

**Az aflatoxin B1 embrionális fejlődésre és
veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatásainak
vizsgálata zebraadánión (*Danio rerio*)**

**Effects of embryonic exposure to aflatoxin B1 on
zebrafish (*Danio rerio*) development and innate immune
system**

IVÁNOVICS Bence

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
(Hungarian University of Agriculture and Life Sciences)
Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola
(Doctoral School of Animal Biotechnology and Animal Science)
Gödöllő, 2023.

Témavezetők (supervisors): URBÁNYI Béla DSc és CZIMMERER Zsolt PhD

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 károsítja 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. Mindezért 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 zebraadánió embriókon és lárvákon. A zebraadánió 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-epozíció 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 lárvánál, 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 anyagcsere-útvonalak 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 koncentrációnál 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 alulexpresszáldódása 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 kihatással 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 anyagcsere-útvonalnak 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, zebradánió modellrendszer segítségével született eredmények hozzájárulnak az AFB1 által indukált embriotoxikus hatások ismeretanyagához.

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.

Forrás (source): <https://doktori.hu/index.php?menuid=193&lang=HU&v id=26895>