

DIPLOMADOLGOZAT

Lorx Nikolett

2025.



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Növénytermesztési-tudományok Intézet
Agrármérnök osztatlan szak

Az aceszulfám-kálium embrionális hatásainak vizsgálata zebradánión (*Danio rerio*)

Belső konzulens: Név: Dr. Csenki-Bakos Zsolt

beosztás: Tudományos főmunkatárs

Név: Dr. Ivánovics Bence

beosztás: Tudományos munkatárs

Belső konzulensek intézete/tanszéke: Akvakultúra és
Környezetbíztonsági Intézet, Környezettoxikológiai Tanszék

Készítette:

Lorx Nikolett

Gödöllő

2025.

Tartalomjegyzék

Bevezetés és célkitűzések	5
Irodalmi áttekintés	7
Az embrionális fejlődés megzavarásának következményei	7
Édesítőszer	8
Az aceszulfám-kálium jellemzése	10
Az aceszulfám-kálium nemkívánatos biológiai hatásai	11
Aceszulfám-kálium utódokra gyakorolt hatásai	14
A zebradánió mint modellszervezet	15
Zebradánió a toxikológiában	17
Anyag és módszer	18
A zebradánió szülőállomány tartási és szaporítási körülményei	18
Embrionális aceszulfám-kálium-expozíció	19
A zebradánió lárvák morfológiai elemzése	20
Viselkedésvizsgálat	21
Zebradánió világos-sötét preferencia teszt	22
Statisztika	24
Bioetikai állásfoglalás	24
Eredmények és értékelésük	25
Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció zebradániók morfológiájára gyakorolt hatásai	25
Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció zebradániók viselkedésére gyakorolt hatásai	28
Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció zebradánió lárvák sötét-fény preferenciájára gyakorolt hatása	31
Következtetések és javaslatok	33
Összefoglalás	34
Köszönetnyilvánítás	36
Irodalomjegyzék	37
Ábrák és táblázatok jegyzéke	40
Nyilatkozatok	41
Hallgatói nyilatkozat	41
Konzulensi nyilatkozat	42

Konzulensi nyilatkozat 2.....	42
Nyilatkozat. mesterséges intelligencia használatáról.....	44

Bevezetés és célkitűzések

Az egyre gyakoribbá váló elhízás a föld népessége körében az utóbbi évezredben fokozódó közegészségügyi problémát jelent, az ez elleni küzdelemben a népesség segítségére lehetnek a különféle alacsony vagy nulla energia tartalmú édesítőszeresek. Számos publikáció számol be a cukor (szacharóz) lehetséges káros hatásairól az emberi szervezetre. Ezek az ismeretek vezettek a cukorfogyasztás lecsökkenéséhez és a mesterséges édesítőszeresek megjelenéséhez az 1800-as években. Az első cukor helyettesítő, mesterséges édesítőszer az alacsony kalória tartalmú szacharin volt, amit hamarosan sorra követtek más mesterséges édesítőszeresek, mint például az aszpartám, a ciklamátok és az aceszulfám-kálium (Ace-K) (Izakovic 2021). Ugyanakkor számos szakirodalmi eredmény hívja fel a figyelmet egyes mesterséges édesítőszeresek nem kívánatos biológiai hatásaira (Suez, 2022), (Shum, 2021), ezért az ide vonatkozó ismereteink bővítése kiemelt jelentőséggel bír.

Az Ace-K jelenleg az egyik leggyakrabban előforduló édesítőszer, amivel találkozhatunk. Számos „zero” és „light” üdítőkben, lekvárokból és különböző élelmiszerekben előfordul, melyeket láthatunk a boltok polcain.

Az aceszulfám-kálium egy olyan mesterséges édesítőszer melyről már megállapították, hogy képes átjutni a placentán és bekerülni a magzatvízbe, valamint a magzati keringésben is megjelenhet (Palatnik, Moosreiner, and Olivier-Van Stichelen 2020; Zhang et al. 2011). A várandós anyák körében egyre gyakoribb probléma a *gestációs diabetes mellitus* vagyis a terhességi cukorbetegség, amely a terhesség során kialakult vagy felfedezett szénhidrát-anyagcsere zavar {Al-Aissa, 2017 #14}. Ezek az anyák a cukorfogyasztás kerülése miatt gyakran választanak a cukor mentes élelmiszerek és üdítők közül.

Az embrionális fejlődés időszaka kiemelten érzékeny periódus, amelynek során a bekövetkező környezeti stresszhatások számos káros, rövid, illetve hosszú távú biológiai hatást vonhatnak magukkal (Dufour-Rainfray et al. 2011; Barr, Bishop A Fau - Needham, and Needham 2007; Gluckman, Hanson Ma Fau - Beedle, and Beedle 2007).

Az embrionális Ace-K-expozíció különböző potenciális káros hatásairól több kutatómunka is beszámol, mint pl. az utódok megváltozott glükóz és lipid anyagcsereje, illetve a máj detoxifikációs képességében, valamint a bél mikrobiom működésében bekövetkező eltérések (Lin et al. 2021; Bian et al. 2017). Ugyanakkor az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció biológiai következményeiről még kevés információ áll rendelkezésünkre. Kutatómunkánk

témáját az aceszulfám-kálium embrionális hatásainak feltárása képezte, amelyet a zebraadánió, mint embriótoxicitás-modell segítségével végeztünk.

A zebraadánió egy szubtrópusi halfaj, amely India és Dél-Kelet Ázsia folyóiban őshonos. Akváriumi díszhalként való elterjedése után a tudomány területén is számos tanulmány modellszervezetévé vált. Viszonylag kis méretű, csapatban élő, nagy ikraprodukcióra képes hal, amelynek egyedfejlődése rendkívül gyors, valamint három-négy hónap alatt eléri az ivarérettséget. A zebraadánió külső termékenyüléssel szaporodik, az embriók és a lárvák gyengén pigmentáltak, így könnyen vizsgálhatók és nyomon követhetők a szervezetükben bekövetkező változások. Ezek a kedvező tulajdonságok lehetővé tették, hogy a gerinces fejlődésbiológia, molekuláris genetika, és embriotoxikológia modellállatává váljon (Linney, Upchurch L Fau - Donerly, and Donerly 2004; Dooley and Zon 2000; Vargesson 2007). Mivel kutatómunkánkban az Ace-K embrionális hatásaira fókuszáltunk, így a zebraadánió embrió egy hatékony modellként szolgált a számunkra.

Kutatómunkánk elsődleges célját az embrionális fejlődés időszakára korlátozódó Ace-K-expozíció hatásainak feltérképezése képezte zebraadánió modellrendszeren, olyan koncentrációtartományban, amely átfed a szakirodalomban közölt, magzatvízben, illetve köldökzsinórból vett vérben mért értékekkel (Razieh, Noori, and Pilevarian 2020), (Colín-García et al. 2023). Ennek a vizsgálat sorozatnak az első fő állomását az alapvető vitalitás béli eltérések megismerése képezte. Ennek érdekében kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen morfológiai változásokat eredményez az Ace-K-expozíció, valamint, hogy okoz-e ez a vegyület eltéréseket a lárvák viselkedésében.

A morfológiai változásokat mikroszkópos képalkotás segítségével kívántuk értékelni. Az Ace-K-expozíció lárvák viselkedésére gyakorolt hatásait zebraadánió lárvák számára kialakított speciális viselkedésvizsgáló rendszerben kívántuk meghatározni, ahol világos-sötét periódusok váltakozása mellett szeretnénk volna nyomon követni a lárvák lokomotoros aktivitásában bekövetkező változásokat. Másrészt, további sötét-világos preferencia vizsgálatban kívántuk értékelni a lárvák viselkedését.

Irodalmi áttekintés

Az embrionális fejlődés megzavarásának következményei

Az embrionális fejlődés időszaka igen érzékeny periódus az egyedfejlődés során. Az ekkor bekövetkező környezeti stresszhatások, (pl. xenobiotikumok; káros fizikai hatások; patogén ágensek) rövid és hosszú távú biológiai problémákat eredményezhetnek az utódokban. A fejlődő embrió szervezete számos támadási pontot szolgáltat az azt érő toxikus anyagok számára, egyes esetekben teratogén, míg máskor felnőtt kori betegségeket eredményező következményeket magával vonva (Barr, Bishop A Fau - Needham, and Needham 2007). Számos xenobiotikum esetén kimutatták, hogy képes átjutni a placentán, így bekerül a magzati keringésbe (REF!). A biológiai következmények széles skálát ölelnek fel. Okozhatnak például különböző idegrendszeri, viselkedésbeli rendellenességeket, mint az autizmus (Dufour-Rainfray et al. 2011). A várandósság alatti valproinsav, etanol, thalidomid és a mizoprosztol kitettség összefüggésbe hozható az autizmus megnövekedett előfordulásával. Az autizmuson kívül számos felnőttkori betegséget eredményezhet az embrionális xenobiotikum-expozíció, ilyenek például a koszorúér-megbetegedések, vagy a cukorbetegség. Egy tanulmány (Selgrade et al. 2013) arról számolt be, hogy az asztma egyes esetekben kialakulhat méhen belül, vagy a korai életszakaszban is. Több tanulmány kimutatta (Leth-Møller et al. 2023a), hogy bizonyos mesterséges édesítőszer mint például a szukralóz, szacharin, aceszulfám-K és a ciklamát átjuthatnak a placentán, és jelen vannak a magzati keringésben, valamint az amnionfolyadékban. Egy tanulmány azt vizsgálta (Cai, Sivak, and Davenport 2021), hogy a mesterséges édesítőszer várandósság alatti fogyasztása, hogyan hozható kapcsolatba különböző születési kimenetekkel. Kimutatták, hogy a napi mesterséges édesítőszer fogyasztás összefüggésben lehet a koraszülés kockázatának növekedésével, enyhe mértékben növelheti a születési súlyt, és hatással lehet a gesztációs kor hosszára. Egy másik kutatás (; Plows et al. 2022) pedig az anyai non-nutritive édesítőszer (olyan mesterséges édesítőszer, amelyek vagy alacsony kalória tartalmúak, vagy egyáltalán nem szolgáltatnak energiát a fogyasztó számára) fogyasztást hozta összefüggésbe a gyerekek magasabb BMI-indexével és testzsírtartalmával a születéstől a serdülőkorig tartó időszakban. A várandósság alatt az anyáknak fokozott figyelmet kell szentelni az étkezésükre, életmódjukra, mivel ezek a magzat fejlődését számottevő mértékben befolyásolhatják.

Édesítőszer

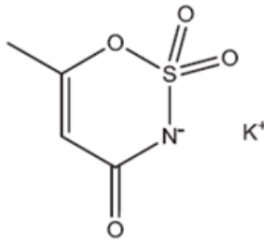
A diabétesz, az elhízás és a túlsúly egyre gyakoribb problémája a társadalmunknak, amely elleni küzdelemben nagy szerepet játszanak a különféle cukormentes diéták és a kevesebb cukorbevitellel járó táplálkozás. A kevesebb energia bevitellel járó étkezés és a testtömeg kontroll iránti törekvés teret adott az édesítőszer széleskörű elterjedésének. Az élelmiszeripar a cukor alternatívájaként használja a mesterséges édesítőszereket, mivel magasabb az édesítő értékük, kevesebb energiát tartalmaznak, mint a szacharóz, valamint ugyanazon édes íz elérése érdekében kevesebb mennyiség is elegendő belőlük. A fogyasztók szívesen választják a „zero”, illetve „light” termékeket a fent említett előnyeik miatt. A mesterséges édesítőszer fogyasztásának élettani hatása, nagy mértékű népszerűségük miatt, intenzíven kutatott területté vált (Chattopadhyay, Raychaudhuri, and Chakraborty 2017).

A mesterséges édesítőszer felhasználása először az első világháború idején lett felkapott, ugyanis a mezőgazdasági válságnak köszönhetően a cukor előállítás lecsökkent. A legtöbb mesterséges édesítőszer szintetikus előállított készítmény, felépítésük teljesen különbözik a szacharóz molekula szerkezetétől, felfedezésüket a véletlennek köszönhetjük. A mesterséges édesítőszer kutatásának és előállításának kezdetén a szakemberek arra törekedtek, hogy lemásolják a cukor (szacharóz) felépítését, szerkezetét és tulajdonságait, amik hatást gyakorolnak az édes íz érzékelésére, de a kísérletek nem vezettek sikerre. A mesterséges édesítőszer nagy része más kémiai kísérletek melléktermékeként keletkezett (Maja Izakovic 2021).

Az első mesterséges édesítőszer, a szacharint, 1879-ben Constantine Fahlberg fedezte fel. A szacharin megismerését követően további édesítőszereket szintetizáltak, mint például az aszpartám, aceszulfám-K, szukralóz, neoheszperidin, neotám, ciklamát (Maja Izakovic 2021). A statisztikai analízisek arról számolnak be, hogy a mesterséges édesítőszer fogyasztása közvetlen módon nem befolyásolja a testsúlyt, valamint a vércukorszintet. Ennek ellenére, a legújabb kutatások eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a mesterséges édesítőszer hatással vannak a glükóz felszívódására a bélrendszerben, valamint az inzulin- és inkretin-szekrécióra, emberekben és állatokban is (Chattopadhyay, Raychaudhuri, and Chakraborty 2017). Továbbá a mesterséges édesítőszer befolyásolhatja a mikrobiom összetételét, ennek köszönhetően a vércukorszintet is (Bian et al. 2017). Ezen kívül megjelentek a szakirodalomban olyan publikációk is, amelyek összefüggésbe hozzák a nagy mértékű non-nutritive édesítőszer fogyasztást a szív-és érrendszeri, koszorúér és agyi érrendszeri megbetegedések kialakulásával, valamint a tumorképződés kockázatának növekedésével

(Iizuka 2022). A mesterséges édesítőszeres várandósság alatti fogyasztásának magzatra gyakorolt hatásairól szintén egyre több tanulmány jelent meg az elmúlt évtizedben, ezért a potenciális rövid és hosszútávú káros biológiai hatások megismerése kiemelt fontossággal bír. Mindemellett, a nagymértékű kibocsátás és sok esetben jelentős mértékű perzisztencia miatt egyes mesterséges édesítőszereseket a szakirodalom mára potenciális környezeti szennyező anyagokként is számontart (Praveena, Cheema, and Guo 2019a). Egy kutatás a mesterséges édesítőszeres ökotoxikológiai kockázatát vizsgálta a talajökoszisztémában (Lin et al. 2024), környezetileg releváns koncentrációkban a mesterséges édesítőszeres befolyásolhatják a talajlakó szervezetek anyagcseréjét, szaporodását és mikrobiális egyensúlyát. A szakirodalomban találunk olyan írást, (Goveas 2025) amely egy kutatási hiányterületre hívja fel a figyelmet, az édesítőszeres környezeti és egészségügyi kockázatainak pontos értékeléséhez. A tanulmány szerint „One Health” megközelítésre van szükség, amely egy olyan integrált szemlélet, amely magába foglalja az emberi, környezeti és vadon élő állatok egészségének egységes vizsgálatát. Ez a szemlélet elengedhetetlen a mesterséges édesítőszeres szennyezésének mérsékléséhez, valamint a hosszú távú következmények megelőzéséhez.

Az aceszulfám-kálium jellemzése



1. ÁBRA AZ ACESZULFÁM-KÁLIUM SZERKEZETI KÉPLETE (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

Az Ace-K (1.ábra) része az édesítőszer azon csoportjának, amelyeket véletlenszerűen fedeztek fel. Leírása Karl Clauss kémikus és természettudós nevéhez fűződik, aki laboratóriumi munkája közben vette észre saját kezén az édes anyag ízét 1967-ben (Izakovic 2021). Alkalmazása a Sweeteners in Food Regulations 1983. rendelet alapján engedélyezett. Az Ace-K alkalmazását illetően az Egészségügyi Világszervezet (WHO) és az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) megállapított egy megengedhető napi bevitt (Acceptable Daily Intake, ADI= 15 mg/testsúly kg) (Zeece 2020), valamint kedvezően értékelte élelmiszerbiztonsági szempontból.

Az Ace-K egy szulfonát vegyület káliumsója. Az Ace-K eltarthatósága szobahőmérsékleten majdnem korlátlanak tűnik. Vízben rendkívül jól oldódik, alkoholban azonban kevésbé. Az Ace-K-nak nincs energiatartalma, valamint, 200-szor édesebb, mint egy 3%-os szacharóz oldat (Maja Izakovic 2021), (Zeece 2020). Intenzív édes ízének és elhanyagolható energiatartalmának köszönhetően az egyik leggyakrabban alkalmazott mesterséges édesítőszer. Az élelmiszerek és italok esetében alkalmazott feldolgozási és tárolási körülmények között az Ace-K stabilnak bizonyul. Felhasználása rendkívül széleskörű, megtalálható különféle üdítőkben, péksüteményekben, fagyaltokban, valamint asztali édesítőszerként is meg lehet találni a boltok polcain. Nem csak önmagában alkalmazzák, a kutatások nem észleltek problémát az Ace-K szorbitollal, polidextrózzal és hasonló térfogatnövelőkkel való együttes felhasználás esetén, így ezeket a keverékeket szintén megtalálhatjuk a különféle élelmiszerekben, mint például lekvárokbán, rágógumikban, pékárukban (von Rymon Lipinski 1985).

Az engedélyezett mesterséges anyagok szabályozása eltér az Egyesült Államokban, valamint Európában, ezért az édesítőszer szabályozásában is viták merültek fel a mesterséges édesítőszer fogyasztása és annak egészségügyi hatásai között. Ennek ellenére számos vizsgálat kimutatta, hogy az édesítőszer fogyasztása nem jár káros egészségügyi

következményekkel, ha a fogyasztók betartják a megengedhető napi bevitelt (Maja Izakovic 2021). Különböző kutatások eredményei alapján az Ace-K nem mutatott, citotoxikus, rákkeltő vagy teratogén hatást. Az ide vonatkozó munkák összefoglalóját 1981-ben megjelentette a Világegészségügyi Szervezet (von Rymon Lipinski 1985).

Az emberi test által metabolizálható cukrok (szacharóz, fruktóz, glükóz) fogyasztása jelentősen hozzájárul a napi kalóriabevitelhez. Az aceszulfám-kálium viszont nem metabolizálódik az emberi szervezetben. Az erre irányuló kísérleteket patkányokon, kutyákon és sertéseken végezték. Mivel az állatkísérletek azt támasztották alá, hogy az Ace-K nem metabolizálódott, önkénteseket is bevontak a vizsgálatokba. A humán önkénteseken elvégzett tanulmány esetében az Ace-K szintén nem metabolizálódott, az emberi szervezetbe kerülést követően a bélből gyorsan felszívódott, majd kiválasztódva, változatlan formában a vizelettel ürült (von Rymon Lipinski 1985).

Az aceszulfám-kálium nemkívánatos biológiai hatásai

Annak ellenére, hogy az aceszulfám-kálium fogyasztása napjaikban különböző élelmiszerbiztonsági kutatások szerint alapvetően biztonságos, megjelentek a szakirodalomban olyan publikációk, amelyek a mesterséges édesítőszer, köztük az aceszulfám-kálium lehetséges negatív hatásairól számoltak be (Chattopadhyay, Raychaudhuri, and Chakraborty 2017). A mesterséges édesítőszer kitettség többnyire felnőtt emberek esetében diétás italokból, valamint ételekből ered. Az aceszulfám-kálium képes átjutni a placentán ezáltal megjelenik a magzati keringésben, illetve a magzatvízben, valamint az anyatejben is. Az Ace-K jelenlétét váransósság alatt a magzatvízből, továbbá az anyatejből, fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékromatográfiás és tömegspektrometriás módszerekkel mutatták ki (Zhang et al. 2011). Az Ace-K jelenléte a magzati keringésben és az anyatejben kihatással lehet az utódok felnőtt kori egészségi állapotára. Az egereken végzett vizsgálatok rámutattak arra, hogy az utódok prenatális vagy posztnatális Ace-K kitettsége későbbiekben hosszútávú hatással lehet a felnőtt utódok édesíz preferenciájára (Zhang et al. 2011).

Számos publikáció kiemeli a bélmikrobiom fontos szerepét a testsúly szabályozásában és a glükóz metabolizálásában (Bian et al. 2017). A szacharin kihatással lehet a bél mikrobiótájára, és glükóz intoleranciát okozhat. Ez egy újabb kérdést vet fel, hogy van-e összefüggés az édesítőszer fogyasztás és a járványszerű elhízás, valamint a cukorbetegség között. Egy további kutatómunka arról számolt be, hogy az Ace-K befolyásolta a bél mikrobiom összetételét CD-1 egerekben. A megfigyelt testsúly gyarapodás, a bélbaktériumok összetételének eltolódása,

egyes energia metabolizmus-asszociált gének kifejeződésének megváltozása, és a széklet anyagcseretermékek összetételének változása ivar- specifikus volt, a megfigyelt hatások különböztek a hím és a nőstény egyedek esetében. Az Ace-K növelte a testtömeg gyarapodást a hím egyedekben, ellentétben a nőstényekkel (Bian et al. 2017). Ivar-specifikus hatásról egy másik publikációban is olvasni, a tanulmány egereken vizsgálta az Ace-K krónikus fogyasztásának hatását a neuro-metabolikus funkciókra. Az eredmények hím egerek (C57BL/6J) neuro-metabolikus funkcióiban mutatott változást, ezáltal feltételezhető, hogy az Ace-K tartós fogyasztása befolyásolhatja a kognitív funkciókat (Cong et al. 2013).

Vemhes és laktációs fázisban lévő egereket tettek ki non-nutritive édesítőszer (Ace-K és szukralóz) felvételnek, humán fogyasztás szempontjából releváns dózisban. Bár az utódok expozíciója alacsony volt, igen jelentős metabolikus változásokat lehetett megfigyelni rajtuk. A vizsgálatok alátámasztották, hogy az Ace-K fogyasztása a várandósság és a szoptatás alatt kihatással lehet az utódok anyagcsere folyamataira, és különböző metabolikus változásokat eredményezhet, kihathat a máj méregtelenítő mechanizmusaira, valamint a mikrobiom összetétel arányaiban is változásokat okozhat. Az ilyen mikrobiom működésében és összetételében bekövetkező változások összefüggésbe hozhatók az elhízással és különféle anyagcsere betegségekkel (Olivier-Van Stichelen, Rother, and Hanover 2019).

Egyes kutatómunkák eredményei felvetik, hogy a non-nutritive édesítőszer fogyasztása fiatal korban növeli a korai serdülés esélyét. A kísérletben vizsgált patkányok esetében az aceszulfám-kálium fogyasztása a méhen belüli szakasztól az elválasztásig felgyorsította a pubertás kialakulását, amihez fokozott gonadotropin-fel szabadító hormon (GnRH) elválasztás társult. Továbbá az intracerebroventrikuláris aceszulfám-kálium injekció szintén indukálta a korai serdülés bekövetkezését patkányoknál (Wu et al. 2024).

Egy másik tanulmány szerint magas koleszterin diétával táplált ApoE^{-/-} egerek esetében az aceszulfám-kálium növelte a magas koleszterin diéta által kiváltott diszlipidémiát, amely együtt járt a zsírképzés fokozásával és a lipolízis csökkenésével. Ezek tovább súlyosbíthatják a magas koleszterin diétával okozott érlelmeszesedést az ApoE^{-/-} egerekben. A magas koleszterin diéta mellett az aceszulfám-kálium további hatásokat gyakorolt a lipogenezisre. Mindemellet az aceszulfám-kálium befolyásolhatja a lipidek metabolizmusát a májban, ami további lipid szabályzási zavarokhoz vezethet, ezzel fokozva az érlelmeszesedés előrehaladását (Lin et al. 2021).

A mesterséges édesítőszer, mint újonnan keletkező környezetszennyező anyagok, környezetre gyakorolt hatásának tanulmányozására egyre több figyelmet szentelnek a kutatók (Praveena, Cheema, and Guo 2019b). Az Ace-K a környezetben viszonylag gyakran fordul elő,

rendkívül perzisztensen van jelen az ökoszisztémában, kimutatható a szennyvízben, annak köszönhetően, hogy az emberi szervezetből szinte változatlan formában ürül. Emiatt az Ace-K kihatással lehet a vízi élővilágra is. Az Ace-K vízi szervezetekre gyakorolt káros hatásairól még meglehetősen kevés ismerettel rendelkezünk, ezért nagyobb figyelmet kell fordítani olyan kutatómunkákra, melyek a környezeti szempontból releváns Ace-K koncentrációknak történő kitettség biológiai következményeit vizsgálták.

Egy kutatómunka (Li et al. 2021), arról számolt be, hogy az aszpartam emberi elfogadott napi beviteli érték tartományába eső koncentrációkban okozott neurotoxikus és viselkedéssel kapcsolatos eltéréseket felnőtt zebradánió modellnél. Az aszpartam-expozíció hatására a halak viselkedési mintázata szignifikánsan megváltozott. Megbomlott az agyi neurotranszmitter-egyensúly, csökkent az aktivitás a sötét térben, valamint a szociális viselkedésük is megváltozott. Egy másik kutatás (Li et al. 2021), pedig a sztívia és a szukralóz hatását tanulmányozta szintén felnőtt zebradánió egyedeken. Eredményként kimutatták, hogy az előbb említett non-nutritive édesítőszer szorongásos és depressziós jellegű viselkedést, valamint megnövekedett agressziót okoztak. Bár az Ace-K esetében a standard toxicitási tesztek nem mutattak ki letális hatásokat, egyre több vizsgálat utal például az Ace-K idegrendszer működését befolyásoló hatásaira. Egy kutatás (Colín-García et al. 2023) céljából tűzték az Ace-K (50, 75, 125 µg/l) és a szukralóz (50, 75, 125 µg/l) hatásának vizsgálatát, külön-külön és együttesen, az úszásra, az acetilkolin-észteráz aktivitására, az oxidatív stresszre adott válasza zebradánió modellszervezetben 4 hónapos expozíció után. Az expozíció követően a felnőtt zebradániók szorongásszerű viselkedést mutattak, megnőtt az egyhelyben töltött idő hossza és csökkent az úszási aktivitás, valamint oxidatív stresszt eredményezett a központi idegrendszerben, és gátolta az acetilkolin-észteráz aktivitását. Az eredmények kimutatták, hogy az Ace-K toxikusabb volt, mint a szukralóz, viszont a két édesítőszer együttes alkalmazása még károsabb hatást váltott ki, mint külön-külön (Colín-García et al. 2023). Egy hasonló vizsgálatban az Ace-K és a szukralóz biokémiai, fiziológiai és viselkedéssel kapcsolatos hatásaira fókuszáltak, a *Daphnia magna* modell segítségével. Mindkét édesítőszer esetében az acetilkolin-észteráz aktivitást érintően dózisfüggő növekedést, a szívfrekvenciára és a viselkedésre pedig gátló hatást lehetett megfigyelni. Ezen felül az Ace-K alacsonyabb koncentrációkon gátolta, magasabb koncentrációkon pedig serkentette az acetilkolin-észteráz aktivitását (Wiklund et al. 2023).

Egy felnőtt zebradániókon végzett vizsgálat, viszonylag alacsony, környezeti szempontból azonban releváns koncentrációkon (1, 10, 100 mg/l) vizsgálta az Ace-K idegrendszerre gyakorolt hatásait. Az eredmények megmutatták, hogy az Ace-K ezeken a viszonylag alacsony, túlélést nem befolyásoló koncentrációkon belül is megváltoztatja a

zebradániók viselkedését. Az Ace-K-expozíció befolyásolta a halak sötét-fény preferenciáját és a felfedező-képességüket, növelte a neofóbiát, befolyásolta a szociális viselkedésüket, valamint kihatással volt a tanulásra és a memóriára (Dong et al. 2020).

Az Ace-K részben lebontható a hagyományos UV fertőtlenítéssel eljárás során, viszont a bomlástermékeinek toxicitásáról szintén kevés információ áll rendelkezésünkre (Ren et al. 2016). A következő kutatómunka, Ace-K-nak és bomlástermékeinek kitett ezüstkárászok (*Carassius auratus*) májában végbemenő lehetséges oxidatív állapotváltozásokra összpontosított. Az eredmények alapján fokozott toxicitást lehetett megfigyelni az Ace-K UV sugárzás után képződött bomlástermékei esetén. Ezen végeredmények rávilágítottak arra, hogy az Ace-K vízi környezetben való jelenlétét és fennmaradását újabb környezeti kockázatként kell kezelni. Az Ace-K tehát egy potenciális környezeti kockázattal bíró anyag, további megismerése, környezetre és emberi szervezetre gyakorolt hatásainak feltárása indokolt (Praveena, Cheema, and Guo 2019b).

Aceszulfám-kálium utódokra gyakorolt hatásai

Több kutatómunka eredményei utalnak arra, hogy az anyák mesterséges édesítőszer fogyasztása terhesség alatt növelheti az elhízás kialakulását az utódoknál, azonban ennek mechanizmusa még nem ismert. A különböző non-nutritive édesítőszer, így az Ace-K is képes a transzplacentális transzmisszióra, jelen van a magzati keringésben és a magzatvízben valamint egy kísérletben vizsgált köldökzsinórvér mintákban is mérhető koncentrációkban is kimutatták az Ace-K-t (Leth-Møller et al. 2023b). A rágcsálókon végzett vizsgálatok alapján, arra következtethetünk, hogy az édesítőszer expozíciója negatív hatással lehet az utódok metabolikus egészségére. Egereken végzett vizsgálatok alapján számottevő változásokat tapasztalhattak a kutatók a bél mikrobiom összetételében, valamint a máj méregtelenítő folyamataiban is olyan utódok esetében, amelyek a méhen belüli fejlődés és a laktáció időszakában non-nutritive édesítőszer (köztük Ace-K) expozíciónak voltak kitéve (Halasa et al. 2020).

Szinte alig fellelhető olyan kutatómunka, amely az embrionális Ace-K-expozíció immunológiai következményeit vizsgálja. Ugyanakkor a fejlődő embrió immunrendszerét befolyásoló faktorok jelentős mértékű kihatással lehetnek az utód életkilátásaira. Bridge-Comer és mtsai. (2023) egerek *in utero* Ace-K-kitettséget követően vizsgálták az újszülött egyedek bőrének állapotát, valamint a sebgyógyulási, és az ahhoz társuló gyulladásos folyamatokat. Az

anyai Ace-K fogyasztás növelte az utódok bőrében a pro-inflammatorikus markerek kifejeződését, valamint befolyásolta a sebgyógyulás folyamatát. Mindezek alapján a továbbiaknak jól megtervezett, prospektív klinikai vizsgálatok elvégzésére van szükség, amik segítik megérteni a non-nutritive édesítőszer, köztük az Ace-K várandósság alatti bevitelének hatását a fejlődő utód szervezetére.

A zebradánió mint modellszervezet

A zebradánió (*Danio rerio*) a pontyfélék (*Cyprinidae*) családjába tartozó szubtrópusi halfaj, India, Dél-Kelet Ázsia folyóiban őshonos. A *Danio* genus első megjelenését Kelet-Indiában figyelték meg, majd ezt követően a kontinens számos területén észleltek fajokat, különösképpen Asszám és Meghálaja államokban, valamint Nepál és Banglades területén (Vargesson, 2007). A díszhalként igen népszerűvé vált halfaj hamarosan a tudomány területén is elterjedt, mint modellorganizmus. A zebradánió egy kistermetű csapatban élő halfaj, így viszonylag kis helyen nagy egyedszámban tartható, valamint rövid generációs idővel rendelkezik. Ezek a tulajdonságok lehetővé teszik egy speciálisan zebradániók számára kiépített recirkulációs rendszer létesítését, melyek megkönnyítik a laboratóriumok munkáját, és újabb lehetőségeket nyitnak előttünk.

A zebradánió embrió széles körben alkalmazott modellszervezet a biológiai tudományok számos területén, különösen kedvelt modellszervezetté vált a gerinces fejlődési folyamatok és a humán rendellenességek tanulmányozásában (Dooley and Zon 2000). A teljes szekvenált zebradánió genom 2013-tól elérhető a tudományos közösség számára (Howe et al. 2013). Egyaránt jól alkalmazható a fejlődésbiológiai és molekuláris genetikai kutatások során, különböző humán megbetegedések vizsgálatánál, valamint kitűnő modell szervezete a farmakológiai, toxikológiai és környezeti kockázattal bíró anyagok ökotoxikológiai hatásának vizsgálatának (Scholz et al. 2008).

A gerincesek fejlődésmenetére irányuló tanulmányok emlős modellállatok alkalmazása során akadályokba ütközhet, mivel az emlősállatok embriógenézise méhen belül játszódik le. A zebradánió külső megtermékenyítésű halfaj, így az embriógenézis méhen kívül megy végbe, gyors fejlődésmenete, valamint az embriók és a lárvák átlátszósága, hozzájárul a fejlődésmenet egyszerűbb nyomon követéséhez és vizsgálhatóságához. Napjainkban már több ezer mutáns és transzgenikus zebradánió vonalat hoztak létre, specializálódva a különböző tudományos területek kutatási céljaira. (Dooley and Zon 2000)

A zebradánió embrió az Európai Unió állatkísérletek végzésére irányuló rendelete alapján (2010/63/EU) önállóan nem-táplálkozó stádiumokban nem engedélyköteles. A zebradánió egyedfejlődése gyors, a megtermékenyítést követő 24 órával már kifejlődik a legtöbb szervkezdemény, az organogenezis nagyrésze az első két napon lejátszódik, és az 5. napra befejeződik. A lárvák önálló táplálkozása az 5. napot követően indul. Ezáltal az organogenezis teljes mértékben nyomon követhető, állatkísérleti engedély nélkül. Emellett kifejezetten előremutató szervezetet kínál a 3R szabály (Replacement, Reduction, Refinement) mentén. A 3R szabály (Russel, Burch, 1959) a kísérleti állatok felhasználására irányuló szabályozás; Reduction: állatszám csökkentés, Replacement: helyettesítés, alacsonyabb rendű modellezés, Refinement: eredmények finomítása, kísérleti technikák minőségének javítása, kísérleti körülmények tökéletesítése. A zebradánió tudományos célokra való felhasználása, teljes mértékben nem képes helyettesíteni az emlős modelleken végzett kísérleteket, de lecsökkentheti, finomíthatja azokat (Dooley and Zon 2000).

A zebradánió szerveinek fejlődése és működése számos hasonlóságot mutat az emlős és a humán szervezethez képest, és a mutáns vagy transzgenikus vonalak egyszerű létrehozása nagy mértékben megkönnyíti a különböző betegségmodellek létrehozását. Nagyléptékű genetikai szűrések több mint 500 mutáns fenotípust azonosítottak a korai fejlődésment különböző aspektusaiban. A humán fehérje kódoló gének legalább 70%-nak van funkcionális megfelelője a zebradánióban (Santoriello and Zon 2012). Mivel a zebradánió nem emlős modell, ezért vannak bizonyos hátrányai a humán betegségek modellezésében, például hiányoznak bizonyos szervek, mint a tüdő és az emlőmirigy. Ezen kívül a zebradánió genomja számos duplikációt tartalmaz, melyek gén szubfunkcionalizációt és neofunkcionalizációt eredményezhetnek. A zebradánió alkalmazása a természettudományok területén ugyanakkor hasznos lehet a különböző humán betegségek patogenezisének megismerésében, és új terápiás szerek felfedezésében is nagy segítségére lehet a tudománynak.

A zebradánió tartása viszonylag egyszerű, költséghatékony körülmények között kivitelezhető. Egy speciálisan a faj számára kiépített recirkuláris rendszerben, társas élőlény mivoltukból fakadóan, a megfelelő vízi paramétereket biztosítva, nagy egyedszámban tarthatók. Laboratóriumi tartás esetén, táplálékukat száraz haltáp, és élő frissen kikelt só rákok alkotják. Szaporításuk viszonylag egyszerűen elvégezhető, rendkívül nagy mennyiségű ikrát képesek adni.

Zebradánió a toxikológiában

A fent említett alkalmazásokon kívül a zebradánió embrió a toxikológiában is jól alkalmazható modell szervezet. A környezet-toxikológia és az élelmiszer-toxikológia tudománya gyakran alkalmazza a zebradániót, mint modellszervezetet. Olyan tanulmányokhoz szolgálnak kiváló modellként, amelyek célja a xenobiotikumok hatásmechanizmusainak, és szervezeten történő sorsának megértésére és annak lehetséges rövid és hosszútávú káros hatásainak vizsgálata. Számos transzgénikus zebradánió reporter vonalat alkalmaznak a toxinok hatásmechanizmusainak és támadáspontjainak feltérképezéséhez (Linney, Upchurch L Fau - Donerly, and Donerly 2004). A toxikus anyagok működési mechanizmusának megismerése fontos a környezetben és az élelmiszerben is megjelenő vegyi anyagok kockázatának értékelésében, valamint segíthet a káros rövid és hosszútávú hatások feltárásában. A zebradánió a korábban már említett tulajdonságai miatt jól használható a xenobiotikumok hatásmechanizmusainak megértésére irányuló vizagálatokban. Alkalmazása jó alternatívája lehet az emlős modelleknek, a toxikológia és az ökotoxikológia tudományok területén is, gazdaságosság, idő- és helytakarékoság, és állatjóléti szempontok alapján is.

Anyag és módszer

A zebradánió szülőállomány tartási és szaporítási körülményei

A kísérleteink során felhasznált zebradánió embriók szülőgenerációjának nevelése a Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezettoxikológiai Tanszékének zebradániós laboratóriumában, a Techniplast ZebTEC által kimondottan erre a fajra tervezett, recirkulációs haltartó és halnevelő rendszerben történt. A vizsgálatainkhoz a széles körben alkalmazott AB típusú zebradánió vonalakat használtunk fel, amelyeket a vízkeringetésű rendszerben 3 literes medencékben tartunk. Az automatizált rendszer megfelelő környezetet biztosít a víz állandó keringetésével, szűrésével, cseréjével, valamint az optimális környezeti paraméterek fenntartásával. A víz hőmérséklete 24-25 °C, kémhatása: 6,8-7,8 pH, vezetőképessége 500-800 μ S. Ezeket a beállított paramétereket a rendszer folyamatosan ellenőrzi és korrigálja. A rendszerben lévő víz tisztaságáért egy többlépcsős (aktív szenes, mechanikai és UV-csőes) szűrő felelős. A laboratórium automatikusmegvilágítást biztosít, 14 óra világos és 10 óra sötét periódus által. A halállomány táplálékát száraz haltáp (Zebrafeed), valamint napi egy alkalommal, élő táplálék kiegészítés, frissen kikelt só rákok (*Artemia salina*) képezik.

Az nemzetközi szinten is elterjedt AB laboratóriumi vonalú szülők szaporítása az alábbiak szerint történt. Erre a célra speciálisan kialakított, elhúzható válaszfalú 1 literes műanyag ívató edényben zajlott. Az edények kiemelhető rácsos aljú belső résszel vannak ellátva, amely segíti az embriók begyűjtését. A rács résein az ikrák átjutnak, és leülepednek az edényben, ahol a szülők nem férnek hozzájuk, így nem tudják elfogyasztani őket. Ez a szaporító eszköz igyekszik a halak természetes szaporodási körülményeit modellezni, ezért a rács formája imitálja a természetes partvonalat, így még komfortosabbá teszi a halak számára. Az ívást követően az ikrákat embrió médiummal (E3: 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄) félig feltöltött, 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe helyeztük, majd fénymikroszkóp alatt szelektáltuk az embriókat, kiválasztva a normális fejlődést mutató, ép embriókat a kísérletek elvégzéséhez.

Embrionális aceszulfám-kálium-expozíció

Az embriók az Ace-K expozíciónak az embrionális fejlődés időszakában, 8-16 sejtés állapotól a megtermékenyítést követő 120. óráig voltak kitéve (2. ábra). A kezelés 10 cm átmérőjű Petri-csészékben zajlott, melyekben a kezelési oldatokhoz a zebradánió számára megfelelő paraméterekkel rendelkező embrió médiumot (E3) használtunk. Az embriókat 40 ml végtérfogatú oldatokban inkubáltuk, valamint az expozíció során, naponta 50 %-os oldatcserét végeztünk. A kezelési egyedsűrűség Petri-csészénként 20 embrió volt, vagyis 20 embrió/40 ml.



2. ÁBRA AZ EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ IDŐSZAKA (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

A kísérlethez kiválasztott Ace-K koncentráció tartomány (25, 50, 100, és 200 µg/l) átfed a szakirodalmakban megjelenő, magzatvízből, illetve köldökzsinórból vett vérből kimutatott Ace-K koncentráció értékekkel (2. ábra) (Halasa et al., 2020, 2021; Leth-Møller et al 2023).

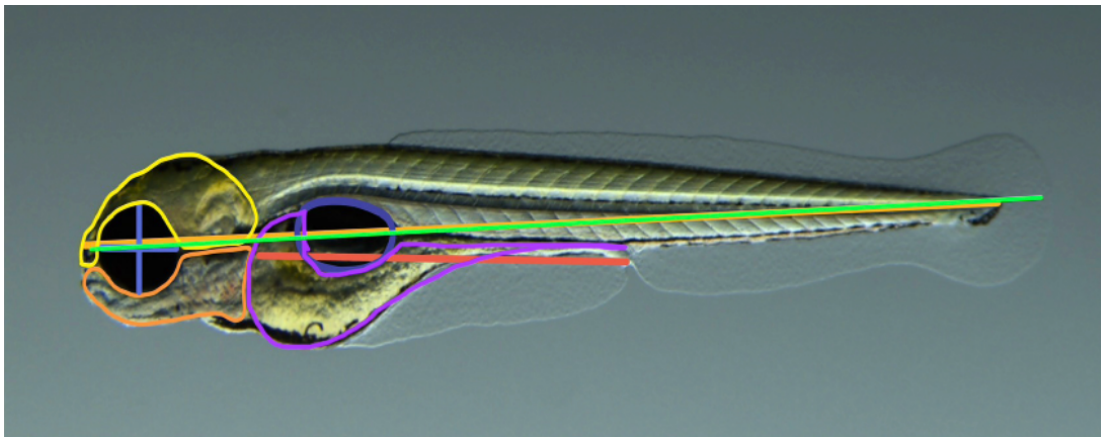
Mivel az Ace-K hidrofíl tulajdonságú ezért a kezelés során nem volt szükségünk különböző oldószerek használatára. Az kísérleteink során az Ace-K vizes oldatából adódó kálium-ion koncentráció növekedés a legmagasabb alkalmazott koncentráció esetén is elhanyagolható volt a zebradánió embriók nemzetközileg is alkalmazott embrió médiumának (E3) ajánlott kálium koncentrációjához képest (KCl E3= 0,17 mM).

A zebradánió lárvák morfológiai elemzése

Az Ace-K expozíció után, a kísérletben résztvevő 120 órás zebradánió lárvákat elaltattuk (trikain-metánszulfonát, 168 mg/l), majd az altatást követően sztereomikroszkóp (Leica M205 FA, Leica DFC 7000 T kamera, Leica Application Suite X szoftver) segítségével, oldalnézeti fényképeket készítettünk róluk.

A fényképek alapján, az Ace-K expozíciót követő, lehetséges, jól azonosítható deformitások megjelenését vizsgáltuk. Az Ace-K expozíciónak kitett vizsgálati csoportokat összehasonlítottuk a kontroll csoport egyedeinek morfológiai paramétereivel. A morfológia eltérések számszerűsítése érdekében ImageJ szoftvert használva, meghatároztuk a standard és teljes testhosszt, a lárvális bélhosszt (Chuang et al., 2019 alapján), az úszóhólyag oldalnézeti területét, a koponya dorsalis régiójának oldalnézeti területét, illetve a szem oldalnézeti területét, horizontális és vertikális átmérőjét, valamint a szik-bélrendszer területét.

Az morfológiai elemzéseket két független kísérletben, független ikratételekkel, három belső ismétlésenként hat lárvaival végeztük ($N = 2 \times 3 \times 6 = 36$ lárva/csoport).



Narancssárga vonal: standard testhossz

Zöld vonal: teljes testhossz

Kék vonalak: szem horizontális és vertikális átmérője

Sötétkék terület: úszóhólyag területe

Lila terület: szik-bélrendszer területe

Citromsárga terület: koponya dorzális régiója

3. ÁBRA 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK MORFOLÓGIAI MÉRÉSEINEK PARAMÉTEREI (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

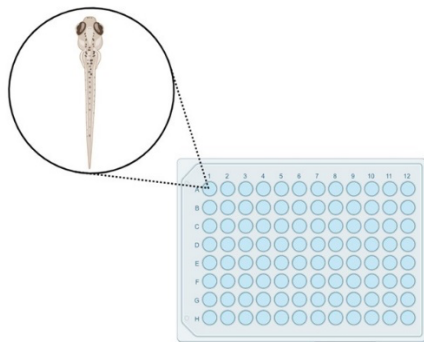
Viselkedésvizsgálat

Az embrionális Ace-K-expozíciónak a zebradánió lárvák viselkedésére gyakorolt hatásait, ViewPoint ZebraLab rendszerben ZebraBox készülékben vizsgáltuk (4. ábra). Az Ace-K-expozíciót követően a 120 órás zebradánió lárvákat individuálisan egy 96 lyukú, vízszintes aljú, sejttenyésztő lemezekbe helyeztük el, lárvánként 200 µl embrió médium kíséretében (5. ábra). Mielőtt megkezdtük volna a vizsgálatot, az elhelyezést követően 30 perces akklimatizációs időszakot biztosítottuk a lárváknak $25\pm 0,5$ °C hőmérsékleten. Az akklimatizációs periódus leteltével a lárvékat tartalmazó sejttenyésztő lemezeket elhelyeztük a zárt rendszerű vizsgáló készülékben.

ViewPoint ZebraLab



4. ÁBRA A VISELKEDÉSVIZSGÁLAT ELVÉGZÉSÉRE SZOLGÁLÓ KÉSZÜLÉK (VIEWPOINT ZEBRALAB, ZEBRABOX) (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)



5. ÁBRA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK ELHELYEZÉSÉRE SZOLGÁLÓ, 96 LYUKÚ SEJTENYÉSZTŐ LEMEZ (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

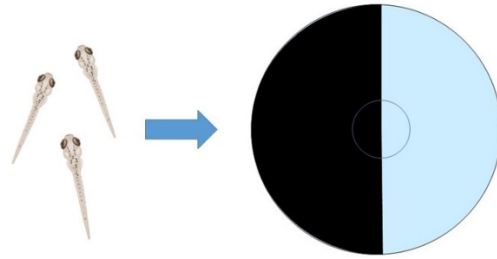
A viselkedést vizsgáló rendszer folyamatosan felvételeket készített (infravörös fényre érzékeny kamera segítségével) a lárvák mozgásáról, 10 perc világos, 20 perc sötét majd újból 10 perc megvilágított periódusok folyamán. A ZebraLab szoftver abban volt segítségünkre, hogy meghatározta a felvételek alapján, a kis finom-mozgásokkal megtett távolságokat, illetve a nagyobb mértékű, durvább mozgásokkal megtett távolságokat. Ezeket az adatokat a szoftver percre vonatkozóan összesítette, egyedenként.

A lárvák által mutatott, perces felbontásban megfigyelhető mozgás-mintázat alapján kiértékeljük a fény-sötét átmenet előtti 10 perc során, valamint az átmenetet követő egy perc folyamán mutatott lokomotoros aktivitást. Ez utóbbi egy perces periódus külön értékelését a zebradánió lárvákra kontroll körülmények között jellemző, fény lekapcsolására adott gyors, nagymértékű mozgásaktivitás növekedés indokolta.

A viselkedésvizsgálatot három független ismétlésben (független ikratételek), három belső ismétléssel, ismétlésenként nyolc lárvaival végeztük ($N = 3 \times 3 \times 8 = 72$ lárva / csoport).

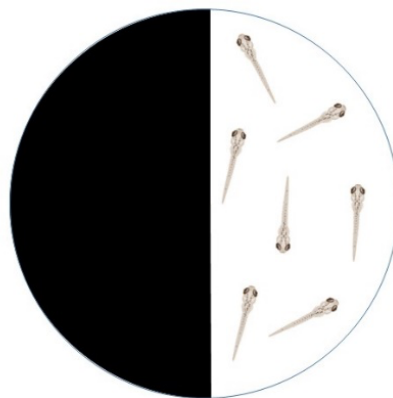
Zebradánió világos-sötét preferencia teszt

Az Ace-K-expozíciónak kitett, 120 órás zebradánió lárvák viselkedésének további vizsgálatát a világos-sötét preferencia teszt képezte. Ehhez olyan, közvetlenül erre a célra kialakított, 10 cm átmérőjű Petri-csészéket alkalmaztunk, amelyek egyik fele matt fekete színű, így a fény erről az oldalról történő beszűrődése megakadályozott. A Petri-csészébe 40 ml embrió médiumot töltöttünk. A teszt megkezdése előtt a Petri-csészék közepébe alulról nyitott, 1 cm átmérőjű szűrőkosárcákat (gyűrű) helyeztünk, melyekbe ismétlésenként 10 lárva tettünk (6. ábra).



6. ÁBRA 10 CM ÁTMÉRŐJŰ MÓDOSÍTOTT PETRI-CSÉSZE, BENNE A SZŰRŐKOSÁRKA (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

A teszt indításakor a gyűrűket óvatosan kiemeltük, majd visszahelyeztük a Petri-csésze tetejét (7. ábra). A megvilágított területen 4 mérési pontban digitális fénymérő segítségével meghatároztuk a megvilágítás mértékét (LUX). A teszt megvilágításától számított, első és második órában, leszámoltuk a Petri-csésze világos ténfelén tartózkodó zebraadánió lárvákat, a lárvák megzavarása nélkül (7. ábra). A vizsgálat $24 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten zajlott. A tesztet három belső ismétléssel, ismétlésenként 10 lárvalal végeztük el ($N = 3 \times 10 = 30$ lárva/csoport).



7. ÁBRASÖTÉT-FÉNY PREFERENCIA TESZT, MEGVILÁGÍTOTT TÉRBEN TARTÓZKODÓ LÁRVÁK SZÁMA (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

Statisztika

Az adatok statisztikai értékelése folyamán, elsőként Shapiro-Wilk normalitási tesztet hajtottunk végre. Az adatok eloszlása alapján, a normalitási tesztet követően, paraméteres ANOVA-t és Dunnett-féle post hoc tesztet vagy nem-paraméteres ANOVA-t (Kruskal-Wallis próba) és Dunn-féle post hoc tesztet végeztünk GraphPad Prism szoftver segítségével. A statisztikailag igazolható különbségeket $p < 0,05$ érték függvényében határoztuk meg. A tanulmány során megfigyelt eredményeket, átlag \pm szórás formában prezentálom. A statisztikailag igazolható különbségeket a mellékletekben feltüntetett diagramon a megfelelő oszlop felett egy csillaggal jelöltem.

Bioetikai állásfoglalás

Az Európai Parlament és a Tanács tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló (2010/63/EU) irányelvei alapján a kizárólag önállóan nem táplálkozó stádiumú halakon végzett kísérletek nem engedélykötelesek. A vizsgálataink folyamán nem alkalmaztunk önállóan táplálkozó stádiumú egyedeket.

Eredmények és értékelésük

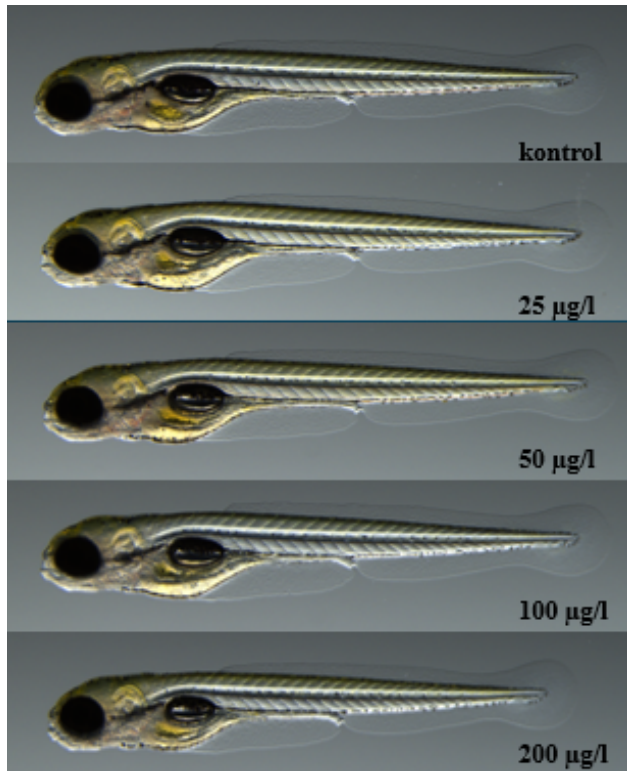
Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció zebraadániók morfológiájára gyakorolt hatásai

Vizsgálataink során nem tapasztaltunk pusztulást, valamint jelentős mértékű deformitásokat a zebraadánió lárváknál az egyes kezelési (és kontroll) csoportokban. Az embrionális Ace-K-expozíció nem eredményezett drasztikus morfológiai eltéréseket, ugyanakkor a 200 µg/l Ace-K koncentrációhoz tartozó csoportok esetén enyhe, de statisztikailag igazolható csökkenés mutatkozott meg a kontroll csoporthoz viszonyítva a standard testhosszban, teljes testhosszban, a lárvális bélhosszban, és az úszóhólyag méretében egyaránt. Valamint a koponya dorsalis régiójának területében a két legnagyobb koncentrációnak kitett csoportban merhető volt csökkenés. A szem külső morfológiájának tekintetében nem tapasztaltunk számottevő eltéréseket, ugyanakkor a horizontális szemátmérő esetén egy enyhe, de statisztikailag igazolható csökkenés mutatkozott meg a legnagyobb kezelési csoport esetén a kontroll csoporthoz viszonyítva (200 µg/l). A 8. ábrán látni lehet a 120 órás zebraadánió lárvák oldalnézeti felvételét, a különböző koncentrációknak kitett csoportokból. A következő ábra (9.ábra) mutatja a morfológiai mérések eredményét, a csillaggal jelölt oszlopokban lehet látni a statisztikailag igazolt különbségeket a kontroll csoporthoz viszonyítva. A szem területében, valamint a szik-bélrendszer területében nem tudtam kimutatni statisztikailag igazolható különbséget egyes csoportokban a kontroll csoport egyedeihez képest.

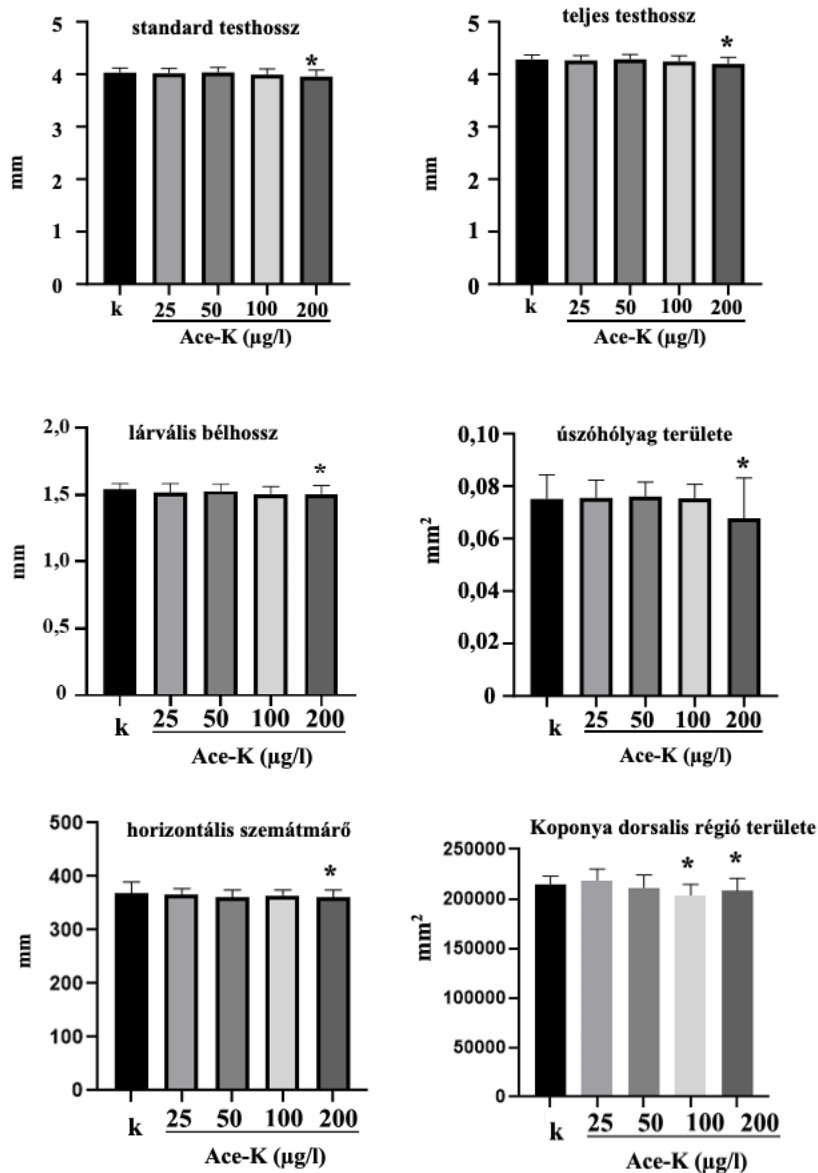
Ez idáig meglehetősen kevés kutatómunka vizsgálta az Ace-K zebraadánió embriókra gyakorolt hatásait. Hasonlóan az általunk kapott eredményekhez, (Saputra és mtsai. 2021) nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a mortalitásban a kontroll és kezelt csoportok között az általunk is vizsgált Ace-K koncentráció tartományon belül. Mindemellett 72 órás zebraadánió embrióknál statisztikailag igazolható növekedésről számolnak be a szívverés frekvenciájában, 100 µg/l Ace-K expozíció esetén. A szívet érintő morfológiai elváltozásokat (pl. perikardiális ödéma) tekintve ugyanakkor nem mutatkoztak meg különbségek.

A szakirodalomban nem találtam olyan kutatásokat melyek bizonyítékokkal tudták alátámasztani, hogy az Ace-K-expozíció okoz drasztikus morfológiai elváltozást, valamint teratogenitást emlős modelleknél.

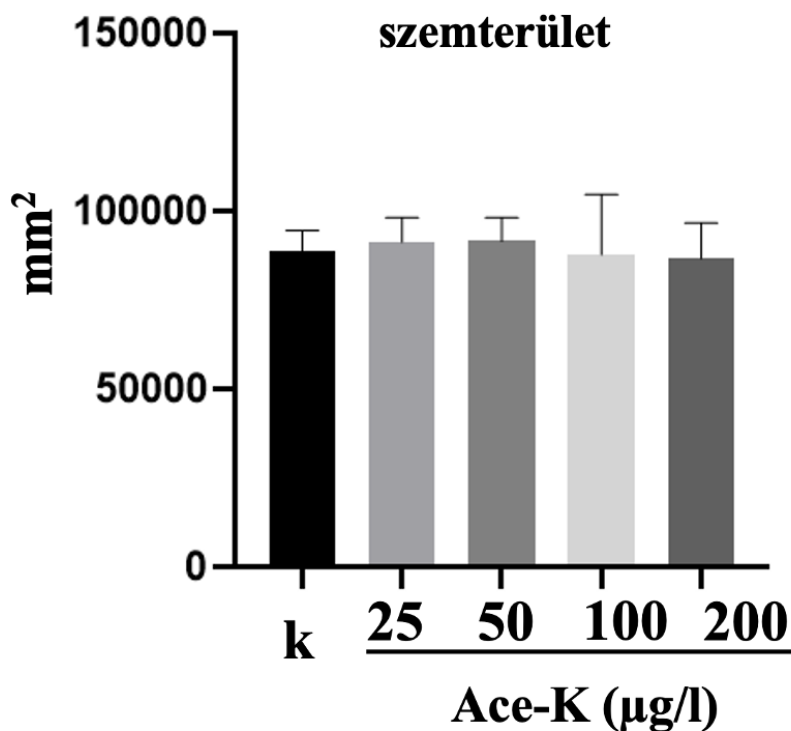
Összességében elmondható, hogy a vizsgálataink során az embrionális Ace-K-expozíció enyhe mértékű morfológiai eltéréseket okozott a zebradánió lárvákban, amelyek háttérben húzódó mechanizmusok további feltáró munkát igényelnek.



8. ÁBRA120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK MIKROSKÓPPAL KÉSZÍTETT KÉPE, KÜLÖNBÖZŐ ACE-K KONCENTRÁCIÓNAK KITÉVE (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)



9. ÁBRA AZ ACESZULFÁM-KÁLIUM-EXPOZÍCIÓ 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK MORFOLÓGIÁRA GYAKOROLT HATÁSA. K: KONTROLL; *: STATISZTIKAILAG IGAZOLHATÓ KÜLÖNBÉG A KONTROLLHOZ VISZONYÍTVÁ, $P < 0.05$ (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

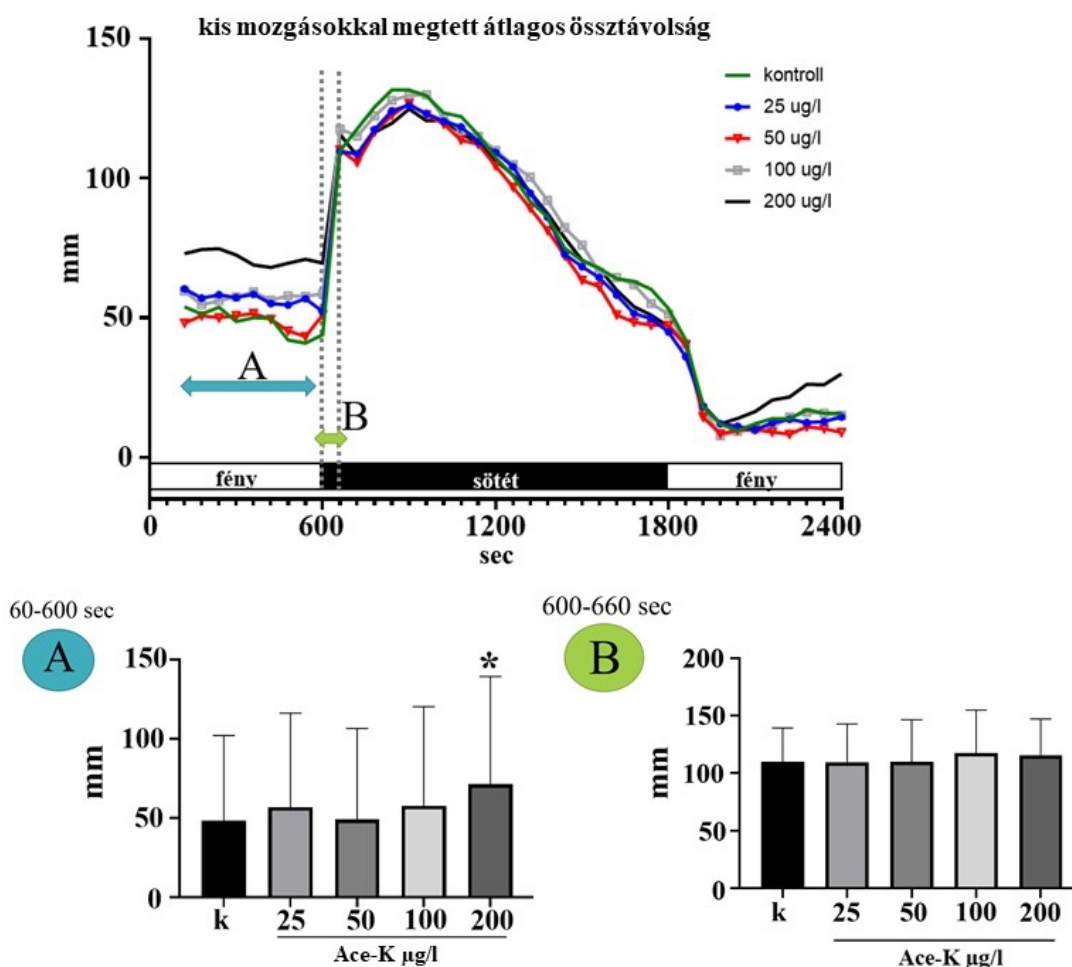


10. ÁBRAAZ ACESZULFÁM-KÁLIUM-EXPOZÍCIÓ 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK SZEMTERÜLETRE GYAKOROLT HATÁSA. (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

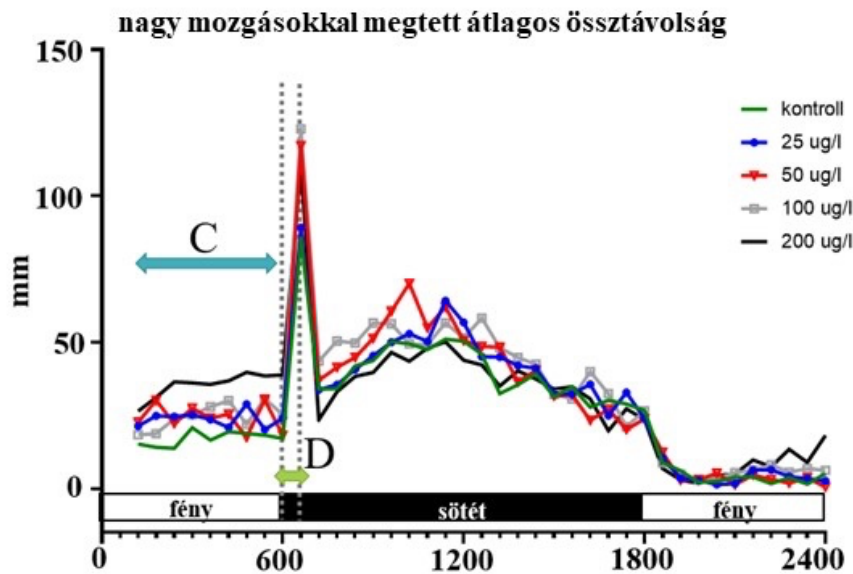
Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció zebradániók viselkedésére gyakorolt hatásai

Az Ace-k expozíció nem eredményezett nagymértékű eltéréseket a 120 órás lárvák kis, finom-mozgásokkal és nagy, „durvább” jellegű mozgásokkal megtett távolságait tekintve. Érdekes módon azonban a legnagyobb, 200 µg/l Ace-K koncentrációhoz tartozó csoportok esetén a sötét periódust megelőző világos szakaszban statisztikailag igazolható mértékű, emelkedett mozgás-aktivitás volt megfigyelhető, mind a finomabb, mind a nagyobb mértékű mozgásokkal megtett távolságokra vonatkozóan egyaránt a kontroll csoporthoz képest (8., 9. ábra). Emellett azonban koncentráció függő emelkedő tendenciát ebben a kezdeti világos periódusban nem tapasztaltunk. A világos-sötét átmenetet követően minden csoportban hirtelen bekövetkező mozgásaktivitás növekedés jelentkezett. Ez a megnövekedett mozgásaktivitás a fény lekapcsolását követő percben a nagyobb Ace-K koncentrációkhoz tartozó csoportok esetén meghaladta a kontroll aktivitását (első sorban a nagy mozgásokkal megtett távolságokra vonatkozóan), azonban ez esetben statisztikailag igazolható különbséget nem mutattunk ki. A sötét periódusban a kis mozgásokkal megtett, percenként összesített távolságok fokozatos

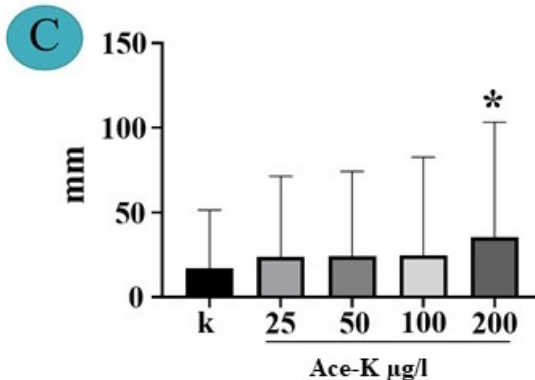
csökkenést mutattak, míg a nagy mozgások mennyisége a sötét periódus kezdetét követő második percben már visszaállt közel a kiindulási állapotra, ezt követően pedig enyhe emelkedő majd csökkenő ívet járt be (10., 11. ábra). Ezekben a periódusokban már nem tapasztaltunk látható különbséget az egyes csoportok között. Érdekes módon a sötét periódus követő világos periódusban a 200 µg/l Ace-K koncentrációhoz tartozó csoportok esetén a lárvák mozgásaktivitása fokozatos növekedést mutatott a többi csoporthoz képest (8., 9. ábra). Ennek a jelenségnek a további vizsgálata újabb, nagyobb időintervallumokra kiterjesztett fényperiódusok bevonását szorgalmazza.



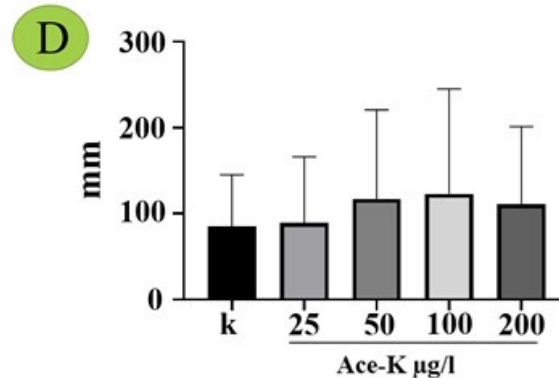
11. ÁBRA EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ HATÁSA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK KIS, FINOM-MOZGÁSOKKAL MEGTETT ÁTLAGOS TÁVOLSÁGÁRA. K: KONTROLL; A: SÖTÉT PERIÓDUS ELŐTTI SZAKASZ; B: FÉNY-SÖTÉT ÁTMENETET KÖVETŐ PERC; *: STATISZTIKAILAG IGAZOLHATÓ KÜLÖNBSÉG P < 0,05 (FORRÁS: SAJÁT)



60-600 sec



600-660 sec



12. ÁBRA EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ HATÁSA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK, NAGYOBB, DURVA MOZGÁSOKKAL MEGTETT ÁTLAGOS TÁVOLSÁGÁRA. K: KONTROLL; A: SÖTÉT PERIÓDUS ELŐTTI SZAKASZ; B: FÉNY-SÖTÉT ÁTMENETET KÖVETŐ PERC; *: STATISZTIKAILAG IGAZOLHATÓ KÜLÖNBSÉG $P < 0,05$ (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

Az Ace-K expozíció zebradániók viselkedésére és idegrendszerére gyakorolt hatásait tudomásunk szerint csak felnőtt egyedeken vizsgálta néhány kutatómunka (Dong et al. 2020). Embrionális Ace-K-expozíció neurotoxikus vagy viselkedésbeli elváltozást okozó hatásairól a nem találtam kutatómunkákat a szakirodalomban. Az embrionális Ace-K expozíció lokomotoros aktivitást és világos-sötét ingerre adott válaszreakciót érintő következményei ugyanakkor szinte még ismeretlenek. Krónikus Ace-K expozíciónak kitett felnőtt zebradánióknál igen jelentős, komplex viselkedésbeli különbségeket tapasztaltak, amelyek

többek között megváltozott fény-preferenciában, szociális viselkedésben, tanulásban, neurotranszmitter-átvitelben jelentkezett (Dong et al., 2019). A mi eredményeinkhez hasonló minázatot mutattak más édesítőszerekkel végzett tanulmányok is felnőtt zebradánió egyedek esetében, amiket már a szakirodalmi áttekintésben részleteztem. Emlősök esetén szintén korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésünkre az *in utero* Ace-K kitettség utódok viselkedésére, idegrendszerére gyakorolt hatásairól. Az eddigi ide vonatkozó tanulmányok elsősorban a táplálékfelvételben, illetve azt meghatározó íz-preferenciában bekövetkező eltéréseket emelik ki (Morahan et al., 2020; Zhang et al., 2011).

Eredményeink alapján elmondható, hogy az embrionális Ace-K-expozíció enyhe mértékben kihatással volt a zebradánió lárvák lokomotoros aktivitására, nagymértékű viselkedésbeli változásokat – ellentétben a felnőtt zebradániókra vonatkozó szakirodalmi eredményekkel – azonban nem tapasztaltunk a csoportok között.

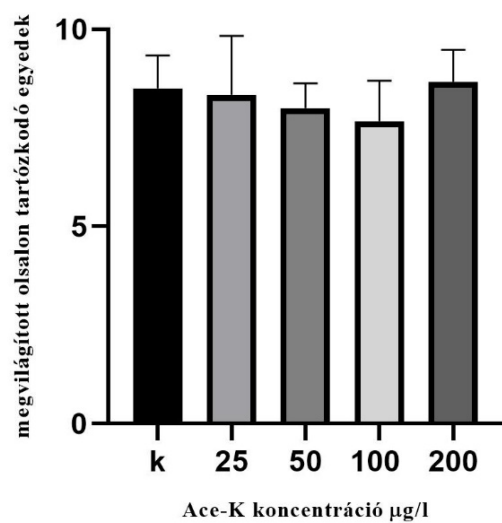
Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció zebradánió lárvák sötét-fény preferenciájára gyakorolt hatása

Az Irodalmi áttekintés című fejezetben már említettem, hogy a különböző non-nutritive édesítőszerek expozíciója hatással volt a felnőtt zebradánió modellek sötét térben lévő aktivitására.

A sötét-világos preferencia-vizsgálat során a teszt indításakor a Petri csésze közepére helyezett zebradánió lárvák a világos térfél felé orientálódtak, majd pedig a 2 órás inkubációs periódus során döntő többségben a világos térfélen tartózkodtak. Nem volt statisztikailag kimutatható különbség a kontroll és kezelési csoportok között (12. ábra).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a vizsgált 2 órás periódusban az általunk alkalmazott koncentráció tartományban az embrionális Ace-K -expozíció nem eredményezett különbségeket a lárvák sötét-világos preferenciájában.

120 órás zebradánió lárvák sötét-fény preferenciája



13. ÁBRAEMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ HATÁSA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK SÖTÉT-FÉNY PREFERENCIÁJÁRA, K: KONTROLL (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)

Következtetések és javaslatok

Összességében elmondható, hogy a morfológiai elváltozásokat tekintve az aceszulfám-kálium-expozíció nem okozott drasztikus elváltozásokat, ugyanakkor bizonyos paraméterek esetében enyhe mértékű csökkenés mutatkozott. A megfigyelt jelenség hátterében lévő mechanizmusok azonosítása és vizsgálata érdekében, további célzott és részletes kísérletekre van szükség.

A viselkedés vizsgálatok alapján elmondható, hogy az Ace-K-expozíció kitettség hatására, enyhe mértékben megváltozott a zebraadánió lárvák lokomotoros aktivitása, de nagy mértékű viselkedésbeli elváltozások nem voltak tapasztalhatók a különböző csoportok között. A sötét periódus után következő világos periódusban, a 200 µg/l aceszulfám-kálium koncentrációnak kitett csoportokban a zebraadánió lárvák mozgásában statisztikailag kimutatható aktivitás növekedést mértünk. Ezen jelenség pontosabb ismeretére és kimutatásához, további vizsgálatok szükségesek, nagyobb időintervallumok és további fényperiódusok bevonása, valamint nagyobb egyedszámban végzett kísérletek javasoltak. Mivel a felnőtt zebraadánió egyedekkel végzett kísérletek eredményei jelentős viselkedésbeli és neurotoxikus hatásokról számoltak be az aceszulfám-kálium-expozíciót követően, ezért a további kiterjesztett vizsgálatok elvégzését szorgalmazom.

Összefoglalás

A különböző mesterséges édesítőszer használata az élelmiszeriparban nagy népszerűségnek örvend. megtalálhatók a boltok polcain lévő termékekben, felhasználják éttermekben és az élelmiszer feldolgozásban. A cukros üdítők és élelmiszerek elkerülése érdekében egyre több ember fogyasztja a mesterséges édesítőszerrel készült termékeket. Mindezzel párhuzamosan az elmúlt évtizedekben egyre több kutatómunka tűzte ki célul ezen vegyületek humánegészségügyi kockázatainak a feltérképezését. A szakirodalom mára már számos kérdést vet fel a különböző mesterséges édesítőszer káros környezeti és egészségügyi hatásával kapcsolatban. Ezek közül kiemelt jelentőséggel bírnak a fejlődő embrióra gyakorolt hatásokra fókuszáló kutatások. Az embrionális fejlődés során kapott ingerek, hatások meghatározóan hatnak a magzat méhen kívüli és felnőttkori életére is.

Az aceszulfám-kálium az egyik leggyakrabban alkalmazott édesítőszer, amely képes átjutni a placentán és számottevő mennyiségben megjelenni a magzati keringésben, valamint a magzativízben egyaránt. Az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció nem kívánt biológiai hatásairól a szakirodalomban azonban meglehetősen kevés eredmény érhető el jelenleg. Ezért ennek a kutatómunkának a célját az embrionális aceszulfám-kálium-expozíció feltérképezése képezte egy humán betegségek modellezésében is gyakran alkalmazott modellorganizmus, a zebradánió segítségével. A zebradánió fehérjéket kodoló génjei 72 %-nak van funkcionális megfelelője a humán szervezetekben, külső megtermékenyítése miatt jól nyomon követhető az embrionális fejlődése, ezért megfelelő modell a kísérletünk elvégzéséhez.

Az ép 8-16 sejtes állapotban lévő lárvák a megtermékenyítést követő 120 óra leteltéig voltak kitéve az aceszulfám-kálium-expozíciónak, különböző Ace-K koncentrációk szerint csoportokra bontva (25,50,100,200 µg/l). A morfológiai vizsgálat mellett, az Ace-K expozíció viselkedésre és a sötét-fény preferenciára gyakorolt hatásának vizsgálatára irányuló vizsgálatok is elvégzésre kerültek.

Az általunk alkalmazott, humán kitettség szempontjából potenciálisan releváns koncentrációkkal történő embrionális Ace-K-expozíció nem okozott drasztikus elváltozásokat, sem morfológiai, sem pedig viselkedésbeli tekintetben. Ugyanakkor a legmagasabb koncentrációval (200 µg/l) kezelt vizsgálati csoportok esetében enyhe mértékű, de statisztikailag már igazolható csökkenés mutatkozott a kontroll csoporthoz képest a vizsgált morfológiai paraméterekben, ide tartozik a standard és a tényleges testhossz, a lárvális bélhossz,

az úszóhólyag területe, a koponya dorsalis régiójának területe, valamint a szem horizontális átmérője. Mindemellett, az Ace-K-expozíció kihatással volt a lárvák lokomotoros aktivitására, első sorban a megvilágított periódusok alatt, a legnagyobb koncentrációnak (200 µg/l) kitett csoportokban nagyobb mozgásaktivitást tapasztaltunk, azonban az expozíció nem változtatta meg azok fény-preferenciáját. Eredményeink alapján, valamint tekintetbe véve a szakirodalomban megjelenő, felnőtt zebradánióknál tapasztalt viselkedésbeli eltéréseket, további részletesebb, adott esetben taktilis és vizuális ingerek kombinációját felvonultató viselkedésvizsgálatok elvégzése válik szükségessé.

Itt érdemes kiemelni, hogy jelen kutatómunka az embrionális fejlődés végére fókuszált, ugyanakkor az embrionális expozíció hosszú távú következményeinek feltárása kiemelten fontos. Ezen további munkák során érdemes kiemelt hangsúlyt fektetni emellett az immunrendszerre gyakorolt hatások megismerésére is, főként, mivel ezen a területen az Ace-K expozíció tekintetében szinte alig rendelkezünk ismeretekkel.

Kutatómunkánk eredményei reményeink szerint kiindulási alapot képeznek egy hosszabb távú vizsgálatsorozatnak, amelynek során újabb, molekuláris, immunológiai és bioinformatikai vizsgálómódszerek bevonásával lehetővé válik az Ace-K embrionális hatásainak minél részletesebb feltérképezése.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindazoknak, akik segítségükkel, munkájukkal, odafigyelésükkel hozzájárultak dolgozatom létrejöttéhez. Köszönetet mondok Dr. Ivánovics Bencének, aki témavezetőmként komoly szakmai háttérrel biztosított dolgozatomhoz, mindig türelemmel, nyitottsággal állt hozzám, és rengeteg segítséggel, jótanáccsal látott el közös munkánk folyamán, valamint bevezetett a tudományos világba, kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá. Szeretnék köszönetet mondani második témavezetőmnek, Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imrének, aki nyitottan, kedvesen fordult felém, segített megismerkedni a zebradániók számára kialakított laboratóriummal és az abban található eszközökkel, szakmai tudásával kiváló háttérrel biztosított a halakkal való munkához. Köszönöm Dr. Szabó Istvánnak, aki türelemmel és nyitottsággal kísért végig munkásságunkat, segítségére bármikor számíthattam.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet dolgozóinak, akik segítettek megismerkedni a halak körül és a laborban zajló mindennapos feladatokkal.

Végül, szeretném megköszönni családomnak, és barátaimnak, hogy támogatásukkal hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Kutatásunkat az Innovációs és Technológiai Minisztérium által kiírt Tématerületi Kiválósági Program (TKP2021), Nemzetvédelem és Nemzetbiztonság alprogram pályázata támogatta (TKP2021-NVA-22).

Irodalomjegyzék

- Barr, D. B., Larry L. Bishop A Fau - Needham, and L. L. Needham. 2007. 'Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit'.
- Bian, X., L. Chi, B. Gao, P. Tu, H. Ru, and K. Auid-Orcid Lu. 2017. 'The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice'.
- Cai, C., A. Sivak, and M. H. Davenport. 2021. 'Effects of prenatal artificial sweeteners consumption on birth outcomes: a systematic review and meta-analysis', *Public Health Nutr*, 24: 5024–33.
- Chattopadhyay, S., U. Raychaudhuri, and R. Chakraborty. 2017. 'Artificial sweeteners - a review'.
- Colín-García, Karla, Gustavo Axel Elizalde-Velázquez, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, and Sandra García-Medina. 2023. 'Influence of sucralose, acesulfame-k, and their mixture on brain's fish: A study of behavior, oxidative damage, and acetylcholinesterase activity in *Danio rerio*', *Chemosphere*, 340: 139928.
- Cong, W. N., Huan Wang R Fau - Cai, Caitlin M. Cai H Fau - Daimon, Morten Daimon Cm Fau - Scheibye-Knudsen, Vilhelm A. Scheibye-Knudsen M Fau - Bohr, Rebecca Bohr Va Fau - Turkin, William H. Turkin R Fau - Wood, 3rd, Kevin G. Wood Wh 3rd Fau - Becker, Ruin Becker Kg Fau - Moaddel, Stuart Moaddel R Fau - Maudsley, Bronwen Maudsley S Fau - Martin, and B. Martin. 2013. 'Long-term artificial sweetener acesulfame potassium treatment alters neurometabolic functions in C57BL/6J mice'.
- Dong, Gaopan, Xiang Li, Guangxi Han, Lupei Du, and Minyong Li. 2020. 'Zebrafish neuro-behavioral profiles altered by acesulfame (ACE) within the range of "no observed effect concentrations (NOECs)"', *Chemosphere*, 243: 125431.
- Dooley, K., and L. I. Zon. 2000. 'Zebrafish: a model system for the study of human disease'.
- Dufour-Rainfray, D., Sébastien Vourc'h P Fau - Tourlet, Denis Tourlet S Fau - Guilloteau, Sylvie Guilloteau D Fau - Chalon, Christian R. Chalon S Fau - Andres, and C. R. Andres. 2011. 'Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism'.
- Gluckman, P. D., Alan S. Hanson Ma Fau - Beedle, and A. S. Beedle. 2007. 'Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective'.
- Goveas, Louella Concepta. 2025. 'Artificial Sweeteners and the One Health crisis: Toxicity effects and Ecological consequences', *Discover Applied Sciences*, 7: 535.
- Halasa, B. C., A. Sylvestsky, E. M. Conway, P. J. Walter, H. Cai, M. F. Walter, E. Schoupe, L. Hui, and K. I. Rother. 2020. 'SUN-055 Prenatal Exposure to Artificial Sweeteners. LID - SUN-055'.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, Sean Humphray, Karen McLaren, Lucy Matthews, Stuart McLaren, Ian Sealy, Mario Caccamo, Carol Churcher, Carol Scott, Jeffrey C. Barrett, Romke Koch, Gerd-Jörg Rauch, Simon White, William Chow, Britt Kilian, Leonor T. Quintais, José A. Guerra-Assunção, Yi Zhou, Yong Gu, Jennifer Yen, Jan-Hinnerk Vogel, Tina Eyre, Seth Redmond, Ruby Banerjee, Jianxiang Chi, Beiyuan Fu, Elizabeth Langley, Sean F. Maguire, Gavin K. Laird, David Lloyd, Emma Kenyon, Sarah Donaldson, Harminder Sehra, Jeff Almeida-King, Jane Loveland, Stephen Trevanion, Matt Jones, Mike Quail, Dave Willey, Adrienne Hunt, John Burton, Sarah Sims, Kirsten McLay, Bob Plumb, Joy Davis, Chris Clee, Karen Oliver, Richard Clark, Clare Riddle, David Elliott, Glen Threadgold, Glenn Harden, Darren Ware, Sharmin Begum, Beverley Mortimore, Giselle Kerry, Paul Heath, Benjamin Phillimore, Alan Tracey, Nicole Corby, Matthew Dunn, Christopher Johnson, Jonathan Wood, Susan Clark, Sarah Pelan, Guy Griffiths, Michelle Smith, Rebecca Glithero, Philip Howden, Nicholas Barker, Christine Lloyd, Christopher Stevens, Joanna Harley, Karen Holt, Georgios Panagiotidis, Jamieson Lovell, Helen Beasley, Carl Henderson, Daria Gordon, Katherine Auger, Deborah Wright, Joanna Collins, Claire Raisen, Lauren Dyer, Kenric Leung, Lauren Robertson, Kirsty Ambridge, Daniel Leongamornlert, Sarah McGuire, Ruth Gilderthorp, Coline Griffiths, Deepa Manthravadi, Sarah Nichol, Gary Barker, Siobhan Whitehead, Michael Kay, Jacqueline Brown, Clare Murnane, Emma Gray, Matthew Humphries, Neil Sycamore, Darren Barker, David Saunders, Justene Wallis, Anne Babbage, Sian Hammond, Maryam Mashreghi-Mohammadi, Lucy Barr, Sancha Martin, Paul Wray, Andrew Ellington, Nicholas Matthews, Matthew Ellwood, Rebecca Woodmansey, Graham Clark, James D. Cooper, Anthony Tromans, Darren Grafham, Carl Skuce, Richard Pandian, Robert Andrews, Elliot Harrison, Andrew Kimberley, Jane Garnett, Nigel Fosker, Rebekah Hall, Patrick Garner, Daniel Kelly, Christine Bird, Sophie Palmer, Ines Gehring, Andrea Berger, Christopher M. Dooley, Zübeyde Ersan-Ürün, Cigdem Eser, Horst Geiger, Maria Geisler, Lena Karotki, Anette Kirn, Judith Konantz, Martina Konantz, Martina Oberländer, Silke Rudolph-Geiger, Mathias Teucke, Christa Lanz,

- Günter Raddatz, Kazutoyo Osoegawa, Baoli Zhu, Amanda Rapp, Sara Widaa, Cordelia Langford, Fengtang Yang, Stephan C. Schuster, Nigel P. Carter, Jennifer Harrow, Zemin Ning, Javier Herrero, Steve M. J. Searle, Anton Enright, Robert Geisler, Ronald H. A. Plasterk, Charles Lee, Monte Westerfield, Pieter J. de Jong, Leonard I. Zon, John H. Postlethwait, Christiane Nüsslein-Volhard, Tim J. P. Hubbard, Hugues Roest Crollius, Jane Rogers, and Derek L. Stemple. 2013. 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*, 496: 498–503.
- Iizuka, Katsumi. 2022. 'Is the Use of Artificial Sweeteners Beneficial for Patients with Diabetes Mellitus? The Advantages and Disadvantages of Artificial Sweeteners', *Nutrients*, 14: 4446.
- Izakovic, Maja. 2021. 'COMMONLY USED ARTIFICIAL SWEETENERS IN EUROPE
- Leth-Møller, M., C. S. Duvald, S. Stampe, E. Greibe, E. Hoffmann-Lücke, M. Pedersen, and P. G. Ovesen. 2023a. 'Transplacental Transport of Artificial Sweeteners', *Nutrients*, 15.
- Leth-Møller, Magnus, Christina Søndergaard Duvald, Sofie Stampe, Eva Greibe, Elke Hoffmann-Lücke, Michael Pedersen, and Per Glud Ovesen. 2023b. 'Transplacental Transport of Artificial Sweeteners', *Nutrients*, 15: 2063.
- Li, Xiang, Gaopan Dong, Guangxi Han, Lupei Du, and Minyong Li. 2021. 'Zebrafish Behavioral Phenomics Links Artificial Sweetener Aspartame to Behavioral Toxicity and Neurotransmitter Homeostasis', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69: 15393–402.
- Lin, Cheng-Hsin, Hung-Yuan Li, Shu-Huei Wang, Yue-Hwa Chen, Yang-Ching Chen, and Hung-Tsung Wu. 2021. 'Consumption of Non-Nutritive Sweetener, Acesulfame Potassium Exacerbates Atherosclerosis through Dysregulation of Lipid Metabolism in ApoE^{-/-} Mice', *Nutrients*, 13: 3984.
- Lin, X. L., F. Guo, M. C. Rillig, C. Chen, G. L. Duan, and Y. G. Zhu. 2024. 'Effects of common artificial sweeteners at environmentally relevant concentrations on soil springtails and their gut microbiota', *Environ Int*, 185: 108496.
- Linney, E., Susan Upchurch L Fau - Donerly, and S. Donerly. 2004. 'Zebrafish as a neurotoxicological model'.
- Olivier-Van Stichelen, Stephanie, Kristina I. Rother, and John A. Hanover. 2019. 'Maternal Exposure to Non-nutritive Sweeteners Impacts Progeny's Metabolism and Microbiome', *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Palatnik, Anna, Andrea Moosreiner, and Stephanie Olivier-Van Stichelen. 2020. 'Consumption of non-nutritive sweeteners during pregnancy', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 223: 211–18.
- Plows, J. F., I. M. Aris, S. L. Rifas-Shiman, M. I. Goran, and E. Oken. 2022. 'Associations of maternal non-nutritive sweetener intake during pregnancy with offspring body mass index and body fat from birth to adolescence', *Int J Obes (Lond)*, 46: 186–93.
- Praveena, S. M., M. S. Cheema, and H. R. Guo. 2019a. 'Non-nutritive artificial sweeteners as an emerging contaminant in environment: A global review and risks perspectives', *Ecotoxicol Environ Saf*, 170: 699–707.
- Praveena, Sarva Mangala, Manraj Singh Cheema, and How-Ran Guo. 2019b. 'Non-nutritive artificial sweeteners as an emerging contaminant in environment: A global review and risks perspectives', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170: 699–707.
- Razieh, Zereshki, Ali Noori, and Ali Asghar Pilevarian. 2020. 'The Effect of Maternal Exposure to Acesulfame Potassium (Acesulfame-K) on the Development of the Male Gonad in Adult Rats', *Russian Journal of Developmental Biology*, 51: 336–41.
- Ren, Yuhang, Jinju Geng, Fuchang Li, Hongqiang Ren, Lili Ding, and Ke Xu. 2016. 'The oxidative stress in the liver of *Carassius auratus* exposed to acesulfame and its UV irradiance products', *Science of The Total Environment*, 571: 755–62.
- Santoriello, Cristina, and Leonard I. Zon. 2012. 'Hooked! Modeling human disease in zebrafish', *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 2337–43.
- Scholz, S., Ulrike Fischer S Fau - Gündel, Eberhard Gündel U Fau - Küster, Till Küster E Fau - Luckenbach, Doris Luckenbach T Fau - Voelker, and D. Voelker. 2008. 'The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing'.
- Selgrade, MaryJane K., Robyn B. Blain, Kristen M. Fedak, and Michelle A. Cawley. 2013. 'Potential risk of asthma associated with in utero exposure to xenobiotics', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99: 1–13.
- Vargesson, Neil. 2007. 'Zebrafish in 'Manual of Animal Technology''. in.
- von Rymon Lipinski, Gert-Wolfhard. 1985. 'The new intense sweetener Acesulfame K', *Food Chemistry*, 16: 259–69.

- Wu, Hung-Tsung, Chi-Chen Chiang, Chung-Teng Wang, Yue-Hwa Chen, Shih-Yuan Hsu, and Yang-Ching Chen. 2024. 'Consumption of the nonnutritive sweetener acesulfame potassium increases central precocious puberty risk', *Journal of Hazardous Materials*, 461: 132529.
- Zeece, Michael. 2020. 'Chapter six - Flavors.' in Michael Zeece (ed.), *Introduction to the Chemistry of Food* (Academic Press).
- Zhang, Gen-Hua, Meng-Ling Chen, Si-Si Liu, Yue-Hua Zhan, Ying Quan, Yu-Mei Qin, and Shao-Ping Deng. 2011. 'Effects of Mother's Dietary Exposure to Acesulfame-K in Pregnancy or Lactation on the Adult Offspring's Sweet Preference', *Chemical Senses*, 36: 763–70.

Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra AZ ACESZULFÁM-KÁLIUM SZERKEZETI KÉPLETE (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	10
2. ábra AZ EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ IDŐSZAKA (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	19
3. ábra 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK MORFOLÓGIAI MÉRÉSEINEK PARAMÉTEREI (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	20
4. ábra A VISELKEDÉSVIZSGÁLAT ELVÉGZÉSÉRE SZOLGÁLÓ KÉSZÜLÉK (VIEWPOINT ZEBRALAB, ZEBRABOX) (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	21
5. ábra A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK ELHELYEZÉSÉRE SZOLGÁLÓ, 96 LYUKÚ SEJTNYESZTŐ LEMEZ (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA).....	21
6. ábra 10 CM ÁTMÉRŐJŰ MÓDOSÍTOTT PETRI-CSÉSZE, BENNE A SZŰRŐKOSÁRKA (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	23
7. ábra SÖTÉT-FÉNY PREFERENCIA TESZT, MEGVILÁGÍTOTT TÉRBEN TARTÓZKODÓ LÁRVÁK SZÁMA (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	23
8. ábra 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK MIKROSKÓPPAL KÉSZÍTETT KÉPE, KÜLÖNBÖZŐ ACE-K KONCENTRÁCIÓNAK KITÉVE (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	26
9. ábra AZ ACESZULFÁM-KÁLIUM-EXPOZÍCIÓ 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK MORFOLÓGIÁRA GYAKOROLT HATÁSA. K: KONTROLL; *: STATISZTIKAILAG IGAZOLHATÓ KÜLÖNBSÉG A KONTROLLHOZ VISZONYÍTVA, $P < 0.05$ (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	27
10. ábra AZ ACESZULFÁM-KÁLIUM-EXPOZÍCIÓ 120 ÓRÁS ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK SZEMTERÜLETRE GYAKOROLT HATÁSA. (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA)	28
11. ábra EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ HATÁSA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK KIS, FINOM-MOZGÁSOKKAL MEGTETT ÁTLAGOS TÁVOLSÁGÁRA. K: KONTROLL; A: SÖTÉT PERIÓDUS ELŐTTI SZAKASZ; B: FÉNY-SÖTÉT ÁTMENETET KÖVETŐ PERC; *: STATISZTIKAILAG IGAZOLHATÓ KÜLÖNBSÉG $P < 0,05$ (FORRÁS: SAJÁT	29
12. ábra EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ HATÁSA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK, NAGYOBB, DURVA MOZGÁSOKKAL MEGTETT ÁTLAGOS TÁVOLSÁGÁRA. K: KONTROLL; A: SÖTÉT PERIÓDUS ELŐTTI SZAKASZ; B: FÉNY-SÖTÉT ÁTMENETET KÖVETŐ PERC; *: STATISZTIKAILAG IGAZOLHATÓ KÜLÖNBSÉG $P < 0,05$ (FORRÁS: Saját készítésű ábra).....	30
13. ábra EMBRIONÁLIS ACE-K-EXPOZÍCIÓ HATÁSA A ZEBRADÁNIÓ LÁRVÁK SÖTÉT-FÉNY PREFERENCIÁJÁRA, K: KONTROLL (FORRÁS: SAJÁT KÉSZÍTÉSŰ ÁBRA).....	32

Nyilatkozatok

Hallgatói nyilatkozat

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Lorx Nikolett

A Hallgató Neptun kódja: 59PMTU

A dolgozat címe: Az acetylcholin-esteráz inhibitorok hatásmechanizmusának vizsgálata kelbroaduicinnal

A megjelenés éve: 2025.

A konzulens intézetének neve: Állatokultúra és Környezetbiológiai Intézet (Daniczenic)

A konzulens tanszékének a neve: Környezettoxikológiai Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2025. év 10 hó 30 nap

[Signature]
Hallgató aláírása

Konzulensi nyilatkozat

MATE Szervezeti és Működési Szabályzat
III. Hallgatói Követelményrendszer
III.1. Tanulmányi és Vizsgaszabályzat
6.13. sz. függeléke: A MATE egységes szakdolgozat /
diplomadolgozat / záródolgozat / portfólió készítési útmutatója
4.1. sz. melléklete: Konzulensi nyilatkozat

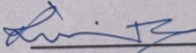
NYILATKOZAT

Lovx Nikolett (név) (hallgató Neptun azonosítója: S9PMTU)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő
védésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: 2025. év 10. hó 30. nap


belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.
² A megfelelő aláhúzendő.
³ A megfelelő aláhúzendő.

Konzulensi nyilatkozat 2.

MATE Szervezeti és Működési Szabályzat
III. Hallgatói Követelményrendszer
III.1. Tanulmányi és Vizsgaszabályzat
6.13. sz. függelék: A MATE egységes szakdolgozat /
diplomadolgozat / záródolgozat / portfólió készítési útmutatója
4.1. sz. melléklete: Konzulensi nyilatkozat

NYILATKOZAT

Lorx Nikolett (név) (hallgató Neptun azonosítója: S9PMTU)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő
védésre **javaslom / nem javaslom**².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: 2025. év 10. hó 30. nap

B-A
belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.

--	--	--	--

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....
.....
.....
.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: Erd....., 2025. november hó 1... nap

Erd
.....

Hallgató aláírása

[Signature]
.....

Konzulens/Témavezető aláírása