



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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

Doktori értekezés

Ivánovics Bence

Gödöllő, 2023.

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

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

Témavezetők: Dr. Urbányi Béla

egyetemi tanár, az MTA doktora

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

Dr. Czimmerer Zsolt

tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. Az embrionális xenobiotikum-expozíció jelentősége és potenciális immunológiai következményei	11
2.2. Az aflatoxinok bemutatása és alapvető tulajdonságai	14
2.3. Az aflatoxin B1 metabolizmusa	16
2.4. Az aflatoxin B1 toxicitása	20
2.4.1. A toxicitás alapját képező hatások	20
2.4.2. Immunotoxicitás	21
2.4.3. Embriotoxicitás és posztembrionális/posztnatális hatások	23
2.5. A környezet szerepe az aflatoxin B1-kontaminációban	26
2.6. Az ember aflatoxin B1-kitettsége	29
2.7. A zebradánió, mint toxikológiai modellszervezet	30
2.8. Az immunrendszer kialakulásának főbb jellegzetességei zebradánióban	35
2.9. Veszélyes immunrendszerre gyakorolt hatások vizsgálati lehetőségei zebradánió embriókon és lárvákon	36
2.9.1. Mikroinjektáláson alapuló gyulladási modellek	37
2.9.2. Úszószegély sebzésén alapuló gyulladási modellek	38
2.9.3. Nem-invazív eljárásokon alapuló gyulladási modellek	39
3. Anyag és módszer	40
3.1. A zebradániók tartási és szaporítási körülményei	40
3.2. Embrionális aflatoxin B1-expozíció szubletális koncentrációkkal	40
3.3. Morfológiai elváltozások értékelése	41
3.4. RNS szekvenálás és teljes transzkriptom analízis	41
3.5. Génexpresszió meghatározása RT-qPCR segítségével	42
3.6. Neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás meghatározása	43
3.7. Nitrogén-monoxid termelődés <i>in vivo</i> meghatározása	43
3.8. Aminosav analízis	44
3.9. Farokúszó sebzésén alapuló gyulladási modell	44
3.10. A szikzacskó lipid tartalmának mérése	45
3.11. Emésztőcsatorna funkcionális <i>in vivo</i> vizsgálata fluoreszcens mikrogyönggyel	45
3.12. Statisztikai értékelés	46
3.13. Bioetikai állásfoglalás	46
4. Eredmények	47
4.1. A szubletális aflatoxin B1-expozíció lárvák morfológiájára és teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai	47

4.2. Az aflatoxin B1 veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatásai	50
4.3. Az aflatoxin B1 nitrogén-monoxid termelődésre és L-arginin tartalomra gyakorolt hatásai	54
4.4. Az aflatoxin B1 emésztőrendszerre gyakorolt hatásai	56
4.5. Az aflatoxin B1 szikból történő lipid-mobilizációra gyakorolt hatása	58
5. Következtetések és javaslatok.....	61
6. Új tudományos eredmények.....	68
7. Összefoglalás.....	69
8. Summary.....	72
9. Irodalomjegyzék.....	74
10. Mellékletek	95
11. Köszönetnyilvánítás	96

Rövidítések jegyzéke

AFAR	AFB1-aldehid-reduktáz
AFB1	aflatoxin B1
AFB2	aflatoxin B2
AFBO	AFB1-exo-8,9-epoxid
AFG1	aflatoxin G1
AFG2	aflatoxin G2
AFL	aflatoxikol
AFM1	aflatoxin M1
AFM2	aflatoxin M2
AFQ1	aflatoxin Q1
aldh1a2	aldehid-dehidrogenáz 1 A2
apoa4a	apolipoprotein A-IVa
apobb.1	<i>apolipoprotein Bb tandem duplicate 1,</i>
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
cdx1b	<i>caudal type homeobox 1b</i>
clda	<i>claudin 15a</i>
cxcl18b	kemokin (C-X-C motívum) ligand 18b
cxcl8b.1	kemokin (C-X-C motívum) ligand 8b1
CYP450	citokróm P450 (enzimcsalád)
DAF-FM-DA	diaminofluoreszcein-FM-diacetát
DEG	<i>differentially expressed genes</i> diffenciáltan expresszált gén
dhrs9	dehidrogenáz/reduktáz-(SDR család) 9
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGPF	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMP	eritromieloid progenitorok
EPHX	epoxid hidroláz
ETs	extracellular traps extracelluláris csapdák
fabp1b.1	zsírsavkötő fehérje 1b-1
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> fluoreszcencia aktivált sejtválogatás
FBS	magzati szarvasmarha szérum
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FET	<i>Fish Embryo Acute Toxicity</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> zöld fluoreszcens protein
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i>
GOEA	<i>Gene Ontology Enrichment Analysis</i>
GST	AFBO glutation-S-transzferáz
HCC	hepatocelluláris karcinóma
hpf	<i>hours post fertilisation</i> termékenyülést követő órák száma
hpi	<i>hours post injury</i> sebzést követő órák száma
HSC	hematopoetikus őssejt
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> Nemzetközi Rákkutató Ügynökség

i11β	interleukin 1β
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
LC	letális koncentráció
LPS	lipopoliszacharid
mmp9	mátrix metallopeptidáz 9
MS-222	trikain-metánszulfonát
mtp	mikroszomális triglicerid transzfer fehérje
NADP+/H	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORO	<i>Oil-Red-O</i>
PBS	foszfát pufferes sóoldat
pllp	plazmolipin
RASFF	Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Riasztási Rendszer
RO	reverz ozmózis
ROS	reaktív oxigénszármazékok
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakció
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia
ZFIN	<i>Zebrafish Information Network</i>

1. Bevezetés

A XXI. század kezdetének talán egyik legfontosabb kérdése, hogy vajon képes lesz-e a technikai-technológiai fejlődés lépést tartani azokkal a kihívásokkal, amelyek a környezetünk – ideértve magát az embert is – globális változásaiból fakadnak. Ezeknek a változásoknak a következményeként várhatóan egyre gyakrabban és a Föld egyre több régióját érintve fogunk szembesülni az ivóvíz, valamint az élelmiszerek és takarmányok csökkenő minőségéből és mennyiségéből adódó problémákkal. Az élelmiszerek és takarmányok esetén megjelenő veszteséghez és minőségromláshoz nagymértékben hozzájáruló faktorok között a különböző penészgombák, illetve az azok által termelt mérgező hatású, másodlagos anyagcseretermékek, a mikotoxinok kiemelt helyen szerepelnek (Marroquín-Cardona et al., 2014; Mitchell et al., 2016). Az Európai Unió Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Riasztási Rendszere (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) a mikotoxinokat a tíz legfontosabb élelmiszerbiztonsági kockázati tényező közé sorolja. A RASFF éves jelentéseiben az 1980-as évektől kezdve napjainkig a mikotoxinok általi szennyeződésekhez köthető, és elsősorban import termékekre vonatkozó tagállami bejelentések igen nagy gyakorisággal vannak jelen (Pięłowski, 2019; RASFF, 2020). Globális szintű felmérések alapján a világ jelenlegi élelmezésére és a haszonállatok takarmányozására előállított terményeknek akár a 60-80 százalékában előfordulhatnak detektálható mennyiségű mikotoxinok, 20-25 százalékukban pedig a kontamináció mértéke meghaladhatja az európai uniós, illetve nemzetközi – pl. Codex Alimentarius-ban foglalt – határértékeket (Eskola et al., 2020; Gruber-Dorninger et al., 2019). A penészgombatoxinok széles körű káros biológiai hatásokkal, többek között hepatotoxikus, neurotoxikus, immunotoxikus, nefrotoxikus, reprotoxikus, illetve karcinogén potenciállal rendelkeznek (Hussein & Brasel, 2001). Ember esetén az akut mérgezések általában ritkák, azonban a relatíve alacsony koncentrációkkal történő krónikus kitettség, főként egyes fejlődő országokban valós problémaként jelenik meg (Gong et al., 2016). A mikotoxinok támadáspontjairól, hatásmechanizmusukról és a toxin-kitettség hosszú távú következményeiről szerzett ismereteink bővítése, és ezen keresztül a potenciális veszélyekre, így a megelőzés, mentesítés és szabályozás hatékonyabbá tételének jelentőségére való felhívás kiemelt fontossággal bír.

Az *Aspergillus* penészgombafajok által termelt aflatoxin B1 (AFB1) az egyik legkiemelkedőbb akut és krónikus toxicitással rendelkező mikotoxin, amelyet a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (*International Agency for Research on Cancer*,

IARC) emberben bizonyítottan karcinogén kategóriába sorol (IARC, 1993). Bár az AFB1 káros biológiai hatásainak felismerése, valamint a különböző kockázatsökkentési eljárások kidolgozása viszonylag nagy múltra tekint vissza, a toxin általi szennyeződés okozta egészségügyi és gazdasági problémák mai napig aktuálisak (Kumar et al., 2017). Egyes környezeti paraméterek (pl. átlaghőmérséklet, páratartalom) és az időjárás klímaváltozás hatására bekövetkező változásai kedvezhetnek az *Aspergillus* fajok szaporodásának és/vagy toxintermelésének, amely fokozott humán- és állategészségügyi kockázatokat vonhat maga után (Battilani et al., 2016; Marroquín-Cardona et al., 2014; Van Der Fels-Klerx et al., 2016). A kontaminálódott élelmiszerek és takarmányok elfogyasztása a terhes anyák, illetve a vemhes állatok számára kifejezetten nagy veszélyt hordoz, mivel az AFB1 képes átjutni a placentán (Partanen et al., 2010). Az embrionális fejlődés időszakában történő xenobiotikum-kitettség jelentős következményekkel járhat az egyed életkilátásaira nézve, amely nem csupán rövid időn belül megjelenő morfológiai, fiziológiai elváltozásokban mutatkozhat meg, hanem akár felnőtt kori betegségek kialakulását, illetve az azokra való fogékonyság növekedését is eredményezheti (Dufour-Rainfray et al., 2011; Gluckman et al., 2008; Selgrade et al., 2013). E tekintetben a fejlődő immunrendszert befolyásoló környezeti hatások szerepe kiemelendő. Az embrionális vérképzés (hematopoézis) kritikus periódusaiban bekövetkező stresszhatások többek között autoimmun és krónikus gyulladással járó betegségek, valamint csökkent immunkompetencia kialakulását is magukkal vonhatják (Goldstein et al., 2020; Holladay, 1999; Holladay & Smialowicz, 2000; Landreth, 2002; Rychlik & Sillé, 2019; Zhang et al., 2005). Különösen fontos kihangsúlyozni az embriót érintő gyulladással járó reakciók jelentőségét, amelyek komoly kihatással vannak például a központi idegrendszer fejlődésére, előmozdítva számos neurológiai kórkép megjelenését (Hagberg et al., 2012). Több kutatási eredmény is számot ad az AFB1 embriotoxikus és immunotoxikus potenciáljáról, azonban az alacsony, nem-letális koncentrációkkal történő embrionális kitettség következményei, főként az ember esetén még nem teljesen ismertek. Fejlődő országokban élő terhes anyák vérének emelkedett AFB1 tartalma az újszülöttek csökkent növekedési rátájával (Turner et al., 2007), alacsony születési tömeggel (Shuaib et al., 2010), valamint a fehérvérsejtek DNS-metilációs mintázatának, mint epigenetikai markernek a megváltozásával (Hernandez-Vargas et al., 2015) mutatott korrelációt. Mindez olyan, részletesebb feltáró munkák elvégzését szorgalmazza, amelyek segítségével átfogóbb képet kaphatunk az embrionális AFB1-kitettség biológiai következményeiről.

Célkitűzés

Doktori munkám célját az embrionális fejlődés időszakában bekövetkező, szubletális koncentrációkkal történő AFB1-expozíció hatásainak feltérképezése képezte zebraadánió modellrendszerben. Ennek során elsőként képet szerettem volna kapni arról, hogy milyen mértékű, teljes embriókra/lárvákra kiterjedő morfológiai elváltozásokat eredményez az alkalmazott szubletális toxin-expozíció. Ezt követően a transzkriptomban bekövetkező globális szintű eltérések vizsgálatán keresztül arra kerestem a választ, hogy melyek az AFB1-expozíció által legjelentősebb mértékben érintett biológiai útvonalak. A morfológiai és transzkriptom szintű különbségek alapján az embriók/lárvák veleszületett immunrendszerében, emésztőrendszerében, illetve a szikben tárolt lipidek mobilizációjában bekövetkező károsodások részletesebb feltérképezését tűztem ki célul.

A veleszületett immunrendszer tekintetében elsőként egyes immun-, és gyulladás-specifikus markergén kifejeződését vizsgáltam, majd pedig a neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásokat kívántam részletesebben megismerni. Ez utóbbi esetben egyrészt azok teljes embrión/lárván belüli mennyiségének és eloszlásának, másrészt pedig szöveti sérülés által indukált lokális gyulladásra adott válaszreakciójuknak vizsgálatán keresztül. Emellett egy, a gyulladásban fontos szerepet játszó mediátor, a nitrogén-monoxid embriókon/lárvákon belüli termelődését, valamint a folyamat szubsztrátjaként szolgáló L-arginin mennyiségét kívántam detektálni. Mindezek alapján az alkalmazott szubletális, embrionális AFB1-expozíció gyulladás indukáló, valamint immunmoduláns potenciáljáról szerettem volna részletesebb képet kapni.

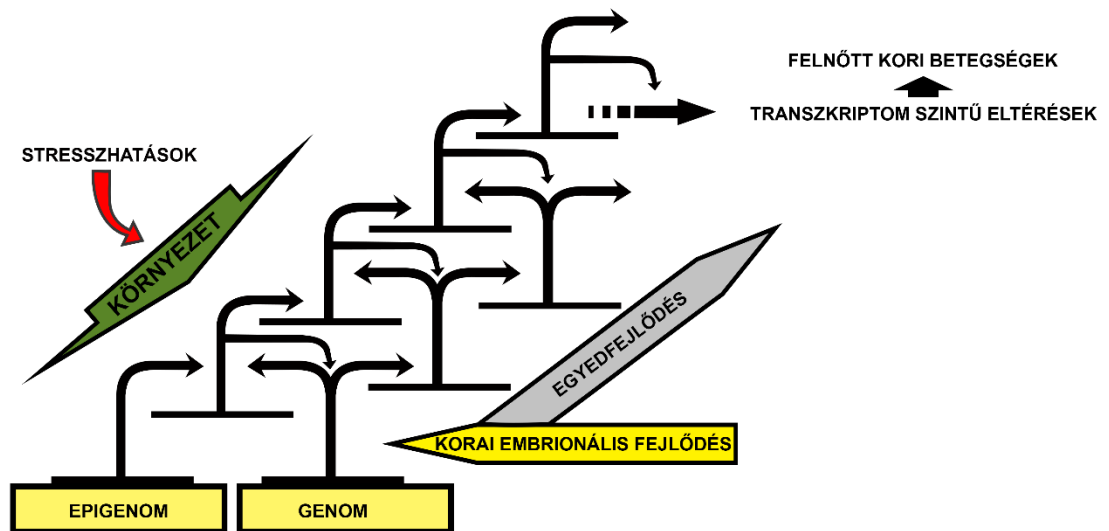
Mivel a tapasztalt morfológiai, transzkriptomikai és immunológiai eltérések a szik-bélrendszer AFB1-expozíció által történő fokozott mértékű károsodására utaltak, ezért a következőkben az emésztőcsatorna fejlettségében és a szikanyagok mobilizációjában fellelhető különbségek vizsgálatára fókuszáltam. Az emésztőrendszert érintő változások felderítése érdekében az emésztőcsatorna egyes funkcionális/anatómiai eltéréseit, valamint annak fejlődésében kulcsszerepet játszó egyes gének kifejeződését vizsgáltam. A szikzacskóban tárolt anyagok hasznosítására/mobilizációjára irányuló folyamatok sérülését a szik lipidtartalmának meghatározásán, valamint a lipid transzportban és anyagcserében kulcsszerepet játszó géncsoportok kifejeződésének mérésén keresztül kívántam értékelni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az embrionális xenobiotikum-expozíció jelentősége és potenciális immunológiai következményei

Az embrionális fejlődés időszaka rendkívül összetett és finoman szabályozott folyamatok egymást követő és egymásra épülő láncolataként írható le. Genetikai és epigenetikai háttérétől függően az egyed végighalad fejlődési programján, amely az azt körülvevő környezet által alapvetően meghatározott. A genotípus fenotípusá történő kifejeződésében kulcsszerepet játszanak azok a génextpressziót szabályozó epigenetikai mechanizmusok, amelyek többek között a DNS metilálásán, valamint az azzal asszociálódó hiszton fehérjék kovalens modifikálásán keresztül mitotikusan (és meiotikusan) stabil változásokat képesek létrehozni. A differenciálódó embrió belső és külső környezetéből érkező szignálok többek között epigenetikai mechanizmusok segítségével integrálódnak a fejlődési program szabályozási rendszerébe. Az embrionális fejlődés tehát egymással szoros együttműködésben lévő genetikai és epigenetikai események kaszkádrésze által megy végbe, interakcióban a környezettel (1. ábra) (Jaenisch & Bird, 2003; Skinner, 2011a, 2011b). Ez a nagyfokú plaszticitást képviselő időszak (*developmental plasticity*) igen kritikus periódusa az egyedfejlődésnek. Az ekkor bekövetkező különböző környezeti stresszhatások (fizikai, kémiai, biológiai) következményei az egyed életkilátásaira nézve széles skálát ölelnek fel. Függően az adott stresszfaktor minőségétől és mennyiségétől, bekövetkezhetnek drasztikusabb elváltozásokat eredményező, gyakran letális teratogén hatások, megjelenhetnek viszonylag korai akut tünetek, sok esetben azonban csak az egyed későbbi élete során, pl. felnőtt korban megjelenő betegségekben, illetve az azokra való fogékonyság növekedésében érvényesül az embrionális kitétség hatása. Ez utóbbiak esetén igen kiemelt szereppel bírnak az epigenomot, illetve annak működését érintő elváltozások (1. ábra) (Gluckman et al., 2008, 2005; Nilsson et al., 2018).

Az immunrendszer alapvető funkciója a különböző károsító ágensekkel szembeni védekezés az idegen struktúrák felismerésén és eliminálásán keresztül (Parkin & Cohen, 2001). A megfelelően működő immunrendszer kialakulása az embrionális vérképzés érzékenyen szabályozott és időzített folyamatainak zavartalan lezajlását kívánja meg.



1. ábra. Sematikus ábra az egyed fejlődési útvonalát meghatározó genetikai és epigenetikai események kaszkádsziszteméről. Az embrionális fejlődés kritikus ablakaiban történő stresszhatások jelentős, hosszú távú, transzkriptom szintű változásokat eredményezhetnek (Nilsson és mtsai. 2018. alapján a szerző által módosítva).

A gerincesek vérképzésének kiindulási pontját a vérképző őssejtek (*hematopoietic stem cells, HSC*) képviselik. Ezek az őssejtek fajtól függő módon különböző vándorlási útvonalat járnak be az embrionális fejlődés során és kolonizálják az egyedfejlődés meghatározott szakaszaira jellemző hematopoetikus szerveket/szöveteket, valamint létrehozzák a mieloid (veleszületett immunrendszerhez köthető) és limfoid (adaptív immunrendszerhez köthető) vonalat biztosító progenitor sejteket (Holsapple et al., 2003). Mindezen folyamatok olyan kritikus fejlődési ablakokat jelölnek ki, amely időszakokban bekövetkező káros környezeti hatások jelentős mértékben és hosszú távon befolyásolhatják az immunrendszer működését (Landreth, 2002). Számos xenobiotikum esetén kimutatásra került az embrionális expozíciót követően immunmoduláció, immunkompetencia-csökkenés. Például, a fejlődő magzat alkoholnak való kitettsége igen komoly szintű immunológiai következményeket vonhat maga után, mind a veleszületett mind az adaptív immunitást érintve, többek között csökkenti a megszülető utód ellenálló képességet különböző bakteriális fertőzésekkel (pl. agyhártyagyulladás, tüdőgyulladás, gyomor-bél hurut) vagy parazitákkal (pl. *Trichinella spiralis*) szemben, kihatással van a csecsemőmirigy fejlődésére, illetve fogékonyabbá teszi az utódot a stressz-indukált immunszuppresszióra (Zhang et al., 2005). A meglehetősen perzisztens, ipari eredetű környezeti szennyező poliklórozott bifenilek általi prenatális kitettség szintén növelte egyes légúti megbetegedések gyakoriságát (Dallaire et al., 2006), valamint csökkentette a csecsemőmirigy méretét (Park et al., 2008) az utódoknál. A fejlődő

embriókat érő nehézfémek (ólom, higany) többek között a T-helper-2 sejtek citokintermelésének indukálásán keresztül növelhetik az asztma, vagy egyes autoimmun betegségek kialakulásának valószínűségét (De Vos et al., 2007; Dietert et al., 2004).

A xenobiotikumok immunrendszerre gyakorolt hatásai közül fontos kiemelni a különböző gyulladásos folyamatokat. Egy környezeti szennyező anyagnak való kitettség a gyulladásban szerepet játszó sejtes és humorális elemek károsításán/modulálásán, vagy közvetlen módon, sejt, illetve szöveti károsodás kialakításán keresztül eredményezhet különböző gyulladásos reakciókat és immunológiai problémákat (Barth et al., 2017; Calderón-Garcidueñas et al., 2003; Zhao et al., 2019). A megjelenő – lokális, vagy szisztémás jellegű – gyulladás tehát egyrészt következménye, mindemellett forrása is lehet az adott xenobiotikum által kialakított elváltozásoknak, betegségeknek. Ennek különösen nagy jelentősége van a gyulladásos folyamatok nem megfelelő lezajlása, krónikussá válása esetén, amely számos további megbetegedést vonhat maga után (Forbes et al., 2009; Maresca & Fantini, 2010). Érdekes összefüggés mutatkozik meg például a krónikus gyulladásos betegségek, a reaktív oxigénszármazékok (ROS) és a tumorképződés között. Egy akut gyulladásos reakció esetén a mieloid sejtek (makrofágok, neutrofil granulociták) ROS termelése fontos védelmi funkciót tölt be, többek között a károsodott sejtek apoptózisának indukálásán keresztül, ahol a szöveti sérülés gyógyulását követően a ROS szintje újra lecsökken. Egy krónikus gyulladás esetén azonban a mieloid sejtek fokozott, folyamatos ROS termelése egyrészt onkogenikus mutációk indukálását eredményezheti a környező sejtekben, másrészt pedig pozitív visszacsatolási mechanizmusokon keresztül fenntartja a gyulladás állapotát (Canli et al., 2017; El-Kenawi & Ruffell, 2017). A mieloid sejtek működésének, jelátviteli folyamatainak xenobiotikumok általi megzavarása, modulálása tehát olyan változásokat eredményezhet a sejtek oxidoreduktív egyensúlyában, ami jelentősen befolyásolhatja egyes, pl. tumoros megbetegedések lefolyását.

A különböző felnőtt kori gyulladás-asszociált betegségek kialakulása számos esetben szoros összefüggést mutat az embrionális fejlődés időszakában bekövetkező anyai és környezeti stresszhatásokkal (Chen et al., 2016). Egy, az AFB1-hez hasonlóan szintén gyakori és kimagasló, többek között nefrotoxicitással bíró mikotoxin, az ochratoxin-A (OTA) embrionális vese sejtenyésztésben (HEK293) történő hatásvizsgálata során számos gyulladás asszociált útvonal erőteljes indukciója mutatkozott meg, amely mechanizmusok feltételezhetően fontos szerepet játszanak az

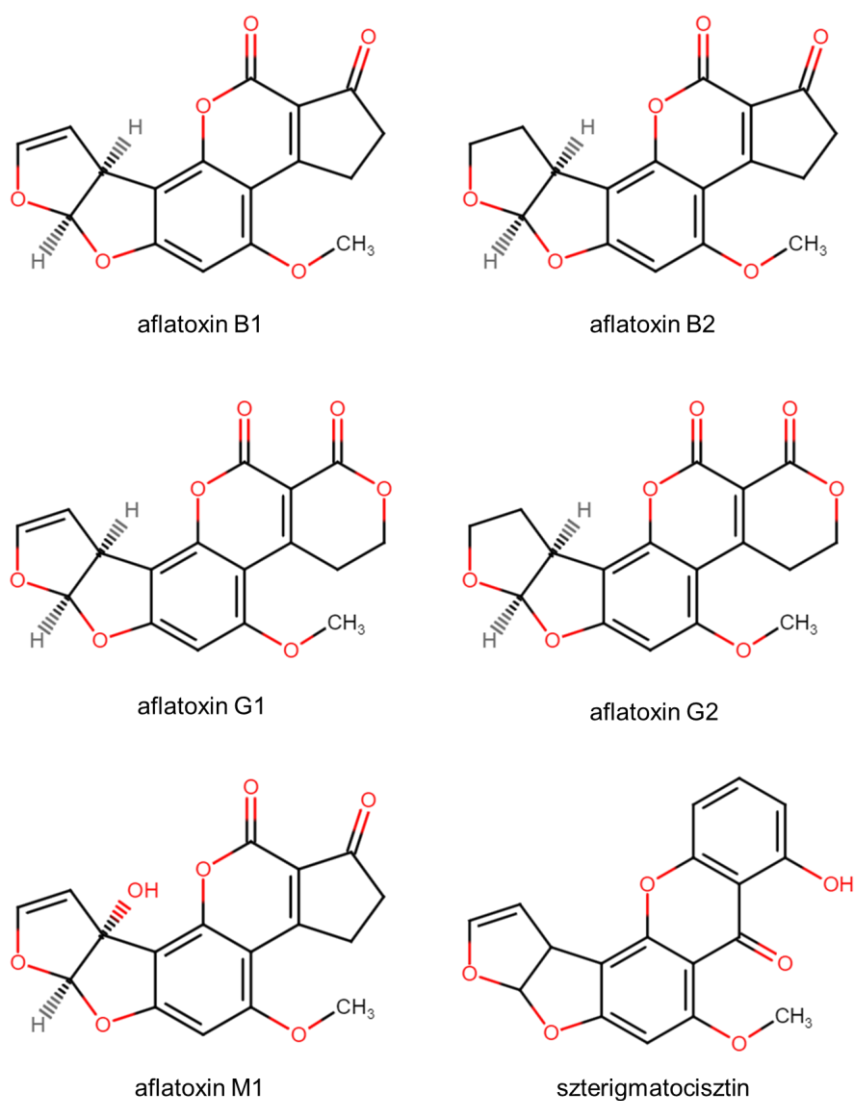
OTA által indukált felnőtt kori vesebetegségek kialakulásában (Raghubeer et al., 2017). A globális problémát jelentő különböző nanoanyagok képesek átjutni a placentán, potenciálisan károsítva a fejlődő utódot (Dugershaw et al., 2020). Szilícium-dioxid alapú nanorészecskék zebradánió embriókon történő vizsgálata során a viszonylag alacsony koncentrációkkal történő expozíció neutrofil granulocitamediált szívizomgyulladást és szívműködésbeli diszfunkciókat vont maga után (Duan et al., 2016). Örtqvist és mtsai. (2019) összefüggésbe hozták a terhesség alatti antibiotikum kitétséget a gyermekkori gyulladásos bélbetegségek kialakulásával, amelyhez feltehetően jelentős mértékben hozzájárulhat a magzati bél-mikrobiom károsodása.

2.2. Az aflatoxinok bemutatása és alapvető tulajdonságai

Az aflatoxin elnevezés a vegyületet termelő penészgomba nemzetség egyik tagja, az *Aspergillus flavus* (Link ex Fries) latin nevéből ered. A gombafaj toxikológiai jelentőségére egy közel hatvan évvel ezelőtt Nagy Britanniában bekövetkezett, több, mint százezer pulyka pusztulásával járó esemény hívta fel a figyelmet (Blount, 1961 alapján Wannop, 1963). A mérgezés hátterének felderítése során feltételezhetővé vált, hogy a tömeges pusztulást a takarmányozásra használt, Brazíliából importált földimogyoró-liszt penészgomba-metabolitok általi kontaminációja okozhatta. Naposkacsákon végzett kísérletek során a problémát okozó földimogyoró-lisztből extrahált és kromatográfiával elválasztott fluoreszcens anyag, a kitenyésztett penészgomba-kultúrából kivont szintén fluoreszcens extraktum, valamint a gombatorzssal beoltott előzetesen sterilizált, nem-toxikus földimogyoró ugyanazokkal a tünetekkel járó toxikózist eredményezett (Sargeant et al., 1961). A beazonosított *A. flavus* metabolitjainak további vizsgálatok karakterizálták (molekulatömeg, abszorbancia) a már korábban megfigyelt, UV-fény alatt kék színnel fluoreszkáló vegyületet, amelyet ez alapján aflatoxin B-nek neveztek el. Emellett egy további, valamivel alacsonyabb mértékű toxicitást mutató, zöld fluoreszcens jelet kibocsátó anyagcseretermék, az aflatoxin G is azonosításra került (Nesbitt et al., 1962). Molekulaszerkezetük feltárását elsőként Asao és mtsai. (1963, 1965) végezték el, amelynek során négy különböző, de egymáshoz nagyon hasonló, gyűrűs szerkezetű szubsztituált furanokumarin-származékot írtak le (B1, B2, G1, G2).

Miután az aflatoxinok pulykára és kacsára gyakorolt drasztikus hatásai napvilágra kerültek, felmerült a kérdés, hogy a szennyeződött takarmányoknak kitett

haszonállatokból nyert termékek – különös tekintettel a tejre – milyen mértékű egészségügyi kockázatot hordoznak. Érdekes módon, szarvasmarhák aflatoxin-szennyezett takarmánnyal való etetését követően, az állatok tejéből készült extraktumban nem tudtak AFB1-et detektálni, azonban az extraktum hasonló elváltozásokat eredményezett naposkacsák májában, mint maga az AFB1 tartalmú takarmány (De Iongh et al., 1964). Patkányok kísérletbe vonásával sikerült továbbá kimutatni, hogy a toxikus tejminták kivonatai egy olyan, vékonyréteg-kromatográfia által jól elkülöníthető vegyületet tartalmaznak, amely egyrészt bizonyos mértékben az *A. flavus* tenyészetekből is kimutatható volt, másrészt pedig feltehetően az AFB1 átalakítása révén keletkezhetett a vizsgálatba vont állatok szervezetében (De Iongh et al., 1964).



2. ábra. Az aflatoxin B1 és különböző módosulatainak szerkezeti képlete (Varga et al. 2009. alapján, a szerző által módosítva, <https://chem-space.com>)

A kezdetben „milk toxin”-nak nevezett vegyület később szintén karakterizálták, amelynek során két újabb, de a korábbiakhoz hasonló szerkezetű aflatoxin, az M1 és M2 került leírásra (Allcroft et al., 1966; Holzapfel et al., 1966). Azóta számos további aflatoxin típust fedeztek fel, a legjelentősebbeket, továbbá bioszintézisük egyik toxikológiai szempontból szintén kiemelendő köztermékét, a szterigmatocisztint (egyres gombafajok esetén végső termék) a 2. ábra mutatja be. A telítetlen furán gyűrűvel (C) rendelkező típusok, vagyis az AFB1 és AFG1 jóval nagyobb mértékű toxicitással bírnak, mint a telített gyűrűs AFB2 és AFG2 (Wogan et al., 1971).

Varga és mtsai. (2009) áttekintő munkájukban felhívják a figyelmet arra, hogy megannyi gombafajnak helytelenül tulajdonítottak aflatoxin-termelő képességet, valamint, hogy a bizonyítottan erre képes eddig ismert fajok mind az *Aspergillus* nemzetség *Flavi*, *Ochraceorosei* és *Nidulantes* szekcióiba tartoznak. Az élelmiszer és takarmány-alapanyagok kontaminációja tekintetében a legfontosabb ide vonatkozó penészgombák az *A. flavus*, *A. parasiticus* és *A. nomius* (Varga et al., 2009). A leginkább érintett termények közé a kukorica, földimogyoró, pisztácia, paradió, rizs, gyapotmag és egyes fűszerek tartoznak, amelyek esetén a szennyezettség mértékét számos tényező, többek között a földrajzi elhelyezkedés, az időjárási körülmények, a betakarítás és tárolás módja, körülményei egyaránt befolyásolják (Jelinek et al., 1989; Nazhand et al., 2020).

2.3. Az aflatoxin B1 metabolizmusa

Annak érdekében, hogy megfelelő módon értékelhessük az AFB1 adott modellrendszerben vizsgált biológiai hatásait, elengedhetetlen, hogy áttekintsük az AFB1 metabolizmusának és toxicitásának legfontosabb aspektusait, valamint az azokban megmutatózó fajok közötti főbb különbségeket.

A szervezetbe kerülő xenobiotikumok útját jelentősen meghatározza, hogy milyen mértékben képesek hidrofób kölcsönhatások kialakítására. Megannyi káros környezeti szennyező anyag apoláros, lipofil tulajdonságából adódóan könnyen átjut a sejtek membránjain és akkumulálódik egyes szövetekben. A különböző biotranszformációs mechanizmusok elsősorban azt a célt szolgálják, hogy a xenobiotikumokat vízdékönyobbá tegyék, így elősegítsék azok kiürülését a szervezetből. A biotranszformáció folyamatát alapvetően két fázisra osztják, az I. fázis legáltalánosabb lépései a hidrolízis, redukció és oxidáció a II. fázisé pedig a

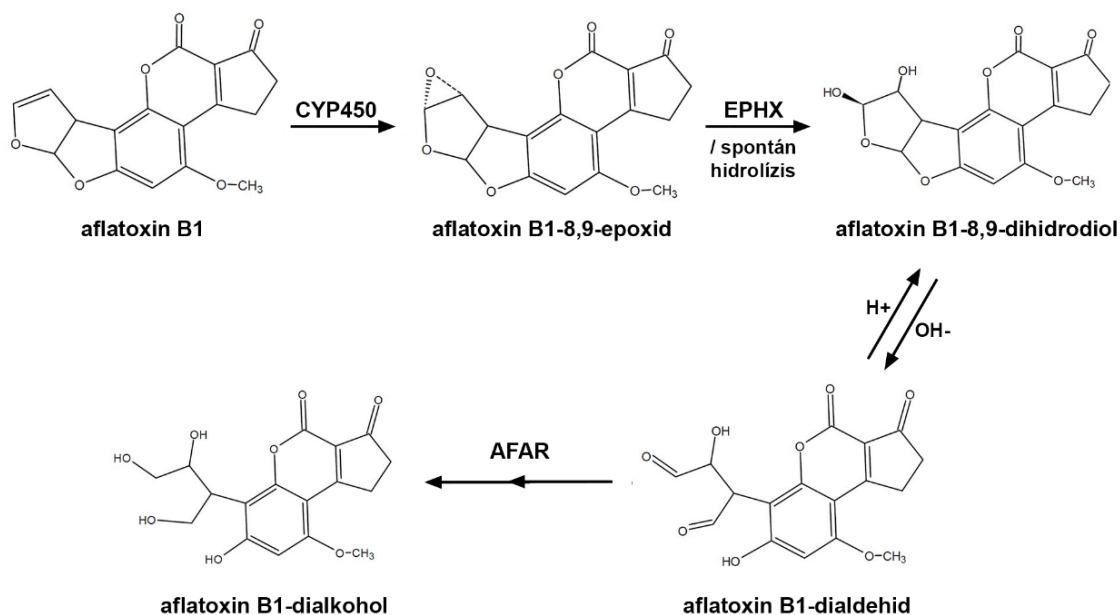
konjugáció (Parkinson et al., 2013). Ez a felosztás eredendően egy, a toxicitás mértékének akár csökkenését, akár növekedését is eredményezhető fázis (I.), valamint egy, csak detoxifikált metabolitokat eredményező fázis (II.) elkülönítésére szolgál (Williams., 1959 alapján Parkinson et al., 2013). Azonban – főként gyógyszer hatóanyagok esetén – toxikusabb termék a II. fázis által is kialakulhat, illetve előfordul, hogy bizonyos vegyületek az I. fázis kihagyásával egyből konjugáción mennek keresztül, vagy a két fázis éppen fordított sorrendben zajlik le (Parkinson et al., 2013). Fontos kiemelni, hogy a biotranszformáció tehát metabolikus aktivációt is magával vonhat, amelynek felismerése kulcsfontosságú az adott xenobiotikum hatásvizsgálatában.

Az AFB1 legtöbb esetben kontaminálódott élelmiszer vagy takarmány elfogyasztása révén kerül a szervezetbe, tehát az elsődleges expozíciós útvonalat az emésztőrendszer képezi, de emellett a légutakon, esetleg bőrön keresztüli kitettség is felmerülhet, például hulladékkezelő vagy takarmányliszt előállító üzemekben dolgozó embereknél (Mahato et al., 2019; Oluwafemi et al., 2012; Viegas et al., 2015). A tápcsatornába került AFB1 lipofil tulajdonságából adódóan könnyen és viszonylag gyorsan diffundál a vékonybél bélhámsejtjeibe, majd ezt követően a mesenterialis vénán keresztül a portális keringésbe jut, és a májban jelentős mértékben felhalmozódik (Hsieh & Wong, 1994). Az AFB1 elsődleges támadáspontját biotranszformációjának központi szerve, a máj képezi. Ki kell hangsúlyozni azonban, hogy a biotranszformáció már a bélcsatornában is elkezdődhet, illetve annak egyes lépései más szervekben, például vesében is végbe mehetnek (Akinrinde et al., 2020; Hsieh & Wong, 1994). Mindezt a biotranszformációban részt vevő kulcsenzimeket kódoló gének térbeli-időbeli kifejeződése és az enzimek aktivitása alapvetően meghatározza, ami nagymértékben függ a fajtól és annak egyedfejlődési stádiumától.

Az I. fázis során az AFB1 hidroxiláción, hidratáción, demetiláción, epoxidáción és redukción mehet keresztül. A redukció kivételével ezeket a folyamatokat főként a citokróm P450 (CYP450) enzimcsalád tagjai katalizálják. Hidroxiláció által keletkezik az AFM1 és AFQ1 (Diaz & Murcia, 2011; Gregorio et al., 2015). Előbbi az emlősök és az ember tejébe egyaránt elválasztódik, potenciális humán- és állategészségügyi kockázatot vonva maga után. Kacsák esetén hepatotoxikus, egérnél genotoxikus és immunotoxikus hatásokról számoltak be AFM1 expozíciót követően (Purchase, 1967; Salah-Abbes et al., 2015; Shirani et al., 2019). A toxint az IARC emberben esetlegesen rákkeltő (Group 2B) kategóriába sorolja (IARC, 1993). Az AFQ1 majmok és ember máj mikroszóma preparátumának dominás AFB1-derivátuma, amely már egy jelentős

mértékben detoxifikált metabolitnak minősül (Hsieh & Wong, 1994; Masri et al., 1974). Hidratáció révén keletkező vegyület az AFB₂a, toxicitása elhanyagolható az anyamolekulához képest, kialakulásának rátája ezért meghatározó lehet az egyes fajok AFB₁-érzékenységét tekintve (Diaz & Murcia, 2011). Egy közelmúltban publikált kutatás azonban felveti az AFB₂a fehérjékhez és lipidekhez való kovalens kötődésének lehetőségét, mint potenciális közreműködő faktort az AFB₁-toxikózisban (Rushing & Selim, 2017).

Az AFB₁ mikotoxinok közötti kiemelkedően nagy toxicitása elsősorban egy epoxidációs folyamat által létrejött anyagcsereterméknek, az AFB₁-exo-8,9-epoxidnak (AFBO), másodsorban pedig az abból AFB₁-8,9-dihidrodiolon keresztül képződő AFB₁-dialdehidnek köszönhető (metabolikus aktiváció) (**3. ábra**) (Diaz & Murcia, 2011; Murcia & Diaz, 2020). Az AFBO rendkívül reaktív metabolit, nukleinsavak guaninjaival (G) kölcsönhatásba lépve kovalens kötés létesítése által DNS- és RNS-adduktokat képez. Ennek egyik következményeként a létrejött instabil AFB₁-N⁷-Gua és stabil AFB₁-FAPy adduktok a DNS szerkezeti torzulását, a bázisok hibás párba állását és DNS-léziók kialakulását eredményezhetik, amely sok esetben guanin-citozin → timin-adenin (GC → TA) transzverzióhoz, tehát pontmutáció rögzüléséhez vezet (Bailey et al., 1996). A *p53* tumor szupresszor gén meghatározott pozíciója (249-es kodon/3) kiemelt támadási pontját képezi az AFB₁ expozíció során végbemenő addukt-képződésnek. Az AFB₁ által is okozott hepatocelluláris karcinómák (HCC) esetén igen nagy százalékban jelenik meg GC → TA transzverzió a *p53* gén „mutációs forrópontjában” (Puisieux et al., 1991; Smela et al., 2001). A legtöbb vizsgált gerinces modellállat és az ember rendelkezik az AFB₁ epoxidációjának katalizálásáért felelős citokróm enzimekkel (Gregorio et al., 2015; Ramsdell & Eaton, 1990; Santacroce et al., 2008). Halak között a szivárványos pisztráng az elsőként és leggyakrabban vizsgált faj az AFB₁ toxicitását feltérképező kutatásokban (Ashley et al., 1964). A szivárványos pisztráng esetén azonosított ide vonatkozó enzimek a CYP2K1 és CYP3A27, amelyek funkciójában/struktúrájában megfeleltethetők a humán CYP1A2-nek és CYP3A4-nek (Buhler et al., 1995; Lee et al., 1998; Santacroce et al., 2008; Yang et al., 2000). Zebradániónál szintén meghatároztak egy, az AFB₁ epoxidációjáért felelős enzimet (CYP2K6), mint CYP2K1-ortológot, amelyet kódoló gén már az embrionális fejlődés során kifejeződik (Thisse & Thisse, 2004; Wang-Buhler et al., 2005).



3. ábra. Az aflatoxin B1 metabolikus aktivációja során keletkező legfontosabb vegyületek (Diaz & Murcia 2011. alapján, a szerző által módosítva)

Az AFB1-8,9- dihidrodiol és a dialdehyd pH-tól függő egyensúlyi rendszerben egymásba átalakulni képes metabolitok (3. ábra) (Murcia & Diaz, 2020). Az AFB1-dialdehyd fehérjék lizinjéhez történő kovalens kötődése által járul hozzá az AFB1 expozíció káros biológiai hatásaihoz. Az ezen az úton létrejövő aflatoxin-albumin adduktok fontos biomarkerként szolgálnak az AFB1-kitettségek vizsgálatában. A detoxifikációt az AFB1-aldehyd-reduktáz (AFAR) enzim végzi, amely a dialdehyd alkohollá történő redukcióját katalizálja, elősegítve annak vizelettel való kiürülését (Diaz & Murcia, 2011; Murcia & Diaz, 2020). Mindez felveti az AFAR gének/enzimek kifejeződésének/aktivitásának AFB1-toxicitásban betöltött szerepét. Hörcsög, egér, patkány, sertés és szivárványos pisztráng esetén nem találtak összefüggést a toxinra való érzékenység és az AFAR-aktivitás között (Tulayakul et al., 2005), azonban kacsá, pulyka, csirke és fűz vizsgálatakor a viszonylag nagyobb fokú toleranciát mutató csirke, és a kifejezetten érzékeny kacsá AFAR-aktivitása összhangban volt a szenzitivitással (Murcia & Diaz, 2020).

További kiemelendő biotranszformációs esemény az AFB1 redukciója, citoplazmatikus NADPH-függő reduktázok által. A keletkező termék, az aflatoxikol (AFL) bár glükuronsavas konjugáció révén távozhat a szervezetből, képes ugyanakkor visszaalakulni a kiindulási vegyületté (AFB1), ez által egyfajta tároló funkciót betöltve potenciálisan növelni a toxicitás volumenét. Az AFB1-redukció/AFL-oxidáció rátája

tehát szintén jelentősen befolyásolhatja az adott faj érzékenységét (Diaz & Murcia, 2011).

Az AFB1-metabolizmus egyik legfontosabb detoxifikációs lépése a glutationnal vagy glükuronsavval történő konjugáció. Előbbi esetben a reaktív AFBO glutation-S-transzferáz (GST) segítségével konjugálódik, amely folyamat általában a májban zajlik le, a létrejött stabil, poláros termék pedig az epével, illetve merkapturáttá alakulva a vizelettel ürül. A GST fajtól függően más szervekben és szövetekben is jelentős aktivitást mutathat. A glükuronsavas konjugáció pedig az AFP1, AFM1-P1 és AFL metabolitok esetén megy végbe (Bbosa et al., 2013; Degen & Neumann, 1978; Diaz & Murcia, 2011). Egyes halfajoknál, pl. a szivárványos pisztrángnál és zebradániónál az AFB1-biotranszformáció II. fázisának fő detoxifikációs lépését az AFL glükuronsavval történő konjugációja jelenti (Santacroce et al., 2008; Troxel et al., 1997).

2.4. Az aflatoxin B1 toxicitása

2.4.1. A toxicitás alapját képező hatások

Ahogy az előző fejezetben már említésre került, az AFB1 toxicitása alapvetően a biotranszformáció során kialakuló reaktív köztitermékek nukleinsavakkal, fehérjékkel és foszfolipidekkel történő kölcsönhatására vezethető vissza. Ebből adódóan az AFB1 a replikáció, a transzkripció, a transláció, és a fehérjeműködés szintjén egyaránt képes befolyásolni a sejtek működését, széles körű biológiai problémákat magával vonva. Jelentős karcinogén potenciálját főként a) a DNS-hez való kötődése által indukált mutációk, b) a metabolizmusa során keletkező reaktív oxigénszármazékok és c) a különböző epigenetikai szabályozó mechanizmusok (DNS-metiláció, hiszton modifikáció, kis nem-kódoló RNS-ek) befolyásolásán keresztül indukált transzkripció szintű változások eredményezik (Bbosa et al., 2013; Benkerroum, 2020a; Rushing & Selim, 2019). Az AFB1 által okozott tumorképződés – a metabolikus aktivációért felelős citokróm enzimek mennyiségéből és aktivitásából, illetve a AFB1 felhalmozódásából adódóan – leggyakrabban a májban jut érvényre (Hsieh & Wong, 1994). Az AFB1-kitettséget, főként fejlődő országokban a HCC kialakulásának egyik legjelentősebb rizikófaktorként tartják számon (Hamid et al., 2013).

További kiemelendő támadási pontot képez a mitokondrium, amelynek háttérében elsősorban az indukált oxidatív stressz, az AFBO mitokondriális DNS-sel történő fokozott kölcsönhatása, illetve az elektron-transzport lánc gátlása áll. Mindez a mitokondrium strukturális és funkcionális károsodását vonja maga után, ami jelentős kihatással van az ATP termelődésére, így a sejtek energiaszerzésére (Huang et al., 2020; Kiessling, 1986; Niranjan et al., 1982). Ez utóbbihoz számottevő mértékben járul hozzá a szénhidrát anyagcsere megzavarása, többek között a glikogén-szintáz, glikogén-foszfóriláz, illetve glükóz-6-foszfátáz enzimek gátlásán/aktivitásának csökkentésén keresztül (Kiessling, 1986).

Az AFB1 expozíció során kialakuló oxidatív stressz, valamint a különböző nukleinsavakkal és fehérjékkel történő interakciók komplex biológiai problémákat eredményeznek, amelyek mögött húzódó ok-okozati összefüggések sok esetben még kevésbé ismertek. A legfontosabb ide tartozó folyamatok immunbiológiai, fejlődésbiológiai, neurobiológiai, szaporodásbiológiai és a kiválasztó szervrendszert érintő elváltozásokat foglalnak magukban (Benkerroum, 2020a; Hussein & Brasel, 2001).

A különböző fajok AFB1 által okozott toxikózisát számos faktor befolyásolja. Elsősorban az előző fejezetben vázolt biotranszformációs útvonalak megléte/hiánya, az abban részt vevő gének/enzimek kifejeződésének/aktivitásának mértéke, az egyed kora, ivara, egészségi állapota, valamint az AFB1 mellett megjelenő további stresszhatások, amelyek akár más mikotoxinokkal vagy egyéb xenobiotikumokkal történő koexpozícióból is fakadhatnak.

2.4.2. Immunotoxicitás

Az AFB1 különböző gerinces fajokon történő hatásvizsgálatai gyakran számolnak be a veleszületett, illetve az adaptív immunrendszer sejtes és/vagy humorális elemeinek modulálásáról. Ennek következményeként, számos vizsgált fajnál megmutatkozott a különböző fertőző ágensekkel szembeni ellenállóképesség, valamint a vakcináció hatékonyságának csökkenése (Meissonnier et al., 2008; Mohsenzadeh et al., 2016; Sahoo & Mukherjee, 2001a). A toxin igen jelentős kihatással van a makrofágok működésére. Szignifikáns mértékben redukálta az alveoláris makrofágok fagocitotikus aktivitását, a DNS és fehérje szintézisük mértékét, valamint lipopoliszacharid (LPS) indukált aktivációjukat sertésben (Pang et al., 2020). Teljes transzkriptom szintű változásokat eredményezett egér makrofág sejtvonalon

(RAW264.7), kiemelten érintve az oxidatív foszforilációban résztvevő útvonalakat, mindemelett erőteljesen indukálta a reaktív oxigénszármazékok és a malonaldehid termelődését, valamint a különböző gyulladás-asszociált gének kifejeződésének mértékét a sejtekben (Ma et al., 2021). Humán (THP-1 eredetű) makrofág sejtvonal AFB1-expozíciója a sejtek autofágiáját vonta maga után, valamint koncentráció-függő mértékben növelte az extracelluláris csapdák (*extracellular traps*, ETs) generálását (An et al., 2017). A főként kromatinból, elasztázból és az immunsejt típusától függően egyéb fehérjékből (pl. neutrofil granulociták esetén mieloperoxidázból) álló extracelluláris csapdák többek között sejt és szövetkárosodások eredményezésén keresztül járulhatnak hozzá az AFB1 immunotoxikus potenciáljához (Gao et al., 2022; Merza et al., 2015). A makrofágoknál tapasztalt eltérésekhez hasonlók (pl. apoptotikus folyamatok, csökkent fagocitózis) mutatkoztak meg dendritikus sejtek vizsgálata esetén (Mehrzađ et al., 2018). Érdekes módon ez idáig viszonylag kevés kutatómunka fókuszált az AFB1 neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásainak részletesebb feltérképezésére.

Az AFB1 immunotoxicitásának további fontos elemét a gyulladáshoz vezető reakciók képezik. Habár az aflatoxinok gyulladáshoz indukáló képessége már az 1960-as években ismeretes volt (Wannop, 1963), az AFB1 által okozott gyulladáshoz vezető folyamatok jelentőségének hangsúlyozása az elmúlt 15 év publikációiban vált viszonylag gyakoribbá. A legtöbb ide vonatkozó kutatómunka elsősorban a különböző pro- és anti-inflammatorikus citokinek és egyéb immun-markerek transzkripció szintjének mérésén, az oxidatív stressz mértékének meghatározásán és egyes esetekben hisztológiai analízisen alapul (Cao et al., 2021; Dey et al., 2021; Mehrzađ et al., 2017; Singh et al., 2015). Az immunrendszer gyulladáshoz vezető folyamatában szerepet játszó elemeinek modulálása, illetve a gyulladáshoz normális feloldásának megzavarása krónikus gyulladáshoz vezető betegségek kialakulását eredményezheti, amely egyes esetekben tumorképződést indukálhat (Bhatia et al., 2019; Ponce et al., 2014). Mindezt az AFB1 veleszületett immunrendszert befolyásoló és inflammatorikus hatásainak részletesebb megismerése kiemelt fontossággal bír.

2.4.3. Embriotoxicitás és posztembrionális/posztnatális hatások

Az AFB1 humán- és állategészségügyi kockázatai között az *in utero* kitettségből fakadó rövid és hosszú távú biológiai hatások kiemelten nagy jelentőséggel bírnak. Számos felmérés vizsgálta a terhes anyák aflatoxin-terheltsége és a magzatok/csecsemők fejlődésbeli paraméterei, egészségi állapota között húzódó összefüggéseket. Ezekben a felmérésekben az anyáktól/köldökzsinórból vett vérminták emelkedett AFB1-biomarker koncentrációi leggyakrabban csökkent születési tömeggel és az újszülöttek növekedésbeli lemaradásával párosultak (Abdulrazaq et al., 2002; De Vries et al., 1989; Gong et al., 2002; Lauer et al., 2019; Shuaib et al., 2010; Turner et al., 2007). Itt meg kell jegyezni, hogy több, az aflatoxin-kitettséggel adott esetben „együtt járó” körülmény (pl. fertőzések) is jelentős kihatással lehet a születési paraméterekre, amely ún. zavaró faktorokkal csak bizonyos munkák korrigáltak (Kyei et al., 2020). Egyes kutatások az AFB1 epigenetikai mintázatokra gyakorolt hatásait vizsgálták, *in utero* és posztnatális kitettség esetén, amelynek során a mért biomarker koncentrációk összefüggést mutattak a fehérvérsejtekben számos növekedési, jelátviteli és immunfolyamatokban kulcsszerepet játszó génekhez tartozó genomi régiók metiláltsági fokával (Ghantous et al., 2021; Hernandez-Vargas et al., 2015). Mindazonáltal összességében elmondható, hogy a terhesség/vemhesség során bekövetkező AFB1-expozíció biológiai következményei és azok ok-okozati viszonyrendszere részletesebb megismerésre szorul.

Az AFB1 fejlődő embrióra gyakorolt toxicitásáról *in vivo* emlős, madár, hal, illetve *in vitro* modellek egyaránt számot adnak. Az ide vonatkozó (habár elsődlegesen nem az embriotoxicitás feltérképezését célzó) korai *in vitro* vizsgálatok csirke, kacska és humán embrió eredetű sejt kultúrákon tesztelték az AFB1 direkt hatásait, amely többek között a sejtek pusztulásában, növekedésük gátlásában és alapvető strukturális elváltozásokban (pl. sejtmag/sejtmagvacskák aránya, citoplazma állapota) mutatkozott meg (Gabliks et al., 1965; Terao, 1967; Zuckerman et al., 1967; Zuckerman & Fulton, 1966). Az alternatív embriotoxikológiai modellek fejlődése olyan *in vitro* embriókultúrák kialakítását tette lehetővé, amelyek már egy komplexebb és intaktabb fejlődésbiológiai rendszert szolgáltatnak a xenobiotikumok hatásvizsgálatához (Abeydeera et al., 1998; Genschow et al., 2002; Lee et al., 2012). Jelentős morfológiai, főként a velőcsőt érintő defektusokat eredményezett teljes embrió tenyésztésben (*whole embryo culture*) az AFB1, valamint annak májfrakcióval metabolikusan aktivált

formája patkánynál (Geissler & Faustman, 1988). Sertés és szarvasmarha embrió kultúra AFB1-kitettsége zavart okozott a hólyagsíra kialakulásában, illetve oxidatív stresszt indukált, továbbá sertésnél DNS károsodás, apoptotikus és autofágiás folyamatok voltak tapasztalhatóak (Jiang et al., 2019; Shin et al., 2018). Ezeknek az *in vitro* embrió tenyészetben alapuló modelleknek a hátrányai, hogy viszonylag költségesek, nehezen kivitelezhetőek, az embrionális fejlődésnek általában csak a korai fázisát képviselik (Augustine-Rauch et al., 2010; Lee et al., 2012), illetve maga az *in vitro* környezet számos stresszfaktort hordoz, ami jelentős mértékben befolyásolhatja az embriogenezist (Wale & Gardner, 2016).

Az emlős vizsgálatokban az *in utero* expozíció a vemhes nőstény kezelése által valósul meg, általában gyomorszondán keresztül/gavázsolással vagy intraperitoneális injektálással. Az utódokat meghatározott fejlődési stádiumban császármetszés segítségével kiemelik, vagy ellést követően vizsgálják. A maternális AFB1-kitettség jelentős mértékben csökkentette háromhetes patkányembriók tüdőjének foszfolipid szintézisét, ugyanakkor növelte annak teljes neutrális lipid termelését, amely különböző ultrastrukturális elváltozásokkal párosult (Das et al., 1978). Szintén patkánynál az anyai kitettség csökkent születési tömeget, halvaszületést, emésztő-, kiválasztó- és idegrendszerre kiterjedő tumorképződést (Goerttler et al., 1980), lokomotoros és tanulási képességek romlását (Kihara et al., 2001), valamint széles körű reprotoxicitást (ivarszervek fejlődése, ivararány, sperma minőség és mennyiség, androgén hormonok termelése, szaporodási ráta) eredményezett az utódgenerációban (Supriya & Reddy, 2015). Nyúlra kifejezetten jellemző teratogén hatásként mutatkozik meg a szemgödör megnagyobbodása, ami a szemgolyó csökkent méretével (*microphthalmia*) párosul, emellett további csontfejlődési problémák és a májlebenyek patológiás elváltozásai is megjelennek (El-Nahla et al., 2013; Wangikar et al., 2005). Az *in vivo* emlős tesztek a legkomplexebb modelljei a humán *in utero* toxin-kitettség hatásvizsgálatának, ugyanakkor az embriót érő toxin koncentrációja nehezen szabályozható/meghatározható, az elváltozások valós idejű monitorozása körülményes, a vizsgálatok igen költségesek és adott esetben bioetikai problémákat is felvethetnek. Mindemellert, az embrionális következmények értékelése során nehezen választhatók szét az anyai kitettségből fakadó másodlagos károsító hatások a xenobiotikum embrióra gyakorolt direkt hatásaitól, amely adott esetben megnehezítheti a vizsgálati anyag toxicitásának hátterében álló mechanizmusok mélyebb szintű feltérképezését. Az egyik alternatívát e tekintetben az *in ovo*

madárembrió modellek szolgáltatathatják.¹ AFB1 expozíció esetén az injektálás módszerét alkalmazzák, amelynek során a tojáshéjon lyukat képeznek, majd az oldószerben felvett toxint pl. a légkamrába vagy a sziktömlőbe injektálják, a mintavételezés pedig a kelést követően történik. Elsősorban csirkéken végezték ezeket a toxicitási tesztek. Teratogén tünetként a végtagok torzulása, a csökkent testméret és az egyenetlen tollazottság jelent meg a kezelt csoportokban (Bassir & Adekunle, 1970). Több kísérleti munka is beszámolt különböző vérparaméterek, illetve az immunrendszer befolyásolásáról AFB1 kitettséget követően a kikelt csibéknél. Csökkent hematokrit, hemoglobinszint, emelkedett monocita és limfocita számot, a makrofágok fagocitotikus képességének redukálódását, illetve a B-limfocita differenciáció központi szervének, a Fabricius-féle tömlőnek alulfejlettségét eredményezte a kezelés (Dietert et al., 1983; Neldon-Ortiz & Qureshi, 1992; Sur & Celik, 2003). Meg kell azonban említeni, hogy ezekben a kísérletekben az oldószeres kontroll több esetben is számottevő mortalitást eredményezett a nem-injektált csoporthoz képest.

A xenobiotikumok fejlődő embrióra gyakorolt káros hatásainak vizsgálatában igen nagy jelentőséggel bírnak a külső megtermékenyítésű halak, mivel többek között lehetővé teszik az expozíció mértékének/idejének pontosabb szabályozását, miközben az embriók valós időben monitorozhatók és könnyen mintavételezhetőek. Főként szivárványos pisztrágon vizsgálták az AFB1 egyes embrionális hatásait, a zebradánióon végzett, viszonylag részletesebb ide vonatkozó munkák az elmúlt pár évben kezdtek el megjelenni a szakirodalomban. Pisztrágnál a máj kialakulásának időszakában történő egyszeri AFB1-kezelés szignifikáns mértékben növelte a máj tumoros megbetegedésének előfordulását az expozíciót követő 12 hónapban (Wales et al., 1978). Továbbá, az embrionális kitettség jelentős kihatással volt a juvenilis egyedek adaptív immunitására, amely többek között a fehérvérsejtek mitogén aktivált proliferációjának és immunglobulin termelésének növekedésében (Ottinger & Kaattari, 2000), hemocianin által kiváltott másodlagos immunválasz során azonban csökkent antitestképződésben nyilvánult meg (Arkoosh & Kaattari, 1987). A zebradánió embriókon végzett részletesebb vizsgálatok elsősorban a fejlődő idegrendszerre gyakorolt hatásokra fókuszáltak. Az embrionális AFB1-expozíció morfológiai elváltozásokat eredményezett az utóagy idegsejtjeinél, kihatással volt a háromosztátú ideg dúcának fejlődésére, a lárvák lokomotoros aktivitására és

¹ Az ide vonatkozó szakirodalom eredendően kevésbé tartja alkalmasnak a madár embriót az emlősöknél és az embernél kialakuló teratogén hatások modellezésére, ez a megközelítés azonban több szerző által megkérdőjelezetté vált (Jelinek, 1982; Wachholz et al., 2021).

menekülési reflexére (Wu et al., 2019), befolyásolta az idegrendszer fejlődésében kulcsfontosságú és neurotranszmitterként is funkcionáló aminosavak (glicin, glutaminsav, gamma-aminovajsav) metabolizmusát (Zuberi et al., 2019), valamint zavart okozott a gliasejtek homeosztázisában és a mielinációban (*myelination*) (Park et al., 2020).

2.5. A környezet szerepe az aflatoxin B1-kontaminációban

Az AFB1-kontamináció által potenciálisan érintett élelmiszerek vagy takarmányok toxin-szennyezettségének mértékét különféle környezeti és antropogén tényezők befolyásolják. Alapvetően az aflatoxin-termelő penészgombákat mezőgazdasági szempontú károkozásuk helyszínéből adódóan az ún. raktári penészek közé sorolják, életciklusuk elsődleges színtere azonban a szántóföld (Abbas et al., 2009; Miller, 1995). Az *A. flavus* életciklusa szaprofita és patogén szakaszokra különíthető el. Előbbi során a talajban és különböző növényi maradványokon áttelelő propagulumok kedvező környezeti feltételek mellett micéliumokat, azok pedig konídiumokat hoznak létre. A patogén fázis kezdetén a levegőbe kerülő konídiumok kolonizálják az új növénykultúrát. A kolonizált növényi szöveteken pedig újabb konídiumok képződnek, amelyek a szél és rovarok közreműködésével tovább növelik a termesztett növénykultúra fertőzöttségét (Abbas et al., 2009). A termés betakarítását követően a tárolás során, kedvező környezeti feltételek mellett (lásd lentebb) a gomba növekedése/toxintermelése intenzívebbé válhat. Az aflatoxin-kontamináció mértékét befolyásoló faktorok a termesztéstől kezdve a betakarítás, tárolás, feldolgozás, ellenőrzés és szabályozás folyamataig egyaránt jelen vannak (Cotty & Jaime-Garcia, 2007). Az *Aspergillus* penészgombafajok növekedését/szaporodását, illetve toxintermelését a hőmérséklet és a vízaktivitás (a_w) alapvetően meghatározza (Schmidt-Heydt et al., 2009). Az ide vonatkozó kutatómunkák eredményei között számottevő különbségek mutatkoznak meg, főként a biztosított szubsztrát (pl.: táptalaj, növény termése) és a vizsgált gombafaj mivoltától függően. Összességében elmondható, hogy a hőmérsékleti és vízaktivitási értékek emelkedése (20-37 °C és 0,90-0,99 a_w tartományokban) általában kedveznek a gomba növekedésének és/vagy aflatoxin-termelésének, mindemellett pl. az alacsony vízaktivitás és magas hőmérséklet együttese (aszályos időszakok) is jelentősen indukálhatja az aflatoxin-szintézisben kulcsszerepet játszó gének kifejeződését (Benkerroum, 2020b; Lahouar et al., 2016; Medina et al., 2015, 2017). Fontos kiemelni tehát, hogy az aflatoxin

produkció mértékében kifejezetten nagy szerepet játszik egyrészt a hő- és víz/szárazságstressz, vagyis a viszonylag magas hőmérséklet (>35 °C) és ezzel párhuzamosan a vízaktivitás meghatározott szélső értékeinek (0,91; 0,99 a_w) fennállása, másrészt pedig ezeknek a tényezőknek adott időn belüli szélsőséges megváltozása/váltakozása (Kos et al., 2013). További meghatározó tényezők az aflatoxin-kontaminációban:

1. *Mikrobiális kompetíció.* Bizonyos, nem-toxigenikus penészgomba törzsek kompetícióba léphetnek az aflatoxin termelő *Aspergillus* törzsekkel, visszaszorítva azokat az adott mikrobiális közösségben, amely lehetőséget biztosít az aflatoxin-szennyezettség csökkentése érdekében történő biológiai védekezésre (Alberts et al., 2017).
2. *Agrotechnológia.* Többek között a nem megfelelő talajelőkészítés és vetéssűrűség, a direktvetés, a nem elegendő öntözés, a kártevők elleni védekezés hiánya, korai vagy késői betakarítás, a termés mechanikai sérülése, a termés elégtelen szárítása, illetve a nem megfelelő raktározási és szállítási körülmények (pl. magas hőmérséklet és páratartalom) jelentős mértékben megnövelhetik az aflatoxin-szennyezettség mértékét (Marroquín-Cardona et al., 2014; Park & Bos, 2007).
3. *Kártevők.* A különböző kártevő rovarok egyrészt a termésen okozott sérülések által behatolási kapukat biztosítanak a fertőző ágensek számára, másrészt hozzájárulnak a konídiumok terjesztéséhez, mindezekkel elősegítve a növénykultúra adott penészgombák általi kolonizálását (Diener et al., 1987).
4. *Gomba-növény interakció.* A penészgomba-fertőzés hatására a növényben olyan, különböző szerves molekulák (pl. aldehidek, ketonok, antocianidinek) keletkezhetnek, amelyek a gomba anyagcseréjének gátlását, vagy esetenként éppen a mikotoxin-produkció indukálását is eredményezhetik (Cleveland et al., 2009).

A klímaváltozásból adódó átlaghőmérséklet-növekedés, szélsőséges, hektikus időjárási körülmények, illetve a kártevő rovarok terjedése tehát jelentős mértékben befolyásolhatják a penészgombák elterjedését/szaporodását és/vagy mikotoxin-termelését, továbbá megváltoztathatják a növényvel interakcióba lépő gombaközösség összetételét (Paterson & Lima, 2010). Az ember aflatoxin-kitettsége tekintetében – különösképpen a kiugróan magas értékeket mutató esetek miatt – főként trópusi

régiók érintettek legnagyobb mértékben (Gong et al., 2016). Amellett azonban, hogy a szennyeződött termékek nemzetközi kereskedelmével a mikotoxinok globális szintű problémaként jelennek meg, a klímaváltozás hatására egyre több mediterrán, illetve kontinentális éghajlatú termőterület válik érintetté (Marroquín-Cardona et al., 2014). Szerbiai kukorica ültetvények betakarításkor történő monitorozása során megmutatkozott, hogy míg az *Aspergillus* gombafajok számára relatíve kevésbé kedvező lokális időjárási körülményeket mutató 2009-2011-es periódus nem eredményezett detektálható mennyiségű aflatoxin-kontaminációt, addig az erősen aszályos, kiugróan magas napi hőmérsékleti értékeket felvonultató 2012. évben a minták közel 70 százaléka volt aflatoxin-szennyezett, 36,3 µg/kg-os átlagértéket mutatva (Kos et al., 2013). Dobolyi és mtsai. (2013) magyarországi kukoricaültetvények *A. flavus* általi fertőzöttségét vizsgálták 2009 és 2010 között, amelynek során a minták több mint 60 százalékaról izoláltak *A. flavus* törzseket, amelyek közel ötöde 5 µg/kg feletti AFB1 produkcióra volt képes. A kontaminációból adódó fokozódó problémák a nemzetközi kereskedelemben is megmutatkoznak. A RASFF éves jelentései alapján az Egyesült Államokból Európába exportált olajos magvak (földimogyoró, pisztácia, mandula) aflatoxin-szennyezettség miatt történő határátkelőhelyi visszafordítása 2012 és 2019 között fokozatosan növekvő esetszámot mutat (Alshannaq & Yu, 2021).

Számos prediktív modell került kidolgozásra annak érdekében, hogy különböző klimatikus forgatókönyvek alapján becsléseket adjanak az adott penészgombafajok mikotoxin-termeléséről, egyes esetekben pedig adott növényre vonatkozóan a várható mikotoxin-szennyezettségről. Battilani és mtsai. (2016) felhívják a figyelmet arra, hogy +2 °C átlaghőmérséklet növekedés esetén jelentősen emelkedhet Dél- és Délkelet-Európa egyes országaiban a termesztett kukorica AFB1-terheltsége. Ukrajnára vonatkozóan három különböző típusú prediktív modell alkalmazása esetén egy csökkenést, míg a másik két modell jelentős mértékű növekedést vetít előre a 2030. évre a termesztett kukorica AFB1-szennyezettségében, kiemelve az ország délkeleti régiójának veszélyeztetettségét (Van der Fels-Klerx et al., 2019). A viszonylag magasabb „aflatoxin-kockázatú” területek határainak kitolódását prognosztizálják az Egyesült Államok esetén is, amely a kukorica-öv (*Corn Belt*) fokozott érintettségét vonná maga után (Yu et al., 2018).

2.6. Az ember aflatoxin B1-kitettsége

Az AFB1 elsősorban a szennyeződött élelmiszerek elfogyasztásával kerül az emberi szervezetbe. Legnagyobb mértékben egyes afrikai és dél-ázsiai területek érintettek, ahol a magas hőmérséklet és páratartalom, valamint a nem megfelelő raktározási körülmények kedveznek az *Aspergillus* fajok terjedésének/toxintermelésének. A kontaminálódott alapvető (pl. kukorica és földimogyoró alapú) élelmiszerek sok esetben kizárólagos fogyasztása a határértékekre vonatkozó szabályok hiányával párosulva fokozott kockázatot jelent az itt élő közösségek számára (Gong et al., 2016; Marroquín-Cardona et al., 2014). Az aflatoxin-terheltség validált biomarkerei közé a vizeletben mért AFM1 és AFB-N7-guanin, valamint a vérben mért AFB-albumin tartozik, de több kutatás a vér AFB1 koncentrációját veszi alapul. (Turner, 2013). A krónikus AFB1-kitettség felmérésére ezek közül leginkább az AFB1-albumin addukt vérből történő meghatározása alkalmas, mivel annak felezési ideje jóval hosszabb (kb. 2 hónap) a többi biomarkerhez képest (Gong et al., 2016). A fentebb említett, veszélyeztetett régiókban élő emberektől vett mintákban mért AFB1-albumin értékek az alsó detektálhatósági határtól az 1000 pg/mg albumin-ig terjedtek (Turner et al., 2012). A humán *in utero* AFB1-kitettségről és annak egyes következményeit vizsgáló munkákról a 2.3.7. fejezetben már említést tettünk. Fontos megjegyezni, hogy az anyát érő AFB1-terhelés egyik további potenciális velejárója lehet a fejlődő utód anyatejen keresztüli AFM1-expozíciója, amely szintén kiemelt egészségügyi kockázatokat hordozhat (Magoha et al., 2014). További AFB1-kitettség érheti az utódot a kontaminálódott tápszeren keresztül, elsősorban szintén afrikai, dél ázsiai fejlődő országokra vonatkozóan. A csecsemő- és korai gyermekkor periódusa többek között az intenzív növekedés, valamint az adott testtömegre vonatkoztatott magasabb expozíciós értékek által igen kritikus időszakot jelent az AFB1 expozíció során (Gong et al., 2016).

Ahogy az előző alfejezetben bemutatásra került, a klímaváltozás következtében egyre több földrajzi régió számára válhat problémává egyes kultúrnövények (pl. kukorica) terméseinek AFB1-kontaminációja. Érdeemes említést tenni továbbá a humán AFB1-kitettség azon potenciális eseteiről, amelyeket a klímaváltozás szintén befolyásolhat, de a toxin nem az elfogyasztott táplálékon keresztül jut a szervezetbe. Egyes munkakörökben előfordulhat a tüdön és/vagy bőrön keresztüli felszívódás. Ez elsősorban hulladékválogató/feldolgozó, valamint malomipari üzemeknél jelenhet meg, például hiányos, vagy nem megfelelő védőfelszerelés mellett. Egy portugál

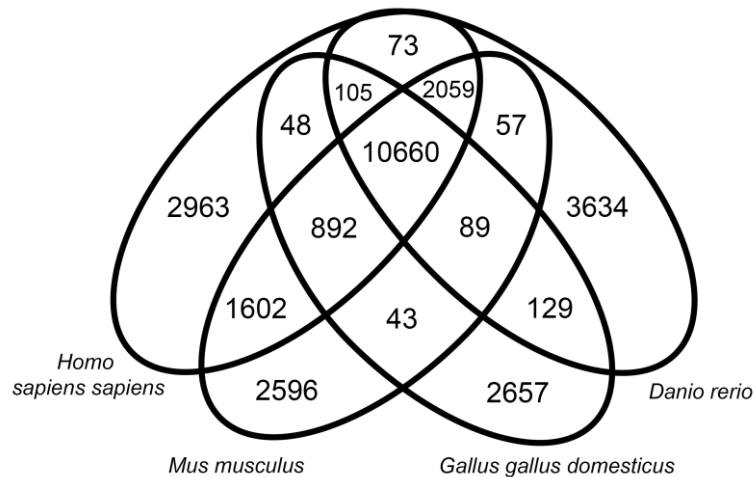
hulladékkezelő üzem dolgozóinak vizsgálatokor 2,5 – 25,9 ng/ml értékek között mozgott a vérérum AFB1 koncentrációja, míg a munkakörön kívüli kontroll csoportnál a toxin nem volt jelen detektálható mennyiségben (Viegas et al., 2015). Lengyel hulladékkezelő üzem szortírozó-kabin levegőinek monitorozásakor az *A. flavus* volt a legnagyobb százalékban kimutatott gombafaj (Bragoszewska, 2020). Nigériai takarmánymalmok levegőjéből szintén az *A. flavus* volt a leggyakoribb kitenyészthető gomba, mindemelett a különböző malmokban dolgozó emberek vérének vizsgálatokor 73,4 – 189,2 ng/ml átlagos AFB1 koncentrációkat detektáltak (kontroll: nd) (Oluwafemi et al., 2012).

2.7. A zebradánió, mint toxikológiai modellszervezet

A szubtrópusi eredettel rendelkező, közkedvelt akvárium halfaj, a zebradánió az 1960-as évek végén egy magyar származású genetikus, Streisinger György közreműködésével lépett a tudomány színterére, mint gerinces modell szervezet. Számos előnyös tulajdonsága miatt rövid időn belül a molekuláris genetika és fejlődésbiológia igen előremutató modellszervezetévé vált (Meunier, 2012). A fajon végzet kutatómunkák száma az 1990-es évektől napjainkig rohamos növekedést mutat. Mára a zebradánió kiemelt vizsgálati alanyává vált a biológia megannyi tudományágának, alkalmazása különösen nagy jelentőséggel bír a toxikológia és ökotoxikológia területén. Legfontosabb előnyös tulajdonságai közé tartozik a rövid generációs idő, a relatíve nagy mennyiségű és gyakori ikraprodukción, az ikrák külső termékenyülése, a gyors embrionális fejlődés, az embriók átlátszósága, valamint a felnőtt egyedek viszonylag kis testmérete és csoportban tarthatósága (Detrich et al., 1999). Az embrionális fejlődés során az embriók mikroszkóp alatt valós időben nyomon követhetők és könnyen manipulálhatók. Számos, fajra adaptált molekuláris biológiai, biokémiai, immunbiológiai és toxikológiai módszer került kidolgozásra, amely a nagy mintaelemszámmal és hatékony monitorozási technológiákkal párosulva lehetővé teszi a nagy áteresztőképességű tesztrendszerek kialakítását. Mindemellet transzgenikus és mutáns zebradánió vonalak létrehozásának lehetősége, valamint már kialakított vonalak széles tárháza áll rendelkezésre a kutatók számára (Spitsbergen & Kent, 2003). A leggyakoribb laboratóriumi zebradánió törzsek közé az AB, a Tübingen és a WIK tartoznak (Holden & Brown, 2018). A faj tartás- és szaporítás-technológiája jól kidolgozott és lehetővé teszi a laboratóriumi minőségbiztosítási rendszerben való működést (*Good Laboratory Practice*, GLP) (Wolf & Wolfe, 2003). Továbbá, az

1994-ben alapított *Zebrafish Information Network* (ZFIN, <https://zfin.org>) a fajon végzett egyre növekvő számú kutatásoknak és fejlesztéseknek köszönhetően egy rendkívül gazdag tudásbázist biztosít a kutatók számára. A ZFIN alapvetően egy genetikai és genomikai adatbázis és központ, amely lehetővé teszi többek között a zebradánió gének, transzkriptumok, ortológok, transzgenikus és mutáns fenotípusok, antitestek, betegség modellek és különböző ontológiák közötti célirányos keresést és tájékozódást (Van Slyke et al., 2018).

A környezetünkben egyre növekvő számban megjelenő szennyező anyagok infra- és szupraindividuális szinten egyaránt komoly problémákat okoznak. Mindez előtérbe helyezi azokat a modellszervezeteket, amelyek viszonylag nagy mintaelemszámmal vizsgálhatók, egy trofikus hálózat valamely kulcsszereplőjét képviselik vagy olyan molekuláris, sejt, szövet, szerv, szervrendszer szintű tulajdonságokat hordoznak, amelyek alapot szolgáltathatnak a vizsgálati eredmények emlősök vagy az ember irányába történő bizonyos fokú extrapolációjára. A zebradánió e tekintetben kettős szerepet tölt be. Egyrészt az édesvízi ökoszisztémák egyik fontos reprezentánsaként, mint ökotoxikológiai modell lép előtérbe, másrészt pedig számos jól konzervált tulajdonságából adódóan, az emlős és humán toxin-kitettség, illetve az abból fakadó betegségek modellezésében is fontos szerepet tölt be (Scholz et al., 2008; Tal et al., 2020). A zebradánió, mint humán betegség modell előretörésének nagy lendületet adott a Sanger Intézet által 2001-ben kezdeményezett genom-szekvenálási projekt, amelynek eredményei lehetővé tették a zebradánió genom humán genommal történő összehasonlítását (Howe et al., 2013). A fehérjét kódoló humán gének 71,4 %-a rendelkezik legalább egy zebradánió ortológgal. Az *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) adatbázisban 2013-ban listázott, leírt fenotípusos eltéréshez köthető humán betegség-asszociált gének 82%-a megjelent ezek között a zebradánió ortológok között (Howe et al., 2013). Az ember, az egér, a házi tyúk és a zebradánió ortológok megoszlását a 4. ábra mutatja be.



4. ábra. Az ember, az egér, a házi tyúk és a zebradánió fehérje kódoló gének ortológok szerinti megoszlása (Howe et al., 2013. alapján a szerző által módosítva).

A zebradánió modellek tehát fontos elemét képezik az ún. transzlációs toxikológiai kutatásoknak, amelyek legfőbb aspektusai az alábbiakban összegezhetők: a) több egyedfejlődési stádiumon keresztül, vagy élethosszig tartó hatásvizsgálat; b) a xenobiotikumok támadáspontjainak megismerése; c) predikciók a toxicitásról más fajok, különös tekintettel az ember irányába; d) modellfejlesztés a toxikózis megelőzését/kezelését/mérséklését célzó hatóanyagok vizsgálatához (Tal et al., 2020).

Az állatkísérletekből fakadó bioetikai kérdések elvezettek többek között a 3R szabály megfogalmazásához, amely a) a gerinces modelleket érő fájdalomcsökkentés érdekében azok alternatív, pl. *in vitro* illetve *in silico* tesztekre történő „kiváltását” (*Replacement*), b) a kísérletbe vont állatok számának csökkentését (*Reduction*) és c) a fájdalom minimalizálása érdekében történő módszerfejlesztést/kifinomítást (*Refinement*) szorgalmazzák (Richmond, 2000). Az önállóan nem táplálkozó stádiumú zebradánió embriók/lárvák – amelyek nem tartoznak a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU direktíva hatálya alá – nagymértékben alkalmasak a 3R szabály mentén történő kísérleti rendszerek felállítására. A 3R további 7 alapelvvel (*Registration, Reporting, Robustness, Reproducibility, Relevance, Responsibility, Respect*) egészült ki a tudományos közösség által létrehozva a zebradánió végzett kutatómunka „10R szabályát” (Canedo et al., 2022).

Az *in utero* xenobiotikum-expozíció embrionális fejlődésre gyakorolt hatásainak részletesebb vizsgálata az emlős modellek esetén számos korlátba ütközik, viszonylag magas költségekkel jár, és bioetikai problémákat vonhat maga után. A zebradánió embrió egy viszonylag költséghatékony alternatívát képvisel az *in utero* vizsgálatok

és az *in vitro* tesztek között. Noha nem biztosítja az anya-placenta-magzat kapcsolatrendszerének komplexitását, azonban lehetővé teszi az adott vizsgálati anyag embrióra gyakorolt direkt hatásainak feltérképezését.

A zebradánió embrionális fejlődése körülbelül 5 nap alatt lezajlik. A víz hőmérsékletétől függően az embriók a termékenyülést követő 2-3. nap során kelnek ki az ikraburokból (Goessling & Sadler, 2015; Kimmel et al., 1995). Fejlődésükhöz és felépítő folyamataikhoz szükséges energiát és alapvető, egyszerűbb vegyületeket a szik által raktározott tartalék táplálóanyagokból fedezik (Winnicki et al., 2001). Az embrionális fejlődés során a szikzacskó anyagai fokozatosan mobilizálódnak, amellyel párhuzamosan differenciálódik az emésztő csatorna, így az embrionális fejlődés időszakát követően a lárvák táplálkozó stádiumba léphetnek (Quinlivan & Farber, 2017). Itt meg kell jegyezni, hogy a szakirodalom nem egységes a zebradánió embrió/lárva kifejezés alkalmazása tekintetében. Egyes szerzők a lárva elnevezést az embrionális fejlődést követő, önállóan táplálkozó stádiumtól, míg mások már az ikraburokból történő keléstől számítva használják (Kristofco et al., 2018; van Wijk et al., 2019). Mindemellett az ikraburokból kikelt, de még önállóan nem táplálkozó stádiumú zebradániók esetén az eleuthero-embrió kifejezés is gyakran megjelenik (Strähle et al., 2012). A doktori munkám vizsgálatának időbeli végpontját az embrionális fejlődés időszakának vége képezte, amely stádium esetén a lárva kifejezés használata mellett döntöttem.

Az embrionális fejlődés végére a zebradánió legtöbb szerve kialakul, így az embrionális toxin-expozíció szervi-differenciációra gyakorolt hatásai viszonylag rövid idő alatt feltérképezhetők (Scholz et al., 2008). Mindez olyan új-generációs szekvenálási módszerekkel és bioinformatikai analízisekkel párosítható, amelyek teljes transzkriptóm szintű betekintést nyújtanak az adott xenobiotikum által érintett biológiai útvonalakba.

Az embrionális expozíciót követően az akut és krónikus következmények hatékonyan vizsgálhatók. Előbbi esetben modellezhetők az adott vizsgálati anyag toxikokinetikai (felszívódás, eloszlás, kiválasztás) és toxikodinámiai (hatásmechanizmus, támadáspont) tulajdonságai, a hosszú távú hatások feltérképezése során pedig betekintés nyerhető többek között a xenobiotikum tumorképződést, felnőtt kori immunológiai és szaporodásbiológiai problémákat eredményező, valamint multi-és transzgenerációs hatásaiba (Scholz et al., 2008).

Kiemelten fontos szerepet töltenek be az embrionális xenobiotikum-expozíció hatásvizsgálatában azok a transzgenikus zebradánió reporter vonalak, amelyek sejt,

szövet, vagy szerv(rendszer) specifikus fluoreszcens jelet bocsátanak ki. Mivel az embrionális és korai lárvális stádiumokban az egyedek gyengén pigmentáltak, illetve mesterséges módon depigmentálhatók, ezért az adott struktúrákat érintő eltérések fluoreszcens mikroszkóp alatt valós időben, *in vivo* monitorozhatók. Az **1. táblázat** a teljesség igénye nélkül felsorol néhány, toxikológiai és ökotoxikológiai kutatások számára is releváns transzgenikus zebradánió vonalat és azok funkcióit (lásd még: Silva Brito et al., 2022).

1. táblázat. Xenobiotikumok toxicitásának vizsgálatára alkalmas transzgenikus zebradánió vonalak (Silva Brito et al., 2022. nyomán)

Vizsgálati terület	Célsejt/szövet/szerv	Vonal megnevezése	Referencia
neurotoxicitás	retina, agy, gerincvelő	<i>Tg(elav3l: GFP)</i>	(Park et al., 2000)
	motoneuronok	<i>Tg(olig2: dsRED)</i>	(Kim et al., 2008)
	motoneuronok	<i>Tg(mnx1: GFP)</i>	(Flanagan-Steet et al., 2005)
	gliasejtek	<i>Tg(gfap: EGFP)</i>	(Bernardos & Raymond, 2006)
	monoaminerg neuronok	<i>Tg(ETvmat2: GFP)</i>	(Wen et al., 2008)
	gerinchúr, fenéklemez	<i>Tg(-2.2shh:gfp:ABC)</i>	(Shkumatava et al., 2004)
vazo- és hematotoxicitás	érrendszer (endotél sejtek)	<i>Tg(fli1:EGFP)</i>	(Tal et al., 2017)
	szív érhálózata (endotél sejtek)	<i>Tg(kdrl:mCherry)</i>	(Chi et al., 2008)
	eritrociták	<i>Tg(gata-1:DsRed)</i>	(Yaqoob et al., 2009)
kardiotoxicitás	szívizom	<i>Tg(myh7:EGFP)</i>	(Huang et al., 2003)
hepatotoxicitás	máj	<i>Tg(fabp10:DsRed)</i>	(Chu & Sadler, 2009)
endokrin zavarok	radiális gliasejtek (aromatáz)	<i>Tg(cyp19a1b-GFP)</i>	(Brion et al., 2012)
immunmoduláció	neutrofil granulociták	<i>Tg(mpx:EGFP)</i>	(Renshaw et al., 2006)
	makrofágok	<i>Tg(mpeg1:mCherry)</i>	(Torraca et al., 2017)
ototoxicitás	szőrsejtek	<i>Tg(pou4f3:gap43-GFP)</i>	(Namdaran et al., 2012)
pankreatotoxicitás	β -sejtek	<i>Tg(ins:GFP)</i>	(Huang et al., 2001)

2.8. Az immunrendszer kialakulásának főbb jellegzetességei zebradánióban

A gerincesek immunrendszere alapvetően két, szoros együttműködésben és átfedésben álló részre, az ősből veleszületett, valamint az evolúció során az állkapocs nélküli és állkapocsos halak őseinél kialakuló adaptív immunrendszerre különíthető (Sutoh & Kasahara, 2021). A veleszületett immunrendszer elemei alapvetően egy elsődleges, gyors és nem antigén-specifikus védelmi vonalat alkotnak, míg az adaptív immunrendszer klonális szelekción alapuló immunmemória és antigén-specifikus immunválasz kialakítására képes (Hoebe et al., 2004; Rajewsky, 1996). Az állkapocsos halak és az emlősök immunrendszere között számos, humorális, sejt és szerv szintű hasonlóság mutatkozik meg. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy a halak adaptív immunrendszere nem képviseli azt a komplexitást és működésbeli fejlettséget, amit az emlősök esetén tapasztalhatunk, a patogén ágensekkel szemben elsősorban a robusztusabb veleszületett immunrendszerükre hagyatkoznak (Tort et al., 2003). Ellentétben az emlősökkel, a halaknál csontvelő nem alakult ki, a vérképzés elsődleges helye a fejvese. Nyirokcsomók szintén nem találhatók, azonban azok primitív analógjaiként csontoshalaknál a lépben, illetve a vesében lokalizálható ún. melanomakrofág központok jelennek meg (Agius & Roberts, 2003).

A zebradánió embrionális és korai lárvális fejlődése során elsődlegesen a veleszületett immunrendszerére támaszkodhat, mivel funkcionálisan érett adaptív immunrendszer csak a termékenyülést követő 4-6. hétre alakul ki (Lam et al., 2004). Az immunrendszer sejtes elemei multipotens őssejtekből alakulnak ki a vérképzés folyamata során, amely két ágra, a mielopoézisre, valamint a limfopoézisre különíthető el (a harmadik fő ág az eritrocitákat létrehozó eritropoezis). A mieloid vonal hozza létre azokat a fehérvérsejteket, amelyek főként a veleszületett, a limfoid vonal pedig azokat, amelyek az adaptív immunrendszerhez köthetők (Ellett & Lieschke, 2010; Kondo, 2009).

A gerincesek embrionális vérképzése primitív és definitív szakaszokra osztható (Zon, 1995). A zebradánió esetén a primitív szakasz a termékenyülés első 24 órájában megkezdődik, amelynek eredményeként elsőként primitív makrofágok alakulnak ki az ún. rostrális vérképző sziget területén, amelyek ezt követően az embrió különböző régióiba (pl. szikzacskó) vándorolnak és tovább differenciálódnak (Detrich et al., 1995; Herbomel et al., 1999; Lieschke et al., 2002). Ezen a „kezdeti mieloid” vonalon emellett primitív neutrofil granulocitákat is létrejönnek (Le Guyader et al., 2008). A

termékenyülést követő 48. órára fagocitózist mutató primitív makrofágok és funkcionális, peroxidáz-pozítív primitív neutrofil granulociták vannak jelen a fejlődő zebradánió embrióban (Herbomel et al., 1999; Le Guyader et al., 2008). A definitív szakasz első felében – amely az embrionális fejlődés második napján kezdődik – jelennek meg az ún. eritromieloid progenitorok (EMP), amelyekből mieloid és eritroid sejtek egyaránt differenciálódnak, vörösvérsejteket, neutrofil granulocitákat, monocitákat és makrofágokat létrehozva. Ezeknek a progenitoroknak a jelentéle azonban csak átmeneti, az egyed fejlődésének további részében a vérképzés kiindulási pontját a (definitív) vérképző őssejtek képezik, amelyek a dorzális aorta ventrális falában keletkeznek. A HSC-k ezt követően az elővesébe, a farki hematopoetikus szövetbe és a csecsemőmirigybe vándorolnak, amelyek kiemelten fontos állomásai zebradániónál az embrionális immunrendszer sejtjes elemeinek differenciációjában. A termékenyülést követő második héttől az eritroid, mieloid és limfoid vonal képződésének helyszínét fokozatosan átveszi a fejvese (Bertrand et al., 2007; Kissa et al., 2008; Murayama et al., 2006).

2.9. Veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatások vizsgálati lehetőségei zebradánió embriókon és lárvákon

A zebradánió embriók és lárvák tehát egyrészt a gerinces vérképzés ontogenezisének fontos modellszervezetét képviselik, másrészt pedig lehetőséget adnak arra, hogy a veleszületett immunrendszer főbb sejtjes és humorális elemeire (és azok fejlődésére) gyakorolt környezeti hatásokat vizsgálhassuk. A zebradánióra adaptált molekuláris biológiai, toxikológiai, biokémiai, immunológiai és műszeres (pl. fluoreszcens és konfokális mikroszkópia, mikroinjektálás) eljárások alkalmazásával és azok kombinálásával viszonylag komplex képet nyerhetünk a xenobiotikumok immunotoxikus hatásairól. Ennek egyik legfontosabb alapját az immunsejtek és az azokkal kölcsönhatásban lévő bizonyos struktúrák detektálhatósága képezi. Ezt egyrészt a már fentebb említett, fluoreszcens jelet kibocsátó genetikailag módosított zebradánió vonalak, másrészt pedig egyéb festési eljárások (pl. neutrál vörös a makrofágok, szudán fekete a granulociták jelölésére) biztosíthatják (Ko et al., 2011). Egyes multikolor transzgenikus vonalak segítségével betekintés nyerhető pl. a makrofágok és neutrofil granulociták vándorlásának egyidejű monitorozására, illetve ezen sejtek és az érhálózat interakcióinak megfigyelésére, vagy például a makrofágok és azok TNF α kifejeződésének együttes detektálására (Gray et al., 2011; Nguyen-Chi

et al., 2015). Az immunsejtek embriókon belüli pozícióját, eloszlását mikroszkópos képelemzés útján értékelhetjük, valamint számszerűsíthetjük azokat szintén fényképek alapján szoftveres módon vagy meghatározhatjuk gyakoriságukat fluoreszcencia aktivált-sejtválogatás (FACS) által. A következő, már jóval körülményesebb és sokszor nehezebben interpretálható eredményeket adó módszer a fagocitotikus képesség meghatározása. Ennek egyik módja az embriók tintával történő vénás mikroinjektálása, majd ezt követően a makrofágok neutrál vörös festése. A tintát tartalmazó makrofágok mikroszkópos és szoftveres elemzés útján elkülöníthetők és számszerűsíthetők (Yuan et al., 2020).

A xenobiotikumok immunrendszerre gyakorolt hatásainak vizsgálatában kiemelt helyen szerepelnek azok az embrionális-lárvális zebradánió modellek, amelyek lehetővé teszik az adott anyag gyulladás indukáló képességének feltérképezését, vagy pedig éppen egy általunk kiváltott gyulladás lezajlásán keresztül értékelik a veleszületett immunrendszer kompetenciáját. Ezeknek a modellrendszereknek fontos elemét képezi a gyulladásos folyamatokat kísérő és szabályozó mediátorok mennyiségi analízise. Zebradánió esetén a nitrogén-monoxid és a hidrogén-peroxid egyaránt szerepet játszanak a gyulladás szignalizációjában. Mindkét molekula termelődése valós időben, *in vivo* nyomon követhető az embriókon, lárvákon belül fluoreszcens próba (DAF-FM-DA), vagy genetikai módosítás által létrehozott hidrogén-peroxid érzékeny fluorofor (HyPer) alkalmazása által (Kojima & Nagano, 2000; Pase et al., 2012). Az immun- és gyulladás-asszociált gének (pl. pro- és anti-inflammatorikus citokinek) kifejeződésének reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével történő mérése szintén alapvető fontosságú. A gyulladásos folyamatok vizsgálatára alkalmas zebradánió embrió/lárva modellek különböző invazív és non-invazív eljárásokon alapulnak, amelyek nem csupán a xenobiotikumok hatásvizsgálatában, de különböző (terápiás célú) vegyületek anti-inflammatorikus potenciáljának megismerésében is kiemelt szerepet töltenek be. Az alábbiakban ezek közül kerül néhány bemutatásra, a teljesség igénye nélkül.

2.9.1. Mikroinjektáláson alapuló gyulladásos modellek

Az embriók üveg mikrokapillárisal történő injektálása alapvető jelentőséggel bír a genetikai módosítás vagy pl. a géncsendesítés folyamatában. A módszert – amelynek mára már automatizált, nagy-áteresztőképességű tesztekkel biztosító

technológiai is elérhető – a toxikológiai kutatásokban is alkalmazzák, mivel többek között alkalmas az adott vizsgálati anyag célzott bejuttatására (Wang et al., 2007). Lefontosabb ide tartozó embrionális/lárvális területek a szikzacskó, a gerinchúr, az agykamra, az otikus vezikula, az izomszelvények, illetve vénák (Torraca & Mostowy, 2018). A mikroinjektálásos gyulladási modellben vagy valamilyen patogén eredetű lipopoliszacharidot (LPS), vagy pedig baktériumokat (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Staphylococcus aureus*) juttatnak az embrióba/lárvába (Brannon et al., 2009; Prajsnar et al., 2012; Vergunst et al., 2010). Az injektálás helyétől függően, lokális, illetve szisztémás gyulladás alakítható ki. Ezt követően megfigyelhető az egyes immunsejtek gyulladási területre történő vándorlása, felhalmozódása, reverz migrációjuk dinamikája. Fluoreszcensen jelölt baktériumok esetén pedig nyomon követhető az azokkal való interakciók (Benard et al., 2012). Emellett, a gyulladás-indukáló anyag/agens különböző dózisokban történő injektálásával túlélési görbék is felállíthatók.

2.9.2. Úszószegély sebzésén alapuló gyulladási modellek

A zebra-dánió úszóinak kezdeti formái az embrionális fejlődés során jelennek meg, ekkor még egy folytonos úszószegélyt alkotva. Ez az úszószegély átlátszó, könnyen manipulálható és viszonylag gyors regenerációra képes. A zebra-dánió embriók és lárvák közkedvelt és igen előremutató modellként szerepelnek a gerinces szöveti regeneráció, és az azt szabályozó mechanizmusok kutatásában is (Yoshinari et al., 2009).

Az úszószegély sebzése különböző helyeken és mértékben megtehető. Az egyik leggyakrabban elterjedt eljárás a farokúszó hossz tengelyre merőleges irányú, altatásban történő, steril levágása, általában az ikraburokból való kikélest követően, 72-120 óras kor között. Ez a művelet egy alapvető gyakorlat megszerzését követően, mikroszkóp alatt könnyen és gyorsan kivitelezhető. A sebzést követő néhány percen belül a neutrofil granulociták az érpályákból kilépve az érintett területhez vándorolnak. Felhalmozódásuk mértéke/dinamikája (*recruitment*) függ a sebzés volumenétől és jellegétől (szövetek roncsolódása), a sejtszám 96-120 óras lárvák esetén a sebzést követő 2-4 óránál éri el a maximumát. A granulociták felhalmozódását némi késéssel követik a makrofágok. 12-24 óra elteltével az immunsejtek mennyisége reverz migrációjukból és/vagy apoptózisukból adódóan jelentősen csökken a regenerálódó szövet területén (Li et al., 2012; Loynes et al., 2010). A fentiekben említett

transzgenikus vonalak alkalmazásával mindez lehetővé teszi az immunsejtek lokális számszerűsítését, az érrendszerből történő ki- és belépés hatékonyságának és a gyulladás lezajlásának értékelését. Mindemellett, például képelemzés által mérhetővé válik a farokúszó regenerációjának mértéke és sebessége, amely jelentősen hozzájárul az adott vegyület lokális gyulladásra gyakorolt hatásának átfogóbb megismeréséhez (Mathew et al., 2006).

2.9.3. Nem-invazív eljárásokon alapuló gyulladási modellek

A nem-invazív beavatkozások esetén az embriókat/lárvákat a gyulladás-indukáló anyag vizes oldatában inkubálják, az expozíció tehát az egyedek teljes felületén keresztül zajlik. Ennek egyik lehetősége az LPS alapú kezelés, amely egy koncentráció-függő szisztémás gyulladást alakít ki. Az alkalmazott dózis függvényében kiértékelhetővé válik az adott immunsejtek teljes embrión/lárván belüli eloszlásának megfigyelése, mennyiségi analízise, vagy adott esetben az egyedek túlélése. Mind ehhez párosíthatók a különböző immun- és gyulladás-asszociált gének kifejeződésében megmutatkozó eltérések. Így képet kaphatunk arról, hogy az adott xenobiotikumnak való embrionális kitettség milyen mértékben képes megváltoztatni egy szisztémás gyulladási reakciót, és következtetéseket vonhatunk le a vizsgálati anyag immunkompetenciát befolyásoló hatásairól (Lee et al., 2013; Yang et al., 2014).

További nem-invazív módszerként jelenik meg a réz-szulfát által indukált lokális gyulladás. Ennek során az embriók/lárvák oldalon szervét alkotó, szőrsejtekből álló ún. neuromast központok károsodnak. Ezek az érzékelő központok transzgenikus vonalak vagy egyéb jelölési technikák segítségével mikroszkóp alatt jól lokalizálhatók. Ez lehetőséget ad annak értékelésére, hogy egy xenobiotikum-expozíció milyen mértékben teszi „fogékonyá” ezeket a neuromast központokat egy kémiai ágens (jelen esetben a réz-szulfát) károsító hatásával szemben, illetve hogyan befolyásolja a veleszületett immunrendszer sejtjeinek erre a típusú lokális gyulladásra adott válaszreakcióját (d’Alençon et al., 2010; Ghysen & Dambly-Chaudière, 2004; Hernández et al., 2006).

3. Anyag és módszer

3.1. A zebradániók tartási és szaporítási körülményei

A kísérletekbe vont embriókat szolgáltató laboratóriumi AB, valamint transzgenikus *Tg(mpx:EGFP)* és *Tg(gata1:dsRED;flk1:GFP)* zebradánió vonalak a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szent István Campusán, az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetben található zebradániók számára kialakított és fenntartott Tecniplast ZebTEC recirkulációs haltartó rendszerben kerültek felnevelésre. A szülőállomány 14/10 világos/sötét szakaszú megvilágítás mellett, $25,5 \pm 0,5$ °C hőmérsékletű, $7,0 \pm 0,2$ pH értékű, 550 ± 50 µS vezetőképességű, szűrt (mechanikai + szén), UV által sterilizett, áramoltatott vízben (rendszer víz), 3 l-es mobilis medencékben, 5-7 egyed/l egyedsűrűséggel volt fenntartva. Az állomány takarmányozása/etetése naponta, életkornak megfelelő szemcseméretű haltáppal (SDS Zebrafeed), valamint tengeri sórákkal (*Artemia salina*) történt. Az ivarérett, felnőtt halak szaporítása erre a célra kialakított, válaszfalal ellátott rácsos aljú szaporítómedencékben zajlott. Az ivást követően a leadott ikratétel 10 cm átmérőjű, friss rendszer vizet tartalmazó Petri csészékbe lett összegyűjtve, majd pedig a termékenyült és normális sejtosztódást mutató embriók fénymikroszkóp alatt steril műanyag Pasteur pipetták segítségével kiválogatásra kerültek.

3.2. Embrionális aflatoxin B1-expozíció szubletális koncentrációkkal

Annak érdekében, hogy kijelölhessem az alkalmazandó, viszonylag alacsony, szubletális AFB1 koncentráció értékeket, elsőként 120 órás intervallumra kiterjesztett *Fish embryo toxicity* (FET) tesztet végeztem el az OECD 236 irányelv alapján. Ennek során a 8-16 sejt stádiumban lévő zebradánió embriók egyedileg, 24 lyukú sejtenyésző lemezekbe kerültek, 2 ml/embrió végtérfogattal. A FET tesztben alkalmazott kezelési koncentrációk (0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25 és 0,5 mg/l) dimetil-szulfoxidban (DMSO) felvett 1 mg/ml-es AFB1 törzsoldat rendszer vízben történő hígításával készültek. Az oldószeres kontroll csoport esetén az oldószer (DMSO) mennyisége nem haladta meg a 0,01 térfogatszázalékot. A FET teszt két független kísérlettel, csoportonként három ismétlésben került kivitelezésre, ismétlésenként 10 egyed alkalmazva (N = 60/csoport). A teszt során naponta feljegyeztem az elpusztult embriók számát. A mortalitási értékek alapján a koncentráció-válasz összefüggést,

valamint az 1, 10 és 50 % pusztulást eredményező AFB1 koncentrációkat (LC1, LC10, LC50) OriginPro szoftver segítségével határoztam meg, az alábbi egyenlet szerint: $y = A1 + (A2 - A1) / (1 + 10^{((\text{LOG}x0 - x) * p)})$, ahol A1: alsó aszimptóta; A2: felső aszimptóta (a koncentráció válasz görbe alsó és felső platói által közelített vízszintes egyenesek); LOGx0: a függvény középpontja; p: Hill koefficiens (a görbe meredeksége). A további kísérletek során alkalmazott, szubletális koncentrációk (0,025; 0,05; 0,075 és 0,1 mg/l) felső határa az LC10 érték alapján került kijelölésre. Az ide vonatkozó AFB1-expozíciók 10 cm átmérőjű Petri-csészékben zajlottak, $25,5 \pm 0,5$ °C hőmérsékletet biztosító inkubátorokban, 20 embrió/40 ml, illetve 30 embrió/45 ml végtérfogatban, szintén 120 órás kezelési idővel.

3.3. Morfológiai elváltozások értékelése

Az embrionális AFB1-expozíció végén, a termékenyülést követő 120. órát megelőzően (120 hours post fertilisation, hpf) a zebradánió lárvákat altatásba vittem, trikain-metánszulfonát (MS-222) rendszervizes oldatának (168 mg/l) segítségével. Ezt követően mikroszkóp (Leica M205 FA, Leica DFC 7000 T kamera, Leica Application Suite X szoftver, Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) alatt oldalnézeti fényképeket készítettem a lárvákról, három ismétlésben, ismétlésenként 10 egyeddel (N=30/csoport). A teljes testhosszt, az úszóhólyag oldalnézeti területét és a relatív bélhosszt a fényképek alapján ImageJ szoftverrel határoztam meg. A lárvák érrendszerében bekövetkező morfológiai elváltozások megfigyeléséhez *Tg(gata1:dsRED;flkl:GFP)* vér-érrendszer specifikus transzgenikus zebradánió vonalat alkalmaztam. A kontroll, illetve kezelt csoportok összehasonlítása a fentiekben leírt mikroszkópos technikával készült fényképek alapján történt, GFP és mCherry szűrők alkalmazása mellett.

3.4. RNS szekvenálás és teljes transzkriptom analízis

A teljes RNS szekvenálást és analízist a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végeztük. Ennél a vizsgálatnál az embrionális AFB1-expozíciót a kijelölt szubletális koncentráció sor legmagasabb, LC10 értéket megközelítő koncentrációjával (0,1 mg/l \approx LC10) végeztük el. Az AFB1-expozíció végén, csoportonként 4 ismétlésben, ismétlésenként 30 lárva 200 μ l Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csővekben (30 lárva/cső) homogenizálásra került, majd

400 µl-re kiegészítve -80 °C hőmérsékleten lett eltárolva. Az RNS izolálást kloroformos elválasztás/izopropanolos precipitáció/etanolos mosás módszerével végeztük. Az RNS integritását Eukaryotic Total RNA Nano Kit és Agilent BioAnalyzer automata gélelektroforézis készülék segítségével határoztuk meg. Szekvenálásra azok a minták kerültek, ahol az RNS integritás értéke (*RNA integrity number (RIN) value*) 7-nél nagyobb volt. Az RNS könyvtár létrehozása Ultra II RNA Sample Prep kit segítségével történt. Ennek során elsőként a poli(A)farokkal rendelkező mRNS-t, mágneses gyöngyökkel konjugált deoxitimin szekvenciához (*oligo-dT*) kötöttük, eluáltuk, majd pedig fragmentáltuk. Ezt követően random primerek felhasználásával és reverz transzkripció által létrehoztuk a komplementer DNS-eket (cDNS). Adapter ligálást követően a szekvenálást Illumina NextSeq500 készülék segítségével végeztük el. A nyers szekvenálási adatokat HISAT2 algoritmus segítségével illesztettük a zebraadánió referencia genomhoz (GRCz11). A differenciáltan expresszált géneket StrandNGS szoftver és DESeq1 algoritmus segítségével azonosítottuk. Az AFB1 kezelés hatására szignifikánsan érintett biológiai folyamatokat gén-ontológiai elemzéssel (*Gene Ontology Enrichment Analysis, GOEA*), Cytoscape/ClueGo szoftverrel (Bindea et al., 2009) értékeltük.

3.5. Génexpresszió meghatározása RT-qPCR segítségével

Az egyes, többek között a transzkriptom analízis eredményei alapján kijelölt markergének kifejeződését reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz lánreakcióval (RT-qPCR) határoztam meg. Az AFB1-expozíció végén, csoportonként 5 ismétlésben, ismétlésenként 30 lárvát 200 µl Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csővekben (30 lárv/cső) homogenizáltam, majd 400 µl-re kiegészítve -80 °C hőmérsékleten tároltam. Az RNS izolálást kloroformos elválasztás/izopropanolos precipitáció/etanolos mosás módszerével végeztem. Az izolált, nukleáz-mentes vízben felvett RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop One spektrofotométerrel értékeltem. A cDNS-ek létrehozásához High Capacity cDNA Reverse Transcription kit-et használtam. A PCR reakciókat 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix segítségével végeztem LightCycler 480 II készülékben. Az egyes kezelési/kontroll csoportokhoz tartozó eredményeket az *efla* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítva, normalizált mRNS szintben fejeztem ki. A vizsgált génekhez tartozó primerek szekvenciáit az 1. melléklet tartalmazza.

3.6. Neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás meghatározása

A neutrofil granulociták számszerűsítéséhez és az embriókon/lárvákon belüli eloszlásának vizsgálatához *Tg(mpx:EGFP)* transzgenikus zebradánió reporter vonalat alkalmaztunk. A teljes lárvákra vonatkozó neutrofil granulocita sejtszám (EGFP+ sejtek gyakorisága) a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében, fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) módszerével határoztuk meg. A vizsgálatot két független kísérlettel, csoportonként három ismétlésben, ismétlésenként 15 lárvával végeztük el. Ennek során az AFB1-expozíció végén (120 hpf) a lárvákat mikrocentrifuga-csövekbe (15 lárv/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 reszuszpendáltuk és 40 µm pórusméretű sejtszűrő kosarakkal átszűrtük. Az egyes mintákban az EGFP+ sejtek gyakoriságát 10^5 sejtre vonatkozóan NovoCyte Flow Cytometer készülékkel határoztuk meg.

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

3.7. Nitrogén-monoxid termelődés *in vivo* meghatározása

Egy gyulladáshoz közeli mediátornak, a nitrogén-monoxidnak lárvákon belüli termelődését fluoreszcens jelet szolgáltató diaminofluoreszcein-FM diacetát (DAF-FM-DA) próba segítségével határoztam meg. Az AFB1-expozíció végén a lárvákat 96 lyukú, lyukanként 200 µl, 5 µM DAF-FM-DA oldatot tartalmazó sejttenyésztő lemezekbe helyeztem individuálisan és 25,5 °C-on, sötétben, 1 órán keresztül inkubátorban tartottam. Ezt követően a lárvákat rendszervízben átöblítettem, majd altatásban (MS-222, 168 mg/l) oldalnézeti fényképeket készítettem GFP szűrővel felszerelt Leica

M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A fényképek alapján ImageJ szoftver segítségével meghatároztam az egész lárvára, valamint a szik-bélrendszer területére korlátozódó fluoreszcencia intenzitás értékeit. A fluoreszcencia intenzitása arányos a nitrogén-monoxid termelődés mértékével.

3.8. Aminosav analízis

Az L-arginin tartalmat ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UPLC) módszerrel határoztuk meg. Az AFB1-expozíció végén a 120 órás lárvákat mikrocentrifuga-csővekbe gyűjtöttük, meghatároztuk a nedves tömeget, majd homogenizáltuk a lárvákat (30 lárva/cső, 3 ismétlés/csoport). A homogenizálást centrifugálás (20000 g, 10 perc), a felülúszó átszűrése (3kDa-os szűrő), majd pedig vákuumos szárítása (SpeedVac, Thermo Scientific) követte. A derivatizálást AccQTag Ultra kit segítségével végeztük. A minták mérését és analízisét 2 belső ismétlésben UPLC készülékkel (H-Class, Waters) és Empower szoftverrel végeztük.

3.9. Farokúszó sebzésén alapuló gyulladási modell

A farokúszó sebzését Tg(*mpx*:EGFP) transzgenikus zebra-dánió reporter vonalon végeztem, amely lehetővé teszi a neutrofil granulociták sebzés területére vándorlásának *in vivo* monitorozását. Az embrionális AFB1-expozíciót követően, 108 hpf-nél a lárvákat altatásba vittem (MS-222, 168 mg/l), majd mikroszkóp alatt steril borotvapengével a farokúszó-véget a lárva tengelyére merőlegesen, a gerinchúr vége és a farokúszó legtávolabbi pontja közötti szakasz középső régiójában, egyenes vonalú vágással eltávolítottam. Ez után a lárvák friss rendszervizet tartalmazó 24 lyukú sejttenyésztő lemezekbe kerültek, individuálisan. A sebzést követő 4. és 12. órában a lárvákról oldalnézeti fényképeket készítettem GFP szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A sebzés területére vándorolt neutrofil granulociták mennyiségét a fényképek alapján manuális sejtyszámolással összesítettem, 5 független kísérletben, csoportonként 10 lárvával (N=50/csoport).

3.10. A szikzacskó lipid tartalmának mérése

A lárvák, elsősorban azok szikzacskójának neutrális lipidtartalma közti különbségeket Oil-Red-O (ORO) festéssel határoztam meg. Az AFB1-expozíció végén (120 hpf) a lárvákat jéggel fokozatosan lehűtött rendszervízben túlaltattam, PBS-el átöblítettem, majd 4 % (v/v) paraformaldehidben, 4 °C-on, 6 órán keresztül fixáltam azokat. A fixálást követően 1 g/l ORO izopropanolos (60%) oldatában a lárvákat szobahőmérsékleten 2 órán keresztül mikrocentrifuga-csövekben inkubáltam. A festést PBS-el történő átöblítés követte, végül az egyedek lépcsőzetes módon, 95 százalékos glicerinbe kerültek. Az ORO által festett lárvákról, mikroszkóp (Leica M205 FA) alatt egységes megvilágítású (fehér) háttérrel oldalnézeti képeket készítettem. Az egyes csoportokhoz tartozó lárvák szikzacskóinak lipid tartalma közti különbségeket optikai denzitás méréssel határoztam meg ImageJ szoftver segítségével, „Rodbard”-kalibrációt követően (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>). A festést két ismétlésben, csoportonként 10 lárvaival végeztem (N=20/csoport).

3.11. Emésztőcsatorna funkcionális *in vivo* vizsgálata fluoreszcens mikrogönggyel

Az emésztőrendszer károsodásának egyik vizsgálatát a fluoreszcens mikrogönggy-assay képezte. Ennek során reverz ozmózis (RO) vízzel átmosott, centrifugált és újra szuszpenzióba vitt (2,5 %), fluoreszcens jelet kibocsátó, átlagosan 2 µm átmérőjű mikrogönggyöket (*carboxylate-modified polystyrene latex beads, fluorescent red*, Sigma-Aldrich) alkalmaztam. Az AFB1-expozíció végén, két független kísérletben, csoportonként 10 lárva (N=20/csoport) 0,025 százalékos mikrogönggy szuszpenziót tartalmazó mikrocentrifuga-csövekbe helyeztem (5 lárva/cső) és 3 órán keresztül 25,5 °C-on, a centrifuga-csöveket nyitott állapotban hagyva inkubáltam. Az inkubálást követően a lárvaikat friss rendszervízben többször átöblítettem, eltávolítva a mikrogönggyöket a vizes közegből, majd pedig altatásban (MS-222, 168 mg/l) oldalnézeti fényképeket készítettem az állatokról mCherry szűrővel felszerelt Leica M205 FA fluoreszcens mikroszkóp alatt, Leica Application Suite X szoftver által. A garat-régióban, valamint a bélcsatornában felhalmozódó mikrogönggyök által kibocsátott fluoreszcens jelet ImageJ szoftver által számszerűsítettem.

3.12. Statisztikai értékelés

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

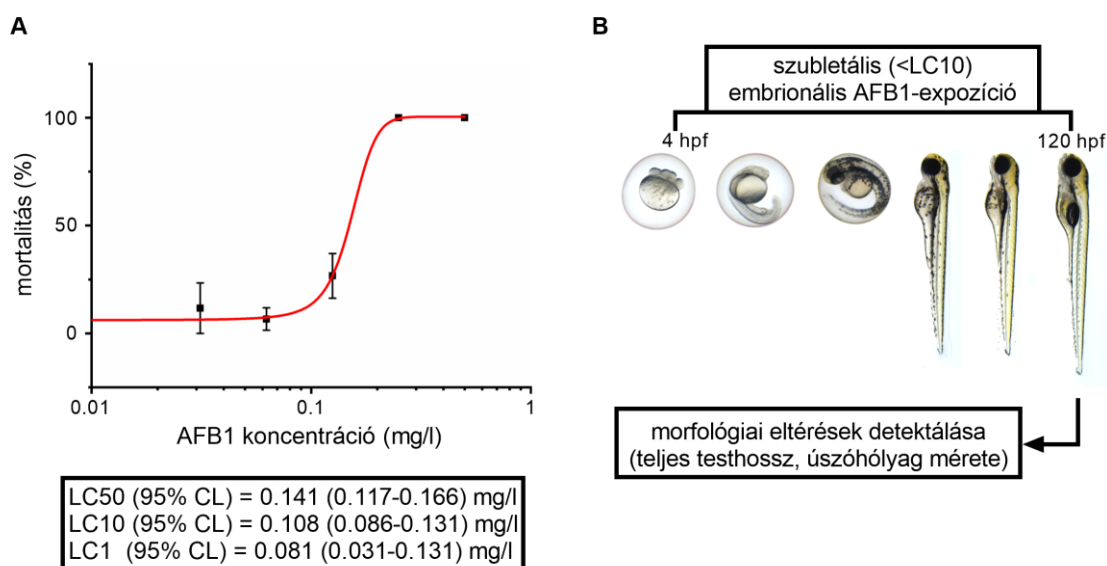
3.13. Bioetikai állásfoglalás

A doktori munka során elvégzett kísérletek megfelelnek az Európai Parlament és a Tanács tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU irányelveinek, amelynek hatálya alá többek között „az önállóan táplálkozó lárvaállapotú állatok” tartoznak. A doktori munka kísérleteihez önállóan nem-táplálkozó stádiumú zebraadániókat használtunk fel.

4. Eredmények

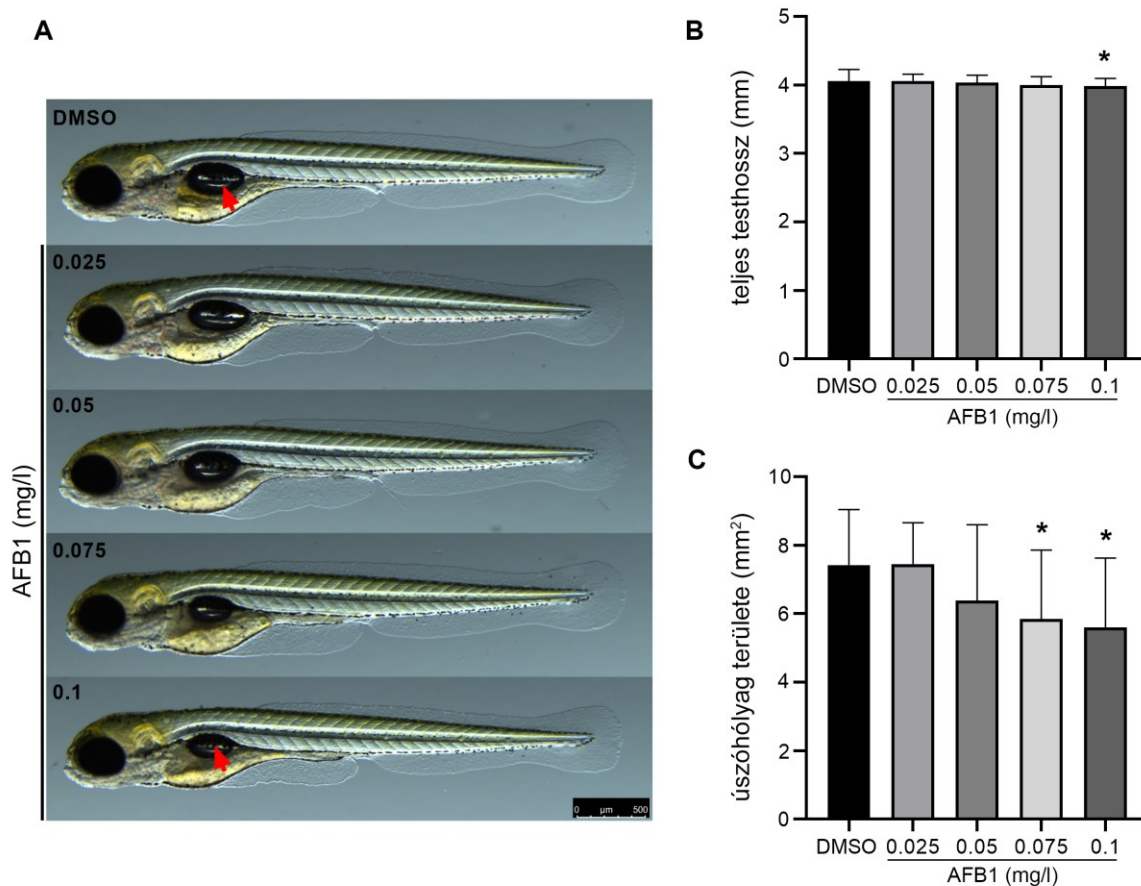
4.1. A szubletális aflatoxin B1-expozíció lárva morfológiájára és teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai

A viszonylag alacsony, szubletális AFB1 koncentrációk a 120 órára kiterjesztett FET teszt során tapasztalt mortalitási arányok alapján kerültek kijelölésre. Az ide vonatkozó koncentráció-válasz görbe alapján meghatározott, 120 órára vonatkoztatott letális koncentráció értékek az alábbiak szerint alakultak: LC1 = 0,081 mg/l; LC10 = 0,108 mg/l; LC50 = 0,141 mg/l (5. A ábra). Az alkalmazott szubletális koncentráció-sorozatot az LC10 (0,108 mg/l) érték alapján az alábbiakban határoztuk meg: 0,025; 0,05; 0,075 és 0,1 mg/l (5. B ábra).



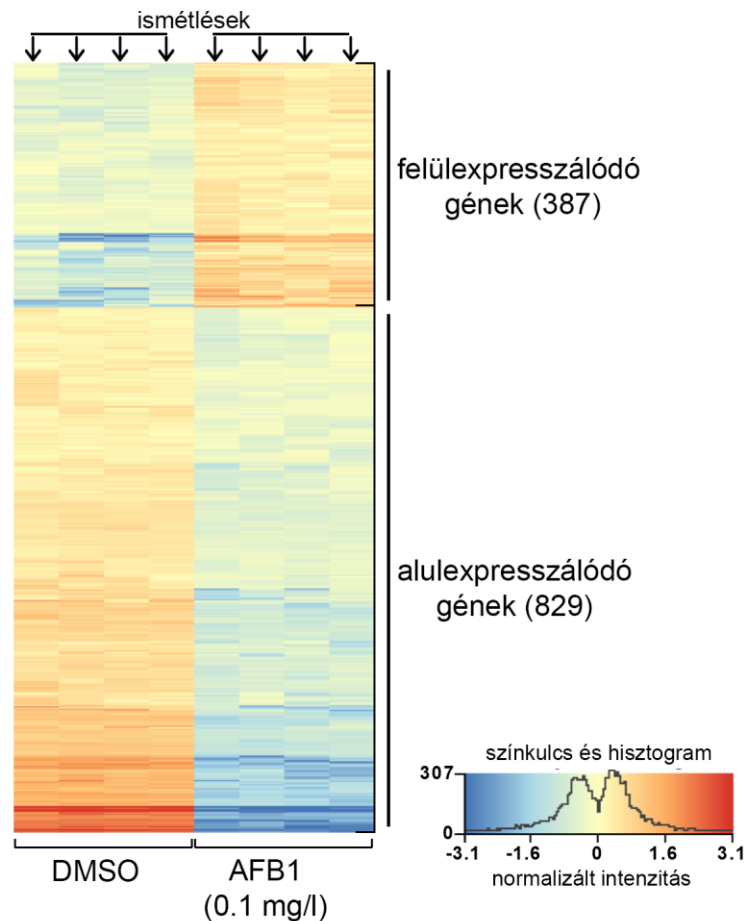
5. ábra. A) Koncentráció-válasz görbe és az ahhoz tartozó letális koncentráció (LC) értékek a 120 órára kiterjesztett Fish Embryo Acute Toxicity (FET) teszt során tapasztalt mortalitási arányok alapján. B) Az LC10 érték alapján kijelölt, szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció sematikus ábrája. hpf: *hours post fertilization*.

Az embrionális AFB1-expozíció nem eredményezett drasztikus morfológiai elváltozásokat az embriókban/lárvákban, azonban enyhe mértékű, de statisztikailag már igazolható csökkenés mutatkozott a teljes testhosszban 0,1 mg/l koncentráció esetén. Mindemellett egy jelentősebb, koncentráció-függő csökkenés volt tapasztalható az úszóhólyag méretében (6. A-C ábra).



6. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció hatása a 120 órás zebradánió lárvák morfológiájára. A) Oldalnézeti fényképek a 120 órás lárvákról a kezelést követően. A piros nyíl az úszóhólyagot jelöli. **B)** Az AFB1-expozíció hatása a lárvák teljes testhosszára. **C)** Az AFB1-expozíció hatása az úszóhólyag méretére. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$). hpf: *hours post fertilization*.

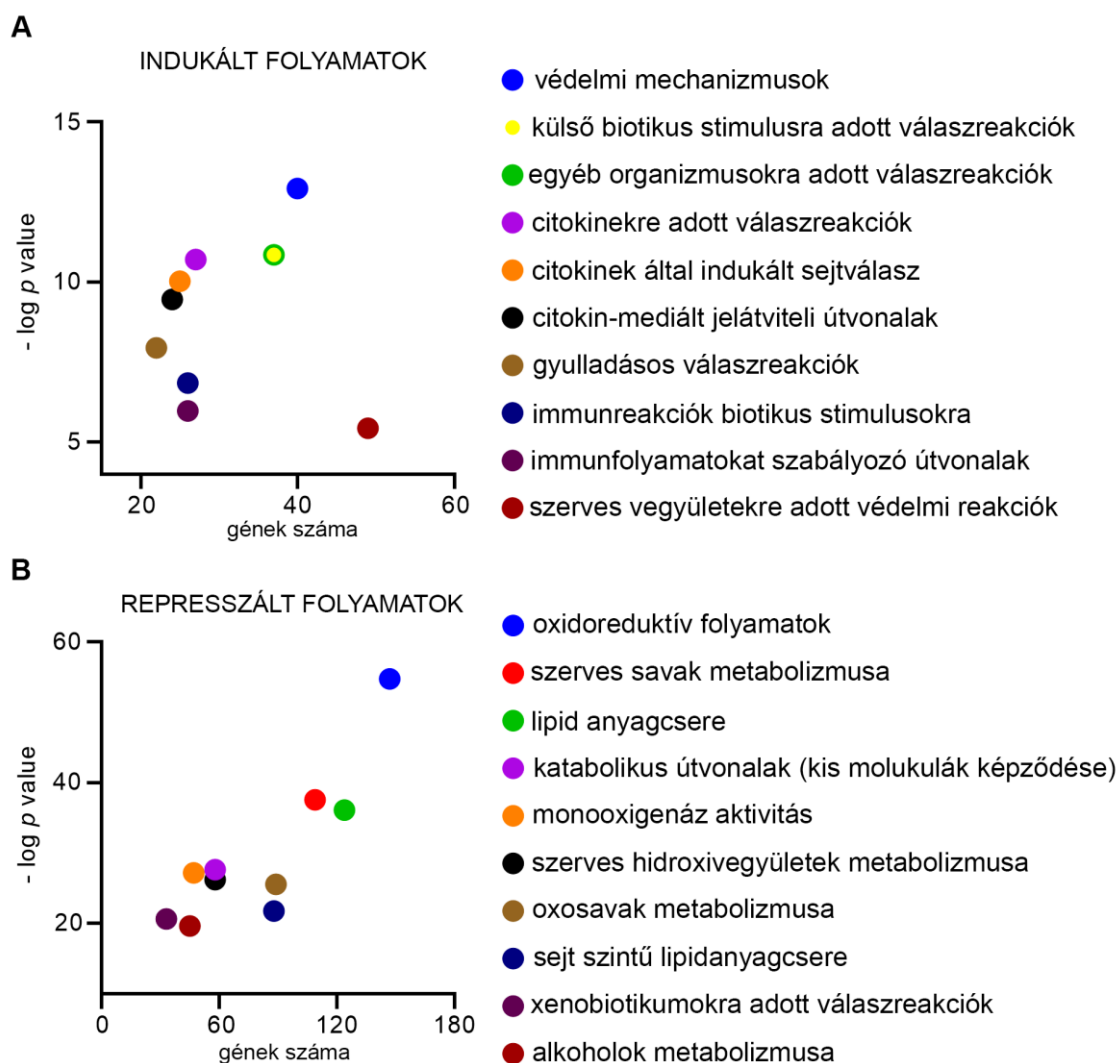
Ezt követően, teljes RNS szekvenálás és transzkriptom analízis segítségével mélyebb betekintést nyertünk a lárvák AFB1-expozíció által befolyásolt különböző biológiai folyamataiba. 1216 gén mRNS szintű kifejeződése változott meg szignifikáns mértékben (*differentially expressed genes*, DEGs) a kezelés hatására (0.1 mg/l). Ezen differenciáltan expresszált gének közül 829 csökkent, míg 387 fokozott kifejeződést mutatott az AFB1 kezelt lárvákban (7. ábra).



7. ábra. Szubletális (LC10), embrionális AFB1-expozíció teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai a 120 órás zebradánió lárvákban. A teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltan expresszált gének „hőtérképe”.

A gén-ontológiai elemzés számos, szignifikáns mértékben indukált vagy gátolt biológiai folyamatot azonosított. Az indukált gének között az immunrendszer- és gyulladás-kapcsolt folyamatokban kulcsszerepet játszó géncsoportok kimagasló felülreprezentáltsága volt kimutatható (8. A ábra). A gátolt gének esetén legjelentősebb mértékben a redox útvonalak és számos anyagcsere folyamat – különös tekintettel a lipid és szerves sav anyagcserére – érintettsége mutatkozott meg (8. B ábra).

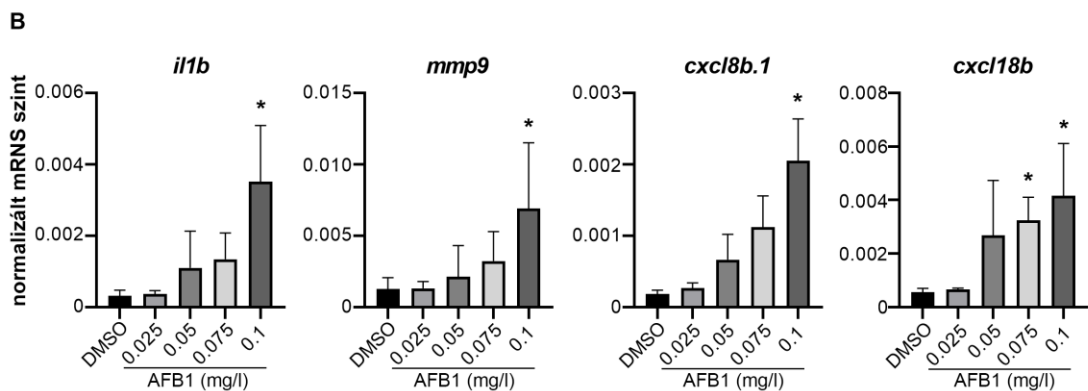
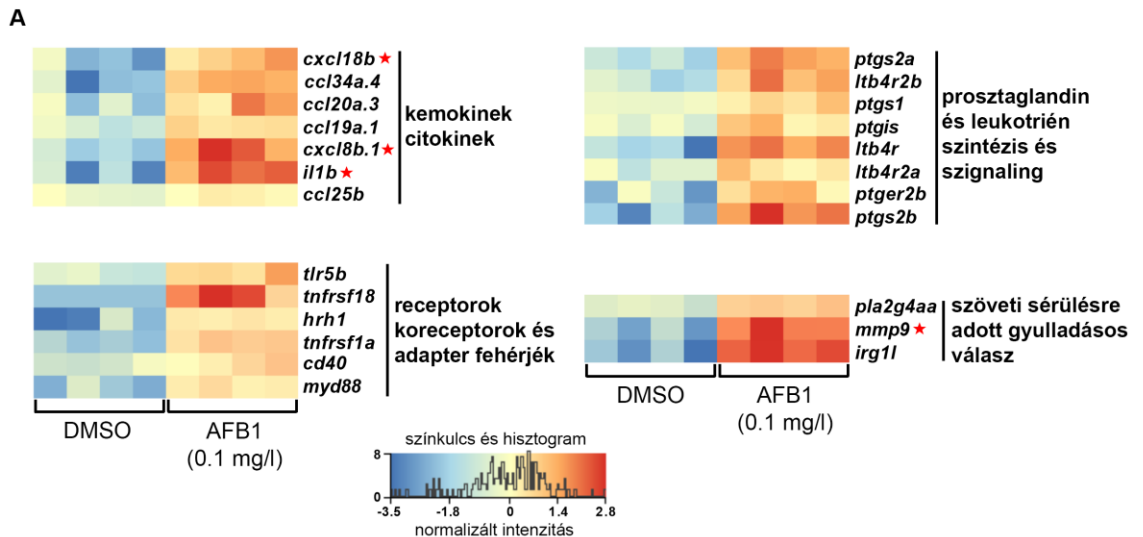
Összefoglalva tehát, a szubletális AFB1-expozíció nem okozott drasztikus morfológiai eltéréseket, mindemellett azonban jelentős, teljes transzkriptom szintű változásokat eredményezett az embrionális fejlődés végére a zebradánió lárvákban.



8. ábra. Szubletális (LC10), embrionális AFB1-expozíció teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai a 120 órás zebradánió lárvákban. A) Az AFB1 által legszignifikánsabb mértékben indukált és B) represszált első 10 biológiai folyamat, és az azokhoz tartozó differenciáltan expresszált gének mennyisége.

4.2. Az aflatoxin B1 veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatásai

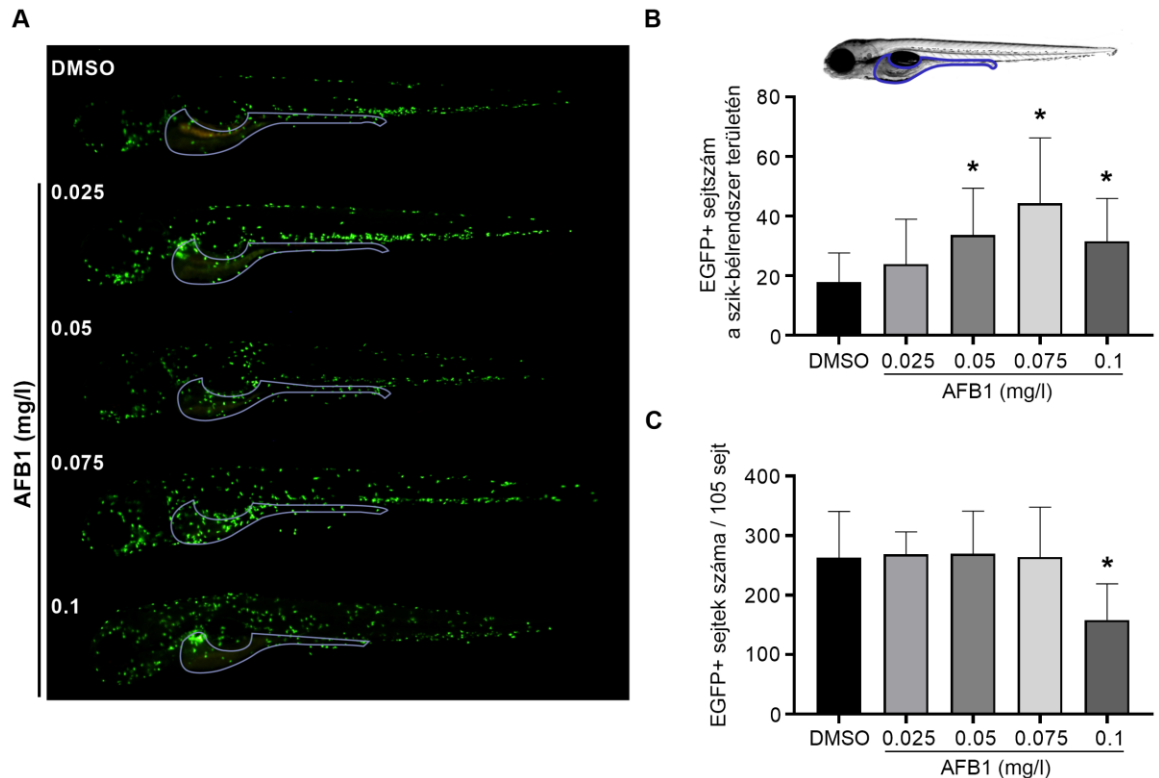
A teljes transzkriptom analízis során született eredmények alapján a következőkben az embrionális AFB1-expozíció veleszületett immunrendszerre és gyulladásos folyamatokra gyakorolt hatásainak vizsgálatára fókuszáltunk. Ennek érdekében elsőként négy immunválasz-asszociált gén (interleukin 1 β , *ill\beta*; mátrix metallopeptidáz 9, *mmp9*; kemokin (C-X-C motívum) ligand 8b 1, *cxcl8b.1*; kemokin (C-X-C motívum) ligand 18b, *cxcl18b*) kifejeződését vizsgáltam RT-qPCR segítségével. Összhangban az RNS-sevenálás eredményeivel (9. A ábra), az AFB1 kezelés a kiválasztott markergének jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után (9. B ábra).



9. ábra. Az AFB1 hatása az immun- és gyulladás asszociált gének kifejeződésére a 120 órás zebradánió lárvákban. A) Teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltan expresszált immun- és gyulladás asszociált gének „hőterképe”. Piros csillag jelöli az RT-qPCR-hez kiválasztott géneket. **B)** Az immun-specifikus géncsoport RT-qPCR által meghatározott kifejeződése. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség az oldószeres kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

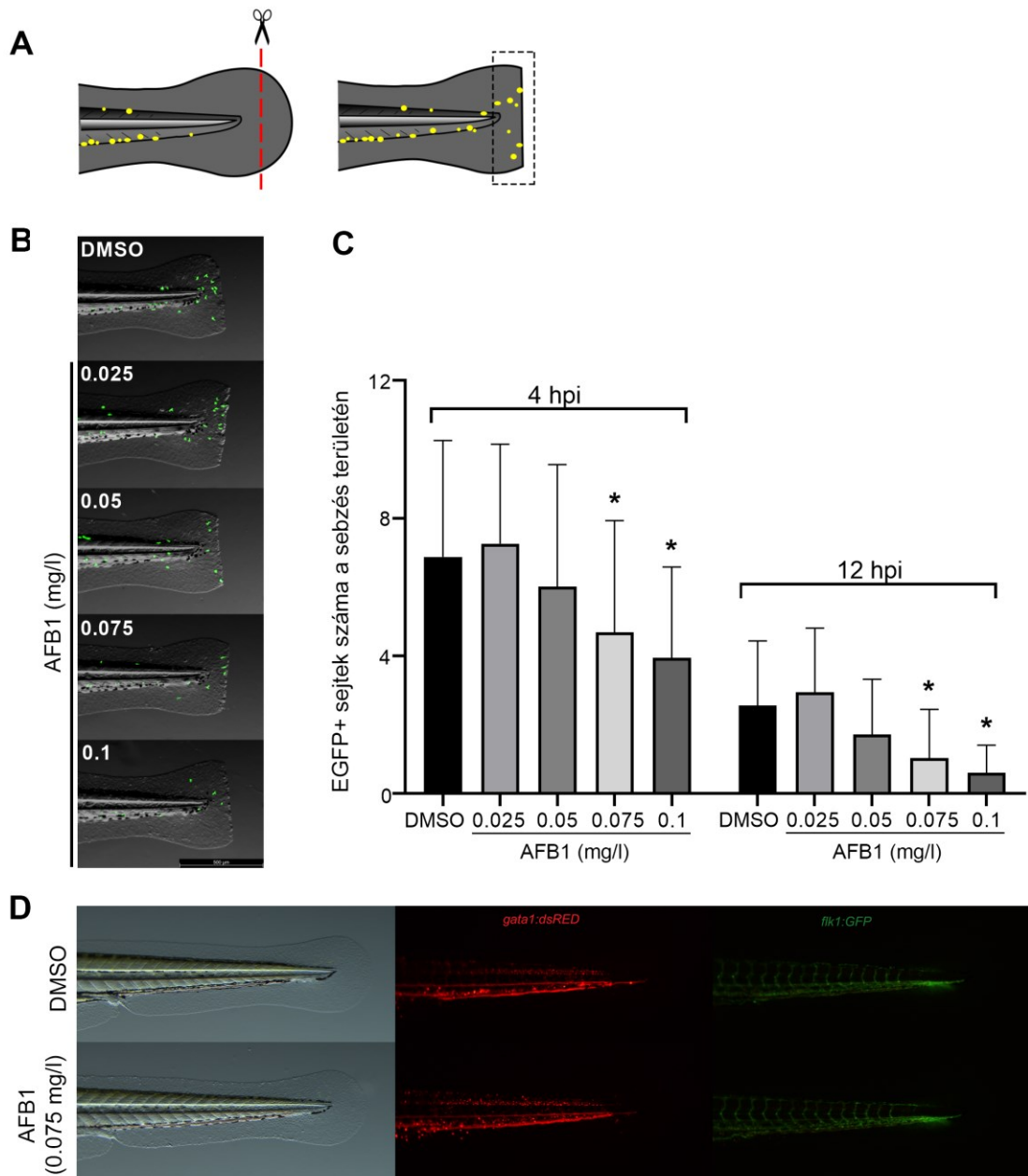
A többek között fontos neutrofil granulocita kemoattraktáns faktorokat (*cxcl8b.1*, *cxcl18b*) is felvonultató immunválasz-asszociált géncsoportok szignifikáns indukciója alapján feltételezhetővé vált az AFB1-expozíció granulociták eloszlását, mennyiségét, viselkedését moduláló hatása. Mindezek *in vivo* és *in vitro* vizsgálatához neutrofil granulocita specifikus transzgenikus zebradánió vonal állt rendelkezésünkre. A 120 órás lárvákról készült fényképek alapján megfigyelhetővé vált, hogy az AFB1 kezelés hatására a neutrofil granulociták eloszlása a lárvákban megváltozik, diffúz jellegű szóródást eredményezve (10. A ábra). Mindemellett, a lárvák szik-bélrendszerének területén a neutrofil granulociták fokozott felhalmozódása mutatkozott meg. Mivel az embriók/lárvák ezen régiója jól lokalizálható és körül határolható, ezért összesítettem a szik-bélrendszer területén akkumulálódott granulocita sejtek számát, amely 0,025–0,075 mg/l koncentráció tartományban erőteljes növekedést mutatott (10. B

ábra). Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy az AFB1 expozíció kihatással van-e a teljes neutrofil granulocita sejtszámra a lárvákban. Az EGFP⁺ sejtek fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (FACS) által meghatározott gyakorisága csak a legmagasabb, 0,1 mg/l-es kezelési koncentráció esetén csökkent szignifikáns mértékben a kontrollhoz viszonyítva (10. C ábra).



10. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció neutrofil granulociták eloszlására és mennyiségére gyakorolt hatása a 120 órás zebradánió lárvákban. A) Oldalnézeti fényképek *Tg(mpx:EGFP)* lárvákról AFB1 kezelést követően. **B)** AFB1 hatása a neutrofil granulociták szik-bélrendszer területén történő felhalmozódására. **C)** AFB1 hatása a neutrofil granulociták teljes lárvákon belüli gyakoriságára. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség a kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

Az embrionális AFB1-expozíció immunmoduláns potenciáljának további, részletesebb feltérképezése érdekében farokúszó-sebzésen alapuló, *in vivo*, lokális, steril gyulladáson alapuló modellben vizsgáltam a neutrofil granulociták válaszreakcióját (az alkalmazott kísérleti rendszert a 11. A ábra mutatja). Ennek során jelentős mértékű, koncentráció-függő csökkenés volt tapasztalható az AFB1-kezelt lárváknál a sebzés területére vándorló granulociták mennyiségében, a sebzést követő 4., valamint 12. órában egyaránt (11. B és C ábra).



11. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció hatása a neutrofil granulociták lokális gyulladásra adott válaszára és az érrendszer morfológiájára 120 órás zebradánió lárvákban. A) A farokúszó sebzésén alapuló gyulladásos modell sematikus ábrája. **B)** Oldalnézeti fényképek a *Tg(mpx:EGFP)* lárvák farokúszó régiójáról AFB1 kezelést és farokúszó sebzést követően. **C)** Az AFB1 hatása a neutrofil granulociták sebzés területén történő felhalmozódására. **D)** Oldalnézeti fényképek *Tg(gata1:dsRED;flk1:GFP)* lárvák farokúszó régiójáról AFB1 kezelést követően. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség a kontrollhoz (DMSO) viszonyítva, ($p < 0,05$). hpi: hours post injury.

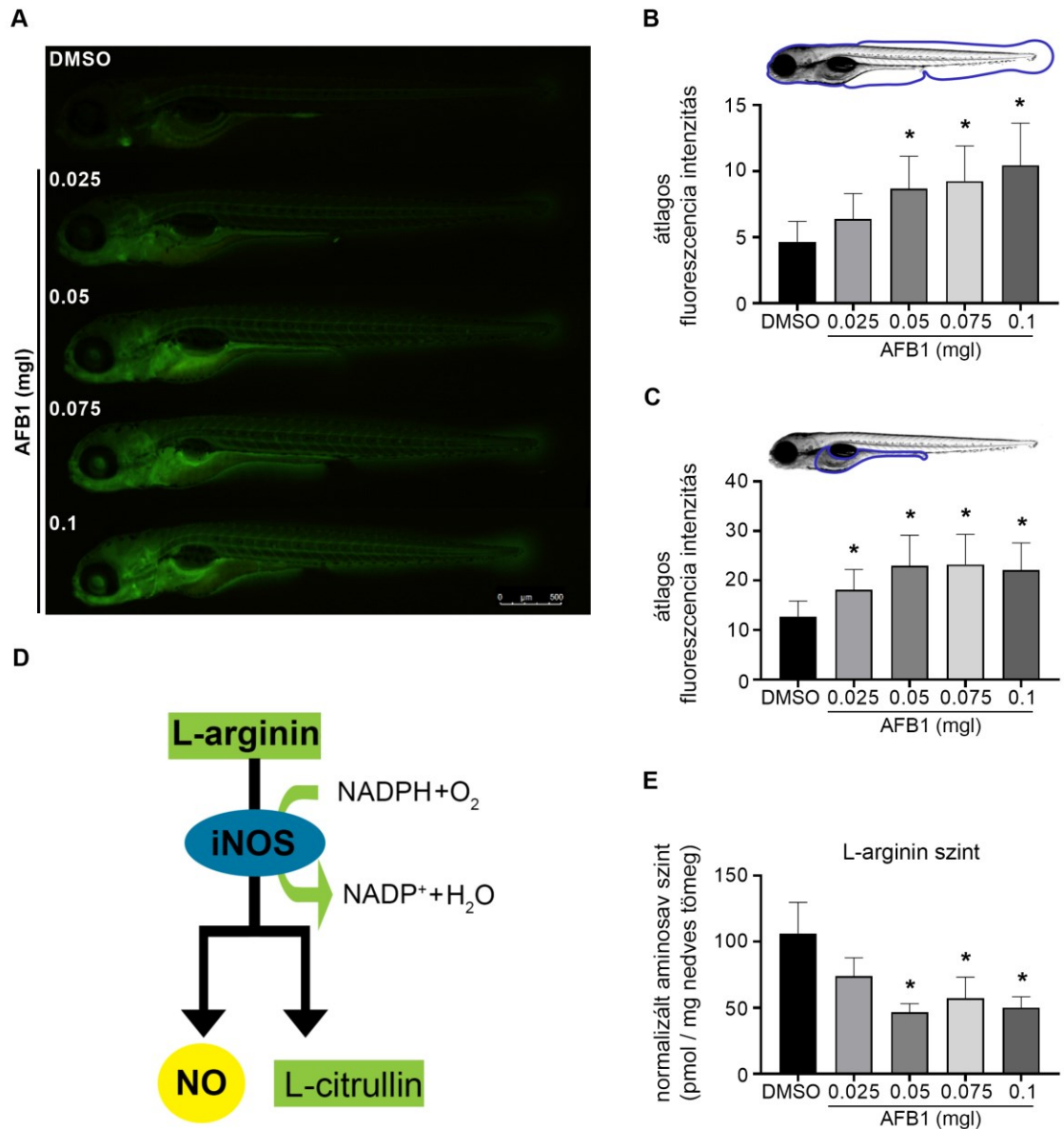
Mindez felvetette az érrendszer AFB1-általi sérüléseinek, és ezen keresztül a granulocita vándorlás befolyásolásának a lehetőségét. A vér-érrendszer specifikus transzgenikus zebra-dánió vonal vizsgálata során azonban nem tapasztunk jelentős mértékű eltéréseket a kontroll és a kezelési csoport között az érrendszer morfológiájában (11. D ábra).

A szubletális AFB1-expozíció tehát egyrészt önmagában egy szignifikáns mértékű gyulladást indukált az embriókban/lárvákban, amely együtt járt a neutrofil granulociták eloszlásának és gyakoriságának megváltozásával, másrészt pedig jelentős kihatással volt ezeknek az immunsejteknek egy indukált, lokális gyulladásra adott válaszreakciójára.

4.3. Az aflatoxin B1 nitrogén-monoxid termelődésre és L-arginin tartalomra gyakorolt hatásai

A fentiekben bemutatott pro-inflammatorikus hatások további karakterizálásához egy gyulladással kapcsolatos mediátor, a nitrogén-monoxid termelődésének vizsgálatára került sor. A nitrogén-monoxid fontos szerepet játszik a különböző patogén ágensek vagy testidegen anyagok elleni immunválaszban, amelynek során termelődését a veleszületett immunrendszer egyes sejtjeinek indukálható nitrogén-monoxid-szintáz enzimjei (iNOS) biztosítják. A 120 órás lárvákban fluoreszcens próba segítségével történő *in vivo* nitrogén-monoxid-produkció detektálásakor erőteljes mértékű, koncentráció-függő növekedés mutatkozott az AFB1-kezelés hatására a kontroll-csoportéhoz képest (12. A és B ábra). Emellett, hasonlóképpen a neutrofil-granulociták szik-bélrendszer területén történő intenzív felhalmozódásához, a nitrogén-monoxid-termelés kifejezetten nagy mértékű növekedést mutatott a lárvák ezen régiójában a kezelt csoportokban (12. C ábra).

Mivel az iNOS a nitrogén-monoxid előállításához szubsztrátként L-arginint használ fel, a következőkben meghatároztuk a teljes lárvák nedves testtömegre normalizált L-arginin-tartalmát. Összhangban a nitrogén-monoxid-szint növekedésével, az AFB1-kezelésen átesett embrióknál szignifikáns mértékű csökkenés volt tapasztalható az L-arginin-tartalomban (12. D-E ábra). Összességében tehát elmondható, hogy a szubletális AFB1-expozíció egy nitrogén-monoxid-termelés-fokozódásával és L-arginin-szint-csökkenésével együtt járó gyulladással kapcsolatos reakciót eredményezett a lárvákban.



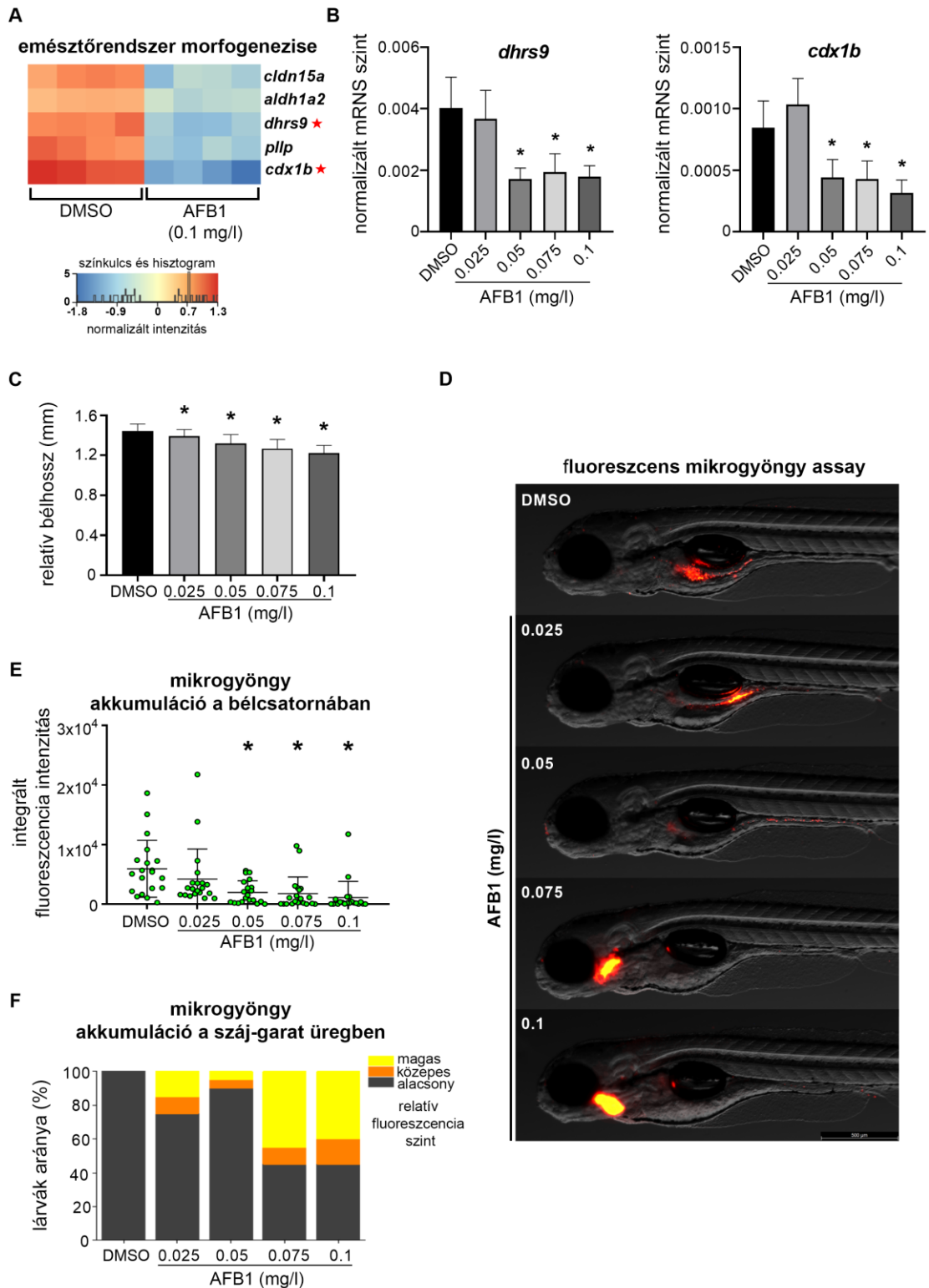
12. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció nitrogén-monoxid termelődésre és az L-arginin mennyiségére gyakorolt hatásai zebradánió lárvákban. A) Oldalnézeti fényképek a 120 órás lárvákról AFB1 kezelést és fluoreszcens NO-próba alkalmazását követően. A fluoreszcencia intenzitása arányos a nitrogén-monoxid termelődés mértékével. B) Az AFB1 hatása a nitrogén-monoxid termelődésre a teljes lárvákban. C) Az AFB1 hatása a nitrogén-monoxid termelődésre a szik-bélrendszer területén. D) A nitrogén-monoxid képződés folyamatának sematikus ábrája. E) Az AFB1 L-arginin szintre gyakorolt hatása. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség a kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

4.4. Az aflatoxin B1 emésztőrendszerre gyakorolt hatásai

Ahogy a fentiekben leírt eredmények alapján láthattuk, a granulocita felhalmozódás és nitrogén-monoxid termelődés tekintetében a szik-bélrendszer egy kifejezetten érintett területként jelentkezett az AFB1 kezelés hatására. Mindemellett, a mikroszkópos fényképek elemzése során a kezelt lárvák bélcsatornájának alulfejlettségére utaló jeleket is detektáltunk. Továbbá, az RNS szekvenálás által felderített szignifikáns mértékben differenciáltan expresszált gének között számos, az emésztőrendszer fejlődésében kulcsszerepet játszó gén (claudin 15a, *clda*; aldehid-dehidrogenáz 1 A2, *aldh1a2*; dehidrogenáz/reduktáz-(SDR család) 9, *dhrs9*; plazmolipin, *p1lp*; caudal type homeobox 1b, *cdx1b*) szerepelt (13. A ábra). Ez utóbbi két gén (*dhrs9*, *cdx1b*) jelentős mértékű redukciója mutatkozott meg azok RT-qPCR által történő validálása során a 0,05, 0,075 és 0,1 mg/l AFB1 koncentrációkkal kezelt csoportokban (13. B ábra).

Az emésztőrendszer károsodásának további feltérképezése érdekében elsőként meghatároztam a lárvák nyelőcsőve és végbélnyílása közötti távolságot, mint „relatív bélhosszt” (nincs elkülönült gyomor), amely már a legalacsonyabb, 0,025 mg/l koncentráción is szignifikáns csökkenést mutatott (13. C ábra). Ezt követően az emésztőrendszer bizonyos mértékű funkcionális-anatómiai eltéréseinek becslésére alkalmas vizsgálatot végeztem el fluoreszcens mikroyöngyök segítségével. Az AFB1 expozíció alatt tartott lárváknál a mikroyöngyök a legalacsonyabb kezelési koncentráció esetén (0,025 mg/l) csökkent mértékben, a többi koncentrációhoz tartozó csoport esetén pedig szinte alig kerültek be a bélcsatornába, ellentétben a kontroll csoporttal (13. D-E ábra). Érdekes módon, a bélcsatorna drasztikusan alacsony mikroyöngy tartalma a magasabb koncentrációknál (0,075; 0,1 mg/l) a száj-garat régióban történő igen erőteljes – a lárvák legalább 55 százalékánál bekövetkező – mikroyöngy akkumulációval párosult (13. D, F ábra).

A szubletális AFB1-expozíció tehát jelentős mértékben befolyásolta az emésztőcsatorna normális kialakulását az embrionális fejlődés során.

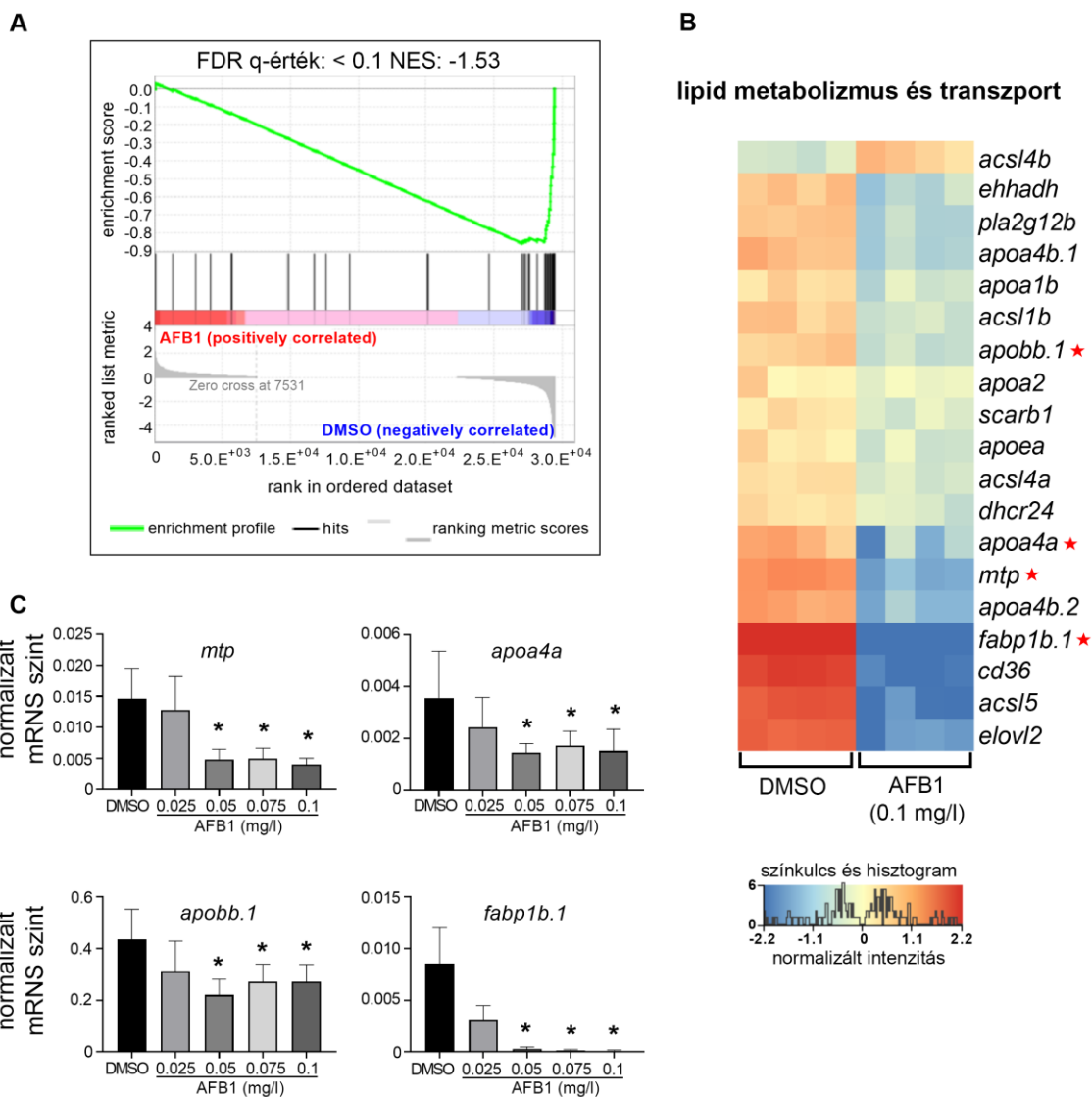


13. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció gasztro-intesztinális rendszerre gyakorolt hatásai zebradánió lárvákban. A) Teljes RNS-szekvenálás által azonosított differenciáltan expresszált, emésztőrendszer morfogenezisében kulcsszerepet játszó gének „hő térképe” és B) RT-qPCR által meghatározott kifejeződése. C) Az AFB1 bélhosszra gyakorolt hatása a 120 órás lárvákban. D) Oldalnézeti fényképek a 120 órás lárvákról AFB1 kezelést követően. A fluoreszcens jel a lárva belüli mikrogöngyöket jelöli. E) Az AFB1 hatása a mikrogöngyök bélcsatornában történő akkumulációjára. F) Az AFB1 hatása a mikrogöngyök száj-garat régióban történő felhalmozódására. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség a kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

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

A teljes lárvákból történő transzkriptom analízis eredményei felhívták figyelmünket az AFB1 különböző, főként az energiaszerzésre irányuló metabolikus útvonalakat gátló hatására. Ide vonatkozóan kiemelkedtek a lipid anyagcserében és transzportban szerepet játszó folyamatok. Mindemellett, a szik-bélrendszer jelentős mértékű érintettsége mutatkozott meg az AFB1-indukált gyulladás során. Mindez alapján feltételezhetővé vált, hogy az embrionális AFB1-expozíció számottevő mértékben képes befolyásolni a szikanyagok mobilizálódását/hasznosulását. Ennek további megismeréséhez Fraher és mtsai. (2016) által azonosított, a zebra-dánió szik-lipid anyagcserében és transzportban kulcsszerepet játszó géncsoportot (*gene set*) alapul véve elsőként géncsoport dúsulási analízist (*Gene Set Enrichment Analysis, GSEA*) végeztünk el a teljes RNS-szekvenálás által nyert adatokon. A GSEA az AFB1 expozíció hatására alulexpresszált lipid metabolizmus és transzport-asszociált gének szignifikáns feldúsulását mutatta ki (*False Discovery Rate, FDR* <0,1; *Normalized Enrichment Score, NES*: -1,53) (14. A és B ábra). Ezek közül négy gén (mikroszomális triglicerid transzfer fehérje, *mtp*; apolipoprotein A-IVa, *apoa4a*; apolipoprotein Bb tandem duplicate 1, *apobb.1*; zsírsavkötő fehérje 1b-1, *fabp1b.1*) mRNS szintű kifejeződését tovább vizsgáltuk RT-qPCR segítségével, validálva az RNS-szekvenálás eredményeit. Az *mtp*, *apoa4a* és *apobb.1* gének esetén 0,025 mg/l koncentrációnál enyhe, míg 0,05, 0,075 és 0,1 mg/l koncentrációknál egy jelentősebb mértékű, szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a génkifejeződésben. A *fabp1b.1* gén tekintetében már a 0,025 mg/l koncentrációnál is egy erőteljesebb, a magasabb értékeknél pedig drasztikus mértékű gátló hatás mutatkozott meg (14. C ábra).

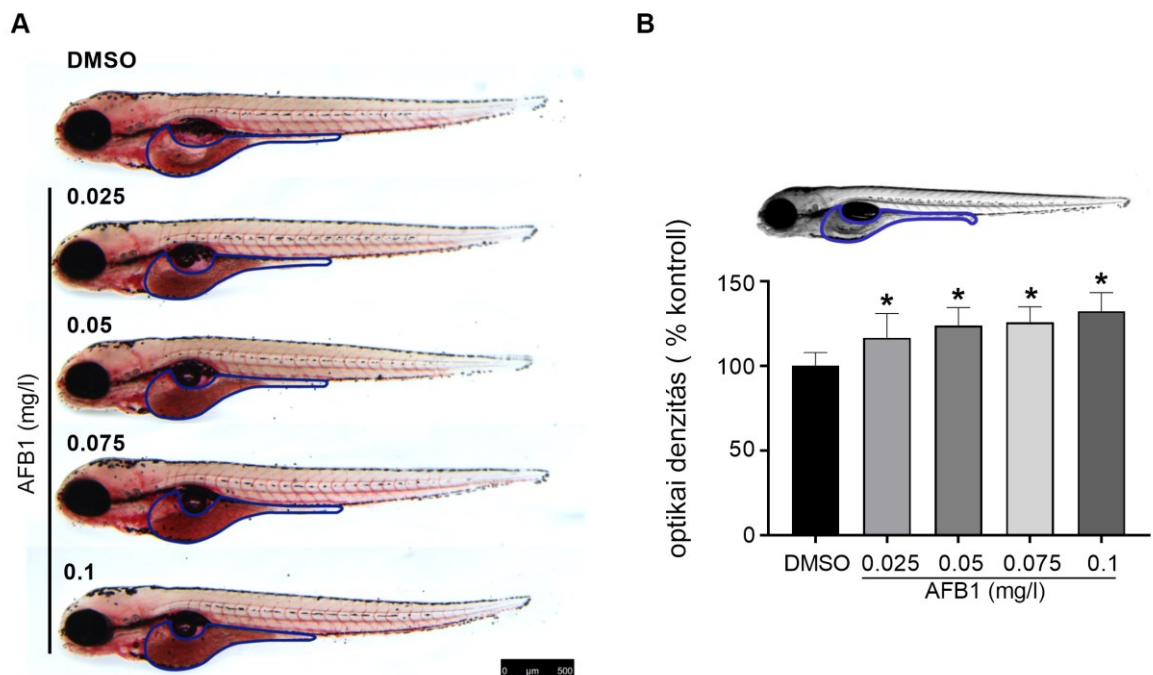
Annak érdekében, hogy a szikból történő lipid-mobilizációt érintő változásokat tovább karakterizáljuk, a teljes lárvák Oil-Red-O alapú lipidfestését végeztem el, amely képet adott a neutrális lipidek lárvákon belüli eloszlásáról, és lehetővé tette a szik-bélrendszer területének optikai-denzitáson alapuló lipid-tartalom becslését.



14. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció lipid metabolizmusban és transzportban kulcsszerepet játszó génekre gyakorolt hatásai zebradánió lárvákban. A) Lipid metabolizmus és transzport specifikus géncsoport feldúsulási analízise az RNS szekvenálás által detektált differenciáltan expresszált génlistában. B) Az AFB1 által szignifikánsan represszált szik-lipid metabolizmus és transzport-asszociált gének „hőtésképe”. Piros csillag jelöli az RT-qPCR-hez kiválasztott géneket. C) Az asszociált gének RT-qPCR által meghatározott kifejeződése. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség a kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

Összhangban a molekuláris-biológiai vizsgálatok eredményeivel, az AFB1 kezelés hatására szignifikáns, koncentráció-függő növekvő tendenciát tapasztaltunk a szik-bélrendszer területén mért optikai denzitásban, amely a szikból történő lipid-felhasználás képességének csökkenésére utalt (15. A és B ábra).

Összegezve a fenti eredményeket, a szubletális AFB1-expozíció jelentős mértékű kihatással volt a fejlődő embriók lipid-anyagcseréjére és a szikben raktározott lipidek mobilizációjára.



15. ábra. Szubletális, embrionális AFB1-expozíció lipid mobilizációra gyakorolt hatásai zebradánió lárvákban. A) Oldalnézeti fényképek a 120 órás lárvákról lipid-festést követően. B) Az AFB1 hatása a szik-bélrendszer területén lévő lipidek mennyiségére. A diagramok átlagot és szórást jelölnek. *: statisztikailag igazolt különbség a kontrollhoz (DMSO) viszonyítva ($p < 0,05$).

5. Következtetések és javaslatok

Az AFB1 az egyik legnagyobb humán- és állategészségügyi kockázattal bíró penészgombatoxin. Embriotoxikus hatását ugyan már a 1960-as években kimutatták, de az emlősök és az ember esetén az embrionális AFB1-kitettség által okozott káros hatások nem minden részlete ismert. Több kutatás hívta fel a figyelmet a terhes anyák emelkedett AFB1 terheltsége és az alacsony születési súly, illetve csökkent növekedési ráta közötti összefüggésekre (Shuaib et al., 2010; Turner et al., 2007). Egyes munkák vizsgálták ugyan a humán prenatális AFB1-kitettség bizonyos immunológiai következményeit az utódokban, azonban e területen viszonylag még kevés eredmény áll rendelkezésünkre (Hernandez-Vargas et al., 2015). Az AFB1-kitettség pre- és posztnatális következményei mögött húzódó lehetséges folyamatok közül Smith és mtsai. (2017) az alábbiakat emelik ki:

- a) pro-inflamtorikus citokin termelés indukciója az anyában, a placentában és a magzatban; szisztémás gyulladós folyamatok kialakulása;
- b) a bélrendszer gyulladása és a bél-barrier károsodása az anyában és a magzatban;
- c) a placenta és a magzat fejlődésének megzavarása.

Mindez olyan vizsgálatok elvégzését szorgalmazza, amelyek többek között a fentiekben vázolt szempontokat is figyelembe véve minél részletesebb módon hozzá tudnak járulni az embrionális AFB1 kitettség biológiai következményeinek megismeréséhez. A zebradánió egy alkalmas alternatívát nyújt az AFB1 embrionális hatásainak komplex vizsgálatához az *in vitro* modellek és az emlős rendszerek között. Noha a zebradánió embrió nem alkalmas az anya-placenta-magzat kölcsönhatásainak és az AFB1 expozícióból adódó közvetett anyai hatásoknak a modellezésére, ugyanakkor a toxin direkt embrionális hatásai jól nyomon követhetők és feltérképezhetők ezen modellrendszer segítségével. Jelen doktori munka a relatíve alacsony, szubletális AFB1 koncentrációk általi direkt embriotoxicitás átfogó, többek között morfológiai, molekuláris biológiai és immunológiai értékelését végezte el.

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

eltérő expozíciós ablakban végzett tesztek alapján születtek. Az általunk meghatározott 120 órás expozícióra vonatkozó LC50 és LC10 érték 0,141, illetve 0,108 mg/l volt. Wu és mtsai. (2019) hozzánk hasonlóan, nem tapasztaltak mortalitást az általunk becsült LC10 érték alatti, hasonló felbontású koncentráció tartományban az embrionális fejlődés időszaka alatt. Zuberi és mtsai. (2019) által meghatározott 96 és 120 hpf közötti expozíciós ablakra vonatkozó LC50 érték $0,5 \mu\text{M} \approx 0,156 \text{ mg/l}$ volt, míg 24 és 48 hpf között ennek közel négyszerese. Ennek háttérében részben az állhat, hogy zebraadánióban az AFB1-gyet reaktív metabolittá alakító citokróm enzim (CYP2K6) az embrionális fejlődés első felében alacsonyabb szinten, az embrionális fejlődés végéhez közeledve (96-120 hpf) pedig egyre intenzívebb mértékben fejeződik ki (Wang-Buhler et al., 2005).

A szubletális AFB-expozíció nem eredményezte az embriók/lárvák számottevő torzulását a kezelési időszak alatt, hasonlóképpen Wu és mtsai. (2019) által leírtakhoz. Mindazonáltal a teljes transzkriptom szintjén már jelentős eltéréseket detektáltunk. Az AFB1 több, mint 1200 gén kifejeződését befolyásolta szignifikáns mértékben. A csökkent kifejeződést mutató gének között szignifikánsan feldúsultak azok a géncsoportok, amelyek pl. az oxidoreduktáz és monooxigenáz aktivitásban, illetve az energiaszerző metabolikus útvonalakban játszanak fontos szerepet. Az oxidoreduktáz aktivitású enzimek közül egyesek reaktív szabadgyök-képződést eredményeznek (pl. xantin oxidáz), ezzel szemben számos kulcsszerepet tölt be a reaktív oxigénszármazékok (ROS) eliminálásában (pl. szuperoxid dizmutáz, glutation-peroxidáz, NADPH-kinon-oxidoreduktáz) (Battelli et al., 2016; Ngoka, 2008). Mindemellett pl. a mitokondriális elektron-transzportlánc I-es komplexének (NADH:ubikinon oxidoreduktáz) diszfunkciója is erőteljes oxidatív stressz kialakulását eredményezheti (Emelyanova et al., 2016; Koopman et al., 2007; Kussmaul & Hirst, 2006). Az alkohol által indukált oxidatív stressz májban történő kialakulásának egyik közreműködő faktoraként tartják számon a citokróm P450-oxidoreduktáz és glutation-reduktáz enzimek gátlását (Dong et al., 2014). Továbbá, a humán hepatocelluláris karcinóma egyik velejárájaként azonosították a máj oxidoreduktáz aktivitásának jelentős csökkenését (Ngoka, 2008). A hepatokarcinogén potenciállal is rendelkező AFB1 ROS-indukáló képességéről megannyi kutatás ad tanúbizonyságot (An et al., 2017; Mary et al., 2012; Ubagai et al., 2008; Wang et al., 2017), ezért jelen doktori munka elsősorban nem ennek a területnek a karakterizálására fókuszált. Összességében azonban elmondható, hogy a transzkriptom analízis során 147, az oxidoreduktáz aktivitásban közreműködő gén kifejeződésének csökkenését mutattam

ki 120 órás zebra-dánió lárvákban az AFB1 kezelés hatására, amely összhangban van a toxin ismert oxidatív stressz indukáló képességével.

Az embrionális, szubletális AFB1-expozíció metabolomra kifejtett hatásaival kapcsolatban meglehetősen kevés információ érhető el a szakirodalomban, ugyanakkor felnőtt egereken és patkányokon végzett ilyen irányú kutatások széles körű, glükóz, aminosav és lipid anyagcserét egyaránt érintő változásokról számolnak be (Kimbrough et al., 1992; Lu et al., 2013; Zhang et al., 2011). Ezt a képet jelentős mértékben visszatükrözi a doktori munka embriókon elvégzett transzkriptom analízisének eredménye, amely a különböző szerves-sav, lipid és szénhidrát anyagcserében kulcsszerepet játszó géncsoportok szignifikánsan csökkent kifejeződéséről ad számot.

Az embrionális AFB1-kezelés következtében fokozott mRNS kifejeződést mutató gének között kimagasló mértékben dúsultak fel az immunválaszban és gyulladásos folyamatokban közreműködő géncsoportok. Mindez együtt járt a teljes embriókon/lárvákban belüli neutrofil granulociták erőteljes diffúz szóródásával és emelkedett nitrogén-monoxid termeléssel, amely a szik-bélrendszer területén különösen intenzívnek bizonyult. Dey és Kang (2020) AFB1-kezelte 6 napos zebra-dánió lárvák vizsgálata során szintén a szik-bélrendszer területén detektált jelentős mértékű ROS képződést. Emellett, a megnövekedett nitrogén-monoxid termeléssel összhangban, csökkent L-arginin szintet tapasztaltam. Az AFB1 tehát egy szisztémás jellegű gyulladásos reakciót indított el a fejlődő embriókban/lárvákban. Továbbá, a lokális gyulladáson alapuló modellben szignifikáns mértékben csökkentette a neutrofil granulociták sebzés területén történő felhalmozódását. A granulociták teljes lárvákban belüli gyakorisága csak a legmagasabb alkalmazott (LC10 érték körüli) koncentráción mutatott csökkenést, ugyanakkor a lokális sebzésre adott „csökkent mértékű” válaszreakció már az alacsonyabb koncentrációk esetén is számottevő volt. Mindemellett, a lárvák érrendszeréről készült fényképek értékelése során nem figyeltem meg olyan, szemmel látható, drasztikus morfológiai elváltozásokat, amelyek jelentősen akadályozhatták volna a neutrofil granulociták úszószegélyhez történő vándorlását. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy a leukociták gyulladásos területre történő migrációja rendkívül komplex és érzékenyen szabályozott folyamat, ahol az érfal-struktúra, illetve a különböző kemotaktikus szignálok és adhéziós folyamatok összjátéka egyaránt támadáspontot jelenthet egy toxin-expozíció során (Nourshargh & Alon, 2014). Mindezek vizsgálata azonban túlmutatott a jelen doktori munka keretein. Hasonlóképpen az általam tapasztaltakhoz,

a zebraadánió embriók/lárvák farokúszójának sebzésén alapuló gyulladáshos modell alkalmazása során több xenobiotikum – pl. egy növényvédő szer keverék, a famoxadon-cimoxanil (Cheng et al., 2020), illetve az egyes kozmetikumokban is előforduló ezüst nanorészecskék (R. J. Chen et al., 2021) – esetén is megmutatkozott a neutrofil granulociták mozgósításának/vándorlásának modulálása. Relatívé kevés információ érhető el a szakirodalomban az AFB1 neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásairól, elsősorban *in vitro* vizsgálati eredmények születtek, amelyek a granulociták fagocitotikus illetve enzimátikus aktivitásának csökkenéséről adnak számot (Mehrzađ et al., 2011; More et al., 2005; Sahoo & Mukherjee, 2001b). Összefoglalva doktori munkám ide vonatkozó eredményeit, a szubletális, embrionális AFB1-expozíció pro-inflammatorikus és immunmoduláns hatásokat eredményezett a 120 órás zebraadánió lárvákban.

Ahogy már fentebb említésre került, a fejlődő embriók szik-bélrendszerének jelentős mértékű érintettsége volt megfigyelhető az AFB1 által indukált gyulladáshban. A zebraadánió embrionális fejlődése során a szikben tárolt tápanyagok fokozatosan felhasználásra kerülnek, a szikzacskó mérete csökken, területének egy részét pedig fokozatosan átveszi a fejlődő bélcsatorna. Fontos kiemelni tehát, hogy az embriók szikrendszere egy metabolikusan aktív és különböző transzport-folyamatokat felvonultató terület (Fraher et al., 2016). Park és mtsai. (2020) szignifikánsan nagyobb szik-átmérőket detektáltak az AFB1 kezelt zebraadánió embriók esetén a kontrollhoz viszonyítva. Eredményeim emellett a szikben tárolt lipidek anyagcseréjében és transzportjában részt vevő géncsoportok gátolt mRNS szintű kifejeződését mutatták ki. Mindezt felveti az embrionális tartalék táplálóanyagok felhasználásának/mobilizálásának sérülését. Ahogy az várható volt, a 120 órás lárvák lipid festése visszaigazolta az addigi eredményeket, a szik-bélrendszer területén lévő lipidek mennyisége koncentráció-függő növekedést mutatott a kezelés hatására. Eddig csak kevés kutatás jelent meg a szakirodalomban, amely az embrionális AFB1-expozíció lipid anyagcserére gyakorolt hatásait vizsgálta, ugyanakkor felnőtt patkányok vér- illetve májmintáinak analízise során beszámolnak a lipid metabolizmus AFB1 általi megzavarásáról (Rotimi et al., 2017; Ugbaja et al., 2020). Továbbá, patkányoknál az AFB1 előmozdította a máj foszfolipid és koleszterin tartalmának növekedését, a zsírszövet gyarapodását (Singh & Venkitasubramanian, 1975). A máj kóros lipid-akkumulációjával (pl. alkoholos és nem alkoholos zsírmáj), valamint az elhízással együtt járó betegségeket különböző gyulladáshos folyamatok kísérik, amelyek egyrészt megjelenhetnek a fokozott lipid-akkumuláció egyik

következményeként, illetve a betegség lefolyását súlyosbító tényezőként egyaránt (Gao & Tsukamoto, 2016; Ma et al., 2008). Egyes xenobiotikumok szintén eredményezhetnek gyulladással együtt járó lipid felhalmozódást, mint pl. a felszíni vizekben is megjelenő anti-ösztrogenikus tamoxifen zebra-dánióknál (Yu et al., 2020). Az esetünkben megfigyelt, szik-bélrendszer területére vonatkozó emelkedett lipid-tartalom és gyulladás ok-okozati összefüggéséről azonban csak további, részletesebb feltáró munka alapján vonhatunk le következtetéseket. Továbbá meg kell jegyezni, hogy az AFB1-kezelés hatására kialakult lipid „akkumuláció” jelen esetben feltételezhetően a szik lipid-raktárának csökkent mobilizációjából adódott, és nem egy „aktív” felhalmozódás eredménye.

Több kutatómunka is beszámolt az AFB1 kezelést követő emésztőrendszeri elváltozásokról. Patkányok esetén a bél mikrobiom-asszociált metabolikus útvonalak megzavarása (Zhou et al., 2018), egérnél az intesztinális integritás sérülésén keresztüli barrier funkciók defektusai (Gao et al., 2021), brojler csirkéknél a táplálóanyagok csökkent hasznosulása mutatkozott meg (X. Chen et al., 2016). Mindemellett, emlős és madár modellrendszerben egyaránt megnyilvánult az AFB1 által indukált bélkárosodás és gyulladás együttese, ahol különböző anti-inflammatorikus táplálékkiegészítő anyagok alkalmazásával csökkenteni lehetett a bélben, illetve a bél-mikrobiomban okozott elváltozások mértékét (J. Chen et al., 2021; Sarker et al., 2021). Az embrionális AFB1-kitettség bélrendszerre gyakorolt hatásairól és annak háttéréről azonban még viszonylag kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Vizsgálataim az embrionális/lárvális emésztőrendszer AFB1 általi károsodását mutatták ki, amely az emésztőrendszer morfogenezisében kulcsszerepet játszó gének kifejeződésének erőteljes gátlásában, a bélrendszer alulfejlettségében és funkcionális zavarában nyilvánultak meg. Mindez a szik-bélrendszer területén történő fokozott neutrofil-granulocita felhalmozódással és nitrogén-monoxid produkcióval járt együtt. Az embrionális emésztőrendszer AFB1 által indukált elváltozásai és az ahhoz asszociálódó gyulladós folyamatok ok-okozati összefüggései és az azok háttérében álló mechanizmusok azonban további, részletesebb feltérképezésre szorulnak.

A terhes anyák és vemhes állatok AFB1 kitettsége kiemelten nagy egészségügyi kockázatot hordozhat magában az utódra nézve. A prenatális AFB1-expozíció biológiai következményei azonban még nem teljesen ismertek. Az eddigi, *in vitro* tesztek és különböző modellszervezeteken végzett vizsgálatok, illetve a humán felmérések eredményei alapján feltételezhető, hogy a születés-, csecsemő-, illetve gyermekkori fejlődésbeli és immunológiai problémák kialakulásához jelentős

mértékben hozzájárulhat az AFB1 pro-inflammatorikus, immunmoduláns, gasztrointesztinális rendszert károsító, valamint a szénhidrát, lipid és aminosav anyagcserét befolyásoló képessége (Smith et al., 2017). Doktori munkám az LC10 és az alatti AFB1 koncentrációk direkt embrionális hatásainak viszonylag átfogóbb feltérképezését tűzte ki célul, amelyhez többek között a preklinikai gyógyszer-tesztelésben és humán betegség modellezésben is elterjedt modellszervezetet, a zebradániót hívtam segítségül. A kutatómunkám során alkalmazott, egymást kiegészítő morfológiai, transzkriptomikai, immunológiai, toxikológiai vizsgálatok alapvetően egymással összhangban lévő eredményeket szolgáltatottak. Összességében elmondható, hogy a szubletális, embrionális AFB1-expozíció során a veleszületett immunrendszer, az energiaszerzésre irányuló biológiai folyamatok, valamint az gasztrointesztinális rendszer kiemelt érintettsége mutatkozott meg. Mindez jelentős mértékben meghatározhatja a fejlődő utód későbbi életkimenetelét. Az akut gyulladásos folyamatokban, a gasztrointesztinális rendszer fejlődésében, és számos energiaszerző metabolikus útvonalban kulcsszerepet játszó gének és azok kifejeződésének szabályozása nagyfokú hasonlóságot mutat a zebradánió és az emlősök között (Flynn III et al., 2009; Forn-Cuní et al., 2017; Marza et al., 2005; Miyares et al., 2014; Quinlivan & Farber, 2017; Wallace & Pack, 2003). Az eredmények magasabb rendű gerincesek irányába történő extrapolálásakor ugyanakkor tekintetbe kell venni, hogy a zebradánió embrió modell egy placentát nélkülöző, közvetett anyai hatásoktól mentes rendszert képvisel.

Javaslatok

Doktori munkám eredményei alapján az alábbi vizsgálatok javasolhatók a jövőben:

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

6. Új tudományos eredmények

1. Doktori munkámban elsőként vizsgáltam a szubletális koncentrációkkal történő embrionális aflatoxin B1 (AFB1)-expozíció teljes RNS szekvenáláson alapuló, teljes transzkriptomra gyakorolt hatásait 120 órás zebradánió lárvákban, amelynek során kimutattam, hogy az AFB1-expozíció jelentős mértékben gátol számos energiaszerzésre irányuló anyagcsereútvonalat, valamint az immunválasz- és a gyulladás-asszociált géncsoportok erőteljes indukálását eredményezi.
2. Elsőként számoltam be a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció neutrofil granulocitákra gyakorolt – megváltozott eloszlásban, sejtszámban és lokális gyulladásra adott válaszreakcióban megmutatkozó – szignifikáns hatásairól 120 órás zebradánió lárvákban.
3. Elsőként mutattam ki a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíciónak az *in vivo* nitrogén-monoxid termelődésre és az L-arginin tartalomra gyakorolt ellentétes irányú hatását 120 órás zebradánió lárvákban.
4. Elsőként mutattam ki a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció zebradánió embriók/lárvák szik-lipid mobilizációjára gyakorolt gátló hatásait.
5. Elsőként számoltam be a szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíciónak az emésztőrendszer fejlődését és funkcióját károsító hatásairól zebradánió embriókban/lárvákban.

7. Összefoglalás

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

A terhesség, illetve vemhesség időszaka kiemelten veszélyeztetett periódus az AFB1-kitettség szempontjából, mivel a toxin átjut a placentán, potenciálisan károsítva a fejlődő utódot. Az embrionális korban bekövetkező környezeti stresszhatások következményei az utódra nézve széles skálát ölelnek fel, megmutatkozhatnak egyrészt akut, pl. teratogén hatásokban, mindemellett felnőtt kori betegségekben, az azokra való fogékonyság növekedésében, vagy egyes patogénekkal szembeni ellenállóképeség csökkenésében egyaránt. Mindezt kiemelten fontos az embrionális xenobiotikum-kitettség biológiai hatásainak minél alaposabb megismerése. Noha az aflatoxikózis egyes kórképei madarakban, emlősökben és halakban már régóta ismeretesek, az embriotoxikus hatások azonban részletesebb feltérképezésre szorulnak.

Jelen doktori munka elsődleges célját az alacsony, szubletális koncentrációkkal történő embrionális AFB1-expozíció komplex hatásvizsgálata képezte zebradánió embriókon és lárvákon. A zebradánió a biológiai tudományok számos ágának közkedvelt gerinces modellszervezete, amely megannyi előnyös tulajdonságából adódóan kiemelt helyen szerepel többek között a környezeti szennyező anyagok, illetve terápiás célú vegyületek embrionális hatásainak vizsgálatában. Számos molekuláris, sejt, szövet, illetve szerv szintű hasonlóság mutatkozik meg a zebradánió és az emlősök között, amely alkalmassá teszi a fajt magasabb rendű gerinceseket érő stresszhatások és betegségek bizonyos mértékű modellezésére. A zebradánió külső termékenyüléséből adódóan, a doktori munka az AFB1-expozíció anyai hatásoktól független, direkt embriotoxikus potenciálját vizsgálta, különböző molekuláris

biológiai, bioinformatikai, immunológiai és toxikológiai módszerek integrálásán keresztül.

A szubletális, embrionális AFB1-expozíció nem eredményezett drasztikus morfológiai elváltozásokat a 120 órás lárváknál, a teljes testhosszban azonban egy enyhe, az úszóhólyag méretében pedig már számottevőbb mértékű csökkenés volt tapasztalható. Mindemellett igen jelentős, transzkriptom szintű eltérések mutatkoztak meg a kezelést követően. Az AFB1 által legszignifikánsabb mértékben gátolt biológiai folyamatok közé többek között az oxidoreduktáz aktivitás, valamint a szerves sav és lipid anyagcsere, illetve egyéb katabolikus anyagcsereútvonalak tartoztak. Az AFB1 expozíció által fokozott mRNS kifejeződést mutató gének között pedig kimagasló mértékben dúsultak fel a különböző immunválasz- és gyulladás-asszociált géncsoportok. A veleszületett immunrendszer érintettségének további karakterizálása során a neutrofil granulociták lárvákon belüli diffúz szóródása, emelkedett nitrogén-monoxid termelődés, valamint az immun- és gyulladás-specifikus markergének erőteljes indukálódása jelentkezett. Mindez egyrészt megerősítette a transzkriptóm-analízis ide vonatkozó eredményeit másrészt az AFB1-expozíció szisztémás jellegű gyulladás-indukáló képességét tükrözte vissza. Továbbá, LC10 értéken a neutrofil granulociták gyakorisága szignifikáns mértékben csökkent a teljes lárvákon belül. Mindemellett az AFB1 már LC10 alatti koncentrációknál is jelentősen befolyásolta a granulociták lokális sebzésre adott válaszreakcióját.

A fejlődő embriók szik-bélrendszere kiemelt mértékben érintett területként jelent meg a szubletális AFB1-expozíciók során. Ez egyrészt az intenzív neutrofil granulocita felhalmozódásban és nitrogén-monoxid termelődésben, másrészt pedig a szikben tárolt lipidek defektív mobilizációjában, valamint a gasztointesztinális rendszer alulfejlettségében, funkcionális/anatómiai defektusaiban nyilvánult meg. Az itt tapasztalt tünetegyüttes is összhangban volt a teljes RNS szekvenálás és transzkriptóm-analízis során nyert eredményekkel, amelyeket a lipid-metabolizmusban és transzportban, valamint az emésztőrendszer morfogenezisében kulcsszerepet játszó markergének RT-qPCR által meghatározott erőteljes alulexpresszációja szintén megerősített.

Összefoglalva doktori munkám eredményeit, elmondható, hogy az embrionális AFB1-expozíció már LC10 és az alatti értékeken jelentős mértékű és széles körű káros hatással bír a 120 órás zebradánió lárvákban. Az AFB1 szignifikáns khatással volt az embrionális/lárvális veleszületett immunrendszerre, pro-inflammatorikus és immunmoduláns hatások indukálásán keresztül. Mindemellett kiemelt mértékben

befolyásolta az embriók/lárvák energiaszerzésre irányuló folyamatait, többek között a tartalék lipidek mobilizációjának, az emésztőrendszer fejlődésének és működésének, valamint számos anyagcsereútvonalnak a megzavarásán keresztül. Jelen doktori munka egyrészt felhívja a figyelmet az embrionális AFB1-kitettség egészségügyi kockázataira, szorgalmazva a megelőzés és mentesítés módszereinek fejlesztését, másrészt pedig egy viszonylag költséghatékony modellrendszerben végpontokat szolgáltat az AFB1 általi toxicitás mérséklésére irányuló terápiás célú anyagok jövőbeli vizsgálatához.

Habár az embert és haszonállatait érő *in utero* AFB1 terhelés utódokra gyakorolt hatásai mögött húzódó molekuláris biológiai és élettani folyamatok részletesebb megismerésre szorulnak, reményeim szerint a doktori munkám által szolgáltatott, zebadánió modellrendszer segítségével született eredmények hozzájárulnak az AFB1 által indukált embriotoxikus hatások ismeretanyagához.

8. Summary

Mycotoxin contamination of foods and feeds poses a global human and animal health risk and leads to economic problems. Aflatoxin B1 (AFB1) is one of the most prominent mycotoxins with the highest acute and chronic toxicity and is frequently found in cereals, oilseeds, spices, and their products. Changes in environmental and weather conditions due to climate change may favor the growth and/or toxin production of aflatoxigenic filamentous fungi. Various predictive models forecast an increase in AFB1 contamination of certain grains, especially maize, and the expansion of affected geographical regions in the near future, which can result in an elevated risk to human and domestic animal health.

Pregnancy or gestation is a highly vulnerable period for the consequences of AFB1 exposure, as the toxin can cross the placental barrier and potentially harm the developing embryo. Embryonic exposure to environmental stress factors may lead to a broad range of adverse biological effects, from serious developmental problems to long-term consequences such as increased susceptibility to adult diseases. Therefore, it is paramount to understand the biological effects of xenobiotic exposure during critical periods of development. Although some pathological features of aflatoxicosis in certain fish, bird, and mammal species have been known for a long time, the embryotoxic properties of AFB1 need to be further explored.

The present thesis's primary objective was to comprehensively investigate the effects of embryonic AFB1 exposure at relatively low, sub-lethal concentrations in zebrafish embryos and larvae. Due to its advantageous properties, zebrafish has become a popular vertebrate model organism in many biological research areas. Its embryos are frequently used in toxicological, ecotoxicological, and pharmacological studies. Zebrafish shares many molecular, developmental, physiological and morphological similarities with mammals and humans, making this fish a suitable and promising model for a better understanding of xenobiotic exposure-related human diseases. The development of zebrafish embryos occurs externally, which allows us to explore the embryotoxicity of AFB1 independently from maternally-mediated harmful effects. Thus, my doctoral research investigated the direct embryotoxic potential of AFB1 by integrating molecular biological, bioinformatical, toxicological, and immunological methodologies.

The sublethal embryonic exposure to AFB1 did not result in drastic morphological alterations in the 120 hpf zebrafish larvae. However, a slight decrease in total body length and a more pronounced reduction in swim bladder area were observed. At the same time, the AFB1-exposure triggered global transcriptomic changes involving more than a thousand differentially expressed genes. Oxidoreductive activity, organic acid, and lipid metabolism, and other catabolic pathways were the most significantly down-regulated biological processes. In contrast, immune response- and inflammation-related gene ontology terms were prominently enriched among the up-regulated genes. Further characterization of the immunological effects of AFB1 revealed diffuse widespread neutrophil distribution, elevated nitric-oxide production, and increased inflammatory gene expression in the whole larvae. These findings confirm the results of the whole-transcriptome RNA-sequencing and indicate a systemic inflammation-induction by embryonic AFB1-exposure. Furthermore, the neutrophil frequency in the whole larvae was significantly reduced at LC10, and at the same time, the neutrophil recruitment during a local inflammation decreased considerably at concentrations below LC10.

The abdominal region (yolk sac and intestinal area) of the AFB1-exposed developing embryos/larvae was prominently affected, which was manifested by intense neutrophil accumulation, enhanced nitric-oxide production, defective yolk lipid mobilization, and impaired gastrointestinal function. These phenomena are also consistent with the results obtained from the transcriptome analysis, and the significant down-regulation of yolk lipid metabolism and transport-associated and digestive tract morphogenesis-associated gene sets.

Taken together, the embryonic exposure to sub-lethal concentrations of AFB1 resulted in extensive transcriptomic and developmental alterations in the 120 hpf zebrafish larvae. AFB1 induced pro-inflammatory and immunomodulatory effects and disturbed the energy metabolism of the larvae, which were accompanied by insufficient lipid mobilization and abnormal gastrointestinal tract development. The results of this doctoral research draw attention to the hazardous potential of embryonic AFB1 exposure and emphasize the urgent need for improving prevention and mitigation strategies. Besides, the integrative zebrafish models used in this study provide different endpoints for developing and evaluating antidotes or therapeutic compounds.

9. Irodalomjegyzék

- Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablutowicz, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A., Weaver, M.A., 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Rev.* 28, 142–153.
<https://doi.org/10.1080/15569540903081590>
- Abdulrazzaq, Y.M., Osman, N., Ibrahim, A., 2002. Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates. *Ann. Trop. Paediatr.* 22, 3–9.
<https://doi.org/10.1179/027249302125000094>
- Abeydeera, L.R., Wang, W., Cantley, T.C., Rieke, A., Prather, R.S., Day, B.N., 1998. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev. Inc. Gamete Res.* 51, 395–401.
- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26, 499–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- Akinrinde, A.S., Ogunbunmi, T., Akinrinmade, F.J., 2020. Acute aflatoxin B1-induced gastro-duodenal and hepatic oxidative damage is preceded by time-dependent hyperlactatemia in rats. *Mycotoxin Res.* 36, 443–452.
<https://doi.org/10.1007/s12550-020-00408-6>
- Alberts, J.F., Lilly, M., Rheeder, J.P., Burger, H.M., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A., 2017. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. *Food Control* 73, 101–109.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.029>
- Allcroft, R., Rogers, H., Lewis, G., Nabney, J., Best, P.E., 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the ‘milk toxin.’ *Nature* 209, 154–155.
- Alshannaq, A., Yu, J.H., 2021. Analysis of EU rapid alert system (RASFF) notifications for aflatoxins in exported US food and feed products for 2010–2019. *Toxins (Basel)*. 13, 90. <https://doi.org/10.3390/toxins13020090>
- An, Y., Shi, X., Tang, X., Wang, Y., Shen, F., Zhang, Q., Wang, C., Jiang, M., Liu, M., Yu, L., 2017. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-mediated autophagy and extracellular trap formation in macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00053>
- Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L., 1987. Effect of early aflatoxin B1 exposure on in vivo and in vitro antibody responses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* 31, 19–22.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N., 1963. Aflatoxins b and g. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1706–1707.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N., 1965. The structures of aflatoxins B and G1. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 882–886.
<https://doi.org/10.1021/ja01082a031>
- Ashley, L.M., Halver, J.E., Wogan, G.N., 1964. Hepatoma and aflatoxicosis in Trout. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23.
- Augustine-Rauch, K., Zhang, C.X., Panzica-Kelly, J.M., 2010. In vitro developmental toxicology assays: a review of the state of the science of rodent

- and zebrafish whole embryo culture and embryonic stem cell assays. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 90, 87–98.
- Bailey, E.A., Iyer, R.S., Stone, M.P., Harris, T.M., Essigmann, J.M., 1996. Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1535–1539. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1535>
- Barth, A., Brucker, N., Moro, A.M., Nascimento, S., Goethel, G., Souto, C., Fracasso, R., Sauer, E., Altknecht, L., da Costa, B., Duarte, M., Menezes, C.B., Tasca, T., Arbo, M.D., Garcia, S.C., 2017. Association between inflammation processes, DNA damage, and exposure to environmental pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 353–362. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7772-0>
- Bassir, O., Adekunle, A., 1970. Teratogenic action of aflatoxin B1, palmo-toxin Bo and palmotoxin Go on the chick embryo. *J. Pathol.* 102, 49–51.
- Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M., Bolognesi, A., 2016. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>
- Battilani, P., Toscano, P., Van Der Fels-Klerx, H.J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T., 2016. Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci. Rep.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Bbosa, G.S., Kitya, D., Odda, J., Ogwal-Okeng, J., 2013. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health (Irvine. Calif.)*. 05, 14–34. <https://doi.org/10.4236/health.2013.510a1003>
- Benard, E.L., van der Sar, A.M., Ellett, F., Lieschke, G.J., Spaink, H.P., Meijer, A.H., 2012. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J. Vis. Exp.* e3781, 1–8. <https://doi.org/10.3791/3781>
- Benkerroum, N., 2020a. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 423. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- Benkerroum, N., 2020b. Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in southeast asian and sub-saharan african countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041215>
- Bernardos, R.L., Raymond, P.A., 2006. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr. Patterns* 6, 1007–1013. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.04.006>
- Bertrand, J.Y., Kim, A.D., Violette, E.P., Stachura, D.L., Cisson, J.L., Traver, D., 2007. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development* 134, 4147–4156. <https://doi.org/10.1242/dev.012385>
- Bhatia, R., Gautam, S.K., Cannon, A., Thompson, C., Hall, B.R., Aithal, A., Banerjee, K., Jain, M., Solheim, J.C., Kumar, S., Batra, S.K., 2019. Cancer-associated mucins: role in immune modulation and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 223–236. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-09775-0>
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Bragoszewska, E., 2020. The dose of fungal aerosol inhaled by workers in a waste-sorting plant in Poland: A case study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17,

177. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010177>

- Brannon, M.K., Davis, J.M., Mathias, J.R., Hall, C.J., Emerson, J.C., Crosier, P.S., Huttenlocher, A., Ramakrishnan, L., Moskowitz, S.M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cell. Microbiol.* 11, 755–768. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01288.x>
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B. chu, Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069>
- Buhler, D.R., Yang, Y.H., Dreher, T., Miranda, C.L., Wang, J.L., 1995. Cloning, sequencing and expression of the major rainbow trout constitutive cytochrome P450 (CYP2K1). Identification of a new cytochrome P450 gene subfamily. *Mar. Environ. Res.* 39, 1–4. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00017-J](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)00017-J)
- Calderón-Garcidueñas, L., Maronpot, R.R., Torres-Jardon, R., Henríquez-Roldán, C., Schoonhoven, R., Acuña-Ayala, H., Villarreal-Calderón, A., Nakamura, J., Fernando, R., Reed, W., Azzarelli, B., Swenberg, J.A., 2003. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol. Pathol.* 31, 524–538. <https://doi.org/10.1080/01926230390226645>
- Canedo, A., Saiki, P., Santos, A.L., da Silva Carneiro, K., de Souza, A.M., Qualhato, G., da Silva Brito, R., Mello-Andrade, F., Rocha, T.L., 2022. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. *Cienc. Anim. Bras.* 23. <https://doi.org/10.1590/1809-6891V22E-70884>
- Canli, Ö., Nicolas, A.M., Gupta, J., Finkelmeier, F., Goncharova, O., Pesic, M., Neumann, T., Horst, D., Löwer, M., Sahin, U., Greten, F.R., 2017. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. *Cancer Cell* 32, 869-883.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.004>
- Cao, Q. qin, Lin, L. xi, Xu, T. ting, Lu, Y., Zhang, C. dong, Yue, K., Huang, S. cheng, Dong, H. ju, Jian, F. chun, 2021. Aflatoxin B1 alters meat quality associated with oxidative stress, inflammation, and gut-microbiota in sheep. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 225, 112754. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112754>
- Chen, J., Lv, Z., Cheng, Z., Wang, T., Li, P., Wu, A., Nepovimova, E., Long, M., Wu, W., Kuca, K., 2021. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 inhibits aflatoxin B1-induced cecal inflammation in mice by regulating their intestinal flora. *Food Chem. Toxicol.* 156, 112438. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112438>
- Chen, R.J., Huang, C.C., Pranata, R., Lee, Y.H., Chen, Y.Y., Wu, Y.H., Wang, Y.J., 2021. Modulation of innate immune toxicity by silver nanoparticle exposure and the preventive effects of pterostilbene. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22052536>
- Chen, T., Liu, H.X., Yan, H.Y., Wu, D.M., Ping, J., 2016. Developmental origins of inflammatory and immune diseases. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 558–565. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw036>
- Chen, X., Naehrer, K., Applegate, T.J., 2016. Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks. *Poult. Sci.* 95, 1312–1325. <https://doi.org/10.3382/ps/pew022>
- Cheng, B., Zhang, H., Hu, J., Peng, Y., Yang, J., Liao, X., Liu, F., Guo, J., Hu, C.,

- Lu, H., 2020. The immunotoxicity and neurobehavioral toxicity of zebrafish induced by famoxadone-cymoxanil. *Chemosphere* 247, 125870. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125870>
- Chi, N.C., Shaw, R.M., De Val, S., Kang, G., Jan, L.Y., Black, B.L., Stainier, D.Y.R., 2008. Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation. *Genes Dev.* 22, 734–739. <https://doi.org/10.1101/gad.1629408>
- Chu, J., Sadler, K.C., 2009. New school in liver development: Lessons from zebrafish. *Hepatology* 50, 1656–1663. <https://doi.org/10.1002/hep.23157>
- Cleveland, T.E., Carter-Wientjes, C.H., De Lucca, A.J., Boué, S.M., 2009. Effect of soybean volatile compounds on aspergillus flavus growth and aflatoxin production. *J. Food Sci.* 74, H83–H87. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01078.x>
- Cotty, P.J., Jaime-Garcia, R., 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060>
- d'Alençon, C.A., Peña, O.A., Wittmann, C., Gallardo, V.E., Jones, R.A., Loosli, F., Liebel, U., Grabher, C., Allende, M.L., 2010. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-151>
- Dallaire, F., Dewailly, É., Vézina, C., Muckle, G., Weber, J.P., Bruneau, S., Ayotte, P., 2006. Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on incidence of acute respiratory infections in preschool inuit children. *Environ. Health Perspect.* 114, 1301–1305. <https://doi.org/10.1289/ehp.8683>
- Das, S.K., Nair, R.C., Patthey, H.L., Mgbodile, M.U.K., 1978. The effects of aflatoxin b1 on rat fetal lung lipids. *Neonatology* 33, 283–288. <https://doi.org/10.1159/000241085>
- De Iongh, H., Vles, R.O., Van Pelt, J.G., 1964. Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. *Nature* 202, 466–467.
- De Vos, G., Abotaga, S., Liao, Z., Jerschow, E., Rosenstreich, D., 2007. Selective effect of mercury on Th2-type cytokine production in humans. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 29, 537–548. <https://doi.org/10.1080/08923970701690993>
- De Vries, H.R., Maxwell, S.M., Hendrickse, R.G., 1989. Foetal and neonatal exposure to aflatoxins. *Acta Paediatr. Scand.* 78, 373–378. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1989.tb11095.x>
- Degen, G., Neumann, H., 1978. Major metabolite of aflatoxin-B₁ in rat is a glutathione conjugate. *Chem. Biol. Interact.* 22, 239–255.
- Detrich, H.W., Kieran, M.W., Chan, F.Y., Barone, L.M., Yee, K., Rundstadler, J.A., Pratt, S., Ransom, D., Zon, L.I., 1995. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10713–10717. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10713>
- Detrich, H.W., Westerfield, M., Zon, L.I., 1999. Overview of the zebrafish system. *Methods Cell Biol.* 59, 3–10.
- Dey, D.K., Chang, S.N., Kang, S.C., 2021. The inflammation response and risk associated with aflatoxin B1 contamination was minimized by insect peptide CopA3 treatment and act towards the beneficial health outcomes. *Environ. Pollut.* 268, 115713. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115713>
- Dey, D.K., Kang, S.C., 2020. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-

- dependent caspase-mediated apoptosis in normal human cells, inhibits *Allium cepa* root cell division, and triggers inflammatory response in zebrafish larvae. *Sci. Total Environ.* 737, 139704.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139704>
- Diaz, G.J., Murcia, H.W., 2011. Biotransformation of Aflatoxin B1 and Its Relationship with the Differential Toxicological Response to Aflatoxin in Commercial Poultry Species, in: Guevara-González, R.G. (Ed.), *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*. InTech, pp. 3–20.
- Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S., Klich, M.A., 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25, 249–270.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001341>
- Dietert, R.R., Bloom, E., Qureshi, M.A., Nanna, U.C., 1983. Hematological toxicology following embryonic exposure to aflatoxin-B1. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 173, 481–485.
- Dietert, R.R., Lee, J.E., Hussain, I., Piepenbrink, M., 2004. Developmental immunotoxicology of lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 86–94.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.020>
- Dobolyi, C., Sebok, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Szécsi, Á., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Krifaton, C., Kukolya, J., 2013. Erratum: Occurrence of aflatoxin producing *aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary (*Acta Alimentaria*). *Acta Aliment.* 42, 649.
<https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.4.18>
- Dong, X., Liu, H., Chen, F., Li, D., Zhao, Y., 2014. MiR-214 Promotes the Alcohol-Induced Oxidative Stress via Down-Regulation of Glutathione Reductase and Cytochrome P450 Oxidoreductase in Liver Cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 68–77. <https://doi.org/10.1111/acer.12209>
- Duan, J., Yu, Y., Li, Yang, Li, Yanbo, Liu, H., Jing, L., Yang, M., Wang, J., Li, C., Sun, Z., 2016. Low-dose exposure of silica nanoparticles induces cardiac dysfunction via neutrophil-mediated inflammation and cardiac contraction in zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 10, 575–585.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1102981>
- Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., Tourlet, S., Guilloteau, D., Chalon, S., Andres, C.R., 2011. Fetal exposure to teratogens: Evidence of genes involved in autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1254–1265.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.013>
- Dugershaw, B.B., Aengenheister, L., Hansen, S.S.K., Hougaard, K.S., Buerki-Thurnherr, T., 2020. Recent insights on indirect mechanisms in developmental toxicity of nanomaterials. Part. *Fibre Toxicol.* 17, 1–22.
<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00359-x>
- El-Kenawi, A., Ruffell, B., 2017. Inflammation, ROS, and Mutagenesis. *Cancer Cell* 32, 727–729. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.015>
- El-Nahla, S.M., Imam, H.M., Moussa, E.A., Ibrahim, A.M., Ghanam, A.R., 2013. Teratogenic effects of aflatoxin in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Vet. Anat.* 6, 67–85. <https://doi.org/10.21608/jva.2013.45024>
- Ellett, F., Lieschke, G.J., 2010. Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 563–570.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.05.004>
- Emelyanova, L., Ashary, Z., Cosic, M., Negmadjanov, U., Ross, G., Rizvi, F., Olet,

- S., Kress, D., Sra, J., Jamil Tajik, A., Holmuhamedov, E.L., Shi, Y., Jahangir, A., 2016. Selective downregulation of mitochondrial electron transport chain activity and increased oxidative stress in human atrial fibrillation. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 311, H54–H63.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00699.2015>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R., 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25%. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 2773–2789.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Flanagan-Steet, H., Fox, M.A., Meyer, D., Sanes, J.R., 2005. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* 132, 4471–4481.
<https://doi.org/10.1242/dev.02044>
- Flynn III, E.J., Trent, C.M., Rawls, J.F., 2009. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Lipid Res.* 50, 1641–1652.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M800590-JLR200>
- Forbes, L.J.L., Patel, M.D., Rudnicka, A.R., Cook, D.G., Bush, T., Stedman, J.R., Whincup, P.H., Strachan, D.P., Anderson, R.H., 2009. Chronic exposure to outdoor air pollution and markers of systemic inflammation. *Epidemiology* 20, 245–253. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318190ea3f>
- 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>
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N.A., Meikle, P.J., Sinclair, A.J., Gibert, Y., 2016. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Rep.* 14, 1317–1329.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.016>
- Gablíks, J., Schaeffer, W., Friedman, L., Wogan, G., 1965. Effect of aflatoxin B1 on cell cultures. *J. Bacteriol.* 90, 720–723. <https://doi.org/10.2307/1590041>
- Gao, B., Tsukamoto, H., 2016. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? *Gastroenterology* 150, 1704–1709.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.025>
- Gao, X., Jiang, L., Xu, J., Liu, W., Li, S., Huang, W., Zhao, H., Yang, Z., Yu, X., Wei, Z., 2022. Aflatoxin B1-activated heterophil extracellular traps result in the immunotoxicity to liver and kidney in chickens. *Dev. Comp. Immunol.* 128, 104325. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104325>
- Gao, Y., Bao, X., Meng, L., Liu, H., Wang, J., Zheng, N., 2021. Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 Induce Compromised Intestinal Integrity through Clathrin-Mediated Endocytosis. *Toxins (Basel)*. 13, 184.
<https://doi.org/10.3390/toxins13030184>
- Geissler, F., Faustman, E.M., 1988. Developmental toxicity of aflatoxin B1 in the rodent embryo in vitro: contribution of exogenous biotransformation systems to toxicity. *Teratology* 37, 101–111.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., 2002. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Altern. to Lab. Anim.* 30, 151–176.
- Ghantous, A., Novoloaca, A., Bouaoun, L., Cuenin, C., Cros, M.P., Xu, Y., Hernandez-Vargas, H., Darboe, M.K., Prentice, A.M., Moore, S.E., Gong, Y.Y.,

- Herceg, Z., Routledge, M.N., 2021. Aflatoxin exposure during early life is associated with differential dna methylation in two-year-old gambian children. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22168967>
- Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.012>
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Cooper, C., Thornburg, K.L., 2008. Effect of in utero and early-life conditions and adult health and disease. *N. Engl. J. Med.* 359, 61–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Pinal, C., 2005. The developmental origins of adult disease. *Matern. child Nutr.* 1, 130–141. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2005.00020.x>
- Goertler, K., Löhrke, H., Schweizer, H.J., Hesse, B., 1980. Effects of aflatoxin B1 on pregnant inbred Sprague-Dawley rats and their F1 generation. A contribution to transplacental carcinogenesis. *NCI J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1349–1354.
- Goessling, W., Sadler, K.C., 2015. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology* 149, 1361–1377. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.034>
- Goldstein, J.M., Hale, T., Foster, S.L., Tobet, S.A., 2020. Sex differences in major depression and comorbidity of cardiometabolic disorders : impact of prenatal stress and immune exposures. *Neuropsychopharmacology* 44, 59–70. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0146-1>
- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Hall, A.J., Wild, C.P., 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: Cross sectional study. *Br. Med. J.* 325, 20–21. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7354.20>
- Gong, Y.Y., Watson, S., Routledge, M.N., 2016. Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies. *Food Saf.* 4, 14–27. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2015026>
- Gray, C., Loynes, C.A., Whyte, M.K.B., Crossman, D.C., Renshaw, S.A., Chico, T.J.A., 2011. Simultaneous intravital imaging of macrophage and neutrophil behaviour during inflammation using a novel transgenic zebrafish. *Thromb. Haemost.* 105, 811–819. <https://doi.org/10.1160/TH10-08-0525>
- Gregorio, M.C. Di, Bordin, K., Souto, P.C.M.D.C., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F., 2015. Comparative biotransformation of aflatoxin B1 in swine, domestic fowls, and humans. *Toxin Rev.* 34, 142–150. <https://doi.org/10.3109/15569543.2015.1091979>
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., 2019. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins (Basel)*. 11, 375. <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>
- Hagberg, H., Gressens, P., Mallard, C., 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann. Neurol.* 71, 444–457. <https://doi.org/10.1002/ana.22620>
- Hamid, A.S., Tesfamariam, S.G., Zhang, Y., Zhang, Z.G., 2013. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncol. Lett.* 5, 1087–1092. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1169>
- Herbomel, P., Thisse, B., Thisse, C., 1999. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735–3745.

[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80407-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80407-2)

- Hernandez-Vargas, H., Castelino, J., Silver, M.J., Dominguez-Salas, P., Cros, M.P., Durand, G., Le Calvez-Kelm, F., Prentice, A.M., Wild, C.P., Moore, S.E., Hennig, B.J., Herceg, Z., Gong, Y.Y., Routledge, M.N., 2015. Exposure to aflatoxin B1 in Utero is associated with DNA methylation in white blood cells of infants in The Gambia. *Int. J. Epidemiol.* 44, 1238–1248. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv027>
- Hernández, P.P., Moreno, V., Olivari, F.A., Allende, M.L., 2006. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* 213, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.10.015>
- Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B., 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5, 971–974. <https://doi.org/10.1038/ni1004-971>
- Holden, L.A., Brown, K.H., 2018. Baseline mRNA expression differs widely between common laboratory strains of zebrafish. *Sci. Rep.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23129-4>
- Holladay, S.D., 1999. Prenatal immunotoxicant exposure and postnatal autoimmune disease. *Environ. Health Perspect.* 107, 687–691.
- Holladay, S.D., Smialowicz, R.J., 2000. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ. Health Perspect.* 108, 463–473.
- Holsapple, M.P., West, L.J., Landreth, K.S., 2003. Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 68, 321–334. <https://doi.org/10.1002/bdrb.10035>
- Holzapfel, C.W., Steyn, P.S., Purchase, I.F.H., 1966. Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Lett.* 7, 2799–2803.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrant, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L. & Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hsieh, D.P., Wong, J.J., 1994. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins, in: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, pp. 73–88. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(97\)00022-9](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(97)00022-9)
- Huang, C.J., Tu, C.T., Hsiao, C. Der, Hsieh, F.J., Tsai, H.J., 2003. Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Dev. Dyn.* 228, 30–40. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10356>
- Huang, H., Vogel, S.S., Liu, N., Melton, D.A., Lin, S., 2001. Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177, 117–124. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00408-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00408-7)
- Huang, W., Cao, Z., Yao, Q., Ji, Q., Zhang, J., Li, Y., 2020. Mitochondrial damage are involved in Aflatoxin B1-induced testicular damage and spermatogenesis disorder in mice. *Sci. Total Environ.* 701, 135077. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135077>
- Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101–134. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)

- IARC, 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, in: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer & World Health Organization.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jelinek, C.F., Pohland, A.E., Wood, G.E., 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 223–230.
- Jelinek, R., 1982. Use of chick embryo in screening for embryotoxicity. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 2, 255–261.
- Jiang, Y., Hansen, P.J., Xiao, Y., Amaral, T.F., Vyas, D., Adesogan, A.T., 2019. Aflatoxin compromises development of the preimplantation bovine embryo through mechanisms independent of reactive oxygen production. *J. Dairy Sci.* 102, 10506–10513. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16839>
- Kiessling, K.-H., 1986. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure Appl. Chem.* 58, 327–338.
- Kihara, T., Surjono, T.W., Sakamoto, M., Matsuo, T., Yasuda, Y., Tanimura, T., 2001. Effects of Prenatal Aflatoxin B1 Exposure on Behaviors of Rat Offspring. *Toxicol. Sci.* 61, 368–373. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.2.368>
- Kim, H., Kim, S., Chung, A.Y., Bae, Y.K., Hibi, M., Lim, C.S., Park, H.C., 2008. Notch-regulated perineurium development from zebrafish spinal cord. *Neurosci. Lett.* 448, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.072>
- Kimbrough, T.D., Llewellyn, G.C., Weekley, L.B., 1992. The effect of Aflatoxin B1 exposure on serotonin metabolism: Response to a tryptophan load. *Metab. Brain Dis.* 7, 175–182. <https://doi.org/10.1007/BF01000244>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kissa, K., Murayama, E., Zapata, A., Cortés, A., Perret, E., Machu, C., Herbomel, P., 2008. Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization. *Blood* 111, 1147–1156. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099499>
- Ko, S.K., Chen, X., Yoon, J., Shin, I., 2011. Zebrafish as a good vertebrate model for molecular imaging using fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.* 40, 2120–2130. <https://doi.org/10.1039/c0cs00118j>
- Kojima, H., Nagano, T., 2000. Fluorescent indicators for nitric oxide. *Adv. Mater.* 12, 763–765. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(200005\)12:10<763::AID-ADMA763>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(200005)12:10<763::AID-ADMA763>3.0.CO;2-R)
- Kondo, M., 2009. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol. Rev.* 238, 37–46.
- Koopman, W.J.H., Verkaart, S., Visch, H.J., Van Emst-De Vries, S., Nijtmans, L.G.J., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2007. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: Radical changes in mitochondrial morphology? *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 293, 22–29. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00194.2006>
- Kos, J., Mastilović, J., Hajnal, E.J., Šarić, B., 2013. Natural occurrence of aflatoxins

- in maize harvested in Serbia during 2009-2012. *Food Control* 34, 31–34.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.004>
- Kristofco, L.A., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2018. Differential uptake of and sensitivity to diphenhydramine in embryonic and larval zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1175–1181. <https://doi.org/10.1002/etc.4068>
- Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K., Kang, S.G., 2017. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Front. Microbiol.* 7, 2170. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Kussmaul, L., Hirst, J., 2006. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7607–7612.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103>
- Kyei, N.N.A., Boakye, D., Gabrysch, S., 2020. Maternal mycotoxin exposure and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *Mycotoxin Res.* 36, 243–255. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00384-6>
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V., 2016. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.001>
- Lam, S.H., Chua, H.L., Gong, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: A gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 9–28. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4)
- Landreth, K., 2002. Critical windows in development of the rodent immune system. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 493–498.
- Lauer, J.M., Duggan, C.P., Ausman, L.M., Griffiths, J.K., Webb, P., Wang, J.S., Xue, K.S., Agaba, E., Nshakira, N., Ghosh, S., 2019. Maternal aflatoxin exposure during pregnancy and adverse birth outcomes in Uganda. *Matern. Child Nutr.* 15, e12701. <https://doi.org/10.1111/mcn.12701>
- Le Guyader, D., Redd, M.J., Colucci-Guyon, E., Murayama, E., Kissa, K., Briolat, V., Mordelet, E., Zapata, A., Shinomiya, H., Herbomel, P., 2008. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood* 111, 132–141. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095398>
- Lee, H., Inselman, A.L., Kanungo, J., Deborah, K., Lee, H., Inselman, A.L., Kanungo, J., Hansen, D.K., 2012. Alternative models in developmental toxicology. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 10–22.
<https://doi.org/10.3109/19396368.2011.648302>
- Lee, S.H., Ko, C.I., Jee, Y., Jeong, Y., Kim, M., Kim, J.S., Jeon, Y.J., 2013. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model. *Carbohydr. Polym.* 92, 84–89.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.066>
- Lee, S.J., Wang-Buhler, J.L., Cok, I., Yu, T.S., Yang, Y.H., Miranda, C.L., Lech, J., Buhler, D.R., 1998. Cloning, sequencing, and tissue expression of CYP3A27, a new member of the CYP3A subfamily from embryonic and adult rainbow trout livers. *Arch. Biochem. Biophys.* 360, 53–61.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0943>
- Li, L., Yan, B., Shi, Y.Q., Zhang, W.Q., Wen, Z.L., 2012. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 25353–25360.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349126>

- Lieschke, G.J., Oates, A.C., Paw, B.H., Thompson, M.A., Hall, N.E., Ward, A.C., Ho, R.K., Zon, L.I., Layton, J.E., 2002. Zebrafish SPI-1 (PU.1) marks a site of myeloid development independent of primitive erythropoiesis: Implications for axial patterning. *Dev. Biol.* 246, 274–295.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0657>
- Loynes, C.A., Martin, J.S., Robertson, A., Trushell, D.M.I., Ingham, P.W., Whyte, M.K.B., Renshaw, S.A., 2010. Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* 87, 203–212. <https://doi.org/10.1189/jlb.0409255>
- Lu, X., Hu, B., Shao, L., Tian, Y., Jin, T., Jin, Y., Ji, S., Fan, X., 2013. Integrated analysis of transcriptomics and metabolomics profiles in aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in rat. *Food Chem. Toxicol.* 55, 444–455.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.020>
- Ma, J., Liu, Y., Guo, Y., Ma, Q., Ji, C., Zhao, L., 2021. Transcriptional profiling of aflatoxin b1-induced oxidative stress and inflammatory response in macrophages. *Toxins (Basel)*. 13, 401. <https://doi.org/10.3390/toxins13060401>
- Ma, K.L., Ruan, X.Z., Powis, S.H., Chen, Y., Moorhead, J.F., Varghese, Z., 2008. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology* 48, 770–781.
<https://doi.org/10.1002/hep.22423>
- Magoha, H., Kimanya, M., De Meulenaer, B., Roberfroid, D., Lachat, C., Kolsteren, P., 2014. Association between aflatoxin M exposure through breast milk and growth impairment in infants from northern Tanzania. *World Mycotoxin J.* 7, 277–284. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1705>
- Mahato, D.K., Lee, K.E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K.N., Kumar, P., Kang, S.G., 2019. Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies. *Front. Microbiol.* 10, 2266.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>
- Maresca, M., Fantini, J., 2010. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicon* 56, 282–294. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.04.016>
- Marroquín-Cardona, A.G., Johnson, N.M., Phillips, T.D., Hayes, A.W., 2014. Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food Chem. Toxicol.* 69, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- Mary, V.S., Theumer, M.G., Arias, S.L., Rubinstein, H.R., 2012. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology* 302, 299–307.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.08.012>
- Marza, E., Barthe, C., Andre, M., Villeneuve, L., Helou, C., Babin, P.J., 2005. Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 232, 506–518.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20251>
- Masri, M.S., Booth, A.N., Hsieh, D.P., 1974. Comparative metabolic conversion of aflatoxin B1 to M1 and Q1 by monkey, rat and chicken liver. *Life Sci.* 15, 203–212.
- Mathew, L.K., Andreasen, E.A., Tanguay, R.L., 2006. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. *Mol. Pharmacol.* 69, 257–265.

<https://doi.org/10.1124/mol.105.018044>

- Medina, A., Gilbert, M.K., Mack, B.M., OBrian, G.R., Rodríguez, A., Bhatnagar, D., Payne, G., Magan, N., 2017. Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production. *Int. J. Food Microbiol.* 256, 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.020>
- Medina, Rodríguez, A., Sultan, Y., Magan, N., 2015. Climate change factors and *Aspergillus flavus*: Effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin J.* 8, 171–179. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1726>
- Mehrzad, J., Bahari, A., Bassami, M.R., Mahmoudi, M., Dehghani, H., 2018. Immunobiologically relevant level of aflatoxin B1 alters transcription of key functional immune genes, phagocytosis and survival of human dendritic cells. *Immunol. Lett.* 197, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.008>
- Mehrzad, J., Klein, G., Kamphues, J., Wolf, P., Grabowski, N., Schuberth, H.J., 2011. In vitro effects of very low levels of aflatoxin B1 on free radicals production and bactericidal activity of bovine blood neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.01.010>
- Mehrzad, J., Malvandi, A.M., Alipour, M., Hosseinkhani, S., 2017. Environmentally relevant level of aflatoxin B1 elicits toxic pro-inflammatory response in murine CNS-derived cells. *Toxicol. Lett.* 279, 96–106.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.902>
- Meissonnier, G.M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A.M., Gong, Y.Y., Wild, C.P., Bertin, G., Galtier, P., Oswald, I.P., 2008. Immunotoxicity of aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 231, 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.04.004>
- Merza, M., Hartman, H., Rahman, M., Hwaiz, R., Zhang, E., Renström, E., Luo, L., Mörgelin, M., Regner, S., Thorlacius, H., 2015. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 149, 1920–1931.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.026>
- Meunier, R., 2012. Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic models in developmental biology: Zebrafish, 1970-2000. *Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* 43, 522–531.
<https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2011.11.013>
- Miller, J.D., 1995. Fungi and mycotoxins in grains: Implication for stored products research. *J. Stored Prod. Res.* 31, 1–16.
- Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C., Wu, F., 2016. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Addit. Contam. Part A* 33, 540–550. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1138545>
- Miyares, R.L., De Rezende, V.B., Farber, S.A., 2014. Zebrafish yolk lipid processing: A tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *DMM Dis. Model. Mech.* 7, 915–927.
<https://doi.org/10.1242/dmm.015800>
- Mohsenzadeh, M.S., Hedayati, N., Riahi-Zanjani, B., Karimi, G., 2016. Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. *Toxin Rev.* 35, 121–127.
<https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1209523>
- More, T., Reddy, G.R., Kumar, S., 2005. An evaluation of the metabolic basis of

- aflatoxin B1 toxicity by using buffalo granulocytes and agranulocytes in vitro. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 33, 387–390. <https://doi.org/10.1177/026119290503300410>
- Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H.F., Handin, R.I., Herbomel, P., 2006. Tracing Hematopoietic Precursor Migration to Successive Hematopoietic Organs during Zebrafish Development. *Immunity* 25, 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.015>
- Murcia, H., Diaz, G.J., 2020. Dealing with aflatoxin B1 dihydrodiol acute effects: Impact of aflatoxin B1-aldehyde reductase enzyme activity in poultry species tolerant to AFB1 toxic effects. *PLoS One* 15, e0235061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235061>
- Namdaran, P., Reinhart, K.E., Owens, K.N., Raible, D.W., Rubel, E.W., 2012. Identification of modulators of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *J. Neurosci.* 32, 3516–3528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3905-11.2012>
- Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B., Santini, A., 2020. Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *Foods* 9, 644. <https://doi.org/10.3390/foods9050644>
- Neldon-Ortiz, D.L., Qureshi, M.A., 1992. Effects of AFB1 embryonic exposure on chicken mononuclear phagocytic cell functions. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 187–196. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(92\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0145-305X(92)90018-8)
- Nesbitt, B., O'Kelly, J., Sargeant, K., Sheridan, A., 1962. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 195, 1062–1063.
- Ngoka, L.C.M., 2008. Dramatic down-regulation of oxidoreductases in human hepatocellular carcinoma hepG2 cells: Proteomics and gene ontology unveiling new frontiers in cancer enzymology. *Proteome Sci.* 6, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-6-29>
- Nguyen-Chi, M., Laplace-Builhe, B., Travnickova, J., Luz-Crawford, P., Tejedor, G., Phan, Q.T., Duroux-Richard, I., Levraud, J.P., Kissa, K., Lutfalla, G., Jorgensen, C., Djouad, F., 2015. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *Elife* 4, 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.07288>
- Nilsson, E.E., Sadler-Riggelman, I., Skinner, M.K., 2018. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ. Epigenetics* 4, 1–13. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy016>
- Niranjan, B.G., Bhat, N.K., Avadhani, N.G., 1982. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. *Science* (80-.). 215, 73–75. <https://doi.org/10.1126/science.6797067>
- Nourshargh, S., Alon, R., 2014. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 41, 694–707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- Oluwafemi, F., Odebiyi, T., Kolapo, A., 2012. Occupational aflatoxin exposure among feed mill workers in Nigeria. *World Mycotoxin J.* 5, 385–389. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1399>
- Örtqvist, A.K., Lundholm, C., Halfvarson, J., Ludvigsson, J.F., Almqvist, C., 2019. Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gut* 68, 218–225. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314352>
- Ottinger, C.A., Kaattari, S.L., 2000. Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B1. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 101–106. <https://doi.org/10.1006/fsim.1999.0227>

- Pang, V.F., Chiang, C.F., Chang, C.C., 2020. The in vitro effects of aflatoxin B1 on physiological functions of swine alveolar macrophages. *Vet. Med. Sci.* 6, 919–925. <https://doi.org/10.1002/vms3.313>
- Park, H.C., Kim, C.H., Bae, Y.K., Yeo, S.Y., Kim, S.H., Hong, S.K., Shin, J., Yoo, K.W., Hibi, M., Hirano, T., Miki, N., Chitnis, A.B., Huh, T.L., 2000. Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic Zebrafish with fluorescent neurons. *Dev. Biol.* 227, 279–293. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9898>
- Park, H.Y., Hertz-Picciotto, I., Petrik, J., Palkovicova, L., Kocan, A., Trnovec, T., 2008. Prenatal PCB exposure and thymus size at birth in neonates in Eastern Slovakia. *Environ. Health Perspect.* 116, 104–109. <https://doi.org/10.1289/ehp.9769>
- Park, M.V.D.Z., Bos, P.M.J., 2007. Information sources for the detection of emerging mycotoxin risks, RIVM REPORT.
- Park, S., Lee, J.Y., You, S., Song, G., Lim, W., 2020. Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes in vitro and on glial cell development in zebrafish in vivo, *Journal of Hazardous Materials.* Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121639>
- Parkin, J., Cohen, B., 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777–1789. <https://doi.org/10.7748/ns2008.12.23.15.47.c6738>
- Parkinson, A., Ogilvie, B.W., Buckley, D.B., Kazmi, F., Czerwinski, M., Parkinson, O., 2013. Biotransformation of xenobiotics, in: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill Education, pp. 185–366.
- Partanen, H.A., El-Nezami, H.S., Leppänen, J.M., Myllynen, P.K., Woodhouse, H.J., Vähäkangas, K.H., 2010. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. *Toxicol. Sci.* 113, 216–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp257>
- Pase, L., Nowell, C.J., Lieschke, G.J., 2012. In vivo real-time visualization of leukocytes and intracellular hydrogen peroxide levels during a zebrafish acute inflammation assay, 1st ed, *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391856-7.00032-9>
- Paterson, R.R.M., Lima, N., 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43, 1902–1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.010>
- Phillips, J.B., Westerfield, M., 2020. Zebrafish as a Model to Understand Human Genetic Diseases, *The Zebrafish in Biomedical Research.* Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812431-4.00047-6>
- Piğowski, M., 2019. Comparative analysis of notifications regarding mycotoxins in the rapid alert system for food and feed (RASFF). *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* 11, 725–735. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1398>
- Ponce, R.A., Gelzleichter, T., Haggerty, H.G., Heidel, S., Holdren, M.S., Lebrec, H., Mellon, R.D., Pallardy, M., 2014. Immunomodulation and lymphoma in humans. *J. Immunotoxicol.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.798388>
- Prajsnar, T.K., Hamilton, R., Garcia-Lara, J., Mcvicker, G., Williams, A., Boots, M., Foster, S.J., Renshaw, S.A., 2012. A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of staphylococcus aureus in a zebrafish model. *Cell. Microbiol.* 14, 1600–1619. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x>

- Puisieux, A., Lim, S., Groopman, J., Ozturk, M., 1991. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res.* 51, 6185–6189.
- Purchase, I.F.H., 1967. Acute toxicity of aflatoxins M1 and M2 in one-day-old ducklings. *Food Cosmet. Toxicol.* 5, 339–342.
- Quinlivan, V.H., Farber, S.A., 2017. Lipid uptake, metabolism, and transport in the larval zebrafish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 319. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00319>
- Raghubeer, S., Nagiah, S., Chaturgoon, A.A., 2017. Acute Ochratoxin A exposure induces inflammation and apoptosis in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicol* 137, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.07.013>
- Rajewsky, K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/381751a0>
- Ramsdell, H.S., Eaton, D.L., 1990. Species susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenesis: comparative kinetics of microsomal biotransformation. *Cancer Res.* 50, 615–620.
- RASFF, 2020. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2020, European Commission. Publications Office of the European Union.
- Renshaw, S.A., Loynes, C.A., Trushell, D.M.I., Elworthy, S., Ingham, P.W., Whyte, M.K.B., 2006. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108, 3976–3978. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024075>
- Richmond, J., 2000. The 3Rs - Past, Present and Future. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 27, 84–92.
- Rotimi, O.A., Rotimi, S.O., Duru, C.U., Ebebeinwe, O.J., Abiodun, A.O., Oyeniya, B.O., Faduyile, F.A., 2017. Acute aflatoxin B1 – Induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats. *Toxicol. Reports* 4, 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.07.006>
- Rushing, B.R., Selim, M.I., 2019. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food Chem. Toxicol.* 124, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Rushing, B.R., Selim, M.I., 2017. Structure and oxidation of pyrrole adducts formed between aflatoxin B2a and biological amines. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1275–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00002>
- Rychlik, K.A., Sillé, F.C.M., 2019. Environmental exposures during pregnancy: Mechanistic effects on immunity. *Birth defects Res.* 111, 178–196. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1469>
- Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2001a. Immunosuppressive effects of aflatoxin B1 in Indian major carp (*Labeo rohita*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 143–149. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(00\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(00)00017-5)
- Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2001b. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 683–695. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0345>
- Salah-Abbes, J. Ben, Abbes, S., Jebali, R., Haous, Z., Oueslati, R., 2015. Potential preventive role of lactic acid bacteria against Aflatoxin M1 immunotoxicity and genotoxicity in mice. *J. Immunotoxicol.* 12, 107–114. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.904025>
- Santacroce, M.P., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C.,

- Centoducati, G., Crescenzo, G., 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Rev. Fish Biol. Fish.* 18, 99–130. <https://doi.org/10.1007/s11160-007-9064-8>
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., Carnaghan, R., 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192, 1096–1097.
- Sarker, M.T., Wan, X., Yang, H., Wang, Z., 2021. Dietary lycopene supplementation could alleviate aflatoxin b1 induced intestinal damage through improving immune function and anti-oxidant capacity in broilers. *Animals* 11, 3165.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R., 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.026>
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Selgrade, M.K., Blain, R.B., Fedak, K.M., Cawley, M.A., 2013. Potential risk of asthma associated with in utero exposure to xenobiotics. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 99, 1–13. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21028>
- Shin, K.T., Guo, J., Niu, Y.J., Cui, X.S., 2018. The toxic effect of aflatoxin B1 on early porcine embryonic development. *Theriogenology* 118, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.002>
- Shirani, K., Zanjani, B.R., Mehri, S., Razavi, K., Badiee, A., Hayes, A.W., Giesy, J.P., Karimi, G., 2019. miR-155 influences cell-mediated immunity in Balb/c mice treated with aflatoxin M1. *Drug Chem. Toxicol.* 44, 39–46. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1556682>
- Shkumatava, A., Fischer, S., Müller, F., Strahle, U., Neumann, C.J., 2004. Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* 131, 3849–3858. <https://doi.org/10.1242/dev.01247>
- Shuaib, F.M.B., Jolly, P.E., Ehiri, J.E., Yatich, N., Jiang, Y., Funkhouser, E., Person, S.D., Wilson, C., Ellis, W.O., Wang, J.S., Williams, J.H., 2010. Association between birth outcomes and aflatoxin B1 biomarker blood levels in pregnant women in Kumasi, Ghana. *Trop. Med. Int. Heal.* 15, 160–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02435.x>
- Silva Brito, R., Canedo, A., Farias, D., Lopes, T., 2022. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology : Historical review , recent advances , and trends *Science of the Total Environment Transgenic zebra fi sh (Danio rerio) as an emerging model system in ecot. Sci. Total Environ.* 848, 157665. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157665>
- Singh, K.B., Maurya, B.K., Trigun, S.K., 2015. Activation of oxidative stress and inflammatory factors could account for histopathological progression of aflatoxin-B1 induced hepatocarcinogenesis in rat. *Mol. Cell. Biochem.* 401, 185–196. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2306-x>
- Singh, N., Venkitasubramanian, T.A., 1975. Effect of aflatoxin B1 on lipids of rat tissues. *Environ. Physiol. Biochem.* 5, 147–157.
- Skinner, M.K., 2011a. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*

- 93, 51–55. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20199>
- Skinner, M.K., 2011b. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics* 6, 838–842. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16537>
- Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A., Essigmann, J.M., 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B1: From mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22, 535–545. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.4.535>
- Smith, L.E., Prendergast, A.J., Turner, P.C., Humphrey, J.H., Stoltzfus, R.J., 2017. Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 770–776. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0730>
- Spitsbergen, J.M., Kent, M.L., 2003. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research - Advantages and current limitations. *Toxicol. Pathol.* 31, 62–87. <https://doi.org/10.1080/01926230390174959>
- 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. *Reprod. Toxicol.* 33, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>
- Supriya, C., Reddy, P.S., 2015. Prenatal exposure to aflatoxin B1: developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats. *Sci. Nat.* 102, 26. <https://doi.org/10.1007/s00114-015-1274-7>
- Sur, E., Celik, I., 2003. Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br. Poult. Sci.* 44, 558–566. <https://doi.org/10.1080/00071660310001618352>
- Sutoh, Y., Kasahara, M., 2021. The immune system of jawless vertebrates: insights into the prototype of the adaptive immune system. *Immunogenetics* 73, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01182-6>
- Tal, T., Kilty, C., Smith, A., LaLone, C., Kennedy, B., Tennant, A., McCollum, C.W., Bondesson, M., Knudsen, T., Padilla, S., Kleinstreuer, N., 2017. Screening for angiogenic inhibitors in zebrafish to evaluate a predictive model for developmental vascular toxicity. *Reprod. Toxicol.* 70, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.12.004>
- Tal, T., Yaghoobi, B., Lein, P.J., 2020. Translational toxicology in zebrafish. *Curr. Opin. Toxicol.* 23–24, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.05.004>
- Terao, K., 1967. The effect of aflatoxin on chick-embryo liver cells. *Exp. Cell Res.* 48, 151–155.
- Thisse, B., Thisse, C., 2004. Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis.
- Torraca, V., Mostowy, S., 2018. Zebrafish Infection: From Pathogenesis to Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 28, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.002>
- Torraca, V., Tulotta, C., Ewa Snaar-Jagalska, B., Meijer, A.H., 2017. The chemokine receptor CXCR4 promotes granuloma formation by sustaining a mycobacteria-induced angiogenesis programme. *Sci. Rep.* 7, 18–20. <https://doi.org/10.1038/srep45061>
- Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S., Inmunitarias, R., Adaptativas, I.Y., 2003.

- Innate and Adaptive Crossroads Fish. *Inmunología* 22, 277–286.
- Troxel, C.M., Reddy, A.P., O’Neal, P.E., Hendricks, J.D., Bailey, G.S., 1997. In vivo aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 213–220. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8058>
- Tulayakul, P., Sakuda, S., Dong, K.S., Kumagai, S., 2005. Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B1 in livers of experimental and farm animals. *Toxicon* 46, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.023>
- Turner, P.C., Collinson, A.C., Cheung, Y.B., Gong, Y., Hall, A.J., Prentice, A.M., Wild, C.P., 2007. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *Int. J. Epidemiol.* 36, 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/ije/dym122>
- Turner, P.C., Flannery, B., Isitt, C., Ali, M., Pestka, J., 2012. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutr. Res. Rev.* 25, 162–179. <https://doi.org/10.1017/S095442241200008X>
- Ubagai, T., Tansho, S., Ito, T., Ono, Y., 2008. Influences of aflatoxin B1 on reactive oxygen species generation and chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. *Toxicol. Vitro.* 22, 1115–1120. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.01.007>
- Ugbaja, R.N., Okedairo, O.M., Oloyede, A.R., Ugwor, E.I., Akinloye, D.I., Ojo, O.P., Ademuyiwa, O., 2020. Probiotics consortium synergistically ameliorates aflatoxin B1-induced disruptions in lipid metabolism of female albino rats. *Toxicon* 186, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.007>
- Van Der Fels-Klerx, H.J., Liu, C., Battilani, P., 2016. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin J.* 9, 717–726. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066>
- Van der Fels-Klerx, H.J., Vermeulen, L.C., Gavai, A.K., Liu, C., 2019. Climate change impacts on aflatoxin B1 in maize and aflatoxin M1 in milk: A case study of maize grown in Eastern Europe and imported to the Netherlands. *PLoS One* 14, e0218956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218956>
- Van Slyke, C.E., Bradford, Y.M., Howe, D.G., Fashena, D.S., Ramachandran, S., Ruzicka, L., Staff, Z.F.I.N., 2018. Using ZFIN: data types, organization, and retrieval, in: *Eukaryotic Genomic Databases*. Humana Press, pp. 307–347. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7737-6>
- van Wijk, R.C., Krekels, E.H.J., Kantae, V., Harms, A.C., Hankemeier, T., van der Graaf, P.H., Spaank, H.P., 2019. Impact of post-hatching maturation on the pharmacokinetics of paracetamol in zebrafish larvae. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38530-w>
- Varga, J., Frisvad, J., Samson, R., 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin J.* 2, 263–277. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1094>
- Vergunst, A.C., Meijer, A.H., Renshaw, S.A., O’Callaghan, D., 2010. Burkholderia cenocepacia creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infect. Immun.* 78, 1495–1508. <https://doi.org/10.1128/IAI.00743-09>
- Viegas, S., Veiga, L., Figueiredo, P., Almeida, A., Carolino, E., Viegas, C., 2015. Assessment of workers’ exposure to aflatoxin B1 in a Portuguese waste industry. *Ann. Occup. Hyg.* 59, 173–181. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meu082>

- Wachholz, G.E., Rengel, B.D., Vargesson, N., 2021. From the farm to the lab: how chicken embryos contribute to the field of teratology. *Front. Genet.* 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.666726>
- Wale, P.L., Gardner, D.K., 2016. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum. Reprod. Update* 22, 2–22. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv034>
- Wales, J.H., Sinnhuber, R.O., Hendricks, J.O., Nixon, J.E., Eisele, T.A., 1978. Aflatoxin B1 induction of hepatocellular carcinoma in the embryos of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 1133–1137. <https://doi.org/10.1093/jnci/60.5.1133>
- Wallace, K.N., Pack, M., 2003. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev. Biol.* 255, 12–29. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00034-9)
- Wang-Buhler, J.L., Lee, S.J., Chung, W.G., Stevens, J.F., Tseng, H.P., Hseu, T.H., Hu, C.H., Westerfield, M., Yang, Y.H., Miranda, C.L., Buhler, D.R., 2005. CYP2K6 from zebrafish (*Danio rerio*): Cloning, mapping, developmental/tissue expression, and aflatoxin B1 activation by baculovirus expressed enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 140, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.02.002>
- Wang, W., Liu, X., Gelinas, D., Ciruna, B., Sun, Y., 2007. A fully automated robotic system for microinjection of zebrafish embryos. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000862>
- Wang, W.J., Xu, Z.L., Yu, C., Xu, X.H., 2017. Effects of aflatoxin B1 on mitochondrial respiration, ROS generation and apoptosis in broiler cardiomyocytes. *Anim. Sci. J.* 88, 1561–1568. <https://doi.org/10.1111/asj.12796>
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A.K., Telang, A.G., 2005. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 43, 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.004>
- Wannop, C.C., 1963. Groundnut Toxicity in Poultry:: Turkey X Disease. *Br. Vet. J.* 119, 174–177. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)42453-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)42453-5)
- Wen, L., Wei, W., Gu, W., Huang, P., Ren, X., Zhang, Z., Zhu, Z., Lin, S., Zhang, B., 2008. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 314, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.012>
- Williams., R.T., 1959. Detoxication Mechanisms. *The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds*, 2nd ed. Wiley, New York.
- Wogan, G.N., Edwards, G.S., Newberne, P.M., 1971. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Res.* 31, 1936–1942.
- Wolf, J.C., Wolfe, M.J., 2003. Good laboratory practice considerations in the use of fish models. *Toxicol. Pathol.* 31, 53–57. <https://doi.org/10.1080/01926230390178739>
- Wu, T.S., Cheng, Y.C., Chen, P.J., Huang, Y.T., Yu, F.Y., Liu, B.H., 2019. Exposure to aflatoxin B1 interferes with locomotion and neural development in zebrafish embryos and larvae. *Chemosphere* 217, 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.058>

- Yang, L.L., Wang, G.Q., Yang, L.M., Huang, Z.B., Zhang, W.Q., Yu, L.Z., 2014. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: A novel screening method for anti-inflammatory drugs. *Molecules* 19, 2390–2409. <https://doi.org/10.3390/molecules19022390>
- Yang, Y.H., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Wang-Buhler, J.L., Buhler, D.R., 2000. Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BV-CYP2K1) as lauric acid (ω -1)-hydroxylase and aflatoxin B1 exo-epoxidase. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1279–1283.
- Yaqoob, N., Holotta, M., Prem, C., Kopp, R., Schwerte, T., 2009. Ontogenetic development of erythropoiesis can be studied non-invasively in GATA-1:DsRed transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 154, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.06.024>
- Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., Kawakami, A., 2009. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev. Biol.* 325, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.028>
- Yu, J., Wu, F., Hennessy, D.A., 2018. The impact of climate change on aflatoxin contamination in US corn, in: *Agricultural & Applied Economics Association Annual Meeting*. Washington. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.273914>
- Yu, Q., Huo, J., Zhang, Y., Liu, K., Cai, Y., Xiang, T., Jiang, Z., Zhang, L., 2020. Tamoxifen-induced hepatotoxicity via lipid accumulation and inflammation in zebrafish. *Chemosphere* 239, 124705. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124705>
- Yuan, X., Huang, L., Lei, J., Long, Y., Li, C., 2020. Study on Anti-Inflammatory Effect and Major Anti-Inflammatory Components of PSORI-CM02 by Zebrafish Model. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5604654>
- Zhang, L., Ye, Y., An, Y., Tian, Y., Wang, Y., Tang, H., 2011. Systems responses of rats to aflatoxin B1 exposure revealed with metabonomic changes in multiple biological matrices. *J. Proteome Res.* 10, 614–623. <https://doi.org/10.1021/pr100792q>
- Zhang, X., Sliwowska, J.H., Weinberg, J., 2005. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp. Biol. Med.* 230, 376–388.
- Zhao, C.N., Xu, Z., Wu, G.C., Mao, Y.M., Liu, L.N., Qian-Wu, Dan, Y.L., Tao, S.S., Zhang, Q., Sam, N.B., Fan, Y.G., Zou, Y.F., Ye, D.Q., Pan, H.F., 2019. Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 18, 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.12.010>
- Zhou, H., George, S., Li, C., Gurusamy, S., Sun, X., Gong, Z., Qian, H., 2017. Combined toxicity of prevalent mycotoxins studied in fish cell line and zebrafish larvae revealed that type of interactions is dose-dependent. *Aquat. Toxicol.* 193, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.030>
- Zhou, J., Tang, L., Wang, J., Wang, J.S., 2018. Aflatoxin B1 disrupts gut-microbial metabolisms of short-chain fatty acids, long-chain fatty acids, and bile acids in male F344 rats. *Toxicol. Sci.* 164, 453–464. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy102>
- Zon, L.I., 1995. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86, 2876–289. [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70485-8](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70485-8)
- Zuberi, Z., Eeza, M.N.H., Matysik, J., Berry, J.P., Alia, A., 2019. NMR-based metabolic profiles of intact zebrafish embryos exposed to aflatoxin b1

recapitulates hepatotoxicity and supports possible neurotoxicity. *Toxins (Basel)*. 11, 258. <https://doi.org/10.3390/toxins11050258>

Zuckerman, A.J., Fulton, F., 1966. Acute toxic effects of aflatoxin on human embryo liver cells in culture. *Br. Med. J.* 2, 90–91. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5699.795>

Zuckerman, A.J., Tsiquaye, K.N., Fulton, F., 1967. Tissue culture of human embryo liver cells and the cytotoxicity of aflatoxin B1. *Br. J. Exp. Pathol.* 48, 20–27.

10. Mellékletek

1. Melléklet. RT-qPCR által vizsgált génekhez tartozó primer szekvenciák

gén	ID		szekvencia	amplikon (bp)
<i>il1β</i>	405770	F	TGCGGGCAATATGAAGTCA	271
		R	TTCGCCATGAGCATGTCC	
<i>mmp9</i>	406397	F	CATTAAGATGCCCTGATGTATCCC	141
		R	AGTGGTGGTCCGTGGTTGAG	
<i>cxcl8b.1</i>	100536594	F	AAACGACAAGTACTCGGACTGAA	93
		R	GACAAATCTGTCCTTTCTTAAGTGTG	
<i>cxcl18b</i>	795785	F	AACAGCAGGGCCAATTACTG	68
		R	TCTTCAGCGAGTCGGTGT TA	
<i>dhrs9</i>	322529	F	TTAAAAGCCTGGTGGGACAG	95
		R	CCTCAATCTCCAGCCAGTCA	
<i>cdx1b</i>	100004956	F	AGACGCAACCCTTACGACTG	97
		R	TCTGTGTACACCACCCGGTA	
<i>mtp</i>	406207	F	CAAACCACTTTCCCCTTCA	94
		R	CCACCTGATCTCTGCTCCTC	
<i>apoa4a</i>	550608	F	GACCCTCACAGCTGAGGAAA	116
		R	TGAATGGCCAGGGTGTATTT	
<i>apobb.1</i>	321166	F	AGCCAGTCAAAGACCACAC	73
		R	CTGATGAGCTGAGCAAGTGG	
<i>fabp1b.1</i>	554095	F	TCATGTCGTTCACTGGGAAA	98
		R	TGCCTTTCTCAATCATGTCCG	
<i>ef1a</i>	30516	F	TGTGGAGAGCTTCTCTAC	166
		R	TGAGGGAAATTCACCTTGG	

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Czimmerer Zsoltnak a folyamatos szakmai segítségért, mentorálásért, támogatásért és Prof. Dr. Urbányi Bélának a kutatómunka szakmai és infrastrukturális alapjainak biztosításáért, állandó támogatásáért!

Köszönettel tartozom a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (Szent István Egyetem jogutódja), Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet minden munkatársának a sok segítségükért, kiemelt mértékben: Prof. Dr. Müller Tamásnak, Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak, Dr. Ács Andrásnak, Gazsi Gyöngyinek, Dr. Staszny Ádámnak, Berta Roberta Izabellának, Reining Mártának, Dr. Cserháti Mátyásnak, Dr. Ferincz Árpádnak, Dr. Szabó Istvánnak, Dr. Bokor Zoltánnak, Dr. Háhn Juditnak, Dr. Bernáth Gergelynek, Dr. Kriszt Balázsnak, Dr. Lengyel Szvetlanának, Dr. Kovács Balázsnak, Bock Illésnek, Garai Edinának, Vásárhelyi Ernának, Nguyen Ngoc Quyennek, Nagy Borbálának, Molnár Józsefnek!

Külön köszönöm Prof. Dr. Mézes Miklósnak számos szakmai tanácsát és segítségnyújtását!

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

Hálával tartozom Makádiné Farkas Anasztáziának sok-sok segítségéért, valamint Jeney Zsuzsannának, Regős Diánának, Rác-Vigh Zitának, Páskai Jankának, Törökné Hajdú Mónikának, Varga Bernadettnek, Megyeri Ágnesnek, Simáné Dolányi Editnek, hogy munkájukkal nagymértékben hozzájárultak a doktori kutatómunka megvalósulásához!

Szeretném megköszönni továbbá családomnak és barátaimnak a sok támogatását!

A doktori kutatómunkát támogató pályázatok:

NVKP_16-1-2016-0009, NVKP_16-1-2016-0035, GINOP-2.3.4-15-2016-00002, KP2020-NKA-16, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008, TKP2020-NKA-16, BO/00669/20/4, OTKA K_135824, OTKA FK_128705