GRANULOCITA SEJTEK MENNYISÉGI ANALÍZISE A TELJES EMBRIÓKBÓL	20
3.5 NITRÓGÉN-MONOXID TERMELŐDÉS VIZSGÁLATA	21
3.6 IMMUNKOMPETENCIA-VIZSGÁLAT LOKÁLIS GYULLADÁSOS MODELLBEN	21
3.7 AZ EMBRIONÁLIS BENDIOKARB-EXPOZÍCIÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA LPS-INDUKÁLT GYULLADÁSOS MODELLBEN	22
3.8 STATISZTIKAI FELDOLGOZÁS	22
4. EREDMÉNYEK	23
5. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	29
6. ÖSSZEFOGLALÓ	31
7. ABSTRACT	32
8. IRODALOMJEGYZÉK	33
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	39
NYILATKOZAT	40

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CuSO₄: réz-szulfát

LTB₄: leukotrién B₄

hai1a: hepatocita növekedési faktor aktivátor inhibitor 1a gén

cdipt: cdp-diacilglicerol-inozitol 3-foszfatidiltranszferáz gén

ER: endoplazmatikus retikulum

per os: szájon át

LD₅₀-érték: letális dózis 50% (egy adott anyag azon mennyisége, amely a vizsgált populáció 50%-ánál halált okozott)

PCB: poliklórozott bifenilek

PAH: policiklusos aromás szénhidrogének

hpf: termékenyülést követő órák száma (hours post fertilisation)

3R: replacement (helyettesítés), reduction (csökkentés), refinement (finomhangolás)

RT-qPCR: reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakció (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ZEBRA: Zebrafish Entrapment by Restriction Array

1. BEVEZETÉS

Az immunrendszer alapvető feladata a különböző patogén ágensekkel szembeni védekezés a saját és nem saját struktúrák közötti különbségtétel által [1]. Ennek az érzékenyen szabályozott védelmi rendszernek a megzavarása komoly szintű rövid- és hosszútávú biológiai következményeket vonhat maga után. Az immunrendszer számos esetben egy kiemelt jelentőségű támadáspontot képez a környezetünkben jelen lévő xenobiotikumok számára, széles-körű egészségügyi problémákat eredményezve [2–4]. Különösen nagy jelentőséggel bír az embrionális fejlődés időszakában bekövetkező xenobiotikum-kitettség. A fejlődő embrió immunrendszerének befolyásolása nem csupán akut problémákat eredményezhet, hanem adott esetben későbbi betegségek kialakulását vagy egyes betegségekre való fogékonyság megnövekedését vonhatja maga után [4]. A xenobiotikumok immunotoxikus potenciáljának egyik gyakori elemét, illetve következményét a gyulladással kapcsolatos folyamatok indukálása képezi. Habár a gyulladás egy egészséges szervezetben egy előnyös védekező mechanizmusként szolgál, a folyamat rendellenesé válása számos krónikus betegség kialakulásában játszik szerepet [5–9]. Ezért a környezetünkben jelen lévő xenobiotikumok embrionális immunrendszerre gyakorolt hatásainak feltérképezése kiemelt fontossággal bír.

A fejlődésbiológiában modellállataként megjelenő zebradánió számos előnyös tulajdonsága miatt széles körben elterjedt gerinces modellszervezetévé vált a különböző biológiai kutatásoknak, különös tekintettel a toxikológiai és ökotoxikológiai vizsgálatokra [10–15]. A zebradánió-embriók hematopoézise és veleszületett immunrendszerének működése szintén intenzíven kutatott területté vált. A termékenyülést követő 2. napon az embriók már funkcionális makrofágokkal és neutrofil granulocitákkal rendelkeznek [16–19]. Különböző transzgénikus vonalak létrehozásával és a megfelelő mikroszkópos technológia párosításával ezek az immunsejtek *in vivo* nyomon követhetővé váltak a teljes embriókon és lárvákban belül. A zebradánió veleszületett immunrendszeréről szerzett növekvő háttértudásunk és a fajra adaptálható különböző vizsgálómódszerek párosítása lehetővé teszi olyan modellek kialakítását, amelyek egyrészt képet adhatnak a vizsgálati anyag gyulladást indukáló potenciáljáról. Mindemellett, lokális és szisztémás gyulladás indukálásán keresztül információt kaphatunk arról, hogy milyen kihatással van a vizsgálati anyag az immunrendszernek egyes sejtes és humorális elemeire, illetve, hogy milyen mértékben képes megküzdeni a xenobiotikum-expozíción átesett egyed veleszületett immunrendszere az adott, pl. szöveti sérülés vagy szisztémás gyulladás jelentette kihívással [14, 20, 21].

A diplomadolgozat célja, hogy áttekintést adjon a zebraadánió-embriókon kialakítható legjelentősebb gyulladásos modellekről, kiemelve azok toxikológiai kutatásokban való alkalmazási lehetőségeit, valamint egy karbamát inszekticid, a bendiokarb veleszületett immunrendszere gyakorolt hatásának vizsgálata ezen modelleken keresztül. A többek között malária elleni védekezésben alkalmazott acetilkolin-észteráz gátló bendiokarb nem-célszervezetekre gyakorolt részletesebb biológiai hatásairól – különös tekintettel az embrionális fejlődésre és immunrendszere – viszonylag még kevés információ áll rendelkezésünkre. Egy közelmúltban publikált kutatómunka összefüggésbe hozza az anyai bendiokarb-expozíciót a magzat immunrendszerének károsodásával és a vakcináció hatékonyságának csökkenésével [4]. Mindez jelentős mértékű egészségügyi kockázatokra hívja fel a figyelmet és rávilágít a bendiokarb immunológiai hatásait vizsgáló további, részletesebb kutatások szükségességére.

CÉLKITŰZÉSEK

A diplomadolgozat célja a zebraadánió-embriókon kialakítható legfontosabb gyulladásos modellek bemutatása, illetve egy karbamát inszekticid, a bendiokarb immunológiai hatásainak vizsgálata ezen modelleken keresztül, az alábbiak szerint.

Szubletális, embrionális bendiokarb-expozíciót követően

- a) a neutrofil granulociták embrióon belüli eloszlására és mennyiségére gyakorolt hatások vizsgálata neutrofil granulocita-specifikus transzgenikus zebraadánió vonal segítségével
- b) egy gyulladásos mediátor a nitrogén-monoxid *in vivo* termelődésére és annak eloszlására gyakorolt hatások vizsgálata az embriókon belül
- c) immun- és gyulladás-asszociált markergének kifejeződésére gyakorolt hatások vizsgálata
- d) szöveti sérülésre adott válaszreakcióra gyakorolt hatások vizsgálata farokúszó sebzésén alapuló lokális gyulladásos modellben – neutrofil granulociták vándorlásának monitorozása
- e) szisztémás, LPS kezelés alapú gyulladásra adott válaszreakcióra gyakorolt hatások vizsgálata – neutrofil granulocita sejtszám változásának monitorozása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 IMMUNTOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Az immunrendszer az élő szervezetben található komplex biológiai struktúrákból és folyamatokból álló rendszer, amelynek fő feladata a különböző fertőzések elleni védelem, a saját, illetve nem saját szervezetből származó anyagok megkülönböztetése, valamint a testidegen anyagok és organizmusok elpusztítása révén. A gerinces immunrendszer két, egymással szoros együttműködésben álló részre a veleszületett, és az adaptív immunrendszerre különíthető. A veleszületett immunrendszer nagymértékben konzervált a különböző gerinces fajok között, feladata az azonnali, nem-specifikus védekezés a különböző patogének ellen. Az adaptív immunrendszer a veleszületett immunrendszerrel együttműködve aktiválódik, lassabb, de specifikus immunválasz kialakítására képes, amely klonális szelekción alapuló immunológiai memóriával rendelkezik, ezáltal képes a korábban találkozott patogének ellen hatékonyabb és gyorsabb, specifikus védekezést biztosítani [22]. A környezetünkben fellelhető szennyező anyagok egyre nagyobb problémát okoznak, mind a különböző környezeti elemekre, mind pedig az ember egészségére nézve. Ezek közül számos anyag esetében kimutattak immunotoxikus hatásokat. Immunotoxicitást mutattak ki egyes fémek, mint például az alumínium vagy arzén esetén, illetve immunmoduláns hatást tapasztaltak egyes perfluorozott anyagok és nem utolsósorban egyes peszticidek, köztük a bendiokarb esetében is [4]. Az alumínium csökkentette az immunválasz szabályozásáért felelős interleukin-2 (IL-2) termelődését és csökkentette a makrofágok funkcióját [23]. Az arzén, illetve szerves foszfát peszticidek esetében is kimutattak általános immunszuppresszív hatást, azonban a pontos hatásmechanizmust még nem sikerült kideríteni [24, 25]. A perfluorozott anyagok antigén-specifikus immunválasz csökkentő hatását mutatták ki egerek esetében, illetve a gyulladás-specifikus jelátviteli utak módosulását is megfigyelték [26]. A környezetben található xenobiotikumoknak való embrionális expozíciót összefüggésbe hozták már az asztma kockázatának növekedésével, illetve kimutatták egy xenobiotikum receptor szerepét az emberi gyulladásos bélbetegség kialakulásában is [27, 28]. A környezeti xenobiotikum-expozíció az autoimmun betegségek kialakulásában is fontos szerepet játszhat [29].

Az immunrendszer károsodása jelentős problémákat okozhat a haszonállat tartásban is. A különböző környezeti stresszhatások és idegen anyagok okozta immunkárosodást, így a fertőzésekre, különböző gyulladásos és daganatos betegségekre való fogékonyság

növekedését számos kutatás kimutatta, mind szarvasmarha, mind sertések esetén [30–38]. Szarvasmarha vakcináció hatékonyságának hőstressz, illetve mikotoxinok okozta csökkentését is kimutatták [39, 40]. A haszonállatok egészségének romlása a termelés csökkenéséhez vezethet, ezáltal akár komoly gazdasági károkat eredményezve, valamint az állatok jólléte is jelentősen romolhat [35–38, 41]. Mindez rávilágít az immunotoxikológiai kutatások növekvő fontosságára.

Az immunotoxikológia különböző xenobiotikumoknak immunrendszerre gyakorolt hatásait vizsgálja [42]. Az egyik ide vonatkozó vizsgált paraméter az immunszuppresszió mértéke, amely többek között különböző fertőzésekre való növekvő fogékonyságban és vírus indukálta rosszindulatú elváltozásokban nyilvánulhat meg. Az immunrendszerre gyakorolt hatások következményeként immunstimuláció is megjelenhet, amely többféle következménnyel járhat. Az immunstimuláció legfontosabb és az esetek többségében a legsúlyosabb következménye lehet különféle autoimmun betegségek kialakulása, amikor az immunrendszer saját és nem saját közötti különbségtételének képessége sérül, a szervezet saját sejtjeit is megtámadja. Az immunotoxikológia hatáskörébe tartozik az immunrendszer közvetítette hiperszenzitív reakciók vizsgálata is, amelyeknek oka a szervezet kóros specifikus immunválasza olyan anyagok felé, amelyek normál esetben nem váltanának ki jelentős mértékű immunválaszt [43].

A xenobiotikumok okozta immunotoxicitás egyik további fontos következménye a gyulladással járó folyamatok indukálása. Ennek általános következménye egyrészt a reaktív szabadgyök-képződés, másrészt pedig a gyulladással járó citokinek aktiválódása, illetve egyéb gyulladással járó mediátorok termelődése, amely normális esetben hozzájárul a gyulladás megfelelő lezajlásához, a szöveti integritás helyreállításához, azonban az immunrendszert érő környezeti stressz (pl. xenobiotikum expozíció) közvetlen vagy közvetett eredményeként megjelenő túlzott mértékű gyulladással járó reakció már kóros következményekkel járhat [44].

Az immunotoxikológiai vizsgálatokra számos *in vivo* és *in vitro* módszer áll rendelkezésre, sok esetben a kettő kombinációját alkalmazzák. A legtöbb standardizált immunotoxikológiai vizsgálat az immunszuppresszióra koncentrál. Ilyen módszerek közé tartozik a nyirokszervek, főként a csecsemőmirigy, lép, csontvelő, nyirokcsomók és Peyer plakkok szövettani vizsgálata. Az immunrendszer működésének vizsgálatára alkalmasak az immunfunkciós próbák is, mint például a T-dependens antigén válasz próba, melynek során rágcsálókba juh vörösvértesteket injektálnak, majd 5 nap múlva a rágcsáló leölését követően eltávolított lépben eritrocitákat tartalmazó szuszpenzióba helyezik és vizsgálják a lépben való anti-eritrocita antitestek termelésének mértékét. Gyakrabban alkalmazott

immunfunkciós próbák még a limfociták gyakoriságának számszerűsítése áramlásos citometria segítségével, a természetes ölüsejtek (*Natural Killer, NK sejtek*) aktivitásának és a limfociták proliferációs képességének mérése (az utóbbi *in vitro* is mérhető), késői típusú hiperszenzitivitási reakcióra alapuló próbák, citotoxikus T-sejt aktivitási próbák, citokinek koncentrációjának mérése, illetve makrofágok és neutrofil granulociták funkciójának mérése. Az utóbbi tesztek során főként a neutrofil granulociták kemotaktikus aktivitását, illetve a neutrofilek és makrofágok fagocitotikus aktivitását és az fagocitózis során történő oxidatív „burst” intenzitását vizsgálják. Az immunfunkció vizsgálatára egyes esetekben az teljes gazdaszervezet fertőzésekkel szemben való rezisztenciáját mérik fel [43].

A halakban végzett immunotoxikológiai vizsgálatok során a fent említett mechanizmusok közül jelenleg még csak az immunszuppressziót és immunmodulációt vizsgáló kutatások léteznek. A halaknál használt egyik leggyakoribb immunotoxikológiai módszer az ún. „challenge induced mortality test”, amelynek során az immunrendszert valamilyen kihívás elé állítják. Ezen teszt során a halakat a xenobiotikum szubletális koncentrációival kezelik, és ezt követően (vagy esetenként ko-expozícióban) egy kontroll körülmények között alacsony vagy közepes mortalitással járó akut fertőzést okozó patogént juttatnak a szervezetükbe. A patogénnel és a xenobiotikummal való kezelést külön-külön is végrehajtják. A mortalitás emelkedése az előzetesen xenobiotikum expozícióban átesett csoportokban a patogénnel történő kezelés során a vizsgált anyag immunkompromitáló hatására utal [42].

Az immunmoduláns hatás vizsgálatára a halaknál leggyakrabban vizsgált paraméterek a fagocitotikus aktivitás, az oxidatív „burst” és a lizozim aktivitás, illetve immun-specifikus gének, főként egyes citokinek expressziója. Az utóbbit általában reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakció (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR*) alkalmazásával vizsgálják. A potenciálisan immuntoxikus anyagok vizsgálatára *in vitro* halteszteket is végeznek, főként *in vivo* kísérletekkel kombinációban, de az elvégzett *in vitro* tesztek kis száma miatt még nincsenek standardizált módszerek [42].

Az immunotoxikológiai tesztrendszereknek elengedhetetlen részét képezik a molekuláris biológiai vizsgálatok. Az immunrendszer működésével és a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokkal kapcsolatban álló gének meghatározására többféle módszer áll rendelkezésünkre. Az egyik gyakran alkalmazott vizsgálat a fentebb már említésre került RT-qPCR, amely napjainkban már alapvető részét képezi a legtöbb toxikológia modellrendszernek. Míg a korábbi molekuláris biológiai kutatások korlátozott mértékben voltak képesek az egyes biológiai

folyamatokhoz társuló gének vizsgálatára, a microarray típusú tesztek már lehetővé teszik a részleges, új generációs szekvenálási eljárások pedig a teljes transzkriptóm-szintű elemzéseket. A relatíve magas költségekkel járó szekvenálás alapú transzkriptóm-analízis és az ehhez képest alacsonyabb költségű, amplifikálás alapú RT-qPCR egymást kiegészítve alapot szolgáltatnak az adott vizsgálati anyag komplex hatásvizsgálatához, az érintett biológiai útvonalak, azon belül pedig az immunrendszer érintettségének részletesebb megismeréséhez [45].

Az immunrendszer molekuláris biológiai vizsgálatának egyik kiemelten fontos módszere a többféle gyulladásos jelenség szabályozásáért is felelős szignál-molekulák, például az egyes citokinek analízise. A biológiailag aktív citokinek vizsgálatára a génexpressziós mérések mellett a fehérje-szint mérését szokták alkalmazni, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) segítségével [46]. Ezen mérés során szolid fázishoz kötött antitestek segítségével kivonják a vizsgált citokint az adott anyagból. Ezt követően egy második fajta antitestet adnak hozzá, amely egy különböző antigénre specifikus. Ez az antitest egy olyan enzimmel van párosítva, amely a vizsgált citokint egy kolorimetriás méréssel vizsgálható végtermékké alakítja, így megállapítható az adott citokin mennyisége [46].

Az immuntoxikológiai vizsgálatokban kiemelt jelentőségű a xenobiotikumok fejlődő immunrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálata. Az embrionális fejlődés során az embriót érő stresszhatások komoly következményekkel járhatnak az embrió, majd az újszülött, a későbbiekben pedig a felnőtt egészségre nézve [30, 47–49]. A fejlődés korai szakaszaiban a stresszhatások egészségügyi kockázata jóval magasabb a felnőtt korhoz képest, mivel az embrionális fejlődés során bizonyos időpontokban a magzat kifejezett érzékenységet mutat a környezeti stresszel, pl. különböző kémiai anyagokkal szemben [30, 47–52]. A magzatot ért különböző stresszhatások hosszú távú egészségügyi következményekkel járhatnak, amelyek sok esetben felnőtt kori betegségekből, az azokra való fogékonyság növekedésében is megnyilvánulhatnak [50, 53].

Az embriót érő stresszhatások egyik leghangsúlyosabb következményei közé tartoznak az immunrendszer fejlődését negatívan befolyásoló hatások. A fejlődési immuntoxikológia, amely különböző anyagok és fiziológiai hatások fejlődő immunrendszerre való hatását vizsgálja, egyre nagyobb hangsúlyt kap, mivel sok, egyre sűrűbben megjelenő krónikus betegség hátterében az immunrendszer működésének diszfunkcióját állapították meg. Az immunrendszer az embrionális fejlődés során rengeteg kulcsfontosságú fejlődési lépésen esik át, amelyek szabályos és zavartalan véghezvitele nélkülözhetetlenek a későbbi életben való betegségek elleni védekezésben. Emiatt az embrió immunrendszere kifejezetten

érzékeny a különböző toxinok hatásaival szemben, a negatív hatások az immunrendszer életre szóló rendellenes működéséhez vezethetnek [53].

Az embriót érő stresszhatások következménye jelentősen függ a stresszhatás embrionális fejlődésen belüli idejétől is, a különböző fejlődési szakaszokban jelentkező stresszhatások teljesen eltérő egészségügyi következményekkel járhatnak. Ezek alapján látható, hogy a felnőtt szervezeteknél megállapított toxikus anyagokra vonatkozó biztonsági előírások nem vonatkoztathatók az embrióra, a fejlődő embriók esetén külön immunotoxikológiai kutatásokra és eltérő biztonsági előírások megállapítására van szükség. A fejlődési immunotoxicitás a legtöbb gyermekkori krónikus betegséggel is összefüggésbe hozható [53]. Az embriót érő stresszhatások vizsgálata kiemelten fontos haszonállatok esetén is, például az immunrendszer megfelelő embrionális fejlődésének kifejezett szerepe van a vakcináció megfelelő hatékonyságában szarvasmarhák esetében [54]. A különböző hatásokra való érzékenység embrionális fejlődés során való változásának minél alaposabb megismerése jelentős termékenység, illetve termelékenység növekedést, ezáltal gazdasági hasznot eredményezhet [30]. A fenti okokból látható tehát, hogy az embrionális immunotoxikológiai vizsgálatok kiemelt fontosságúak, mind a gyermekek egészségvédelme, mind pedig a felnőtt-kori krónikus betegségek megelőzése szempontjából, illetve jelentős szerepük van a haszonállattartás hatékonyságának és az állatok jóllétének fejlesztésében is [30, 53, 55].

A fejlődő szervezetet ért immunotoxikus hatás sokféle formában megnyilvánulhat, ilyenek az allergiás reakciók, rendellenes gyulladás, immunszuppresszió és autoimmunitás [53]. Az immunrendszer egészséges fejlődése létfontosságú a saját és nem saját helyes megkülönböztetésének kialakulása szempontjából. Ennek következtében az embrionális korban történő immunotoxikus hatás a patogének elleni védekezőképesség csökkenéséhez, vagy akár a szervezet saját anyagi ellen történő immunválaszhoz, autoimmunitáshoz vezethet. Az immunrendszer közvetlen hatása nehezebben megállapítható, de ugyanolyan fontos következmény a szervek és szövetek működésének sérülése. Mivel az immunrendszer a szervek és szövetek homeosztatisz szabályozásáért is felel, a fejlődő immunrendszert ért toxikus hatás különböző szervi diszfunkciókhoz is vezethet közvetlenül. Immunológiai eredetű allergiás megbetegedésekben és a magzatban jelentkező rendellenes gyulladásban fontos szerepét állapították meg a magzati környezet immundiszruptív hatásának [53].

A fejlődő szervezetet ért környezeti toxikus hatások növelhetik a tumoros megbetegedések, köztük a gyermekkori leukémia kockázatát, illetve különböző fertőző betegségekre való fogékonyságot, mint például az influenza, neonatális sepszis vagy a középfülgyulladás

[53]. Kimutatták tumoros megbetegedésekre való fogékonyság növekedését környezeti toxinok hatására haszonállatokban is, például a saspáfrány növelte a tumorképződésre való hajlamot szarvasmarha esetében [31]. Fejlődési immunotoxikológiai hatásokat hoztak kapcsolatba az atópiás dermatitisz, asztma, rhinitis és egyéb légzőszervi betegségek kialakulásával is. Az immunológiai eredetű autoimmun betegségek több formában nyilvánulhatnak meg. A betegség lehet szisztémás, mint például a szisztémás lupus erythematosus, autoimmun betegség kialakulhat az endokrin szervekben (például pajzsmirigy), az emésztőrendszerben (cöliákia), idegrendszerben (szklerózis multiplex), májban (autoimmun hepatitisz), keringési rendszerben (autoimmun myocarditis) és a hasnyálmirigyben (egyes típusú diabétesz). Számptalan kognitív diszfunkcióval járó betegséget is kapcsolatban hoztak a fejlődési immunotoxikológiai hatásokkal, mint például az autizmus, IQ deficit és skizofrénia. Idősebb korban kialakuló betegségek, mint a Parkinson és az Alzheimer kór, illetve a gyulladássos bélbetegség és az atherosclerosis esetén is megállapították a prenatális kori immunotoxikus hatások szerepét [53].

2.2 INSZEKTICID KARBAMÁTOK

Az inszekticid karbamátok a kolinészteráz-bénítő rovarölő szerek csoportjába tartoznak. Növényvédelmi felhasználásuk már az 1950-es években elkezdődött, azóta sokféle származékát állították elő és használják, mind növényvédelmi szerként, mind pedig a marária ellen való védekezésre a fejlődő országokban [56, 57] Az inszekticid karbamátok akaricid, molluskicid és herbicid hatással is rendelkeznek, rovarölő hatásuk mellett [57].

Az mérgezés leggyakoribb oka az inszekticid karbamát készítmények használata során a használatra vonatkozó utasítások be nem tartása. Permetezés során a megfelelő határérték túllépése vagy a várakozási idő figyelmen kívül hagyása a növényevő állatok mérgezéséhez vezethet, illetve a méhekre is fokozott veszélyt jelent. A takarmány helytelen raktározása is mérgezést okozhat. Fontos mérgezési forrás még mind állatok, mind pedig a fejlődő országokban emberek esetén a rovarirtó szerek nem megfelelő használata. Az inszekticid karbamátok a vízi élővilágra is fokozott veszélyt jelenthetnek a növényvédő szerek használatát követő nagyobb esőzések esetén, illetve, ha a vízi élővilág védelmére vonatkozó előírásokat nem tartják be [57].

A karbamátok toxicitása vegyületenként jelentősen eltér, a per os LD₅₀-érték általában 1-500mg/kg között helyezkedik el. Szájon át való felszívódásuk jó, bőrön át azonban jelentősen rosszabbul szívódnak fel, így a dermális letális dózis az orális dózis sokszorosa.

A mérgezésre a fiatal állatok érzékenyebbek. A méreganyag szervezetben való megoszlása viszonylag egyenletes, az anyag metabolizációja gyorsan megtörténik, kevésbé toxikus bomlástermékek keletkezésével, amelyek a vizelettel és emlősök esetén a tejjel is ürülnek. Kumuláció nem jellemző [57].

Hatásukat az acetilkolin-észteráz enzimmel karbamoilációján keresztül fejtik ki. Az így létrejött karbamoilált enzim működése jelentősen lassabb, mint a normál enzimé, ami acetilkolin felhalmozódáshoz vezet. Az utóbbi anyag felhalmozódása okozza a tüneteket. A karbamoiláció mindig reverzibilis, a mérgezés lefolyása gyors [57].

A mérgezés a gyors ürülés miatt mindig heveny, a klinikai tünetek 5-30 perc múlva jelentkeznek, a bevitt toxikus anyag mennyiségétől és minőségétől függően. A tüneteket három különböző csoportba soroljuk. A muszkarinszerű hatás következtében fokozódik a simaizmok és a mirigyek működése, ami élénk bélmozgások, hasmenés, émelygés, nyálzás és pupillaszűkület, dyspnoe és tüdőödéma képében nyilvánul meg. A központi idegrendszerre kifejtett hatás miatt kezdetekben izgatottság, izomremegés, görcsök jelentkeznek, majd a súlyosabb esetben kóma lép fel. A nikotinszerű hatás a harántcsíkolt izmokban jelentkezik, izomrángások, izomgyengeség, végül bénulás következik be. A halál oka legtöbbször a légzőizmok bénulása okozta fulladásos halál, amelyhez a gyakran fellépő tüdőödéma is hozzájárul. Halált okozhatnak a kialakuló szív működési zavarok (kamrafibrilláció, aritmia) is [57].

2.2.1 Bendiokarb

A bendiokarb az inszekticid karbamátok közé tartozó acetilkolin-észteráz inhibitor. A hatása a legtöbb karbamáttal ellentétben irreverzibilis, a rovarok központi idegrendszerére hat. Noha a bendiokarb forgalmazása az USA-ban és EU-ban már kivezetésre került, számos fejlődő, afrikai és ázsiai ország területén nagy mennyiségben alkalmazzák. Jelenleg főként a malária terjedésének csökkentése céljából, inszekticidként használják, illetve a mezőgazdaságban növényvédő szerként [56, 58]. A bendiokarb neurotoxikus hatását már emlősökben is kimutatták, illetve a karbamátok oxidatív stressz okozó hatása is kimutatásra került. Több mérgezéses eset is előfordult emberek esetében is és megfigyelték, hogy a karbamátokra a gyermekek a felnőtteknél jóval érzékenyebbek [58]. A bendiokarb embriotoxikus hatását is kimutatták már csirkeembrió esetén, illetve teratogén hatást figyeltek meg patkányoknál, egy bizonyos dózis felett [59].

A közelmúltban hatalmas mennyiségű vegyianyag került a természetes környezetünkbe, amely már mostanra rengeteg kárt okozott az élővilágban, a jövőbeli, hosszútávú

következmények pedig még nagyobb veszélyeket rejtenek magunkban. A növényvédő szerek, köztük a karbamátok jelentős környezetkárosító hatása és vízi élővilágra való veszélye egyre nagyobb kockázatot jelent, a bendiokarb vízi élőlényekre való hatását azonban idáig még nem vizsgálták. A bendiokarb kockázatai közül azonban a legjelentősebb az emberi egészségre kifejtett káros hatása. Ezen növényvédőszer egészségügyi hatásait emberekben még alig vizsgálták, viszont már kimutatták a humán embriókban okozott immunrendszer károsító hatását és a vakcináció hatékonyságának negatív befolyásolását [4]. Mindez felhívja a figyelmet a bendiokarb hatásait vizsgáló immuntoxikológiai kutatások kiemelt fontosságára.

2.3 A ZEBRADÁNIÓ-EMBRIÓ, MINT TOXIKOLÓGIAI MODELL

A zebradániók modellállatként való használata az embrionális fejlődés vizsgálatát célzó kutatásokkal kezdődött. Hamar kiderült azonban, hogy a gyors fejlődés, könnyű tenyésztetőség, kis méret, illetve a lárvák és embriók átlátszósága miatt kiváló kutatási modellt biztosítanak a tudomány egyéb területein is [60].

A zebradániók eredeti élőhelyüket tekintve szubtrópusi halak, a laboratóriumi körülményekhez kiválóan adaptálódnak, mivel könnyen létre lehet hozni számukra a természetes életkörülményeikhez hasonló környezetet, 25-28,5 °C között tarthatók [61]. Szaporodásuk reggel, sekély vízben történik, ezen körülményeket könnyen lehet rekonstruálni a laboratóriumban, a megvilágítás és a hőmérséklet változtatásával, illetve a halak sekély vizű medencébe való helyezésével [61].

Mivel a zebradániók szaporodása külső termékenyülés által történik, valamint az embriók/lárvák gyengén pigmentáltak, illetve depigmentálhatók, ezért fejlődésük könnyen megfigyelhető, illetve kísérletileg manipulálható. A zebradánió mindössze 120 óra alatt végigmegy az embrionális fejlődési ciklusán, amelynek lépései mára már rendkívül pontosan dokumentáltak [15, 17]. A zebradánió-embriók gyengén pigmentáltak, illetve mikroszkóp alatt könnyen kezelhetők és manipulálhatók. Számos fluoreszcens jelet kibocsátó transzgenikus vonal érhető el, amelyek nagyban megkönnyítik a különböző biológiai jelenségek *in vivo* vizuális vizsgálatát [16, 17, 19, 62, 63]. Az embriók és lárvák kis mérete lehetővé teszi a relatíve kis térfogatban történő expozíciót, így a vizsgálati anyag költséghatékonyabb tesztelését [60]. Ezen tulajdonságok és módszerek integrálása hatékony módon lehetővé teszi a gyulladáshoz vezető reakciók, abban résztvevő egyes sejtek és gyulladáshoz vezető mediátorok nyomon követését.

A zebradánió modellállatként való alkalmazásának nagy előnye, hogy nagyban hozzájárul a 3R szabály (replacement, reduction, refinement), minél hatékonyabb megvalósításához. Az Európai Unió által meghatározott rendelet alapján a még önállóan nem táplálkozó stádiumban lévő zebradániókon végzett kutatás nem minősül állatkísérletnek [64, 65]. Ennek következtében kiváló alternatívát biztosítanak az állatokon végzett kísérletekkel szemben, megvalósítva ezzel a „replacement”, azaz helyettesítés elvét. A zebradánió-embriókon végzett kutatás a „reduction”, azaz a csökkentés elvét is segíti, hiszen a segítségükkel végrehajtható kutatások csökkentik a magasabb rendű élőlényeken végrehajtandó kísérletek számát. Gyors szaporodásuk és kis helyigényük, illetve könnyű kezelhetőségük hozzájárul a „refinement”, tehát a finomhangolás elvéhez, amely a kísérleti modellek hatékonyságának növelését hangsúlyozza, az állatok szenvedésének minimalizálását előtérbe helyezve.

A zebradánió modellként való használatának másik nagy előnye, hogy sok konzervatív jeggyel rendelkezik, az emlősök és a zebradánió között számos molekuláris sejt és szerv szintű hasonlóság mutatkozik meg. A humán fehérje kódoló gének körülbelül 70%-a rendelkezik legalább egy zebradánió ortológgal [66]. Humán betegségeket is modelleznek zebradániókkal, például több emberi idegrendszeri betegség kutatását is végezték már rajtuk, mivel a zebradánió neuronjainak strukturális elrendeződése nagymértékben hasonlít az emlősökéhez [62]. A gyógyszerek toxicitásának zebradániókon való vizsgálatához már standardizált tesztek is elérhetők, mint például a „*Fish Embryo Acute Toxicity Test*” (FET) [67]. Emellett egyéb, specifikusabb standardizált tesztek is elérhetők, például a hepatotoxicitás vagy kardiotoxicitás vizsgálatára [60].

A zebradánió veleszületett immunrendszerének sejtes, illetve humorális elemei is számos hasonlóságot mutatnak az emlősök vagy akár az ember immunrendszerével [60]. A halak immunsejtjei morfológiailag és funkcionálisan is sok hasonlóságot mutatnak az emlős immunsejtekkel, illetve a halaknál is jellemző humorális, sejt közvetített és veleszületett immunválasz is. Az elsődleges és másodlagos nyirokszövet funkciója is megegyezik a halak és az emlősök között [68]. A zebradánió neutrofil granulocitái a humán neutrofilekhez hasonlóan myeloperoxidázt termelnek, illetve granulumokat tartalmaznak és a magjuk szegmentált [69]. A termékenyülést követő 2. napra az embriók már funkcionális makrofágokkal és neutrofil granulocitákkal rendelkeznek [16–19].

Az zebradánió adaptív immunrendszere a termékenyülést követő 3-6 hét között válik funkcionálisan éretté. Ennek következtében a veleszületett immunrendszer teljesen függetlenül vizsgálható az embrionális és lárvális fejlődés korai szakaszaiban. Az adaptív immunrendszer szintén sok hasonlóságot mutat az emlősökéhez. A T és B sejtek funkciója

nagy mértékben hasonlít az emlősökéhez, illetve thymussal és thymocyttal is rendelkeznek a zebradánió lárvák [60].

A zebradániókon végzett kutatások emlős szervezetre való vonatkoztatása során a halak és az emlősök immunrendszere közötti fő különbségeket is figyelembe kell venni. A halaknál nincs csontvelő, helyette a vérképzés fő szerve a fejvese, Nyirokcsomók, illetve Peyer-plakkjaik sincsenek, viszont vannak nyirokereik, tehát funkcionális nyirokrendszerrel rendelkeznek, illetve az állkapcsos halaknál a nyirokcsomók primitív formáinak megfeleltethető ún. melanomakrofág központok jelennek meg [70].

2.3.1 Különböző gyulladásos modellek zebradánión

A zebradánió embrionális/lárvális fejlődéséről szerzett, viszonylag részletes tudásunk és a fajra adaptált különböző genetikai, molekuláris biológiai, immunológiai és toxikológiai vizsgálómódszerek együttese olyan modellrendszerek kialakítását tették lehetővé, amelyeken keresztül a veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatásokat *in vivo* értékelhetjük. Az embrionális/lárvális gyulladásos zebradánió modellek alkalmazása alapvetően három fő területen hasznosul: a) információt szolgáltatnak a gerinces immunrendszer differenciálódását, sejtes és humorális elemeinek működését és szabályozását vizsgáló kutatások számára; b) kiemelt szerepük van a különböző terápiás célú vegyületek gyulladáscsökkentő hatásainak vizsgálatában c) segítségükkel vizsgálhatjuk a különböző xenobiotikumok immunotoxikus hatásait. Jelen diplomamunka ez utóbbi területre fókuszál. A következőkben a teljesség igénye nélkül bemutatásra kerülnek a legfontosabb ide vonatkozó embrionális/lárvális zebradánió modellek.

Farokúszó sebzésén alapuló modell

Az egyik leggyakrabban alkalmazott lokális gyulladásos modell zebradániók esetén a farokúszó sebzésén alapuló modell. Ennek alkalmazásakor a zebradánió embrió/lárva farokúszójának egy részét egy steril borotvapengével eltávolítják, vagy bemetszést végeznek a farokúszón vagy az úszószegélyen egy steril szikepenge vagy tű segítségével, sztereomikroszkóp alatt [60]. Embriók és lárvák esetén egyes kutatásoknál, erősebb gyulladásos válasz kiváltása érdekében a notochord (az embrió kezdetleges gerincoszlopa, amely még nincs különálló csigolyákra osztva [71]) disztális része is eltávolításra kerülhet. Ezt követően valós időben vizsgálhatók az akut gyulladásos paraméterek, általában több előre meghatározott időpontban [60]. A leggyakrabban vizsgált paraméter a makrofágok és neutrofil granulociták felhalmozódása a sérült régió környékén. Ennek megfigyelése

vizuálisan is lehetséges fluoreszcens mikroszkóp segítségével, mivel már több transzgenikus zebradánió vonalat létrehoztak, amelyeknek leukocitái fluoreszcens fehérjéket expresszálnak. Ilyenek például GFP és mCherry fluoreszcens proteinek, amelyek bizonyos transzgenikus vonalakban a neutrofil granulocitákra specifikus fehérjékkel együtt expresszálódnak, mint például a lizozim és myeloperoxidáz [20].

A farokúszó sebzésén alapuló módszert általában a gyulladással kapcsolatos válasz alapvető lépéseinek vizsgálatára használják, mint az egyes immunsejtek közötti interakciók, kommunikációs csatornák, illetve ezen sejtek migrációja. Emellett elterjedté vált ez a modell a preklinikai gyógyszeresztelésben is, különböző vegyületek anti-inflammatorikus hatásainak vizsgálatához. Sok korábban ismeretlen, vagy ez idáig nem gyulladáscsökkentő szerként ismert gyógyszer-összetevők gyulladást csökkentő hatását is sikerült kimutatni a farokúszó sebzéses modell segítségével, ami új gyulladáscsökkentő hatású szerek felfedezéséhez vezetett [60]. Ezen szerek tesztelése során többek között azt vizsgálták, hogy a neutrofil granulociták szöveti sérülés területére történő migrációját képes-e az adott anyag szignifikánsan csökkenteni [72].

Fontos megjegyezni azonban, hogy a zebradánió embrió és lárva farokúszója nem vaszkularizált, így a sebzés helye köré gyűlő fehérvérsejtek nagy része nem közvetlenül az érpályából lép ki, hanem a környező szövetekből származik. A granulociták miután belépnek az érpályákba elvándorolnak (*crawling*) a kilépés helyéig, ahol kilépnek az érpályából és migrációjuk a szövetközi térben folytatódik a sebzés területéhez. A gyulladás folyamata során egy részük apoptózison megy keresztül, más részük pedig visszavándorol (*reverse migration*) [60].

A farokúszó sebzésén kívül a test egyéb területein, különböző módszerekkel ejtett sebzéseket is alkalmaznak a gyulladás vizsgálatát célzó tudományos kutatások esetén. Erre példa a lézeres besugárással ejtett sérülés [60]. Ezen sebzés tipikus területei a kaudális hematopoetikus szövet (CHT) [73], a szikzacskó [74], az izomszelvények [76], valamint az epidermisz [77].

Különböző vegyületek által kiváltott gyulladás

Lipopoliszacharid-indukált gyulladás

Egyes kísérleti modellek különböző vegyületek által alakítanak ki szisztémás vagy lokális gyulladással kapcsolatos reakciókat. Ilyen modell a lipopoliszacharid-indukált gyulladás.

A lipopoliszacharid (LPS) a gram-negatív baktériumok sejtfalában található endotoxin, amely a veleszületett immunrendszer aktivációját váltja ki [78]. Az LPS-indukált gyulladás kiváltása rendszerint az embriók LPS-t tartalmazó folyadékba való helyezésével, non-invazív módon, vagy a lipopoliszacharid szikzacskóba való mikroinjektálásával történik [60]. Habár a zebradániók immunrendszere esetén az LPS felismerése kevésbé hatékony az emlősökhöz képest [79], a megjelenő immunválasz hasonló az emlősökhöz. Az LPS stimuláció esetén aktiválódó jelátviteli utak és transzkripciós faktorok nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emlősök és a zebradánió között [80]. LPS-előkezelés hatására a zebradániókban bizonyos mértékű tolerancia is kialakítható, az emlősökhöz hasonlóan [21, 81].

Az LPS-indukált gyulladást zebradániók esetén gyulladáscsökkentő gyógyszerekkel kapcsolatos kutatásban is alkalmazzák, illetve ezen módszer segítségével sikerült kimutatni több, hagyományos gyógyászatban használt természetes anyag gyulladásgátló hatását is [82–84]. Az LPS-indukált gyulladás esetén a tudományos kutatások több paramétert is figyelembe vesznek, a kutatás jellegétől függően. Ilyen a neutrofil granulociták migrációja az LPS injektálás helyére, a szabadgyök (ROS) és nitrogén-monoxid felszabadulás, illetve a mortalitás [60]. LPS kezelést egyes kutatásokban farokúszó sebzéssel kombinációban is alkalmaztak, a seb körüli leukocita akkumuláció serkentésére [85, 86].

Réz-indukált gyulladás

A réz egy létfontosságú nyomelem a szervezet működéséhez. Sokféle, az antioxidánsok metabolizmusában és energia előállításban résztvevő enzim katalitikus kofaktora [60]. Túlzott mennyiségű anorganikus réz-expozíció azonban oxidatív stresszhez, ezáltal gyulladáshoz vezet zebradániók esetén [87]. Felnőtt zebradániók esetén kimutatásra került a vízben oldott réz által kiváltott oxidatív stressz és ebből következő apoptózis a kopoltyúknál, illetve a rézzel való kezelés során az anyag dóziszfüggő letalitását is sikerült kimutatni zebradániókon [88, 89].

Zebradánió embriók/lárvák réz-szulfát (CuSO_4) kezelése esetén többféle szervezetre gyakorolt hatást is kimutattak. Embriók esetén a CuSO_4 gátolta a fejlődést és csökkentette a túlélést [90, 91], illetve az oldalvonalban található neuromastok sérülését okozva jelentős mértékű lokális gyulladást vált ki, amely makrofágok és neutrofil granulociták infiltrációjával jár [92]. Ennek következtében a neutrofilek neuromastban történő akkumulációja az egyik leggyakrabban használt indikátor a réz-indukált gyulladáshoz

modellek esetén. Ezt a módszert már sikeresen alkalmazták gyulladáscsökkentő gyógyszerek hatásának vizsgálatára [92].

A réz-indukált gyulladási modell könnyen automatizálható, mivel a gyulladás indukálásához elegendő csupán a CuSO₄ embrió médiumhoz való hozzáadása. Ezt követően a neuromastokban való leukocita-kumulációt vizsgálják fluoreszcens neutrofilekkel és neuromastokkal rendelkező transzgenikus zebradánió-vonalak segítségével [92, 93]. A fenti módszerrel több természetes anyagnak, illetve klinikailag engedélyezett gyógyszernek sikerült kimutatni a gyulladáscsökkentő hatását [60].

Leukotrién B₄ indukált gyulladás

A leukotrién B₄ (LTB₄) egy leukociták által termelt gyulladáskeltő hatású jelátvivő molekula, amely fokozza a gyulladás helyén történő leukocita-akkumulációt [94]. Zebradániók esetén kimutatták, hogy az LTB₄ mind a neutrofil granulocitákra, mind pedig a makrofágokra nézve attraktáns hatással rendelkezik [94, 95]. Az LTB₄ indukált gyulladási modell segítségével történt a *Zebrafish Entrapment by Restriction Array (ZEBRA)* nevű eszköz kifejlesztése, amelynek segítségével a zebradánió-lárvák és -embriók előre meghatározott módon, gyorsan pozícionálhatók, ezzel növelve az automatizált képalkotás hatékonyságát. Az eszköz felépítése lehetővé teszi a zebradániók automatizált adagolását, expozícióját és fényképezését, illetve használható más típusú gyulladási modellek bevonására, például farokúszó sebzésen alapuló vizsgálatra is [96].

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A ZEBRADÁNIÓ SZÜLŐÁLLOMÁNY FENNTARTÁSI ÉS SZAPORÍTÁSI KÖRÜLMÉNYEI

A kísérleteinkhez felhasznált embriók szülőgenerációjának felnevelése a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Szent István Campusán, az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet recirkulációs rendszerű zebraadánió laboratóriumában történt. A víz hőmérséklete a rendszerben $25\pm 0,5$ °C, a medencékből elfolyó vizet a rendszer folyamatosan szűri, valamint ellenőrzi és állandó szinten tartja annak paramétereit. Az ellenőrzött paraméterek közé tartozik a hőmérséklet, a vezetőképesség és a pH. A laboratóriumban napi 14 óra megvilágítási és 10 óra sötét periódust alakítottak ki, automatikus, mesterséges fényvel történő szabályozás segítségével. A halak etetése zebraadániók számára kialakított, granulált haltáppal (*Special Diets Services, UK*), illetve sórákkal (*Artemia salina*) történt. A szaporításhoz AB vonalú zebraadániókat használtunk. A szaporítás speciálisan erre a célra kialakított, elhúzható válaszfallal rendelkező, 1 literes műanyag medencékben zajlott. Az edényekben egy kiemelhető teljesen különálló, rácsos aljú belső rész található, amely megkönnyíti az ikrák begyűjtését, illetve megakadályozza, hogy a halak elfogyasszák azokat. Az ívást követően az ikrákat rendszervízzel félig megtöltött 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe osztottuk szét. Ezt követően a termékenyült, normális osztódást mutató embriók sztereomikroszkóp alatt kiválogatásra kerültek.

3.2 EMBRIONÁLIS BENDIOKARB-EXPOZÍCIÓ

Az embrionális bendiokarb-expozíció során alkalmazott kezelési és kontroll oldatokhoz mechanikai és szén szűréssel szűrt, UV által sterilizált rendszervizet használtunk fel, amelynek hőmérséklete $25,5\pm 0,5$ °C, pH-ja $7,0\pm 0,2$, vezetőképessége pedig 550 ± 50 μ S volt. Az embriókat 10 cm átmérőjű műanyag Petri csészékben inkubáltuk. Egy darab, 10 cm átmérőjű Petri csészében 20-30 embriót helyeztünk el a kezelések során, 40-50 ml végtérfogatban. Szubletális, LC10 alatti bendiokarb koncentrációkat alkalmaztunk, amelyeket egy korábbi, nemzetközi folyóiratban publikált munka alapján választottunk ki [97]. A kezelések során alkalmazott bendiokarb koncentrációk 0,07, 0,4, 0,75, 1,5 és 3 mg/l voltak. Oldószerként DMSO-t alkalmaztunk, amelynek végső koncentrációja nem haladta meg a 0,01 v/v %-ot. A kezelési és kontroll oldatokat naponta cseréltük. Az embrionális

bendiokarb-expozíció a termékenyülést követő ~3. órától a 96. óráig (hpf, hours post fertilisation) tartott.

3.3 NEUTROFIL GRANULOCITÁK ELOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ EMBRIÓKON BELÜL

Annak érdekében, hogy *in vivo* megfigyelhessük a bendiokarb-expozíció neutrofil granulocitákra gyakorolt hatását, egy neutrofil granulocita-specifikus, transzgenikus zebradánió reporter vonalat (Tg(mpx:EGFP)) alkalmaztunk. A kezelést követően az embriókról altatásban (trikain-metánszulfonát, MS-222, 168 mg/l) fluoreszcens mikroszkóp alatt oldalnézeti, valamint felülnézeti fényképeket készítettünk (Leica M205 FA, Leica DFC 7000 T camera, Leica Application Suite X szoftver). A fényképek alapján kiértékeljük a neutrofil granulociták eloszlásában bekövetkező változásokat. Mivel egy jelentős felhalmozódás mutatkozott meg az oldalvonal szerv mentén, ezért annak régiójában ImageJ szoftver segítségével a sejtszámot összesítettük (N = 2 x 16/csoport).

3.4 NEUTROFIL GRANULOCITA SEJTEK MENNYISÉGI ANALÍZISE A TELJES EMBRIÓKBÓL

A bendiokarb neutrofil granulocita sejtszámra gyakorolt hatását áramlási citometriával, azon belül pedig fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (FACS) módszerével vizsgáltuk, Tg(mpx:EGFP) transzgenikus zebradánió reporter vonal segítségével. A FACS elvégzésére a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében került sor. A bendiokarb-expozíció végén az embriókat mikrocentrifuga-csövekbe (30 embrió/cső) helyeztük, amelyeket jéggel lehűtött vízbe állítottunk az egyedek túlaltatása érdekében. Ezt követően a lárvákat Ringer-oldatban átöblítettük, majd pedig 0.25 százalékos Tripszin-EDTA segítségével emésztettük. Az emésztést magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS) és kalcium-klorid hozzáadásával állítottuk le. A mintákat centrifugálást követően (400 g; 5 perc) 5 százalékos FBS/PBS oldatban újra szuszpendáltuk és 40 µm pórusméretű sejtszűrő kosarakkal átszűrtük. Az egyes mintákban az EGFP⁺ sejtek gyakoriságát 10⁵ sejtre vonatkozóan NovoCyte Flow Cytometer készülékkel határoztuk meg. A kísérletet 4 ismétlésben végeztük (N = 4 x 30/csoport).

3.5 NITROGÉN-MONOXID TERMELŐDÉS VIZSGÁLATA

A nitrogén-monoxidnak, mint fontos gyulladáshoz vezető mediátornak az embriókon belüli termelődését fluoreszcens jelet szolgáltató diaminofluoreszcein-FM-diacetát (DAF-FM-DA) próba segítségével határoztuk meg. A bendiokarb-kezelés végén az embriókat 96 lyukú, lyukanként 200 µl, 5 µM DAF-FM-DA oldatot tartalmazó sejtenyésző lemezekbe helyeztük individuálisan, majd pedig 25,5 °C-on, sötétben, 1 órán keresztül inkubáltuk azokat. Ezután az embriókat rendszervízben átöblítettük, majd altatásban oldalnézeti fényképeket készítettünk GPF szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A fényképek alapján ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk az oldalon-szerv területére korlátozódó fluoreszcencia intenzitás értékeit, amely arányos a nitrogén-monoxid termelődés mértékével.

3.6 IMMUNKOMPETENCIA-VIZSGÁLAT LOKÁLIS GYULLADÁSOS MODELLBEN

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az embrionális bendiokarb-kezelés hogyan befolyásol egy indukált lokális gyulladáshoz vezető válaszreakciót. Mindezt a regenerációra képes farokúszó steril sebzése által vizsgáltuk. A farokúszó sebzését Tg(mpx:EGFP) transzgenikus zebradánió vonalon végeztük, amely segítségével valós időben nyomon követhettük a neutrofil granulociták sebzés területére történő vándorlását. A bendiokarb-kezelés végén az embriókat altató folyadékba helyeztük (MS-222, 168 mg /l), majd mikroszkóp alatt steril borotvapengével a farokúszó-véget a lárva tengelyére merőlegesen, a gerinchúr vége és a farkúszó legtávolabbi pontja közötti szakasz középső régiójában, egyenes vonalú vágással eltávolítottuk. Ezután az embriók individuálisan, friss rendszervíz tartalmazó 24 lyukú sejtenyésző lemezekbe kerültek. A sebzést követően viszonylag rövid időn belül megkezdődik a granulociták sebzés területére történő vándorlása. A sebzést követő 4. órában az embriók farokúszó-régiójáról altatásban oldalnézeti fényképeket készítettünk GPF szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A sebzés területére vándorolt neutrofil granulociták mennyiségét (EGFP-pozitív sejtek száma) a fényképek alapján manuális sejtszámolással összesítettük.

3.7 AZ EMBRIONÁLIS BENDIOKARB-EXPOZÍCIÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA LPS-INDUKÁLT GYULLADÁSOS MODELLBEN

A bendiokarb kezelés immunmoduláns hatásának további vizsgálatához a kezelést követően az embriókat *Pseudomonas aeruginosa* eredetű, szubletális lipopoliszacharid (LPS, 100 ug/ml) expozíciónak tettük ki. Ehhez a vizsgálatához az alkalmazott bendiokarb koncentráció sorozatból egy viszonylag alacsonyabb (0.4 mg/l) és egy viszonylag magasabb (1.5 mg/l) értéket választottunk ki. Az LPS kezelés a bendiokarb expozíciót követően, 96 és 120 hpf között zajlott, ekkor a bendiokarb már nem volt jelen a kezelési oldatokban. Az LPS kezelés végén, 120 hpf-nél altatásban oldalnézeti fényképeket készítettünk az embriókról GFP szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. Ezt követően ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk a teljes embriókon belül a neutrofil granulocita sejtszámot (EGFP-pozitív sejtek száma).

3.8 STATISZTIKAI FELDOLGOZÁS

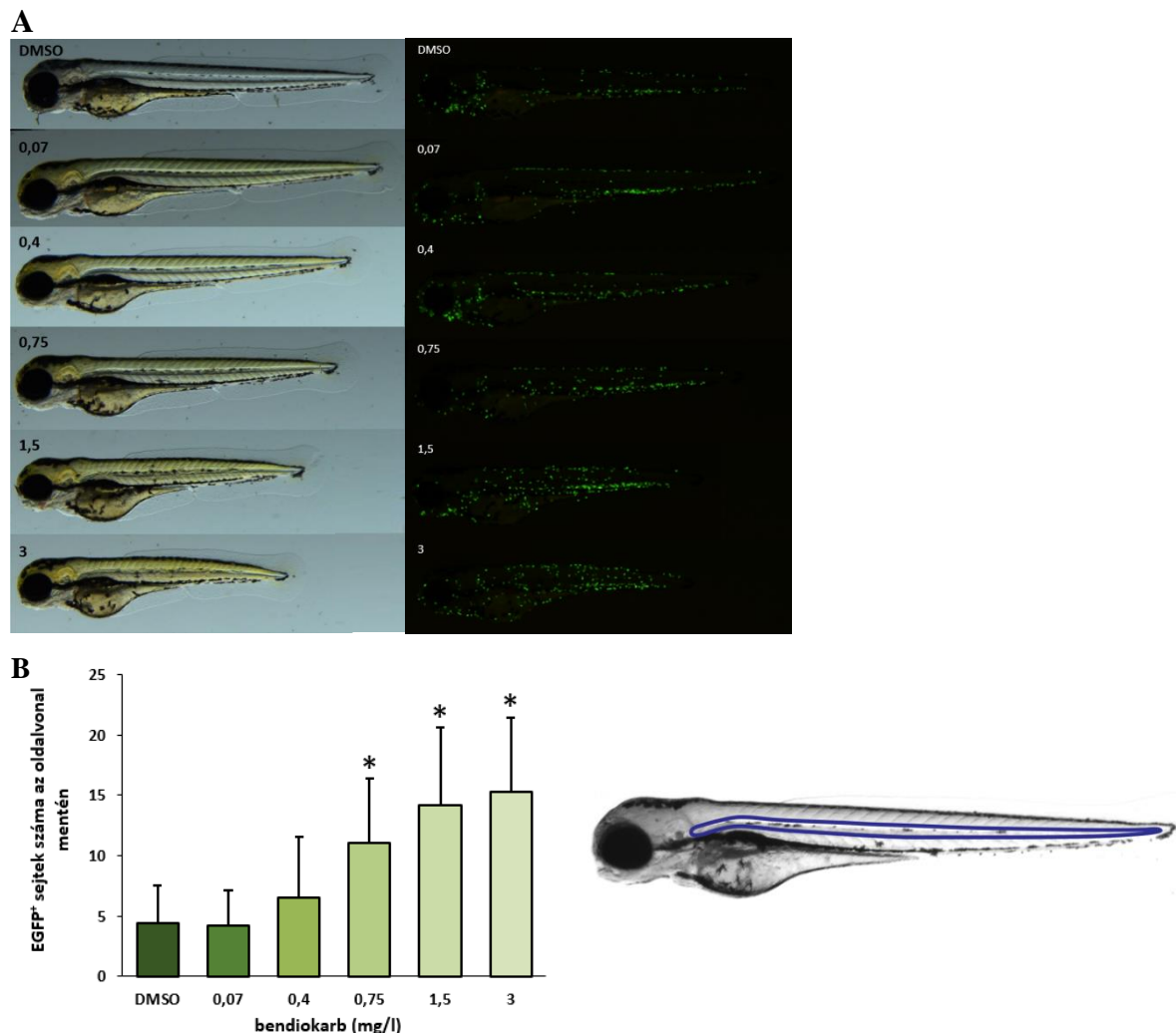
Az eredményeket elsőként Shapiro-Wilk teszt által normalitás-vizsgálatnak vetettük alá. A statisztikai különbségeket egyszempontos paraméteres ANOVA-val és Dunnett-féle post hoc teszttel, vagy egyszempontos nem-paraméteres ANOVA-val (Kruskal-Wallis teszt) és Dunn-féle post hoc teszttel értékeltük. Az eredményeket átlag \pm szórás formában prezentáltuk. Statisztikailag igazoltan szignifikáns különbség $p < 0,05$ esetén lett megállapítva.

4. EREDMÉNYEK

Embrionális bendiokarb-expozíció hatása a neutrofil granulociták eloszlására és teljes embrión belüli mennyiségére

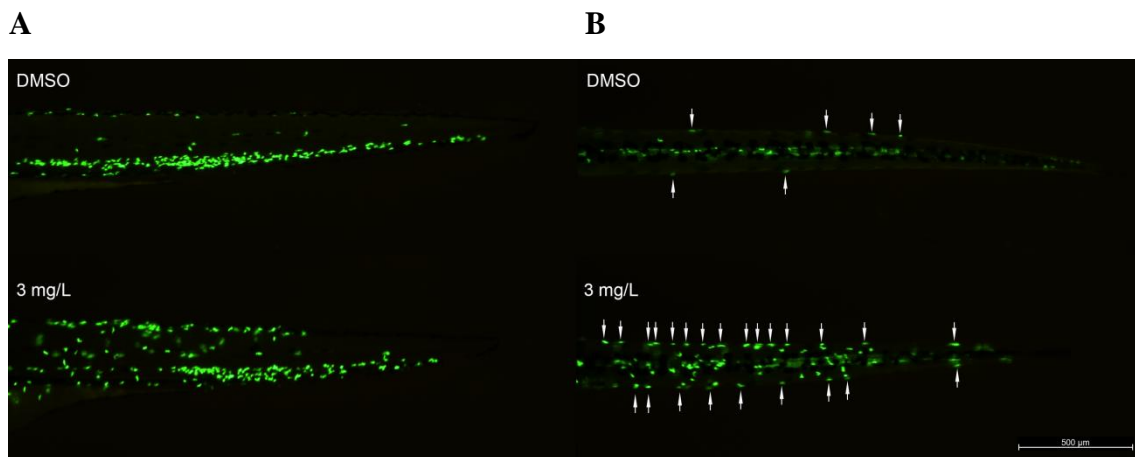
A bendiokarb kezelés hatására a neutrofil granulociták eloszlásában jelentős különbségek mutatkoztak meg. A kezelési koncentrációk növekedésével a sejtek egyre nagyobb mértékű, diffúz jellegű szóródást mutattak (1. ábra).

Különösen szembeütő volt a granulociták embriók középvonala mentén történő felhalmozódása. Ennek számszerűsítése során nagymértékű, statisztikailag igazoltan szignifikáns, koncentráció-függő növekedés mutatkozott meg a neutrofil granulocita sejtszámban az oldalsó vonal mentén (1. ábra).



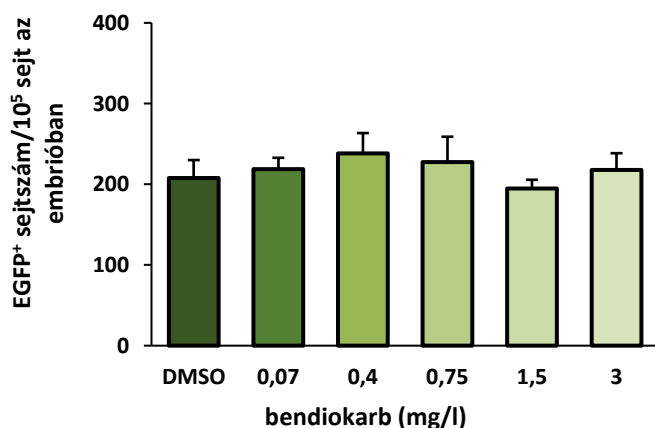
1. Ábra. A szubletális, embrionális bendiokarb-expozíció hatása a neutrofil granulociták eloszlására 96 óras zebradánió embriókban. **A)** Oldalnézeti, natív és fluoreszcens fényképek a *Tg(mpx:EGFP)* embriókról bendiokarb-expozíciót követően. **B)** Az EGFP-pozitív sejtek száma az embriók oldalsó vonala mentén. A kék vonal a mérési területet jelöli az embrión. A diagram átlagot és szórást jelöl (N= 2 x 16). *: statisztikailag igazolt különbség a kontroll csoporthoz (DMSO) képest. $p < 0,05$

Annak érdekében, hogy az oldalvonal-szerv tényleges érintettségét jobban megfigyelhessük, felülnézeti fényképeket is készítettünk az embriókról. A felülnézeti fényképek alapján láthatóvá vált, hogy az oldalnézetben megfigyelt, középvonalhoz vándorolt neutrofil granulociták az embriók kültakarójánál halmozódtak fel (2. ábra).



2. Ábra. A szubletális, embrionális bendiokarb-expozíció hatása a neutrofil granulociták eloszlására a 96 órás zebradánió embriókban. Oldalnézeti (A) és felülnézeti (B) fényképek a *Tg(mpx:EGFP)* embriók törzs-farok régiójáról. A fehér nyilak a felülnézeti képeken az embriók kültakarójához vándorolt sejteket jelölik az oldalvonal mentén.

Mindemellett azonban a teljes embriókból FACS által meghatározott neutrofil granulocita sejtszám (pontosabban azok gyakorisága) nem mutatott szignifikáns különbségeket az egyes csoportok között (3. ábra).

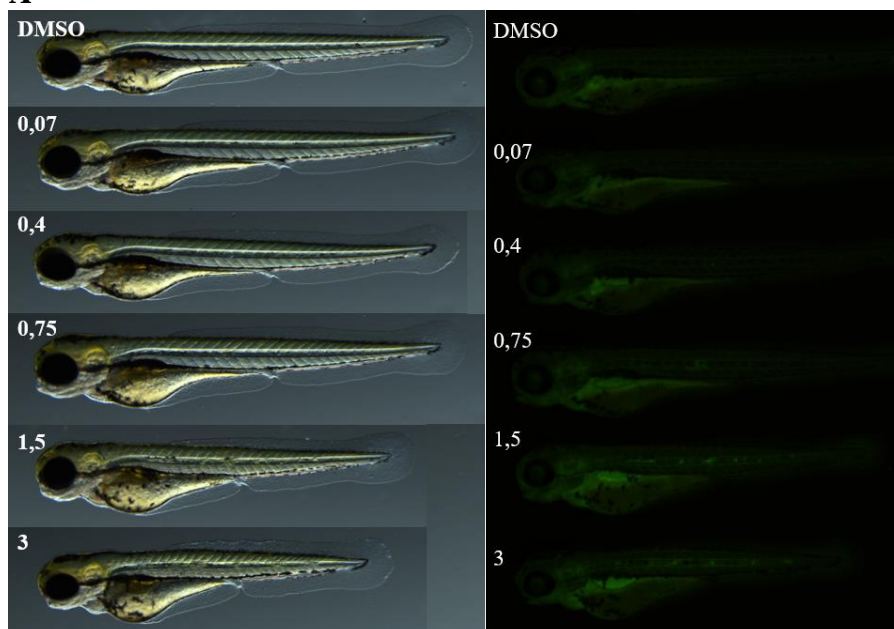


3. Ábra. A szubletális, embrionális bendiokarb-expozíció hatása a neutrofil granulociták teljes zebradánió embrióon belüli mennyiségére. A FACS analízis által meghatározott EGFP-pozitív sejtek gyakorisága. A diagram átlagot és szórást jelöl (N= 4 x 30). $p < 0,05$

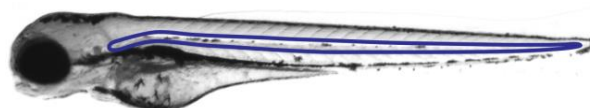
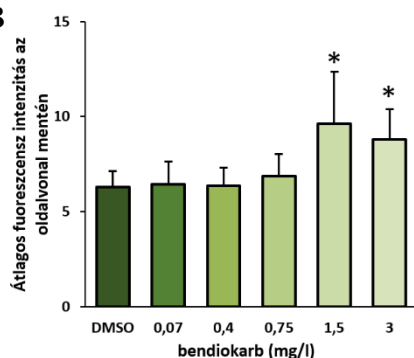
Embriónális bendiokarb-expozíció hatása a nitrogén-monoxid termelődésére és annak eloszlására az embriókban

A nitrogén-monoxidnak, mint gyulladáshoz vezető mediátornak az *in vivo* vizsgálatok során jól lokalizálható, az embriók oldalsó vonala mentén foltokban megjelenő fluoreszcencia „gócponthoz” figyeltünk meg (4. ábra). Ennek számszerűsítése érdekében meghatároztuk az oldalsó vonal területére korlátozott fluoreszcencia intenzitást, amely az 1,5 és 3 mg/l bendiokarb kezeléshez tartozó csoportokban statisztikailag igazolhatóan szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz képest (DMSO) (5. ábra). Mindemellett, enyhe mértékű nitrogén-monoxid termelődés-növekedést figyeltünk meg a fluoreszcencia képek alapján a szik-bélrendszer területén, a magasabb koncentrációkhoz tartozó kezelési csoportokban.

A



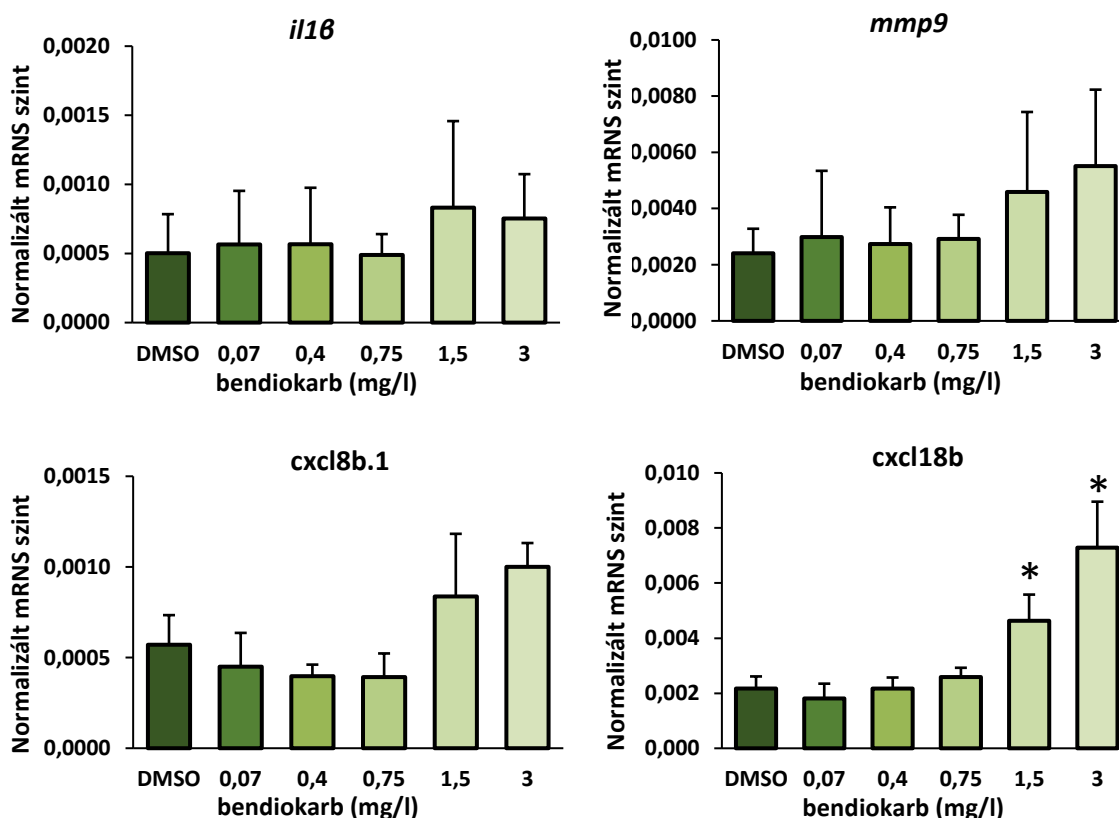
B



4. Ábra. A szubletális, embriónális bendiokarb-expozíció hatása a nitrogén-monoxid termelődésére és annak eloszlására a 96 órás zebradánió embriókban. A) Oldalnézeti fényképek a fluoreszcencia próba (DAF-FM-DA) által *in vivo* jelölt embriókról, bendiokarb kezelést követően. A fluoreszcencia intenzitása arányos a nitrogén-monoxid termelődésével. B) Fluoreszcencia intenzitás az embriók oldalsó vonala mentén. A diagram átlagot és szórásjelölést (N = 2 x 10). A kék vonal a mérési területet jelöli az embrióban. *: statisztikailag igazolt különbség a kontroll csoporthoz (DMSO) képest. $p < 0,05$

Embrionális bendiokarb-kezelés hatása a gyulladás és immun-specifikus markergének kifejeződésére

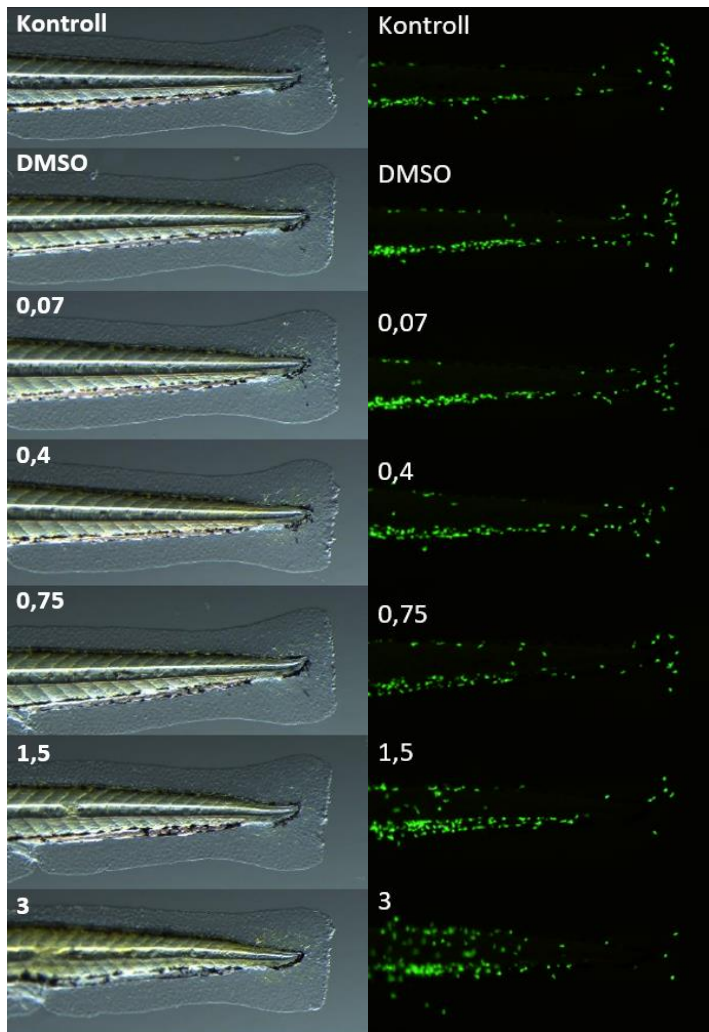
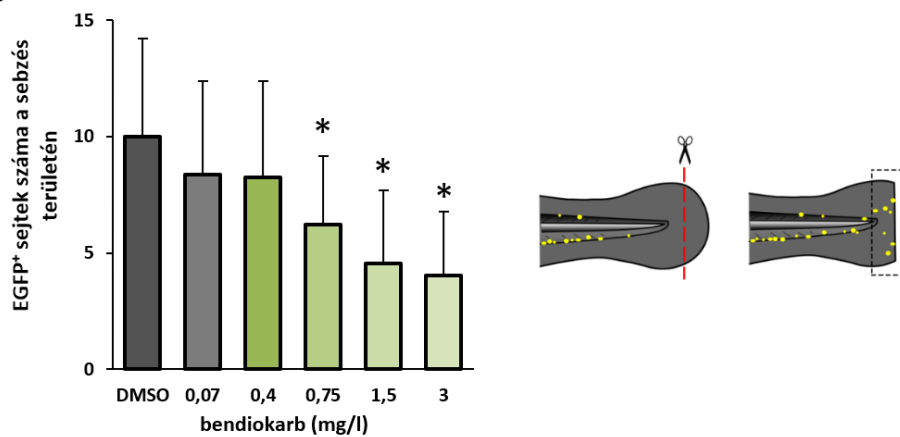
Összhangban a neutrofil granulocita eloszlás és nitrogén-monoxid termelődés esetén tapasztalt eredményekkel, a bendiokarb kezelés a magasabb alkalmazott koncentrációkhoz (1,5 és 3 mg/l) tartozó csoportoknál a vizsgált immun- és gyulladás specifikus markergének emelkedett expresszióját eredményezte. A neutrofil granulocita attraktáns faktorokat kódoló gének (cxcl18, cxc8) kifejeződését tekintve viszonylag erőteljesebb indukciót detektáltunk (6. ábra).



6. Ábra. A szubletális, embrionális bendiokarb-kezelés hatása a gyulladás és immun-specifikus markergének kifejeződésére. (N= 4 x 12). *: statisztikailag igazolt különbség a kontroll csoporthoz (DMSO) képest. $p < 0,05$

Embrionális bendiokarb-expozíció hatása az indukált lokális sebzésre adott válaszreakcióra

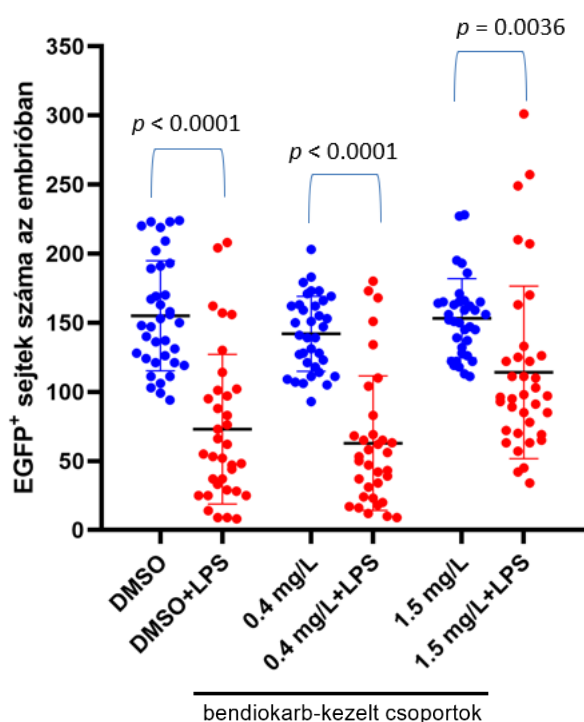
Az zebra-dánió farokúszójának steril sebzésén alapuló lokális gyulladásos modellben jelentős különbség mutatkozott meg a kontroll és kezelési csoportok között. A bendiokarb kezelésen átesett embrióknál koncentráció-függő mértékben csökkent a sebzés területére vándorolt neutrofil granulociták mennyisége (7. ábra). A csökkenő tendencia már az alacsonyabb koncentrációknál megmutatkozott (7. ábra).

A**B**

7. Ábra. A szubletális, embrionális bupropion-expozíció hatása a neutrofil granulociták eloszlására és mennyiségére indukált lokális sebzésre adott válaszreakció esetén 96 órás zebradánió embriókban. **A)** Oldalnézeti, natív és fluoreszcens fényképek a *Tg(mpx:EGFP)* embriók farokúszójáról bupropion-expozíció utáni lokális sebzést követően. A számok az alkalmazott bupropion koncentrációt fejezik ki mg/L-ben. **B)** Az EGFP-pozitív sejtek száma a sebzés területén. A diagram átlagot és szórást jelöl (N = 2 x 10). *: statisztikailag igazolt különbség a kontroll csoporthoz (DMSO) képest. $p < 0,05$

Embrionális bendiokarb-expozíció hatása az LPS-indukált szisztémás gyulladásra

A *P. aeruginosa* eredetű LPS által indukált 24 órás gyulladással szemben kontroll körülmények között 100 µg/ml LPS alkalmazott koncentráció mellett a zebradánió-embriók még nem mutatnak ugyan pusztulást, azonban a kezelés végére jelentősen csökken a (funkcionális), mieloperoxidáz-pozitív granulociták mennyisége a teljes embriókban. Érdekes módon a korábban bendiokarb kezeléssel átesett embriók esetén, a magasabb 1,5 mg/l-es bendiokarb koncentrációhoz tartozó csoportban szignifikánsan kevesebb neutrofil granulocita pusztult el az LPS hatására, mint a kontroll, illetve az alacsonyabb 0,4 mg/l koncentráció esetén (8. ábra).



8. Ábra. Az embrionális bendiokarb-expozíció hatása az LPS-indukált szisztémás gyulladásra 96 órás zebradánió embriókban. Az EGFP-pozitív sejtek száma a teljes embrióban különböző bendiokarb koncentrációk esetén. A pontdiagram átlagot és szórást jelöl (N= 3 x 12). Az egyes pontok a diagramon az individuális méréseket jelölik.

5. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk végzett kutatás során a szubletális, embrionális bendiokarb-expozíció immunrendszerre gyakorolt hatásait vizsgáltuk különböző embrionális gyulladási modellek segítségével zebradánióban, amelynek során számottevő eltéréseket tapasztaltunk. A veleszületett immunrendszer sejtjeit tekintve első sorban a neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásokra fókuszáltunk. Vizsgálataink során megmutatkozott a neutrofil granulociták diffúz szóródása a teljes embriókon belül a kezelt csoportokban, amelyek mellett szignifikáns, koncentráció-függő, növekvő mértékű felhalmozódást mutattak az embriók oldalvonal mentén. Mindez a nitrogén-monoxid, mint gyulladási mediátor oldalvonal mentén történő fokozott termelődésével, valamint az immun és gyulladás asszociált markergének, köztük a neutrofil-granulocita kemoattraktáns faktorokat kódoló gének kifejeződésének koncentráció-függő indukálásával társult. A tapasztaltak alapján feltételezhető, hogy a megfigyelt gyulladási kép mögött részben az oldalvonal mentén sorakozó érzékelő szőrszálakból álló neuromast központok bendiokarb általi károsodása húzódhat. Nanoanyagok toxicitásának zebradánióon történő vizsgálata során szintén megmutatkozott az oldalvonal érzékelő neuromast központjainak károsodása, amely szintén együtt járt egyes gyulladási asszociált gének intenzívebb kifejeződésével és a neutrofil granulociták megváltozott eloszlásával [98]. A bendiokarb oldalvonal-szervet károsító hatásának részletesebb felderítéséhez azonban további, sejt szintű vizsgálatok szükségesek.

Jelentős eltéréseket tapasztaltunk továbbá a szöveti sérülés által indukált lokális gyulladási modellben is. A kezelési csoportokban a neutrofil granulociták eltérő mértékű választ adtak a lokális gyulladásra, amely a sebészeti területén történő koncentráció-függő, csökkent felhalmozódásban nyilvánult meg. Mindezzel együtt a teljes embriókon belül nem mutattunk ki számottevő különbséget a granulociták mennyiségét tekintve a kontroll és kezelési csoportok között. Elmondható tehát, hogy a granulocita migrációban bekövetkező különbségek mögött nem a teljes (mozgósítható) granulocita sejtszám csökkenése állt. Mindez a bendiokarb jelentős mértékű immunmoduláns potenciáljáról tanúskodik, amelynek háttérben feltételezhetően első sorban a különböző gyulladási- és veleszületett immunrendszer-kapcsolt szignalizációs útvonalak megzavarása/modulálása és a bendiokarb-expozíció által indukált pro-inflammatorikus folyamatok állhatnak. Különböző, immunotoxikus potenciállal rendelkező xenobiotikumok esetén szintén megfigyelték a neutrofil granulociták, illetve makrofágok szöveti sérülésre adott eltérő válaszreakcióját. A rizstermesztés során alkalmazott növényvédő szer a cyhalofop-butil [99], a fungicid hatású peszticid keverék famoxadone-cymoxanil [100], illetve egyes nanoanyagok [101] hasonlóan az általunk tapasztaltakhoz, az immunsejtek csökkent mértékű felhalmozódását

tapasztalták farokúszó-sebzésen alapuló lokális zebraadánió modellben. A granulocita-vándorlás modulálásának részletesebb megismerésére további, például az érrendszer és a makrofágok érintettségét is vizsgáló kísérletek elvégzése szükséges.

Érdekes módon az LPS-kezelésen alapuló szisztémás gyulladásos modellben az előzetesen – viszonylag magasabb koncentrációkkal történő, de még szubletális, LC10 alatti tartományban lévő – bendiokarb expozíció átesett zebraadánió embriók neutrofil granulocitái nagyobb mértékű toleranciát mutattak az LPS-kezeléssel szemben a kontroll csoporthoz képest. Elképzelhető, hogy a bendiokarbnak való embrionális expozíció olyan transzkriptóm szintű változásokat eredményezett a veleszületett immunrendszer, többek között a neutrofil granulociták tekintetében, amelyek így eltérő módon reagáltak egy újabb, LPS-expozíció formájában történő „kihívásra”. Zebraadánió embriókon kimutatták, hogy egy korábbi, viszonylag alacsony, szubletális LPS-dózis toleranciát alakít ki egy későbbi önmagában letális LPS-dózissal szemben, amely jelenség háttérben kulcsszerepet játszhatnak egyes citokin receptorok és az azokhoz köthető szignalizációs útvonalak [102]. Az embrionális bendiokarb-expozíció szisztémás gyulladásra adott válasza mögött húzódnó molekuláris biológiai mechanizmusok megismerése további feltáró munkát igényel.

A bendiokarb embrionális hatásvizsgálatáról főként az elmúlt két évtizedben jelentek meg eredmények, korlátozott mennyiségben, első sorban csirke embrión, amelyek nem adnak számot jelentős, teratogén hatásokról [103–105]. Más inszekticid karbamátokhoz képest a bendiokarb-expozíció immunológiai következményeiről szintén meglehetősen kevés információ érhető el a szakirodalomban. Nyulak vizsgálata során a bendiokarb számottevő elváltozásokat okozott a lép szöveti struktúrájában és a limfocita sejtszámban [106]. A háttérben húzódnó hatásmechanizmusok, a veleszületett immunrendszer sejtes és humorális elemeire gyakorolt hatások azonban még alig ismertek.

Jelen diplomamunka eredményei alapján összességében elmondható, hogy az embrionális, szubletális bendiokarb-expozíció jelentős mértékű kihatással volt a zebraadánió-embriók veleszületett immunrendszerére, annak sejtes és humorális elemeinek befolyásolásán keresztül egyaránt. Vizsgálataink eredményei a bendiokarb pro-inflammatorikus és immunmoduláns potenciáljáról tanúskodnak. Mindazonáltal a tapasztalt eltérések háttérben álló folyamatok megismerése további kutatómunkát igényel.

Kísérleteink eredményei felhívják a figyelmet a zebraadánió embrió, mint gerinces modell toxikológiai vizsgálatokban történő alkalmazásának jelentőségére. A növekvő ökológiai, valamint humán és haszonállat-egészségügyi kockázatok miatt növekvő az igény új, költséghatékony vizsgálati módszerek kifejlesztésére és a már meglévő módszerek finomhangolására a toxikológiai vizsgálatok terén, amelyhez a zebraadánió egy előremutató alternatívát kínál.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

Az emberi tevékenység következtében környezetünkbe egyre nagyobb mennyiségben kerülnek különféle környezeti szennyezőanyagok, amelyek károsíthatják a patogén ágensek elleni védekezésben kulcsszerepet játszó immunrendszert. Ez számos rövid- és hosszútávú egészségügyi következménnyel járhat.

A dolgozat célját képezte, hogy átfogó képet adjon különböző, lokális vagy szisztémás gyulladás indukálásán alapuló zebradánió modellekről, illetve, hogy megvizsgáljuk ezeken keresztül egy humánegészségügyi szempontból is jelentős karbamát inszekticid, a bendiokarb veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatását. Megvizsgáltuk az embrionális, szubletális bendiokarb-expozíció hatását a neutrofil granulociták embrión belüli eloszlásra és mennyiségére, illetve egy gyulladást mediátor, a nitrogén-monoxid termelődésére. Vizsgáltuk még egyes immun- és gyulladás-asszociált markergének kifejeződését is bendiokarb-expozíció átesett zebradánió-embrión. Továbbá, farokúszó-sebzésen alapuló lokális, valamint lipopoliszacharid (LPS)-indukált szisztémás gyulladástos modellben értékeltük az embrionális bendiokarb-expozíció neutrofil granulociták válaszreakciójára/funkcionalitására kifejtett hatásait.

A bendiokarb-expozíció hatására koncentráció-függő módon megváltozott a neutrofil granulociták embrión belüli eloszlása, az oldalon mentén azok fokozott, szignifikáns mértékű felhalmozódása volt tapasztalható. A nitrogén-monoxid termelődése szintén emelkedett értékeket mutatott az oldalon mentén. A viszonylag magasabb koncentrációk az immun- és gyulladás-specifikus markergének kifejeződésének jelentős mértékű indukálását eredményezték. A farokúszó sebzésén alapuló gyulladástos modellben a neutrofil granulociták sebzés területére vándorlása pedig szignifikáns, koncentráció-függő csökkenést mutatott a bendiokarb kezelésén átesett csoportokban. Érdekes módon az LPS-kezelés által indukált erőteljes szisztémás gyulladás során az előzetesen bendiokarb-expozíció átesett embriókban a granulociták nagyobb mértékű toleranciája mutatkozott meg.

Összességében megállapítható, hogy a bendiokarb – feltételezhetően az oldalon szerv mentén sorakozó neuromast érzékelő központok károsításán keresztül is – inflammatorikus folyamatokat indukált az embriókban, mindemellett pedig erőteljes mértékben befolyásolta a neutrofil granulociták általunk indukált lokális és szisztémás gyulladástos adott válaszreakcióját. Mindez az embrionális, szubletális bendiokarb-expozíció immunmoduláns potenciáljáról tanúskodik. Eredményeink felhívják a figyelmet a bendiokarb immunrendszerre gyakorolt hatásainak további, részletesebb feltérképezését célzó kutatómunkák elvégzésének szükségességére.

7. ABSTRACT

Due to anthropogenic activities increasing amounts of environmental pollutants enter the environment. A potential target for these xenobiotics is the immune system, which plays a vital role in host defense against pathogens. Impairment of this system can result in several short- and long-term health consequences.

The aim of this thesis was to provide an overview of zebrafish models which are based on the induction of local or systemic inflammation, and to investigate the immuno-toxicological effects of embryonic exposure to sublethal concentrations of bendiocarb, a carbamate insecticide. The effects of embryonic exposure to sublethal concentrations of bendiocarb were investigated on the distribution and abundance of neutrophil granulocytes and on the production of an inflammatory mediator, nitric oxide. The expression of certain immune- and inflammation-associated marker genes on bendiocarb-exposed zebrafish embryos was also investigated. In addition, we evaluated the modulatory effects of embryonic bendiocarb-exposure on neutrophil granulocyte response and function using local and LPS-induced systemic inflammatory models.

The exposure to bendiocarb resulted in a diffuse, widespread distribution of neutrophil granulocytes in the whole embryos, and a significant increase in neutrophil accumulation along the lateral line in a concentration-dependent manner. An elevated nitric oxide production has also been observed along the lateral line. Furthermore, bendiocarb-exposure resulted in significant up-regulation of immune- and inflammation-associated marker genes. In addition, in the tail fin transection model, neutrophil granulocyte migration to the wound site showed a significant, concentration-dependent decrease after bendiocarb-exposure. Interestingly, during the intense systemic inflammation induced by LPS treatment, neutrophil granulocytes showed a greater tolerance to LPS in the embryos, which were previously exposed to bendiocarb.

Overall, it can be concluded that the sublethal, embryonic exposure to bendiocarb induced pro-inflammatory effects in the zebrafish embryos, presumably as part of the result of potentially damaged neuromasts along the lateral line. The response of neutrophil granulocytes to a local and a systemic inflammation was also strongly affected by the embryonic exposure. In conclusion, these findings indicate a significant immunomodulatory potential of this carbamate insecticide. The result of our study draws attention to the need of further, more detailed studies focusing on the investigation of short- and long-term immunological consequences of embryonic bendiocarb-exposure.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Erdei Anna, Sármay Gabriella, Prechl József (2012) *Immunológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest
2. Vos J, Loveren H van, Wester P, Vethaak D (1989) Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *TiPS* 10:289–292. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(89\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90031-X)
3. Walsh CJ, Butawan M, Yordy J, Ball R, Flewelling L, de Wit M, Bonde RK (2015) Sublethal red tide toxin exposure in free-ranging manatees (*Trichechus manatus*) affects the immune system through reduced lymphocyte proliferation responses, inflammation, and oxidative stress. *Aquat Toxicol* 161:73–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.019>
4. Prah 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 MR, Dorsey G, Aweeka F, Feeney ME (2021) Exposure to pesticides in utero impacts the fetal immune system and response to vaccination in infancy. *Nat Commun* 12:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20475-8>
5. Calder P, Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VGM, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R (2013) Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: A review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 12:349–361. <https://doi.org/10.2174/18715281113129990053>
6. Akchurin OM, Kaskel F (2015) Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif* 39:84–92. <https://doi.org/10.1159/000368940>
7. Prasad S, Sung B, Aggarwal BB (2012) Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation. *Prev Med (Baltim)* 54:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.11.011>
8. Sciarra A, di Silverio F, Salciccia S, Autran Gomez AM, Gentilucci A, Gentile V (2007) Inflammation and Chronic Prostatic Diseases: Evidence for a Link? *Eur Urol* 52:964–972. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.06.038>
9. Ramos-González EJ, Bitzer-Quintero OK, Ortiz G, Hernández-Cruz JJ, Ramírez-Jirano LJ (2021) Relationship between inflammation and oxidative stress and its effect on multiple sclerosis. *Neurologia* 1686:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2021.10.003>
10. Sipes NS, Padilla S, Knudsen TB (2011) Zebrafish-As an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93:256–267. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20214>
11. Scholz S (2013) Zebrafish embryos as an alternative model for screening of drug-induced organ toxicity. *Arch Toxicol* 87:767–769. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1044-2>
12. Sukardi H, Chng HT, Chan ECY, Gong Z, Lam SH (2011) Zebrafish for drug toxicity screening: Bridging the in vitro cell-based models and in vivo mammalian models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7:579–589. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.562197>
13. Bauer B, Mally A, Liedtke D (2021) Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *Int J Mol Sci* 22:1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms222413417>
14. He JH, Gao JM, Huang CJ, Li CQ (2014) Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicol Teratol* 42:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.01.006>
15. Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
16. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203:253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
17. Charles B.Kimmel (1989) Genetics and early development of zebrafish. *Trends in Genetics* 5:283–288. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90103-0)
18. Cooper MS, D'amico LA, Henry CA (1999) Analyzing Morphogenetic Cell Behaviors in Vitrally Stained Zebrafish Embryos. *Methods in Molecular Biology* 122:185–204. <https://doi.org/10.1385/1-59259-722-X:185>
19. Lilianna Solnica-Krezel, Derek L. Stemple, Wolfgang Driever (1995) Transparent things: Cell fates and cell movements during early embryogenesis of zebrafish. *BioEssays* 17:931–939. <https://doi.org/10.1002/bies.950171106>
20. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MKB (2006) A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108:3976–3978. <https://doi.org/10.1182/blood-2006>

21. Novoa B, Bowman T v., Zon L, Figueras A (2009) LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 26:326–331. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.004>
22. Rauta PR, Nayak B, Das S (2012) Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol Lett* 148:23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
23. Zhu Y, Li Y, Miao L, Wang Y, Liu Y, Yan X, Cui X, Li H (2014) Immunotoxicity of aluminum. *Chemosphere* 104:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.052>
24. Dangleben NL, Skibola CF, Smith MT (2013) Arsenic immunotoxicity: A review. *Environ Health* 12:1–15. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-73>
25. Galloway T, Handy R (2003) Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. *Ecotoxicology* 12:345–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1022579416322>
26. Dewitt JC, Peden-Adams MM, Keller JM, Germolec DR (2012) Immunotoxicity of Perfluorinated Compounds: Recent Developments. *Toxicol Pathol* 40:300–311. <https://doi.org/10.1177/0192623311428473>
27. Selgrade MK, Blain RB, Fedak KM, Cawley MA (2013) Potential risk of asthma associated with in utero exposure to xenobiotics. *Birth Defects Res C Embryo Today* 99:1–13. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21028>
28. Arsenescu R, Arsenescu V, Zhong J, Nasser M, Melinte R, Dingle RWC, Swanson H, de Villiers WJ (2011) Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 17:1149–1162. <https://doi.org/10.1002/ibd.21463>
29. Pollard KM, Christy JM, Cauvi DM, Kono DH (2018) Environmental xenobiotic exposure and autoimmunity. *Curr Opin Toxicol* 10:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.009>
30. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ (1993) Developmental Changes in Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress in Cows. *J Dairy Sci* 76:2899–2905. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77629-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77629-8)
31. W. F. H. Jarret, P. E. McNeil, W. T. R. Grimshaw, I. E. Selman, W. I. M. McIntyre (1978) High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and papilloma virus. *Nature* 274:215–217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/274215a0>
32. Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Janovick Guretzky NA, Litherland NB, Underwood JP, Looor JJ (2005) Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci* 4:323–344. <https://doi.org/10.4081/ijas.2005.323>
33. Sardon D, de la Fuente I, Calonge E, Perez-Alenza MD, Castaño M, Dunner S, Peña L (2005) H-ras immunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. *J Comp Pathol* 132:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.09.011>
34. Lee IK, Kye YC, Kim G, Kim HW, Gu MJ, Umboh J, Maaruf K, Kim SW, Yun CH (2016) Stress, nutrition, and intestinal immune responses in pigs - A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 29:1075–1082. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0118>
35. Sordillo LM, Aitken SL (2009) Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 128:104–109. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305>
36. Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ (2019) Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. *Annu Rev Anim Biosci* 7:361–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>
37. Sharma RP (1993) Immunotoxicity of Mycotoxins. *J Dairy Sci* 76:892–897. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77415-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77415-9)
38. Sivinski SE, Meier KE, Mamedova LK, Saylor BA, Shaffer JE, Sauls-Hiesterman JA, Yoon I, Bradford BJ (2022) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on oxidative status, inflammation, and immune response in transition dairy cattle. *J Dairy Sci* 105:1–16. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21998>
39. Bagath M, Krishnan G, Devaraj C, Rashamol VP, Pragna P, Lees AM, Sejian V (2019) The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Res Vet Sci* 126:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>
40. Oswald IP, Marin DE, Bouhet S, Pinton P, Taranu I, Accensi F (2005) Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Addit Contam* 22:354–360. <https://doi.org/10.1080/02652030500058320>
41. Weaver AC, Todd See M, Hansen JA, Kim YB, de Souza ALP, Middleton TF, Kim SW (2013) The use of feed additives to reduce the effects of aflatoxin and deoxynivalenol on pig growth, organ health

- and immune status during chronic exposure. *Toxins (Basel)* 5:1261–1281. <https://doi.org/10.3390/toxins5071261>
42. Rehberger K, Werner I, Hitzfeld B, Segner H, Baumann L (2017) 20 Years of fish immunotoxicology—what we know and where we are. *Crit Rev Toxicol* 47:509–535. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024>
 43. Descotes J (2006) Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:249–259. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.2.249>
 44. Dori Germoleca, Robert Luebke, Andrew Rooney, Kelly Shipkowskia, Rob Vandebrield, Henk van Loveren (2017) Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. *Curr Opin Toxicol* 5:55–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.08.002>
 45. Staudt LM, Brown PO (2000) Genomic Views of the Immune System. *Annu Rev Immunol* 18:829–859. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.829>
 46. House R v (2001) Cytokine measurement techniques for assessing hypersensitivity. *Toxicology* 158:51–58. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00401-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00401-7)
 47. Dennery PA (2007) Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81:155–162. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>
 48. Huang CH, Chan WH (2017) Rhein induces oxidative stress and apoptosis in mouse blastocysts and has immunotoxic effects during embryonic development. *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/IJMS18092018>
 49. Lee YH, Cheng FY, Chiu HW, Tsai JC, Fang CY, Chen CW, Wang YJ (2014) Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials* 35:4706–4715. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.021>
 50. Badham HJ, Renaud SJ, Wan J, Winn LM (2010) Benzene-initiated oxidative stress: Effects on embryonic signaling pathways. *Chem Biol Interact* 184:218–221. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.005>
 51. Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y (2005) Effects of Heat Stress on the Redox Status in the Oviduct and Early Embryonic Development in Mice. *Journal of Reproduction and Development* 51:281–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1262/jrd.16089>
 52. Orozco-Hernández JM, Gómez-Oliván LM, Elizalde-Velázquez GA, Heredia-García G, Cardoso-Vera JD, Dublán-García O, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, Galar-Martínez M (2022) Effects of oxidative stress induced by environmental relevant concentrations of fluoxetine on the embryonic development on *Danio rerio*. *Science of the Total Environment* 807:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151048>
 53. Dietert RR (2009) Developmental immunotoxicology: Focus on health risks. *Chem Res Toxicol* 22:17–23. <https://doi.org/10.1021/tx800198m>
 54. Chase CCL, Hurley DJ, Reber AJ (2008) Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 24:87–104. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001>
 55. Kfustensen P, Andersen A, Irgens LM, Bye AS, sUNDHEIM L (1996) Cancer in offspring of parents engaged in agricultural activities in Norway: Incidence and risk factors in the farm environment. *International Union Against Cancer* 65:39–50. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960103\)65:1%3C39::AID-IJC8%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960103)65:1%3C39::AID-IJC8%3E3.0.CO;2-2)
 56. Lo C, Dia AK, Dia I, Niang EHA, Konaté L, Faye O (2019) Evaluation of the residual efficacy of indoor residual spraying with bendiocarb (FICAM WP 80) in six health districts in Senegal. *Malar J* 18:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2829-4>
 57. Dr. Lehel József, Dr. Laczay Péter (2011) *Toxikológia*. Szent István Egyetemi Kiadó, Budapest
 58. Adiguzel C, Kalender Y (2020) Bendiocarb-induced nephrotoxicity in rats and the protective role of vitamins C and E. *Environmental Science and Pollution Research* 27:6449–6458. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07260-x>
 59. Petrovová E, Maženský D, Vdoviaková K, Massanyi P, Luptáková L, Smrčo P (2010) Effect of bendiocarb on development of the chick embryo. *Journal of Applied Toxicology* 30:397–401. <https://doi.org/10.1002/jat.1509>
 60. Xie Y, Meijer AH, Schaaf MJM (2021) Modeling Inflammation in Zebrafish for the Development of Anti-inflammatory Drugs. *Front Cell Dev Biol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.620984>

61. Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S, Taddei K, Lardelli M, Groth DM, Verdile G, Martins RN (2012) Regular care and maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/4196>
62. Yesudhasan BV, Selvan Christyraj JRS, Ganesan M, Subbiahanadar Chelladurai K, Venkatachalam S, Ramalingam A, Benedict J, Paulraj VD, Selvan Christyraj JD (2020) Developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and toxicological studies using foldscope microscope. *Cell Biol Int* 44:1968–1980. <https://doi.org/10.1002/cbin.11412>
63. Charles B. Kimmel, Donald A. Kane, Charline Walker, Rachel M. Warga, Mary B. Rothman (1989) A mutation that changes cell movement and cell fate in the zebrafish embryo. *Nature* 337:358–362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/337358a0>
64. 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. *Reproductive Toxicology* 33:128–132. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>
65. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS AZ EURÓPAI UNIÓ TANÁCSA (2010) AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 2010/63/EU IRÁNYELVE (2010. szeptember 22.) a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* 276:33–79
66. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, 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 R, 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-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Osogawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SMJ, Enright A, Geisler R, Plasterk RHA, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJP, Crollius HR, Rogers J, Stemple DL (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
67. OECD (2013) OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* 236:1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
68. Wester PW, Vethaak AD, van Muiswinkel WB (1994) Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology* 86:213–232. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90005-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90005-1)
69. Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE (2001) Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98:3087–3096. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V98.10.3087>
70. Meeker ND, Trede NS (2008) Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* 32:745–757. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.11.011>
71. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA (2011) Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol Pathol* 39:759–775. <https://doi.org/10.1177/0192623311409597>
72. Hall CJ, Boyle RH, Sun X, Wicker SM, Misa JP, Krissansen GW, Print CG, Crosier KE, Crosier PS (2014) Epidermal cells help coordinate leukocyte migration during inflammation through fatty acid-fuelled matrix metalloproteinase production. *Nat Commun* 5:1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms4880>
73. Yoo SK, Deng Q, Cavnar PJ, Wu YI, Hahn KM, Huttenlocher A (2010) Differential Regulation of Protrusion and Polarity by PI(3)K during Neutrophil Motility in Live Zebrafish. *Dev Cell* 18:226–236. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.015>

74. Redd MJ, Kelly G, Dunn G, Way M, Martin P (2006) Imaging macrophage chemotaxis in vivo: Studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil Cytoskeleton* 63:415–422. <https://doi.org/10.1002/cm.20133>
75. Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, Yoo SK, Ranheim EA, Huttenlocher A (2009) Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Dev Comp Immunol* 33:1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.003>
76. Otten C, Abdelilah-Seyfried S (2013) Laser-inflicted injury of zebrafish embryonic skeletal muscle. *Journal of Visualized Experiments* 71:1–5. <https://doi.org/10.3791/4351>
77. Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L, Sanda T, Jette CA, Testa JR, Neuberg DS, Langenau DM, Kutok JL, Zon LI, Traver D, Fleming MD, Kanki JP, Look AT (2010) T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell* 18:353–366. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.009>
78. Bruce Beutler, Ernst Th Rietschel (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews* 3:169–176. <https://doi.org/10.1038/nri1004>
79. Iliev DB, Roach JC, Mackenzie S, Planas J v., Goetz FW (2005) Endotoxin recognition: In fish or not in fish? *FEBS Lett* 579:6519–6528. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.061>
80. Forn-Cuní G, Varela M, Pereiro P, Novoa B, Figueras A (2017) Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Sci Rep* 7:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep41905>
81. Dios S, Balseiro P, Costa MM, Romero A, Boltaña S, Roher N, Mackenzie S, Figueras A, Novoa B (2014) The involvement of cholesterol in sepsis and tolerance to lipopolysaccharide highlighted by the transcriptome analysis of zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 11:421–433. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0995>
82. Yang L, Zhou X, Huang W, Fang Q, Hu J, Yu L, Ma N, Zhang W (2018) Protective Effect of Phillyrin on Lethal LPS-Induced Neutrophil Inflammation in Zebrafish. *Cellular Physiology and Biochemistry* 43:2074–2087. <https://doi.org/10.1159/000484192>
83. Sheng Y, Li H, Liu M, Xie B, Wei W, Wu J, Meng F, Wang HY, Chen S (2019) A Manganese-Superoxide Dismutase from *Thermus thermophilus* HB27 Suppresses Inflammatory Responses and Alleviates Experimentally Induced Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 25:1644–1655. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz097>
84. Sun Q, Zhu J, Cao F, Chen F (2017) Anti-inflammatory properties of extracts from *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf. *PLoS One* 12:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181094>
85. Cordero-Maldonado ML, Siverio-Mota D, Vicet-Muro L, Wilches-Arizábal IM, Esguerra C v., de Witte PAM, Crawford AD (2013) Optimization and Pharmacological Validation of a Leukocyte Migration Assay in Zebrafish Larvae for the Rapid In Vivo Bioactivity Analysis of Anti-Inflammatory Secondary Metabolites. *PLoS One* 8:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075404>
86. Bohni N, Cordero-Maldonado ML, Maes J, Siverio-Mota D, Marcourt L, Munck S, Kamuhabwa AR, Moshi MJ, Esguerra C v., de Witte PAM, Crawford AD, Wolfender JL (2013) Integration of Microfractionation, qNMR and Zebrafish Screening for the In Vivo Bioassay-Guided Isolation and Quantitative Bioactivity Analysis of Natural Products. *PLoS One* 8:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064006>
87. Pereira TCB, Campos MM, Bogo MR (2016) Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *Journal of Applied Toxicology* 36:876–885. <https://doi.org/10.1002/jat.3303>
88. Griffitt RJ, Weil R, Hyndman KA, Denslow ND, Powers K, Taylor D, Barber DS (2007) Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 41:8178–8186. <https://doi.org/10.1021/es071235e>
89. Craig PM, Wood CM, Mcclelland GB (2007) Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:1882–1892. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00383.2007.-In>
90. Johnson A, Carew E, Sloman KA (2007) The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 84:431–438. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.003>
91. Góran D, Xiu R (1991) Toxicity of Mercury, Copper, Nickel, Lead, and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contain Toxicol* 21:126–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01055567>

92. d'Alençon CA, Peña OA, Wittmann C, Gallardo VE, Jones RA, Loosli F, Liebel U, Grabher C, Allende ML (2010) A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol* 8:1–16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-151>
93. Wittmann C, Reischl M, Shah AH, Mikut R, Liebel U, Grabher C (2012) Facilitating drug discovery: an automated high-content inflammation assay in zebrafish. *J Vis Exp* 65:1–17. <https://doi.org/10.3791/4203>
94. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ (2005) Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology* 174:589–594. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.589>
95. Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K (2001) Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clinical and Experimental Allergy* 31:1714–1723. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01184.x>
96. Bischel LL, Mader BR, Green JM, Huttenlocher A, Beebe DJ (2013) Zebrafish Entrapment by Restriction Array (ZEBRA) device: A low-cost, agarose-free zebrafish mounting technique for automated imaging. *Lab Chip* 13:1732–1736. <https://doi.org/10.1039/c3lc50099c>
97. Gazsi G, Czimmerer Z, Ivánovics B, Berta IR, Urbányi B, Csenki-Bakos Z, Ács A (2021) Physiological, developmental, and biomarker responses of zebrafish embryos to sub-lethal exposure of bendiocarb. *Water (Switzerland)* 13:1–16. <https://doi.org/10.3390/w13020204>
98. Brun NR, Koch BEV, Varela M, Peijnenburg WJGM, Spaink HP, Vijver MG (2018) Nanoparticles induce dermal and intestinal innate immune system responses in zebrafish embryos. *Environ Sci Nano* 5:904–916. <https://doi.org/10.1039/c8en00002f>
99. Cheng B, Zou L, Zhang H, Cao Z, Liao X, Shen T, Xiong G, Xiao J, Liu H, Lu H (2021) Effects of cyhalofop-butyl on the developmental toxicity and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 263:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127849>
100. Cheng B, Zhang H, Hu J, Peng Y, Yang J, Liao X, Liu F, Guo J, Hu C, Lu H (2020) The immunotoxicity and neurobehavioral toxicity of zebrafish induced by famoxadone-cymoxanil. *Chemosphere* 247:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125870>
101. Martinez CS, Igartúa DE, Czarnowski I, Feas DA, Alonso S del v., Prieto MJ (2019) Biological response and developmental toxicity of zebrafish embryo and larvae exposed to multi-walled carbon nanotubes with different dimension. *Heliyon* 5:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02308>
102. Novoa B, Bowman T v., Zon L, Figueras A (2009) LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 26:326–331. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.004>
103. Petrovová E, Maženský D, Vdoviaková K, Massanyi P, Luptáková L, Smrčo P (2010) Effect of bendiocarb on development of the chick embryo. *Journal of Applied Toxicology* 30:397–401. <https://doi.org/10.1002/jat.1509>
104. Petrovova E, Sedmera D, Luptakova L, Mazensky D, Danko J (2012) Chick development and high dose of bendiocarb. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47:1312–1318. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.672138>
105. Petrovova E, Sedmera D, Lesnik F, Luptakova L (2009) Bendiocarb effect on liver and central nervous system in the chick embryo. *J Environ Sci Health B* 44:383–388. <https://doi.org/10.1080/03601230902801091>
106. Petrovova E, Massanyi P, Capcarova M, Zivcak J, Stodola L (2011) Structural alterations in rabbit spleen after bendiocarb administration. *Journal of Environmental Science and Health* 46:788–792. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.601937>

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom Ivánovics Bence és Dr. Lehel József témavezetőimnek, a lelkes tanításért és támogatásért, illetve a munka során nyújtott segítségért.

Köszönöm a tudományos munkában való segítséget Dr. Czimmerer Zsoltnak, Dr. Bácsi Attilának, Tóth Mártának és Domokos Apolkának.

További köszönet illeti Prof. Dr. Urbányi Bélát, Dr. Csenki Bakos Zsoltot, Dr. Szabó Istvánt és Gazsi Gyöngyit, illetve a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezettoxikológiai Tanszék munkatársait a szívélyes fogadtatásért és a laboratóriumi munkában való segítségért.

NYILATKOZAT

Témavezetői nyilatkozat

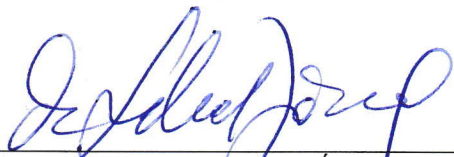
Alulírott DR. LEHEL JÓZSEF és IVÁNOVICS BENCE, mint témavezetők nyilatkozunk, hogy

BODA ZSÓFIA állatorvostan-hallgató

Zebradánión kialakított gyulladássos modellek alkalmazási lehetőségei toxikológiai vizsgálatokban

c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022. október 11.



/DR. LEHEL JÓZSEF/
témavezető

Állatorvostudományi Egyetem
Élelmiszer-higiéniai Tanszék



/IVÁNOVICS BENCE/
témavezető

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

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: BODA ZSÓFIA
Elérhetőség (e-mail cím): zsofia.boda@gmail.com
A feltöltendő mű címe: ZEBRA DANION KIALAKÍTOTT GYULLADÁSOS MODELLEK ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI TOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATOKBAN
A mű megjelenési adatai: -
Az átadott fájlok száma: 1

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 anyagrészt 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:

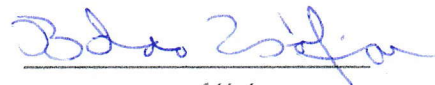


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

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, 2012 év ...10.....hó ...10... nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra 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, szolgálta, 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.*

NYILATKOZAT

Alulírott BODA ZSÓFIA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe ZEBRADÁNION KIALAKÍTOTT GYULLADÁSOS MODELLEK ALKALMAZÁSI
LEHETŐSÉGEI TOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATOKBAN..... tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022..... évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 10. 24.



BODA ZSÓFIA
a hallgató neve és aláírása



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: **Boda Zsófia**

Neptun-kódja: **I6XQAL**

A témavezető neve és beosztása: **Dr. Lehel József, egyetemi docens**

Tanszék: **Élelmiszer-higiéniai Tanszék**

A diplomadolgozat címe: **Zebradánión kialakított gyulladáso modellek alkalmazási lehetőségei toxikológiai vizsgálatokban**

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021	11	23	A dolgozat felépítésének megbeszélése	<i>Dr. Lehel József</i>
2.	2022	05	13	Irodalmi feldolgozás átnézése	<i>Dr. Lehel József</i>
3.	2022	08	31	Az eredmények megbeszélése, a dolgozat áttekintése	<i>Dr. Lehel József</i>
4.	2022	10	11	Dolgozat véglegesítése	<i>Dr. Lehel József</i>
5.	2022	10	16	Témavezetői nyilatkozat kiadása	<i>Dr. Lehel József</i>

Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	11	16	TDK dolgozat feltöltésre került az előírás szerint a megfelelő tárhelyre	<i>Dr. Lehel József</i>
2.	2023	11	18	TDK és diplomamunka azonossága	<i>Dr. Lehel József</i>
3.	2023	11	17	nyilatkozat elkészítése	<i>Dr. Lehel József</i>
4.				Szakkolgozat leadása és feltöltése	<i>Dr. Lehel József</i>
5.					

Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: 


.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása:  Átvétel dátuma: 2023.11.02.

