



A *BENDIOCARB* EXPOZÍCIÓ KOMPLEX HATÁSVIZSGÁLATA A
ZEBRADÁNIÓ (*Danio rerio*) KORAI ÉLETSZAKASZÁBAN,
SZUBLETÁLIS KONCENTRÁCIÓKON

Doktori értekezés tézisei

Gazsi Gyöngyi

GÖDÖLLŐ, 2024.

A doktori iskola megnevezése: Állatbiotechnológiai és állattudományi doktori iskola

Tudományága: mezőgazdaság-tudomány

Vezetője:

Dr. Mézes Miklós

Egyetemi tanár, MTA rendes tagja

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

Témavezető:

Dr. Csenki-Bakos Zsolt

Tudományos főmunkatárs

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei, célkitűzések

A különböző növényvédő szerek (peszticid) használata ma már a mindennapjaink részévé vált. Segíti az intenzív gazdálkodást, használatuk biztosítja a fokozott élelmiszertermelést, és az élelmiszerellátás biztonságát. Becslések szerint, a peszticidek használata nélkül, a termés egyharmada elveszne. A peszticidek folyamatos és széleskörű használata, terhelheti az egyébként nem célzott szervezeteket, a környezetet és a kijuttatás helyétől távolabbi területeken jelenhetnek meg növényvédőszer-maradékként, köszönhetően a bioakkumulációs és perzisztens tulajdonságaiknak. Alkalmazásukból adódóan napjainkra többféle élelmiszerben kimutathatók. A határérték feletti szermaradékot tartalmazó élelmiszerek tartós fogyasztása pedig komoly egészségügyi következményeket okozhatnak. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a peszticid mérgezéseket közegészségügyi problémaként azonosította, amely világszerte jelentős morbiditást és halálozást okozhat. A felhasznált növényvédőszerek 29,5%-a rovarirtó szer (inszekticid) és mechanizmustól függően több alcsoportja létezik a csoportnak.

A *bendiocarb* a karbamátok csoportjába tartozó széles spektrumú rovarölő. Napjainkban is egyike a WHO által ajánlott anyagnak, amely hatásosan felhasználható az *IRS - Indoor Residual Spraying* (beltéri permetezés) technika során elősegítve a szúnyogok számának kontrollálását, a malária terjedésének csökkenését. Ennek ellenére nagyon korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre a *bendiocarb* expozíció okozta biológiai hatásokról. Elterjedt alkalmazása miatt, világszerte kimutathatóvá vált különféle vizekben és az otthoni felhasználásból adódóan emberi levegő és vérmintákból is. Az emberi szervezetbe felszívódva átjut a placentán és megjelenhet a születendő csecsemőkben. Az embrionális fejlődés időszakában történő *bendiocarb* kitettség, hasonlóan más xenobiotikumokhoz jelentős következményekkel járhat az élő szervezetre, mind a morbiditás mind a halálozás tekintetében. Ennek következtében szükségessé vált a részletesebb feltáró munkák elvégzése, amelyek segítségével átfogóbb képet kaphatunk az embrionális *bendiocarb* kitettség biológiai következményeiről.

Az akvarisztikából is jól ismert zebradánió (*Danio rerio*) az egyik legelterjedtebb gerinces modellszervezet számos tudományterületen és a fajról rendelkező háttértudás pedig lehetőséget biztosít komplex modellrendszer kialakításához, ezáltal részletes és extrapolálható információk nyerhetők a különböző környezetbe kerülő szennyező anyagok hatásáról. A dolgozatomban ennek a fajnak az embrióit használtam modellként.

Célkitűzések

A doktori munka során a célom az embrionális fejlődés időszakában bekövetkező *bendiocarb* expozíció hatásának feltérképezése volt, zebradánió modellszervezet felhasználásával. Ezen belül az alábbi alcélokat tűztem ki

1. A vegyület LC_{50} értékének megállapítása, valamint az embriókra/lárvákra kiterjedő morfológiai elváltozások detektálása.
2. Az anyag fő hatásmechanizmusával szorosan összefüggő vizsgálatok elvégzése:
 - a. acetilkolinészteráz-gátlásának vizsgálata
 - b. szív működés vizsgálata
 - c. az antioxidáns rendszerben szerepet játszó enzimek aktivitásának feltérképezése
 - d. a viselkedésben megjelenő eltérések feljegyzése
3. a teljes transzkriptom szintű változások feltárása, a *bendiocarb* expozíció által jelentősebb mértékben érintett biológiai útvonalak azonosítása. A kapott eredmények alapján tovább vizsgáltam:
 - a. a lárvák vizuális észleléséhez,
 - b. az izomszövethez, izomrendszerhez,
 - c. az immunrendszerhez kapcsolódó folyamatokban bekövetkező elváltozásokat.

2. Anyag és módszer

2.1 A kísérletek helyszíne, az állatok tartása

A kísérleteket az egykori Szent István Egyetem, MKK-KTI, Halgazdálkodási Tanszékén (ma Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet) végeztem. A vizsgálataim során zebradánió halfaj AB vad típusát és transzgenikus vonalait (2.2*shh:gfp:ABC#15*, Tg(*mpx:EGFP*)) használtam. A halakat, állandó vízminőségi paramétereken tartottam, a folyamatos vízátfolyást biztosító recirkulációs rendszerben (Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Italy). Az állatok számára a 14 órás nappali megvilágítást és a 10 órás éjszakai időszakot egy fényprogram biztosította. A halakat naponta kétszer etettük ZEBRAFEED (Sparos, 400–600 µm) táppal és hetente kétszer kaptak frissen kelt sórák lárvákat (*Artemia* spp) (Ocean Nutrition >230000NPG).

A vizsgálatok során felhasznált zebradánió embriókat a felnőtt egyedek ivásából nyertem. Az ivatást követően az ikrákat összegyűjtöttem és szétválogattam sztereómikroszkóp (Leica M205 FA, Wetzlar, Germany) alatt. A megtermékenyült és normális sejtosztódást mutató embriók kerültek kiválogatásra az OECD 236 szabvány ajánlása alapján.

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

2.2 Akut embrió tesztek

A 96 órás akut embrió toxicitási vizsgálatokat az OECD 236-os iránymutatása alapján terveztem. A tesztekhez szükséges ikrákat az anyahalak szinkronizált szaporítása után összegyűjtöttem, szétválogattam és a 8 sejtes állapotot megelőzően a tesztedényekbe helyeztem. A teszt időtartalma 96 óra volt, napi oldatcserével biztosítottam az állandó koncentrációt. A tesztek 24-es szövettenyésztő lemezekben végeztem, minden koncentráció esetében 20 embriót vizsgáltam, három ismétlésben. A tesztek egymástól független időpontban kétszer megismételtem. Negatív kontrollként rendszervízben használtam és oldószeres kontroll (0,026 v/v% DMSO rendszervízben oldva) csoport is beállításra került. Az akut embrió toxicitás tesztelésekor 200 mg/L-es törzsoldatot alkalmaztam, majd az alkalmazott koncentrációkat ezen törzsoldat hígításával állítottam elő, biztosítva az egységes DMSO koncentrációt. A 96 órás akut embrió toxicitási vizsgálat során meghatároztam a mortalitást és embrionális fejlődési rendellenességeket kerestem az OECD 236 irányelve alapján. Vizuálisan összehasonlítottam a melanociták számát és méretét a kontroll csoportokkal. 72 órával a termékenyülés után, a lárvák kelését követően digitális felvételeket készítettem az embriókról laterális orientációval a Leica M205 FA

sztereomikroszkóp segítségével. A teszt végpontjaként kiszámoltam az LC/EC₁₀, 50, 90-es értékeket probit-analízissel az OECD-irányelv szerint.

2.3 A szubletális bendiocarb expozíció káros hatásainak feltérképezésére irányuló embrionális vizsgálatok

Az akut embrionális vizsgálatok eredményei alapján szubletális *bendiocarb* koncentrációkat (3, 1,5; 0,75; 0,4; 0,07) választottam ki, a *bendiocarb* expozíció szubletális következményeinek meghatározására. Negatív kontrollként rendszervizet használtam és oldószeres kontroll (DMSO) csoport is beállításra került. A DMSO-expozíció az OECD 236 irányelve alapján határérték alatt volt (0,01 v/v%). A kísérleteket 10 cm-es Petri csészékben végeztem, napi oldatsere mellett. A szubletális vizsgálatok során 3 mg/L-es törzsoldatot alkalmaztam, majd az alkalmazott koncentrációkat ezen törzsoldat hígításával állítottam elő, biztosítva az egységes DMSO koncentrációt. Minden vizsgálati koncentráció esetében három párhuzamos lett beállítva és a tesztek egymástól független időpontban kétszer megismétlésre kerültek. A vizsgálati edényekbe 50 ml teszt-, vagy kontrolloldat került. A tesztek során felhasznált ikrák az anyahalak szinkronizált szaporítása után, átválogatást követően (8 sejtes állapotot megelőzően) kerültek a Petri csészékbe. A tesztek hossza 96 óra volt, hasonlóan az akut teszthez és ezt követően történtek a további vizsgálatokhoz szükséges mintavételek.

2.3.1 Morfológiai vizsgálatok

Az akut embrió toxicitási eredmények alapján morfológiai vizsgálatot végeztem, hogy megállapítsam a *bendiocarb* hatását a teljes testhosszra és a notochord régió hosszára. 96 órával a termékenyülés után digitális felvételeket készítettem az embriókról (2.2*shh:gfp:ABC#15* transzgénikus vonalról) laterális orientációval a Leica M205 FA sztereomikroszkóp alatt. Minden koncentráció esetében 10 lárváról készült felvétel ismétlésenként. Az elkészült fényképeket az Image J szoftver segítségével, méretskála alkalmazásával elemeztem.

2.3.2 Pulzusszám mérés

A pulzusszám mérés 48 órával a termékenyülést követően történt. Minden kezelési párhuzamosban 10 lárvát szívverése lett rögzítve (20 sec), laterális orientációval, a Leica M 205 FA mikroszkóppal. Az elkészült felvételeket lassítottam, majd manuálisan leszámláltam a lárvák szívverését.

2.3.3 Enzimaktivitás vizsgálatok zebradánió embriókon

A termékenyülést követően 48, 72 és 96 órával mintát vettem a kezelésekből. 20 lárvát helyeztem az Eppendorf- csövekbe (két részmintát, minden ismétléshez) és homogenizáltam (TissueLyser LT, Qiagen, Germantown, MD, USA). Ismétlésenként három párhuzamosban értékeltem az enzimaktivitást 25 °C-on. A

minták fehérjekoncentrációját három párhuzamosban határoztam meg a Bradford módszer segítségével (Bradford 1976), mikrolemezre (microplate) adaptálva.

Az AChE aktivitás meghatározását Ellman et al. 1961. szerint végeztem, mikrolemezre adaptálva azt (Guilhermino et al. 1996). A kataláz (CAT) enzim aktivitását Aebi (1984) módszerét alkalmazva mértem. A glutation-S-transzferáz (GST) aktivitást Habig et al. (1974) módszerével határoztam meg, mikrolemezre adaptálva. A glutation-peroxidáz aktivitás méréshez Paglia & Valentine (1967) módszerét vettem alapul, Lawrence & Burk (1976) általi módosításokkal, amit 96 lyukú szövettenyésztő lemezre adaptáltam (Faria et al. 2009). A teljes szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitást 3 párhuzamosban mértem a xantin-oxidáz/citokróm c módszerrel (Crapo et al. 1978).

A lipid-peroxidációt (LPO) a szövet homogenizátumokban a malonaldehid képződése alapján értékeltem a Wills (1987 a-b) által kidolgozott tiobarbitursav módszerrel. Az eredményeket a tiobarbitursav reaktánsok (TBARS) mikromoljaiban adtam meg, a homogenizált fehérje milligrammjára vonatkoztatva.

2.3.4 Viselkedés vizsgálatok

A 96 órás *bendiocarb* kitettséget követően viselkedés vizsgálatokat végeztem. A viselkedés vizsgálatok során lapos aljú 96 lyukú szövettenyésztő lemezbe helyeztem az állatokat. Minden koncentráció esetén 10 lárvát vizsgáltam ismétlésenként (1 lárv/lyuk) a Zebrabox rendszer (ViewPoint Life Science, Franciaország, 6. ábra) segítségével. A vizsgálat során a fotoperiódus stimulálás érte a lárvákat: 10 perc világos (nappali fény) szakasz, 20 perc sötét (éjszakai fény) szakasz és 10 perc világos szakasz.

2.3.5 RNS szekvenálás és transzkriptom analízis

A Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végeztük a teljes RNS szekvenálást és a későbbi analízist is. A vizsgálat során az embrionális *bendiocarb* expozíciót a szubletális koncentráció sor egy alacsonyabb (0,4 mg/l) és a legmagasabb (3 mg/l) koncentrációival végeztük el. A kezelés végén 4 ismétlésben, ismétlésenként 30 lárvát került 200 µl Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csőbe. A minták homogenizálását követően 400 µl-re kiegészítettük és -80 °C hőmérsékleten tároltuk. Az RNS izolálás kloroformos elválasztással, izopropanolos precipitációval és etalonos mosással végeztük, majd az integritást Eukaryotic Total RNA Nano Kittel és Agilent BioAnalyzer készülékkel határoztuk meg. Az Ultra II RNA Sample Prep Kit felhasználásával készült az RNS könyvtár. Első lépésben a poli(A)farokkal rendelkező mRNS-t a mágneses gyöngyökkel konjugált deoxitimin szekvenciához kötöttük, majd eluáltuk és végül fragmentáltuk. Reverz transzkripció és random primerek használatával létrehoztuk a cDNS-eket. A szekvenálást Illumina NextSeq500 készülékkel végeztük el, az adapter ligálását követően. A nyers adatokat HISAT2 algoritmus felhasználásával illesztettük a

zebradánióánál használt referencia genomhoz (GRCz11). StrandNGS szoftver használatával azonosítottuk a differenciáltan expresszáldó géneket. Végül a kapott eredményeket gén-ontológiai elemzéssel (*Gene Ontology Enrichment Analysis*, GOEA) és a Cytoscape/ClueGo szoftver segítségével értékeltük.

2.3.6 Génexpressziós szintek meghatározása

A transzkriptom analízis eredményei és a szakirodalmak alapján különböző markergének kerültek kiválasztásra. Kifejeződésüket reverz transzkripción alapuló kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) mértem meg. A *bendiocarb* expozíciót követően csoportonként 5 ismétlésben, ismétlésenként 30 lárvát 200 µl Trizol reagenst tartalmazó mikrocentrifuga-csőbe helyeztem, majd homogenizáltam (30 lárv/cső). A homogenizátumokat 400 µl-re kiegészítettem és -80 °C hőmérsékleten tároltam. Az RNS izolálás, a korábbiakhoz hasonlóan, kloroformos elválasztással, izopropanolos precipitációval és etanolos mosással végeztem. A nukleáz-mentes, izolált vízben felvett RNS mennyiségét, minőségét NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) spektrofotométerrel értékeltam. A komplementer DNS-ek létrehozásához High Capacity cDNA Reverse Transcription kit került alkalmazásra. A reakciókat LightCycler 480 II (Roche) készülékben, 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix használatával végeztem. A kapott eredményeket az *efla* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítottam és normalizált mRNS szinten fejeztem ki.

2.3.7 Szöveti vizsgálat

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

2.3.8 Nitrogén-monoxid termelés mérése, in vivo

A nitrogén-monoxid lárvákban belüli termelését a diaminofluorescein-FM diacetát (DAF-FM-DA) fluoreszcens próba felhasználásával értékeltam és Lepiller et al. (2007) protokollját vettem alapul. A 96 órás *bendiocarb* kezelést követően a lárvákat egyenként egy 96 lyukú szövettenyésztő lemezre helyeztem át. A mikrolemez vájataiba előzetesen 200 µl 5 µM DAF-FM-DA oldat volt pipetázva. Az inkubálást (25,5 °C, 1 óra, sötét) követően a lárvákat rendszervízzel átmostam és elaltattam trikain-metánszulfonát oldat hozzáadásával (MS222, 168 mg/l). Az altatás után a lárvákat laterálisan

pozícionáltam és a Leica M205 FA sztereomikroszkóp alatt, GFP szűrővel fotóztam. A fluoreszcens intenzitást a lárvák notochord régiójában az Image J szoftver segítségével mértem.

2.3.9 A neutrofil granulocita sejtszám és eloszlás meghatározása

A Tg(*mpx:EGFP*) transzgénikus zebradánió vonal utódai kerültek a vizsgálat során felhasználásra. A Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében végeztük a teljes lárvákra vetített neutrofil granulocita sejtszám meghatározást, fluoreszcencia aktivált sejtválogatással (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). A minták két független kísérletből származtak, csoportonként három ismétlésben. Ismétlésenként 15 lárvát került jeges vízzel lehűtött mikrocentrifugacsövekbe. Ezután a lárvákat Ringer-oldatban átmostuk, majd 0,25 % -os Tripszin-EDTA hozzáadásával emésztettük. Az emésztés leállítása magzati szarvasmarha szérum (FBS, fetal bovine serum) és kalcium-klorid hozzáadásával történt. Centrifugálást (400 G, 5 min) követően a minták reszuszpendálása 5 %-os FBS/PBS-ben történt és 40 µm pórusméretű sejtszűrő kosarakkal szűrtük át őket. NovoCyte Flow Cytometer készülék használatával határoztuk meg az EGFP+ sejtek gyakoriságát, 10⁵ sejtre vonatkozóan.

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

2.3.10 Farokúszó sebzésén alapuló elváltozások

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

2.3.11 Statisztikai értékelés

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

A szubletális vizsgálatok során kapott eredmények normalitás-vizsgálatát Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Smirnov próbával végeztem. A csoportok közötti

statisztikai különbségeket a normalitás-vizsgálatról függően egyszempontos nem-paraméteres ANOVA-val (Kruskal-Wallis teszt és Dunn-féle post hoc teszt) vagy egyszempontos paraméteres ANOVA-val és Dunnett-féle post hoc testtel értékeltem. A kapott eredményeket átlag $\pm$ szórás formában ábrázoltam.

Az enzimaktivitás vizsgálatok során kapott adatokat az OriginPro (2019-es verzió, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) szoftvercsomag segítségével elemeztem. A biokémiai marker aktivitások koncentrációfüggésének kimutatására nemlineáris regressziót alkalmaztam. A különböző *bendiocarb* koncentrációk és az expozíciós idő biokémiai markerekre gyakorolt interaktív hatásának vizsgálatára kétirányú varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam, ahol az idő ($t = 48$; $t = 72$ és $t = 96$ hpf), a kezelés (kontroll, DMSO, 3, 1,5, 0,75, 0,4 és 0,07 mg/l), és ezek kölcsönhatása kategorikus prediktor faktor volt, míg a mért biomarkereket függő változónak tekintettük. A statisztikai elemzések előtt a nyers adatokat az eloszlás normalitása és a variancia homogenitása tekintetében Kolmogorov-Smirnov teszttel, illetve Levene's teszttel elemeztem.

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

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

3. Eredmények

3.1 A halembrió toxicitás teszt eredményei

A 96 órás *bendiocarb* kezelést követően kiszámoltam az LC/EC_{1, 10, 50, 90}-es értékeket. A mortalitási adatok alapján a *bendiocarb* fél-halálos koncentrációja 96 órával a termékenyülés után 32,52 mg/l. A *bendiocarb* embriókra gyakorolt hatásának vizsgálatakor különböző deformitásokat tapasztaltam, melyek megjelenése dózis-hatás összefüggést mutatott. Ezen deformitások alapján számított EC₅₀ 2,30 mg/l volt 96 órás kitettség esetében. A legjellemzőbb megfigyelt deformitások a 3,12 mg/l feletti koncentrációk esetében a farokfejlődési rendellenességek voltak és a 0,39 mg/l feletti kezeléseknél a lárvák testhossza csökkent. Ezeken kívül megfigyelhetők voltak egyéb fejlődési rendellenességek is a 96 órás kezelés során.

3.2 A szubletális *bendiocarb* expozíció káros hatásainak feltérképezésére irányuló embriónális vizsgálatok eredményei

3.2.1 A morfológiai vizsgálatok eredményei

Az akut embrionális kísérletek eredményei alapján egy szűkebb koncentráció tartományban folytattam a további vizsgálatokat egy transzgenikus vonallal (Tg(*shh*:GFP)). Az eredmények tükrözték a korábbi megfigyeléseimet. Szignifikánsan csökkent a teljes testhossz és a notochord hossz is a 0,75 mg/l, és az az feletti koncentrációk esetében a negatív és az oldószeres kontroll csoportokhoz képest ($p < 0,05$; $N=60$). Egyéb elváltozásokat nem tapasztaltam a kísérlet során.

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

Az AChE aktivitása a lárvák fejlődése során, állandó *bendiocarb* kitettség mellett szignifikáns csökkenést mutatott, mind a három vizsgálati fázisban (48 hpf, 72 hpf, 96 hpf). A kiváltott gátlás a vizsgált időpontokban koncentrációfüggőnek és időfüggőnek bizonyult. A *bendiocarb* kezelés a *hspb 11* gén szignifikáns mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után, a 0,75-3 mg/l tartományban. Azonban a pulzusszám vizsgálat során szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a 0,4-3 mg/l-es koncentráció tartományban a kontroll csoportokhoz képest.

3.2.3 Az enzimaktivitás meghatározása zebradánió lárvákban

Az enzimaktivitás vizsgálatok során a méréseim azt mutatták, a SOD esetében, hogy szignifikáns koncentrációfüggő gátlás alakul ki a 48 hpf idős lárvákban a *bendiocarb* kezelés során. Ezzel ellentétes eredményt kaptam a 72 hpf-es

fázisban, ugyanis a SOD aktivitás szignifikánsan emelkedett a 0,07; 1,5 és a 3 mg/l-es *bendiocarb* kezelés során. A CAT enzim aktivitása nem mutatott szignifikáns változást a *bendiocarb* kezelést követő 48 hpf és 72 hpf korban. Szignifikáns növekedés a 0,4 mg/l kezelési csoportban volt csak megfigyelhető 96 órával a termékenyülést követően, szignifikáns csökkenést pedig a 3 mg/l *bendiocarb* kezelési koncentrációnak kitett lárvák esetében tapasztaltam. A *bendiocarb* kezelés hatására a GST aktivitása koncentráció- és időfüggőséget mutatott a 48 hpf és a 72 hpf fejlődési fázisban. A GST aktivitása szignifikánsan növekedett a 48 hpf korban, 3 mg/l *bendiocarb* kezelést követően, 72 órás fázisban pedig szintén szignifikáns növekedés volt megfigyelhető már a 0,4 mg/l-es *bendiocarb* kezelésektől. Érdekes módon a CAT és a GST aktivitása a 0,4 mg/l-es *bendiocarb* kezelést követően a 96 hpf fázisban mutatta a legmagasabb aktivitást, de ennek a trendnek az ellenére szignifikáns különbség és koncentráció-függés csak a CAT esetében volt kimutatható. A teljes glutation-peroxidáz (GPxTOT) és a Se-függő glutation-peroxidáz (GPx-Se) aktivitása hasonló mintát követett. A kontroll csoportokhoz képest szignifikáns növekedést csak a GPx-Se esetében mértem, a 48 hpf fázisban, 0,75 mg/l koncentrációjú *bendiocarb*bal kezelt embrióknál, illetve a 3 mg/l-es koncentráció esetében 72 órás korban. Mind a GPxTOT, mind a GPx-Se aktivitása fokozatosan csökkent 96 órás kezelési fázisban, de ezt a koncentrációfüggő tendenciát statisztikai elemzés nem támasztotta alá.

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

3.2.4 A szubletális bendiocarb expozíció a lárvák viselkedésére gyakorolt hatásai

A lárvák mozgásának percenkénti feljegyzései azt jelezték, hogy a *bendiocarb* expozíció csökkentette a mozgással összefüggő viselkedést, különösen a magasabb koncentrációk esetén. A sötét fázis alatt a lárvák által nagy mozdulatokkal megtett teljes távolság és az idő, amelyet ezen mozgásformával tölt, egy szignifikáns csökkenést mutatott a 0,75 mg/l-es koncentrációtól felfelé a kontroll csoporthoz képest. A sötét ciklus során a lárvák kis mozgásformával töltött ideje és a távolság, amelyet ezen kis mozdulatokkal tesz meg a korábbi eredményekhez hasonló trendet követett, azonban a koncentráció függő gátlás már a 0,4-3 mg/l tartományban kialakult. A lárvák mozgási aktivitása a fény inger közvetlen jelentkezése előtt és után azt mutatta, hogy az állatok reagálnak a fotoperiódus változására a magasabb kezelési koncentrációk esetében is. Közvetlenül a sötét fázis beállta után már mérhető egy szignifikáns csökkenés a lárvák kis és nagy mozgásában a kontroll csoporthoz képest.

3.2.5 A szubletális bendiocarb expozíció lárvák teljes transzkriptomra gyakorolt hatásai

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

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

3.2.6 A szubletális bendiocarb expozíció lárvák vizuális érzékelésére gyakorolt hatásai

Megvizsgáltam két, a fény érzékelésben és a fototranszdukcióban szerepet játszó gén (*rho*, *opn1mw2*) kifejeződését RT-qPCR segítségével. A *bendiocarb* kezelés a kiválasztott markergének szignifikáns represszálasát vonta maga után. A lárvák szemét ért változásokra koncentrált kórszövettani elemzések során a 3 mg/l-es koncentrációval kezelt egyedek esetében találtam eltérést. A lárvák szemének retina rétegei között vakuolizáció alakult ki.

3.2.7 A szubletális bendiocarb expozíció lárvák izom szövetére gyakorolt hatásai

A gerincesekben megtalálható két izomspecifikus gén (*desma*, *fn1b*) kifejeződése szignifikáns mértékben változott a *bendiocarb* expozíciót követően. A *bendiocarb* kezelés a *desma* gén jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után a 0,75-3 mg/l-es koncentráció tartományban. A *bendiocarb* kezelés az *fn1b* gén jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után az 1,5-3 mg/l-es koncentráció tartományban. Az izomszövetet vizsgálatát célzó kórszövettani vizsgálatok során a 1,5 mg/l esetében enyhe mag- és sarcoplasma elváltozásokat (vizenyő, vakuolizáció) tapasztaltam. A 3 mg/l-es koncentráció esetén ezen az elváltozások súlyosbodását, discoid elfajulás is megfigyeltem.

3.2.8 A szubletális bendiocarb expozíció a lárvák immunrendszerével kapcsolatos hatásai

Első lépésként két immunválasz-asszociált gén (*cxcl18b*, *cxcl8b.1*) kifejeződését vizsgáltam RT-qPCR segítségével. A kiválasztott markergének jelentős mértékű koncentráció-függő indukálása volt megfigyelhető az 1,5 mg/l és a 3 mg/l-es *bendiocarb* expozíció esetében. Ezen gének többek között neutrofil granulocita kemoattraktáns faktorok, így a szignifikáns indukciójuk alapján feltételezhetővé vált, hogy a *bendiocarb* terhelés modulálhatja granulociták eloszlását, mennyiségét, viselkedését. A 96 órás lárvákról (Tg(*mpx*:EGFP)) készült felvételek alapján megfigyelhetővé vált, hogy a *bendiocarb* kezelés megváltoztatja a neutrofil granulociták eloszlását a lárvákban belül, fokozott felhalmozódás alakul ki az oldalvonal mentén. Azonban a fluoreszcencia aktivált sejtválogatás során megállapítottam, hogy az EGFP⁺ sejtek meghatározott gyakorisága nem mutat szignifikáns eltérést. Ezt követően megvizsgáltam a granulociták válaszreakcióját farokúszó-sebzésen alapuló helyi, steril gyulladásos modell felhasználásával. Szignifikáns, koncentráció-függő csökkenést tapasztaltam a *bendiocarb*bal kezelt lárvák esetében, a sebzést követő 4. órában. Ezt követően a NO termelődésének vizsgálatára került sor, melynek során megállapítottam, fluoreszcens próba segítségével, hogy a 96 órás lárvákban a NO produkció növekedést mutat a lárvák oldalvonala, a notochord régió mentén.

4. Következtetések és a javaslatok

Számos növényvédőszerrel kapcsolatosan megállapították, hogy összefüggésbe hozható egészségügyi és környezeti problémákkal. A *bendiocarb* felhasználásából adódóan világszerte kimutathatóvá vált különféle víztestekben és pl. a terhes anyák véréből is, ami komoly kockázatot jelenthet a születendő gyermekek számára. A *bendiocarb* expozíció okozta esetleges hatásokról azonban limitált mennyiségű eredmény áll rendelkezésünkre, éppen ezért egészségkárosító hatásának, hatásmechanizmusának nem minden részlete ismert. Emiatt olyan vizsgálatok elvégzésére van szükség, amelyek részletesebb módon hozzájárulnak a *bendiocarb* kitettség biológiai következményeinek megismeréséhez.

Az elvégzett vizsgálatok során megállapítottam, hogy a *bendiocarb* LC₅₀ értéke 96 órával a megtermékenyülés után 32,52 mg/l a zebradánió embriók esetében. Ez az érték jelentősen magasabbnak bizonyult, mint amit korábban a szakirodalmakban azonosítottak más halfajoknál, viszont hasonlóságot mutat a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) esetében feljegyzett LC₅₀ értékekkel (32-150 mg/l).

A *bendiocarb* hatás mechanizmusát tekintve az idegmérgek csoportjába tartozik és a várákosásnak megfelelően koncentráció- és időfüggő gátlást okozott az AChE aktivitásában. A *bendiocarb* kezelés a *hspb 11* gén jelentős mértékű, koncentráció-függő indukálását vonta maga után, a 0,75-3 mg/l tartományban. A *bendiocarb* expozíció a 48 órás zebradánió embriók esetében 0,4-3 mg/l tartományban a pulzusszám szignifikáns fokozódását eredményezte. A karbamátok szívritmusra gyakorolt hatása változatos és a *tachycardia* ugyanolyan gyakran előfordulhat, mint a hatásmechanizmus alapján a valószínűsíthető *bradycardia*. A kapott eredményeim arra engednek következtetni, hogy a vizsgált *bendiocarb* koncentrációtartomány *tachycardia* kialakulását okozza. Ezt a következtetést tovább erősíti, hogy a nAChR aktivitással összefüggést mutató *hspb 11* gén kifejeződése megemelkedett, így feltételezhető, hogy a nikotinreceptorokhoz kapcsolódó hatások érvényesülnek.

Korábban kimutatták, hogy a karbamátok oxidatív stresszt váltanak ki. A közelmúltban végzett tanulmányok arról számoltak be, hogy a *bendiocarb* módosítja az antioxidáns és méregtelenítő enzimaktivitást az emlősökben. A termékenyülést követő 48 órában a lárvák SOD-aktivitása jelentősen csökkent a 3 mg/l-es *bendiocarb* kezelés hatására. Az embrionális *bendiocarb* kezelés a CAT működésében egy speciális mintázatot mutatott a 96 hpf expozíciós ablakban. A 0,4 mg/l-es kezelési csoport esetében mértem a legmagasabb szignifikáns CAT-aktivitást, ami a magasabb koncentráció tartományokban jelentősen csökkent. Korábbi tanulmányok beszámoltak arról, hogy a *bendiocarb* kezelés fokozhatja a máj és a vese GST aktivitását patkányokban. A kapott eredményeim hasonlóan alakultak a termékenyülést követő 48. és 72. órában, koncentráció függően fokozódott a GST enzim aktivitása. A lipidperoxidáció szintje hasonló trendet követett, mint a CAT enzim aktivitása. A legmagasabb LPO szintet 0,4 mg/l-es

koncentráció esetében detektáltam és a magasabb koncentráció tartományokban csökkent a LPO szintje. A szakirodalommal összevetett eredmények arra engednek következtetni, hogy a LPO hormetikus választ mutat a karbamátokra a különböző halfajokban.

A környezetbe kerülő különböző xenobiotikumok befolyásolják az élőlények természetes cirkadián viselkedési ritmusát és fiziológiáját. Jelen doktori munka vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a szubletális *bendiocarb* expozíció csökkent a fejlődésben lévő lárvák mozgás intenzitását a magasabb koncentráció tartományokban. Eredményeim párhuzamot mutatnak számos korábbi tanulmánnyal, ahol különböző inszekticid karbamátok viselkedésre gyakorolt hatását vizsgálták. Összességében elmondható, hogy a *bendiocarb* képes megzavarni a viselkedést és valószínűsíthetőleg az ACh felhalmozódása, a receptorok túlzott stimulálása okozhatja a neurotoxikus tüneteket.

A szubletális *bendiocarb* expozíciót követően teljes transzkriptom szinten is jelentős eltéréseket találtam, több, mint 2694 gén kifejeződését befolyásolta szignifikáns mértékben. A represszált gének között szignifikánsan feldúsultak azok a gén csoportok, amelyek az érzékszervi fejlődésben és a vizuális észlelésben játszanak fontos szerepet. A növényvédő szerek, beleértve az inszekticid karbamátokat is, befolyásolhatják a halak retinájának fejlődését, későbbi funkcióját, működését és morfológiáját. Az embrionális *bendiocarb* kitettség a fény érzékelésben és a fototranszdukcióban szerepet játszó két markergén (*rho*, *opn1mw2*) szignifikáns represszálasát vonta maga után. A legmagasabb koncentrációval kezelt egyedek szemének a retina rétegei között vakuolizáció alakult ki. Valószínűsíthetőleg a *bendiocarb*, hasonlóan más inszekticid karbamátokhoz, befolyásolja a retina fejlődését. A viselkedés vizsgálatok eredményei kapcsán azonban megállapítható, hogy a kezelésen átesett lárvák érzékelik a sötét-fény ciklus változását.

Az embrionális *bendiocarb* expozíció teljes transzkriptom analízise során megállapítottam, hogy a fokozott kifejeződést mutató gének között kiemelkedtek az izomszövethez, izomrendszerhez kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó géncsoportok. Az embrionális *bendiocarb* expozíció hatására a két izomspecifikus gén (*desma*, *fn1b*) kifejeződése indukálódott, illetve a kórszövettani vizsgálatok szöveti eltéréseket mutattak a két legmagasabb koncentráció esetében. A *bendiocarb* kitettség hasonló tüneteket eredményez, mint amit az AChE gátlók kapcsán korábbi tanulmányok említenek.

A teljes transzkriptom analízis elemzése során arra a következtetésre jutottam, hogy az immunrendszerhez-kapcsolt folyamatokban közreműködő géncsoportok kifejeződése is megemelkedett. Ez együtt járt két immunválasz-asszociált gén (*cxcl18b*, *cxcl18b.1*) koncentráció-függő indukálásával, a neutrofil granulociták megváltozott eloszlásával, emelkedett nitrogén-monoxid termeléssel, amely az oldalon mentén különösen intenzívnek bizonyult. A lokális gyulladás (farokúszó sebzés) alapuló modellben csökkentette a neutrofil granulociták felhalmozódását a sebzés területén. A kapott eredmények alapján a *bendiocarb* kitettség immunmoduláns hatásokat eredményezhet és valószínűsíthetőleg a

bendiocarb kezelés egy szisztémás jellegű gyulladásos reakciót indít el a fejlődésben lévő lárvákban. A karbamátok hatásmechanizmusa az AChE gátláson alapul és a szerin primer alkoholos hidroxilcsoportjával lépnek reakcióba. Azonban a szerin-hidroláz aktivitása valószínűsíthetőleg több immunfunkcióhoz is kapcsolódik. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a karbamát peszticidek az AChE gátlásán keresztül megváltoztathatják a limfocita kolinerg jelátvitelt, az immunociták sejtmembránjához kapcsolódó észteráz-aktivitásokat. Ezenkívül a gátlás strukturális és funkcionális változásokhoz vezethet az immunocitákban, módosíthatja a jelátviteli utakat, gátolhatja vagy éppen stimulálhatja az immunsejtek aktivációját, proliferációját, majd effektor funkcióját. Továbbá valószínűsíthető, hogy a karbamátok által generált szabad oxigénradikálok gátolják a T-sejtek működését a membrán lipidperoxidációján keresztül, azonban az inszekticid karbamátok specifikus hatásai az immunrendszer működésére továbbra is kevésbé ismertek.

A prenatális fejlődés alatt a gerinces embriók különösen érzékenyek azon anyagokra, amelyek befolyásolják a kolinerg-receptorok vagy a AChE működését. A neurotranszmitterek a fejlődő szövetekben növekedésszabályzó és morfogenetikai funkciókat látnak el. A fejlődő neurotranszmitter-rendszer különösen sebezhető pl. a szerves foszforsav-észterek és a karbamát peszticidek akut kolinerg toxicitására, amelyeket úgy terveztek, hogy hatást gyakoroljanak a receptorokra. A doktori munka során betekintést nyertem az LC₁₀ alatti *bendiocarb* koncentrációk okozta tünetekbe, korai életszakaszban. A vizsgálatok a humán betegség modellezésben és a preklinikai gyógyszer tesztelésben is használatos modellszervezeten, a zebrafish embriókon történtek. Az egymást kiegészítő toxikológiai, morfológiai, enzimaktivitási, viselkedési, transzkriptomikai, hisztopatológiai, immunológiai vizsgálatok egymással és a szakirodalommal összhangban lévő eredményeket szolgáltatottak. Összességében elmondható, hogy az embrionális *bendiocarb* kitettség az AChE gátlásán keresztül számos biológiai folyamatra hatást gyakorolt, amelyek jelentős mértékben meghatározhatják a fejlődő szervezet későbbi életfolyamatait. Ugyanakkor a kapott eredmények fejlettebb gerincesek irányába történő extrapolálásakor körültekintően kell eljárni és további munkálatok elvégzése szükséges, azonban a zebrafish embrióon kapott eredmények jó alapot szolgáltathatnak.

Javaslatok

A doktori munka során kapott eredmények alapján az alábbi vizsgálatok javasolhatók a jövőben:

1. Krónikus kitettség vizsgálatok elvégzése, az embrionális/adult kori, akár generációkon átívelő hatások megismerése, a hosszú távú következmények feltárása
 - az esetleges hormonmoduláns hatás feltérképezése

- reprodukciós képességet vizsgáló toxikológiai tesztek elvégzése.
2. A kapott eredmények tükrében további kardiotoxicitás vizsgálatok elvégzése kiegészítve szív-regenerációs modell használatával.
 3. Az immunmoduláns hatás további feltárása, akár egy makrofág-specifikus transzgenikus zebradánió vonal bevonásával.
 4. Keverék vizsgálatok elvégzése.

5. Új tudományos eredmények

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

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Gazsi Gy., Czimmerer Zs, Ivánovics B, Berta I. R., Urbányi B., Csenki-Bakos Zs., Ács A. (2021) Physiological, Developmental, and Biomarker Responses of Zebrafish Embryos to Sub-Lethal Exposure of Bendiocarb Water 13:2 Paper:204,16 p.(2021)

Hazai folyóiratban megjelent közlemények

Gazsi Gy., Baska F., Baska-Vincze B., Csenki Zs., Kövesi J., Appl Á. J., Bakos K., Csepeli A., Reining M., Kovács R. (2014) A labormodell zebradánió (*Danio rerio*) legfontosabb betegségei. Irodalmi összefoglaló és saját eredmények, Magyar Állatorvosok Lapja (2014)

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

Gazsi Gy., Berta I. R., Csenki-Bakos Zs., Ivánovics B., Póliska Sz., Reining M., Vásárhelyi E., Baska F., Urbányi B., Ács A., Czimmerer Zs. (2019): A szubletális bendiocarb expozíció komplex káros hatásainak feltérképezése zebradánió embrióban. 7th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő Book of abstracts of presentations and posters, Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Gazsi Gy., Ian B. A. E., Vahid Z., Ivánovics B., Luca R., Urbányi B., Csenki Zs., Müller T. (2021): Ovarian inseminated sperm impacts spawning success in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) even in the absence of a male stimulus. *Theriogenology* 172 pp. 315-321.,7 p.

Gazsi Gy., Ivánovics B., Berta I. R., Szabó T., Zarski D, Kucska B., Urbányi B., Horváth L., Müller F., Müller T. (2021): Artificial sperm insemination in externally fertilised fish as a novel tool for ex situ and in situ conservation of valuable populations. *Endangered Species Research* 45 pp. 169-179.,11 p.

Ivanovics B., **Gazsi Gy.**, Reining M., Berta I. R., Poliska Sz., Toth M., Domokos A., Nagy B., Staszny A., Cserhati M., Csosz E., Bacsí A., Csenki-Bakos Zs., Ács A., Urbányi B, Czimmerer Zs. (2021): Embryonic exposure to low concentrations of aflatoxin B1 triggers global transcriptomic changes, defective yolk lipid mobilization, abnormal gastrointestinal tract development and inflammation in zebrafish. *Journal of Hazardous Materials* 416 Paper: 125788,15 p.

Novak M., Baebler Š., Žegura B., Rotter A., Gajski G., Gerić M., Garaj-Vrhovac V., Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Horváth Á., **Gazsi Gy.**, Filipič M. (2021): Deregulation of whole-transcriptome gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) after chronic exposure to low doses of imatinib mesylate in a complete life cycle study *Chemosphere* 263 Paper: 128097,10 p.

Pataki B., Berta I. R., **Gazsi Gy.**, Urbányi B., Kollár T., Horváth Á. (2021) Effect of age on the mercury sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Fish physiology and biochemistry* 47:3 pp. 687-695.,9 p.

Kerekes F., Kollár T., **Gazsi Gy.**, Kása E., Urbányi B., Csenki-Bakos Zs., Horváth Á. (2020): Investigation of Fertilizing Capacity of Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm Exposed to Heavy Metals. *Dose-Response* 18:2 Paper: 155932582091959 ,10 p.
Bakos K., Kovacs R., Balogh E., Sipos D. K., Reining M., Gyomarei-Neuberger O., Balazs A., Kriszt B., Bencsik D., Csepeli A., **Gazsi Gy.**, Hadzhiev Y., Urbányi B., Mueller F., Kovacs B., Csenki Zs. (2019): Estrogen sensitive liver transgenic zebrafish (*Danio rerio*) line (Tg(vtg1:mCherry)) suitable for the direct detection of estrogenicity in environmental samples. *Aquatic Toxicology* 208 pp. 157-167., 11 p.

Bencsik D., **Gazsi Gy.**, Urbányi B., Szende B., Racz G., Veba A., Csenki Zs. (2018): Assessment of subacute genotoxic and histopathological effects of a food flavour ingredient, 4-ethylbenzaldehyde (EBA) on zebrafish (*Danio rerio*) model. *Acta Alimentaria* 47:2 pp. 245-251.,7 p.

Kovacs R., Bakos K., Urbanyi B., Kovesi J, **Gazsi Gy.**, Csepeli A., Appl A. J., Bencsik D., Csenki Zs., Horvath A. (2015) Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. Environmental Science and Pollution Research 23:15 pp.14718–14729 (corr. auth.)

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

Gazsi Gy., Ivánovics B., Berta I. R., Szabó T., Zarski D., Urbányi B., Horváth L., Kucska B., Müller F., Müller T. (2019):Zebradánió szaporítási kísérletek sperma inszeminációs módszerrel 7th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő - Book of abstracts of presentations and posters; Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő

Bencsik D., Szabó P. B., **Gazsi Gy.**, Urbányi B., Szende B., Rácz G., Véha A., Csenki Zs. (2018) Subacute effects of a food flavour on fish model In: István, Bíró; Sándor, Beszédes; József, Gál; György, Hampel; Szabolcs, Kertész; Mária, Szabó; Katalin, Sziládi (szerk.) International Conference on Science, Technology, Engineering and Economy: ICOSTEE 2018: Book of Abstracts, Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar, Szeged 87 p. p. 38

Gazsi Gy., Ivánovics B., Berta I. R., Szabó T., Zarski D., Urbányi B., Horváth L., Kucska B., Müller F., Müller T. (2019):Zebradánió szaporítási kísérletek sperma inszeminációs módszerrel 7th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő - International Conference; Book of abstracts of presentations and posters; Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő

Balogh E., Berta R., **Gazsi Gy.**, Garai E., Reining M., Urbányi B., Bakos K., Csenki Zs. (2017): Egy víztisztítási melléktermék, a 3-amino-9-etilkarbazol által kiváltott defektusok felderítése toxikológiai módszerekkel a zebradánió (*danio rerio*) korai életszakaszában In: Bényi, E; Bodnár, Á.; Pajor, F.; Póti, P. (szerk.) 6th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő - International Conference; Book of abstracts of presentations and posters; Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő 71 p

Gazsi Gy., Ivánovics B., Berta I. R., Szabó T., Zarski D., Urbányi B., Horváth L., Kucska B., Müller F., Müller T. (2019): A novel fish induced spawning method for ex situ and in situ conservation of population by using sperm injection into ovary, In: Gábor, Pintér; Szilvia, Csányi; Henrik, Zsiborács (szerk.) Innovation Challenges in the 21st Century: LXI. Georgikon Napok International Scientific Conference: Abstract volume Keszthely, Pannon Egyetem Georgikon Kar 131 p. p. 35 , 1 p.

Bencsik D., Bakos K., Fetter E., Scholz S., Kovács R., **Gazsi Gy.**, Kövesi J., Csepeli A., Szende B., Rácz G., Urbanyi B., Csenki Zs.(2014): Test the water! Effects of a water disinfection byproduct on zebrafish embryos, In: 11th International Congress on The Biology of Fish. Edinburgh, Egyesült Királyság Abstract Book pp. 53

Kovács R., **Gazsi Gy.**, Reining M., Bakos K., Appl A. J., Vuong D. T., Giang P. T., Bencsik D., Grosz Gy., Scholz S., Fetter É., Ortmann J., Baska F., Urbányi B., Csenki Zs. (2014) A complex study of fluoride cardiotoxic and neurotoxic effects on zebrafish embryo. Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology, Aulnay-sous-Bois/Paris, France. pp. 51

Urbanyi B., Bakos K., Kovacs R., Reining M., **Gazsi Gy.**, Kovacs B., Csepeli A., Kövesi J., Bencsik D., Simon G., Csenki Z. (2014) Zebrafish: A toxicological “multitool”. In: Aquaculture Europe 2014, San Sebastián, Spanyolország pp. 1372–1373

Kovács R., Csenki Zs., **Gazsi Gy.**, Bencsik D., Bakos K., Baska F., Grósz Gy., Grósz T., Urbányi B. (2010) Studying the effects of chronic fluoride exposition to the zebrafish (*Danio rerio*) cardiac functions using electrocardyography, 11th European Meeting on Environmental Chemistry, Portorož, Szlovénia, pp. 153

Balogh E., Bakos K., Urbányi B., **Gazsi Gy.**, Berta R. I., Csenki Zs. (2018) Investigation of toxic effects of water disinfection by-products on zebrafish by toxicological tests and gene expression analysis In: Fish & Amphibian Embryos Symposium p. 1

Ivánovics B., **Gazsi Gy.**, Csenki Zs., Berta I. R., Reining M., Ács A., Urbányi B., Czimmerer Zs. (2020) Effects of embryonic exposure to non-lethal concentrations of aflatoxin B1 on zebrafish immune system In: 11th European Zebrafish Meeting. Program and abstract book pp. 193-193.,1 p.

Pataki B., Kollár T., Marinović Z., Lujić J., **Gazsi Gy.**, Berta R. I., Urbányi B., Horváth Á. (2019): Inheritance of sperm cryoresistance in zebrafish (*Danio rerio*) In: Alexandra, Depincé; Audrey, Laurent (szerk.) 7th International Workshop on the Biology of Fish Gametes: Book of abstracts 176 p. pp. 133-133., 1 p.

Bakos K., Kovacs R., Staszny A., Balogh E., Bencsik D., **Gazsi Gy.**, Csepeli A., Sipos D. K., Reining M., Urbanyi B., Balazs A., Kriszt B., Kovacs B., Muller F., Csenki Zs. (2017) Development of a liver transgenic zebrafish line (vtg1:mcherry) for the detection of estrogenic substances, 10th European Zebrafish Meeting Budapest, Book of abstracts 319 p.

Losonczi E., Szabó K., Kollár T., Csenki Zs., **Gazsi Gy.**, Horváth Á., Urbányi B., Gyüre Zs., Zsigmond Á., Varga M., Varga Z., Pribenszky Cs., Cserepes J.: A protocol to arrest zebrafish embryonic development at different stages of ontogeny. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, kivonat 439.p.

Gazsi Gy., Fabi L., Kellner V., Garai E., Balogh E., Ráth Sz., Ferincz Á., Czimmerer Zs., Csenki Zs., Urbányi B., Balogh K., Baska F., Kovács R., Reining M. (2016): Investigation of fluoride ion oxidative and ossification effect on zebrafish, Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology symposium & workshop, Aulnay-sous-Bois/Paris, France

Gazsi Gy., Kerekes F., Bálint B., Reining M., Garai E., Balogh E., Ráth E., Ferincz Á., Czimmerer Zs., Csenki Zs., Urbányi B., Kovács R. (2016): Cardiovascular and neurotoxicity effects of 2,4-D and chlorpyrifos on zebrafish with acute exposure, Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology symposium & workshop, Aulnay-sous-Bois/Paris, France,

Kovács R., **Gazsi Gy.**, Reining M., Bakos K., Appl Á. J., Vuong D. T., Giang P. T., Bencsik D., Grosz Gy., Scholz S., Fetter É., Ortmann J., Baska F., Urbányi B., Csenki Zs. (2015) A complex study of fluoride cardiotoxic and neurotoxic effects on zebrafish In: The 9th European Zebrafish Meeting p. 52,1 p.

Bencsik D., Bakos K., Fetter É., Scholz S., Kovács R., **Gazsi Gy.**, Kövesi J., Csepeli A., Szende B., Rácz G., Urbányi B., Csenki Zs. (2014) Test the water! Effects of a water disinfection byproduct on zebrafish embryos In: Don, MacKinlay (szerk.) Abstract Book Edinburgh, Egyesült Királyság / Skócia p. 53,1 p.

Kovacs R., **Gazsi Gy.**, Reining M., Bakos K., Appl A. J., Vuong D. T., Giang P. T., Bencsik D., Grosz G., Scholz S., Fetter E., Ortmann J., Baska F., Urbanyi B., Csenki Zs. (2014) A complex study of fluoride cardiotoxic and neurotoxic effects on zebrafish. Heart of Europe Zebrafish Meeting, Varsó, Lengyelország pp. 57.

Kovács R., **Gazsi Gy.**, Bencsik D., Bakos K., Baska F., Grósz Gy., Grósz T., Urbányi B., Csenki Zs. (2012) A possible way to use electrocardiography for studying long-term exposure of chemicals on adult zebrafish (*Danio rerio*). 1st European Conference on the Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in Ecotoxicology, Dübendorf, Switzerland pp. 45.

Kovács R., **Gazsi Gy.**, Bencsik D., Bakos K., Baska F., Grósz Gy., Grósz T., Urbányi B., Csenki Zs. (2012) Used electrocardiography for studying fluoride effects on adult zebrafish heart functions, 10th International Congress on the Biology of Fish, Madison, Wisconsin, USA

Kovács R., Csenki Zs., Tarcai Zs., **Gazsi Gy.**, Bencsik D., Bakos K., Kovács B., Urbányi B., Filipič M., Horváth Á. (2012) Effects of 5-fluorouracil and cisplatin to the embryonic and early life stage development of zebrafish (*Danio rerio*), Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology, Aulnay-sous-Bois/Paris, France

Kovács R., **Gazsi Gy.**, Bencsik D., Bakos K., Baska F., Grósz Gy., Grósz T., Urbányi B., Csenki Zs. (2012) Studying effects of chemicals on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiac functions using electrocardiography, 3rd SETAC CEE Annual Meeting, Krakow, Poland, Book of Abstract 50 pp.

Kovács R., **Gazsi Gy.**, Bencsik D., Bakos K., Baska F., Grósz Gy., Grósz T., Urbányi B., Csenki Zs. (2011): The effects of fluoride exposure on the cardiac functions of zebrafish (*Danio rerio*). Poszter a „7th European Zebrafish Meeting” Edinburgh, Skócia pp. 368.

Hazai konferencia kiadványban megjelent kiemelt közlemények

Gazsi Gy., Csenki Zs., Bakos K., Reining M., Bencsik D., Appl Á. J., Kövesi J., Csepeli A., Kovács R., Baska F. (2014): A nátrium-fluorid szubletális hatása zebradánió (*Danio rerio*) embriókra és lárvákra, XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas

Gazsi Gy., Berta I. R., Ivánovics B., Ruffilli L., Szabó T., Urbányi B., Horváth L., Müller T. (2018) Külső megtermékenyítésű zebradánió (*Danio rerio*) ívatása tejes jelenléte nélkül In: XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás 67 p. p. 44

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

Gazsi Gy., Kovács R., Appl Á. J., Csepeli A., Ferincz Á., Bencsik D., Garai E., Kövesi J., Reining M., Csenki Zs., Urbányi B. (2015) Akut fluorid terhelés hatása zebradánió embriók szív működésére XXXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás Szarvas p. 51.