



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**TRICHOTECÉNVÁZAS MIKOTOXINOK HATÁSA A GLUTATION REDOX
RENDSZER SZABÁLYOZÁSÁRA**

Doktori értekezés

Pelyhe Csilla

Gödöllő

2017

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Dr. Kovács Balázs

tudományos főmunkatárs, PhD

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

.....

A programvezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

.....

A társ-témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	I
Rövidítések jegyzéke.....	IV
1 BEVEZETÉS ÉS PROBLÉMAFELVETÉS	1
2 CÉLKITŰZÉSEK	2
3 SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
3.1 A trichotecénvázás mikotoxinok általános jellemzői	3
3.1.1 A T-2 toxin és a DON toxikokinetikai jellemzői	5
3.1.2 A T-2 toxin és DON hatásai az állati szervezetre (toxikodinámiai jellemzők).....	6
3.1.3 A T-2 toxin és a DON kapcsolata a ROS képzés indukciójával és az oxidatív stresszel	9
3.2 Az oxidatív stressz kialakulása, befolyásolása, hatása és molekuláris jellemzői.....	12
3.2.1 Az alacsony szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók.....	14
3.2.2 A közepesen magas szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók.. ..	17
3.2.3 A magas szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók	17
3.2.4 Mikotoxinok hatása az Nrf2-ARE útvonalon.....	17
3.3 A szervezet antioxidáns rendszerének bemutatása	18
3.3.1 A biológiai antioxidáns rendszer.....	18
3.3.1.1 Az első védelmi vonal.....	18
3.3.1.2 A második védelmi vonal	20
3.3.1.3 A harmadik védelmi vonal.....	21
3.3.2 A szelenoproteinek molekuláris biológiai jellemzői.....	21
3.3.3 A GPx enzim család	23
4 ANYAG ÉS MÓDSZER	29
4.1 Mikotoxinok termeltetése és a kísérletesen szennyezett takarmányok elkészítése	29
4.1.1 Mikotoxinok termeltetése.....	29
4.1.2 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése.....	29
4.1.3 A takarmányok mikotoxin tartalmának meghatározása és annak módszere.....	30
4.2 Kísérleti állatok/kísérleti protokollok.....	30
4.2.1 A vizsgálat helyszíne.....	30
4.2.2 Kísérleti állatok és tartásuk – pontyok	30
4.2.3 Kísérleti állatok és tartásuk – brojlercsirkék	31
4.3 Mintavételezés	32

4.3.1	Pontyokkal végzett vizsgálatok.....	32
4.3.2	Brojlercsirkékkel végzett vizsgálatok	32
4.4	Biokémiai módszerek.....	32
4.4.1	A lipidperoxidációs markerek mérési módszerei.....	32
4.4.1.1	A konjugált dién és -trién tartalom meghatározása	32
4.4.1.2	A malondialdehid koncentráció mérése.....	32
4.4.2	A glutation redox rendszer tagjainak mérési módszerei	33
4.4.2.1	Redukált glutation koncentráció meghatározása	33
4.4.2.2	A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása.....	33
4.4.2.3	A fehérjekoncentráció mérése	33
4.5	Génexpressziós vizsgálatok.....	34
4.5.1.1	RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR.....	34
4.5.1.2	Real-time PCR vizsgálatok pontyban	34
4.5.1.3	Real-time PCR vizsgálatok házityúkban	35
4.5.2	Real-time PCR eredmények kiértékelése.....	36
4.5.3	Statisztikai értékelés.....	36
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	37
5.1	Pontyokkal végzett kísérlet eredményei.....	37
5.1.1	A pontyokkal végzett kísérletben megállapított tranzitidő	37
5.1.2	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a pontyokra.....	37
5.1.2.1	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a mortalitásra	37
5.1.2.2	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása lipidperoxidációs paraméterekre a májban	37
5.1.2.3	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer paraméterekre a májban	39
5.1.2.4	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására.	40
5.1.2.5	Megbeszélés.....	43
5.1.3	Rövidtávú DON terhelés hatása a pontyokra	52
5.1.3.1	Rövidtávú DON terhelés hatása a mortalitásra.....	52
5.1.3.2	Rövidtávú DON terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban	52
5.1.3.3	Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban ...	54
5.1.3.4	Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására ...	55
5.1.3.5	Megbeszélés.....	58
5.2	Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletek eredményei	65
5.2.1	Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletben megállapított tranzitidő	65

5.2.2	Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletek során megállapított takarmányfelvétel.....	65
5.2.3	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása 1 hetes brojlercsirkékre	65
5.2.3.1	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban	66
5.2.3.2	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban .	68
5.2.3.3	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására .	69
5.2.3.4	Megbeszélés.....	71
5.2.4	Rövidtávú DON terhelés hatása az 1 hetes brojlercsirkékre	76
5.2.4.1	Rövidtávú DON terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban	76
5.2.4.2	Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban ...	78
5.2.4.3	Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban	79
5.2.4.4	Megbeszélés.....	81
5.2.5	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása 3 hetes brojlercsirkékre	84
5.2.5.1	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban	84
5.2.5.2	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban .	86
5.2.5.3	Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására .	87
5.2.5.4	Megbeszélés.....	89
5.2.6	Rövidtávú DON terhelés hatása 3 hetes brojlercsirkékben	94
5.2.6.1	Rövidtávú DON terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban	94
5.2.6.2	Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban ...	96
5.2.6.3	Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására ...	97
5.2.6.4	Megbeszélés.....	99
6	ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	102
6.1	Következtetések.....	102
6.2	Javaslatok.....	105
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	106
8	ÖSSZEFOGLALÁS	107
9	SUMMARY.....	110
	M1 IRODALOMJEGYZÉK	i

Rövidítések jegyzéke

β -TrCP	<i>β-transducin repeat containing protein</i>
3'-OH-T-2	3'-hidroxi-T-2 toxin
AIF	Apoptózis indukáló faktor
AKT	Protein kináz B
ALP	Alkalikus foszfatáz
ALT	Alanin-aminotranszferáz
ANOVA	Variancia analízis - <i>Analysis of variance</i>
ARE	Antioxidáns válaszelem – <i>Antioxidant Response Element</i>
AST	Aszpartát-aminotranszferáz
Bac	β -aktin
BTB	Broad komplex - <i>Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac</i>
CAT	Kataláz
CBP	CREB-kötő fehérje - <i>CREB-binding protein</i>
CTR	Karboxil-terminális régió
CD	Konjugált diének
cDNS	Komplementer DNS
cGPx4	Citoszol glutation-peroxidáz4
Cry	Kriptokróm gén
CsMBE	CNC-sMaf-kötő elem
CT	Konjugált triének
Ct	Küszöb ciklus
CYP1A4	Citokróm P450 1A4
CYP1A5	Citokróm P450 1A
CYP450 2F2	Citokróm P450 2F2
Cys	Cisztein
D3G	Deoxinivalenol-3- β -D-glükózid
DAS	Diacetoxiszcirpenol
DGR	Kettős glicin ismétlődő domén - <i>Double glycine repeat domain</i>
DHA	Dokozahexaénsav
DLGex	<i>Extended DLG tripeptide</i>
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DOM-1	Deepoxi DON
DON	Deoxinivalenol
DON-3-GlcA	Deoxinivalenol-3- glükuronid
EGF	Epidermális növekedési faktor
EPA	Eikozapentaénsav
EpRE	Elektrofil Válaszelem - <i>Electrophil Response Element</i>
GAPDH	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GCL	γ -glutamil-cisztein ligáz
GCS	γ -glutamil-cisztein-szintetáz
Gpx	Glutation-peroxidáz
GSR	Glutation reduktáz
GSS	Glutation-szintetáz vagy szintáz
GSH	Redukált glutation
GSSG	Glutation-diszulfid
GSK3	Glikogen-szintetáz-kináz 3
GST	Glutation S-transzferáz
HSP	Hősokk fehérjék – <i>Heatshock proteins</i>
IL-10	Interleukin 10
IVR	Közbeeső régió - <i>Intervening region</i>
Keap1 (iNrf2)	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LC ₅₀	Medián letális koncentráció - <i>Median lethal concentration</i>
LcPUFA	Hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak - <i>Long chain polyunsaturated fatty acids</i>
LD ₅₀	Medián letális dózis - <i>Median lethal dose</i>
LOX	Lipoxigenáz
MDA	Malondialdehid
MGB- NFQ	<i>Minor Groove Binder - nonfluorescent quencher</i>
mGPx4	Mitokondriális glutation-peroxidáz4
mRNS	Hírvívó RNS - <i>Messenger RNS</i>
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Neh	<i>Nrf2-ECH homology</i>

NEO	neoszolaniol - <i>Neosolaniol</i>
nGPx4	Nukleáris glutation-peroxidáz4
Niv	Nivalenol
NMD	korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás - <i>Nonsense mediated decay</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor E2-related factor 2</i>
PCR	Polimeráz-lánreakció
Per	Period gének
PHGPx	Foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz (=Gpx4)
PI3K	Foszfatidil inozitol 3 kináz
PUFA	Többszörösen telítetlen zsírsavak - <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
qPCR	Real-time PCR
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reaktív oxigén szabadgyökök
RQ	Relatív kvantifikáció
SCN	Szuprachiasmatikus mag - <i>Suprachiasmaticus nucleus</i>
Se	Szelén
Sec	Szelenocisztein
SECIS	<i>Selenocysteine insertion sequence</i>
SMCP	Spermium mitokondriumhoz kapcsolódó ciszteinben gazdag fehérje – <i>Sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein</i>
SOD	Szuperoxid dizmutáz
TNF- α	Tumor nekrosis faktor alfa
tRNS	Transzfer RNS
TTFL	Transcripció/transzlációs szabályzók - <i>Transcriptional-translational feedback loop</i>
UTR	Nem transzlálódó régió - <i>Untranslated region</i>

1 BEVEZETÉS ÉS PROBLÉMAFELVETÉS

A takarmányozás elsődleges célja, hogy kiegyensúlyozott táplálóanyag ellátottságot biztosítson az állatok számára, így megfelelő alapot szolgáltatson az életfenntartáshoz, a növekedéshez és a szaporodáshoz. A gabonafélék a monogasztrikus gazdasági állataink legfőbb, kérődző állatainknak pedig fontos takarmány alapanyagai, melyekkel azonban toxikus anyagok is kerülhetnek a takarmányokba.

A trichotecénvázas mikotoxinok a *Fusarium* penészgomba fajok másodlagos anyagcsere termékei. Gazdasági jelentőségük és gyakorlati előfordulásuk alapján ennek a mikotoxin családnak a legnagyobb jelentőségű tagjai a deoxinivalenol (DON) és a T-2 toxin, valamint azok toxikus metabolitjai.

Toxikus hatásairól már számos ismerettel rendelkezünk, amelyek az egyes biológiai folyamatok, valamint az azokat szabályozó mechanizmusok paramétereiben bekövetkező változásokon alapulnak, ezek jelentős része azonban vagy *in vitro* modellekkel végzett vizsgálatokon, vagy *in vivo*, de általában szubletális, hosszan tartó mikotoxin terhelések eredményein alapulnak.

A T-2 toxin és a DON hatásaival, ezen belül kiemelten a szabadgyök képződéssel járó folyamatokra, valamint a szervezet antioxidáns védőrendszerére gyakorolt hatásaik mechanizmusával kapcsolatban még számos kérdés vár megválaszolásra. A hosszan tartó mikotoxin terhelést követően mért biokémiai változások csak egy folyamat végső állapotát jelzik, amelynek során egyre fokozódó mértékű károsodás, vagy adaptáció egyaránt előfordulhat.

Fontos kérdés, hogy a T-2 és a DON mikotoxinok takarmányokkal történt felvételét követően mennyi idővel váltanak ki toxikus hatásokat. Ezen belül milyen mértékben indukálnak oxidatív stresszt, illetve az antioxidáns rendszer biokémiai és molekuláris markerei milyen sorrendben és mértékben indukálódnak. Egyértelmű válasz jelenleg még nem adható ezekre a kérdésekre.

Ezen túlmenően, a mikotoxinok, így a T-2 toxin és a DON halak, illetve madarak szervezetére kifejtett rövidtávú hatásai jelenleg még csak kevésbé ismertek, így kísérleteimhez modell szervezetként a gazdasági szempontból fontos ponty és házityúk fajokat választottam.

Az általam elvégzett vizsgálat sorozat célja a fentiek alapján annak feltárása volt, hogy eltérő mértékű *per os* mikotoxin terhelés során a lipidperoxidáció és az antioxidáns védőrendszer egyes tagjai, valamint a xenobiotikum transzformáló rendszer milyen mértékben, és kiemelten milyen egymást követő lépések során, aktiválódik, vagy merül ki. Ezeket a folyamatokat enzim/fehérje, illetve génexpressziós szinten is vizsgáltam pontyok és brojlercsirkék szervezetében rövidtávú mikotoxin terhelés során.

2 CÉLKITŰZÉSEK

1. Vizsgálataim fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljam egyes trichotecénvázis mikotoxinok (T-2 toxin és DON) hatását a lipidperoxidációs folyamatokra, valamint a glutation redox rendszer egyes elemeinek változására, valamint azok szabályozására a terhelést követő első 24 órában két eltérő élettani sajátosságokkal rendelkező állatfajban, a pontyban és a brojlercsirkében.
2. A brojlercsirkékkel végzett vizsgálatok esetében további célom volt felmérni az általam vizsgált paraméterek változásainak életkorral összefüggő eltéréseit azonos mértékű mikotoxin terhelés mellett.
3. Célom volt felmérni a takarmányrészek áthaladásának tranzit idejét a bélcsatornában, amely befolyásolja a mikotoxinok bélcsatornából való felszívódására rendelkezésre álló időtartamot, ennek alapján pedig összefüggéseket keresni az általam vizsgált paraméterek értékeiben észlelt változások és a mikotoxinok felszívódását követő idő között.
4. A vizsgálatok eredményei alapján további célom volt annak felmérése, hogy az általam vizsgált mikotoxinok hatására a májban keletkező reaktív oxigén gyökök a szennyezett takarmány felvételét követően előidézik-e lipidperoxidációs folyamatokat, illetve ezek hatására milyen időintervallumban és milyen sorrendben aktiválódnak a glutation redox rendszer egyes elemei mRNS és fehérje/tripeptid szinten.

A fenti célok eléréséhez az alábbi kísérleteket állítottam be, és paraméterek vizsgálatát végeztem el:

- I. Egyszeri, szubletális T-2 toxin vagy DON rövidtávú (24 órás) hatásának felmérése egynyaras pontyok májában:
 - a) a lipidperoxidációs folyamatok esetén az iniciációs szakasz markereinek (konjugált diének (CD) és konjugált triének (CT)), valamint a terminációs szakasz metastabil végtermékének (malondialdehid (MDA)) mennyiségére;
 - b) a biológiai antioxidáns rendszer működését jelző paraméterek változására (glutation-peroxidáz (GPx) aktivitás, redukált glutation (GSH) tartalom),
 - c) továbbá, a foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidázt kódoló gének (glutation-peroxidáz 4 a és b (*Gpx4a* és *Gpx4b*)), valamint a Keap1/Nrf2-ARE (*kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor E2-related factor 2*/antioxidáns válaszelem) útvonal transzkripció faktorait kódoló egyes gének (*Keap1*, *Nrf2*) expressziós változásaira.
- II. Rövidtávú (24 órás), szubletális T-2 toxin vagy DON hatásának felmérése eltérő életkorú (1 és 3 hetes) brojlercsirkék májában:
 - a) a lipidperoxidációs folyamatok esetén az iniciációs szakasz markereinek (CD és CT), valamint a terminációs szakasz metastabil végtermékének (MDA) mennyiségére;
 - b) a biológiai antioxidáns rendszer működését jelző paraméterek változására (GPx aktivitás, GSH tartalom),
 - c) valamint a glutation redox rendszer egyes elemeit kódoló gének (glutation-peroxidáz 4 (*Gpx4*), glutation-szintetáz (*Gss*), glutation-reduktáz (*Gsr*)) expressziós változásaira

3 SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A trichotecénvázas mikotoxinok általános jellemzői

A mikotoxinok egyes fonalas gombák másodlagos metabolizmus termékei (Berthiller et al., 2013), amelyek a takarmányokat, ezen belül különösen a gabonaféléket (Selma és Gülden 2008), szennyezik. Ezáltal a gazdasági állatoknál dóziszfüggő mértékben termelés kiesést, illetve toxikus válaszreakciót váltanak ki (Diaz 2005). Jellemzően hőstabil vegyületek, tehát a hagyományos takarmányipari műveletek során alkalmazott kezeléseknek ellenállnak (Szigeti 1997).

A trichotecénvázas mikotoxinokat termelő *Fusarium* penészek általában hűvös és párás környezetben (Wood 1992), a jelenlévő oxigén mennyiségétől, illetve a gabonában jelenlévő szubsztrátoktól (pl. keményítő) függően (Kovács 2010), számos, eltérő kémiai struktúrával rendelkező trichotecénvázas vegyületet termelhetnek. Az egyes *Fusarium* fajok/törzsek mikotoxin termelését, az határozza meg, hogy genetikai állományukban jelen vannak-e, illetve bizonyos külső környezeti hatásokra aktiválódnak-e, az adott mikotoxinok termelésért felelős gének (Kimura et al., 2003). Ezek a toxinogén fajok/törzsek képesek mikotoxin-szintézisre (Desjardins et al., 1993). A mikotoxinok, mint a másodlagos anyagcsere folyamatok termékei nem esszenciálisak a penészgombák növekedéséhez, azok termelődését jellemzően valamilyen környezeti stresszhatás, pl. hőstressz, indukálja (Schmidt-Heydt et al., 2008). A trichotecénvázas mikotoxinokat négy kategóriába sorolják a kémiai funkciós csoportjaik szerinti hasonlóság alapján (1. táblázat) (McCormick et al., 2011). Az „A” típusú trichotecénvázas mikotoxinok közé tartozik a T-2 toxin (legfontosabb termelő penészgomba fajok: *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. graminearum*), míg a deoxinivalenol (DON) „B” típusú (legfontosabb termelő penészgomba fajok: *F. graminearum*, *F. culmorum*) mikotoxin (Moss, 2002). A „C”, valamint a makrociklusos „D” típusú trichotecénvázas mikotoxinok gazdasági szempontból kisebb jelentőségűek, és ezeket jellemzően más penészgomba fajok termelik (pl. *Stachybotris chartarum*, *Stachybotrys alternans*, *Myrothecium verrucaria*, *Myrothecium roridum*) (Grove 1993).

A mérsékelt éghajlati égövbe tartozó országokban, így Magyarországon is, a DON a leggyakrabban, és legnagyobb mennyiségben előforduló (Simsek et al., 2013), míg a T-2 toxin a leginkább toxikusnak tartott trichotecénvázas mikotoxin (Bamburg et al., 1968). A T-2 toxin is gyakori, viszont általában sokkal kisebb koncentrációban van jelen a takarmányokban (2. táblázat) (Biomim World Mycotoxin Survey 2015, Binder et al., 2007).

1. táblázat A trichothecénvázis mikotoxinok csoportosítása a trichotecénvázhoz kapcsolódó funkció csoportok elhelyezkedése alapján (McCormick et al., 2011 nyomán)

Típus	„A”	„B”	„C”	„D”
Mikotoxin	T-2 toxin HT-2 toxin T-2 tetraol Neoszolanol (NEO) Diacetoxiszcirpenol (DAS) Trichodermol Trichodermin Izotrichodermol Kalonektrin 7-8-dihidroxi-kalonektrin Harzianum A	Deoxinivalenol (DON) Nivalenol (NIV) Fuzarenon-X Trichothecin Trichothecinol A	Krotocin	Baccharin Roridin A Satratoxin H Verrucarín A

A T-2 toxin és a DON főképp a gabonafélékben, valamint ezek feldolgozott termékeiben (maláta, sör, kenyér stb.) fordulnak elő (Selma és Gülden 2008).

Annak ellenére, hogy ezek a mikotoxinok nagy gyakorisággal, és esetenként nagy mennyiségben fordulnak elő a gabonamagvakban, a trichothecénvázis mikotoxinokra vonatkozóan az Európai Unió a takarmány alapanyagokban és teljesértékű keveréktakarmányokban csak javasolt határértéket határozott meg. A teljesértékű keveréktakarmányok esetében ez 0,25 mg T-2 és HT-2 toxin/kg és 5 mg/kg DON (2. táblázat) (European Commission 2013, Biomin World Mycotoxin Survey 2015).

2. táblázat A szennyezések gyakorisága és mértéke a legfontosabb mikotoxinok esetén – Európa (Biomin World Mycotoxin Survey 2015 alapján)

AFB1: aflatoxin B1; ZEN: zearalenon; DON: deoxinivalenol; T-2: T-2 toxin FUM: fumonizin; OTA: ochratoxin A

	AFB1	ZEN	DON	T-2	FUM	OTA
Vizsgált minták száma (db)	1163	2894	3684	2051	1543	1188
Szennyezett minták aránya (%)	11	64	77	42	54	26
A szennyezések mértékének átlaga (µg/kg)	6	213	1288	25	898	7
A szennyezések maximum értéke (µg/kg)	153	8888	34861	685	15383	150
EU javasolt határérték teljes értékű takarmányokban (µg/kg)	20	2000	5000	250	20000	250

3.1.1 A T-2 toxin és a DON toxikokinetikai jellemzői

A gazdasági állatok jellemzően „per os”, a takarmánnyal, veszik fel a mikotoxinokat, ugyanakkor már a bőrrel való érintkezés révén is felmaródásokat és lokális gyulladást indukálhatnak (dermatotoxikus hatás), amely elsősorban a száj környékét, a száj nyálkahártyáját és a gasztrintesztinális rendszert érinti (Nesic et al., 2014). A mikotoxinokat tartalmazó por belégzése révén azonban az állatok tüdejében is kialakulhat gyulladás (Wong et al., 2016). Ez viszont nehezen különíthető el a belélegzett fizikai részecskék penészgomba tartalmától, azok micéliuma által előidézett gyulladós folyamatoktól (Pauly et al., 2011).

A T-2 toxin, mint lipofil karakterű molekula, könnyen átjut a membránokon (Gyongyossy-Issa et al., 1984). A gyomorból csak kismértékben (Ellison és Kotsonis, 1974; Beasley et al., 1986), a vékonybélből viszont rövid idő alatt és hatékonyan felszívódik. Sertésekben például kimutatták, hogy a takarmányfelvételt követően kevesebb, mint 20 perc múlva már kimutatható mennyiségben volt jelen a vérben (Eriksen és Petterson, 2004). Vemhes emlősállatoknál a placentán is átjuthat úgy a T-2, vagy annak aktív metabolitja a HT-2 toxin is (Wang et al., 2014). A DON kevésbé hidrofób karaktere miatt elsősorban a paracelluláris útvonalon (a sejtközötti téren át) és passzív transzport révén szívódik fel a vékonybélből (Sergent et al., 2006), a takarmányfelvételt követően azonban már 15-30 perccel kimutatható volt a vérből (Eriksen és Petterson, 2004). A DON biológiai felezési ideje rövid, sertésben mindössze 4 óra (Prelusky et al., 1988). A T-2 toxin biológiai felezési-ideje még kevesebb, átlagosan 20 perc, azonban annak 80%-a HT-2 toxinná alakul, ami hasonló toxicitású (SCF, 1999). Brojlerscirkekkel végzett vizsgálatokban megállapították, hogy a takarmánnyal felvett T-2 és HT-2 toxin a bélcsatornából gyorsan felszívódik, majd elsősorban a májban metabolizálódik, és 24-48 órán belül a xenobiotikum transzformáló rendszer gyakorlatilag teljes mértékben eliminálja (Rizzo et al., 1994).

A T-2 toxint a fázis I. enzimek (reaktív és poláros aktív csoportokkal rendelkező enzimek; pl citokrom P450 enzim család) kevésbé hidrofób karakterű molekulává alakítják redukció, oxidáció, hidrolízis, hidroxiláció, és egyéb detoxifikációs folyamatok során (Wu et al., 2010). A T-2 toxin, de főképp a DON, metabolizmusa, elsősorban de-epoxidációja, már a bélcsatornában megkezdődhet egyes mikrobiális enzimek hatására (Swanson et al., 1988). A DON-t de-epoxi DON-ná (DOM-1) a T-2 toxint pedig egyéb deepoxi-metabolitokká alakítják (Young et al., 2007).

A mikrobiális de-epoxidáció hatékonysága azonban az egyes állatfajok között jelentősen eltérő, így például a különböző halfajok közül egyedül a barna törpeharcsa (*Ameriurus nebulosus*) bélcsatornájából izolált mikrobiális közösség volt képes a DON-t átalakítani DOM-1-é (Guan et al., 2009). A halfajok mellett egyéb állatfajok között is nagyfokú eltérések lehetnek (Horvath és Varga, 1961; Anater et al., 2016) a T-2 toxin és a DON bélcsatornában lezajló detoxifikációjával kapcsolatban. Patkányokkal és csirkékkel végzett vizsgálatokban, a DOM-1 mellett, egyéb DON metabolitokat is találtak (Wan et al., 2014), így például DON-10-szulfonátot, DON-3-glükoronidot, DON-3-szulfátot, és DOM-1-10-szulfonátot is. A DON-10-szulfonát és a DOM-1-10-szulfonát metabolitokat azonban csak patkányban, míg a DON-3-szulfátot csupán csirkékben lehetett kimutatni (Wu et al., 2011).

Brojlerscirkek esetében a T-2 toxin fő metabolikus útvonala a hidrolízis, amelyet, elsősorban a májban, a fázis II. enzimek (bioszintetikus konjugációt végző enzimek) katalizálnak. A trichotecének fő metabolikus útvonala a de-epoxidáció és a deacetiláció. A folyamat eredményeképpen a T-2 toxin főbb metabolitjai a HT-2, T-2 triol, T-2 tetranol, 3-hidroxi T-2 és 3-hidroxi HT-2, míg a DON fő metabolitjai a DOM-1 és a deepoxi-nivalenol (Wu et al., 2010).

Pontyoknál a metabolitok között a HT-2 toxin a kimutathatósági határérték alatt volt a máj mikroszómákban, ugyanakkor jelentős mennyiségben találtak 3'-OH-T-2 toxint. Ezen eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a halak xenobiotikum transzformáló folyamatai között a hidrolízis nem tölt be olyan fontos szerepet, mint a szárazföldi állatoknál, sőt pontynál egyéb metabolikus útvonalat is leírtak (Wu et al., 2014b).

A mikotoxinok a fázis II enzimek (pl. glutation-S-transzferázok, GST) hatására konjugáció (glutation-, glükoronsav- stb.) révén részben az epével (Corley et al., 1985), részben a bélsárral, valamint a vizelettel, illetve halak és madarak esetében az ürülékkel ürülnek (Swanson és Corley, 1989). Szakirodalmi adatok szerint a halak szervezetében a trichotecénvázas mikotoxinok fő transzformációs és konjugációs útvonalai jellemzően eltérnek a szárazföldi állatokétól (Wu et al., 2011; Maul et al., 2012; Uhlig et al., 2013).

A penészgombával fertőzött növényekben is végbemegy a xenobiotikum-transzformáció, amelynek eredményeként a mikotoxinok egy része detoxifikálódik. Az állati szervezethez hasonlóan, a fázis II. enzimek segítségével, glükóz- vagy malonsav-konjugáció következik be, majd a konjugátumokat vakuólumokban (sejten belül) vagy az apoplastba (sejtközzötti tér), transzportálják. Ezáltal úgynevezett „maszkolt” mikotoxinokat (pl. deoxynivalenol-3- β -D-glükozid (D3G), T-2 toxin-glükozid) hozva létre. A növényi szövetekben elraktározott „maszkolt” mikotoxinokat viszont az állatok a takarmánnyal együtt felveszik és a kötésekből a bélrendszer enzimjeinek hatására a mikotoxinok részben felszabadulnak majd felszívódnak (Berthiller et al., 2013).

3.1.2 A T-2 toxin és DON hatásai az állati szervezetre (toxikodinámiai jellemzők)

A trichotecénvázas mikotoxinok hatásait számos tényező befolyásolja, így az adott állat faja, fajtája, ivara, kora, takarmányozási és egészségi állapota, a tartási körülmények, továbbá a mikotoxin típusa, az expozíció ideje és egyidejűleg más (toxikus) anyagok jelenléte (Anater et al., 2016). A különböző állatfajoknál jelentős különbséget mutattak ki a mikotoxinok felszívódásának mértékében, azok szervezeten belüli eloszlásában, metabolizmusában és kiválasztásában is (Wu et al., 2011; Maul et al., 2012). A trichotecénvázas mikotoxinok tekintetében a gazdasági állatfajok érzékenysége alapján az alábbi rangsor állítható fel: sertés>baromfifajok>kérődzők (Eriksen, 2003). A baromfiféléken belül az érzékenységi rangsor: lúd>kacsa>házityúk (Mézes et al., 1998).

A T-2 toxin LD₅₀ értéke 1 napos brojlersirkénél 4,97 mg/kg testtömeg, míg ennek értéke a T-2 toxin egyik fő metabolitja, a T-2 tetraol, esetében már 33,79 mg/kg testtömeg. DON esetén az LD₅₀ értéke brojlersirkénél 140 mg/kg testtömeg (Huff et al., 1981).

Halaknál a DON-ra és T-2 toxinra vonatkozóan a szakirodalomban nem található LD₅₀ érték (Pietsch és Hirsch, 2015). Azonban a T-2 toxin esetén egy halfajra, a szúnyogírtó fogaspontyra (*Gambusia affinis*) vonatkozóan találtam adatot, ahol LC₅₀ értéként 147 μ g/L koncentrációt adtak meg (McKean et al., 2006).

A T-2 toxin és a DON halak szervezetére kifejtett hatásai jelenleg még kevésbé ismertek. Az egyes halfajokra vonatkozóan a következő érzékenységi sorrendet állították fel: szivárványos pisztráng>ponty>harcsafélék (Anater et al., 2016). Az egyes halfajok közötti különbségek az érzékenység tekintetében nagymértékűek, ami főképp az adott mikotoxin típusától függ (Guan et al., 2009).

A trichotecénvázas mikotoxinok gazdasági állatoknál általában csak szubkrónikus és szubklinikai tüneteket idéznek elő, így például növekedésbeli lemaradást, takarmány-visszautasítást, csökkent takarmány-értékesülést és emiatt csökkent termelést, növekvő mértékű mortalitást, illetve fokozott

érzékenységet a fertőző betegségekkel szemben. Amennyiben klinikai tünetek is megjelennek, azok hányásban, hasmenésben, bányadságban, csökkent immunválasz készségben, rossz spermaminőségben, alacsony keltethetőségben, és főképp halaknál, anémia formájában nyilvánulnak meg (D’Mello et al., 1999, Eriksen és Petterson, 2004; Matejova et al., 2016). Ezen tünetek többségét halaknál (Anater et al., 2016) és baromfi fajoknál egyaránt megfigyelték (Sokolovic et al., 2008; Awad et al., 2013).

Brojlersirkéknél a trichotecénvázis mikotoxinok főképp nem specifikus hatásokat fejthetnek ki. Így például a szakirodalomban genotoxikus, citotoxikus, immunmoduláns hatásokat egyaránt leírtak. Emellett azonban negatív hatást gyakorolnak az emésztőrendszerre, a májra és az idegrendszerre, emiatt csökkentik a termelési paramétereket (Sokolovic et al., 2008). Halaknál ugyanakkor a mikotoxinok, így a trichotecénvázis mikotoxinok, hatásairól jelenleg még csak kevés adat áll rendelkezésre (Anater et al., 2016).

Baromfifélékben a T-2 toxikózis első tünetei a csökkenő takarmányfelvétel, emiatt a testtömeg gyarapodás és a növekedési intenzitás csökkenése (Chi et al., 1978; Wyatt et al., 1973b; Hoerr, 2003). Tojótúkoknál csökken a tojástermelés (Tobias et al., 1992), romlik a tojáshéj minősége és a keltethetőség mértéke (Chi et al., 1978; Wyatt et al., 1973b).

Halaknál, így például zebradánióánál (*Danio rerio*), a DON terhelés kétfázisú hatást vált ki a termékenyülésben. Alacsony dózisok mellett mérsékelten ugyan, de javult a termékenyülés, sőt még a lárvák úszási aktivitásában is nagyobb értékeket tapasztaltak (Sanden et al., 2012). Baromfi fajokhoz hasonlóan különböző halfajoknál is megfigyelték a takarmányfelvétel, a testtömeg gyarapodás és a növekedési intenzitás csökkenését mind a T-2 toxin, mind pedig DON felvételét követően. Ilyen hatást írtak le szivárványos pisztrágnál (*Oncorhynchus mykiss*) (Poston et al., 1983; Woodward et al., 1983; Hooft et al., 2011) és atlanti lazacnál (*Salmo salar*) (Döll et al., 2010), a ponty esetében viszont ezeket a hatásokat nem észlelték (Pietsch et al., 2014a,b). Egy közleményben azonban leírták, hogy a T-2 toxinnal szennyezett takarmánnyal szemben a pontyok kisebb érdeklődést mutattak (Matejova et al., 2016). Az egyes vizsgált halfajok közül a szivárványos pisztráng tűnik a leginkább érzékenynek a DON iránt, mivel már 20 mg DON/kg takarmány koncentráció esetén is teljes takarmány-visszautasítást figyeltek meg (Woodward et al., 1983). Ugyanakkor, 10 mg DON/kg takarmány szennyezettségi szint mellett semmilyen hatás nem volt megfigyelhető a pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*) takarmányfogyasztására, növekedésére, vérparamétereire és a máj tömegére (Manning et al., 2014). Ebből is jól látható, hogy jelentős különbségek vannak az egyes halfajok mikotoxinokkal szembeni érzékenységében. A különböző mikotoxinok iránti érzékenységben fennálló különbségeket jól jellemzi, hogy amennyiben pettyes harcsával T-2 toxinnal szennyezett takarmánnyal etettek 0,625-5 mg/kg takarmány koncentrációban, akkor annak hatására dózisfüggő mértékben csökkent a növekedés, sőt 2,5 mg T-2 toxin/kg takarmány koncentráció felett már jelentősen nőtt a mortalitás is (Manning et al., 2003). Pontynál (*Cyprinus carpio*) is hasonló változásokat figyeltek meg az említett paraméterekben 0,52 vagy 2,45 mg T-2 toxin/kg takarmány etetésének hatására (Balogh et al., 2009).

A trichotecénvázis mikotoxinok elsődleges hatása, hogy az eukarióta sejtekben gátolják a fehérje- és DNS szintézist (Holladay 1995). A fehérje szintézis gátlása a riboszómák szintjén valósul meg, ahol annak mindhárom fő szakaszát (iniciáció, elongáció és termináció) gátolják (Cundliffe et al., 1974; Sokolovic et al., 2008). Az epoxi gyűrű ugyanakkor szerkezeti felépítése miatt emellett

közvetlenül is képes kötődni a fehérjékhez (Cundliffe et al., 1977; Awad et al., 2013) gátolva azok funkcióját.

Fehérje szintézist gátló hatásuk miatt a vérképző és lymphoid szövetek különösen érzékenyek a trichotecénavázás mikotoxinokra (Ueno et al., 1983). Ez a háttere annak, hogy a T-2 toxin vagy a DON jól ismert immundepresszív, illetve immunszuppresszív vegyületek (Kidd et al., 1995). A hatás azonban függ az alkalmazott dózistól és az expozíció időtartamától (Pestka et al., 2004, Awad et al., 2013), így például kis dózisban immunstimuláns hatásukat is kimutatták, az immunrendszer egyes elemeinek génexpressziója és poszt-transzlációs modifikációjának indukálása révén (Dong et al., 1994; Warner et al., 1994; Pestka et al., 2004). Annak ellenére, hogy az „A” típusú trichotecének jelentősen kisebb immunotoxicitással bírnak, mint a „B” típusúak (Sharma, 1993), T-2 toxikózis során nekrozist és lymphoid sejt depléciót is leírtak brojlercsirkék thymusában, lépében és nyirokcsomóiban (Wyatt et al., 1973b; Boonchuvit et al., 1975, Hoerr, 2003). Emellett, *Salmonella* fertőzés esetén nagyobb mértékű mortalitást is tapasztaltak T-2 toxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó brojlercsirkéknél (Hoerr et al., 1982, Ziprin és Elissalde 1990), valamint alacsony antitest títert határoztak meg Newcastle betegség és fertőző bursitis elleni vakcinázást követően (Kamalavenkatesh et al., 2005, Girish és Devegowda, 2006; Weber et al., 2006). A DON toxikus hatásai közül ugyanakkor az immuntoxicitást tartják a legjelentősebbnek (Bondy és Pestka, 2000). Ezt támasztja alá, hogy DON terhelés esetén kacsáknál csökkent a *Bursa Fabricii* mérete és degradálódott annak szöveti szerkezete is, ami kihatott az antitest termelésre és a betegségekkel szembeni ellenállóképességre is (Feinberg és Mclaughlin, 1989; Dänicke et al., 2004; Kubena et al., 1985). Brojlercsirkékben DON hatására, a T-2 toxinhoz hasonlóan, csökkent a fertőző bronchitis vírus és a Newcastle betegség elleni vakcinázást követően mért antitest titer és emiatt a vakcinázás határfoka (Dänicke et al., 2004; Harvey et al., 1991; Dänicke et al., 2002). Halaknál, egy T-2 toxinnal végzett kísérletben, csökkent hematokrit és hemoglobinszinteket találtak szivárványos pisztrángnál 2,5 mg T-2 toxin/kg takarmány, vagy azt meghaladó szennyezettségi szintek mellett (Poston 1983). Emellett pontyban is csökkent immunválaszt és az immunrendszer sejtjeinek (fehérvérsejt, limfociták, neutrofil granulociták) csökkent számát figyelték meg (Pietsch et al., 2014a; Pietsch et al., 2015; Matejova et al., 2016).

In vitro kísérletekben a trichotecénavázás mikotoxinokkal végzett kezelést követően egér makrofág- és humán sejt vonalakban apoptózist mutattak ki (Yang et al., 2000), csirke lymphocitákban pedig, T-2 toxin hatására, DNS károsodást tapasztaltak (Sokolovic et al., 2007), továbbá apoptózist figyeltek meg brojlercsirkék thymusában (Venkatesh et al., 2005). DON hatására csökkent sejtosztódást, valamint az immunrendszer sejtjeinek nekrozisát és apoptózisát állapították meg (Pestka és Bondy, 1990; Pestka et al., 2004). A vérképzésre kifejtett negatív hatásukat bizonyítja, hogy mindkét trichotecénavázás mikotoxin indukálja a hematopoetikus progenitor sejtek apoptózisát (Parent-Massin 2004). A DON például közvetlenül indukálja a T-sejtek, a B-sejtek és az IgA⁺ sejtek (Pestka et al. 1994), valamint a makrofágok programozott sejthalálát (Zhou és Pestka 2005). Az apoptózis hátterében a fehérjeszintézis gátlása, vagy az oxidatív stressz indukciója miatt bekövetkező DNS-károsodás állhat, amely egyúttal aktiválja a mitokondriális apoptotikus utakat (Zhuang et al., 2013), ugyanakkor csökkenti a citokróm P450 és a glutation-S-transzferáz enzimsalád tagjainak aktivitását, azaz a mikotoxin detoxifikációját (Meissonnier et al. 2008).

A T-2 toxin és a DON a szerotoninerg, valamint a dopamin rendszer működésének megzavarásával (Smith, 1992; Sokolovic et al., 2008), továbbá a sejtek egyes jelátviteli útvonalainak befolyásolásán keresztül neurotoxikus (Prelusky, 1994, Wang et al., 1998) és ezzel összefüggésben emetikus (Fioramonti et al., 1993) hatást fejtenek ki. Brojlerszirkékben csökkent takarmányfelvételt, valamint mozgáskoordinációs zavarokat is megfigyeltek T-2 toxin hatására, a neurotoxicitással összefüggésben (Wyatt et al., 1973a, Wyatt et al., 1973b).

A T-2 toxin és a DON 12,13-epoxi gyűrűs szerkezete kémiaiag különösen reaktív, amely felelőssé tehető azok dermatotoxikus (Ueno, 1977) hatásaiért. Baromfi fajokban, a szájüregben és a csőrökben, felmaródásokat és nekrotikus léziókat figyeltek meg 1 - 5 mg T-2 toxin/kg takarmány dózistartományban, az etetés megkezdését követő egy héten belül (Chi et al., 1978; Brake et al., 2000). A T-2 toxin hatására emellett nekrotikus elhalásokat is megfigyeltek a szájüregben, a zúzógyomorban, a bél nyálkahártyáján és a májban (Ademoyero és Hamilton 1989; Ademoyero és Hamilton 1991; Konjevic et al., 2004). Leírták emellett a tollasodás zavarát is brojlerszirkékben nagymértékű T-2 toxin terhelés mellett (Wyatt et al., 1973b; Hoerr, 2003;). A DON is hasonló elhalásokat idézett elő a nyálkahártya károsítása révén tojótyúkók zúzógyomrában (Lun et al., 1986) és vékonybelében, (Dänicke et al., 2002). Szöveti vizsgálatokkal azt is megállapították, hogy a DON brojlerszirkékben negatív hatással van a gasztrointesztinális rendszer nyálkahártyájára. Így például elhalásokat találtak a bélbolyhok kriptáiban (Awad et al., 2004; Awad et al., 2006; Awad et al., 2011), valamint károsítja az intesztinális epithel sejtek integritását, ennek révén csökkentve a *tight junction* fehérjék hidrofíl molekula-transzportját (Awad et al., 2013).

Szívárványos pisztrángban Hoofft et al. (2011) szövettani elváltozásokat figyeltek meg a májban és a bélben DON terhelés hatására, de hasonló nekrotikus elváltozásokat írtak le pontyok májában és egyéb szöveteiben is (Pietsch et al., 2014b; Pietsch et al., 2015) Leírták továbbá, hogy *in vitro* modellben a DON gátolja egyes hal eredetű sejtvonalak életképességét, csökkenti a membránok integritását, valamint a mitokondriumok és a lizoszómák aktivitását. Az egyes vizsgált sejtvonalak közül a szívárványos pisztráng eredetűek mutatták a legnagyobb fokú érzékenységet a DON iránt (Pietsch et al., 2011). Pontyból származó elsődleges hepatocita sejtvonalban szintén toxikus hatásokat figyeltek meg már 0,5 µg DON/ml koncentrációnál, emellett több mikotoxin együttes vizsgálata során a DON additív hatását is tapasztalták (He et al., 2010).

3.1.3 A T-2 toxin és a DON kapcsolata a ROS képzés indukciójával és az oxidatív stresszel

A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) olyan gyökök vagy molekulák, amelyek minden élő, aerob, szervezetben megtalálhatók (Dickinson és Chang 2011). Közös jellemzőjük, hogy külső elektróhéjukon párosítatlan elektront tartalmaznak, ezáltal reaktívak. Mivel valamely más atomról vagy molekuláról vonnak el elektront, így további gyökképződést indukálnak (Jacob és Burri, 1996). A szervezetben fiziológiás körülmények között is folyamatosan keletkeznek szabadgyökök (Halliwell, 1991; Murphy, 2009), amelynek fiziológiás szinten tartását az antioxidáns rendszer szabályozza (Lien et al., 2008).

Korábban megállapítást nyert, hogy a sejtekben zajló biokémiai változásokkal összefüggésben a trichotecénvázis mikotoxinok hosszú távú hatására fokozódik az állati szervezetben a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása, amely kihat a biológiai antioxidáns rendszer működésére is (Mézes et al., 1998; Surai et al., 2002). A szakirodalomban jelentős számban írtak le összefüggést a trichotecénvázis mikotoxinok és az azok hatására kialakuló oxidatív stressz között (Arunachalam és Doohan, 2013).

A trichotecénvázas mikotoxin-expozíció és a ROS képződés összefüggésével kapcsolatban ugyanakkor megoszlanak a vélemények arról, hogy a mikotoxinok közvetlenül, vagy közvetve, azaz az antioxidáns védőrendszer működésének befolyásolása révén idéznek-e elő oxidatív stresszt (Sudakin, 2003; Jossé et al., 2011; Mishra et al., 2014; Chandratre et al., 2014; Wen et al., 2016). Egyes vizsgálatokban ugyanis nem találtak közvetlen ROS képződést indukáló hatást, sőt egyes esetekben csökkenő mennyiségben találtak ROS vegyületeket a trichotecénvázas mikotoxinokkal összefüggésben (Pietsch et al., 2011; Bin-Umer et al., 2014).

A trichotecénvázas mikotoxinok, szerkezetükből adódóan, azaz az epoxi csoport megléte miatt, reaktívak, ezért képesek ROS képződést indukálni (Chandratre et al., 2014). Emellett közvetett módon is indukálhatnak ROS képződést, azaz oxidatív stresszt, így például a xenobiotikum-transzformáló rendszer (pl. citokróm P450 család) aktivációja (Wen et al., 2016), vagy az általuk indukált gyulladási folyamatok (Fialkow et al., 2007; Osselaere et al., 2013; Wu et al., 2014a) által. A gyulladási folyamatok immunreakciókat is indukálhatnak (Strasser et al., 2013; Pierron et al., 2016), amely szintén fokozhatja a ROS képződést. A mikotoxinok emellett immunszuppresszív hatással is rendelkeznek, amely ez utóbbi folyamatokat befolyásolhatja (Kidd et al. 1995; Pestka et al., 2004).

Brojlercsirkénél számos adattal rendelkezünk a trichotecénvázas mikotoxinokkal összefüggő lipidperoxidációs hatásokról, de jellemzően szubkrónikus expozíciót követően (Smith, 1992; Mézes et al., 1998; Mézes et al., 1999; Surai 2002; Weber et al., 2010). Így például brojlercsirkékben 1,5 mg/kg testtömeg dózisu T-2 toxin hatására emelkedett malondialdehid (MDA) tartalmat mértek a májban 7 napos expozíciót követően (Leal et al., 1999). Ez arra utal, hogy a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása nőtt. Dvorska et al., (2007) szubkrónikus terhelést követően szintén emelkedett MDA tartalmat találtak a májban, amely egyidejűleg az antioxidáns védelmi rendszer csökkent mennyiségével/aktivitásával is társult (Se, α -tokoferol, aszkorbinsav, karotinoidok és redukált glutation (GSH) tartalom, glutation-peroxidáz (GPx) aktivitás). Egy másik vizsgálatban, 6 hetes T-2 toxin-expozíciót követően, oxidatív károsodásokra utaló változásokat észleltek egyes májkárosodást jelző markerek értékeiben (Yang et al., 2016). Csirke hepatocita eredetű sejtvonalakban, *in vitro* modellben, 24 órás T-2 toxin terhelést követően, viszont az antioxidáns rendszer indukációját tapasztalták. Így például nőtt egyes antioxidáns enzimek, a GPx, a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a kataláz (CAT) aktivitása, ugyanakkor csökkent a GSH, de nőtt az MDA tartalom (Yang et al., 2016). Egy másik, *in vitro*, vizsgálatban is kimutatták az oxidatív stressz jelenlétét, szintén csirke eredetű sejtvonalakban (Mu et al., 2013). A szakirodalomban ugyanakkor kevés rövid távú, gazdasági állatokkal végzett, *in vivo* vizsgálati eredmény található, de például egy T-2 toxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó, brojlercsirkékkel végzett, 48 órás kísérletben megállapították, hogy már 12 órával a takarmányfelvételt követően fokozódnak a lipidperoxidációs folyamatok és egyidejűleg nő az antioxidáns rendszer aktivitása (Bócsai et al., 2015).

Ezzel ellentétben, 17 napos expozíció után 10 mg T-2 toxin/kg takarmány vagy 10 mg DON/kg takarmány dózisok mellett nem találtak eltéréseket a lipidperoxidációs folyamatokban, annak ellenére, hogy a DNS töredezettsége már kimutatható volt (Frankic et al., 2006). Ehhez hasonlóan Rezar et al. (2007) sem találtak oxidatív károsodásokat 17 nap után 0,5-13,5 mg T-2 toxin /kg takarmány dózisok mellett. DON esetében is ismertek olyan vizsgálatok, amelyek során DNS károsodást ugyan tapasztaltak, de nem volt szignifikáns mértékű változás a lipidperoxidációs folyamatok intenzitásában (Awad et al., 2011). Egy hosszútávú (28 napos) T-2 toxinnal végzett

kísérletben brojlercsirkéknél szintén nem tapasztalták a lipidperoxidációs folyamatok intenzitásának növekedését és az enzimatikus antioxidáns rendszer is csak mérsékelten aktiválódott, annak ellenére, hogy a termelési paraméterek dózis- és időfüggően romlottak (Balogh et al., 2015).

Egy másik vizsgálat során viszont brojlercsirkékben T-2 toxin expozíció hatására *in vitro* és *in vivo* modellekben egyaránt leírták az antioxidáns védelmi rendszer enzimatikus tagjainak aktivitás növekedését, de emellett a *Gst*, a *Sod*, a *Cat* és a *Gpx* gének expressziójának változását is tapasztalták (Yang et al., 2016). A T-2 toxin emellett indukálta a xenobiotikum transzformáló rendszer elemeinek, így például a CYP1A4 és a CYP1A5 enzimek, aktivitását és génexpresszióját (Wu et al., 2014b).

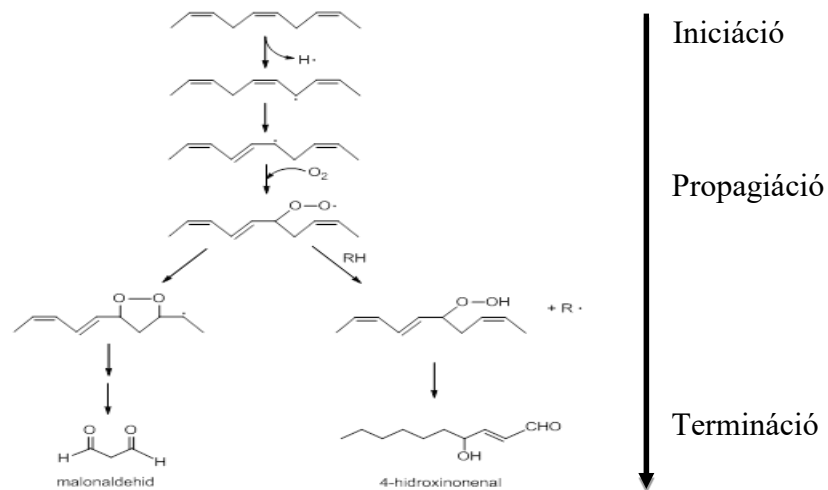
Halak antioxidáns rendszerére és lipidperoxidációs folyamataira vonatkozóan is kevés adat áll rendelkezésre a mikotoxinok hatásaival összefüggésben (Anater et al., 2016). Az elérhető adatok szintén jellemzően szubkrónikus terheléses vizsgálatok. Így például 56 napon keresztül tartó DON terhelés hatására a glutation redox rendszer csökkent aktivitását tapasztalták a 26. és az 56. nap után (Pietsch és Burkhardt-Holm, 2015). Emellett, azonos terhelési protokoll mellett, fokozott lipidperoxidációt is megfigyeltek pontyok májában és veséjében (Pietsch et al., 2014b). Egy másik vizsgálatban (Sanden et al., 2012) DON kezelést követően nőtt a *Cyp1a* mRNS szintje zebra-dánió májában, valamint a *Cu-Zn Sod* és *Cyclin G1* gének koncentrációfüggő transzkripció változását is megfigyelték. A T-2 toxin xenobiotikum transzformáló enzimrendszerre kifejtett hatását vizsgálva a GST aktivitásának növekedését észlelték pontyban (Kravchenko et al., 1989). Szintén T-2 toxin hatására, 0,52 és 2,45 mg T-2 toxin/kg takarmány koncentráció mellett, négy hetes kezelés során emelkedett GSH szintet találtak pontyban, a lipidperoxidációs markerek értékei azonban nem mutattak változást (Balogh et al., 2009). Hasonló eredményeket kaptunk T-2 toxinnal vagy DON-nal szennyezett takarmány etetését követően hosszútávú vizsgálat során pontyban. Az antioxidáns rendszer és a lipidperoxidációs folyamatok markerei csak kismértékű változást mutattak, génexpresszió szinten ugyanakkor a *Ggpx4a* és *Gpx4b* gének indukcióját tapasztaltuk (Pelyhe et al., 2016). Egy másik, pontyokkal végzett, 4 hetes etetéses kísérletben, emelkedő MDA értékek mellett, csökkent CAT- és emelkedett GST aktivitást tapasztaltak a májban, a GPx és GSR aktivitás azonban nem változott. A vesében viszont, szintén emelkedő MDA tartalom mellett, a GPx aktivitás csökkenését és a CAT növekedését tapasztalták. Megfigyelték továbbá a *TNF- α* és az IL-10 gének indukcióját is, nem tapasztaltak viszont génexpressziós változásokat a *Cyp450 2F2* és *Cat* gének expressziójában sem a májban sem a vesében (Matejova et al., 2016). Egy *in vitro* vizsgálatban, DON terhelés során, különböző halfajokból izolált sejtvonalakban is fokozott mértékű lipidperoxidációt tapasztaltak, amelyre a szívárványos piztrángból származó sejtvonal volt a leginkább érzékeny (Pietsch et al., 2011).

3.2 Az oxidatív stressz kialakulása, befolyásolása, hatása és molekuláris jellemzői

A szervezetben részben külső hatásokra, de számos élettani folyamat során is folyamatosan képződnek ROS vegyületek egyes enzimatis folyamatok (pl. a mitokondriális légzési lánc (Murphy, 2009)), vagy az immunrendszer működése során az oxidatív burst mechanizmus révén (Slauch, 2011), de keletkezhetnek szintézis útján is, például a nitrogén oxid aktivációjával (Bredt et al., 1990). Ezek a molekulák kémiaiilag reaktívak és károsíthatják a biológiai makromolekulákat, de fontos szerepet töltenek be egyes jelátviteli útvonalakban, a sejtszintű folyamatok szabályozásában, a nem specifikus immunválasz kialakulásában, vagy az apoptózis indukciójában (Engel et al., 2006; Dickinson és Chang 2011; Slauch, 2011). A ROS képződés fiziológiás szinten tartását a biológiai antioxidáns védelmi rendszer végzi, ugyanakkor, ha a ROS képződés és az antioxidáns védelmi rendszer egyensúlya felbomlik, oxidatív stressz alakul ki (Sies, 1991). Az egyensúly megbomlása bekövetkezhet a ROS képződés fokozódása, vagy a szervezet antioxidáns védelmének csökkenése (pl. C-, E-, vagy A-vitamin hiánya, metionin/cisztein hiány, szelénhiány, antioxidáns enzimek csökkent aktivitása) miatt is (Espinosa-Diez et al., 2015). Az így kialakult oxidatív stresszre, annak mértékétől függően, a sejtek eltérő módon és mértékben reagálnak, amely eltérő következményekkel jár a sejtek túlélése szempontjából (Gloire et al., 2006).

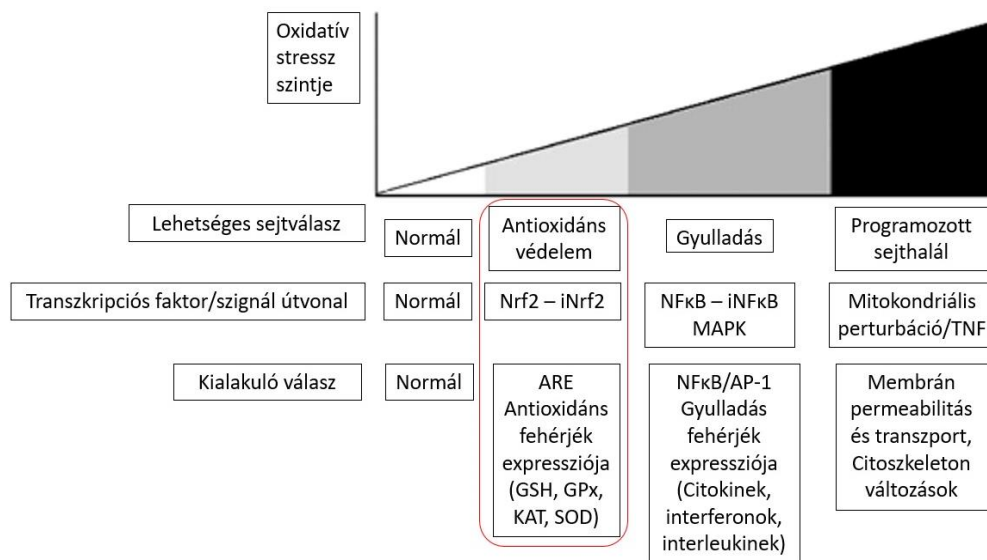
Oxidatív stressz hatására a sejtek minden biomolekulája károsodhat (Jacob és Burri, 1996). Ennek következtében károsodnak a különböző sejtstruktúrák (Berlett és Stadtman 1997), de elsősorban a lipidek, azok (per)oxidációja révén (Gutteridge és Halliwell 1990). A DNS károsodása miatt a szálak törése is bekövetkezhet, valamint egyes, a lipid peroxidáció terminációs szakaszában keletkező, metabolitok (pl. MDA, 4-hidroxi-2-nonenál) hatására DNS adduktok jöhetnek létre, amelyek pontmutációk kialakulásához vezethet (Cooke et al., 2003; Ayala et al., 2014).

A lipidek peroxidációja elsősorban a membránokat érinti, mivel azok foszfolipid kettősrétegben nagy mennyiségű többszörösen telítetlen zsírsav található, amelyek különösen érzékenyek a peroxidatív károsodásokra (Ayala et al., 2014). A lipidperoxidáció kezdeti lépéseként a membránalkotó többszörösen telítetlen zsírsavakról egy ROS elektront von el (iniciáció), amelynek hatására lipid szabadgyökök keletkeznek, amelyek azután a szomszédos kettős kötésekről vonnak el elektronokat, amelynek hatására peroxidatív láncreakció alakul ki (propagáció). A folyamat kezdeti szakaszában a kettőskötések átrendeződése miatt konjugált diének (CD) és konjugált triének (CT) keletkeznek (Takagi et al., 1987; Ayala et al., 2014), amelynek következtében megváltozik a membránok fluiditása, emiatt integritása. Ezt követi a propagációs folyamat, amelynek során a telítetlen kettőskötések felbomlanak és oxidálódnak. A folyamatot egy végső, terminációs, fázis zárja, amelynek során a zsírsavak feldarabolódnak és ennek során metastabil végtermékek, így például aldehidek, keletkeznek (pl. malondialdehid, 4-hidroxi-2-nonenál) (1. ábra). Ezek a reaktív aldehidek fehérjéket precipitálhatnak, sőt DNS adduktokat is létrehozhatnak. A 4-hidroxi-2-nonenál átjut a vér-agy-gáton is, amely azért különösen veszélyes, mert az agy nagy lipid-, ezen belül telítetlen zsírsavtartalma, mellett az egyes szövetek közül a legkevésbé hatékony antioxidáns védelmi rendszerrel rendelkezik (Genet et al., 2002; Ayala et al., 2014). A lipidperoxidációs folyamatok következtében az oxidatív módon károsodott zsírsavak miatt a membránok fluiditása és integritása csökken, emiatt permeabilitásuk megnő (Gutteridge és Halliwell 1989), amelynek hatására végeredményben a sejt pusztulása, lízise következik be (Mézes és Matkovics 1986).



1. ábra A lipidperoxidáció folyamata: A lipidperoxidáció kezdeti lépéseként többszörösen telítetlen zsírsavakról egy ROS elektront von el (iniciáció), ennek hatására lipid szabadgyökök keletkeznek, amely peroxidatív láncreakciót indítanak el (propagáció). A folyamatot egy végső, terminációs, fázis zárja, amelynek során a zsírsavak feldarabolódnak és ennek során metastabil végtermékek, így például aldehidek, keletkeznek (Perjési 2014 nyomán)

Az oxidatív hatásoktól függően a szervezetben különböző mértékű oxidatív stressz alakul ki, amelynek függvényében eltérő reakciós útvonalak aktiválódnak. Ezeket az eltérő válaszreakciókat az ún. hierarchikus oxidatív stressz modellben (2. ábra) foglalták össze (Gloire et al., 2006).



2. ábra A hierarchikus oxidatív modell: Különböző mértékű oxidatív stressz függvényében eltérő reakciós útvonalak aktiválódnak molekuláris és fehérje szinten. Alacsony oxidatív stressz esetén az Nrf2-iNrf2-ARE útvonal aktiválódik, melynek hatására az antioxidáns elemek génexpressziója indukálódik (piros kerettel jelölve), közepes oxidatív stressz gyulladásos folyamatokat indukál az NFκB és MAPK útvonalon, melynek hatására gyulladással kapcsolatos fehérjék expressziója emelkedik, magas oxidatív stressz esetén apoptózis folyamata zajlik a mitochondriális perturbáció révén (Gloire et al., 2006 nyomán)

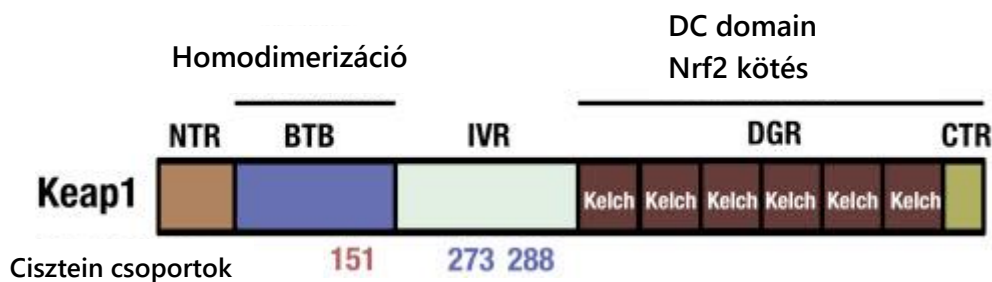
3.2.1 Az alacsony szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók

A modellből látható (2. ábra), hogy amennyiben az oxidatív stressz alacsony szintű, annak hatására aktiválódik a szervezet antioxidáns védelmi rendszere. Ennek során egyrészt fehérje szinten aktiválódnak az antioxidáns enzimek (pl. SOD, CAT, GPx), amelynek háttérében molekuláris szinten a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1)- *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2) - Antioxidáns válaszelem (ARE) (Suzuki et al., 2016) enzimatiszus út vonal indukálódása áll. Ennek révén fokozódik az antioxidáns fehérjék, így például az antioxidáns enzimeket kódoló gének expressziója (Moi et al., 1994). A folyamat kulcseleme az Nrf2, amely egy, a sejtekben fiziológias körülmények között folyamatosan termelődő, transzkripció faktor (Suzuki et al., 2016). Az antioxidáns válaszelem folyamatos aktiválódásának elkerülése érdekében azonban folyamatosan termelődik egy Nrf2 represszor fehérje (Keap1 vagy iNrf2) is, mely homodimer formában aktív és egy a Cullin-3 alapú E3 ubiquitin ligázhoz kapcsoló adapter fehérje (Suzuki és Yamamoto, 2015).

A Keap1 szerkezetileg három funkcionális csoportot tartalmaz: N-terminális BTB (*Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac*) domain, IVR (*intervening* (közbeeső) *region*), és a DC domainek. A DC doméneket egy DGR (*double glycine repeat*) domain és egy CTR (*carboxyl-terminal region*) alkotja (3. ábra). A BTB domain a Keap1 homo-dimerizációjában játszik szerepet, ezáltal a két Keap1 molekula képes megkötni az Nrf2-t a DC domaineken (3. ábra). A Keap1 cisztein csoportjai: Cys151, Cys273 és Cys288, amelyek az oxidatív stressz érzékelésében játszanak szerepet.

Az Nrf2 hat funkcionális csoportot tartalmaz, melyek a Neh (Nrf2–ECH homology) 1 - 6 domainek (4. ábra) (Suzuki et al., 2016).

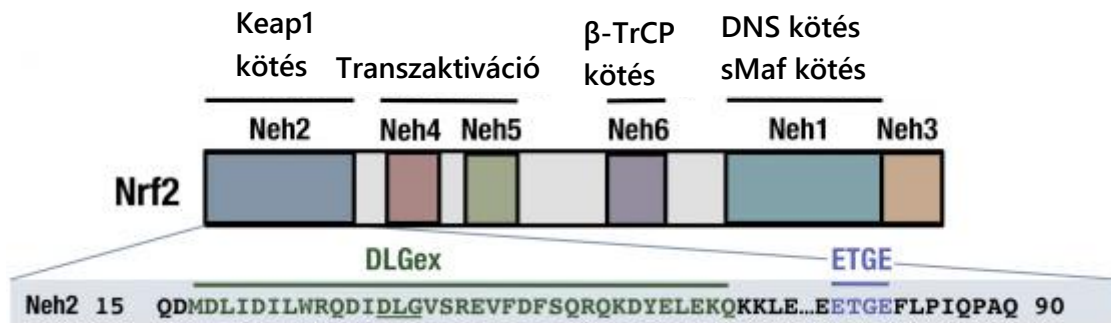
A Neh1 domain leucin cipzár bázikus régió szerkezete révén az Nrf2 képes a sMaf fehérjével dimerizálódni és ennek révén kötődni a DNS-hez. A Neh4 és Neh5 transzaktivátor domainek, amelyek képesek kötődni a CBP-hez (*CREB-binding protein*) és más transzkripció ko-aktivátorokhoz. A Neh2 és Neh6 domainek degronok, amelyek a Keap1 és a β -TrCP target-szakaszai az Nrf2 degradáció folyamatában. A Neh2 domain a DLGex és ETGE domainekből áll, melyek a Keap1-hez kötődésért felelősek (Suzuki et al., 2016).



3. ábra A Keap1 domain szerkezete: A fehérje három funkcionális csoportot tartalmaz: N-terminális régió (NTR), BTB (*Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac*) domain, mely a homodimerizációban játszik szerepet, IVR (*intervening* (közbeeső) régió), mely a CUL3-mal való interakcióért felelős szakasz, és a DC domainek, amelyek 6 ismétlésben magukba foglalják a konzervált Kelch domént (*double glycine repeat* DGR) és a C terminális régiót (CTR), amelyek az Nrf2-vel való kötődésért felelősek. A Keap1 cisztein csoportjai: Cys151, Cys273 és Cys288, amelyek az oxidatív stressz érzékelésében játszanak szerepet. (Suzuki et al 2016 nyomán)

A Neh2 domain az Nrf2 N-terminális részén található. A Keap1-hez való kötődésért az Nrf2 Neh2 domain két alegysége felelős, az alacsony affinitású DLGex (*extended DLG*) és a magas affinitású ETGE alegységek. A két alegység közötti lizin csoportok az ubiquitinizáció targetjei, ezáltal a két kötőhely kiemelt szerepet játszik az Nrf2 lebontásában. Oxidatív stressz hatására a DLGex disszociál a Keap1-ről, ezáltal megváltozik a Keap1 szerkezete, így az Nrf2 degradációja nem megy végbe. Az ETGE két lépéses folyamatban kapcsolódik a Keap1-hez. Az első lépésben gyors-be/gyors-ki, a második lépésben pedig lassú-be/lassú-ki módon kapcsolódik, amelynek segítségével stabilan kötődik a Keap1-hez. A DLGex azonban már egy lépésben kapcsolódik a Keap1-hez, amely gyors-be/gyors-ki működésű. Ezek a különbségek fontos szerepet játszhatnak az oxidatív stressz érzékelésében (Suzuki et al., 2016). Az ETGE és a DLGex alegységeket működésük miatt „*hinge and latch*” (zsanér és retesz) modellként írták le, míg a Keap1-Nrf2 kapcsolódást „*Two-site binding*” (Kétoldali kötődés) modellel jellemzik (Mitsuishi et al., 2012).

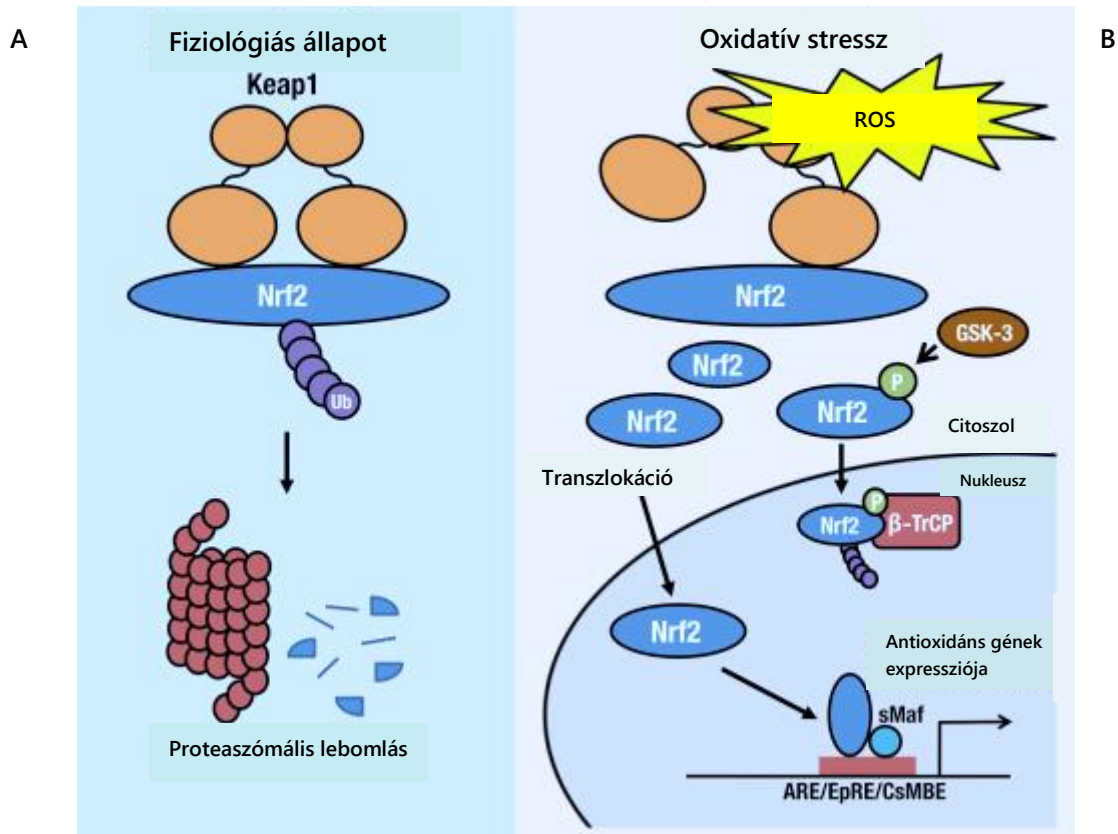
A Neh6 domain a β -TrCP Nrf2 bontási útvonalban játszik szerepet, mely szintén egy Cullin-3 alapú E3 ubiquitin ligázhoz kapcsoló adapter fehérje, azonban a β -TrCP csak a foszforilált Nrf2-t ismeri fel. Az Nrf2 foszforilációját a GSK3 végzi, a Neh6 335. és 338. szerin csoportjánál. A GSK3 aktiválódása a PI3K–AKT útvonalon történik.



4. ábra Az Nrf2 domain szerkezete: Az Nrf2 hat funkcionális csoportot tartalmaz. A Neh2 domén a Keap1 lebontási útvonalért felelős, a Neh4 és 5 a transzkripció aktiválásáért felelős, a Neh1 a DNS és sMaf kötésért felelős, a Neh6 az Nrf2 β -TrCP Nrf2 bontási útvonalban játszik szerepet. Az ábrán tovább látható a Neh2 két alegysége, a DLGex és ETGE domáinak, melyek a Keap1-hez kötődésért felelősek (Suzuki et al 2016 nyomán)

A Keap1 a citoszolban megköti, majd ubiquitinizációt követően a proteoszómába szállítja az Nrf2-t, amely ott lebontásra kerül (Kaspar et al., 2009), ezáltal szabályozva annak aktuális mennyiségét (4. ábra). A Keap1-homodimer emellett az oxidatív stressz érzékelőjeként is fontos szerepet kap azáltal, hogy olyan cisztein csoportokkal rendelkezik, amelyek képesek az intracelluláris redox változásokat érzékelni (Suzuki és Yamamoto, 2015). Ennek alapját az adja, hogy a Keap1 cisztein csoportjai tiol (-SH) csoportokat tartalmaznak, amelyek könnyen reagálnak az elektrofil molekulákkal (Suzuki et al., 2016).

Az Nrf2 másik degradációs útvonalában a GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) játszik szerepet, mely foszforilálja az Nrf2-t, majd az ubiquitinizációt követően lebontásra kerül a β -TrCP (β -*transducin repeat containing protein*) által, amely ezáltal megakadályozza az Nrf2 nukleuszba történő bejutását és felhalmozódását (5. ábra) (Suzuki et al., 2016).



5. ábra Az Nrf2 működése és degradációs úvonálai, A: fiziológias ROS szint esetén a Keap1 megkötö az Nrf2-t, amely ubiquitizációt követően a proteaszómában degradálódik, B/1: Oxidatív stressz esetén az Nrf2 bejut a sejtmagba, kapcsolódik az ARE-vel és indukálja az antioxidáns gének expresszióját, míg B/2: a GSK-3 által foszforilált Nrf2-t a nukleuszban a β -TrCP elbontja, így megakadályozva az Nrf2 nukleuszban való túlzott felhalmozódását. (Suzuki et al., 2016 nyomán)

Az Nrf2 felezési ideje alacsony, körülbelül 18 perc (Suzuki et al., 2016). Oxidatív stressz körülmények között viszont az Nrf2 stabilizációja feltételezhetően olyan mechanizmusoktól függ, amelyek megakadályozzák, vagy csak csökkentik, a Keap1 Nrf2-höz kötődését (Nguyen et al., 2005). A nem kötött Nrf2 bejut a sejtmagba és aktiválja az antioxidáns válaszlelem által kódolt gén-klasztert (5. ábra). Oxidatív stressz szignál hatására emellett degradálódik a Keap1 fehérje is, ezzel is elősegítve az Nrf2 bejutását a sejtmagba, ahol az, egy Maf1 fehérjéhez kapcsolódást követően, összekapcsolódik az ARE, más néven *Electrophil Response Element* (EpRE) vagy *CNC-sMaf binding element* (CsMBE) kötőhelyekkel (Bloom és Jaiswal 2003; Itoh et al., 2004). A felismert kötőhelyek az antioxidáns védelemért felelős fehérjéket kódoló gének promóter régiójában található transzkripciós faktor kötő helyek (Nguyen et al., 2009). A kapcsolódást követően több mint 200 olyan gén expressziója indukálódik, amelyek közvetlen vagy közvetett módon részt vesznek az antioxidáns védelemben. Így például aktiválja a fázis II detoxifikációért felelős, a glutation bioszintéziséért felelős enzimek, továbbá az extracelluláris szuperoxid-dizmutáz, egyes hőszokk fehérjék, valamint a ferritin gének expresszióját (Petri et al., 2012). Az ARE olyan szerkezeti és biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek egyúttal meghatározzák oxidatív stressz iránti érzékenységét is (Rushmore et al., 1991). Nem csupán a H_2O_2 -re adott válasz képes aktiválni, hanem minden olyan vegyület, amely bekapcsolódhat a redox ciklusba és/vagy metabolikus úton válik reaktív vagy elektrofil intermedierekké (Rushmore et al., 1990). Ezen felül minden olyan vegyület is aktiválja, amely reakcióba lép a szulfhidril csoportokkal, ezzel csökkentve a sejtek szabad -SH tartalmát (Nguyen et al., 2009).

Az oxidatív stressz által indukált jelátviteli utak és szignál-rendszerek, az antioxidáns, így például a *Gpx* gének expressziójának indukálása mellett, befolyásolják az *e* gének által kódolt enzimfehérjék poszt-transzlációs modifikációját, azaz aktivitását is. Ezek a folyamatok azonban részleteiben jelenleg még csak kevésbé ismertek. Leírták például, hogy a citoszol glutation-peroxidáz (GPx1) a poszt-transzláció során acetiláció (Shepard et al., 2010; Fritz et al., 2012), illetve foszforiláció (Cao et al., 2003) útján módosulhat, ami jelentősen növeli az enzim katalitikus aktivitását (Shepard et al., 2010). A mitokondriumban, a GPx1 mellett, a foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz (GPx4) acetilációját is leírták (Choudhary et al., 2009; Fritz et al., 2012; Lundby et al., 2012).

3.2.2 *A közepesen magas szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók*

Amennyiben az oxidatív stressz mértéke nő, már nem elsősorban az Nrf2 aktiválódik, hanem gyulladási folyamatok indukálódnak, amelynek során az NF κ B (*Nuclear Factor κ B*) transzkripciós faktor jut be a nukleuszba, miután az erőteljes mértékű oxidatív stressz hatására degradálódik annak represszor fehérjéje, az I κ NF κ B. Ennek eredményeként egyes citokinek, interleukinek és interferonok génexpressziója indukálódik (2. ábra) (Lawrence, 2009).

3.2.3 *A magas szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók*

Az oxidatív stressz mértékének egy kritikus szintje felett, már az ún. programozott sejthalál (apoptózis) vagy a nekrosis szignál útvonalai válnak elsődlegessé (2. ábra). Az apoptózis során a tumor nekrosis faktor (TNF) útvonal (*intrinsic pathway*) aktiválódik, amelynek során a mitokondriumok perturbációja (*pore transition*) következik be a „mitochondrial swelling” révén (*extrinsic pathway*). Ez utóbbi folyamat háttérében a kalcium efflux zavara miatt bekövetkező kaszpáz kaszkád aktiválódás áll (Engel et al., 2006; Banerjee et al., 2016).

Amennyiben viszont a sejteket olyan mértékű oxidatív károsodás éri, amelynek hatására a membránalkotó többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek is oxidatív károsodnak, amelyet a szervezet antioxidáns és repair rendszerei már nem képesek szabályozni, úgy nekrosis alakul ki. A nekrosis során a membrán sérülések következtében a sejtől enzimek és egyéb biológiailag aktív anyagok jutnak az extracelluláris térbe, károsítva ezzel a sejt környezetét, ami további ROS képződéshez vezet (Choi et al., 2009).

3.2.4 *Mikotoxinok hatása az Nrf2-ARE útvonalon*

A trichotecénvázas mikotoxinok által előidézett oxidatív stressz hatására az ARE feltehetően az Nrf2-ARE útvonalon keresztül aktiválódik, amely az oxidatív stressz válaszáért felelős fehérjék és a glutation szintézisében és újrahasznosításában résztvevő gének transzkripcióját is irányítja (Jennings et al., 2013), ebbe beleértve a glutation-peroxidázokat is (Köhle és Bock 2007). Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy T-2 toxin hatására csökkent az *Nrf2* expressziója *in vivo* eger agyban (Chaudhary és Rao 2010), amelynek hatására az alkalmazott dózis és az expozíció időtartamától függően csökkent és/vagy nőtt néhány, a glutation újrahasznosításáért felelős, enzim génexpressziója is, amelyet primer csirke hepatocitákban írtak le *in vitro* modellben (Mu et al., 2013). Azt is megfigyelték, hogy *Nrf2 knock-out* patkányok nagyobb érzékenységet mutattak az aflatoxin B1 toxicitással szemben, melynek háttérében az Nrf2-ARE útvonal gátlása állhat. Ezzel ellentétben a *Keap1 knock-down* egerek, a vad típushoz viszonyítva, jobban tolerálták a xenobiotikumokat, ami azzal magyarázható, hogy kisebb mennyiségű *Keap1* fehérje kevesebb *Nrf2*-t kötött meg. A *Keap1* homozigóta *knock-out* egerek ugyanakkor alultápláltság miatt a választást követően elpusztultak, amelynek oka az emésztőrendszer *hyperkeratosis*a volt, azaz a *Keap1* fehérje hiányának az Nrf2-ARE útvonalra gyakorolt hatása mellett egyéb, még nem teljes mértékben feltárt, hatásai is lehetnek (Suzuki et al., 2016).

3.3 A szervezet antioxidáns rendszerének bemutatása

3.3.1 A biológiai antioxidáns rendszer

Az élő szervezetben az oxidatív hatások kivédésére az evolúció során egy hatékony biológiai antioxidáns védelmi rendszer alakult ki, amelynek funkciója a ROS által előidézett károsodásoktól megvédeni a szervezetet (Sies 1997). Magasabb rendű szervezetekben az antioxidáns védelmi rendszernek három védelmi vonala alakult ki (Tokarz et al., 2013).

3.3.1.1 Az első védelmi vonal

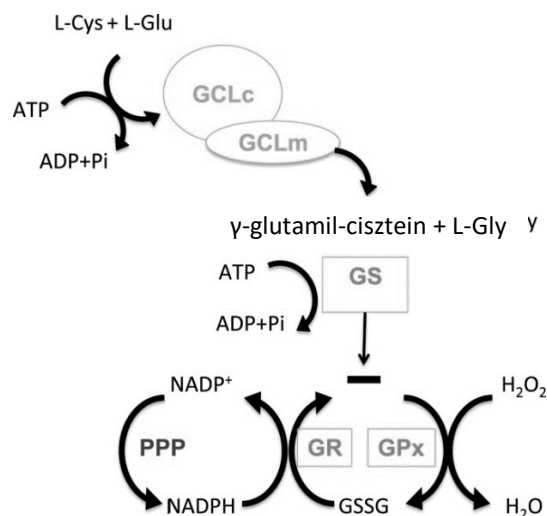
Az első védelmi vonalat a kis molekulatömegű antioxidánsok alkotják. Ezek olyan nukleofil és redukáló tulajdonságú molekulák, amelyek képesek reakcióba lépni a reaktív elektrofil szabadgyökökkel és környezetükhöz képest könnyebben képesek azoknak egy vagy két elektront átadni, azaz elektron donorként funkcionálnak. Lehetnek zsírolédkony (pl. A-vitamin, E-vitamin), vagy vízzoldékony (C-vitamin, húgysav, glutation) karakterűek. Az antioxidáns molekulák hatására leáll a szabadgyökök által előidézett láncreakció, miközben, igaz csak rendkívül rövid időre és csak kismértékben, de maguk is reaktív gyökké alakulnak (Buettner és Jurkiewicz, 1993), amelyet követően azonban gyorsan és nagy hatékonysággal redukálódnak. A zsírolédkony α -tokoferol fizikailag is kapcsolódik a membrán foszfolipidekhez, ezáltal közvetlenül védi azokat az oxidatív károsodástól. Oxidációját követően tokoferil-kinonná alakul, amely kevésbé hidrofób karakterű, ezért részben kilép a membránból. Az oxidálódott α -tokoferolt (tokoferil-kinon) elsősorban a citoszolban lévő L-aszkorbinsav redukálja, amely ezáltal ismét hidrofóbbá válik, így ismét kapcsolatba léphet a membrán foszfolipidekkel (Tokarz et al., 2013). Az oxidálódott aszkorbinsavat (dehidroaszkorbinsav) részben a GSH regenerálja (Espinosa-Diez et al., 2015), vagy ebben a formában kiürül a szervezetből.

A kis molekulatömegű antioxidánsokat más megközelítésben metabolikus és nutriens antioxidánsok csoportjába is oszthatjuk (Lien et al., 2008). A metabolikus antioxidánsok közé azok az endogén vegyületek tartoznak, amelyeket a szervezet is képes előállítani. Ilyen például a glutation, az L-arginin, a koenzim Q10, vagy a melatonin (Droge 2002). Ezzel szemben a nutriens antioxidánsok olyan exogén vegyületek, amelyeket a szervezet nem képes előállítani, azokat a takarmány vagy táplálék útján veszi fel. Ide tartozik például az E-vitamin, a C-vitamin (egyes állatfajoknál, így például a legtöbb halfajnál is), a karotinoidok, továbbá egyes flavonoidok (Lien et al., 2008).

A nem-enzimatikus antioxidáns védelem kiemelten fontos tagja a vízzoldékony redukált glutation (GSH), amely három aminosavból áll (tripeptid). A peptid szintézise azonban nem áll genetikai kontroll alatt, abban két enzim vesz részt, a γ -glutamil-cisztein-szintetáz vagy ligáz (GCS vagy GCL), amely a glutamát és a cisztein kapcsolódását katalizálja, valamint a glutation-szintetáz (GS), amely a dipeptidhez egy glicin aminosavat kapcsol (6. ábra). A folyamat ATP-dependens (Espinosa-Diez et al., 2015). A GCL heterodimer enzim, amelynek katalitikus aktivitásért a GCLc (73 kDa) alegység, valamint a GCLc egység szabályozásáért a GCLm (33 kDa) alegység a felelős (Lu 2013).

A GSH a szervezetben az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló antioxidáns molekula, amelynek redukált formája aktív tiol csoporttal rendelkezik, ez oxidatív stressz esetén könnyen oxidálódik, így az oxidatív folyamatok elleni védelem fontos komponense (Volodymyr 2011). A ROS redukcióját követően két oxidálódott GSH dimerizációjával glutation-diszulfid (GSSG) jön létre. A GSH közvetlenül és közvetve egyaránt képes ROS eliminálására. Egyrészt ugyanis

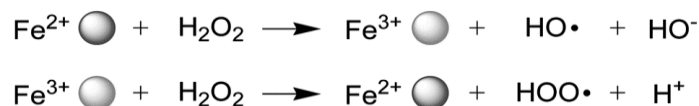
közvetlenül reakcióba léphet a szuperoxid anionnal és más szabadgyökökkel, másrészt pedig, közvetett módon, képes más antioxidáns molekulákat, így például a dehidro-aszkorbinsavat, redukálni (Espinosa-Diez et al., 2015). A GSH homeosztázist nem csak annak *de novo* szintézise befolyásolja, de abban szerepe van más faktoroknak is, így például a sejten belüli felhasználásnak, az újrahasznosításnak (GSSG \Rightarrow GSH redukció), vagy a sejtből történő efflux mértékének. A GSH-nak szerepe van továbbá a szervezet enzimatikus antioxidáns védelmében is, mint a GPx vagy a GST enzimek ko-szubsztrátja. A GSSG-t a glutation reduktáz (GSR) regenerálja, amely folyamatnak fontos szerepe van a sejtek szabad szulfidril tartalmának fenntartásában (6. ábra). Emellett számos egyéb funkcióval is rendelkezik, így például cisztein tartalék, transzportálja és tárolja a nitrogén oxidot, részt vesz az ösztrogének, leukotriének és prosztaglandinok metabolizmusában, a ribonukleotidok és deoxiribonukleotidok redukálásában, valamint konjugáló ágensként részt vesz a xenobiotikum transzformációban (Halliwell és Gutteridge 1989). A GSH bioszintézisét allosztérikus folyamatok, valamint a szubsztát-hozzáférés is befolyásolják. Amennyiben ugyanis az intracelluláris GSH tartalom egy kritikus értéket meghalad, akkor a GCLc kompetitív gátlása révén csökken a GSH szintézise. Szintézisének további limitáló tényezője a sejtek szabad cisztein tartalma (Lu 2009; Lu 2013).



6. ábra A glutation bioszintézis és a glutation redox rendszer: A cisztein (L-Cys) és glutamin (L-Glu) összekapcsolását a γ -glutamil-cisztein-ligáz (GCL) végzi, ezt követően a glutation-szintetáz (GS) egy glicint (L-Gly) csatol az így létrejövő GSH-hoz, amely folyamatok NADPH-t igényelnek. A glutation redox rendszerben, a GPx enzim koszubsztrátként használja a GSH-t H_2O_2 eliminálásához, majd a létrejövő oxidált GSSG-t a GR visszaredukálja GSH-vá, ami szintén energia igényes folyamat (Espinosa-Diez et al., 2015 nyomán)

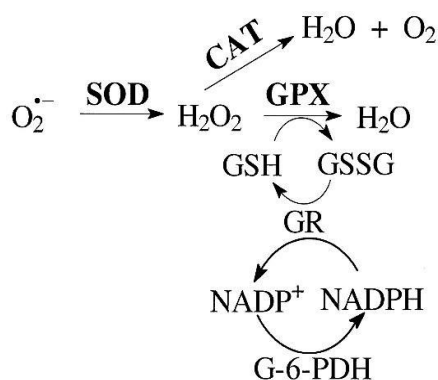
3.3.1.2 A második védelmi vonal

A második védelmi vonalhoz az antioxidáns enzimek (SOD, CAT, GST, GPx, tioredoxin-reduktáz (Trx) és egyes fémkötő (kelátképző) fehérjék (pl. ferritin, metallothionein, albumin) tartoznak. Az antioxidáns enzimek olyan módon semlegesítik a reaktív oxigén gyököket, hogy a ROS-t redukáló reakciókat katalizálnak (Cai és Cherian 2003; Espinosa-Diez et al., 2015). A kelátképző fehérjék pedig olyan módon hatnak, hogy megkötik az átmeneti fémeket (pl. Fe, Cu), amelyek Fenton-típusú reakciók során ROS képződést indukálhatnak (7. ábra) (Leonard et al., 2004; Murale et al., 2014).



7. ábra A Fenton reakció folyamata: Fém-katalizált szabadgyök képződés, melyben a vas hidrogénperoxiddal reagálva szabadgyököket hoz létre (Murale et al., 2014 nyomán)

Az enzimatisz védőrendszer elemei: a szuperoxid aniont hidrogén-peroxiddá redukáló szuperoxid-dizmutázok (SOD), a hidrogén-peroxidot bontó kataláz (CAT), valamint a peroxidázok csoportja, ezen belül például a glutation-peroxidázok (GPx) és a glutation S-transzferázok (GST) (Leonard et al., 2004), továbbá a tioredoxin reduktázok (Trx) (Holmgren, 1977). A mitokondriumokban és a mikroszómákban folyamatosan keletkező szuperoxid anion semlegesítését a szuperoxid-dizmutázok (SOD) végzik. Az ősbib típusú Mn-SOD a prokariótákban és az eukarióták mitokondriumában található. Az eukarióta sejtek citoszoljában viszont a Cu-Zn SOD van jelen (Espinosa-Diez et al., 2015). A kataláz csaknem teljes készlete a mikroszómákban, a sejtmagban és a peroxiszómákban található (Leonard et al., 2004). A GPx enzimeknek jelentős szerepük van a ROS káros hatásaival szembeni védekezésben, elsősorban a citoszolban és a mitokondriumban, mivel a szuperoxid-dizmutáz működése során keletkező H_2O_2 -t vízzé alakítják, miközben a GSH-t oxidálják (8. ábra) (Imai és Nakagawa 2003). A tioredoxin reduktáz a tioredoxin, egy átlagosan 12 kDa molekulatömegű tiol/diszulfid, redukációjában vesz részt. A tioredoxin fontos intracelluláris redox szabályozó, mert szerepe van a redox-érzékeny transzkripció faktorok szabályozásában és azokat aktív formában tartja oxidatív stressz állapotokban. Ennek alapján a tioredoxin és a tioredoxin reduktáz megelőző funkciót töltenek be a ROS által előidézett citotoxicitás kivédésében (Calabrese et al., 2009).



8. ábra Az enzimatisz antioxidáns rendszer sematikus ábrája: A szuperoxid aniont a SOD H_2O_2 -vé alakítja, melyet a CAT és a GPx bont tovább vízzé (Li et al., 2000 nyomán)

A glutation S-transzferáz enzimes család nem kizárólag antioxidáns hatású, mert a xenobiotikum transzformáció II. Fázis, azaz a bioszintetikus konjugáció, enzimek közé tartozik, amelyek részben a GSH és az elektrofil xenobiotikumok bioszintetikus konjugációját katalizálják (Liu et al., 1993). Ezen túlmenően glutation-peroxidázhoz hasonló aktivitással is rendelkeznek, amelynek során főképp a szerves hidroperoxidokat redukálják ko-szubsztrátként GSH-t felhasználva, elsősorban szelén hiányos állapotokban, mintegy a szelén-dependens GPx helyettesítőjeként (Rahman 2007).

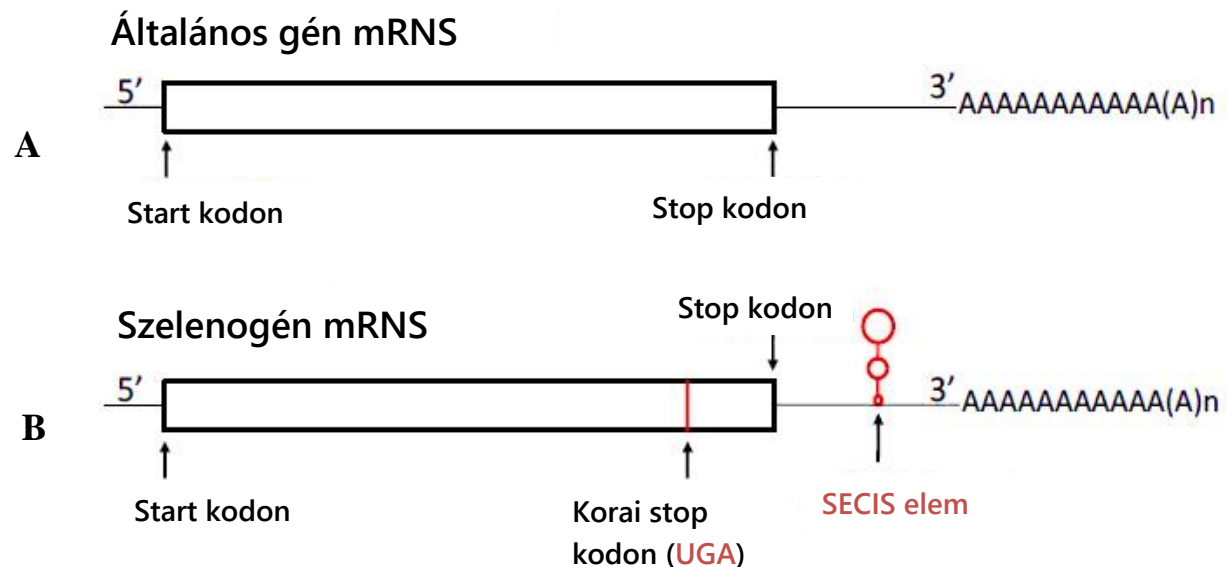
A glutation redox rendszer alacsony szintű oxidatív stressz esetén kiemelt fontosságú, míg a kataláz erőteljesebb oxidatív stressz hatások esetén tölt be fontos szerepet és biztosít védelmet (9. ábra) (Zoidis et al., 2010; Matés et al., 2000).

3.3.1.3 A harmadik védelmi vonal

A harmadik védelmi vonalba az ún. repair molekulák és enzimek tartoznak, így pl. a hősokk fehérjék (Hsp), egyes lipázok, proteázok, továbbá a DNS repair enzimek és a glutation-reduktáz (GSR), amelyek a károsodott/oxidálódott makromolekulák helyreállítását és/vagy eltávolítását katalizálják (Davies, 2000).

3.3.2 A szelenoproteinek molekuláris biológiai jellemzői

A glutation-peroxidázok a szelenoproteinek legfontosabb csoportja, amelyek aktív centrumukban a szelént szelenocisztein formájában tartalmazzák (Kieliszek és Błażej, 2016). A szelenoproteinek mRNS-e egy SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) elemet tartalmaz, amely jól meghatározott tulajdonságokkal rendelkezik. A nyitott leolvasási kereten (*open reading frame*) belül UGA kodon található, mely más mRNS-ek esetén, a transláció során STOP kodonként funkcionál (9. ábra, A). A SECIS elemet tartalmazó szelenoproteinekben azonban egy speciális másodlagos szerkezet a *stem-loop* struktúra alakul ki a transzkripciót követően a 3' UTR régióban (9. ábra, B), amelyet egy enzim komplex felismer, és melynek hatására a transláció során szelenocisztein épül be az aminosav láncba.



9. ábra A szelenogének és általános gének mRNS szerkezetének felépítése: A: az általános mRNS-ek start kodonnal kezdődnek, majd stop kodonnal végződnek, míg a szelenogén esetén a korai stop kodon (UGA) szelenociszteint kódol (Penglase 2014 nyomán)

Amennyiben általános mRNS-ek nyitott leolvasási keretén belül mutáció révén stop kodon alakul ki (UAG (*amber*); UAA (*ochre*); UGA (*opal*)), a korai stop kodon miatt a potenciálisan sérült, korai terminációt hordozó mRNS-ből megrövidült fehérjék képződhetnek, melyek eliminálására a sejt többszintű védekező mechanizmussal rendelkezik. Ezen mechanizmusok egyike a nonsense mutáció által mediált mRNS lebontás (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD), melynek feladata, hogy már mRNS szinten megakadályozza fehérjék szintézisét (Berry et al., 1993; Labunsky et al., 2014). A szelenotranszkriptumban azonban az MND szabályzó mechanizmusként működik, mely a szelén hozzáférhetőségre reagál. Amennyiben a szelén ellátottság megfelelő, a szelenogének korai stop (UGA) kodonja a transzláció alatt újrakódolódik szelenociszteinné (Sec) egy SECIS-hez kapcsolódó fehérje komplex által. A transzláció során a SECIS elementhez kapcsolódó Sec-tRNS-t tartalmazó fehérje komplex kölcsönhatásba lép a riboszómával, így a Sec egyesül a naszcens fehérjelánccal, ténylegesen átfordítva a korai stop kodont Sec kodonná (Berry et al., 1991; Papp et al., 2007; Labunsky et al., 2014). Szelénhiányos állapotokban a SECIS-hez kapcsolódó fehérje komplex felbomlik és az *open reading frame*-ben található UGA kodont stop kodonként ismeri fel a rendszer, emiatt az mRNS az NMD útvonalon keresztül elbomlik (Moriarty et al., 1998; Labunsky et al., 2014).

A szelenoprotein szintézis „lassú” folyamat, amely jelentős mértékben függ az aktuális szelén ellátottságtól (Papp et al., 2007). A szelenogének evolúciós retenciója és konzervatív volta arra utal, hogy a Sec katalitikus előnyt jelent. Összehasonlítva például a Cys-szel (a szelenocisztein tartalmú enzimek homológjai ciszteint tartalmaznak Sec helyett), a Sec viszont növeli a fehérje stabilitását (Nauser et al., 2014) és lehetővé teszi az enzimaktivitást tágabb fiziológiai körülmények között is, így például szélesebb pH tartományban (Gromer et al., 2003), valamint oxidatív stressz esetén nagyobb H₂O₂ szintek mellett (Rocher et al., 1992). Emellett a Sec általában nagyobb katalitikus aktivitást is eredményez, mint a cisztein tartalmú fehérje izoformák. Amennyiben például egyes GPx enzim izoformákban a Sec helyett Cys található, az nagymértékben csökkenti az enzim katalitikus aktivitását (Maiorino et al., 1995; Guo et al., 2014).

3.3.3 A GPx enzim család

A GPx enzimek nélkülözhetetlen részei az antioxidáns védelmi rendszernek, egyes tagjai a membránok védelmét, míg mások a citoszol és a sejtorganelumok oxidatív károsodása elleni védelmet biztosítják. Jelentős szerepük van a ROS káros hatásaival szembeni védelemben, mivel a szuperoxid dizmutáz hatására a szuperoxid anionból keletkező H₂O₂-t vízzé alakítják, a GSH egyidejű oxidációja mellett (Imai és Nakagawa 2003). A GPx enzimek a sejtmagban, a mitokondriumban és a citoszolban egyaránt megtalálhatók. Emlősökben eddig nyolc, a GPx enzimesaládba tartozó, fehérjét azonosítottak, melyek közül a GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 és GPx6 tartalmaz szelenociszteint, míg a GPx5, GPx7 és GPx8 homológok cisztein tartalmúak (Labunsky et al., 2014) (3. táblázat).

3. táblázat A glutation-peroxidáz enzimesalád tagjai és előfordulásuk a szervezetben

Rövidítés	enzim elnevezése (és előfordulása)
GPx1	glutation-peroxidáz 1 (klasszikus, citoszol)
GPx2	glutation-peroxidáz 2 (gasztrointesztinális)
GPx3	glutation-peroxidáz 3 (plazma)
GPx4	glutation-peroxidáz 4 (foszfolipid-hidroperoxidáz)
GPx5	glutation-peroxidáz 5 (mellékhere specifikus androgén-függő fehérje)
GPx6	glutation-peroxidáz 6 (szaglóhám)
GPx7	glutation-peroxidáz 7
GPx8	glutation-peroxidáz 8 (feltehetően önálló izoforma)

A GPx1-et vörösvértestekből azonosították, amelynek fontos szerepe van a hemoglobin oxidatív stressz elleni védelmében, amely az oxigén megkötéséért és annak szállításáért felelős, ezáltal folyamatos oxidatív stressznek van kitéve (Mills et al., 1957). Megakadályozza továbbá az intracelluláris hidrogén-peroxid felhalmozódást, csökkenti lipid-hidroperoxidok és más hidroperoxidok mennyiségét, amelyek a membrán lipidekből szabadulnak fel a lipidperoxidációs folyamatok során (Martinez et al., 1982). Emlősökben az antioxidáns védelem kiemelkedően fontos tagja (Labunsky et al., 2014), amelyet az is bizonyít, hogy GPx1 *knock-out* egerekben nagyobb érzékenységet tapasztaltak az oxidatív stresszel szemben (Cheng et al., 1998; Fu et al., 1999). A GPx1 túlzott mértékű génexpressziója azonban negatívan hat a redox-érzékeny szignál kaszkádrendszerekre, így például az általuk szabályozott tumor nekrosisz faktorra (TNF- α) (Kretz-Remy et al., 1996), az epidermális növekedési faktorra (EGF) (Handy et al., 2009), sőt még az inzulin elválasztás szabályozására is (Lei és Wang 2012). Ez utóbbi okból a GPx1 túltermelődését (*overexpresszió*) összefüggésbe hozták a 2-es típusú diabétesz, az inzulinrezisztencia, a hiperinzulinémia, a hiperglikémia és az elhízás kialakulásával is (McClung et al., 2004; Pepper et al., 2011).

A gasztrointesztinális GPx2 (Chu et al. 1993) specifikusan a táplálékkal felvett, és a bélcsatornában a felszívódás előtt nem redukálódott, szerves hidroperoxidokat redukálja az emésztőtraktus epithel sejteiben, aminek szintén kiemelt szerepe van, ugyanis az epithel sejtek alkotta barrier elégtelensége a bélcsatornában gyulladásos folyamatokhoz, majd következményesen, a bélhámsejtek áteresztőképességének növekedése miatt, potenciálisan patogén mikroorganizmusok bejutásához, azaz fertőzésekhez vezethet (Esworthy et al., 2005).

Megnövekedett expresszióját figyelték meg epitheliális eredetű tumorokban is (Banning et al., 2012). Ez utóbbi betegség pathomechanizmusában betöltött pontos szerepe azonban még nem tisztázott, mert például GPx2 *knock-out* egerekben csak nagy dózisu UV sugárással lehetett daganatképződést indukálni (Walshe et al., 2007), míg GPx1/GPx2 *knock-out* egerekben spontán tumorképződést is megfigyeltek (Chu et al., 2004). Leírták viszont hatását a sejtosztódás szabályozásában, *knock-out* tumor-sejtvonalakban ugyanis gátolta a sejtproliferációt (Naiki-Ito et al., 2007), sőt apoptózist indukált (Yan és Cehn 2006).

Az extracelluláris GPx3 (Takahashi et al., 1990) főképp a vese proximális tubulus sejteiben szintetizálódik, de szerepét az extracelluláris térben, a vérben keringve, tölti be. A vér alacsony nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) szintjét, amely annak csökkent paraoxonáz aktivitása révén növeli a kis sűrűségű lipoprotein (LDL) oxidációját (Kaplan és Aviram, 1999), amelyhez általában a GPx3 alacsony aktivitás is társul, összefüggésbe hozták például a stroke megnövekedett kockázatával (Nowak-Göttl et al., 2011).

A GPx4-et vagy más néven foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidázt (PHGPx) Ursini és munkatársai (1982) azonosították, egy, a liposzómákat és biomembránokat peroxidációtól védő, 20–22 kDa molekulatömegű fehérjeként. Az enzim a citoszolban és membránkötött formában egyaránt megtalálható (Matés, 2000). Eltérően a többi, tetramer, GPx-tól, a GPx4 monomer enzim (Ursini et al., 1985). Funkciójában is eltér az enzimcsalád többi tagjától, mert nem elsősorban a H₂O₂-ot redukálja (Matés, 2000), hanem a lipid hidroperoxidokat, alkil-peroxidokat és a timidin peroxidokat (Bao et al., 1997; Yant et al., 2003). A GPx4 képes továbbá redukálni egyéb hidroperoxidokat, a lipoproteinek és a komplex lipidek oxidált derivátumait, amelyek a koleszterin és koleszterin-észterek oxidációja során szabadulnak fel (Liang et al., 2007). A GPx4 továbbá az egyetlen olyan GPx enzim, amely specifikusan redukálja a foszfolipid-hidroperoxidokat (Maiorino et al., 1991). Membránkötött formája a membránok foszfolipid- és koleszterin-peroxidjait is redukálja, ezáltal az α -tokoferollal együtt védi a membránok integritását (Thomas et al., 1990; Wortmann et al., 2013). A redukcióhoz azonban ko-szubsztrátként nem csak a GSH-t, hanem egyéb tiolokat is felhasználhat. Érett spermiumokban a GPx4 emellett reakcióba léphet egyes tiol fehérjékkel, főképp olyan esetekben, amikor a GSH limitáló tényező. Ez a folyamat azonban nem az oxidatív stressz elleni védelem része, hanem a spermiumok szerkezeti stabilitását segíti elő, olyan módon, hogy egyes struktúrhatású fehérjékben katalizálja a diszulfid kötések kialakulását (Mannes 2013). Szekvencia adatok alapján a GPx4 tekinthető az egyik legősibb szelenoenzimnek (Brigélius-Flohé et al., 1994; Mariotti et al., 2012).

A GPx4 által katalizált reakció során a szelenociszteinekből disszociált szelenolt (-Se-) egy hidroperoxid oxidálja, amelynek hatására szelénsav (-SeOH) és víz jön létre. A szelénsav reakcióba lép a szabad tiol (-SH) csoportokkal, tipikusan a GSH-val, amelynek során egy átmeneti szelenenil-diszulfid jön létre, amelyet viszont egy második GSH molekula redukál (Conrad, 2009).

A GPx4 enzimet egyesek „*Moonlighting*” fehérjének tartják, amelyek jellemzői, hogy egyidejűleg több esszenciális funkciót is betöltenek a szervezetben (Jeffery, 1999). Ennek azonban némiképp ellentmond az a tény, hogy a GPx4, egyéb hatásai mellett, szerepet játszik ugyan az oxidatív stressz indukálta apoptózis megelőzésében (Seiler et al., 2008), de az a hatás végeredményben egy oxidatív stresszre adott válaszreakció része, így nem tekinthető független hatásnak. Feltételezhető ezen a redox-szabályozott, sejthalál útvonalon keresztül, hogy a GPx4 aktivitásnak preventív szerepe lehet egyes neurodegeneratív kórképekben, így pl. az Alzheimer betegségben (Yoo et al., 2010).

Ugyanakkor a GPx4 mRNS-nek, *alternatív splicing* révén, több különböző típusa is létezik, a nukleáris (nGPx4), a mitokondriális (mGPx4) és a citoszol (cGPx4) izoformák. A citoszol izoforma az embrionális fejlődés során, és felnőtt szövetekben is széleskörben expresszálódik. A nukleáris és a mitokondriális izoformák azonban kizárólag a herében fordulnak elő (Noblanc et al., 2011). Ennek a formának tehát, antioxidáns hatása mellett, szerepe lehet a spermiumok védelmében az érés folyamataiban (Ursini et al. 1999; Schneider et al., 2009; Liang et al., 2009), valamint az embrionális fejlődésben (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003; Liang et al., 2009). Ez utóbbit az a megfigyelés támasztja alá, hogy cGPx4 knock-out egérembriók már az embrionális fejlődés korai szakaszában elpusztulnak (Yant et al., 2003; Liang et al., 2009), míg a nGPx^{-/-} és mGPx^{-/-} egérembriók életképesek voltak (Noblanc et al., 2011). A spermium érés korai szakaszában a GPx4 expressziója és katalitikus aktivitása egyaránt nagy, később azonban inaktíválódik és szerkezeti elemként működik. A GPx4, szulfhidril keresztkötések kialakítása révén nagy molekulatömegű polimereket hoz létre, ugyanis intramolekuláris szelenil-szulfid hidakat képez a Cys és Sec reziduumokkal. Ez a szerkezeti elem, valamint a *Sperm Mitochondrion-associated Cysteine-rich Protein* (SMCP) védő kapszulát alkot a spermium középrészén, a mitokondrium-spirál körül (Maiorino et al., 2005; Labunskyy et al., 2014). A mGPx4 knock-out hím egereket teljes infertilitás jellemzi, az enzim gametogenezisben betöltött szerepe miatt (Schneider et al., 2009). Nukleáris GPx4 knock-out egerekben viszont ilyen hatás nem volt tapasztalható (Conrad et al., 2005), valamint a GPx1 és GPx2 esetén sem tapasztaltak ehhez hasonló hatásokat (Zoidis et al., 2010).

Az emlősökkel ellentétben, ahol a GPx4 aktivitás az összes GPx aktivitás kevesebb, mint 2%-a, madarakban ennek mértéke az összes GPx aktivitásban jelentősen nagyobb mértékű (ld. később) (Barnes et al., 2009). Ennek a filogenetikai különbségnek a hátterében, amely mind génexpressziós, mind pedig enzimaktivitás szinten megmutatkozik, az evolúció során megváltozott szerkezetű és/vagy funkciójú szelenogenom állhat (Huang et al., 2011).

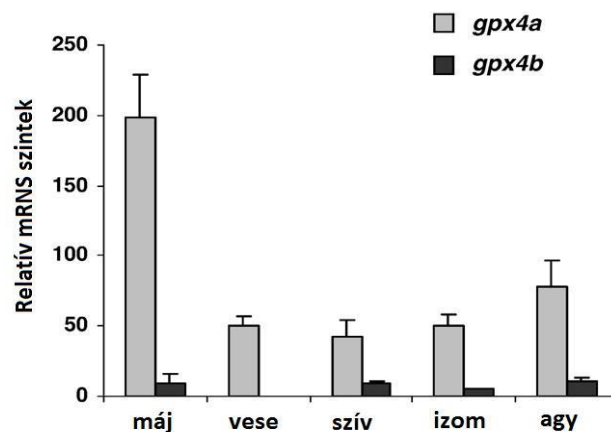
Brojlercsirkék májában az összes peroxidáz-aktivitás 30%-a szelén-dependens (GPx), 42% szelén-independens (GST), míg a „monomer” GPx (GPx4) aktivitás 28%, amelyből látható, hogy a GPx4 az összes GPx aktivitás közel 50%-áért felelős (Miyazaki és Motoi, 1992). Pulykában szintén a GPx4 felelős az összes GPx aktivitás közel feléért a májban, harmadáért az izomban, hereszövetben és a szívizomban (Sunde és Hadley, 2010).

Megállapították brojlercsirkék májában és vázizomzatában, hogy a *Gpx4* génexpressziója a legnagyobb mértékű a szelenoproteinek között (Huang et al., 2011). A mellizomban a *Gpx1*-hez viszonyítva a *Gpx4* génexpressziója még nagyobb (1:6) volt. A génexpresszió mértékét azonban az aktuális szelénellátottság is befolyásolta. Megfelelő szelénellátottság esetén 1:6 arányú volt a *Gpx4* javára, addig a *Gpx4* részaránya szelénhiányos állapotban tovább nőtt (Yao et al., 2014). Tojótúkoknál is hasonlóan magasabb arányú expressziós szinteket mértek a *Gpx4* esetében (Liu et al., 2014).

A glutation-peroxidázok halakban betöltött funkcióiról és az enzimek génexpressziójáról jelenleg még kevés információ áll rendelkezésünkre (Kryukov és Gladyshev, 2000, Thisse et al., 2003). Azonban számos halfaj genomjában azonosították már az enzimes család több tagját kódoló géneket is (Benner et al., 2010; Mariotti et al., 2012).

Pontyban a *Gpx4* génexpressziója a májban a legnagyobb mértékű, ezt követi az agy, majd közel azonos mértékben, a vázizom, a vese és a szív (10. ábra) (Hermesz és Ferencz 2009).

Thisse és munkatársai (2003) a *Gpx4* gén két formáját (*Gpx4a*, *Gpx4b*) azonosították zebradánióban (*Danio rerio*). Hermesz és munkatársai (2009) szintén két *Gpx4* gént azonosítottak pontyban (*Cyprinus carpio L.*).



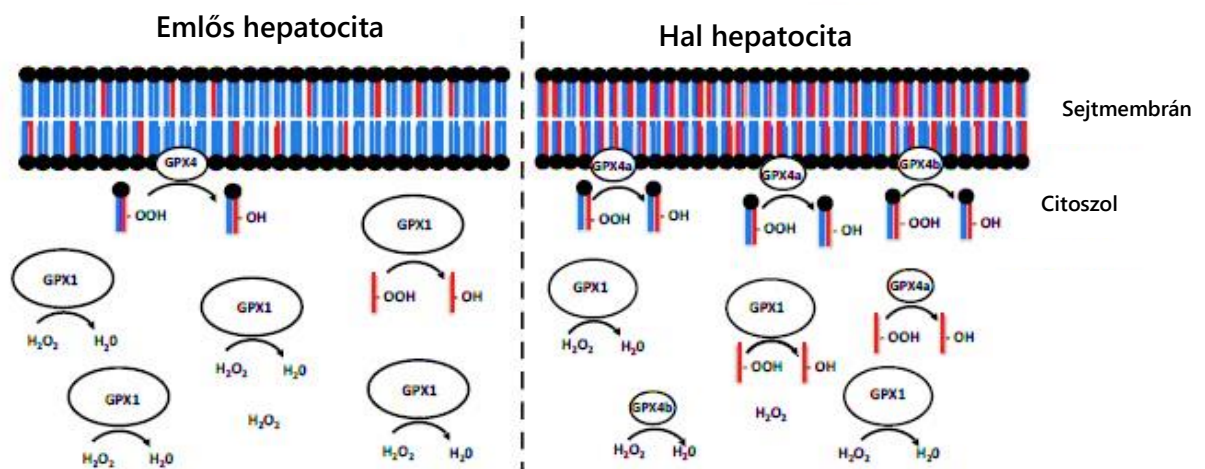
10. ábra Relatív *Gpx4a* és *Gpx4b* mRNS szintek ponty májban, vesében, szívben, izomban és agyban (Ferencz 2010)

Halakban a GPx4 a teljes GPx aktivitás közel egyharmadáért felelős (Grim et al., 2011; Wang et al., 2012). Pontyban azt is megállapították, hogy a *Gpx4a* mRNS szintje a májban a legmagasabb, míg a *Gpx4b* szint alacsony volt az összes vizsgált (10. ábra) szövetben (Hermesz 2010). Zheng és munkatársai (2013) szintén azt találták, hogy a *Gpx4a* mRNS legnagyobb mennyiségben a zebradánió májában található meg. Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) májában a *Gpx1* mRNS mennyisége csak egyharmada volt a *Gpx4a* és a *Gpx4b* mRNS-hez viszonyítva (Pacitti et al., 2013), ellentétben az emlős máj GPx1 mRNS mennyiséggel, ami közel 7-szer nagyobb volt, mint a GPx4 (Weiss et al., 2001).

Halak szöveteiben az emlősökkel összehasonlítva az oxidációra érzékeny többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége (pl. DHA és EPA) jóval nagyobb (Mahaffey, 2004). Ennek alapján feltételezhető, hogy a sejtmembránokban található többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációval szembeni védelmére is nagyobb GPx4 aktivitás szükséges, amelyet az is alátámaszt, hogy pozitív korrelációt figyeltek meg a GPx4 aktivitás és a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége között különböző halfajokban (Grim et al., 2011).

Emlős sejtekkel összehasonlítva, halak májsejtjeinek membránjában a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (LcPUFA) (11. ábra) mennyisége nagyobb, mint a rövid szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavaké (PUFA), vagy akár az egyszerűen telítetlen és telített zsírsavaké (11. ábra) (Morais et al., 2011). A LcPUFA-k rendkívül érzékenyek az oxidációra, ami lipid(per)oxidációs láncreakcióhoz vezethet, károsítva ezzel a sejtmembránt (Abedi és Sahari, 2014). Mint arra korábban már utaltam, a GPx1 és a GPx4 izoforma egyaránt képes a peroxidok redukciójára, ugyanakkor a GPx4 szélesebb szubsztrátspecifitással rendelkezik (pl. lipidperoxidok) (Bao et al., 1997; Yant et al., 2003; Liang et al., 2007). Emiatt a halak számára előnyösebb, ha a glutation redox rendszerben a GPx1 mellett a multifunkcionális GPx4 paralógok nagyobb arányban vannak jelen (Penglase 2014).

A GPx rendszer működése



11. ábra Emlős és hal GPx rendszer működésének elméleti modellje a hepatocitákban: Halak esetén a membránban általában nagyobb mennyiségben vannak jelen a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak, amelyek fokozottan érzékenyek az oxidációra. A GPx4 hatékonyabban eliminálja a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavakból ROS hatására keletkező lipidperoxidokat, mint a GPx1, emiatt az emlősökhöz képest nagyobb mennyiségben van szükség halaknál ennek az enzimnek a jelenlétére (Penglase 2014). Piros vonal: hosszú szénláncú telítetlen zsírsavak (LcPUFA); kék vonal: egyszerűen telítetlen és telített zsírsavak

A GPx enzimes család következő tagja a mellékhere-specifikus GPx5 (Ghyselinck et al., 1989), amelynek aktív centrumában szelenocisztein helyett cisztein található, azaz nem szelenoprotein. Sec-tartalmú GPx5 formát nem azonosítottak (Mariotti et al., 2012). Elsődleges funkciója, hogy védje a spermatozoákat az oxidatív stressz okozta károsodásoktól, amely károsíthatja a membrán integritását, továbbá csökkentenék a spermiumok motilitását, így csökkenne a sperma minősége és termékenyítőképessége (Chabory et al., 2009).

A szaglóhám specifikus GPx6 (Dear et al., 1991) a szaglólebens epitheliumában expresszálódik, és érdekessége, hogy emberben szelenocisztein, rágsálókban pedig cisztein található az aktív centrumában, és expresszálódik az embrionális fejlődés során is (Kryukov et al., 2003).

A GPx5 és GPx6 enzimek a GPx család fiatalabb tagjai, amelyek feltehetően a GPx3 tandem duplikációja révén alakultak ki az evolúció során (Mariotti et al., 2012).

Az enzimes család két, utoljára azonosított tagjának aktív centruma szintén ciszteint tartalmaz. A GPx7-et először emlő tumor sejtekből izolálták (Utomo et al., 2004), amelynek szubsztrátjai a GPx4-hez hasonlóan a foszfolipid-hidroperoxidok. A legújabban felfedezett humán GPx8 (Toppo et al., 2008) szerkezete alapján a GPx-ok családjába tartozik ugyan, de ko-szubsztrátja GSH helyett a tioredoxin.

A Cys tartalmú GPx7 és GPx8 vélhetően az ősi GPx4-ből fejlődött ki, még mielőtt a halak és a többi gerinces fejlődése kettévált a törzsfejlődés során (Mariotti et al., 2012).

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Mikotoxinok termeltetése és a kísérletesen szennyezett takarmányok elkészítése

4.1.1 Mikotoxinok termeltetése

A kísérletekhez felhasznált mikotoxinok termelését kollaboráció keretében a KE-MTA „Mikotoxinok Az Élelmiszerláncban” kutatócsoport végezte kukoricadara szubsztráton. A T-2 toxin esetében a *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 törzset, míg a deoxinivalenol (DON) esetében a *Fusarium graminearum* NRRL 5883 törzset alkalmazták, amelyek korábbi vizsgálatok eredményei alapján elsődlegesen csak az adott mikotoxint termelik, egyéb mikotoxinok jelenlétével a takarmányban csak mérsékelten kell számolni.

4.1.2 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése

A brojlercsirkékkel folytatott kísérletek során az ismert koncentrációban trichotecénvázas mikotoxinokat tartalmazó kukoricadarát a tervezett koncentráció eléréséhez szükséges mennyiségben kevertük a különböző csoportok brojler nevelő teljes értékű takarmánykeverékéhez. Az alaptakarmány T-2 toxint és DON-t, valamint azok metabolitjait, előzetesen elvégzett laboratóriumi vizsgálattal ellenőrizve, csak minimális mennyiségben tartalmazott.

A pontyokkal végzett kísérlet során kereskedelmi forgalomban lévő Aqua Garant Classic™ takarmányt (extrudált, lassan süllyedő takarmány növendék pontyok számára) nagy teljesítményű darálóval ledaráltuk majd a T-2 toxint vagy DON-t ismert koncentrációban tartalmazó kukoricadarával kevertük össze. Az alaptakarmány T-2 toxint és DON-t, valamint azok metabolitjait, előzetesen elvégzett laboratóriumi vizsgálattal ellenőrizve, ebben az esetben is csak minimális mennyiségben tartalmazott. Az egyes kezelési csoportok adagjait közvetlenül felhasználás előtt 1:4 arányban desztillált vízzel hígítottuk, annak érdekében, hogy gyomorszondán keresztül adagolható legyen. Kontrollként az alaptakarmány vizes keverékét (1:4) alkalmaztuk.

Mindkét kísérletsorozathoz metil-narancs indikátorral, mint a bélcsatornából fel nem szívódó, nem toxikus, jelzőanyaggal, 1% w/w-ban kiegészített kontroll takarmányt készítettem, amely a tranzit idő meghatározására szolgált.

Mindkét kísérletsorozatnál a kontroll takarmányból, valamint a kísérletes mikotoxin szennyezést követően, mintát vettem mikotoxin analízis céljára.

4.1.3 A takarmányok mikotoxin tartalmának meghatározása és annak módszere

A mesterségesen szennyezett és a kontroll takarmányok DON (Pussemier et al., 2006) és T-2 toxin (Trebstein et al., 2008)) tartalmának mérése immunaffinitás előtisztítást követően nagy felbontású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel történt. A mérési eredményeket a 4. táblázat és az 5. táblázat mutatja.

4. táblázat A pontyokkal végzett kísérletekben felhasznált takarmányok mikotoxin tartalma (T-2 toxin – T1-T3 csoportok, DON – D1-D3 csoportok)

	Kezelési csoportok	Mennyiség (mg/kg takarmány)
Kontroll	Kontroll	T-2 < 0,02; DON < 0,02
T-2 toxinnal kezelt csoportok	T1 (alacsony)	10,79
	T2 (közepes)	23,67
	T3 (magas)	130,82
DON toxinnal kezelt csoportok	D1 (alacsony)	9,03
	D2 (közepes)	22,15
	D3 (magas)	125,92

5. táblázat Az 1 és 3 hetes csirkékkel végzett kísérletekben felhasznált takarmányok mikotoxin tartalma

Mikotoxin	Mennyiség (mg/kg takarmány)
Kontroll	T-2 < 0,02; DON < 0,02
T-2 toxin	5,77
DON	4,86

4.2 Kísérleti állatok/kísérleti protokollok

4.2.1 A vizsgálat helyszíne

Vizsgálataimat a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattudományi Alapok Intézet Takarmányozástani Tanszékén végeztem. A brojlerszárvasokkal és pontyokkal folytatott takarmányozási kísérletek színhelye a Tanszék Kísérleti Tere volt, amely mikotoxinokkal végzendő vizsgálatokhoz szükséges állatkísérleti engedéllyel rendelkezik (NÉBIH Pest Megyei Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, XIV-1-001/1880-5/2011).

4.2.2 Kísérleti állatok és tartásuk – pontyok

A vizsgálataimhoz Szarvasi P34 hibrid pontyokat (n=160) alkalmaztam, amelyeket az ÖKO 2000 Kft.-től szereztem be. Egy hét akklimatizációt követően a pontyokat véletlenszerűen osztottuk (kontroll és mikotoxinokkal kezelt) csoportokba (n=22), a tartás két alcsoportra bontva történt összesen 14, azonos ürtartalmú (150 L) akváriumokban. A kontroll és kezelt akváriumokba az esetleges mortalitás miatt 22 halat helyeztünk, amelyből a mintázott állatok száma 18 volt a vizsgált 24 órás periódus alatt. A random csoportosítás közben véletlenszerűen 6 állatot abszolút kontrollként mintáztunk a 0. időpontban, továbbá 6 egyedet a tranzitidő megfigyelésére elkülönítettünk. A kísérlet 2014. november végén (29-30.) zajlott.

A halakat fél-statikusan rendszerben, naponta 30% mértékű vízcserével, pihentetett, folyamatosan átlevégőztetett csapvízben tartottuk az akklimatizációs idő alatt, és statikus rendszerben, pihentetett, folyamatosan átlevégőztetett csapvízben a kísérlet időtartama alatt. A víz hőmérséklete folyamatosan 19 ± 1 °C volt. A megvilágítási programot 12:12 óra sötét/világos szakaszokra állítottuk be. Az állatok testtömege a kísérlet indításakor $35,92 \pm 2,82$ g volt. A takarmány tranzitidejének felmérésére, egy külön akváriumban, egyszeri adagban metil-narancssal kiegészített takarmánnyal gyomorszondán át kezelt kontroll állatokat is beállítottunk (n=6). A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok a 6. táblázatban láthatóak.

6. táblázat A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok az egyes csoportokban (mg/kg testtömeg)

Kezelési csoport	Kontroll	T1 (alacsony)	T2 (közepes)	T3 (magas)
T-2	< 0,02	0,15	0,33	1,82
Kezelési csoport	Kontroll	D1 (alacsony)	D2 (közepes)	D3 (magas)
DON	< 0,02	0,13	0,31	1,75

4.2.3 Kísérleti állatok és tartásuk – brojlercsirkék

Vizsgálataimhoz a naposcsibéket (Cobb 540 kakas n=230) a Babádi Keltető Kft.-től szereztük be, amelyek átlagos testtömege 50 g volt. A kísérlet 2013. május-júniusában zajlott. A madarakat az adaptációs idő alatt faforgács almon neveltük, majd egy hetes életkor előtt, 5 naposan az állomány egy részét (n=100), 3 hetes életkor előtt, 19 naposan pedig annak másik részét (n=100) csoportosítottuk és 2-2 napig akklimatizációs időt követően indítottuk el a kísérletet. A csoportosításkor mérlegeléssel meghatároztuk az egyes csoportokba került madarak testtömegét, ügyelve arra, hogy az egyes kísérleti csoportok között az átlagos testtömeg ne térjen el 5%-nál nagyobb mértékben. Az egyes kísérleti csoportokba tartozó madarakat (n=30, a kontroll és a mikotoxinokkal kezelt csoportokban egyaránt) két alcsoportra (n=15) bontva helyeztük el a brojler kísérlet helyszínéül szolgáló teremben. Alományként minden csoport esetében fenyőfa forgácsot használtunk. Az ivóvizet és a takarmányt a madarak *ad libitum* fogyaszthatták, folyamatos megvilágítás mellett. A takarmány adott életkorú brojlercsirkék bélcsatornáján való áthaladási idejének felmérésére egy külön, metilnarancs indikátorral kiegészített kontroll takarmányt fogyasztó, csoportot is beállítottunk (n=5), továbbá 5 véletlenszerűen kiválasztott állatot a 0. időpontban abszolút kontrollként mintáztunk. A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok az egyes korcsoportokban a 7. táblázatban láthatóak.

7. táblázat A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok az egyes korcsoportokban (mg/kg testtömeg)

1 hetes állatok		
Kontroll	T-2 toxin	DON
(T-2 < 0,02; DON < 0,02 mg/kg takarmány)	1,35	1,75
3 hetes állatok		
Kontroll	T-2 toxin	DON
(T-2 < 0,02; DON < 0,02 mg/kg takarmány)	0,77	1,29

4.3 Mintavételezés

4.3.1 Pontyokkal végzett vizsgálatok

A kísérlet indulásakor (reggel 14:00) (n=6, abszolút kontroll), majd az egyszeri mikotoxin terhelést követő 8., 16 és 24. órában kezelésként, véletlenszerűen kiválasztott, 6-6 állatból került sor mintavételre. A dekapitációt követően a halakból *post mortem* máj mintát vettem a biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. A biokémiai vizsgálatokhoz a máj mintákat a lefagyasztásig (maximum 2 óra) jégen tartottuk, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a májmintákat a mintavételt követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, majd a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.3.2 Brojlersirkékkel végzett vizsgálatok

A kísérlet indulásakor (reggel 8:00) (n=5, abszolút kontroll), majd a mikotoxinnal szennyezett takarmány etetésének megkezdését követő 4., 8., 12., 16., 20 és 24. órában kezelésként, véletlenszerűen kiválasztott, 5-5 állatból került sor mintavételre. A madaraktól az elvéreztetést követően *post mortem* máj és vese mintát vettem a biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. A biokémiai vizsgálatokhoz a máj mintákat lefagyasztásig (maximum 2 óra) jégen tartottuk, majd a felhasználásig -80°C-on tároltuk. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a májmintákat a mintavételt követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, majd a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.4 Biokémiai módszerek

4.4.1 A lipidperoxidációs markerek mérési módszerei

4.4.1.1 A konjugált dién és -trién tartalom meghatározása

A konjugált dién és -trién tartalmat a májból az AOAC (1984) módszere szerint határoztuk meg. A módszer lényege, hogy a minta lipidtartalmának 2,2,4-trimetil-pentánnal történt extrakcióját követően a konjugált diének abszorbanciája 232 nm-en, míg a -triének abszorbanciája 268 nm-en mérhető.

4.4.1.2 A malondialdehid koncentráció mérése

A malondialdehid a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjának terminációs szakasza során keletkező metastabil végtermék. A szövetmintákból hideg (4 °C) fiziológiás sóoldattal (hal: 0,62% (w/v) NaCl; madár: 0,65% (w/v) NaCl) készített 1:9 arányú homogenátum MDA koncentrációját a Placer és munkatársai (1966) által kidolgozott, Matkovics és munkatársai (1988) által részben módosított módszerrel mértem. A módszer alapelve, hogy az MDA 2-tiobarbitursavval (Sigma, St. Louis) savanyú közegben és magas hőmérsékleten sárgás-vörös színű komplexet képez, amelynek 535 nm-en abszorpciós maximuma van, így spektrofotometriásan mérhető. Az inkubációs rendszer pH értékének beállítására 10 % (w/v) triklór-ecetsavat (Carlo Erba, Rodano) használtam. A reakcióidő 20 perc volt 100 °C-on, vízfürdőben. Szobahőmérsékletre történő gyors lehűtést, majd centrifugálást (2500g, 10 perc, +4°C) követően a felülúszóból reagens vakkal szemben mértem a minták abszorbanciáját. Standardként 1,1,3,3-tetra-etoxi-propánt (Fluka, Buchs) használtam. Az eredményeket MDA koncentráció egyenértékben adtam meg, bár ismert, hogy a 2-tiobarbitursav a MDA mellett más aldehidekkel is reakcióba lép (Janero, 1998).

4.4.2 *A glutation redox rendszer tagjainak mérési módszerei*

4.4.2.1 Redukált glutation koncentráció meghatározása

A redukált glutation koncentrációt a szövetmintákból fiziológiás sóoldattal (hal: 0,62% (w/v) NaCl; madár: 0,65% (w/v) NaCl) készített 1:9 arányú homogenátum 10.000 g szupernatans frakciójában Sedlak és Lindsay (1968) módszerével mértem. A módszer alapját a glutation szabad SH- csoportjának szulfhidril-reaktív vegyületekkel való színes komplexképző reakciója adja. A mérés során a minták fehérje SH tartalmát 10% (w/v) triklór-ecetsavval (Carlo Erba, Rodano) végzett kicsapással távolítottam el, majd centrifugálást (10000 g, 2 perc) követően a tiszta felülúszóból mértem, amely szinte kizárólag a nem-fehérje szulfhidril csoportokat, elsődlegesen a GSH-t, tartalmazza. A reakció során szulfhidril-reagensként 5,5-dithiobis-(2-nitro-benzoészav) (Sigma, St. Louis) alkalmaztam, amely sárga színű komplexet képez a reaktív nem-fehérje SH-csoportokkal. Ezt követően a GSH koncentráció a komplex fényelnyelésének 412-es nm-es hullámhosszon, az abszorbancia mérésével meghatározható. A komplex kialakulásához szükséges lúgos közeget a trisz-hidroximetil-aminometán (Sigma, St. Louis) pufferrel (pH: 8,9) állítottam be. A GSH koncentrációt a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtam meg.

4.4.2.2 A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása

A GPx aktivitását szintén a szövetek 1:9 homogenátum 10.000 g szupernatans frakciójában határoztam meg. A módszer alapelve, hogy a reaktív oxigéngyökök jelenlétében a GSH a glutation-peroxidáz enzim hatására oxidáló ko-szubsztrát jelenlétében glutation-diszulfidddá oxidálódik. Vizsgálati rendszeremben az enzim ko-szubsztrátjai GSH (Sigma, St. Louis) és egy stabil szerves peroxid, a kumul-hidroperoxid (Merck, Darmstadt) voltak. A végpontos enzimreakció időtartama 10 perc volt, amelyet 10% (w/v) triklór-ecetsavval (Carlo Erba, Rodano) végzett fehérjekicsapással állítottam le (Matkovics et al., 1988). A GSH-fogyást az 5,5-dithiobis-(2-nitro-benzoészav)-val (Sigma, St. Louis) képzett komplex fényelnyelésének 412 nm hullámhosszon spektrofotométerrel, az abszorbancia mérésével határoztam meg. Az enzimaktivitást egységben fejeztem ki, amely 1 nmol GSH oxidációját jelenti percenként a használt rendszerben 25 °C-on. Az enzimaktivitást a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtam meg.

4.4.2.3 A fehérjekoncentráció mérése

A szövet 1:9 homogenátumok 10.000 g szupernatans frakciójának fehérjetartalmát a Folin-fenol reagens (Sigma, St. Louis) fehérjékkel adott színreakciója alapján mértem (Lowry et al., 1951). A módszer két reakción alapul, először a Cu(II) ionok Cu(I) ionná redukálódnak, majd a következő lépés során a tirozin és triptofán reziduumok redukálják a Folin-Ciocalteu-reagens reaktív komponenseit (foszfor-molibdát és foszfor-wolframát), jól detektálható kék színt eredményezve, melynek 750 nm-en abszorpciós maximuma van. Standardként szarvasmarha szérum albumint (Reanal, Budapest) használtam.

4.5 Génexpressziós vizsgálatok

4.5.1.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR

A kísérleti állatok májmintáiból, 5 mg szövetből Trizol reagenssel (Molecular Research Centre, Cincinnati) teljes RNS-t tisztítottam, Phase Lock Gel (5Prime GmbH, Hamburg) csövek segítségével, a gyártó előírásai szerint. Az RNS-t jéghideg izopropanolban kicsaptam, majd 75% (v/v) etanollal mostam, végül RNáz-mentes vízben vettem fel. Az RNS koncentrációját, tisztaságát és integritását 2%-os agaróz gélben és nanofotométer (Implen GmbH, Munich) segítségével vizsgáltam, ahol az OD 260/280 mutató esetén a 2.0 érték feletti mintákat fogadtam el. A genomi DNS szennyeződést DNáz (Thermo Fisher Scientific, San Jose) kezeléssel távolítottam el, a gyártó leírása alapján. Mintánként 1000 ng RNS-ből random nonamerrel (9-mer) reverz transzkripció során (RevertAID Reverse transcriptase, Thermo Fisher Scientific, San Jose) cDNS-t hoztam létre mindkét vizsgált faj esetén. A cDNS-ből kezelési csoportonként poolokat hoztam létre, egyedenként azonos mennyiségű cDNS-ből (pontyok esetén n=6, brojlercsirkék esetén n=5), amelyből a qPCR méréseket végeztem.

4.5.1.2 Real-time PCR vizsgálatok pontyban

Az *Nrf2* (*Nrf2*), *Keap1* (*Keap1*) és a glutation-peroxidáz 4a és b (*Gpx4a* és *Gpx4b*) célgének, valamint a β -actin háztartási gén, expresszióját kvantitatív, real-time PCR-rel vizsgáltam, SYBRGreen módszerrel. A vizsgálatokhoz az irodalomban leírt primereket használtam fel (Hermesz és Ferencz, 2009; Jiang et al., 2015) (8. táblázat). A méréseket Step One Plus™ Real-Time PCR systems (Thermo Fisher Scientific, San Jose) készüléssel végeztem, Maxima SYBRGreen qPCR Master Mix (1x final concentration) felhasználásával (Thermo Fisher Scientific, San Jose), 5 ismétlésben. A vizsgálat során 12,5 μ l végtérfogatban 2,31 μ M/l primert és 5 ng cDNS-t használtam templáknént. Minden mérés alkalmával primer páronként beállítottam egy non-template kontrollt is. A qPCR hőmérsékleti profil a *Gpx4a* és *Gpx4b* génekre: 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95°C 15 sec, 55°C 30 sec és 72C 30 sec, 45 cikluson keresztül ismételve, míg az *Nrf2* és a *Keap1* célgének esetében 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95°C 15 sec, 60°C 30 sec és 72°C 30 sec, 45 cikluson keresztül. A SYBERGreen jelet minden ciklus extenzió-lépésének végén detektálta a berendezés.

8. táblázat Ponty primerek szekvenciái

Gén	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>β-actin</i>	GCAAGAGAGGTATCCTGACC	CCCTCGTAGATGGGCACAGT
<i>Gpx4a</i>	GGAACCAGGAACAAATTCCC	AGATCCTTCTCCACCACGCTTG
<i>Gpx4b</i>	CTACAAGGCAGAGTTTGACCTC	CTTGGATCGTCCATTGGTCC
<i>Nrf2</i>	TTCCCGCTGGTTTACCTTAC	CGTTTCTTCTGCTTGTCTTT
<i>Keap1</i>	GCTCTTCGAAACCCCT	GCCCCAAGCCCACTACA

4.5.1.3 Real-time PCR vizsgálatok házityúkbán

A *Gpx4*, a *Gss* és a *Gsr* célgénnek valamint a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*Gapdh*) belső kontroll gén expresszióját kvantitatív, real-time PCR-rel vizsgáltam, duplex qPCR módszerrel. Belső kontrollgénként, irodalmi adatok alapján választottam a *Gapdh* gént (Yang et al., 2016; Awad et al, 2011). A célgénekre és a háztartási génre tervezett specifikus primerek és eltérő fluoreszcens festékekkel jelölt (8. táblázat) *dual labelled* (MGB- *minor groove binder*) TaqMan próbák lehetővé tették két géntermék egyidejű vizsgálatát. A primereket és próbákat Primer Express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, San Jose) szoftver segítségével terveztem (9. táblázat).

A méréseket Step One Plus™ Real-Time PCR systems (Thermo Fisher Scientific, San Jose) készülékkel végeztem, Maxima Probe qPCR Master Mix (1x final concentration) felhasználásával (Thermo Fisher Scientific, San Jose) 5 ismétlésben. A vizsgálat során 12 µl végtérfogatban 5 ng cDNS-t használtam fel az 11. táblázatban feltüntetett duplex reakciókhoz. Minden mérés alkalmával, duplexenként, egy non-template kontrollt is beállítottam. A qPCR hőmérsékleti profil a következő volt: 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95°C 15 sec, 58°C 30 sec és 72°C 30 sec, 45 cikluson keresztül. A VIC és FAM jelet 72°C-on olvasta le a berendezés minden ciklusban az extenzió-lépésének végén.

9. táblázat Brojlerscirke primerek szekvenciái

gén	forward primer	reverse primer
<i>Gapdh</i>	TGACCTGCCGTCTGGAGAAA	TGTGTATCCTAGGATGCCCTTCAG
<i>Gpx4</i>	AGTGCCATCAAGTGGAACTTCAC	TTCAAGGCAGGCCGTCAT
<i>Gss</i>	GTACTIONACTGGATGTGGGTGAAGA	CGGCTCGATCTTGTCCATCAG
<i>Gsr</i>	CCACCAGAAAGGGGATCTACG	ACAGAGATGGCTTCATCTTCAGTG

10. táblázat A próbák szekvenciái és jelölése

gén	próba	elnyelő molekula	fény kibocsájító fluorofor
<i>Gapdh</i>	CCAGCCAAGTATGATGAT	MGB	VIC
<i>Gpx4</i>	CAGCCCAATGGAG	MGB	FAM
<i>Gss</i>	AGGAGGGAACAACCTG	MGB	FAM
<i>Gsr</i>	CTGGCACTTCGGCTC	MGB	FAM

11. táblázat A duplexek alkalmazása

Duplex	<i>GAPDH</i> primer (pM/µl)	<i>GAPDH</i> próba (pM/µl)	Célgén primer (pM/µl)	Célgén próba (pM/µl)
<i>Gapdh</i> és <i>Gpx4</i>	2,40	1,3	2,90	2,1
<i>Gapdh</i> és <i>Gss</i>	0,66	0,66	3,96	3,3
<i>Gapdh</i> és <i>Gsr</i>	0,66	0,66	3,96	3,3

4.5.2 *Real-time PCR eredmények kiértékelése*

A PCR termék specifitását és a primer dimerek jelenlétét TaqMan próbák esetén gélelektroforézis, míg a SYBRGreen módszer esetén gélelektroforézis és olvadási görbe (*melting-curve*) analízis segítségével ellenőriztem. A Ct értékeket a cél- és kontroll gének esetén is a StepOne™/StepOnePlus™ (v2.2) Szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, San Jose) határoztam meg és számítottam ki a delta Ct (ΔCt) és a delta-delta Ct értékeket ($-\Delta\Delta Ct$), végül az RQ (relatív kvantifikáció; $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) értékeket számítottam (Livak és Schmittgen, 2001).

4.5.3 *Statisztikai értékelés*

A kísérleti eredmények statisztikai értékelését (leíró statisztikai számítások, egytényezős varianciaanalízis (ANOVA)) a GraphPad Prism 5.04 szoftver (*GraphPad Software Inc., San Diego, USA*); a kéttényezős varianciaanalízist (Two-Way ANOVA), *Student-Newman-Keuls post-hoc test*) a MedCalc for Windows 12.3 programmal végeztem (*MedCalc Software, Ostend, Belgium*). Az ANOVA értékelés alapján az egyes mintavételi időpontokon belül hasonlítottam össze az egyes csoportok értékeit paraméterenként, míg a Two-Way ANOVA eredményeként az egyes dózisos és az idő együttes hatását vizsgáltam a paraméterekben. Ennek eredményeképp megállapítható, hogy az időnek (H) és a kezelésnek (T), illetve a két tényezőnek együttesen (TxH) szignifikáns hatása van e az egyes paraméterekben bekövetkező változásokra.

A táblázatokban és ábrákon az „abc”, illetve a táblázatokban az „ABC” jelölés esetén minden esetben a legkisebb érték képviseli az „a” vagy „A” jelölést, majd azt abc sorrendben követik az emelkedő értékek.

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

5.1 Pontyokkal végzett kísérlet eredményei

5.1.1 A pontyokkal végzett kísérletben megállapított tranzitidő

A kísérletben beállított környezeti paraméterek mellett az egynyaras pontyok metilnarancs-kontroll csoportjában a takarmány bélcsatornán való áthaladásának tranzitideje 16 óra volt (19 ± 1 °C vízhőmérsékleten), amelyet a takarmány gyomorszondán való bejuttatását követően a vízben megjelenő első színes ürülék megjelenése alapján állapítottam meg.

5.1.2 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a pontyokra

A pontyokkal végzett egyszeri, gyomorszondán keresztül történt, mikotoxin terhelés során három, emelkedő dózisú, T-2 toxin kezelés hatását vizsgáltam a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereire, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségére/aktivására, valamint a glutation redox rendszer szabályozására, azon belül egyes kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének expressziójára. A kezelésekhöz felhasznált takarmányok mikotoxin tartalmát a 12. táblázatban tüntettem fel mg/kg testtömeg értékben, amelyet a mesterségesen szennyezett takarmány mikotoxin tartalmának laboratóriumi visszamérése alapján számítottam. A T1 kezelési csoportban 0,15; a T2 csoportban 0,33; a T3-ban 1,82 mg/kg testtömeg mikotoxin dózisokat alkalmaztam, amellyel célom az volt, hogy akut toxicitást érjek el. Az Európai Unió által javasolt T-2 toxin határérték 0,25 mg/kg takarmány (2013/165/EU ajánlás), mely kiindulási alapot nyújtott az alkalmazott dózisok megtervezéséhez. A 24 órás expozíciós idő alatt 8 óránként történtek a mintavételek.

12. táblázat A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok az egyes csoportokban (mg/kg testtömeg)

Kezelési csoport	Kontroll	T1 (alacsony)	T2 (közepes)	T3 (magas)
T-2	< 0,02	0,15	0,33	1,82

5.1.2.1 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a mortalitásra

A 24 órás vizsgálati idő alatt a legnagyobb dózissal kezelt T3 csoportban 19%-os mortalitást (4/21) tapasztaltam, míg az alacsonyabb dózisok esetén elhullás nem volt. A T3 csoportban két állat a vizsgálat 8. és 16. órája között, további két állat pedig a 16. és 24. óra között pusztult el.

5.1.2.2 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása lipidperoxidációs paraméterekre a májban

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (13. táblázat) és konjugált triének (14. táblázat) mennyisége a T-2 toxin terhelés hatására csak kismértékben változott a kontrollhoz viszonyítva. A CD mennyisége a 8. órában szignifikánsan nagyobb volt a T3 csoportban a kontrollhoz viszonyítva, ugyanakkor a későbbiekben ez a különbség már nem volt statisztikailag kimutatható, annak ellenére, hogy tendenciájában minden dózis esetén emelkedett a 16. órában. Az időnek erre a paraméterre csak kisebb mértékű hatása volt az egyes csoportokon belül, de a kontroll csoport esetében is tapasztaltam eltéréseket az egyes mintavételi időpontok, kiemelten a 16. és 24. óra között. A CD esetében a kontroll és a T3 csoportban az időnek szignifikáns mértékű hatása volt, azonban ennek tendenciája eltérő volt, a T3 csoport esetében ezt a különbséget a 8. órai megemelkedett érték idézte elő, míg a T1 és T2 csoportokban nem volt szignifikáns mértékű eltérés a mintavételi időpontok között. Ez a különbség azt jelzi, hogy a kontrollhoz képest a kezelt csoportokban a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszának időbeli tendenciája eltérő volt. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a

kezelés (T), az idő (H) és a kezelés x idő (TxH) hatása egyaránt szignifikáns mértékű volt erre a paraméterre.

A CT mennyisége (14. táblázat) a kontroll csoporthoz viszonyítva nem tért el szignifikáns mértékben, bár tendenciájában az alacsony és közepes dózis esetén emelkedett a 16. órában. Ebben a paraméterben a kontroll értékekben nem volt kimutatható eltérés az egyes mintavételi időpontok között, míg a kezelt csoportok közül a T1 csoportban a 8. órában emelkedett értéket tapasztaltam a többi mintavételi időponthoz képest. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T) és az idő (H) egyaránt szignifikáns hatással volt erre a paraméterre, a kezelés x idő (TxH) együttes hatása azonban nem volt szignifikáns mértékű.

A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA értékekben (15. táblázat) a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltam egyik T-2 toxinnal kezelt csoportban sem. Azonban tendenciájában az MDA érték megemelkedett a 8. órában az alacsony és magas, valamint a 16. órában a magas dózis esetén, míg a közepes dózis esetén csökkent a 24. órában. Ezen paraméter esetében a kontroll értékekben nem volt eltérés az egyes mintavételi időpontok között, míg a kezelt csoportok közül a T2 csoportban a 24. órában alacsonyabb értéket tapasztaltam a többi mintavételi időponthoz képest. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T) szignifikáns hatással volt erre a paraméterre, azonban az idő (H) és a kezelés x idő (TxH) együttesen azt már nem befolyásolta szignifikáns mértékben.

13. táblázat A CD mennyisége a pontyok májában a T-2 toxin terhelés hatására (OD 232nm) (átlag±SD; n=6*)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	0,310 AB ± 0,061	0,369 ^a AB ± 0,098	0,270 A ± 0,025	0,397 B ± 0,081	0,025
T1 (alacsony)		0,476 ^a A ± 0,124	0,332 A ± 0,076	0,430 A ± 0,135	T: 0,010
T2 (közepes)		0,348 ^a A ± 0,052	0,379 A ± 0,109	0,285 A ± 0,021	H: <0,001
T3 (magas)		0,532 ^b B ± 0,169	0,393 A ± 0,024	0,378 A ± 0,065	TxH: 0,017

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16. és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

14. táblázat A CT mennyiségének változása a pontyok májában a T-2 toxin terhelés hatására (OD 268 nm) (átlag±SD; n=6*)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	0,153 A ± 0,032	0,180 A ± 0,047	0,130 A ± 0,011	0,183 A ± 0,042	0,062
T1 (alacsony)		0,232 ^b B ± 0,058	0,159 A ± 0,033	0,197 AB ± 0,064	T: 0,020
T2 (közepes)		0,168 A ± 0,027	0,174 A ± 0,050	0,132 A ± 0,012	H: 0,002
T3 (magas)		0,181 A ± 0,056	0,136 A ± 0,019	0,133 A ± 0,019	TxH: 0,071

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16. és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

15. táblázat Az MDA tartalom alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására (malondialdehid $\mu\text{mol/g}$ nedves tömeg) (átlag \pm SD; n=6*)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	14,72A \pm 3,28	14,48 ^{ab} A \pm 2,81	12,62A \pm 3,27	13,69 ^{ab} A \pm 4,87	T: 0,001 H: 0,082 TxH: 0,136
T1 (alacsony)		19,02 ^b A \pm 4,93	13,73A \pm 2,91	14,39 ^b A \pm 4,60	
T2 (közepes)		12,62 ^a A \pm 1,20	13,15A \pm 4,35	8,28 ^a B \pm 1,27	
T3 (magas)		17,45 ^{ab} A \pm 4,52	17,64A \pm 4,47	15,91 ^b A \pm 2,07	

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között ($p < 0.05$)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16. és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

5.1.2.3 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer paraméterekre a májban

A T-2 toxinnal kezelt csoportokban a GSH tartalom (16. táblázat) a 16. órában szignifikáns mértékben emelkedett mindhárom csoportban, ami a 24. órára visszatért a kontroll csoport szintjére. A 16 órai emelkedés esetén a hatás tendenciájában dóziszfüggően emelkedett.

Ezen paraméter esetében a kontroll értékekben szignifikáns eltérés volt az egyes mintavételi időpontok között, ugyanis a 8. és 24. órában nagyobb értékeket tapasztaltam. A kezelt csoportok közül a T1 csoportban a 8. és 16. órában volt szignifikánsan nagyobb érték, míg a másik két kezelt csoportban az időnek volt minden mintavételi időpontban szignifikáns mértékű hatása, ugyanis már a 0. órától nagyobbak voltak az értékek. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttes hatása egyaránt szignifikáns mértékű volt erre a paraméterre.

A GPx aktivitásban (17. táblázat) a GSH-hoz hasonlóan, a 16. órában tapasztaltam szignifikáns mértékű emelkedést a kontrollhoz viszonyítva a T2 és T3 csoportokban, míg a legnagyobb dózissal kezelt, T3, csoportban már a 8. órában is emelkedő tendenciát tapasztaltam, amely viszont a 24. órára visszatért a kontroll szintre. A 16. órában a GPx aktivitás tendenciájában dóziszfüggően emelkedett az egyes csoportokban. Ezen paraméter esetében a kontroll értékekben is szignifikáns mértékű eltérés volt az egyes mintavételi időpontok között, a 8. és 24. órában ugyanis nagyobb értékeket tapasztaltam. A kezelt csoportok közül a T1 csoportban is a hasonló tendenciát mértem, azonban ebben a csoportban a 24. órában nem volt magasabb az érték. A T2 csoportban az idő előrehaladtával folyamatosan emelkedett az enzimaktivitása kísérlet ideje alatt, míg a T3 csoportban a 8. órai mintavételnél tapasztalt nagymértékű emelkedést követően csökkenő értéket mértem, amely azonban nem tért vissza a kiindulási (0. órai) szintre. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással volt erre a paraméterre.

16. táblázat A GSH tartalom alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=6*)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll		2,93 ^C \pm 1,32	1,48 ^A \pm 0,64	2,64 ^{ab} ^{BC} \pm 0,82	0,011
T1 (alacsony)	1,40 ^A \pm	2,87 ^C \pm 0,88	2,43 ^b ^{BC} \pm 0,55	1,75 ^a ^{AB} \pm 0,28	T: 0,003
T2 (közepes)	0,36	2,58 ^B \pm 0,25	2,81 ^b ^B \pm 0,99	3,27 ^b ^B \pm 1,02	H: <0,001
T3 (magas)		3,62 ^B \pm 0,85	3,32 ^b ^B \pm 1,01	3,18 ^b ^B \pm 0,76	TxH: 0,017

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16. és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

17. táblázat A GPx aktivitásának alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására (U/g 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=6*)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll		3,56 ^a ^B \pm 1,70	1,59 ^a ^A \pm 0,73	3,44 ^{ab} ^B \pm 1,13	0,005
T1 (alacsony)	1,45 ^A \pm	3,73 ^a ^B \pm 1,35	2,62 ^{ab} ^A \pm 0,86	2,36 ^a ^A \pm 0,48	T: 0,011
T2 (közepes)	0,21	2,91 ^a ^B \pm 0,55	3,57 ^b ^{BC} \pm 1,19	4,71 ^b ^C \pm 1,70	H: <0,001
T3 (magas)		5,42 ^b ^C \pm 1,44	3,54 ^b ^B \pm 1,18	3,07 ^{ab} ^B \pm 1,07	TxH: <0,001

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16. és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

5.1.2.4 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására

A *Keap1* gén expressziójában (18. táblázat) a 8. és 16. órában csak kismértékű tendenciaszerű változások jelentkeztek, majd a 24. órában szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva, de csak a nagyobb dózisokkal kezelt, T2 és T3 csoportokban.

Ezen paraméter esetében a kontroll értékekben is szignifikáns mértékű eltérést tapasztaltam az egyes mintavételi időpontok között, a 8. órában ugyanis alacsonyabb értéket mértem, míg a többi mintavételi időpontban a mért érték már nem tért el szignifikáns mértékben. Ezzel ellentétben a T1 csoportban minden mintavételi időpontban alacsonyabb értéket mértem a 0. órához viszonyítva, míg a T2 és T3 csoportokban csak a 8. és 16. órában volt alacsonyabb az érték, a 24. órában viszont már nem. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett a *Keap1* génexpressziójára.

Az *Nrf2* gén expressziójában (19. táblázat) a 16. órában a T3 csoportban csökkenést, míg a T1 csoportban a 24. órában emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva.

A kontroll értékekben is voltak szignifikáns mértékű eltérések az egyes mintavételi időpontok között, ugyanis a 8. és 24. órában kisebb, míg a 16. órában nagyobb értéket mértem. A T1 csoportban a 8. és 24. órában volt kisebb az érték, a T2 csoportban pedig a 16. órai mintavételnél mért nagyobb értéket a 24. órára erőteljes csökkenés követte. A T3 csoportban a 16. órában mértem

alacsonyabb értéket az összes többi mintavételi időponthoz képest. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is szignifikáns hatással volt az *Nrf2* génexpresszióra.

A *Gpx4a* gén expressziója (20. táblázat) a T2 és T3 csoportban már a 8. órában szignifikáns mértékben emelkedett a kontrollhoz viszonyítva, míg a 16. órában csak a T1 csoport esetében tapasztaltam emelkedést, a T2 és T3 csoportokban viszont a mért értékek visszatértek a kontroll szintre. A 24. órára azonban a T3 csoport esetében újabb, nagymértékű, emelkedést tapasztaltam, ami szignifikánsan eltért a kontroll csoporttól.

A mintavételi időpontok esetén a kontroll és a T1 csoportokban a 8. és 16. órában is nagyobb értéket mértem. A T2 csoportban viszont a 8. és 24. órában volt nagyobb az érték, a T3 csoportban pedig minden mintavételi időpontban meghaladta a mért érték a 0. órában mért expressziós szintet. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is szignifikáns mértékű hatással volt a *Gpx4a* gén expressziójára.

A *Gpx4b* gén (21. táblázat) esetében a T1 és T2 csoportban a 8. órában szignifikáns mértékű expresszió csökkenést tapasztaltam a kontrollhoz képest, míg a 16. órában a T1 csoportban, a 24. órában pedig, némiképp késleltetve, a T2 és T3 csoportok esetében is szignifikáns mértékű emelkedést figyeltem meg.

A kontroll csoportban a 8. és 16. órában magasabb értéket tapasztaltam az egyes mintavételi időpontok között. A T1 csoportban a 16. órában, a T2 csoportban pedig a 24. órában volt nagyobb az érték, míg a T3 csoportban a 8. és 24. órai mintavételi időpontokban volt nagyobb. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T) nem, az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttes hatása egyaránt szignifikáns mértékű volt a *Gpx4b* génexpressziójára.

18. táblázat A Keap1 gén expressziójának alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6*, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00B	0,68A± 0,18	0,86AB± 0,16	0,79 ^a AB± 0,35	0,033
T1 (alacsony)		0,56A± 0,14	0,57A± 0,11	0,45 ^a A± 0,14	T: 0,005
T2 (közepes)		0,46A± 0,13	0,67A± 0,09	0,93 ^b B± 0,20	H: <0,001
T3 (magas)		0,42A± 0,09	0,70A± 0,15	1,10 ^b B± 0,28	TxH: <0,001

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16. és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

19. táblázat Az *Nrf2* gén expressziójának alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6*, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00B	0,62A± 0,11	1,29 ^{bc} C± 0,32	0,42 ^a A± 0,10	<0,001
T1 (alacsony)		0,64A± 0,10	1,09 ^b B± 0,13	0,77 ^b A± 0,17	T: <0,001
T2 (közepes)		0,58B± 0,11	1,47 ^c D± 0,08	0,24 ^a A± 0,07	H: <0,001
T3 (magas)		0,58B± 0,14	0,32 ^a A± 0,09	0,55 ^a B± 0,07	TxH: <0,001

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16, és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

20. táblázat A *Gpx4a* gén expressziójának alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6*, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00A	4,88 ^a C± 0,73	2,11 ^a B± 0,52	1,19 ^a A± 0,33	<0,001
T1 (alacsony)		3,84 ^a B± 0,97	6,59 ^b C± 1,68	2,01 ^a A± 0,31	T: <0,001
T2 (közepes)		6,89 ^b C± 1,92	1,61 ^a A± 0,78	3,33 ^a B± 1,34	H: <0,001
T3 (magas)		7,18 ^b C± 1,20	3,40 ^a B± 0,94	13,66 ^b D± 2,26	TxH: <0,001

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16, és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

21. táblázat A *Gpx4b* gén expressziójának alakulása a pontyok májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6*, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00A	3,51 ^b C± 0,92	1,78 ^a B± 0,41	1,36 ^a AB± 0,29	<0,001
T1 (alacsony)		1,63 ^a A± 0,42	4,59 ^b B± 1,08	1,37 ^a A± 0,15	T: 0,648
T2 (közepes)		1,72 ^a A± 0,76	1,39 ^a A± 0,64	3,78 ^b B± 1,10	H: <0,001
T3 (magas)		2,29 ^{ab} B± 1,18	1,70 ^a AB± 0,45	2,99 ^b BC± 0,79	TxH: <0,001

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

*kivéve a T3 csoportot, ahol n=5 a 16, és 24. óras mintavételkor a jelentős mértékű mortalitás miatt

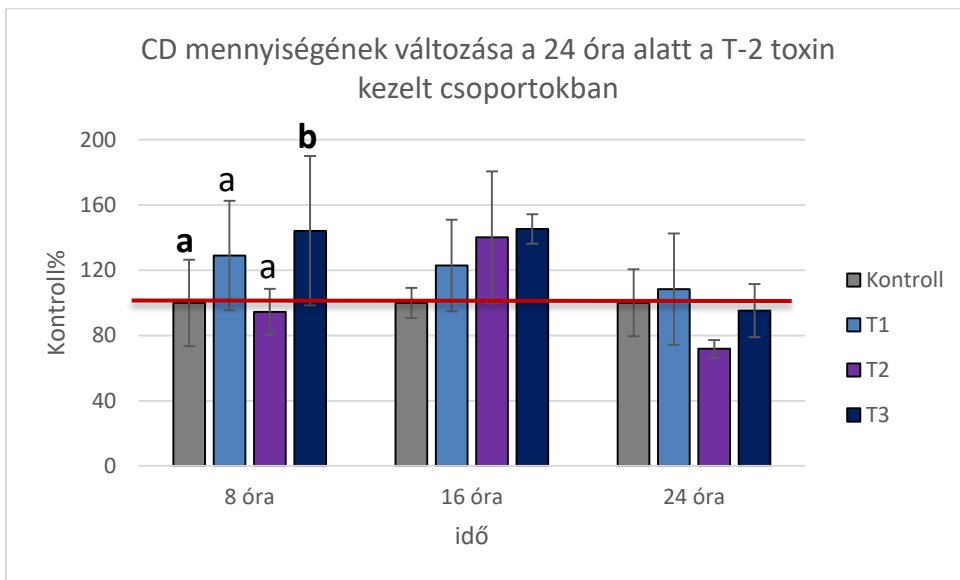
T1 kezelési csoport 0,15; T2 csoport 0,33; a T3 csoport 1,82 mg/kg testtömeg T-2 toxin dózis

5.1.2.5 Megbeszélés

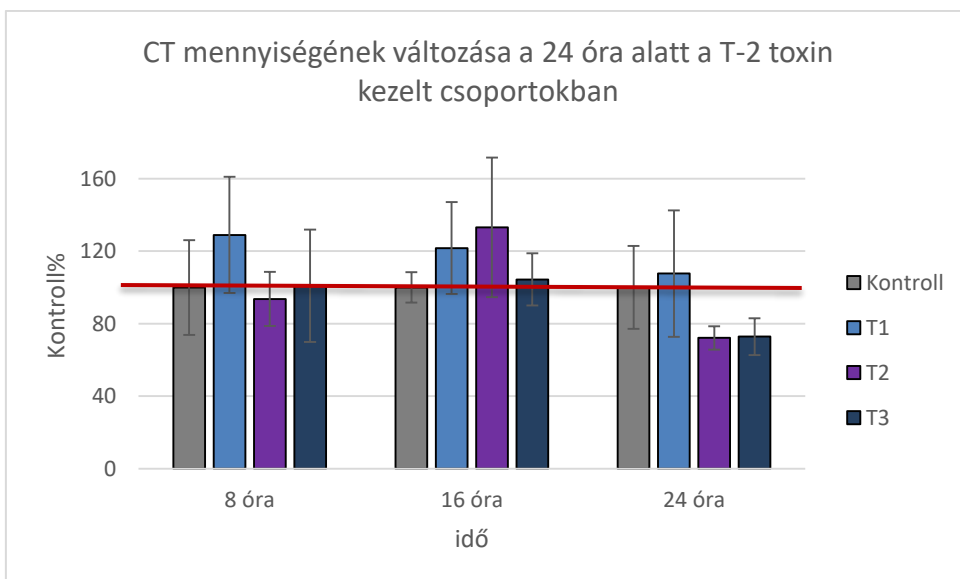
Az egynyaras pontyokkal végzett kísérletben céltom volt egyrészt meghatározni a takarmány átlagos tranzit idejét a kontroll csoportban, amely célból kezeletlen állatok bélcsatornájába 1%-os metilnarancssal kiegészített takarmányt juttattam, egyszeri alkalommal. A halak, mint változó testhőmérsékletű (poikilotherm) élőlények esetében a környezet, jelen esetben a víz, hőmérséklete határozza meg a takarmány tranzitidejét és az alapanyagcsere sebességét (Farkas et al., 1980). A vizsgálatban résztvevő pontyok esetében a tranzitidő meghatározza emellett a mikotoxinok biológiai elérhetőségének idejét is, mivel hozzávetőlegesen ez az időtartam áll rendelkezésre azok felszívódására a bélcsatornából, az emésztőrendszer felépítése miatt (Kapoor et al., 1976). Ennek alapján feltételeztem, hogy a tranzitidő hossza összefüggést mutat a mikotoxin terhelés hatására kialakuló biokémiai és génexpressziós változások idejével. A kísérlet során a víz hőmérséklete 19 ± 1 °C volt, amely hőmérsékleten a takarmány tranzitideje 16 órának adódott.

Ponty fajra a szakirodalomban nem áll rendelkezésre LD₅₀ érték az általam vizsgált mikotoxinokra (Pietsch, 2015). Ennek alapján olyan dózisokat választottam, amelyek más állatfajok esetében már bizonyítottan toxikusnak tekinthetők: T1 csoport: 0,15; T2 csoport: 0,33; T3 csoport: 1,82 mg/kg testtömeg. A dózistartomány kiválasztásának helyességét bizonyította, hogy a legnagyobb alkalmazott dózis esetén már 19%-os mortalitást tapasztaltam a kezelést követő 8. és 16. óra között. Szakirodalmi adatok alapján az is ismert volt, hogy a T-2 toxin halakban is a leginkább toxikus trichotecénvázis mikotoxin, és annak hatására jelentős mértékű mortalitást figyeltek meg (Manning et al., 2003; Balogh et al., 2009; Anater et al., 2015), amelyet a felsoroltak mellett saját korábbi vizsgálataim eredményei is megerősítenek (Pelyhe et al., 2016).

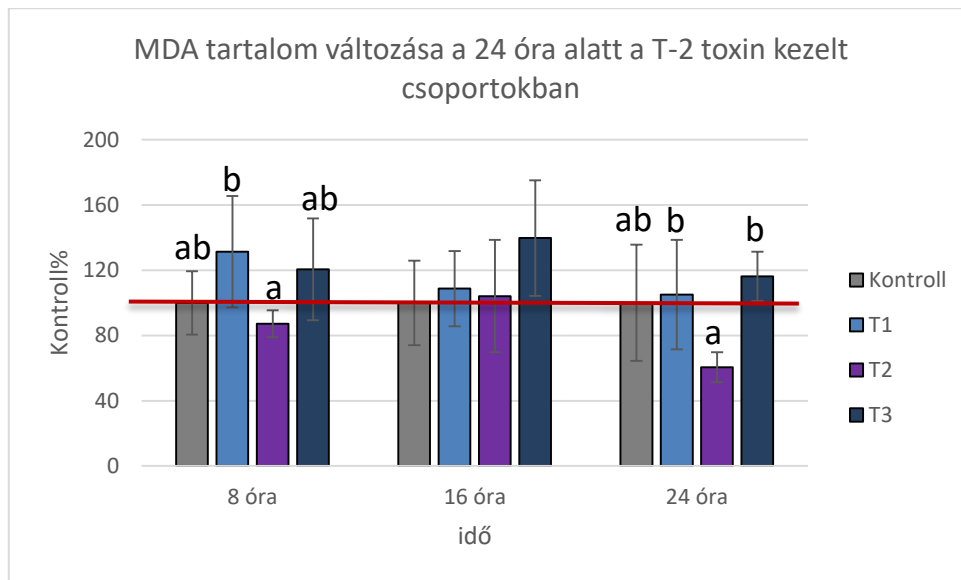
A lipidperoxidációs paraméterekben T-2 toxin hatására csak kismértékű eltérést tapasztaltam a kontroll csoporthoz viszonyítva, úgy annak iniciációs, mind terminációs szakaszát tekintve. Az egyes kezelések közül a legnagyobb, T3, dózissal kezelt csoportban tapasztaltam szignifikáns mértékű emelkedés a 8. órában, bár emelkedő tendencia megfigyelhető volt a CD (12. ábra), CT (13. ábra) valamint az MDA (14. ábra) értékek esetében is a 16. órában a T2 és T3, valamint a 8. órában a T1 kezelési csoportokban. Ennek alapján levonható az a következtetés, hogy a T-2 toxin, az általam alkalmazott dózistartományban (0,15-1,82 mg/kg testtömeg) csak mérsékelten növelte a lipidperoxidációs folyamatok intenzitását a vizsgálat 24 órája alatt. Ez az eredmény magyarázható egyrészt a T-2 toxin, adott dózistartományban és időszak alatt, mérsékelt oxidatív stresszt indukáló hatásával, de éppúgy az antioxidáns védőrendszer gyors és hatékony aktivációjával.



12. ábra A konjugált diének mennyiségének változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

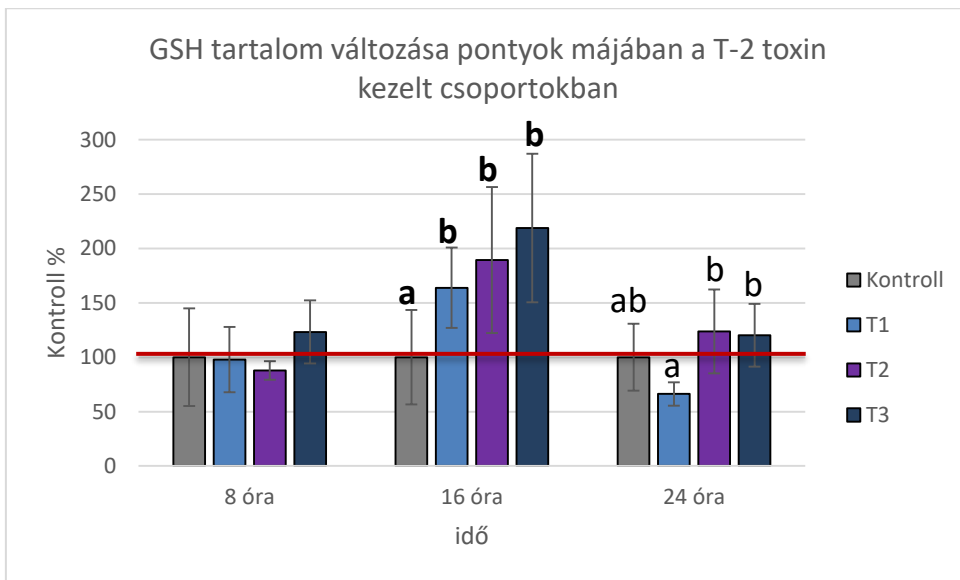


13. ábra A konjugált triének mennyiségének változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.



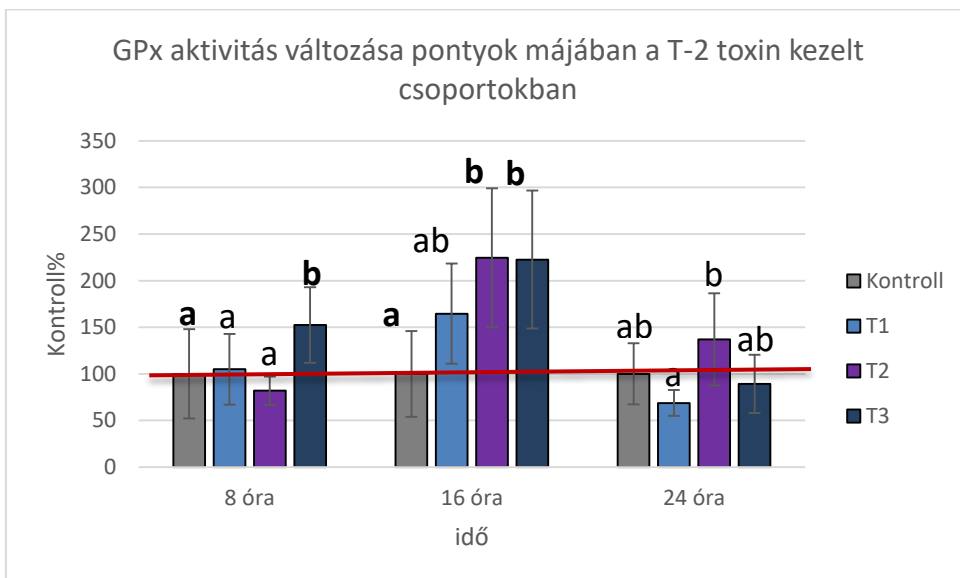
14. ábra A malondialdehid tartalom változása a ponyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Az antioxidáns rendszer T-2 toxin hatására bekövetkező gyors aktivációját bizonyítja a glutation redox rendszer változása már a legkisebb dózis hatására is. A 16. órában ugyanis nagymértékű emelkedést tapasztaltam mindhárom kezelési csoportban mind a GPx aktivitás (16. ábra), mind a GSH tartalom (15. ábra) esetén. Fontos kiemelni azt is, hogy eredményeim alapján nem csak a dózis nagyságának, de a kezeléstől eltelt időnek, illetve ezen két paraméternek együttes hatása is minden kísérleti csoportba kimutatható volt. Ez viszont azt bizonyítja, hogy az alkalmazott dózistól függő változásokat befolyásolja a kezeléstől eltelt idő is, amely az adott metabolikus válasz, jelen esetben a glutation redox rendszer, aktivációjához szükséges. Nagyobb dózis, azaz terhelés esetében a válasz gyorsabban és markánsabban, kisebb dózisonál viszont lassabban és kevésbé markánsan jelentkezik. A kitétség megszűnésével (16 órás tranzitidő), a 24. órára, a nagyobb dózisú kezelést követően a glutation redox rendszer, aktivitása is gyorsabban csökkent, mint a kisebb dózisok esetén.



15. ábra A redukált glutation tartalom változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.

a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



16. ábra A glutation-peroxidáz aktivitásának változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.

a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

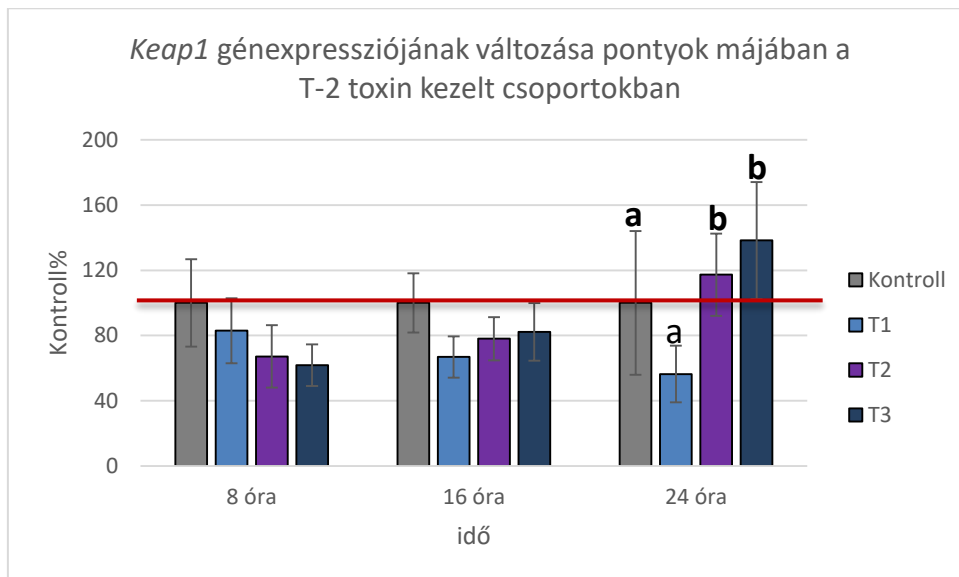
Az eredmények tükrében az is elmondható, hogy a lipidperoxidációs folyamatok szignifikánsan csak a két nagyobb dózis esetén emelkedtek meg, bár tendenciaszerű emelkedés minden csoportban volt. A glutation redox rendszer a T-2 toxin terhelés hatására aktiválódott, amelyet a 16. órában minden csoportban nagymértékben megemelkedett GPx aktivitás és GSH tartalom bizonyít. Ennek alapján levonható az a következtetés, hogy a T-2 toxin ROS képződést indukált a pontyok májában, amelynek hatására aktiválódott az antioxidáns védőrendszer és ezáltal hatékonyan semlegesítette a kialakuló oxidatív stresszt. A lipidperoxidációs folyamatok intenzitásában emiatt csak kismértékű emelkedés következett be. Eredményeim csak közvetve vethetőek össze más, pontyokkal végzett, kísérletek eredményeivel, mivel hasonló paramétereket eddig csak hosszabb távú, szubkrónikus, expozíciót követően vizsgáltak (Kravchenko et al., 1989; Balogh et al., 2009; Pelyhe et al., 2016).

A 24 órás kísérleti időszak első 16 órája kulcsfontosságúnak bizonyult, amely feltevésem szerint összefügg a takarmány tranzit idejével, az ugyanis meghatározza a mikotoxin felszívódására rendelkezésre álló időt. A mikotoxinok felszívódását ugyan a takarmányok összetétele is befolyásolja, de a vékonybélben, azaz a felszívódásra alkalmas bélszakaszban, eltöltött idő is fontos a felszívódásban (Versantvoort et al, 2005). Ezt támasztja alá az a megfigyelésem is, hogy a lipidperoxidációs folyamatokban, valamint a glutation redox rendszer markereiben megállapított szignifikáns vagy tendenciaszerű emelkedés leginkább a 16. órában volt kimutatható, míg azt követően, a 24. órára, amikor az egyszeri adagban bejuttatott takarmányrészek már csak kis mennyiségben voltak jelen a bélcsatornában, tehát már csak elhanyagolható mennyiségű mikotoxin felszívódással lehet számolni, jellemzően visszatértek a kontroll szintre.

A T-2 toxin hatására *in vitro* vizsgálatokban is bizonyították, hogy a sejtekben 24 óra alatt az MDA tartalom időfüggő módon nőtt, míg a GSH tartalom ezen időszak alatt csökkent, amellyel bizonyítottan látták a T-2 toxin terhelés által indukált ROS képződést (Chaudhari et al., 2009a). *In vivo*, egerekkel végzett, kísérletek során a T-2 toxinról (1xLD₅₀: 5,61 és 2xLD₅₀ 11,22 mg/kg testtömeg) megállapították, hogy szintén időfüggően növelte az oxidatív stressz paraméterek, így például a lipidperoxidációs paraméterek értékeit, továbbá az antioxidáns enzimek aktivitását, valamint azok génexpresszióját, párhuzamosan az időközben bekövetkező GSH deplációval (Chaudhari et al., 2009b). A változások időbeli függése mellett a dózisfüggést ugyanakkor nem tudták egyértelműen bizonyítani, sőt esetenként ellentétes eredményekre jutottak nagyobb dózisok alkalmazása esetén. Chaudhary és Rao (2010) *in vivo* egér agyszövetben vizsgálták a T-2 toxin hatására kialakuló oxidatív stresszt, amelynek során emelkedett lipidperoxidációs paramétereket, valamint az antioxidáns enzimek, így a *Sod*, a *Gpx* és a *Gsr* emelkedett génexpresszióját és az enzimek fehérjék nagyobb mennyiségét tapasztalták. Ezek a korábbi eredmények egyértelműen alátámasztani látszanak az általam ponty fajban megállapított változásokat.

A Keap1-Nrf2 szabályozási útvonalban szerepet játszó fehérjék génexpressziós szintű változásait is nyomon követtem. Ebben az esetben elnyújtott és fluktuáló hatást tapasztaltam, ami azt jelenti, hogy a *Keap1* gén esetében kezdetben dózisfüggő csökkenést, később pedig dózisfüggő emelkedést tapasztaltam. Időben a fluktuáció mértéke is dózisfüggőnek mutatkozott. A kontrollhoz viszonyítva megnövekedett génexpressziót csak a 24. órában tapasztaltam (17. ábra). Az *Nrf2* génexpresszió esetében az időbeli eltolódás nagyobb mértékű volt, olyannyira, hogy a kezelést követő 8. órában még nem volt változás, továbbá a dózisfüggés sem volt annyira kifejezett, mint a *Keap1* esetén. A T3 csoportban a génexpressziója csökkent a 16. órában a kontrollhoz képest (18. ábra) A 24. órában a *Keap1* esetén a T2 és T3 csoportokban, míg az *Nrf2* esetében a T1

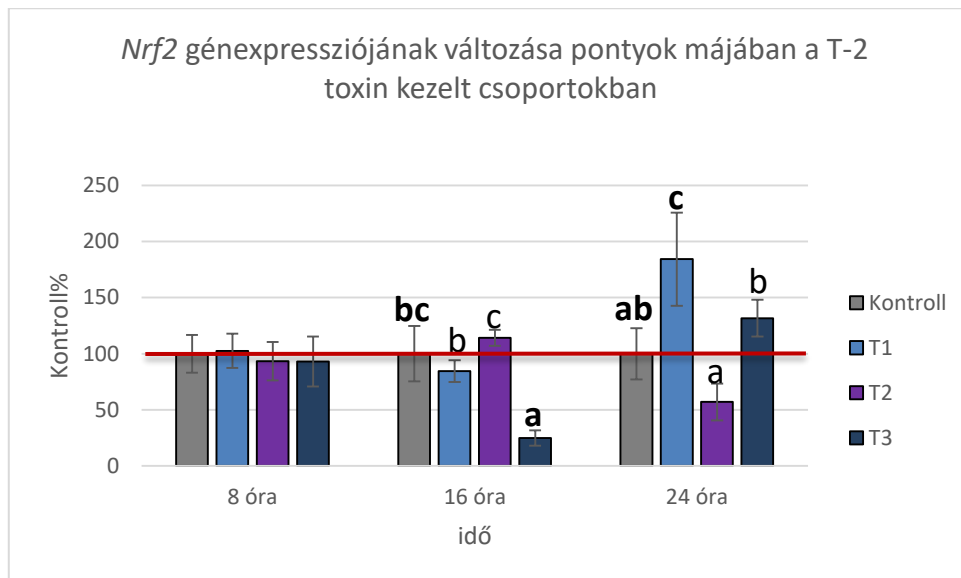
csoportban tapasztaltam emelkedett értékeket, amely eltérések, tekintettel az alkalmazott szubletális dózisokra és az azok által kiváltott oxidatív stressz mértékére jól magyarázható az oxidatív stressz hierarchikus modelljével (2. ábra). A foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz gének (*Gpx4a* (19. ábra) és *Gpx4b* (20. ábra)) esetében az idő függvényében eltérő változásokat tapasztaltam. A *Gpx4a* esetén a 8. órában a génexpresszió emelkedését, míg a *Gpx4b* esetén csökkenését, míg a 24. órában mindkét gén esetén a gének expressziójának indukcióját észleltem a kontrollhoz viszonyítva, ami a *Gpx4a* esetén dózisfüggő tendenciát mutatott és a legnagyobb dózis esetén kiemelkedően nagymértékű volt. Ez az eredmény arra utal, hogy a GPx4 aktivitás korai növekedése az enzim molekula poszttranszlációs modifikációjával, míg annak később mért növekedése már feltehetően *de novo* fehérjeszintézissel magyarázható. A *Gpx4b* vizsgálati paraméter esetében azt is fontosnak tartom kiemelni, hogy a kezdeti gátlást követően a T1 csoportban a 16. órában, míg a T2 és T3 csoportokban csak a 24. órában figyeltem meg a növekvő mértékű génexpressziót, ami a nagyobb dózisok esetében azok elnyújtott hatására utal. Ez az eltérő válaszreakció feltevésem szerint összefüggésben állhat a Keap1-Nrf2 szabályozási útvonal aktivációjával, vagy éppen gátlásával.



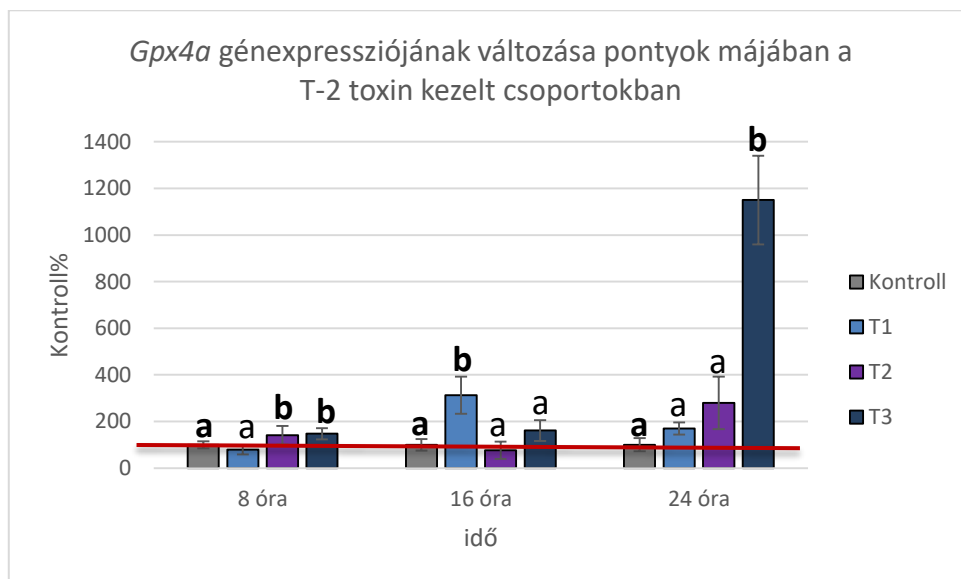
17. ábra A *Keap1* génexpressziós változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm.,

T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.

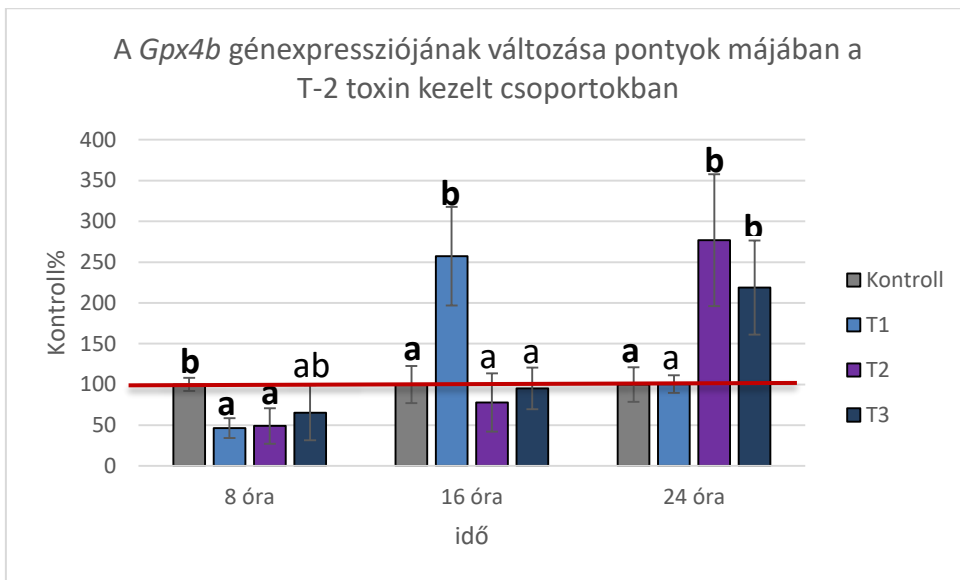
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



18. ábra Az *Nrf2* génexpressziós változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



19. ábra A *Gpx4a* génexpressziós változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



20. ábra A *Gpx4b* génexpressziós változása a pontyok májában a T-2 toxin kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T1: 0,15 mg/kg ttm., T2: 0,33 mg/kg ttm., T3: 1,82 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Az oxidatív stressz hierarchikus modellje (2. ábra) alapján elmondható, hogy alacsony szintű oxidatív stressz esetén az Nrf2 fehérje bejut a sejtmagba és aktiválja az antioxidáns gének expresszióját, magasabb szintű oxidatív stressz hatására azonban a Keap1 gátló hatása az Nrf2-re már csak kevésbé érvényesül, mert ebben az esetben nem elsősorban ez az útvonal aktiválódik (Gloire et al., 2006).

A halakban kiemelkedően fontos antioxidáns szereppel bíró foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz gének (*Gpx4a* (19. ábra) és *Gpx4b* (20. ábra)) expressziója eredményeim szerint kezdetben részben gátlódik, majd ezt követően a kontrollhoz képest emelkedett génexpressziót tapasztaltam. Az *Nrf2* génexpressziója (18. ábra) csak időben eltolva a 24. órában emelkedett, Ennek alapján okkal feltételezhető, hogy a későbbiekben még nő az Nrf2 fehérje szintézise is, amely az antioxidáns gének expressziójának további növekedését eredményezheti.

A nagyobb dózisok (T2 és T3 csoport) hatására a *Gpx4* gének (19. és 20. ábra) mellett a *Keap1* gén expressziója (17. ábra) is emelkedett, ami arra utal, hogy a T-2 toxin hatására kialakuló oxidatív stressz kezdeti gátló hatását követően, de időben elnyújtottan, aktiválta a *Gpx4* géneket. Ugyanakkor ezzel párhuzamosan, az egyre növekvő oxidatív stressz hatására indukálódott a *Keap1* gén expressziója is, mely viszont a későbbiekben, fehérje formában, már gátolja az Nrf2 fehérje sejtmagba való bejutását, ezáltal az antioxidáns gének kifejeződését. Azonban ennek az antioxidáns rendszerre gyakorolt szabályzásának a mélyebb megértése még további vizsgálatokat igényel. Ezek a változások összefüggésben vannak a legnagyobb dózissal kezelt (T3 csoport) állatoknál tapasztalt nagymértékű mortalitással is.

Ezek az eredmények összekapcsolhatók emlősökön kapott kísérleti eredményekkel, melyek során *in vivo* vizsgálatokban megállapították, hogy nagy dózisok mellett a glutation-szintetáz volt az egyetlen olyan gén, amelyet a mikotoxin expozíció indukált, míg alacsonyabb dózisok alkalmazása esetén a *Gpx*, a *Gst* és a *Sod* génexpressziója is emelkedett (Chaudhari et al., 2009b). Ez is megerősíti azon megfigyeléseimet, miszerint az alkalmazott dózis mellett az expozíció idejének is kulcsfontosságú szerepe van. Chaudhary és Rao (2010) is megállapították, hogy T-2 toxin terhelés hatására egér agyban megemelkedett a *Sod*, a *Gsr* és a *Gpx* gének expressziója, míg az Nrf2 transzkripciós faktor és a fázis II. enzimeket kódoló gének esetében csak alacsonyabb szintű génexpresszió volt megfigyelhető.

A T-2 toxinnal egyszeri, gyomorszondán keresztül történt terhelés során az eltérő dózisu mikotoxin terhelésnek kitett csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között is szignifikáns eltéréseket tapasztaltam a lipidperoxidációs paraméterek, a glutation redox rendszer markerei és az utóbbiak mennyiségének szabályozásában szerepet játszó gének esetében is. Ezek a változások azonban nem a kezelés következményei, nem csak a kezelt, hanem a kontroll csoportban is kimutathatók voltak. Ennek hátterében nagy valószínűséggel a biológiai cirkadián ritmus, az egyszeri takarmányfelvétel, illetve egyéb, jelenleg még nem ismert, faktorok is szerepet játszhatnak. Fontosnak tartom azonban kiemelni, bár vizsgálataim célja ettől eltérő volt, hogy az általam alkalmazott 12:12 óra fényprogram eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától. Ez a hatás azonban minden csoportban azonos volt, így a mikotoxin terhelés hatása az egyes csoportokban megfelelően vizsgálható volt. A természetes cirkadián ritmust ez a megvilágítási program természetesen megzavarhatta, amelynek hatása az antioxidáns rendszer egyes elemeire mind fehérje, mind mRNS szinten is megnyilvánulhat (Rodriguez et al., 2004). Ezen enzimek és gének, valamint a cirkadián ritmus kapcsolata azonban szintén további vizsgálatokat igényel.

Irodalmi adatok alapján fontos arra is utalni, hogy a reaktív oxigéngyökök, így a H₂O₂ is, kedvezőtlen hatásaik mellett, fontos szabályzó funkciót is betöltenek a cirkadián ritmus szabályozásában (Wulund és Reddy 2015). Jól ismert, hogy a cirkadián ritmust a hipofízisben található szuprachiasmatikus mag (*suprachiasmaticus nucleus*-SCN) szabályozza. Az SCN neuronok a transzkripciós/poszttranszlációs *feedback loop*-ok (TTFL) révén befolyásolják a napi ritmust a *Cryptochrome* (*Cry*) és a *Period* (*Per*) gének szabályozása révén (Edwards et al., 2016). Zebradánió eredetű sejtvonalon végzett kísérletekben bizonyították, hogy a fény H₂O₂ termelést indukál a sejtekben, ami a TTFL „óra gének”, a *zCry1a* és *zPer2* expressziójának indukálását eredményezte, míg a kataláz, a H₂O₂ elbontásával, gátolta ezen gének expresszióját (Hirayama et al., 2007). Ennek alapján elmondható, hogy a H₂O₂ a szignál transzdukciós útvonalak fontos szereplője, ami befolyásolja a TTFL géneket, ezáltal a cirkadián ritmust is (Wulund és Reddy 2015). A cirkadián ritmus emellett az antioxidáns enzimek génexpresszióját is szabályozza például az *Nrf2* expressziójának szabályozása révén (Patel et al., 2014).

Ebben a kísérletben a kezelés x idő együttes hatását több esetben sikerült statisztikailag is alátámasztanom, amely azt jelzi, hogy nem csak az alkalmazott dózisonak, hanem a kezeléstől eltelt időnek is kulcsfontosságú szerepe van a kialakuló hatások tekintetében. Más tanulmányokban is leírtak nem csak dózis-, de időfüggő, hatásokat is a T-2 toxinnal kapcsolatban, így például egyes humán sejtvonalakban (Wang et al., 2016a).

5.1.3 Rövidtávú DON terhelés hatása a pontyokra

A pontyokkal végzett gyomorszondás kísérlet során három, növekvő dóziszú, DON kezelés hatását is vizsgáltam a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereire, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségére/aktivására, valamint a glutation redox rendszer szabályozására, azon belül egyes kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének expressziójára. A kezelésekhöz felhasznált takarmányok mikotoxin tartalmát a 22. táblázatban tüntettem fel (mg/kg testtömeg), amelyet a mesterségesen szennyezett takarmány mikotoxin tartalma alapján számítottam. A D1 kezelési csoportban 0,13; a D2 csoportban 0,31; a D3-ban pedig 1,75 mg/kg testtömeg DON dózisokat alkalmaztam, amellyel az volt a célom, hogy akut toxicitást érjek el. Az Európai Unió által javasolt DON határérték 5 mg/kg takarmány, mely kiindulási alapot nyújtott az alkalmazott dózis megtervezéséhez. A 24 órás expozíciós idő alatt 4 óránként történtek a mintavételek.

22. táblázat A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok az egyes csoportokban (mg/kg testtömeg)

Kezelési csoport	Kontroll	D1 (alacsony)	D2 (közepes)	D3 (magas)
DON	< 0,02	0,13	0,31	1,75

5.1.3.1 Rövidtávú DON terhelés hatása a mortalitásra

A kísérlet 24 órás időtartama alatt az általam alkalmazott DON dózisok hatására mortalitást egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam.

5.1.3.2 Rövidtávú DON terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (23. táblázat) esetén a DON terhelés hatására a 16. órában szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva minden kezelés hatására, míg a 24. órára ezek az értékek visszatértek a kontroll szintre. Az egyes mintavételi időpontok között a kontroll és a D1 csoportokban tapasztaltam szignifikáns eltérést

Az időtényező hatását vizsgálva a CD értékekben a kontroll és a D1 csoport értékeinél a 16. és 24. órában tapasztaltam szignifikáns mértékű különbséget, amelyek tendenciája azonban eltérő volt. Ez azt jelenti, hogy a kontroll csoportnál a 24., míg a D1 csoportban már a 16. órában emelkedett a CD koncentráció. A D2 és D3 csoportokban az egyes mintavételi időpontok között ugyanakkor nem volt szignifikáns mértékű eltérés, jöllehet a változások tendenciája mindhárom kezelés esetén azonos volt, vagyis a CD értéke 16. óráig emelkedett, azután pedig csökkent. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és a kezelés x idő (TxH) együttesen is szignifikáns mértékű hatással volt a CD koncentrációra.

A CT mennyisége (24. táblázat) a kontroll csoporthoz viszonyítva nem tapasztaltam szignifikáns eltéréseket 8. órában, ugyanakkor mindhárom DON dózissal kísérletesen szennyezett takarmánnyal kezelt csoportban szignifikáns mértékű emelkedés volt a 16. órában, ami ebben az esetben is a 24. órára visszatért a kontroll szintre.

Az időtényezőt vizsgálva a CT értékekben egyedül a D1 csoportban tapasztaltam szignifikáns mértékű eltérést az egyes mintavételi időpontok között, ahol a 16. órában végzett mintavételnél tapasztaltam nagyobb értéket. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T) nem, az idő (H) és a kezelés x idő (TxH) együttesen viszont már szignifikáns mértékű hatással volt a CT koncentrációra.

A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA koncentrációban (25. táblázat) a 16. és 24. órában tapasztaltam szignifikáns eltérést a kontrollhoz viszonyítva, de csak a legnagyobb dózissal kezelt, D3 csoportban.

Az MDA értékekben az időtényező hatását vizsgálva nem tapasztaltam szignifikáns eltérést egyik csoportban sem. A kétutas ANOVA vizsgálatban egyedül a kezelés (T) hatását sikerült alátámasztani, míg az idő (H) valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen nem volt szignifikáns hatással erre a paraméterre.

23. táblázat A CD mennyisége a pontyok májában a DON terhelés hatására (OD 232nm) (átlag±SD; n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	0.310 AB ± 0.061	0,369 ^{ab} AB ± 0,098	0,270 ^a A ± 0,025	0,397 ^{ab} B ± 0,081	0,025
D1 (alacsony)		0,348 ^{ab} A ± 0,097	0,529 ^c B ± 0,156	0,296 ^a A ± 0,041	T: <0,001
D2 (közepes)		0,312 ^a A ± 0,125	0,470 ^b A ± 0,087	0,337 ^a A ± 0,144	H: <0,001
D3 (magas)		0,472 ^b AB ± 0,074	0,615 ^c B ± 0,179	0,568 ^b AB ± 0,313	TxH: 0,008

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

24. táblázat A CT mennyisége a pontyok májában a DON terhelés hatására (OD 268 nm) (átlag±SD; n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	0,153 A ± 0,032	0,180 A ± 0,047	0,130 ^a A ± 0,011	0,183 A ± 0,042	0,062
D1 (alacsony)		0,170 A ± 0,045	0,242 ^b B ± 0,074	0,140 A ± 0,018	T: 0,542
D2 (közepes)		0,151 A ± 0,063	0,217 ^b A ± 0,040	0,150 A ± 0,110	H: 0,009
D3 (magas)		0,158 A ± 0,027	0,216 ^b A ± 0,057	0,198 A ± 0,019	TxH: 0,022

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

25. táblázat Az MDA tartalom alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ nedves tömeg) (átlag \pm SD; n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	14,72 \pm 3,28	14,48 \pm 2,81	12,62 ^a \pm 3,27	13,69 ^{ab} \pm 4,87	0,794
D1 (alacsony)		15,85 \pm 5,71	17,61 ^{ab} \pm 6,36	10,54 ^a \pm 1,31	T: 0,021
D2 (közepes)		14,41 \pm 6,68	17,39 ^{ab} \pm 2,15	18,05 ^{bc} \pm 4,60	H: 0,235
D3 (magas)		14,67 \pm 1,76	21,31 ^b \pm 5,51	20,95 ^c \pm 8,57	TxH: 0,053

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

5.1.3.3 Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban

A DON-al mesterségesen szennyezett takarmánnyal kezelt csoportokban a GSH tartalom (26. táblázat) a 16. órában a legnagyobb dózis esetén (D3) szignifikánsan emelkedett, ami azonban a 24. órára visszatért a kontroll szintre.

Az egyes kísérleti csoportokon belül a kontroll, a D2 és a D3 csoportok esetében volt különbség az egyes mintavételi időpontok között, azok tendenciája azonban eltérő volt. A kontroll csoportban a 8., a D2-ben a 8. és a 24. órában volt nagyobb az érték a 0. órához viszonyítva, míg a D3 csoportban a 16. és 24. órában tapasztaltam nagyobb értékeket. A kétutas ANOVA vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezelés (T), az idő (H) valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is szignifikáns mértékű hatással volt a máj GSH tartalmára.

A GPx aktivitás (27. táblázat), a GSH-hoz hasonlóan, a 16. órában emelkedett szignifikáns mértékben a legnagyobb dózissal kezelt (D3) csoportban a kontrollhoz viszonyítva, amely azonban a 24. órára visszatért a kontroll szintre. Minden kísérleti csoporton belül szignifikáns különbséget találtam az egyes mintavételi időpontok között, a változások tendenciája azonban eltérő volt. A kontroll csoportban a 8. és 24. órában, a D1 csoportban a 24., a D2 csoportban a 16 és a 24 órában, míg a D3 csoportban a 8., a 16. és a 24. órában is nagyobbak voltak az értékek a 0. időponthoz képest. A kétutas ANOVA vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezelés (T) nem, idő (H) valamint a kezelés x idő (TxH) azonban együttesen is szignifikáns mértékű hatással volt a máj GPx aktivitására.

26. táblázat A GSH tartalom alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll		2,93C \pm 1,32	1,48 ^a A \pm 0,64	2,64BC \pm 0,82	0,011
D1 (alacsony)	1,40A \pm 0,36	2,21A \pm 0,99	1,99 ^a A \pm 0,49	2,08A \pm 0,56	T: 0,022
D2 (közepes)		2,37BC \pm 0,91	2,40 ^{ab} AB \pm 0,44	3,34C \pm 1,07	H: <0,001
D3 (magas)		2,09A \pm 0,31	3,32 ^b B \pm 1,17	3,67B \pm 1,49	TxH: 0,012

^{a,b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

27. táblázat A GPx enzim aktivitásának alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására (E/g 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll		3,56B \pm 1,70	1,59 ^a A \pm 0,73	3,44B \pm 1,13	0,005
D1 (alacsony)	1,45A \pm 0,21	2,28AB \pm 1,03	2,50 ^{ab} AB \pm 0,59	3,21B \pm 1,21	T: 0,052
D2 (közepes)		2,30AB \pm 1,01	3,36 ^{bc} B \pm 0,73	4,82C \pm 1,79	H: <0,001
D3 (magas)		2,90B \pm 0,46	4,15 ^c B \pm 1,21	3,83B \pm 1,07	TxH: 0,008

^{a,b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

5.1.3.4 Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására

A *Keap1* gén (28. táblázat) expressziója a 8. órában a D1 csoportban csökkent, míg a D2 csoportban emelkedett a kontrollhoz viszonyítva. Ezt követően, a 16. órában a D1 és D2 csoportban emelkedést, míg a D3 csoportban csökkenést tapasztaltam. Később, a 24. órában, már csak a D2 csoportban tapasztaltam emelkedést a kontrollhoz viszonyítva, tehát ennek a dózisonak a hatására minden mintavételi időpontban emelkedett a *Keap1* gén expressziója.

Az egyes mintavételi időpontok között minden csoporton belül szignifikáns mértékű volt az eltérés. A 8. órában minden csoportban csökkent a *Keap1* gén expressziója. A D2 csoportban a 8. órai csökkenés mellett szintén csökkenés volt a 16. órában, de a 24. órában emelkedett. A D3 csoportban viszont a 16. és 24. órában is csökkent. A kétutas ANOVA vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is volt szignifikáns mértékű hatással volt a *Keap1* gén expressziójára.

Az *Nrf2* gén expressziója (29. táblázat) a 8. órában a D1 csoportban csökkent, míg a D2 és D3 csoportokban emelkedett a kontrollhoz viszonyítva. Ezt követően, a 16. órában, minden csoportban csökkent, majd a 24. órában a kontrollal azonos értékeket mértem a közepes (D2) és magas (D3) dózis hatására. A D1 csoport esetében azonban a 24. órában az expresszió mértéke meghaladta a kontroll értéket.

Az időbeni változásokat tekintve a kontroll csoportban mért érték a 8. órában csökkent, a 16. órában emelkedett, majd a 24. órában ismét csökkent. A D1 csoportban a 8. órai csökkenést

követően folyamatosan emelkedett a 24. óráig, ugyanakkor a D2 és D3 csoportban a 8. órai emelkedést csökkenés követte a 16. órában, mi ezen az alacsony szinten maradt a 24. óráig. A kétutas ANOVA vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is volt szignifikáns mértékű hatással volt az *Nrf2* gén expressziójára.

A *Gpx4a* gén (30. táblázat) expressziója a D1 és D3 csoportokban a 8. órában nagymértékben csökkent, míg ezt követően, a 16. órában, a D1 csoport esetében, a 24. órában pedig a D3 csoportban szignifikáns mértékű emelkedés volt kimutatható a kontrollhoz viszonyítva.

Az egyes mintavételi időpontok között szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam, az egyes csoportokban azonban ennek tendenciája eltérő volt. A kontroll csoportban a 8. és 16. órában emelkedett, míg a D1 csoportban a 16. és 24. órában voltak magasabb értékek a 0. időponthoz képest. A D2 csoportban a 8. és a 24. órában, a D3 csoportban viszont csak a 24. órában volt emelkedés. A kétutas ANOVA vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is volt szignifikáns mértékű hatással volt a *Gpx4a* gén expressziójára.

A *Gpx4b* gén (31. táblázat) expressziója mindhárom kezelt csoportban a 8. órában szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz képest. Ezt követően, a 16. és 24. órában, csak a D1 csoportban volt kimutatható szignifikáns mértékű emelkedés, míg a többi csoportban nem volt szignifikáns mértékű emelkedés, bár a 24. órában D2 és D3 csoportban is megfigyelhető volt emelkedő tendencia a kontrollhoz képest.

Az időbeni változásokat tekintve a kontroll csoportban a 8. és a 16. órában emelkedett meg a gén expressziója a 0. órához képest. A D1 csoportban a 16. és 24. órában, a D3 csoportban pedig csak a 24. órában emelkedett meg az érték. A kétutas ANOVA vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is volt szignifikáns mértékű hatással volt a *Gpx4b* gén expressziójára.

28. táblázat A *Keap1* gén expressziójának alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag \pm SD; n=6, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00 B	0,68 ^b A \pm 0,18	0,86 ^b AB \pm 0,16	0,79 ^a AB \pm 0,35	0,033
D1 (alacsony)		0,24 ^a A \pm 0,10	1,36 ^c C \pm 0,28	0,76 ^a B \pm 0,23	T: <0,001
D2 (közepes)		0,77 ^c A \pm 0,13	1,22 ^c BC \pm 0,16	1,42 ^b C \pm 0,27	H: <0,001
D3 (magas)		0,45 ^b A \pm 0,14	0,51 ^a A \pm 0,13	0,44 ^a A \pm 0,10	TxH: <0,001

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

29. táblázat Az *Nrf2* gén expressziójának alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00B	0,62 ^b A± 0,11	1,29 ^c C± 0,32	0,42 ^a A± 0,10	<0,001
D1 (alacsony)		0,14 ^a A± 0,02	0,65 ^b B± 0,11	1,29 ^b D± 0,25	T: 0,001
D2 (közepes)		1,01 ^c B± 0,21	0,48 ^a A± 0,16	0,55 ^a A± 0,07	H: <0,001
D3 (magas)		0,92 ^c B± 0,06	0,33 ^a A± 0,07	0,37 ^a A± 0,13	TxH: <0,001

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

30. táblázat A *Gpx4a* gén expressziójának alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00A	4,88 ^b C± 0,73	2,11 ^a B± 0,52	1,19 ^a A± 0,33	<0,001
D1 (alacsony)		0,13 ^a A± 0,07	7,81 ^b C± 2,15	2,45 ^a B± 0,69	T: 0,001
D2 (közepes)		2,85 ^b C± 0,81	1,76 ^a AB± 0,79	2,19 ^a BC± 0,61	H: <0,001
D3 (magas)		1,18 ^a A± 0,48	1,22 ^a A± 0,37	4,76 ^b B± 1,15	TxH: <0,001

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

31. táblázat A *Gpx4b* gén expressziójának alakulása a pontyok májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=6, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00A	3,51 ^b C± 0,92	1,78 ^a B± 0,41	1,36 ^a AB± 0,29	<0,001
D1 (alacsony)		1,26 ^a A± 0,61	3,27 ^b B± 0,77	3,02 ^b B± 0,61	T: <0,001
D2 (közepes)		1,78 ^a A± 0,63	0,98 ^a A± 0,41	1,68 ^a A± 0,61	H: <0,001
D3 (magas)		1,14 ^a A± 0,53	0,83 ^a A± 0,41	2,30 ^{ab} B± 0,43	TxH: <0,001

^{a, b} felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)

A, B nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi idő között (p<0.05)

Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása

A statisztikai különbségeket vastaggal szedett betűk jelzik

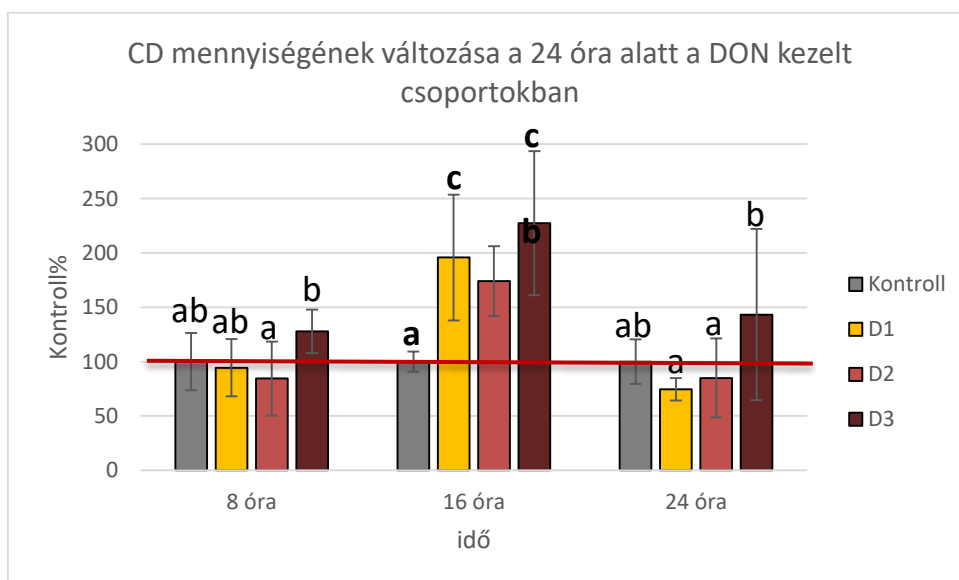
D1 kezelési csoport 0,13; a D2 csoport 0,31; a D3 csoport 1,75 mg/kg testtömeg DON dózis

5.1.3.5 Megbeszélés

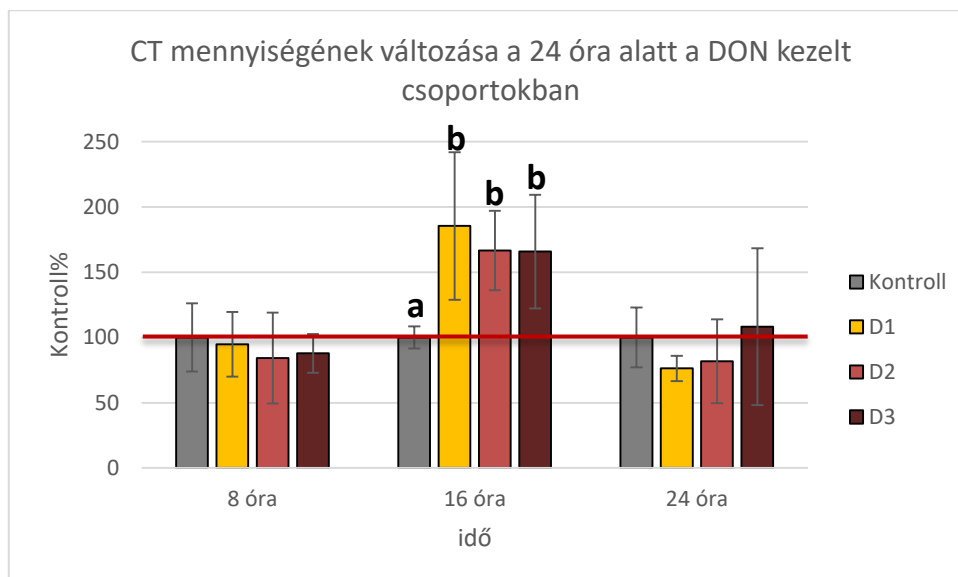
A kísérlet során meghatároztam a takarmány bélcsatornán való áthaladásának tranzitidejét, amely ebben a kísérletben is 16 óra volt. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a mikotoxinok hatásai mellett a tranzit idő is kulcsszerepet játszik az általam vizsgált paraméterek változásával összefüggésben. Ennek oka feltevésem szerint az, hogy a takarmányrészek bélcsatornán keresztül történő áthaladásának ideje befolyásolja a mikotoxinok bélcsatornából történő felszívódásának, így azok a felszívódást követően a májba történő bejutásának idejét is.

Ponty fajra a szakirodalomban nem áll rendelkezésre LD₅₀ érték a DON mikotoxinra vonatkozóan (Pietsch 2015). A kísérlet során az alábbi dózisokat alkalmaztam: D1 csoport: 0,13; D2 csoport: 0,31; és D3 csoport: 1,75 mg/kg testtömeg. A kísérlet 24 órás időtartama alatt mortalitást egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam, amelynek hátterében a DON más trichotecénvázis mikotoxinhoz viszonyított kisebb toxicitása állhat (Sobrova et al., 2010). Ezt a megállapítást erősítik meg korábbi vizsgálatom eredményei is, ahol 4 hetes szubkrónikus vizsgálat során a DON hatására, közel azonos dózisokat alkalmazva, közel 50%-kal kisebb mortalitást tapasztaltam, mint a T-2 toxin esetében (Pelyhe et al., 2016).

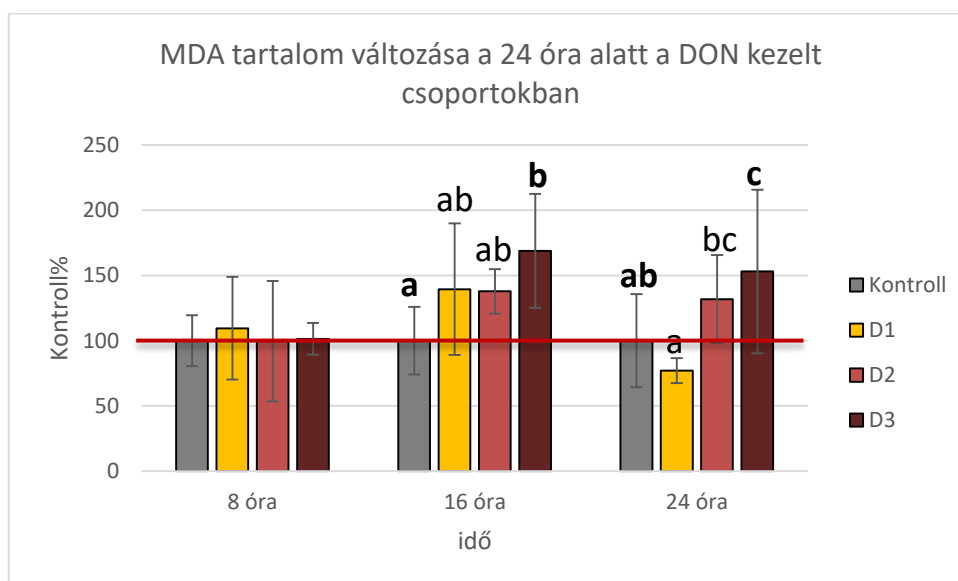
A lipidperoxidációs paraméterekben, mind az iniciációs, mind a terminációs szakaszt tekintve a DON hatására szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam. A 16. órában mindhárom dózis hatására szignifikáns mértékben megemelkedett a CD (21. ábra) és CT érték (22. ábra), továbbá az MDA koncentrációja (23. ábra) is szignifikánsan nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva a legnagyobb dózissal kezelt (D3) csoportban a kezelést követő 16. és 24. órában. Az eredmények alapján tehát levonható az a következtetés, hogy a DON hatására lipidperoxidációs folyamatok indukálódtak, annak iniciációs és terminációs szakasza egyaránt, amelynek hátterében a DON által indukált ROS képződés állhat.



21. ábra A konjugált diének mennyiségének változása pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a vizsgálat 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm., idő: toxin expozíció ideje
a, b, c jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

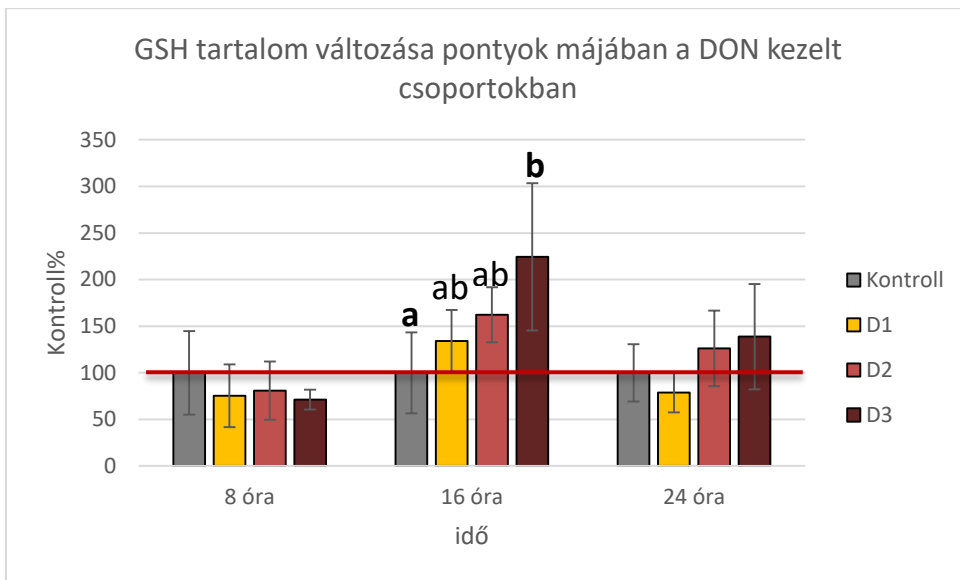


22. ábra A konjugált triének mennyiségének változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

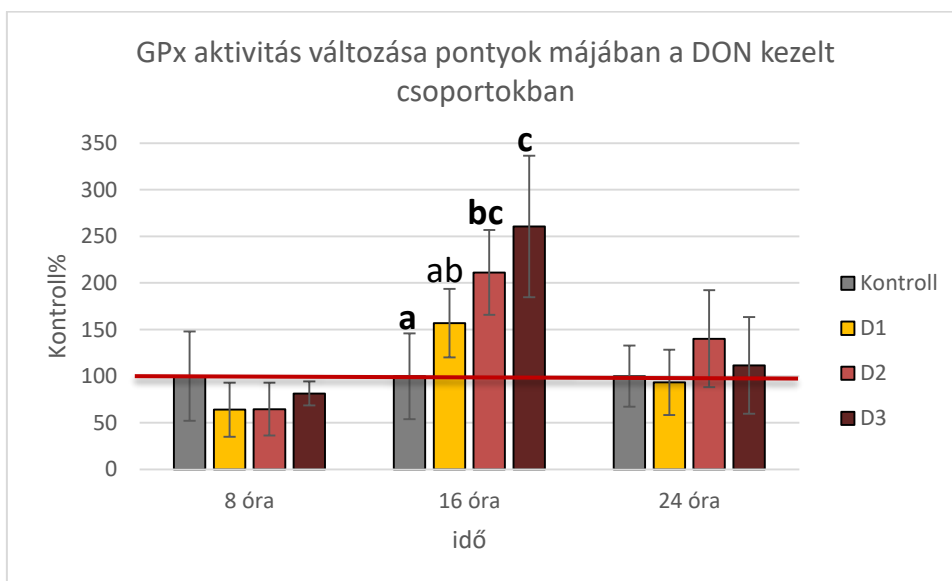


23. ábra A malondialdehid mennyiségének változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje a, b, c jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Az eredmények alapján az is megállapítható volt, hogy a lipidperoxidációs folyamatok mellett a glutation redox rendszer is aktiválódott DON terhelés hatására. Ezt bizonyítja, hogy a kezelést követő 16. órában jelentős mértékű emelkedést tapasztaltam mindhárom dózis esetében a GPx aktivitásban (25. ábra) és a GSH tartalomban (24. ábra) is. Fontos kiemelni azt is, hogy eredményeim alapján nem csak a kezelésnek, de a kezeléstől eltelt időnek, illetve ennek a két paraméternek az együttes hatása is érvényesült.



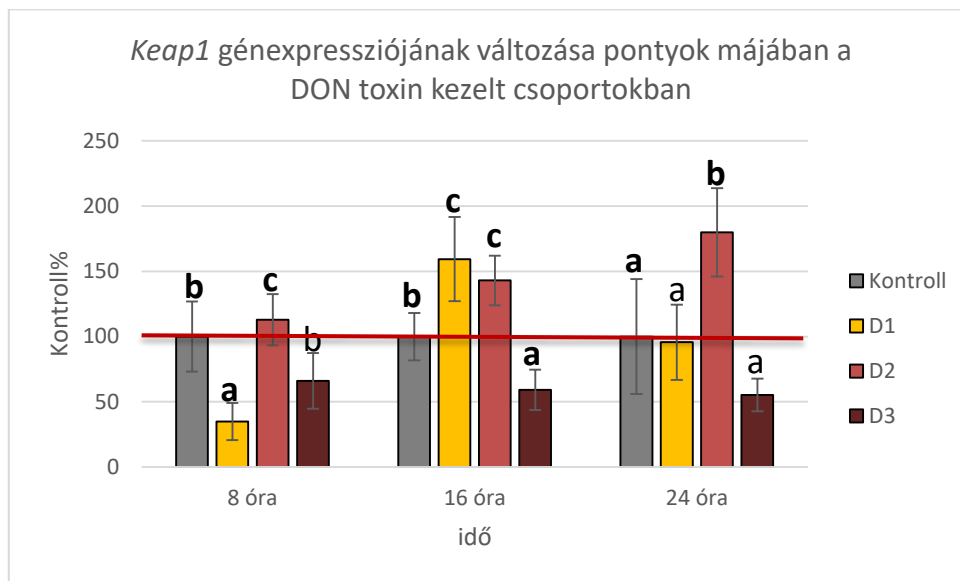
24. ábra A redukált glutation mennyiségének változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm., idő: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



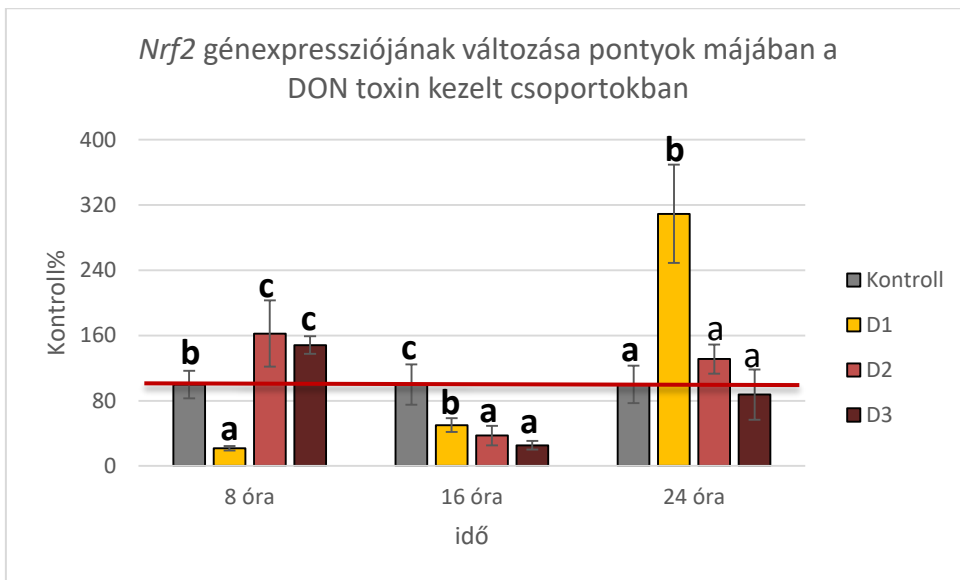
25. ábra A glutation-peroxidáz aktivitásának változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm., idő: toxin expozíció ideje
a, b, c jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

A biokémiai változások szempontjából a 24 órás kísérleti időszak első 16 órája bizonyult kulcsfontosságúnak, amely összefügghet a takarmány tranzit idejével, mivel ez határozza meg a mikotoxin bélcsatornából történő felszívódására rendelkezésre álló időt. Ezt támasztja alá az a megfigyelésem, hogy a megfigyelt változások a lipidperoxidációs folyamatok, valamint a glutation redox rendszer markereiben tendenciaszerű, vagy szignifikáns mértékű, emelkedést mutattak a 16. órában, amelyek nagy része ezt követően, a 24. órára, visszatért a kontroll szintre.

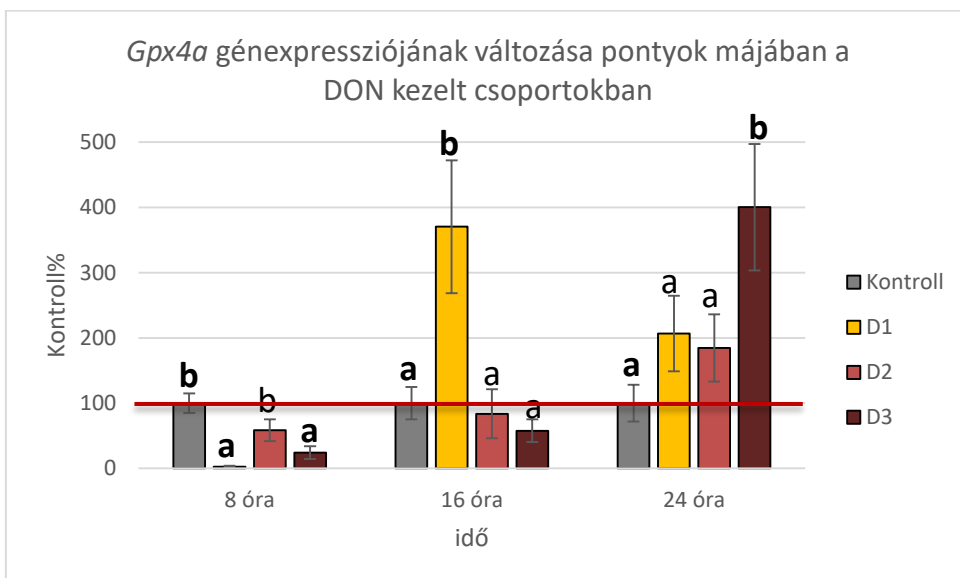
Az Nrf2-Keap1 útvonalban szerepet játszó fehérjék gének expresszióját szintén befolyásolta a DON terhelés. A *Keap1* (26. ábra) esetén a D2 csoportban minden mintavételi időpontban indukciót, míg a D1 és D3 csoportokban indukciót és gátlást egyaránt tapasztaltam a különböző mintavételi időpontokban. A *Keap1* génexpressziója a 16. órában emelkedett, míg a 24. órában már csak a D2 csoportban tapasztaltam indukciót. A D3 csoportban ugyanakkor a kísérlet 24 órája alatt csak kismértékű eltérések voltak. Az *Nrf2* (27. ábra) esetén is azt találtam, hogy a génexpresszió mértéke az egyes mintavételi időpontokban hol emelkedett, hol viszont csökkent. A 8. órában például a D1 csoportban csökkent, a D2 és D3 csoportokban viszont emelkedett. A 16. órában mindhárom csoportban, dózis függő mértékben csökkent, a 24. órában viszont csak a D1 csoportban lehetett szignifikáns mértékű indukciót, kimutatni, azonban a mért értékek dóziszfüggő eloszlása továbbra is megfigyelhető volt.



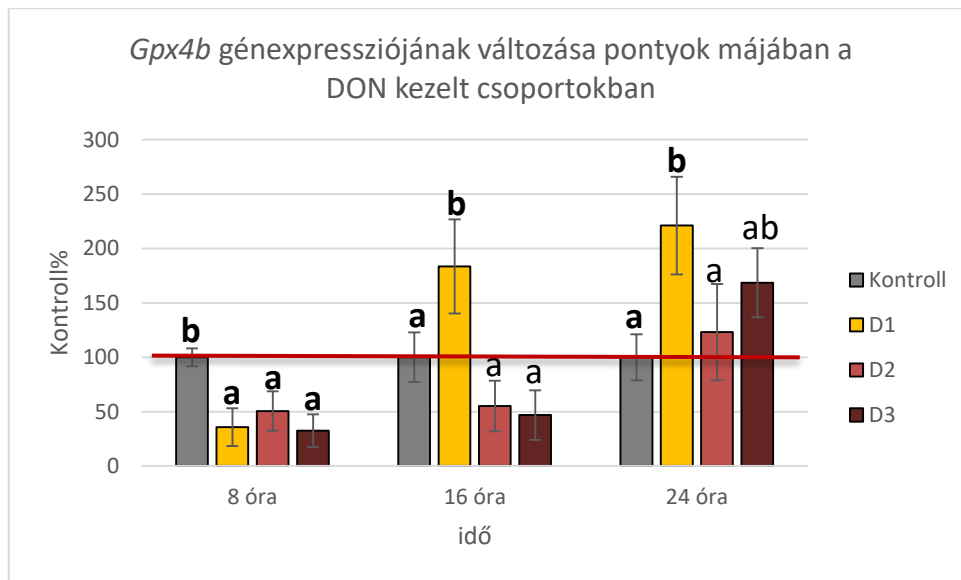
26. ábra A *Keap1* génexpressziójának változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm., idő: toxin expozíció ideje a, b, c jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



27. ábra Az *Nrf2* génexpressziójának változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm., idő: toxin expozíció ideje a, b, c jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



28. ábra A *Gpx4a* génexpressziójának változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm., idő: toxin expozíció ideje a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



29. ábra A *Gpx4b* génexpressziójának változása a pontyok májában a DON toxinnal kezelt csoportokban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. D1: 0,13 mg/kg ttm., D2: 0,31 mg/kg ttm., D3: 1,75 mg/kg ttm, idő: toxin expozíció ideje a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

A fent jelzett két marker esetében jellemzően az első 16 órában történtek változások, amelyek azonban dóziszfüggő mértékben eltérőek voltak. Ez a dóziszfüggő eltérés összefügghet az oxidatív stressz hierarchikus modelljében leírtakkal, vagyis a ROS képződés aktuális mértékével, és azok hatásával az általa indukált útvonalakra. Alacsony oxidatív stressz hatására ugyanis az Nrf2 fehérje bejut a sejtmagba és aktiválja az antioxidáns gének expresszióját, erőteljesebb oxidatív stressz esetén viszont már a Keap1 Nrf2-t gátló aktivitására van szükség, ebben az esetben ugyanis már nem az Nrf2-ARE útvonal aktiválódik. A halakban kiemelkedően fontos antioxidáns szereppel bíró foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz gének (*Gpx4a* (28. ábra) és *Gpx4b* (29. ábra)) expressziója, kezdeti gátlást követően, a kontrollhoz képest emelkedést mutatott, amely emellett elnyújtottan, csak a 16. órában történt mintavétel után, jelentkezett, sőt a legtöbb esetben az emelkedés mértéke a kontrollhoz képest csak tendenciaszerű volt. Az *Nrf2* génexpressziója (27. ábra) ugyanakkor minden alkalmazott dózis esetén csökkent a 16. órában. Ennek alapján feltételezhető, hogy DON terhelés hatására már nem enyhe, hanem erőteljes oxidatív stressz alakult ki, amelynek hatására viszont már nem elsősorban az Nrf2-ARE útvonal aktiválódása következik be.

A szakirodalomban jelenleg kevés DON-nal kapcsolatos adat áll rendelkezésünkre halakra vonatkozóan, még szubkrónikus terheléssel kapcsolatban is. A kapott eredmények azonban részben magyarázhatók egy korábbi, pontyokkal végzett, szubkrónikus vizsgálatom eredményeivel, amelyben hosszabb kezelési időszak alatt már fokozottan növekvő mortalitást is tapasztaltam (Pelyhe et al., 2016), ugyanakkor az oxidatív stresszel összefüggő korábban mások által leírt változások (Pietsch et al., 2014b), mivel azok hosszútávú terhelés hatására következtek be, a jelen kísérletemben leírt rövidtávú hatásokkal közvetlenül nem vehetőek össze.

A DON hatására a kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között szignifikáns eltéréseket tapasztaltam a lipidperoxidációs folyamatok markerei, a glutation redox rendszer egyes elemei és annak szabályozásában szerepet játszó gének esetében is. Ezek a változások azonban nem csak a mikotoxin terhelésnek kitett, hanem a kontroll csoportban is kimutathatóak voltak.

Ennek háttérben a biológiai cirkadián ritmus, az egyszeri takarmányfelvétel, illetve egyéb, jelenleg még nem pontosan ismert, faktorok is szerepet játszhatnak. Fontosnak tartom azonban kiemelni, hogy a vizsgálat során alkalmazott 12:12 óra fényprogram eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától, a kísérlet során alkalmazott azonos környezeti paraméterek azonban lehetővé tették egyes csoportok közötti különbségek vizsgálatát. A természetes cirkadián ritmust ugyanakkor ez a tényező megzavarhatta az antioxidáns rendszer egyes elemeiben mind fehérje, mind pedig mRNS szinten (Rodriguez et al., 2004).

Szakirodalmi adatok alapján azt is fontosnak tartom kiemelni, hogy a reaktív oxigéngyökök, fontos szabályzó funkciót töltenek be a cirkadián óra szabályozásában (Wulund és Reddy 2015), valamint a cirkadián óra az antioxidáns enzimek és fehérjék génexpresszióját is szabályozza, az *Nrf2* expressziójának szabályozása révén (Patel et al., 2014). A cirkadián ritmust, illetve annak szabályozását, részletesebben a T-2 toxinnal végzett kísérletem eredményeinek megbeszélése során tekintetem át (5.1.2.5 fejezet). Ezen kísérletben statisztikailag a kezelés x idő hatását is alátámasztottuk a legtöbb paraméter esetében, amely azt jelzi, hogy nem csak az alkalmazott dózisnak, hanem a kezeléstől eltelt időnek is kulcsfontosságú szerepe van a kialakuló hatásokban és azok mértékében. *In vitro* sejtvonalakkal végzett vizsgálat során is leírtak már korábban, a DON-al kapcsolatban, nem csak dózis-, de egyidejűleg időfüggő változásokat is (Wang et al., 2016b).

5.2 Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletek eredményei

5.2.1 Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletben megállapított tranzitidő

Az egy hetes madaraknál a tranzit idő 5 óra 45 perc, míg a három hetes brojlercsirkéknél 5 óra 40 perc volt, azaz a két korcsoport esetében közel azonos.

5.2.2 Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletek során megállapított takarmányfelvétel

Az egy hetes madarak takarmányfogyasztása a 32. táblázatban látható. A T-2 toxin esetén 11,25%-os takarmány-visszautasítást tapasztaltam a kontroll csoporttal összehasonlítva, míg a DON csoportnál takarmány-visszautasítás nem jelentkezett.

32. táblázat T-2 toxin vagy DON terhelés hatása eltérő életkorú brojlercsirkék takarmányfogyasztására

	Felvett takarmány (g madár ttm).	Eltérés a kontrolltól (%)
1 hetes állatok		
Kontroll (T-2 < 0.02; DON < 0.02 mg/kg takarmány)	169,7	100,00
T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)	162,9	88,75
DON (1,75 mg/kg testtömeg)	171,5	102,19
3 hetes állatok		
Kontroll (T-2 < 0.02; DON < 0.02) mg/kg takarmány)	827,5	100,00
T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)	819,3	87,23
DON (1,29 mg/kg testtömeg)	834,9	125,78

5.2.3 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása 1 hetes brojlercsirkékre

Az egy hetes csirkékkel végzett etetési kísérlet során 1,35 mg T-2 toxin/ kg testtömeg dózis hatását vizsgáltam a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereire, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségére/aktivitására, valamint a glutation redox rendszer szabályozására, azon belül egyes kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének expressziójára. Az Európai Unió által javasolt T-2 + HT-2 toxin határérték 0,25 mg/kg takarmány (2013/165/EU ajánlás), amely kiindulási alapot nyújtott az alkalmazott dózis megtervezéséhez. A 24 órás expozíciós idő alatt 4 óránként történtek a mintavételek.

A kísérlet során etetett takarmány T-2 toxin tartalma 4,86 mg/kg takarmány volt, amely a napi takarmányfelvétel és a testtömeg alapján naponta 1,35 mg/kg testtömeg dózisnak felelt meg. A megadott érték a mesterségesen szennyezett takarmány T-2 toxin tartalmának laboratóriumi vizsgálata során kapott értékeken alapul.

A 24 órás időszak alatt a kontrollhoz viszonyítva 88,75% volt a takarmányfogyasztás, tehát 11,25%-os takarmány-visszautasítást tapasztaltam a T-2 toxinnal kezelt csoportban. Mortalitás a kísérlet ideje alatt nem jelentkezett.

5.2.3.1 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (33. táblázat) és konjugált triének (34. táblázat) értékei a T-2 toxin terhelés hatására csak kismértékben változtak a kontrollhoz viszonyítva. A CD és CT értékekben a kísérlet 20. órájában történt mintavételkor tapasztaltam szignifikáns emelkedést a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva, de ezek az értékek a későbbiekben visszatértek a kontroll szintre.

A CD és CT értékekben a kísérleti csoportokon belül szignifikáns különbségeket találtam az egyes mintavételi időpontok között.

A CD koncentrációja a kontroll csoportban szignifikáns eltérést, nagyobb értéket, az egyes mintavételi időpontok között a 12. és 16. órában mutatott. A T-2 toxinnal kezelt csoportban hasonló tendenciát tapasztaltam, az emelkedés mértéke azonban csak a 16. órában volt szignifikáns mértékű. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns hatása a máj CD tartalmára.

Az egyes mintavételi időpontok között CT esetében a kontroll és a T-2 toxin kezelt csoportban egyaránt nagyobb értékeket mértem a 12. és 16. órában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns hatása a máj CT tartalmára.

A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA értékekben (35. táblázat) szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltam a T-2 toxin kezelt és a kontroll csoportok között.

Az MDA értékekben az egyes mintavételi időpontok között nem volt szignifikáns mértékű eltérés a kontroll csoportban, a T-2 toxin kezelés hatására azonban a 8. és a 16. órában nagyobb értéket mértem a 12. órában történt mintavétel során mért MDA tartalomhoz viszonyítva, a 0. órai mintavételi értéktől azonban egyik sem tért el szignifikánsan. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns mértékű hatása a máj MDA tartalmára.

33. táblázat A konjugált diének (CD) mennyisége az egy hetes csirkék májában a T-2 toxin terhelés hatására (OD 232nm) (átlag±SD; n=5)

	CD (OD 232nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,616± 0,053 A	0,673± 0,029 AB	0,647± 0,035 AB	0,719± 0,031 B	0,734± 0,045 B	0,617± 0,030 aAB	0,632± 0,062 AB	<0,0001
T-2 toxin	0,616± 0,053 A	0,656± 0,035 AB	0,655± 0,063 AB	0,713± 0,050 AB	0,749± 0,071 B	0,698± 0,039 bAB	0,678± 0,020 AB	T: 0,108 H: <0,001 TxH: 0,246

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

34. táblázat A konjugált triének (CT) mennyisége az egy hetes csirkék májában a T-2 toxin terhelés hatására (OD 268nm) (átlag±SD; n=5)

	CT (OD 268nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,128± 0,011 A	0,139± 0,004 ABC	0,139± 0,002 ABC	0,150± 0,013 BC	0,157± 0,010 C	0,133± 0,006 aAB	0,140± 0,015 ABC	0,0004
T-2 toxin	0,128± 0,011 A	0,139± 0,007 AB	0,136± 0,011 AB	0,156± 0,023 B	0,163± 0,020 B	0,152 ± 0,013 bAB	0,149± 0,007 AB	T: 0,641 H: <0,001 TxH: 0,796

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

35. táblázat Az MDA tartalom alakulása az egy hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (malondialdehid µmol/g nedves tömeg) (átlag±SD; n=5)

	MDA (µmol/g)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	4,85± 0,80	5,38± 0,64	4,51± 0,57	4,02± 1,16	4,95± 0,88	4,13± 0,65	4,81± 1,54	0,366
T-2 toxin	4,85± 0,80 AB	4,28± 1,22 AB	6,07± 1,34 B	2,70± 0,59 A	5,53± 1,44 B	4,80± 1,22 AB	4,04± 1,57 AB	T: 0,847 H: 0,007 TxH: 0,058

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

5.2.3.2 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban

A GSH tartalom a T-2 toxin kezelt csoportban (36. táblázat) a 4. és 8. órában szignifikáns mértékben emelkedett a kontrollhoz viszonyítva, a későbbiekben azonban visszatért a kontroll szintre. A kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között is szignifikáns mértékű volt a különbség. A két csoportban a változások tendenciája is hasonló volt, T-2 toxin hatására azonban a változás amplitudója nagyobb volt, különösen a 4. és 16. óra közötti értékekben. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) egyaránt szignifikáns hatással volt a máj GSH tartalmára.

A GPx aktivitás (37. táblázat) a GSH-hoz hasonlóan változott, azaz a 8. órában szignifikáns mértékű, egyéb időpontokban pedig tendenciaszerű, emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva. A T-2 toxinnal kezelt csoporton belül az egyes mintavételi időpontok között szignifikáns különbség volt, a 8. órában, amelyet emelkedett GPx aktivitás idézett elő. A kontroll csoportban az egyes mintavételi időpontok között ugyanakkor nem volt eltérés. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) egyaránt szignifikáns hatással volt a máj GPx aktivitására.

36. táblázat A GSH tartalom alakulása az egy hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GSH ($\mu\text{mol/g}$ 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	2,20 \pm 0,38 AB	2,45 \pm 0,16 aB	2,43 \pm 0,21 aB	2,76 \pm 0,22 BC	2,50 \pm 0,21 B	2,05 \pm 0,15 A	1,97 \pm 0,07 A	<0,0001
T-2 toxin	2,20 \pm 0,38 A	2,91 \pm 0,10 bB	3,23 \pm 0,34 bB	3,14 \pm 0,25 B	2,80 \pm 0,25 B	2,09 \pm 0,15 A	2,15 \pm 0,19 A	

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

37. táblázat A GPx enzim aktivitásának alakulása az egy hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (U/g 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GPx (E/g 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,80 \pm 0,40	1,89 \pm 0,11	1,78 \pm 0,22 a	1,95 \pm 0,14	1,87 \pm 0,17	1,96 \pm 0,05	1,76 \pm 0,13	0,766
T-2 toxin	1,80 \pm 0,40 A	2,27 \pm 0,17 AB	2,41 \pm 0,16 bB	2,14 \pm 0,14 AB	2,20 \pm 0,12 AB	1,90 \pm 0,37 A	1,97 \pm 0,20 AB	T: <0,001 H: 0,038 TxH: 0,033

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

5.2.3.3 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására

A *Gpx4* gén expressziója (38. táblázat) a 24 órás kísérleti időszak alatt kismértékben változott T-2 toxin terhelés hatására a kontrollhoz képest. A 4. és 8. órában megemelkedett, majd a 12. órától a génexpresszió a kontrollhoz képest tendenciájában alacsonyabb volt, azonban csak a 8. órában volt szignifikáns mértékű az emelkedés, valamint a 20. órában szignifikáns mértékben csökkent a génexpresszió. A *Gpx4* génexpressziója a kontroll és a T-2 toxinnal kezelt csoportban is változott az egyes mintavételi időpontok között, tendenciájában emelkedett, azonban a T-2 toxin hatására a változás mértéke nagyobb volt a 4. órában a kontrollhoz képest. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással volt a *Gpx4* gén expressziójára, míg a kezelés (T) nem.

A glutation-szintetáz, *Gss*, gén expressziója (39. táblázat) T-2 toxin hatására tendenciaszerűen megemelkedett a 4. órában, majd alacsony szinten maradt a kontroll csoporthoz képest a 12. órától, amely különbség azonban csak a 24. órában volt szignifikáns mértékű. A kísérleti csoportokban az egyes mintavételi időpontok között ezen gén expressziója esetében is szignifikáns különbségeket figyeltem meg, tendenciájában hasonlóan emelkedést, a 4. órában azonban a T-2 toxin hatására a változás mértéke nagyobb volt. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással volt a *Gss* gén expressziójára, a kezelés (T) azonban nem.

A glutation reduktáz, *Gsr* génexpressziója (40. táblázat) a 4. órára szignifikáns mértékben nőtt, majd a 12. órától tendenciaszerűen a kontroll mintákban mért érték alatt maradt. Ami a 16. órában szignifikáns mértékű eltérést mutatott a kontroll csoporthoz képest. Ezen gén expressziója is szignifikáns mértékben eltért az egyes mintavételi időpontok között. Szignifikáns különbségeket figyeltem meg az egyes csoportokban, de tendenciájában hasonló emelkedést, a T-2 toxin hatására azonban a változás mértéke jelentősebb volt a 4. órában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással volt a *Gsr* gén expressziójára, a kezelés (T) azonban nem.

38. táblázat A *Gpx4* gén expressziójának alakulása az egy hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag \pm SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gpx4</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,00 \pm 0,06 A	1,81 \pm 0,33 B	1,08 \pm 0,05 aA	0,97 \pm 0,15 A	1,02 \pm 0,15 A	1,17 \pm 0,18 bA	1,25 \pm 0,29 A	<0,0001
T-2 toxin	1,00 \pm 0,06 AB	2,25 \pm 0,23 C	1,28 \pm 0,08 bB	0,84 \pm 0,08 A	0,90 \pm 0,16 A	0,84 \pm 0,15 aA	0,88 \pm 0,14 A	T: 0,323 H: <0,001 TxH: <0,001

Az eltérő kisbetűvel (**a**, **b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (**A**, **B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

39. táblázat A *Gss* gén expressziójának alakulása az egy hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gss</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,01± 0,11 AB	4,61± 1,26 C	0,73± 0,09 A	0,22± 0,05 A	0,77± 0,08 A	1,31± 0,24 AB	2,03± 0,66 bB	< 0,0001
T-2 toxin	1,01± 0,11 A	6,09± 0,91 B	0,84± 0,24 A	0,20± 0,04 A	0,59± 0,18 A	1,11± 0,48 A	0,98± 0,14 aA	T: < 0,001 H: < 0,001 TxH: < 0,001

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

40. táblázat A *Gsr* gén expressziójának alakulása az egy hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gsr</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,00± 0,10 A	2,32± 0,30 aB	1,05± 0,14 A	0,79± 0,21 A	1,17± 0,11 bA	1,25± 0,55 A	1,19± 0,24 A	< 0,0001
T-2 toxin	1,00± 0,10 AB	3,70± 0,57 bC	1,34± 0,35 B	0,49± 0,10 A	0,73± 0,11 aAB	0,80± 0,24 AB	0,90± 0,32 AB	T: 0,848 H: < 0,001 TxH: < 0,001

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (1,35 mg/kg testtömeg)

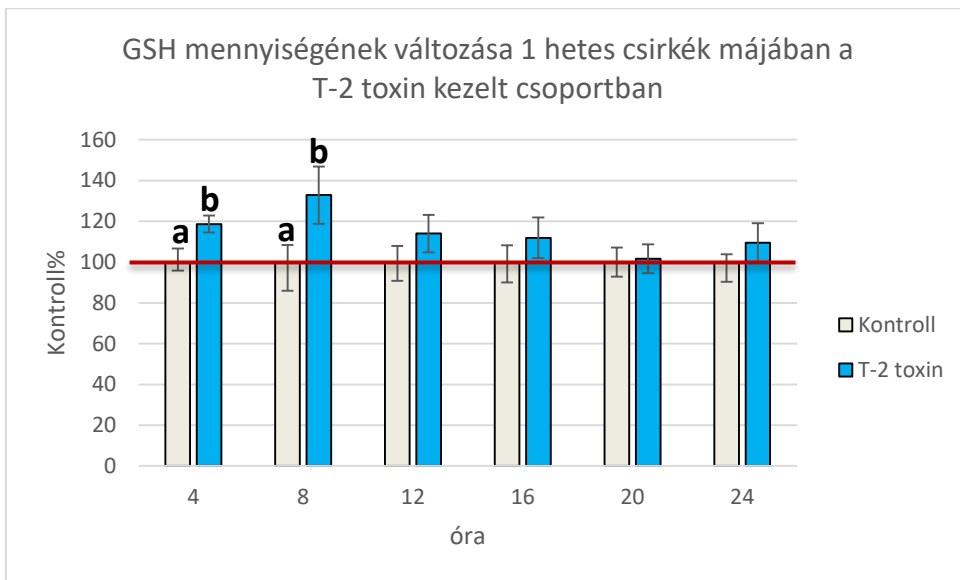
5.2.3.4 Megbeszélés

Az egy hetes brojlercsirkékkel végzett kísérletben a takarmány bélesatornán való áthaladásának ideje 5 óra 45 perc volt, amelyet a színezett takarmány etetésétől a színes ürülék megjelenéséig számított idő alapján határoztam meg, mikotoxin terhelésben nem részesült állatokban. A kísérlet során a madarak a teljes időszak (24 óra) alatt folyamatosan fogyaszthatták a T-2 toxinnal mesterségesen szennyezett takarmányt, a takarmányfelvétel napi ritmusa, valamint a tranzitidő egyaránt összefüggésben állhat a T-2 toxin terhelés hatására kialakuló válaszokkal. A takarmányfelvételtől eltelt idő, valamint a tranzitidő hossza ugyanis befolyásolja a mikotoxinok felszívódására rendelkezésre álló időt, amely összefüggést mutathat a mikotoxin terhelés hatására kialakuló biokémiai és génextpressziós változásokkal. Ez a hatás leginkább a mikotoxinnal szennyezett takarmány első felvételét követő időszakban először megjelenő válaszokkal érvényesülhet, a továbbiakban azt ugyanis a takarmányfelvétel napi ritmusa már elfedheti.

A kísérlet során az alkalmazott dózis mellett elhullást nem tapasztaltam, amelyet egy hasonló dózissal végzett korábbi rövidtávú etetési kísérletben is tapasztaltunk (Bócsai et al., 2016). A trichotecénaváz mikotoxinokra a baromfifélék, azon belül a házityúk, irodalmi adatok alapján, kevésbé érzékenyek, mindazonáltal általánosan elfogadott tény, hogy a T-2 toxin a leginkább toxikus ebből a mikotoxin családból (Sokolovic et al., 2008). A trichotecénaváz mikotoxinok tekintetében az egyes gazdasági állatfajok érzékenysége alapján az alábbi rangsor állítható fel: sertés>baromfifélék>kérődzők (Eriksen 2003). A baromfiféléken belül pedig az érzékenységi rangsor: lúd>kacsa>házityúk (Mézes et al., 1999). A T-2 toxin LD₅₀ értéke 1 napos brojlercsirkénél 4,97 mg/kg testtömeg (Huff et al., 1981).

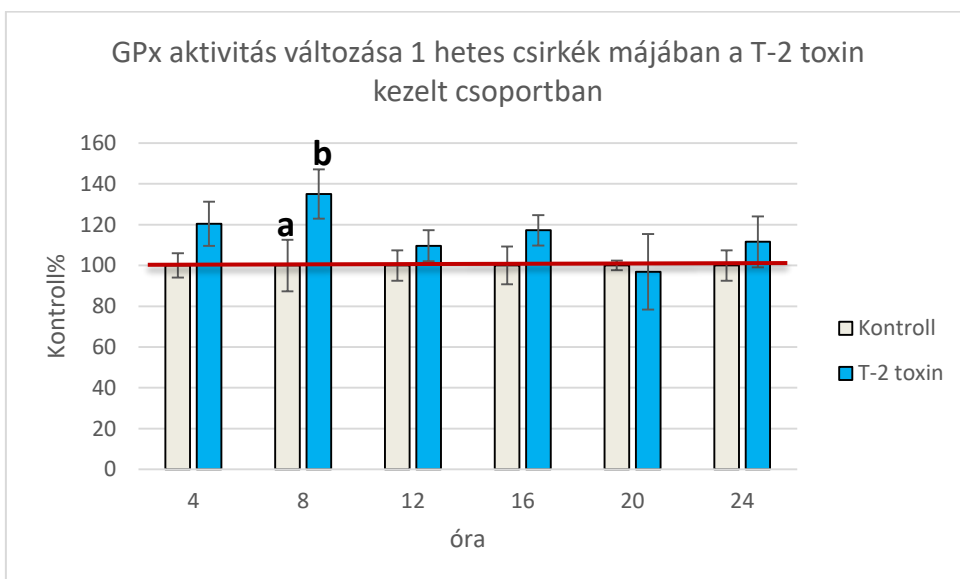
A trichotecénaváz mikotoxinok jól ismert takarmány visszautasítás előidéző hatását jelen kísérlet során is tapasztaltam, ugyanis 1,35 mg/kg testtömeg dózisu T-2 toxin terhelés hatására a takarmány felvétel csökkenésének mértéke 11,25% volt.

Az 1 hetes madarak májában a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CD és CT mennyisége kismértékben emelkedett a 20. órában, az MDA tartalom azonban nem változott a kísérlet 24 órás időtartama alatt. A glutation redox rendszer tagjai ugyanakkor azonos időszak alatt aktiválódtak, amelyet az bizonyít, hogy a kísérleti időszak első 8 órájában szignifikáns mértékű emelkedés volt a GSH tartalomban (30. ábra) és a GPx aktivitásban (31. ábra) is, ami azonban mindkét paraméter esetében a későbbiekben visszatért a kontroll szintre. A glutation redox rendszer szabályozásában a T-2 toxin terhelés hatására szintén szignifikáns változások következtek be. A *Gpx4* génextpressziója (32. ábra) először, a 8. óráig megemelkedett, majd a kontroll szintje alá csökkent. Ehhez hasonló változásokat mutatott a *Gss* expressziója (33. ábra), amely a 8. óráig meghaladta, azt követően pedig alatta maradt a kontroll csoport értékeinek, ami a 24. órában már szignifikáns mértékű volt. Ezt a kettős hatást a *Gsr* esetén is tapasztaltam, ami kezdeti, a 4. órára, emelkedésben, majd ezt követően, a 16. órára, csökkenésben nyilvánult meg (34. ábra).



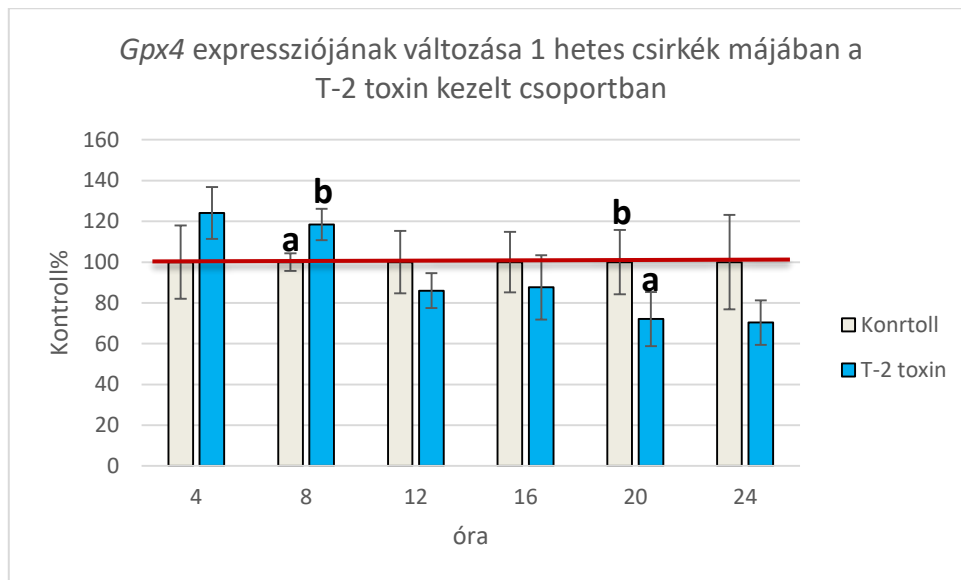
30. ábra A redukált glutation tartalom változása az egy hetes csirkék májában a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 1,35 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



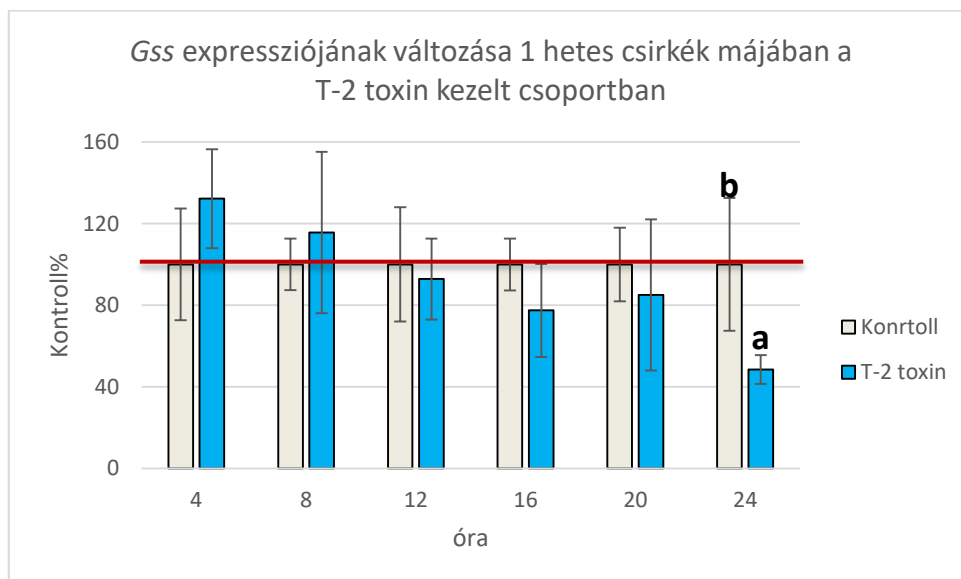
31. ábra A glutation-peroxidáz aktivitásának változása az egy hetes csirkék májában a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. T-2

toxin: 1,35 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



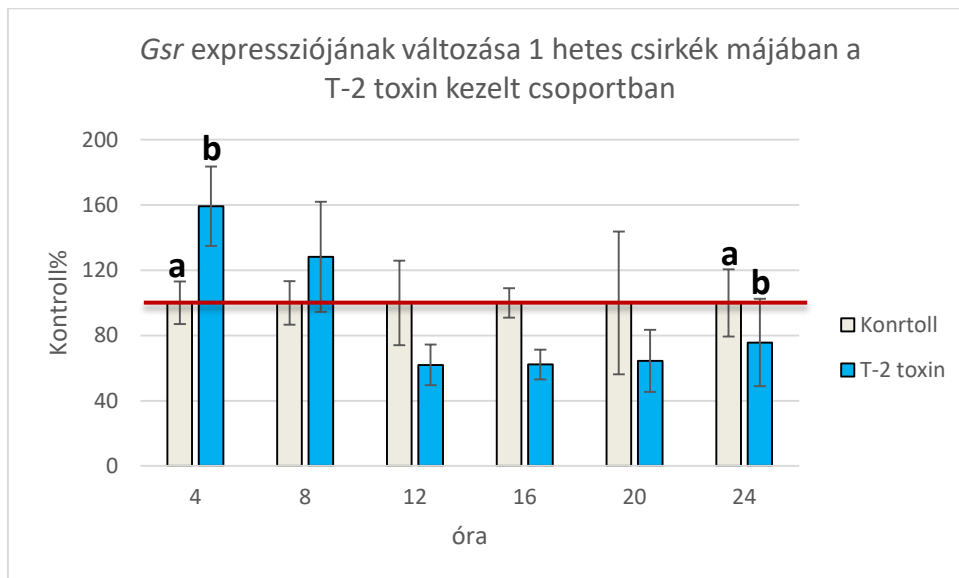
32. ábra A *Gpx4* expressziójának változása az egy hetes csirkék májában a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 1,35 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



33. ábra A *Gss* expressziójának változása az egy hetes csirkék májában a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 1,35 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



34. ábra A *Gsr* expressziójának változása az egy hetes csirkék májában a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 1,35 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje, a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Összefoglalva elmondható, hogy 1 hetes csirkékben T-2 toxin terhelés hatására kismértékben fokozódtak a lipidperoxidációs folyamatok, a glutation redox rendszer (30. ábra és 31. ábra) rövid időn belül aktiválódott, majd a kísérlet első 20. órájára visszatért a kontroll szintre. Szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam a génexpressziós értékekben is, amely valamennyi vizsgált gén esetén (*Gpx4* 29. ábra, *Gss* 30. ábra, *Gsr* 31. ábra) hasonló tendenciát mutatott. A kezdeti expresszió növekedést, a 8. órától csökkent expresszió követte, ami alacsony szinten is maradt. Folyamatos toxin terhelés esetén hosszú távon ez feltételezhetően a gének által kódolt enzimek csökkent mennyiségét/aktivitását eredményezi, ami különböző „feedback” folyamatokon keresztül visszahat a gének expressziójára.

Brojlercsirkéknél számos adattal rendelkezünk a trichotecénavázak mikotoxinokkal, így a T-2 toxinnal összefüggő lipidperoxidációs hatásokról, de jellemzően csak szubkrónikus expozíciót követően (Smith, 1992; Mézes et al., 1998; Surai 2002; Weber et al., 2010).

Korábbi vizsgálatokban megállapították, hogy T-2 toxin terhelés hatására *in vivo* brojlercsirkékben hosszú- (Yang et al., 2016) és rövidtávon (Bócsai et al., 2016), valamint *in vitro*, primer hepatocitákban, 48 óra alatt fokozódott a ROS termelés, amely aktiválta az enzimikus antioxidáns rendszert mind génexpresszió, mind fehérje szinten (Yang et al., 2016). A GSH mennyiségében a T-2 toxin dózistól függő mértékű depléciót állapítottak meg hosszú távú vizsgálatban (Dvorska et al., 2007; Yang et al., 2016), míg primer hepatocita kultúrában a GSH szintézise emelkedett (Yang et al., 2016). Ennek a különbségnek a hátterében feltételezhető a T-2 toxin takarmány-visszautasítást kiváltó hatása *in vivo* rendszerben, ennek következtében ugyanis csökken a GSH szintézishez szükséges aminosav ellátottság.

Jelen kísérletben, 24 óra alatt, nem tapasztaltam a GSH deplécióját, bár a génexpresszió csökkenésének, illetve az antioxidáns- és a xenobiotikum transzformáló rendszer aktivitásának következtében hosszabb távon bizonyosan kimerülne a máj GSH tartalma.

Az oxidatív stressz kialakulása, például T-2 toxin terhelés hatására, indukálhatja az antioxidáns enzimek aktivitását, amelynek háttérében poszt-transzlációs modifikációs folyamatok állhatnak (Shepard et al., 2010). Ilyen indukciót figyeltek meg GPx, SOD és CAT esetében is (Spitz et al., 1992; Tsutsui et al., 2009). Yang et al. (2016) *in vivo* és *in vitro* kísérleteikben is bizonyították, hogy T-2 toxin terhelés hatására nőtt az antioxidáns enzimek aktivitása és génexpressziója is brojlercsirkékben 42 napos expozíciót követően, amelyhez hasonló eredményeket kapott Chaudhary és Lakshmana (2010) is egér agyban.

A legtöbb általam vizsgált paraméter esetében szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam a kísérleti csoportokon belül is az egyes mintavételi időpontok között. Csirke agyban korábban már bizonyították, hogy cirkadián ritmus tapasztalható mind a GPx, mind a GSH esetében (Pablos et al., 1998). A cirkadián ritmus hatásait illetve szabályozását az 5.1.2.5 fejezetben tekintetem át részleteiben. Fontosnak tartom azonban kiemelni, hogy a vizsgálatban alkalmazott folyamatos megvilágítás eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától, azonban a minden csoportban azonos környezeti paraméterek miatt az egyes csoportok közötti különbség megfelelően vizsgálható volt, bár a természetes cirkadián ritmust ez megzavarhatta az antioxidáns rendszer egyes elemeiben mind fehérje, mind mRNS szinten (Rodriguez et al., 2004).

Korábbi tanulmányokban, baromfifélékben, T-2 toxin hatására, mind dózis-, mind időfüggő, változásokat tapasztaltak az antioxidáns rendszer elemeiben (Prasath et al., 2009; Che et al., 2011; Yang et al., 2016). Ezeket a hatásokat korábban, az 5.2.4.4 fejezetben, már részletesen áttekintettem.

5.2.4 Rövidtávú DON terhelés hatása az 1 hetes brojlersirkékre

Az egy hetes csirkékkel végzett etetéses kísérlet során 1,75 mg/kg testtömeg dózisú DON kezelés hatását vizsgáltam a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereire, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségére/aktivitására, valamint a glutation redox rendszer szabályozására, azon belül egyes kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének expressziójára. Az Európai Unió által javasolt DON határérték 5 mg/kg takarmány, mely kiindulási alapot nyújtott az alkalmazott dózis megtervezéséhez. A 24 órás expozíciós idő alatt 4 óránként történtek a mintavételek.

A kísérlet során etetett takarmány DON tartalma 5,77 mg/kg takarmány volt, ami a takarmányfelvételt figyelembe véve testtömegre vonatkoztatva naponta 1,75 mg/testtömeg kg volt, amelyet a mesterségesen szennyezett takarmány felvett mennyisége és annak mért mikotoxin tartalma alapján számítottam.

5.2.4.1 Rövidtávú DON terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (41. táblázat) és konjugált triének (42. táblázat) mennyisége a DON terhelés hatására nem változott szignifikáns mértékben a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A CD esetében a kísérleti csoportokon belül szignifikáns különbségeket találtam az egyes mintavételi időpontok között. A kontroll értékekben is volt szignifikáns mértékű eltérés az egyes mintavételi időpontok között, a 12. és 16. órában ugyanis nagyobb értéket mértem. A DON toxinnal kezelt csoportban is hasonló tendenciát tapasztaltam, azonban az emelkedés csak a 16. órában volt szignifikáns mértékű. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns hatása a máj CD tartalmára.

A CT esetében a kontroll és a DON kezelt csoportban is a 12. és 16. órában tapasztaltam magasabb értéket az egyes mintavételi időpontok esetén. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns hatása a máj CT tartalmára.

A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA értékekben (43. táblázat) szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltam a DON kezelés hatására a kontrollhoz viszonyítva.

Az MDA értékekben az időpontok között nem volt szignifikáns mértékű eltérés a kontroll csoportban, a DON kezelés hatására azonban 8. órában nagyobb, míg a 12. órában kisebb értéket mértem a 0. óraihoz viszonyítva. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelésnek (T) nem, az időnek (H), valamint a kezelés x időnek (TxH) azonban szignifikáns hatása volt a máj MDA tartalmára.

41. táblázat A konjugált diének (CD) mennyisége az egy hetes csirkék májában a DON terhelés hatására (OD 232nm) (átlag±SD; n=5)

	CD (OD 232nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,616± 0,053 A	0,673± 0,029 AB	0,647± 0,035 AB	0,719± 0,031 B	0,734± 0,045 B	0,617± 0,030 AB	0,632± 0,062 AB	<0,0001
DON	0,616± 0,053 A	0,708± 0,029 AB	0,665± 0,065 AB	0,741± 0,050 AB	0,760± 0,055 B	0,630± 0,022 AB	0,653± 0,051 AB	
								T: 0,083 H: < 0,001 TxH: 0,990

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

42. táblázat A konjugált triének (CT) mennyisége az egy hetes csirkék májában a DON terhelés hatására (OD 268nm) (átlag±SD; n=5)

	CT (OD 268nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,128± 0,011 A	0,139± 0,004 ABC	0,139± 0,002 ABC	0,150± 0,013 BC	0,157± 0,010 C	0,133± 0,006 AB	0,140± 0,015 ABC	0,0004
DON	0,128± 0,011 A	0,145± 0,004 ABC	0,138± 0,014 ABC	0,156± 0,012 BC	0,158± 0,010 C	0,137± 0,007 AB	0,138± 0,007 ABC	
								T: 0,366 H: < 0,001 TxH: 0,929

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

43. táblázat Az MDA tartalom alakulása az egy hetes csirkék májában DON terhelés hatására (malondialdehid µmol/g nedves tömeg) (átlag±SD; n=5)

	MDA (µmol/g)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	4,85± 0,80	5,38± 0,64	4,51± 0,57	4,02± 1,16	4,95± 0,88	4,13± 0,65	4,81± 1,54	0,366
DON	4,85± 0,80 B	4,31± 1,30 AB	6,04± 0,69 C	3,32± 0,29 A	4,22± 0,43 AB	4,67± 0,56 ABC	4,87± 0,84 B	
								T: 0,813 H: 0,007 TxH: 0,034

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

5.2.4.2 Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban

A DON-al mesterségesen szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban a GSH tartalom (44. táblázat) nem tért el szignifikáns mértékben a kontroll csoport értékeitől. A kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között is szignifikáns mértékű különbség volt, sőt a két csoportban a tendencia is hasonló volt. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T) és az idő (H) szignifikáns hatással volt a máj GSH tartalmára, míg a kezelés x idő (TxH) együttes hatása nem volt kimutatható.

A GPx aktivitásban (45. táblázat), a GSH-hoz hasonlóan, szintén nem tapasztaltam szignifikáns mértékű eltéréseket a kontroll és a DON kezelt csoportok között. A kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között szintén nem voltak szignifikáns mértékű különbségek, emiatt a kezelés (T), az idő (H), és a kezelés x idő (TxH) sem tudtam statisztikailag alátámasztani.

44. táblázat A GSH tartalom alakulása az egy hetes csirkék májában DON terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GSH ($\mu\text{mol/g}$ 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	2,20 \pm 0,38 AB	2,45 \pm 0,16 B	2,43 \pm 0,21 B	2,76 \pm 0,22 BC	2,50 \pm 0,21 B	2,05 \pm 0,15 A	1,97 \pm 0,07 A	<0,0001
DON	2,20 \pm 0,38 AB	2,23 \pm 0,07 AB	2,02 \pm 0,12 AB	2,41 \pm 0,31 B	2,31 \pm 0,22 AB	1,91 \pm 0,08 A	1,98 \pm 0,10 AB	T: 0,001 H: <0,001 TxH: 0,244

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

45. táblázat A GPx enzim aktivitásának alakulása az egy hetes csirkék májában DON terhelés hatására (U/g 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GPx (E/g 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,80 \pm 0,40	1,89 \pm 0,11	1,78 \pm 0,22	1,95 \pm 0,14	1,87 \pm 0,17	1,96 \pm 0,05	1,76 \pm 0,13	0,766
DON	1,80 \pm 0,40	2,03 \pm 0,51	1,68 \pm 0,09	1,90 \pm 0,23	1,74 \pm 0,35	1,87 \pm 0,11	1,86 \pm 0,10	T: 0,772 H: 0,435 TxH: 0,869

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

5.2.4.3 Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban

A *Gpx4* gén expressziója (46. táblázat) csak kismértékben változott a DON terhelés hatására a 24 órás kísérleti időszak alatt. Csak a 8. órában tapasztaltam szignifikánsan nagyobb értékeket a kontrollhoz viszonyítva. Ezen gén esetén mindkét csoportban szignifikáns különbségeket figyeltem meg az egyes mintavételi időpontok között. A *Gpx4* génepxressziója a kontroll és a DON kezelt csoportban tendenciájában hasonlóan emelkedett a kísérlet első 4 órájában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), valamint a kezelés x idő (TxH) sem volt szignifikáns hatással a *Gpx4* gén expressziójára, míg az időnek (H) volt ilyen hatása.

A glutation-szintetáz, *Gss* gén expressziója (47. táblázat) a kezelt csoportban alacsonyabb volt a 8. órában, majd ezt követően, a 12. órában magasabb, de ezt követően folyamatosan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest. Ezek a különbségek a 16., 20. és 24. órában szignifikáns mértékűek voltak a kontroll értékekhez képest. A kísérleti csoportokban az egyes mintavételi időpontok között a *Gss* gén expressziója esetében is szignifikáns különbségeket figyeltem meg, tendenciájában hasonlóan emelkedést és mindkét kísérleti csoportban emelkedett értékeket tapasztaltam a 4. órában történt mintavételkor. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással volt a *Gss* gén expressziójára.

A glutation reduktáz, *Gsr* gén expressziója (48. táblázat) a kezelt csoportban a 4. és 12. órában szignifikánsan nagyobb, míg azt követően tendenciáját tekintve kisebb, a 16. órában pedig szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Szignifikáns különbségeket figyeltem meg az egyes kísérleti csoportokban az egyes mintavételi időpontok között, tendenciájában hasonló emelkedést, a DON hatására azonban a változás mértéke nagyobb volt a 4. órában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) egyaránt szignifikáns hatással volt a *Gss* gén expressziójára. erre a paraméterre.

46. táblázat A *Gpx4* gén expressziójának alakulása az egy hetes csirkék májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gpx4</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,00± 0,06 A	1,81± 0,33 B	1,08± 0,05 aA	0,97± 0,15 A	1,02± 0,15 A	1,17± 0,18 A	1,25± 0,29 A	< 0,0001
DON	1,00± 0,06 A	1,99± 0,35 B	1,35± 0,10 bA	0,97± 0,06 A	0,99± 0,15 A	1,15± 0,12 A	1,25± 0,10 A	T: 0,242 H: < 0,001 TxH: 0,534

Az eltérő kisbetűvel (**a**, **b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A**, **B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

47. táblázat A *Gss* gén expressziójának alakulása az egy hetes csirkék májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gss</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,01± 0,11 AB	4,61± 1,26 C	0,73± 0,09 bA	0,22± 0,05 aA	0,77± 0,08 bA	1,31± 0,24 bAB	2,03± 0,66 bB	< 0,0001
DON	1,01± 0,11 AB	3,24± 0,09 C	0,32± 0,09 aA	0,58± 0,07 bAB	0,30± 0,10 aA	0,28± 0,04 aA	0,94± 0,29 aB	T: < 0,001 H: < 0,001 TxH: < 0,001

Az eltérő kisbetűvel (**a**, **b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A**, **B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,75 mg/kg testtömeg)

48. táblázat A *Gsr* gén expressziójának alakulása az egy hetes csirkék májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gsr</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,00± 0,10 A	2,32± 0,30 aB	1,05± 0,14 A	0,79± 0,21 aA	1,17± 0,11 bA	1,25± 0,55 A	1,19± 0,24 A	< 0,0001
DON	1,00± 0,10 A	3,85± 0,47 bB	0,99± 0,29 A	1,33± 0,18 bA	0,80± 0,12 aA	1,18± 0,24 A	1,18± 0,19 A	T: 0,002 H: < 0,001 TxH: < 0,001

Az eltérő kisbetűvel (**a**, **b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A**, **B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

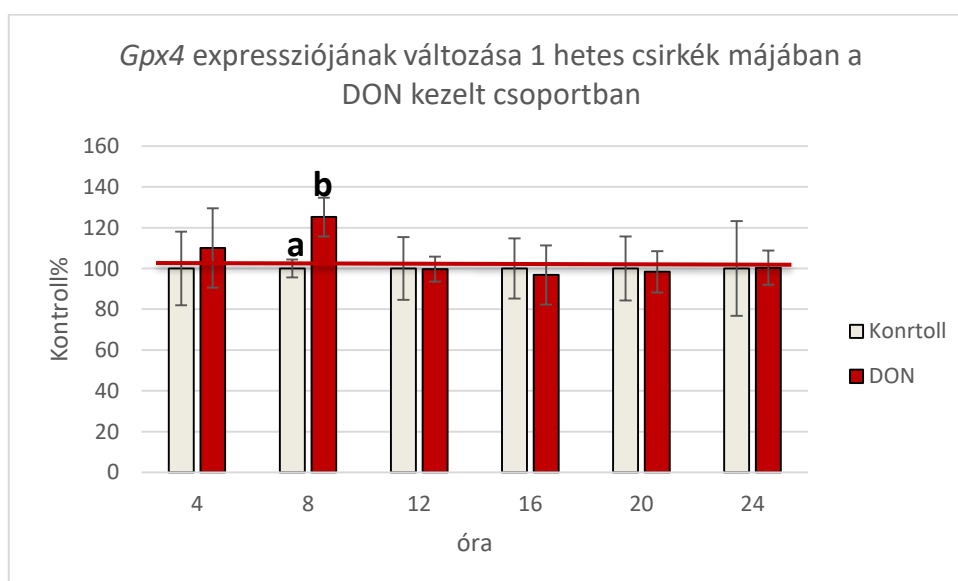
DON (1,75 mg/kg testtömeg)

5.2.4.4 Megbeszélés

Az egy hetes brojlersirkékkel végzett kísérletben meghatároztam a takarmány tranzitidejét, amelyet a színezett takarmány etetésétől a színes ürülék megjelenéséig számított idő alapján állapítottam meg mikotoxin terhelésben nem részesült állatokban, ez az érték 5 óra 45 percnél adódott. A kísérlet során a madarak folyamatosan hozzáfértek a DON-nal mesterségesen szennyezett takarmányhoz, azonban a fent megadott tranzitidő összefüggésben állhat a kialakuló válaszok megjelenésének idejével, mivel a tranzitidő befolyásolja a mikotoxinok felszívódásának időtartamát, amely viszont összefüggésben lehet a mikotoxin terhelés hatására kialakuló biokémiai és génexpressziós változások időben először megjelenő válaszreakcióival.

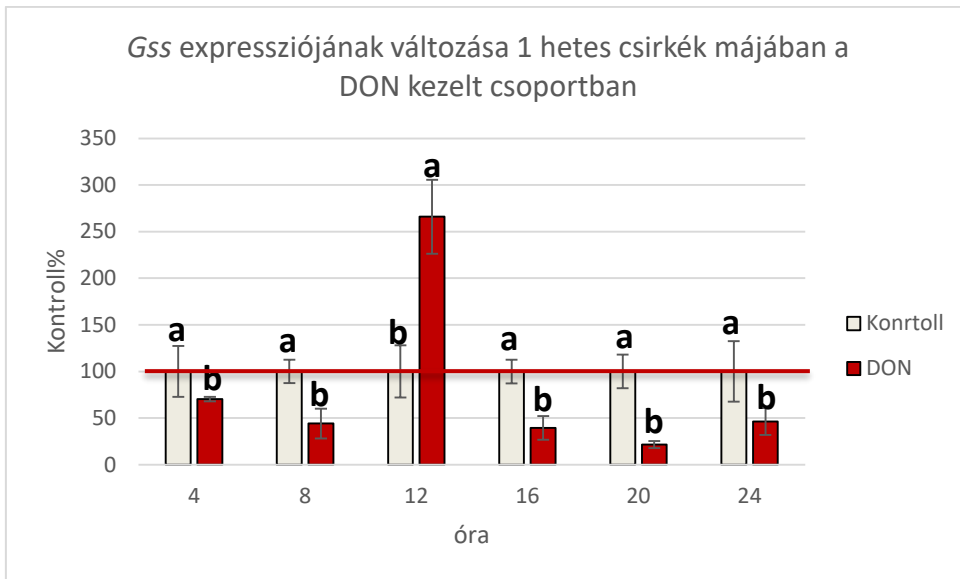
A kísérlet során takarmány-visszautasítást vagy elhullást nem tapasztaltam az alkalmazott 1,75 mg/ kg testtömeg dózis mellett, hasonlóan más, hasonló dózistartományban végzett rövidtávú etetési vizsgálatok eredményeihez (Grenier et al., 2016). Amint arra a korábbiakban már utaltam a trichotecénvázas mikotoxinokra a baromfifélék, azon belül a házityúk kevésbé érzékenyek. Emellett a DON, a T-2 toxinhoz viszonyítva, kevésbé toxikus (Sokolovic et al., 2008). DON esetében az LD₅₀ értéke 1 napos brojlersirkénél 140 mg/kg testtömeg (Huff et al., 1981).

DON terhelés hatására az 1 hetes madarak májában a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (CD) és triének (CT), és a terminációs szakasz markere, a MDA tartalom sem változott szignifikáns mértékben a vizsgált 24 órás periódus alatt. A glutation redox rendszerben szintén nem tapasztaltam szignifikáns mértékű változásokat a DON 24 órás expozíció alatt. A glutation redox rendszer szabályozásában azonban szignifikáns változások következtek be. A *Gpx4* génexpressziója (35. ábra) a kezelés megkezdése után megemelkedett, a 8. órában szignifikáns mértékűt ért el, majd vissza állt a kontroll egyedeknél mért szintre. Ezzel szemben a *Gss* génexpresszió (36. ábra) tendenciájában csökkenést tapasztaltam, amely szignifikáns mértékű volt a 8., 16. 20. és 24. órában, míg ezzel ellentétes, emelkedő értéket, a 12. órában mértem. A *Gsr* génexpressziója (37. ábra) esetén kettős hatást tapasztaltam, emelkedést a 4. és 12. órában, majd ezt követően csökkenést a 16. órában.



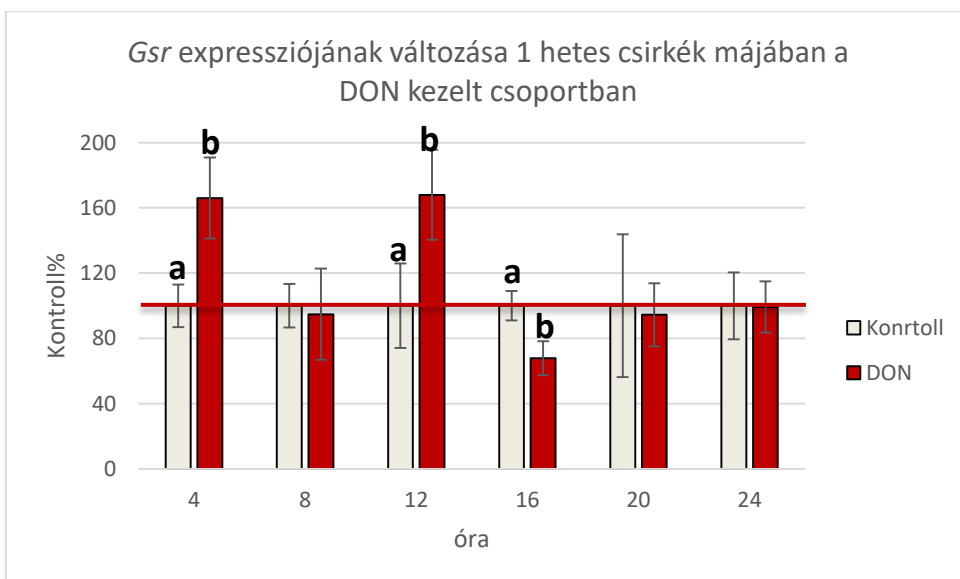
35. ábra A *Gpx4* expressziójának változása egy hetes csirkék májában a DON kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

DON: 1,75 mg DON/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



36. ábra A *Gss* expressziójának változása egy hetes csirkék májában a DON kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt a kontroll százalékos ábrázolásban, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

DON: 1,75 mg DON/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



37. ábra A *Gsr* expressziójának változása egy hetes csirkék májában a DON kezelt csoportban a kísérlet 24 órája alatt a kontroll százalékos ábrázolásában, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

DON: 1,75 mg DON/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Brojlercsirkéknél számos adattal rendelkezünk a trichotecénaváz mikotoxinokkal, de főképp a T-2 toxinnal összefüggő lipidperoxidációs hatásokról, azonban jellemzően szubkrónikus expozíciót követően (Smith, 1992; Mézes et al., 1998; Surai 2002; Weber et al., 2010). Osselaere et al. (2013) vizsgálatai során viszont azt is megállapította, hogy brojlercsirkék vékonybelében oxidatív stressz alakult ki DON-nal szennyezett takarmány felvételét követően, amelynek hátterében a hemoxigenáz és a xantin-oxidoreduktáz enzimek génexpressziójának indukciója áll. Szintén oxidatív stresszt mutattak ki *in vitro* Caco-2 humán bélhám sejtvonalon végzett vizsgálatokban, ahol emelkedett MDA értékeket figyeltek meg DON kezelést követően (Kouadio et al., 2005). A szakirodalomban azonban ellentmondó adatok is találhatóak a DON terhelés és a ROS képződés összefüggésére vonatkozóan (Frankic et al., 2006; Awad et al., 2011), ezen tanulmányok azonban főképp csak DNS károsodást állapítottak meg, amely arra utal, hogy a DON-nak közvetlen genotoxikus hatása is lehet (Awad et al., 2011; El Golli-Bennour és Bacha, 2011).

Összefoglalva elmondható, hogy a máj vizsgálata alapján az 1 hetes csirkék DON terhelésre kevésbé érzékenyen reagáltak a lipidperoxidációs folyamatok és a glutation redox rendszer markereinek tekintetében, ugyanakkor szignifikáns különbségek voltak kimutathatók a génexpressziós változásokban. Fontosnak tartom azt is kiemelni, hogy a *GSS* gén esetében a génexpresszió (36. ábra) tendenciájában szinte folyamatos csökkenést figyeltem meg a teljes 24 órás periódus alatt, mely hasonló a T-2 toxin esetében megfigyelt tendenciához.

A legtöbb paraméternél szignifikáns eltéréseket tapasztaltam az egyes csoportokon belül a mintavételi időpontok között. Csirke agyban korábban bizonyították, hogy a cirkadián ritmus befolyásolja a GPx aktivitását és a GSH mennyiségét (Pablos et al., 1998). A cirkadián ritmus hatásait, illetve annak szabályozását az 5.1.2.5 fejezetben tekintetem át részleteiben. Amint arra a brojlercsirkékkel végzett kísérletem kapcsán már utaltam, a vizsgálat során alkalmazott folyamatos megvilágítás eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától, azonban a minden csoportban azonos környezeti paraméterek miatt az egyes csoportok közötti különbség megfelelően vizsgálható volt, bár a természetes cirkadián ritmust ez megzavarhatta az antioxidáns rendszer egyes elemeiben mind fehérje, mind mRNS szinten (Rodriguez et al., 2004).

DON hatására a lipidperoxidációs paraméterek és a génexpressziós változások többségében szignifikáns mértékű kezelés x idő hatás összefüggést mutattak, a glutation redox rendszer általam vizsgált paraméterei esetében ezt statisztikailag nem tudtam alátámasztani. Igaz, hogy ezen paraméterek esetében a DON hatását sem lehetett kimutatni.

5.2.5 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása 3 hetes brojlersirkékre

A három hetes csirkékkel végzett etetéses kísérlet során 0,77 mg/ kg testtömeg dózisú T-2 toxin hatását vizsgáltam a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereire, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségére/aktivitására, továbbá a glutation redox rendszer szabályozására, azon belül egyes kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének expressziójára. Az Európai Unió által javasolt T-2 toxin határérték 0,25 mg/kg takarmány, mely kiindulási alapot nyújtott az alkalmazott dózis megtervezéséhez. A 24 órás expozíciós idő alatt 4 óránként történtek a mintavételek.

A mesterségesen szennyezett takarmányok mikotoxin tartalma 4,86 mg/kg takarmány volt, ami 0,77 mg/kg testtömeg dózissal felelt meg. A dózis értéket a mesterségesen szennyezett takarmány felvett mennyisége és mikotoxin tartalmának mért T-2 toxin tartalma alapján számítottam. A kísérleti időszak, 24 óra, alatt a T-2 toxinnal szennyezett takarmány felvétel mértéke a kontrollhoz viszonyítva 87% volt, tehát 12,77%-os mértékű takarmány-visszautasítást tapasztaltam. Mortalitás azonban a kísérlet időtartama alatt nem volt.

5.2.5.1 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (49. táblázat) és konjugált triének (50. táblázat) csak kismértékben változtak a T-2 toxin terhelés hatására. A 24. órában a máj CD tartalma szignifikáns mértékben nőtt a kontrollhoz viszonyítva. A CT esetén szignifikáns eltérés nem volt a kontrollhoz képest.

A CD esetében a kontroll értékekben is kimutatható volt szignifikáns mértékű eltérés az egyes mintavételi időpontok között. A kiindulási értékhez, 0. órához, viszonyítva a 4. órában csökkent, míg a 16. órában nagyobb értéket tapasztaltam. A T-2 toxinnal kezelt csoportban is hasonló tendenciát tapasztaltam, az emelkedés azonban a 16. óra mellett a 24. órában is szignifikáns mértékű volt. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns hatása a máj CD tartalmára.

A máj CT tartalmában az egyes mintavételi időpontok esetében a kontroll és a T-2 toxinnal kezelt csoportokban egyaránt a 16. és 24. órában tapasztaltam nagyobb értékeket, a kontroll csoportban azonban ezt a 4. órában csökkenés előzte meg. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül csak az időnek volt szignifikáns hatása a máj CT tartalmára.

A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA értékekben (51. táblázat) szignifikánsan nagyobb értéket mértem a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kontrollhoz képest, de csak a 8. órai mintavételkor. Az egyes mintavételi időpontok között a T-2 csoport esetében voltak szignifikáns eltéréseket, a kontroll csoportban azonban nem. A T-2 toxin kezelés hatására a 8. órában magasabb értéket mértem, amelynek hátterében a T-2 toxin expozíció hatására megemelkedett MDA mennyiség állhat. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül egyiknek sem volt szignifikáns hatása a máj MDA koncentrációjára. paraméterre.

49. táblázat A konjugált diének (CD) mennyisége a három hetes csirkék májában a T-2 toxin terhelés hatására (OD 232nm) (átlag±SD; n=5)

	CD (OD 232nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,477± 0,023 B	0,406± 0,012 A	0,479± 0,034 B	0,497± 0,027 BC	0,537± 0,024 C	0,513± 0,038 BC	0,530± 0,016 aBC	<0,0001
T-2 toxin	0,477± 0,023 B	0,411± 0,043 A	0,494± 0,029 BC	0,463± 0,026 AB	0,551± 0,023 C	0,509± 0,041 BC	0,566± 0,011 bC	T: 0,505 H: <0,001 TxH: 0,213

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

50. táblázat A konjugált triének (CT) mennyisége a három hetes csirkék májában a T-2 toxin terhelés hatására (OD 268nm) (átlag±SD; n=5)

	CT (OD 268nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,108± 0,012 B	0,091± 0,005 A	0,110± 0,009 B	0,111± 0,005 B	0,123± 0,008 C	0,114± 0,007 B	0,130± 0,003 C	<0,0001
T-2 toxin	0,108± 0,012 A	0,094± 0,008 A	0,112± 0,007 A	0,106± 0,005 A	0,129± 0,007 B	0,113± 0,009 A	0,130± 0,004 B	T: 0,752 H: <0,001 TxH: 0,801

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

51. táblázat Az MDA tartalom változása három hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (malondialdehid µmol/g nedves tömeg) (átlag±SD; n=5)

	MDA (µmol/g)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	4,40± 1,24	4,50± 1,05	4,29± 0,55 a	4,24± 0,63	5,19± 1,50	4,56± 1,58	4,36± 0,91	0,904
T-2 toxin	4,40± 1,24 A	4,29± 1,05 A	6,70± 1,06 bB	4,06± 0,73 A	4,67± 0,74 A	4,25± 0,91 A	4,62± 0,35 A	T: 0,397 H: 0,108 TxH: 0,059

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

5.2.5.2 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban

A T-2 toxinnal kezelt csoportban a GSH tartalom (52. táblázat) a 4., 8., majd a 20. órában is szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollban. A kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között is szignifikáns mértékű volt az eltérés. A kontroll csoportban csak a 24. órai mintavételkor tért el szignifikánsan, míg a T-2 toxinnal kezelt csoportban a 8. és a 20. órában is szignifikáns eltérés volt, amelynek háttérében a toxin hatására megemelkedett értékek állnak. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással voltak a máj GSH tartalmára.

A GPx aktivitás (53. táblázat) a GSH-hoz hasonlóan változott, azaz T-2 toxin hatására a 4., 8. és 20. órában szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll.

A kontroll csoportban az egyes mintavételi időpontok között eltérés volt kimutatható, a 4. órában szignifikáns emelkedés, míg a T-2 toxin hatására a 4., 8., és 20. órában is emelkedett értéket mértem, amelyet véleményem szerint a toxin expozíció által indukált enzim aktivitás eredményezett. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T) és az idő (H) volt szignifikáns hatással erre a paraméterre, míg a kezelés x idő (TxH) együttes hatását nem sikerült bizonyítani.

52. táblázat A GSH tartalom alakulása három hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GSH ($\mu\text{mol/g}$ 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	2,05 \pm 0,25 B	1,80 \pm 0,18 aAB	2,31 \pm 0,16 aB	2,53 \pm 0,23 B	2,57 \pm 0,27 B	2,50 \pm 0,24 aB	1,78 \pm 0,11 A	<0,0001
T-2 toxin	2,05 \pm 0,25 A	2,47 \pm 0,25 bAB	3,09 \pm 0,32 bB	2,69 \pm 0,29 AB	2,62 \pm 0,31 AB	3,05 \pm 0,25 bB	2,00 \pm 0,17 AB	T: <0,001 H: <0,001 TxH: 0,002

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

53. táblázat A GPx enzim aktivitásának alakulása három hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (U/g 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GPx (E/g 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	2,16 \pm 0,28 AB	2,81 \pm 0,03 aC	2,45 \pm 0,10 aB	2,50 \pm 0,29 B	2,15 \pm 0,25 AB	2,32 \pm 0,30 aB	1,74 \pm 0,04 A	0,0002
T-2 toxin	2,16 \pm 0,28 A	3,15 \pm 0,27 bC	3,08 \pm 0,07 bC	2,54 \pm 0,44 AB	2,39 \pm 0,24 A	2,88 \pm 0,26 bBC	2,00 \pm 0,24 A	T: <0,001 H: <0,001 TxH: 0,068

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

5.2.5.3 Rövidtávú T-2 toxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására

A *Gpx4* gén expressziója (54. táblázat) a T-2 toxin terhelés hatására nem változott a 24 órás kísérleti időszak alatt a kontrollhoz viszonyítva. A *Gpx4* génepxressziója a kontroll és a T-2 toxinnal kezelt csoportban is változott az egyes mintavételi időpontok között, tendenciájában hasonlóan emelkedett, a T-2 toxin hatására azonban a változás mértéke nagyobb volt a 4. órában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H) szignifikáns hatással volt a *Gpx4* gén expressziójára, míg a kezelés (T) valamint a kezelés x idő (TxH) nem.

A glutation-szintetáz, *Gss* gén expressziója (55. táblázat) T-2 toxin hatására tendenciaszerűen és folyamatosan emelkedett a kontroll csoporthoz képest, amely a 12., 20. és 24. órában szignifikáns mértékű volt. A kísérleti csoportokban az egyes mintavételi időpontok között szignifikáns különbségeket figyeltem meg, tendenciájában pedig csökkenést a 20. óráig, amit a 24. órában ismét emelkedés követett. A T-2 toxin hatására azonban a változás mértéke nagyobb volt a 4. és 8. órában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), valamint a kezelés (T) is szignifikáns hatással volt erre a paraméterre, a kezelés x idő (TxH) együttesen azonban nem.

A glutation reduktáz, *Gsr* gén expressziója (56. táblázat) kezdeti emelkedést (a 4. órában) követően szignifikáns mértékű eltérést, csökkenést, a 16. és 24 órában mutatott a T-2 toxinnal kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva. Ennek a génnek az expressziója is szignifikáns mértékben eltért az egyes mintavételi időpontok között, amely tendenciájában is hasonló, azaz csökkenés volt a két csoportban. A T-2 toxin hatására azonban a változás mértéke nagyobb volt a 16. és 24. órában. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H) szignifikáns hatással volt a *Gsr* gén expressziójára, a kezelés (T) valamint a kezelés x idő (TxH) viszont nem.

54. táblázat A *Gpx4* gén expressziójának alakulása három hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag \pm SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gpx4</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,98 \pm 0,10 B	1,57 \pm 0,33 C	1,25 \pm 0,05 BC	1,02 \pm 0,17 B	0,73 \pm 0,04 AB	0,57 \pm 0,04 A	0,94 \pm 0,11 AB	<0,0001
T-2 toxin	0,98 \pm 0,10 AB	1,70 \pm 0,17 C	1,23 \pm 0,23 B	1,22 \pm 0,11 B	0,80 \pm 0,08 A	0,70 \pm 0,05 A	0,83 \pm 0,10 A	T: 0,122 H: <0,001 TxH: 0,337

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

55. táblázat A *Gss* gén expressziójának alakulása három hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gss</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,02± 0,16 BC	1,57± 0,30 D	1,10± 0,12 C	0,69± 0,15 aB	0,38± 0,12 AB	0,18± 0,00 aA	0,41± 0,14 aAB	<0,0001
T-2 toxin	1,02± 0,16 B	1,61± 0,12 C	1,13± 0,07 B	0,98± 0,14 bB	0,58± 0,15 A	0,42± 0,15 bA	0,77± 0,19 bAB	T: <0,001 H: <0,001 TxH: 0,075

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

56. táblázat A *Gsr* gén expressziójának alakulása három hetes csirkék májában T-2 toxin terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gsr</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,02± 0,19 BC	1,24± 0,29 C	0,99± 0,29 BC	0,89± 0,11 BC	0,80± 0,07 bB	0,27± 0,13 A	0,32± 0,04 bA	<0,0001
T-2 toxin	1,02± 0,19 B	1,46± 0,21 C	1,03± 0,23 B	0,91± 0,14 B	0,45± 0,16 aA	0,39± 0,07 A	0,15± 0,11 aA	T: 0,762 H: <0,001 TxH: 0,062

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p<0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

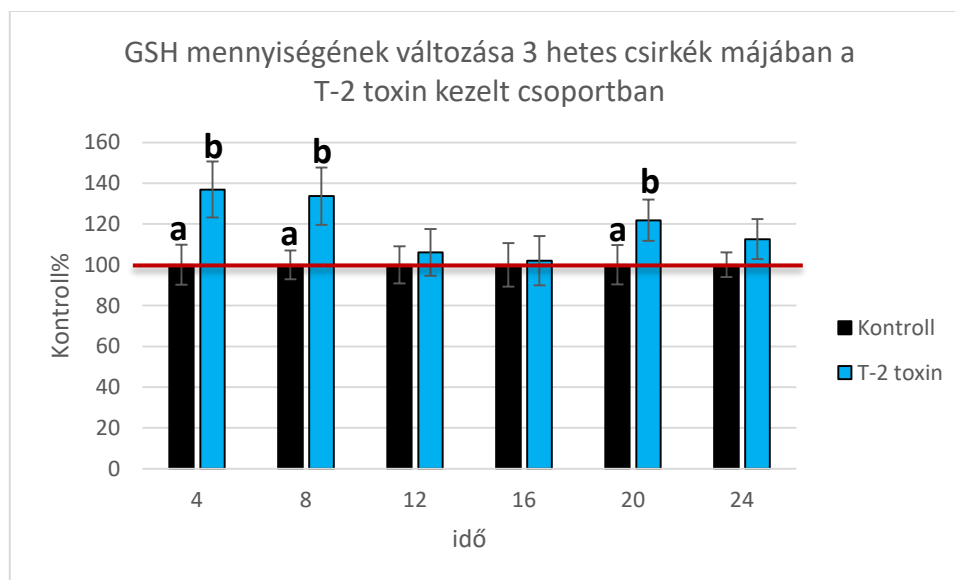
T-2 toxin (0,77 mg/kg testtömeg)

5.2.5.4 Megbeszélés

A három hetes brojlercsirkékkel végzett kísérletben a takarmány tranzitideje 5 óra 40 perc volt, amelyet a színezett takarmány etetésének megkezdésétől az első színes ürülék megjelenéséig számított idő alapján állapítottam meg a kontroll csoportban. A kísérlet során a madarak folyamatosan hozzáfértek a T-2 toxinnal mesterségesen szennyezett takarmányhoz, azonban a tranzitidő hossza összefüggésben állhat a mikotoxin hatására kialakuló válaszok első megjelenésének idejével. A kísérlet alatt, az alkalmazott 0,77 mg T-2 toxin/kg testtömeg dózis mellett, elhullást nem, 12,77%-os takarmány-visszautasítást viszont tapasztaltam, amelyet korábbi hasonló dózissal végzett rövidtávú etetéses vizsgálatok is alátámasztanak (Bócsai et al., 2016). A trichotecénvázis mikotoxinokra a házityúk ugyan kevésbé érzékeny, de a T-2 toxint tekintik a leginkább toxikus trichotecénvázis mikotoxinoknak (Sokolovic et al., 2008).

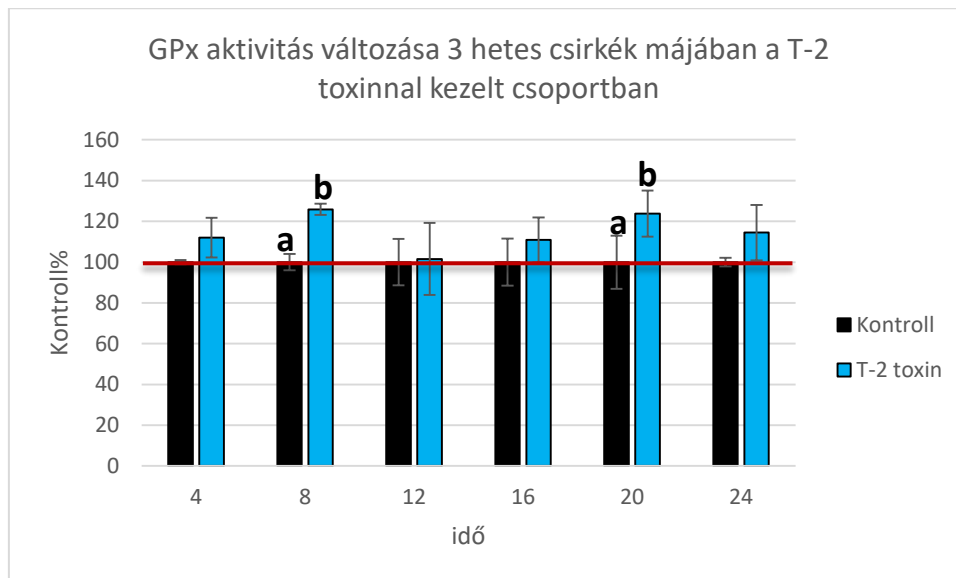
A T-2 toxin terhelés hatására a 3 hetes madarak májában a lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA kismértékben megemelkedett már a 8. órában, a konjugált diének (CD) és triének (CT) mennyisége azonban nem tért el szignifikáns mértékben a kontroll értékektől, amelynek háttérében a lipidperoxidációs folyamatok gyors, de csak kismértékű fokozódása állhat. Az itt megfigyelt tendenciák hasonlóak az 1 hetes madarakkal végzett vizsgálat során észleltekhöz (5.2.3.4. fejezet).

A glutation redox rendszer a T-2 toxin hatására aktiválódott, amelyet az bizonyít, hogy a kísérlet első 8 órájában szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a GSH tartalomban (38. ábra) és a GPx aktivitásban is (39. ábra), ami viszont a későbbiekben visszatért a kontroll szintre, majd a 20. óránál lehetett ismét szignifikáns mértékű emelkedést kimutatni.



38. ábra A redukált glutation tartalom változása három hetes csirkék májában T-2 toxin kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 0,77 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje, a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



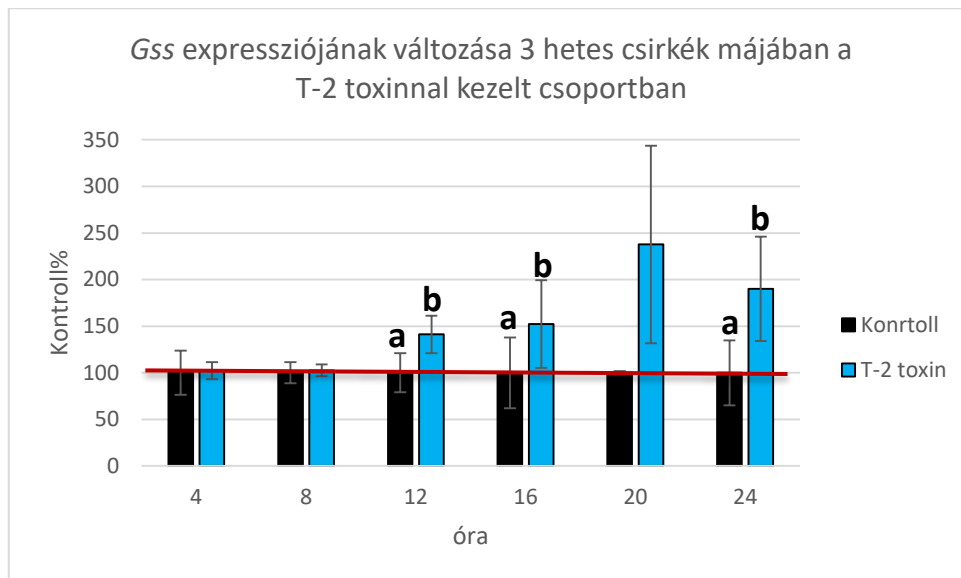
39. ábra A glutation-peroxidáz aktivitásának változása három hetes csirkék májában T-2 toxin kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 0,77 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

A 3 hetes állatoknál a glutation redox rendszer vizsgált tagjai tendenciájában hasonló változásokat mutattak, mint az 1 hetes madarak, de csak a kísérleti időszak első felében, a 3 hetes brojlerszirkéknél viszont a glutation redox rendszer a 20. órában ismét aktiválódott, ami az 1 hetes állatoknál nem volt megfigyelhető (5.2.3.4. fejezet).

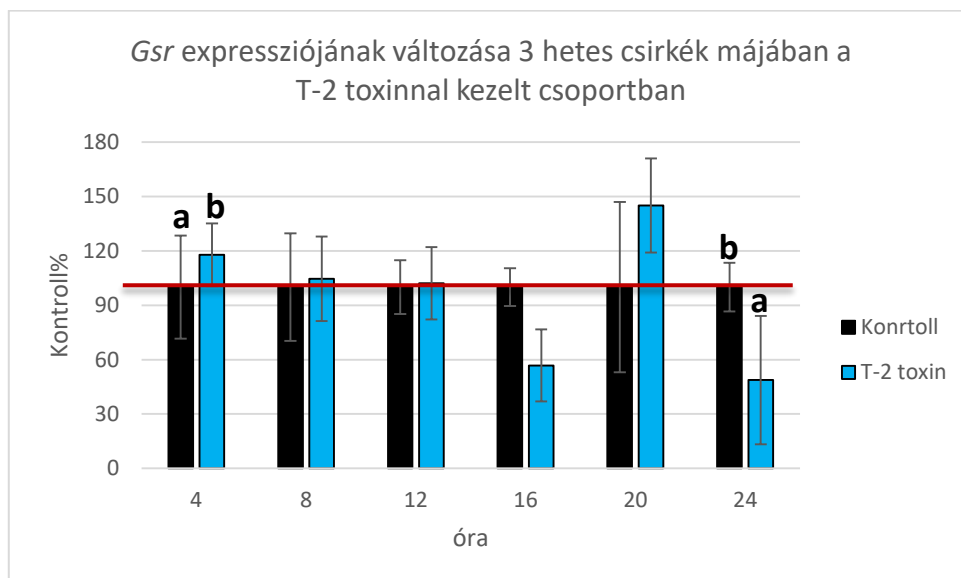
A glutation redox rendszer szabályozásában a T-2 toxin terhelés hatására szintén szignifikáns mértékű változások következtek be. A *Gpx4* génexpressziója ugyan nem változott szignifikáns mértékben, a *Gss* génexpressziójának (40. ábra) tendenciája folyamatos emelkedést mutatott, ami a 12., 20. és 24. órában mér szignifikáns mértékű különbség volt a kontrollhoz viszonyítva. A *GSR* expressziójában (41. ábra) csökkenést mértem a kísérlet 16. és 24 órájában.

A *Gpx4* génexpressziója az egy hetes állatoknál észleltekhöz hasonlóan változott, azaz lényeges, szignifikáns mértékű eltéréseket a kezelt csoportok között nem, ugyanakkor jelentős időbeli változásokat lehetett kimutatni. A *Gss* génexpressziójának tendenciájában viszont, az 1 hetes állatokhoz képest ellentétes változásokat tapasztaltam. A *Gss* expressziójának időbeli változása viszont rendkívül hasonló volt a *GPx4* expressziójánál tapasztaltakkal, ami arra utal, hogy ezeknek a géneknek az expressziója összefüggésben lehet az aktuális takarmány, és következményesen a mikotoxin felvétellel, azaz az adott időszak alatt felszívódott és a májba jutott mikotoxin mennyiséggel. A *Gsr* esetén is eltérő változások voltak, mivel az 1 hetes állatokban kettős választ tapasztaltam (5.2.3.4 fejezet), a 3 hetes állatoknál viszont az expresszió mértéke a T-2 toxin hatására csökkent.



40. ábra A *Gss* expressziójának változása három hetes csirkék májában T-2 toxin kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 0,77 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



41. ábra A *Gsr* expressziójának változása három hetes csirkék májában T-2 toxin kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

T-2 toxin: 0,77 mg T-2 toxin/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Korábbi vizsgálatokban, és más állatfajoknál is, megfigyelték, hogy a kísérleti állatok életkora befolyásolja a ROS képződés mértékét, valamint egyes fehérjék szintézisét (Sobocanec et al., 2008). Így például különböző életkorú állatokban (Rikans és Hornbrook 1997; Sverko et al. 2002) eltérő mennyiségi/aktivitásbeli különbségeket figyeltek meg a lipidperoxidációs folyamatok és az antioxidáns rendszer egyes paramétereiben (Sobocanec et al. 2005; Rikans et al. 1991). A csirkénél már az embrionális fejlődése során is változik az enzimatis és nem enzimatis antioxidáns rendszer egyes elemeinek mennyisége/aktivitása, valamint génexpressziója, amely a kelést követően is folyamatos változást mutat az egyedfejlődéssel összefüggésben (Surai et al., 2016). Így például a glutation mennyisége, valamint a *Gpx*, a *Sod*, és a *Cat* génexpressziója is változik a csirke egyedfejlődése során. A *Gpx* expressziója és az enzim aktivitása az egyes szövetekben is eltérő, csirkében például a májban mérték a legnagyobb értéket minden fejlődési szakaszban, míg a GSH mennyisége az embrionális fejlődés során folyamatosan csökken (Surai, 1999). A kelést, azaz a szilárd takarmány felvételét követően azonban a GSH koncentrációja folyamatosan növekszik, amely tendenciaszerű változást a brojlercsirke mellett más baromfi fajokban is megfigyeltek (Enkvetchakul et al., 1995). A GSH mennyisége mellett a GPx aktivitása is folyamatosan emelkedik a kelést követő első 10 napban, így elmondható, hogy a korai posztnatális élet során a GPx enzim az antioxidáns rendszer legfontosabb tagja (Surai et al., 2016).

Összefoglalva elmondható, hogy a 3 hetes csirkékben T-2 toxin terhelés hatására csak kismértékben fokozódtak a lipidperoxidációs folyamatok, a glutation redox rendszer viszont a T-2 toxinnal szennyezett takarmány felvételét követően rövid időn belül aktiválódott, amely a kísérlet első 8 óráját követően visszatért ugyan a kontroll szintre, de később, a 20. órában, ismét aktiválódott. Szignifikáns különbségeket tapasztaltam a génexpressziós változásokban is, amelyek közül a *Gss* és a *Gsr* géneknél jellemzően a kísérleti időszak második felében figyeltem meg érdemi változásokat. Fontos azonban utalni arra is, hogy míg a *Gss* expressziója a kontrollhoz képest folyamatosan nagyobb volt, különösen a kísérlet 12. és 24. órája között, addig a *Gsr* expressziója a kísérleti időszak végén, a 16. és 24. órában, csökkent.

Korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy T-2 toxin terhelés hatására *in vivo* brojlercsirkékben hosszú- (Yang et al., 2016) és rövidtávon (Bócsai et al., 2016), valamint *in vitro*, primer hepatocitákban, 48 óra alatt fokozódott a ROS termelés, amely következményesen aktiválta az enzimatis antioxidáns védőrendszert úgy génexpresszió, mint fehérje szinten (Yang et al., 2016). A GSH mennyiségében ugyanakkor depléciót találtak a T-2 toxin dózisének függvényében hosszú távú vizsgálatok során (Dvorska et al., 2007; Yang et al., 2016). Primer hepatocita kultúrákban, 48 óra alatt a GSH szintézise emelkedett (Yang et al., 2016). Ennek a hatásnak a hátterében a hosszútávú *in vivo* vizsgálatok során a glutation szintéziséhez szükséges aminosavak csökkent mennyisége állhat a részleges takarmány-visszautasítás következtében, amely hatással viszont rövidtávú *in vitro* modellben nem kell számolni a tápoldat folyamatosan közel azonos aminosav tartalma miatt.

Jelen kísérletben nem tapasztaltam a GSH deplécióját, sőt a GSH szintéziséért felelős gén megnövekedett expresszióját figyeltem meg, azonban vizsgálatom mindössze 24 óráig tartott, így az antioxidáns- és a xenobiotikum transzformáló rendszer aktivitásának következményeként, valamint a csökkent mértékű aminosav felvétel miatt, ennél hosszabb időszak alatt bizonyosan már itt is kimerüléssel lehetett volna számolni.

Jól ismert, hogy az oxidatív stressz, annak mértékétől függően, indukálja az antioxidáns enzimek aktivitását, amely hatás hátterében azonban nem kizárólag génexpressziós változások, hanem az

enzimfehérjék poszt-transzlációs modifikációja is állhat (Shepard et al., 2010). Ilyen indukciót figyeltek meg, egyéb hatásokra, például a GPx, a SOD és a CAT esetében (Spitz et al., 1992; Tsutsui et al., 2009). Yang et al. (2016) *in vivo* és *in vitro* kísérleteiben egyaránt bizonyította, hogy T-2 toxin terhelés hatására brojlercsirkékben egyaránt nő az antioxidáns enzimek génexpressziója és aktivitása is, amelyhez hasonló eredményeket kapott Chaudhary és Lakshmana (2010) is eger agyban.

A legtöbb általam vizsgált paraméter tekintetében szignifikáns eltéréseket tapasztaltam továbbá a kísérleti csoportokon belül is az egyes mintavételi időpontok között. Csirke agyban korábban már bizonyították, hogy cirkadián ritmus mind a GPx aktivitásában, mind pedig a GSH mennyiségében (Pablos et al., 1998) nyomon követhető. Azt is megállapították, hogy a napi ritmusban jelentős eltérések vannak különböző életkorú patkányoknál (Manikonda és Jagota, 2012). A cirkadián ritmus hatásait illetve annak szabályozását az 5.1.2.5 fejezetben már részleteiben áttekintettem. Fontosnak tartom itt is utalni arra, hogy a vizsgálatom során alkalmazott folyamatos megvilágítás eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától, de mivel minden csoport azonos környezeti paraméterek között volt, ezért az egyes csoportok közötti különbség megfelelően vizsgálható, bár a természetes cirkadián ritmust a folyamatos megvilágítás megzavarhatta, amely feltehetően az antioxidáns rendszer egyes elemeiben mind fehérje, mind mRNS szinten megnyilvánulhat (Rodriguez et al., 2004).

A T-2 toxin hatására a paraméterek többségében szignifikáns összefüggést találtam a kezelés és idő együttes hatásában. Baromfiféléknél T-2 toxin hatására már korábban is leírtak mind dózis-, mind időfüggő változásokat, többek között az antioxidáns rendszer egyes elemeiben (Prasath et al., 2009; Che et al., 2011; Yang et al., 2016). Ezeket a hatásokat korábban, az 5.1.2.5 fejezetben már részletesen ismertettem.

5.2.6 Rövidtávú DON terhelés hatása 3 hetes brojlersirkékben

A három hetes csirkékkel végzett kísérlet során 5,77 mg DON/kg takarmány dózisú kezelés hatását vizsgáltam a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereire, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségére/aktivitására, valamint a glutation redox rendszer szabályozására, azon belül egyes kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének expressziójára. Az Európai Unió által javasolt DON határérték 5 mg/kg takarmány, mely kiindulási alapot nyújtott az alkalmazott dózis megtervezéséhez. A 24 órás expozíciós idő alatt 4 óránként történtek a mintavételek.

A kísérletesen szennyezett takarmányok DON tartalma egységnyi testtömegre számítva 1,29 mg/kg testtömeg volt, amelyet a takarmányfelvétel és kísérletesen szennyezett takarmány mért mikotoxin tartalma alapján számítottam.

A kísérleti időszak alatt a DON-nal szennyezett takarmányfelvétel mértéke a kontrollhoz viszonyítva 126% volt, tehát a DON szennyezett takarmányból nagyobb mennyiséget fogyasztottak, mint a kontroll csoport. Mortalitást a kísérlet során nem tapasztaltam.

5.2.6.1 Rövidtávú DON terhelés hatása a lipidperoxidációs paraméterekre a májban

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (57. táblázat) és konjugált triének (58. táblázat) szintje a DON terhelés hatására csak kismértékben változott a kontrollhoz viszonyítva. A CD értéke ennek ellenére a 16. órában szignifikánsan nagyobb volt a kezelt csoportban, de a 24. órára a kontroll szintje alá csökkent. A CT értéke ugyanakkor a DON terhelés hatására szignifikáns mértékben kisebb volt a kísérlet 8. és 24. órájában.

A CD esetében a kontroll csoportban mértem szignifikáns mértékű eltéréseket az egyes mintavételi időpontok között. A 0. órához viszonyítva a 4. órára csökkent, míg a 16. órában magasabb értéket tapasztaltam. A DON kezelt csoportban is hasonló tendenciát tapasztaltam, a 16. órában végzett mintavételkor mért nagyobb érték mellett azonban a 4. órában történt mintavételkor nem volt kimutatható szignifikáns mértékű csökkenés. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) szignifikáns hatással a máj CD tartalmára, míg a kezelésnek (T) nem volt ilyen hatása.

A CT esetében a kontroll csoportban kísérlet 4. órájában csökkenést, a 16. és 24. órában pedig nagyobb értéket mértem. A DON csoportban viszont csak a 16. órában volt nagyobb érték. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) egyaránt szignifikáns hatással voltak a máj CT tartalmára.

A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA értékekben (59. táblázat) szignifikáns eltérést csak a 12. órában tapasztaltam, amikor a DON-nal szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban kisebb volt a kontrollhoz viszonyítva.

Az egyes mintavételi időpontokban a DON kezelés hatására 12. órában alacsonyabb értéket mértem, a kontroll csoportban ugyanakkor nem volt szignifikáns különbség az egyes mintavételi időpontok között. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) közül egyiknek sem volt szignifikáns hatása a máj MDA tartalmára.

57. táblázat A konjugált diének (CD) mennyisége három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (OD 232nm) (átlag±SD; n=5)

	CD (OD 232nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,477± 0,023 B	0,406± 0,012 A	0,479± 0,034 B	0,497± 0,027 BC	0,537± 0,024 aC	0,513± 0,038 BC	0,530± 0,016 bBC	<0,0001
DON	0,477± 0,023 A	0,441± 0,023 A	0,442± 0,012 A	0,492± 0,043 A	0,582± 0,015 bB	0,464± 0,043 A	0,498± 0,022 aA	T: 0,335 H: <0,001 TxH: 0,001

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

58. táblázat A konjugált triének (CT) mennyisége három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (OD 268nm) (átlag±SD; n=5)

	CT (OD 268nm)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,108± 0,012 B	0,091± 0,005 A	0,110± 0,009 bB	0,111± 0,005 B	0,123± 0,008 C	0,114± 0,007 B	0,130± 0,003 bC	<0,0001
DON	0,108± 0,012 A	0,098± 0,006 A	0,098± 0,003 aA	0,111± 0,010 A	0,129± 0,003 B	0,103± 0,007 A	0,111± 0,008 aA	T: 0,022 H: <0,001 TxH: 0,002

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

59. táblázat Az MDA tartalom alakulása három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (malondialdehid µmol/g nedves tömeg) (átlag±SD; n=5)

	MDA (µmol/g)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	4,40± 1,24	4,50± 1,05	4,29± 0,55	4,24± 0,63 b	5,19± 1,50	4,56± 1,58	4,36± 0,91	0,904
DON	4,40± 1,24 B	4,56± 0,60 B	4,31± 0,11 AB	2,56± 0,32 aA	4,11± 0,55 AB	4,77± 1,37 B	3,50± 0,42 AB	T: 0,055 H: 0,082 TxH: 0,289

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

5.2.6.2 Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox paraméterekre a májban

A DON kezelt csoportban a GSH tartalom (60. táblázat) nem tért el szignifikáns mértékben a kontrollhoz viszonyítva. A kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között azonban szignifikáns különbségeket tapasztaltam. A kontroll csoportban csak a 24. órai mintavételnél volt alacsonyabb érték, míg a DON csoportban a 0. időponttól nem tért el egyik mintavételi időpontban vett minta GSH tartalma sem, bár a 4. és a 24. órai érték tendenciájában alacsonyabb volt, mint a 12., 16. és 20. órai. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H) szignifikáns hatással volt, míg a kezelés (T), valamint a kezelés x idő (TxH) nem mutatott szignifikáns hatást a máj GSH tartalmára.

A GPx aktivitásban (61. táblázat), a GSH-hoz hasonlóan, szintén nem tapasztaltam szignifikáns mértékű változásokat a kontroll és a kezelt csoport között az egyes mintavételi időpontokban. A kontroll csoportban azonban az egyes mintavételi időpontok között kimutathatók voltak változások, így például a 4. órában szignifikáns mértékű emelkedés volt megfigyelhető, míg a DON csoportban eltérés, csökkenés, csak a 24. órában volt kimutatható. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H) szignifikáns hatással volt erre a paraméterre, míg a kezelés (T) és a kezelés x idő (TxH) együttes hatását nem lehetett sikerült bizonyítani.

60. táblázat A GSH tartalom alakulása három hetes csirkék májában DON terhelés hatására ($\mu\text{mol/g}$ 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GSH ($\mu\text{mol/g}$ 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	2,05 \pm 0,25 B	1,80 \pm 0,18 AB	2,31 \pm 0,16 B	2,53 \pm 0,23 B	2,57 \pm 0,27 B	2,50 \pm 0,24 B	1,78 \pm 0,11 A	<0,0001
DON	2,05 \pm 0,25 AB	1,58 \pm 0,11 A	2,29 \pm 0,14 AB	2,37 \pm 0,35 B	2,49 \pm 0,48 B	2,54 \pm 0,11 B	1,83 \pm 0,12 A	T: 0,330 H: <0,001 TxH: 0,821

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

61. táblázat A GPx enzim aktivitásának alakulása három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (U/g 10.000 g szupernatans fehérje) (átlag \pm SD; n=5)

	GPx (E/g 10,000g felülúszó fehérje)							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	2,16 \pm 0,28 AB	2,81 \pm 0,03 C	2,45 \pm 0,10 B	2,50 \pm 0,29 B	2,15 \pm 0,25 AB	2,32 \pm 0,30 B	1,74 \pm 0,04 A	0,0002
DON	2,16 \pm 0,28 AB	2,71 \pm 0,14 B	2,45 \pm 0,14 B	2,45 \pm 0,25 B	2,34 \pm 0,39 AB	2,52 \pm 0,08 B	1,82 \pm 0,13 A	T: 0,445 H: <0,001 TxH: 0,699

Az eltérő kisbetűvel (a, b) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Az eltérő nagybetűvel (A, B) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek ($p < 0,05$)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

5.2.6.3 Rövidtávú DON terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására

A *Gpx4* gén expressziója (62. táblázat) csak kismértékben változott DON terhelés hatására a 24 órás kísérleti időszak alatt. A 20. órában azonban szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva. A *Gpx4* génexpressziója a kontroll és a DON kezelt csoportban is változott az egyes mintavételi időpontok között, tendenciájában hasonlóan emelkedett a 4. órában, ami a kezelt csoportban még a 8. órában is szignifikáns mértékű maradt. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással volt erre a paraméterre.

A glutation-szintetáz, *Gss*, gén expressziója (63. táblázat) a kísérlet végén, annak 16. és 20. órájában, növekedett meg szignifikáns mértékben a DON terhelés hatására a kontrollhoz képest. Az egyes kísérleti csoportokban azonban az egyes mintavételi időpontok között is kimutatható volt a *Gss* gén expressziójának változása. Így például szignifikáns mértékben, de hasonló tendenciájú növekedés volt megfigyelhető a 4. és a 8. órában, amelyet a kísérlet végén, a 20. és 24. órában csökkenés követett. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), valamint a kezelés x idő (TxH) együttesen is szignifikáns hatással volt a *Gss* gén expressziójára, a kezelés (T) azonban nem.

A *Gsr* expressziója (64. táblázat) a 12. és 16. órában a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan kisebb volt a DON-al terhelt csoportban, míg a 20. órában már szignifikáns mértékben nagyobb. A gén expressziója szignifikáns mértékben eltért az egyes mintavételi időpontok között is. Ilyen különbségeket figyeltem meg az egyes csoportokban, amelyek tendenciájukban hasonlóak voltak, azaz csökkentek, a DON hatására azonban a változás időben előbb következett be, mivel már a 12. órától alacsonyabb értékeket mértem, míg ez a csökkenés a kontroll csoportban csak később, a 20. és 24. órában mutatkozott. A kétutas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy az idő (H), a kezelés (T) valamint a kezelés x idő (TxH) is szignifikáns hatással volt erre a paraméterre.

62. táblázat A *Gpx4* gén expressziójának alakulása három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag \pm SD; n=5, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gpx4</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	0,98 \pm 0,10 B	1,57 \pm 0,33 C	1,25 \pm 0,05 BC	1,02 \pm 0,17 B	0,73 \pm 0,04 AB	0,57 \pm 0,04 aA	0,94 \pm 0,11 AB	<0,0001
DON	0,98 \pm 0,10 A	1,66 \pm 0,28 B	1,37 \pm 0,22 B	1,01 \pm 0,12 AB	0,74 \pm 0,07 A	1,03 \pm 0,11 bAB	0,81 \pm 0,15 A	T: 0,048 H: <0,001 TxH: 0,011

Az eltérő kisbetűvel (**a**, **b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (**A**, **B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

63. táblázat A *Gss* gén expressziójának alakulása három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gss</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,02± 0,16 BC	1,57± 0,30 D	1,10± 0,12 C	0,69± 0,15 B	0,38± 0,12 aAB	0,18± 0,00 aA	0,41± 0,14 AB	<0,0001
DON	1,02± 0,16 B	1,22± 0,32 C	1,15± 0,21 C	0,65± 0,12 AB	0,72± 0,17 bB	0,51± 0,01 bAB	0,33± 0,06 A	T: 0,399 H: <0,001 TxH: <0,001

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

64. táblázat A *Gsr* gén expressziójának alakulása három hetes csirkék májában DON terhelés hatására (RQ érték) (átlag±SD; n=5, egyenként egyenlő mennyiségű cDNS pool)

	<i>Gsr</i>							p-érték
	0. óra	4. óra	8. óra	12. óra	16. óra	20. óra	24. óra	
Kontroll	1,02± 0,19 BC	1,24± 0,29 C	0,99± 0,29 BC	0,89± 0,11 bBC	0,80± 0,07 bB	0,27± 0,13 aA	0,32± 0,04 A	<0,0001
DON	1,02± 0,19 C	0,91± 0,17 BC	0,87± 0,23 BC	0,54± 0,07 aAB	0,48± 0,17 aA	0,58± 0,10 bAB	0,31± 0,10 A	T: 0,015 H: <0,001 TxH: 0,003

Az eltérő kisbetűvel (**a, b**) jelölt átlagértékek adott oszlopon belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Az eltérő nagybetűvel (**A, B**) jelölt átlagértékek adott soron belül szignifikáns mértékben különböznek (p<0,05)

Rövidítések: T – kezelés hatás; H – idő hatás; TxH: kezelés és idő együttes hatása.

A szignifikáns p-értékek vastagon szedettek.

DON (1,29 mg/kg testtömeg)

5.2.6.4 Megbeszélés

A három hetes brojlercsirkékkel végzett kísérletben a takarmány tranzitideje 5 óra 40 perc volt, amely a színezett takarmány etetésének megkezdésétől a színes ürülék megjelenéséig számított idő volt. A kísérlet során, részben a folyamatos megvilágítás miatt, a madarak folyamatosan hozzáférhettek a DON-nal mesterségesen szennyezett takarmányhoz, emiatt a tranzit idő ismeretében elmondható, hogy az első 5-6 órás időszakot követően folyamatos DON felszívódással lehetett számolni, ami abban a tekintetben fontos, mert így bizonyos összefüggés állapítható meg a DON hatására időben először megjelenő biokémiai vagy génexpresszió szintű válaszokkal.

A kísérlet alatt elhullást nem tapasztaltam az alkalmazott 1,29 mg/ kg testtömeg dózis mellett, amelyet más, hasonló dózissal végzett rövidtávú etetéses vizsgálatok eredményei is alátámasztanak (Grenier et al., 2016). A DON kezelt csoportban a takarmány fogyasztás 26%-kal több volt, mint a kontroll csoportban, amely ellentmond számos korábbi vizsgálati eredménynek, ahol a DON erőteljes takarmány-visszautasítást kiváltó hatását írták le más állatfajokban. Ennek hátterében feltehetően az áll, hogy a trichotecénavázás mikotoxinokra a háziyúk kevésbé érzékeny (Sokolovic et al., 2008).

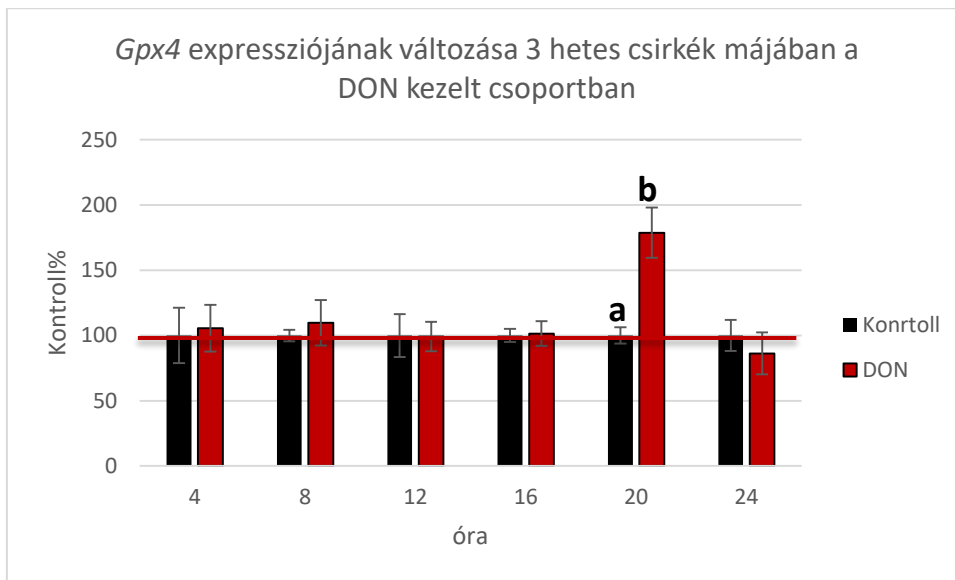
DON terhelés hatására a 3 hetes madarak májában a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének (CD) és triének (CT), valamint a terminációs szakasz markere, az MDA tartalom, több esetben is szignifikáns mértékben kisebb volt a kontrollhoz viszonyítva a vizsgált 24 órás periódus alatt. Egy hetes állatoknál ezen paraméterekben nem tapasztaltam szignifikáns változást. Ennek az eredménynek a hátterében az egységnyi testtömegre számított DON toxinfelvétel mértéke, valamint a takarmányfelvétel napi aktivitásában fennálló különbségek állhatnak. Emiatt feltehető, hogy a két korcsoport toxinterhelésének mértéke, emiatt a ROS képződés intenzitása is eltérő lehet.

A glutation redox rendszerben szignifikáns változásokat nem tapasztaltam a 24 órás DON expozíció alatt, hasonlóan az 1 hetes állatoknál kapott értékekkel, ugyanakkor ellentétben a T-2 toxinnal tapasztaltakkal, amelynek hátterében a DON-nak a T-2 toxintól némiképp eltérő hatásai állhatnak.

A glutation redox rendszer szabályozásában ugyanakkor DON terhelés hatására szignifikáns mértékű változások következtek be. A *Gpx4* génexpressziója (42. ábra) a 20. órában DON hatására szignifikáns mértékben nőtt, hasonlóan az egy hetes állatoknál tapasztaltakhoz, azonban ez a fiatal madarakban jóval korábban, már a 8. órában bekövetkezett be.

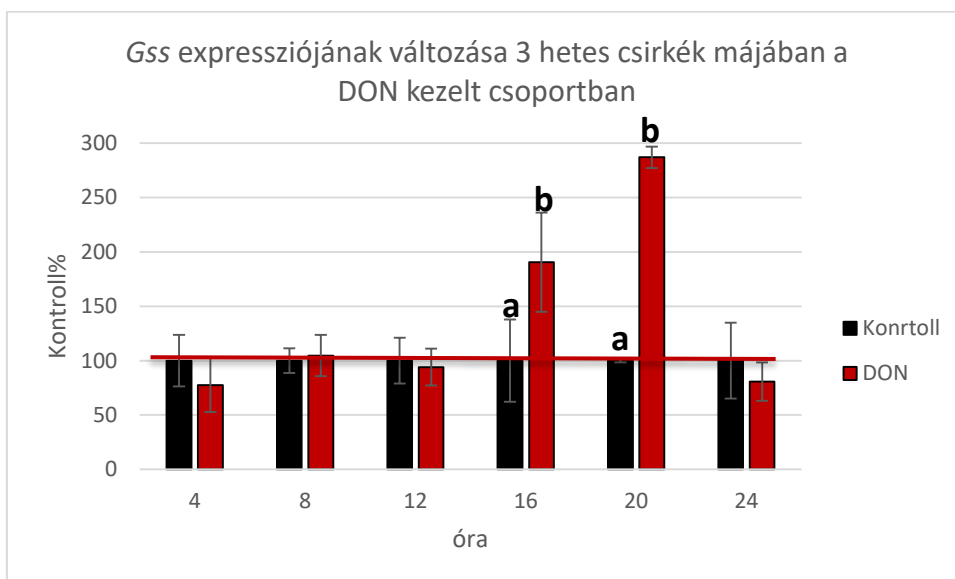
A *Gss* expresszió (43. ábra) tendenciájában folyamatos emelkedést tapasztaltam, a 24. órás vizsgálati idő első 20 órájában a kontrollhoz viszonyítva, amelynek mértéke DON terhelés hatására szignifikánsan nőtt a 16. és 20. órában. A T-2 toxin terhelés 3 hetes állatokban hasonló változásokat idézett elő, az 1 hetes állatokban megfigyelt változásokhoz képest azonban ellentétes hatásokat tapasztaltam mindkét mikotoxin esetén.

A *Gsr* esetében (44. ábra) kettős hatást tapasztaltam, a génexpresszió a 16. óráig csökkent, a 12. és 16. órában szignifikáns mértékben, majd a 20. órában emelkedett. A *Gsr* esetében ez a kettős hatás jellemző volt mindkét korcsoportra és mindkét általam vizsgált mikotoxinra, azaz a DON-ra és a T-2 toxinra is, de a változások tendenciája és annak mértéke eltérő volt.



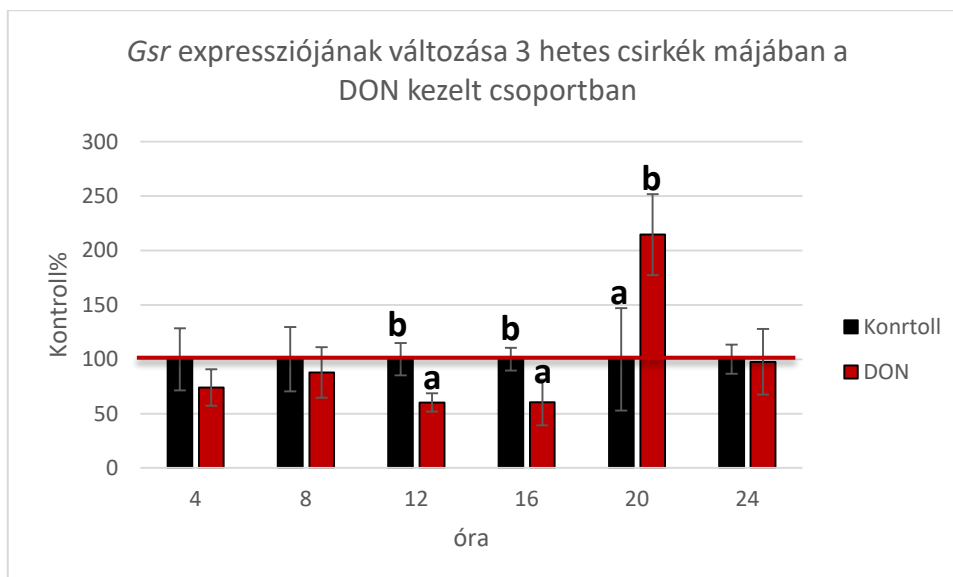
42. ábra A *Gpx4* expressziójának változása három hetes csirkék májában DON kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

DON: 1,29 mg DON/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



43. ábra A *Gss* expressziójának változása három hetes csirkék májában DON kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

DON: 1,29 mg DON/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)



44. ábra A *Gsr* expressziójának változása három hetes csirkék májában DON kezelés hatására a kísérlet 24 órája alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve.

DON: 1,29 mg DON/ kg testtömeg, óra: toxin expozíció ideje,
a, b jelölés jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között ($p < 0.05$)

Az életkorral összefüggő különbségek háttérében az eltérő aktivitású/mennyiségű és génexpressziójú antioxidáns rendszer állhat, a melyet részletesen ismertettem az 5.2.5.4 fejezetben.

Összefoglalva elmondható, hogy a három hetes csirkék kevésbé érzékenyen reagáltak a DON terhelésre a lipidperoxidációs folyamatok és a glutation redox rendszer mennyisége/aktivitása tekintetében, szignifikáns különbségek elsősorban a génexpressziós változásokban voltak kimutathatók. Fontosnak tartom azt is kiemelni, hogy a lipidperoxidációs folyamatok markerei nem emelkedtek, hanem többnyire változatlanok maradtak, vagy csökkentek a kontroll értékekhez viszonyítva, valamint azt is, hogy a *Gss* expressziója (43. ábra) tendenciaszerűen és folyamatosan emelkedett, míg a *Gsr* esetében kettős hatás volt megfigyelhető (44. ábra).

A legtöbb általam vizsgált paraméter esetében szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam a kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között. Azt már korábban is bizonyították, hogy cirkadián ritmus tapasztalható mind a GPx aktivitás, mind a GSH mennyiség tekintetében (Pablos et al., 1998). A cirkadián ritmus hatásait, illetve ennek szabályozását korábban, az 5.1.2.5 fejezetben, már részletesen leírtam. Itt is fontosnak tartom azonban kiemelni, hogy a vizsgálat során folyamatos megvilágítást alkalmaztam, ami eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától, így megzavarta a normál cirkadián ritmust, ez a hatás azonban minden kísérleti csoportban érvényesült. A cirkadián ritmus viszont jól ismert módon befolyásolja az antioxidáns rendszer egyes elemeit fehérje és mRNS szinten egyaránt (Rodriguez et al., 2004).

A DON hatására a lipidperoxidációs paraméterek és a génexpressziós adatok többségében szignifikáns hatást találtam a kezelés x idő összefüggésében, a glutation redox rendszer esetén azonban ezt statisztikailag nem tudtam alátámasztani, igaz, hogy ezekben a paraméterekben a DON hatását sem tudtam egyértelműen bizonyítani az alkalmazott dózis mellett.

6 ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1 Következtetések

A dolgozat korábbi fejezeteiben az egyes kísérletek eredményei megbeszélésre kerültek. Jelen fejezetben a rövidtávú T-2 toxin vagy deoxinivalenol terhelés hatását felmérő kísérleteim eredményei alapján levonható általános következtetéseket mutatom be.

Vizsgálataim elsődleges célja az volt, hogy felmérjem a T-2 toxin vagy a DON mikotoxin terhelést követően a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs markereinek mennyiségében, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségében/aktivitásában, valamint a glutation redox rendszer szabályozásában résztvevő egyes gének expressziójában kimutatható változások mértékét és irányát ponty illetve házityúk fajban, 24 órás időszak alatt, amelynek során az egyes paraméterekben kimutatható időbeli változásokat is nyomon tudtam követni. Célom volt továbbá felmérni a vizsgált állatfajokban a takarmány tranzit idejét is, amely a mikotoxinok bélcsatornában, a felszívódására rendelkezésre álló ideje miatt összefüggésben állhat az először megjelenő válaszreakciók idejével és azok mértékével.

A pontyokkal végzett vizsgálatokban az egyszeri gyomorszondás applikációt választottam, míg a brojlercsirkék esetében *ad libitum* etetéses módszert alkalmaztam, folyamatos megvilágítás mellett.

Mindkét állatfajnál mértem a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszának markereit, a konjugált diéneket és triéneket, valamint annak metastabil végtermékét a malondialdehidet. Emellett a glutation redox rendszer tagjai közül mértem az ezen állatfajok esetében kiemelkedően fontos antioxidáns enzim, a GPx4 aktivitását, valamint a redukált glutation mennyiségét. Ponty faj esetében a szakirodalom alapján rendelkezésemre álló *nrf2*, *keap1* illetve a *gpx4a* és *gpx4b* géneket, míg házityúk faj esetén a szakirodalom és génbanki szekvenciák alapján a *Gpx4*, a *Gss* és *Gsr* géneket választottam expressziós markernek.

Pontyoknál a takarmány tranzitideje 16 óra, míg a brojlercsirkéknél mindkét korcsoportban (1 és 3 hetes) megközelítőleg 6 óra volt. A brojlercsirkék genetikai szelekciója során az elsődleges cél sok száz generáción keresztül a legnagyobb növekedési erély elérése, és ennek révén a metabolizmus intenzitásának fokozása volt, a legkedvezőbb takarmány értékesítés mellett. Ennek révén az intenzív genotípusú madarak napjainkban már 5-6 hét alatt elérik vágási testtömegüket, amely természetesen csak rendkívül intenzív metabolizmussal érhető el. A ponty ezzel szemben kevésbé szélsőségesen nemesített, változó testhőmérsékletű állatfaj, amelynek egyedeit 2-3 éven át nevelik a piaci súly eléréséig, miután a környezeti hőmérséklet döntő mértékben befolyásolja aktuális metabolikus aktivitásukat.

A pontyokkal végzett kísérletben az alkalmazott T-2 toxin dózisok 0,15; 0,33 és 1,82 mg/kg testtömeg voltak, a DON esetében pedig 0,13; 0,31 és 1,75 mg/kg testtömeg.

A brojlercsirkékkel végzett kísérletben az alkalmazott dózisok a pontyokkal végzett kísérletek legnagyobb dózisához állnak közelebb, az 1 hetes állatok esetében ugyanis 1,35 mg T-2 toxin/kg testtömeg, illetve 1,75 mg DON/kg testtömeg voltak. A 3 hetes madarakkal végzett kísérlet során 0,77 mg T-2 toxin/ kg testtömeg illetve 1,29 mg DON/kg testtömeg voltak az alkalmazott dózisok.

Ennek alapján megállapítható, hogy a két állatfaj esetén a kísérletek során alkalmazott dózisok egységnyi testtömegre vonatkoztatva hasonlóak voltak. A viszonylag nagy dózisok alkalmazásával célom akut toxicitás elérése volt. Fontos azonban kiemelni, hogy a brojlercsirkék

esetében az alkalmazott dózis (5,77 mg/kg takarmány) a DON esetében egyes években a gyakorlatban is előfordulhat, míg T-2 toxin esetében (4,86 mg/kg takarmány) ilyen szennyezettségi szint csak szélsőséges esetekben jelenhet meg a takarmányban. A pontyoknál alkalmazott T-2 dózisok a gyakorlatban nem fordulnak elő (10,79, 23,67, illetve 130,82 mg/kg takarmány), míg a DON esetében alkalmazott dózisok közül a két kisebb (9,0, 22,15, illetve 125,92 mg/kg takarmány) kirívó esetekben akár a gyakorlatban is előfordulhat.

Egy 2015-ben végzett világméretű felmérés adatai szerint az átlagos DON szennyezettség 1,3 mg/kg takarmány volt, 34,9 mg/kg takarmány maximum értékkel, míg az átlagos T-2 toxin szennyezettség 0,025 mg/kg takarmány volt, 0,7 mg/kg takarmány maximum értékkel (BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2015). Jól ismert azonban, hogy egy adott évben a gabona magvak penészgomba fertőzöttsége és mikotoxin szennyezettsége számos tényezőtől függ, kiemelten az időjárástól, főképp a csapadék mennyiségétől és annak a tenyészidőszak alatti eloszlásától.

Jól ismert, hogy a brojlercsirkék kevésbé érzékenyek a trichotecénaváz mikotoxinok iránt, és a domesztikált baromfifélék között is ez a legkevésbé érzékeny faj (Mézes et al., 1998). Halakra vonatkozóan csak kevés adat áll rendelkezésünkre az egyes mikotoxinokra való érzékenység vonatkozásában. Az egyes halfajokra vonatkozóan általánosságban a következő érzékenységi sorrendet állították fel: szivárványos pisztráng>ponty>harcsafélék (Anater et al., 2016). Az egyes halfajok közötti különbségek azonban az érzékenység tekintetében nem csupán nagymértékűek, de az függ az adott mikotoxintól is (Guan et al., 2009). Pontyra vonatkozóan azonban csak rendkívül kevés adat áll rendelkezésre az általam vizsgált trichotecénaváz mikotoxinokra vonatkozóan (Pietsch, 2015).

Az általam alkalmazott dózisok hatására elhullást csak a legnagyobb T-2 toxinnal terhelt csoportban tapasztaltam a pontyoknál, ami 19% volt. A pontyra vonatkozóan ugyanakkor nem találtam LD₅₀ értéket a szakirodalomban. Brojlercsirkék esetén elhullás nem volt, azonban a T-2 toxin hatására 10%-ot meghaladó mértékű takarmány-visszautasítás jelentkezett, melyet a szakirodalom is alátámaszt (Eriksen és Petterson, 2004).

Pontyokkal végzett kísérleteimben DON hatására, minden alkalmazott dózis mellett, szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a lipidperoxidációs paraméterekben, míg a T-2 toxin esetében csak hasonló tendenciájú változások voltak megfigyelhetők. Ez az eredmény arra utal, hogy bár a két mikotoxin hasonló kémiai szerkezetű, de a májban a DON, vagy az abból képződő reaktív metabolitok, hatékonyabban idéznek elő ROS képződést, míg eredményeim alapján a T-2 toxin metabolizációja során pontyoknál kevésbé reaktív metabolitok keletkeznek. Annak ellenére, hogy a ROS képződés mértéke eltérő volt, a glutation redox rendszer általam vizsgált paramétereiben mindkét mikotoxin minden alkalmazott dózisének hatására markáns változásokat figyeltem meg. A pontyokkal végzett kísérletekben a mikotoxin terhelést követő 16. óra bizonyult kulcsfontosságú időpontnak a biokémiai változások szempontjából, ami feltehetően összefügg a takarmány tranzit idejével, azaz a mikotoxinnal szennyezett takarmány felvételét követően ennyi idő szükséges a mikotoxinok bélcsatornából történő felszívódásához, majd a májba történő transzportjához és végül hatásuk kifejtéséhez. A mikotoxin terhelések hatására a glutation redox rendszer szabályozásában szerepet játszó gének esetében is szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam, a *gpx4a* és *gpx4b* gének esetén kezdeti gátlást követően indukciót, ami a nagyobb dózisoknál elnyújtottan jelentkezett a mikotoxin expozíciót követő 24. órára. Ez utóbbi hatás hátterében a nagyobb mennyiségű mikotoxin felszívódásában, illetve májban történő metabolizmusában fennálló időbeli eltérés lehet. Fontos kiemelni továbbá, hogy pontyokkal

végzett kísérleteimben a DON és T-2 toxin hasonló tendenciájú és mértékű hatásokat idézett elő, ami arra utal, hogy önmagában a lipidperoxidáció mértéke nem adekvát markere a mikotoxinok által előidézett hatásoknak, mert az antioxidáns védelem aktivációja a lipidperoxidációs folyamatok megindulását, majd kiteljesedését akár teljes mértékben elfedheti, mint ahogy az a T-2 toxin esetében kimutatható volt.

A brojlercsirkékkel végzett kísérletekben a lipidperoxidációs paraméterekben nem tapasztaltam szignifikáns mértékű emelkedést egyik korcsoportban vagy mikotoxin hatására sem. Tekintetbe véve az alkalmazott dózisokat halakkal végzett vizsgálataimhoz képest ennek a különbségnek oka lehet a két állatfaj eltérő májban zajló mikotoxin metabolizmusa, valamint annak intenzitása is. A T-2 toxin hatására azonban a glutation redox rendszer gyors aktiválódását figyeltem meg a mesterségesen szennyezett takarmány felvételének megkezdését követő első 8 órában mindkét korcsoportban, amelyet az idősebb, 3 hetes állatoknál a 20. órában egy további ismételt aktiválódás követett. Ez a hatás pontynál is megfigyelhető volt, azaz a trichotecénvázas mikotoxin terhelés hatására aktiválódik az antioxidáns védőrendszer, amely a lipidperoxidációs folyamatok kialakulását megakadályozhatja még abban az esetben is, ha az adott mikotoxinok egyébként ROS képződést indukálnak. DON hatására ugyanakkor a glutation redox rendszer nem aktiválódott egyik korcsoportban sem, ami arra utal, hogy a baromfi, ezen belül a brojlercsirke, nagymértékű DON toleranciája részben arra vezethető vissza, hogy még nagyobb takarmány szennyezettségi szint mellett sem idéz elő a májban olyan mértékű ROS képződést, ellentétben a T-2 toxinnal, amely elegendő lenne a glutation redox rendszer aktivációjához. A génexpressziós vizsgálatok során a *Gpx4* esetében csak kismértékű változásokat tapasztaltam, ami nem volt konzekvens sem az egyes korcsoportokon vagy az adott mikotoxinnal kapcsolatban sem. Egy hetes madarakban a génexpresszió mindkét mikotoxin hatására nőtt a szennyezett takarmány fogyasztásának megkezdését követő 8 órában, ezt követően a T-2 toxin hatására a 20. órától csökkent. Három hetes állatokban ugyanakkor csak a DON hatására tapasztaltam emelkedést, de csak a 20. órát követően. A *Gsr* esetén a géexpresszió mértékében kettős hatást tapasztaltam, ezek tendenciája azonban eltérő volt. Az 1 hetes állatok májában emelkedést tapasztaltam a 4. órában mindkét mikotoxin, míg a 12. órát követően csak a DON hatására. Ezt a 16. óránál mindkét mikotoxin hatására csökkenés követett. Három hetes madarakban a DON hatására a 12. és 16. órában történt mintavételkor csökkent mértékű *Gsr* expressziót tapasztaltam. T-2 toxin hatására a májban a 16. és 24. órában történt mintavételkor csökkent mértékű *Gsr* expressziót mértem, míg a DON hatására a 20. órában történt mintavételkor emelkedett a génexpresszió mértéke. A génexpressziós változásokkal kapcsolatban szeretném kiemelni, hogy a *Gss* ellentétes irányú változásokat mutatott a két korcsoportban, az azonos korú állatoknál azonban mindkét mikotoxin hatására hasonló tendenciájú változás mutatkozott. Egy hetes madaraknál folyamatos csökkenést, míg a 3 hetes állatoknál folyamatos emelkedést tapasztaltam mindkét mikotoxin hatására. Ennek alapján levonható az a következtetés, hogy az általam vizsgált molekuláris markerek közül a *Gss* bizonyult a leghatékonyabban alkalmazható markernek a T-2 toxin és DON életkori hatásainak nyomon követése során. A génexpressziós változásokban kimutatott eltérések is alátámasztják azt a feltevésemet, hogy a T-2 toxin hatására gyors ROS képződés, majd annak eliminálására gyors és hatékony antioxidáns válasz következik be, míg a DON hatására a ROS képződés mértéke ugyan kicsi, de a folyamatos mikotoxin felvétel hatására a későbbiekben már eléri azt a küszöbértéket, amely ha fehérije szinten még nem, de mRNS szinten már kimutatható.

6.2 Javaslatok

Az utóbbi években a szakirodalomban illetve az adatbázisokban már minden gén szekvenciája mindkét általam vizsgált állatfajra vonatkozóan elérhető, ami kutatásaim kezdetekor még nem volt teljesen ismert. Ennek alapján javaslom eddigi eredményeimre alapozva a kutatások folytatását akár új célgénekkel együtt, és más kémiai szerkezetű mikotoxinok vonatkozásában is.

Javaslom továbbá mikotoxinok keverékének vizsgálatát is, mivel természetes körülmények között a gazdasági állatok általában multimikotoxin szennyezett takarmányokkal találkoznak. Ennek révén pedig vizsgálhatóak lennének az egyes mikotoxinok között fennálló additív, szinergista vagy éppen antagonistá hatások is.

Végül javaslom kísérletek folytatását annak vizsgálatára is, hogy a mikotoxinok hatására kialakuló oxidatív stressz mely természetes antioxidáns vagy antioxidáns keverék alkalmazásával védhető ki hatékonyan, ezáltal információkhoz juthatunk arra vonatkozóan, hogy mely természetes hatóanyagokkal támogatható az állatok szervezete a mikotoxinok káros hatásaival szemben.

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Pontyokkal végzett vizsgálatban megállapítottam, hogy az alkalmazott dózisok esetén, a vizsgált 24 órás periódus alatt:

1. A DON és T-2 toxin hatására egyaránt aktiválódott a glutation redox rendszer, lipidperoxidációs folyamatok azonban csak a DON hatására indukálódtak.
2. A *Keap1* és *Nrf2* génexpressziójában mindkét mikotoxin esetén tapasztaltam változásokat, azok azonban nem mutattak egyértelmű összefüggést sem a dózisokkal sem az idővel.
3. A *Gpx4a* és *Gpx4b* génexpressziója kezdeti kettős hatást követően indukálódott, ami a nagyobb dózisoknál időben később jelentkezett mind a DON, mind a T-2 toxin esetén.

Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletekben megállapítottam, hogy az alkalmazott dózisok hatására, a vizsgált 24 órás periódus alatt:

4. A DON esetében nem, a T-2 toxin hatására viszont aktiválódott a glutation redox rendszer már az első 8 órában mindkét korcsoportban, a lipidperoxidáció azonban egyik mikotoxin hatására sem indukálódott egyik korcsoportban sem.
5. A vizsgált gének közül a *Gss* gén esetében a két korcsoportban ellentétes tendenciájú expressziós változás volt megfigyelhető, az egy hetes állatoknál csökkenést, míg a három hetes állatoknál emelkedést tapasztaltam, mindkét mikotoxin esetében.
6. A *Gsr* gén esetében is tapasztaltam expressziós változásokat mindkét mikotoxin hatására, mindkét korosztályban, a változások azonban nem mutattak egyértelmű összefüggést sem az életkorral sem az idővel.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A trichotecénvázis mikotoxinok a *Fusarium* penészgomba fajok másodlagos anyagcsere termékei, amelyek közül a deoxinivalenol (DON) és a T-2 toxin tekinthetők takarmányozási szempontból a legfontosabbaknak toxikus hatásaik és a takarmányokban való előfordulásuk gyakorisága és annak mértéke alapján. Toxikus hatásaikról számos ismerettel rendelkezünk, amelyek egyes biológiai folyamatok, valamint az azok szabályozásában részt vevő kompartmentek egyes paramétereiben bekövetkező változásokon alapulnak. Ezek jelentős része azonban vagy *in vitro* modellekkel végzett vizsgálatokon, vagy *in vivo*, de szubletális, általában hosszan tartó, mikotoxin terhelések eredményein alapulnak.

A T-2 toxin és a DON hatásaival, ezen belül azoknak a szabadgyök képződéssel járó folyamatokra, valamint a szervezet antioxidáns védőrendszerére gyakorolt hatásainak mechanizmusával kapcsolatban még számos kérdés vár megválaszolásra. A hosszan tartó mikotoxin terhelést követően mért biokémiai változások ugyanis csak egy folyamat végső állapotát jelzik, amely egyaránt utalhat egyre súlyosbodó mértékű károsodásra, csakúgy mint a folyamatos terhelés hatására bekövetkező adaptációra.

A DON és a T-2 toxin halak, illetve madarak szervezetére kifejtett rövidtávú hatásai jelenleg még csak kevésbé ismertek. A kérdés ebben az esetben úgy merül fel, hogy a T-2 toxin vagy a DON takarmányokkal való felvételét követően mennyi idő elteltével váltanak ki jól definiálható biokémiai elváltozásokat, esetünkben indukálnak-e, és ha igen milyen mértékben oxidatív stresszt. Eddig még arra vonatkozóan sem jelentek meg közlemények, hogy az antioxidáns védőrendszer molekuláris és biokémiai markerei milyen sorrendben és mértékben indukálódnak, illetve ezek változása milyen összefüggést mutat az oxidatív stressz hatására kialakuló lipidperoxidációs folyamatokkal.

Doktori munkám célja az volt, hogy felmérjem a T-2 toxin, illetve DON terhelést követő rövid időszak alatt a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs markereinek mennyiségét, a glutation redox rendszer egyes elemeinek mennyiségét/aktivitását, valamint a glutation redox rendszer szabályozásában résztvevő egyes gének expresszióját ponty illetve házityúk fajban. Vizsgálataimat rövidtávon, 24 órás időszak alatt, végeztem, amellel célom volt felmérni az általam vizsgált paraméterek változását egyrészt a terhelés olyan korai szakaszában, amikor adaptációval még nem kell számolni. A 24 órás intervallum lehetőséget teremtett továbbá az általam vizsgált paraméterek esetében azok napszaki változásának nyomon követésre is. Abból a célból, hogy megbecsülhessem a takarmánnyal felvett mikotoxin májba való bejutásának, azaz az első várható hatásnak, az idejét, meghatároztam a vizsgált állatfajokban a takarmányrészek bélcsatornán történő áthaladásának tranzit idejét.

A pontyokkal végzett vizsgálatokban, a halak viselkedési és biológiai jellemzői alapján, gyomorszondás applikációt választottam, míg brojlercsirkékkel végzett vizsgálataim során *ad libitum* etetéses módszert alkalmaztam.

Megállapítottam, hogy pontyoknál a vizsgálataim során alkalmazott vízhőmérséklet (19 ± 1 °C) mellett a takarmány tranzitideje 16 óra, míg a brojlercsirkéknél mindkét vizsgált korcsoportban (1 és 3 hetes) megközelítőleg 6 óra volt. Ez tehát azt jelenti, hogy pontyoknál az első hatások várhatóan 16 óra múlva következnek be, míg brojlercsirkénél a hatások a mikotoxinokkal szennyezett takarmány felvételét követő minimálisan 6 óra múlva jelentkezhetnek.

A pontyokkal végzett kísérletben az alkalmazott T-2 toxin dózisok 0,15; 0,33 és 1,82 mg/kg testtömeg voltak, a DON esetében pedig 0,13; 0,31 és 1,75 mg/kg testtömeg. A brojlercsirkékkel végzett kísérletekben az alkalmazott dózisok a pontyokkal végzett kísérletek legnagyobb dózisához állnak közelebb. Egy hetes állatok esetében 1,35 mg T-2 toxin/kg testtömeg, illetve 1,75 mg DON/kg testtömeg, míg a 3 hetes madarakkal végzett kísérlet során 0,77 mg T-2 toxin/kg testtömeg illetve 1,29 mg DON/kg testtömeg.

A viszonylag nagy dózisok alkalmazásával célozom akut toxicitást, azaz jól mérhető molekuláris és biokémiai eltérések, elérése volt. Az általam alkalmazott mikotoxin terhelés mellett, a rövidtávú kísérlet során elhullást csak a pontyokkal végzett kísérlet során tapasztaltam a legnagyobb T-2 toxin terhelés mellett, ami 19% volt. Ennek alapján a T-2 toxin akut per os LD₅₀ értéke 4,79 mg/kg testtömeg értékre becsülhető.

Pontyokkal végzett kísérleteim során DON hatására, minden alkalmazott dózis mellett, szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a lipidperoxidációs paraméterekben a takarmány felvételét követő 16-24 óra múlva, míg a T-2 toxin esetében csak tendenciájában hasonló változások voltak megfigyelhetők. A glutation redox rendszer általam vizsgált paramétereiben viszont markáns változásokat figyeltem meg mindkét mikotoxin alkalmazott dózisainak hatására a takarmány felvételt követő 16 óra múlva. Pontyoknál, az általam beállított kísérletekben a biokémiai változások szempontjából, a mikotoxin terhelést követő 16. órával megszűnt a toxin terhelés, amit a mért paraméterek is igazoltak, mindez a takarmány tranzit idejével függ össze. A mikotoxin terhelések hatására a glutation redox rendszer szabályozásában szerepet játszó gének esetében is szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam. Kisebb dózisoknál a *Gpx4a* és *Gpx4b* géneknél egy rövid idejű kezdeti gátlást követően indukciót, míg nagyobb dózisoknál ez a hatás elnyújtottan jelentkezett a mikotoxin expozíciót követő 24. órára. Fontosnak tartom kiemelni továbbá, hogy a pontyokkal végzett kísérleteim során a DON és T-2 toxin hasonló tendenciájú és mértékű hatásokat idézett elő a génexpresszióban. Az észlelt változások arra is felhívják a figyelmet, hogy a lipidperoxidációs folyamatok és a glutation redox rendszer génexpresszió és tripeptid/fehérje szintű aktivációja nem áll szoros korrelációban egymással, ami arra utal, hogy a glutation redox rendszer aktivációja, mérsékelt oxidatív stressz esetén, megakadályozhatja a lipidperoxidációs folyamatok megindulását.

Brojlercsirkékkel végzett kísérleteimben a lipidperoxidációs paraméterekben nem tapasztaltam szignifikáns mértékű emelkedést egyik korcsoportban vagy mikotoxin hatására sem. T-2 toxin terhelés hatására azonban a glutation redox rendszer gyors aktiválódását figyeltem meg a szennyezett takarmány felvételének megkezdését követő első 8 órában mindkét korcsoportban, amelyet az idősebb, 3 hetes, állatoknál a 20. órára egy további ismételt aktiválódás követett. DON hatására ugyanakkor a glutation redox rendszer nem aktiválódott egyik korcsoportban sem. A génexpressziós vizsgálatok során a *Gpx4* esetében csak kismértékű változásokat tapasztaltam, ami sem az egyes korcsoportokban vagy az adott mikotoxinnal kapcsolatban nem volt konzekvens mértékű és irányú. A *Gsr* esetén a génexpresszió mértékében kettős hatást tapasztaltam, ezek tendenciája azonban eltérő volt. A génexpressziós változásokkal kapcsolatban szeretném kiemelni, hogy a *Gss* ellentétes irányú változásokat mutatott a két korcsoportban, azonos életkorú állatoknál azonban mindkét mikotoxin hatására hasonló tendenciájú változás mutatkozott. Egy hetes madaraknál folyamatos csökkenést, míg a 3 hetes állatoknál folyamatos emelkedést tapasztaltam mindkét mikotoxin hatására. Ennek alapján jogosnak tartom levonni azt a következtetést, hogy az általam vizsgált molekuláris markerek közül a *Gss* bizonyult a leghatékonyabban alkalmazható markernek a T-2 toxin és DON hatásainak nyomon követése során. Brojlercsirkékkel végzett

kísérletem eredményei megerősítették azt a feltételezésemet, hogy a lipidperoxidációs folyamatok, általunk vizsgált módszerekkel mérhető, kialakulásával csak abban az esetben kell számolni, ha a szabadgyök képződés mértéke elér egy kritikus értéket, azaz azt már az antioxidáns, ezen belül az általam vizsgált glutation redox rendszer, nem képes eliminálni.

A fent közölt eredmények tükrében megállapítható, hogy mindkét állatfajnál már rövid időn belül, halaknál az általunk alkalmazott hőmérséklet mellett 12-16 óra, baromfinál 4-8 óra, is ROS képződést indukált a DON és a T-2 toxin is, ami eltérő mértékben ugyan, de hatással volt a lipidperoxidációs folyamatokra, következményesen pedig a glutation redox rendszer aktiválódását idézte elő. Feltevésem szerint ezeknek a változásoknak a hatására aktiválódott a Keap1-Nrf2-Antioxidáns válaszelem rendszer is, amely az általam vizsgált antioxidáns gének (ponty fajban: *Keap1*, *Nrf2*, *Gpx4a*, *Gpx4b*; házityúk fajban *Gpx4*, *Gsr*, *Gss*) expressziójának fokozódását eredményezte. Eredményeim alapján ezek közül ponty fajban a *Gpx4a* és *Gpx4b*, míg házityúk fajban a *Gss* bizonyult a leginkább jelzőértékűnek a változások nyomonkövetése szempontjából.

A két állatfaj között, továbbá brojlersirke esetében az eltérő életkorú állatoknál egyaránt eltérő érzékenységet tapasztaltam a DON és T-2 toxin terhelés iránt. A két állatfaj közötti eltérések az érzékenységekben jól ismertek, a házityúk fajon belül az egyes életkori csoportok közötti eltérést az érzékenység tekintetében vizsgálataim során elsőként mutattam ki. Ezek az eltérések az általam vizsgált paraméterekben bekövetkező változásokban egyértelműen megmutatkoztak. Egyes gének, így például a *Gsr* és a *Gss*, érzékenyebben reagáltak a mikotoxin terhelésre, amely különösen jól kimutatható volt DON terhelés hatására a brojlersirkékkel végzett kísérleteim során.

9 SUMMARY

Trichothecene mycotoxins are secondary metabolites of *Fusarium* molds. Deoxynivalenol and T-2 toxin are the most significant members of trichothecenes, because of their toxicity and frequent occurrence in cereal grains. A wide range of their toxic effects are known and described in the scientific literature, which affect many biological parameters and their regulation. Nevertheless, most of the toxicological studies with these mycotoxins are based on *in vitro* or sublethal long-term *in vivo* experiments.

Also, the effects of T-2 toxin and DON, emphasizing their effects on the emerging ROS (reactive oxygen species) forming and the mechanism of their action on antioxidant defense system are still not fully described. As changes in biochemical parameters in long-term studies describes only the end of a biological process, which can result in escalating damages, and also in adaptation, there are also still unresolved.

Short term effects of DON and T-2 toxin on fish and poultry are not fully described yet. The burning question is still open, how long period of time requires after DON and T-2 toxin uptake for the significant changes at cellular level, elevating oxidative stress, and which is the relation to each other. Also, the specific response of the biological antioxidant system to oxidative stress should be studied in details, including the order of the response of biochemical and molecular markers of oxidative stress, which are not well understood yet.

The purpose of my doctoral research was to evaluate how DON and T-2 toxin exposure affect lipidperoxidation, including the markers of the initial and terminal phase, the activity/amount of the members of the glutathione redox system, and the expression of genes involved in the regulation of the biological antioxidant system in common carp and chicken. I designed short term studies, which gave an opportunity to observe the daily rhythm of the parameters during a 24 hour period as well. In addition, I aimed to investigate the transit time of feed particles in the gastrointestinal tract, to estimate the available time for mycotoxin absorption, which can be in relation with the first appearing changes in the biomarkers.

In the experiments with common carp, I chose to expose the animals by gavage, based on the behaviour and biological characteristics, while in case of chickens *ad libitum* feeding was applied.

The transit time of common carps was 16 hours, in the applied water temperature (19 ± 1 °C), while in case of chickens it was approximately 6 hours in both investigated age-groups (1 and 3 weeks).

The applied doses in common carp experiments were 0.15; 0.33 and 1.82 mg T-2 toxin/kg b.w. and 0.13; 0.31 és 1.75 mg DON/kg b.w. In the experiments with chickens the doses were closer to the highest applied doses in common carp. In 1-week-old chickens 1.35 mg T-2 toxin/kg b.w. and 1.75 mg DON/kg b.w. while in 3-week-old chickens 0.77 mg T-2 toxin/kg b.w. and 1.29 mg DON/kg b.w. were the applied doses.

My aim was to trigger acute toxicity with the chosen doses. However, mortality was observed only in the highest T-2 toxin dose in common carp, which was 19%.

DON exposure caused significant elevation on lipidperoxidation by every applied dose, while similar trends were observed in the T-2 groups. The parameters of glutathione redox system showed strong response to both mycotoxins. In common carp 16 hour sampling time appeared as a key factor in the responses in biochemical markers, which may be in association with the observed transit time. Mycotoxin exposure affected the expression of the chosen genes as well.

The low and medium doses caused inhibition at the beginning, and induction later, in the expression of *Gpx4a* and *Gpx4b* genes, and this induction appeared in a shift at higher doses. It is important to highlight that DON and T-2 toxin caused similar changes in gene expression as well.

Lipidperoxidation did not change in the experiments with the different age-groups of chickens. Although, T-2 toxin exposure resulted in the activation of the glutathione redox system in the first 8 hours of the experiment in both age-groups, and in the 3-week-old group there was a secondary activation after 20 hours. DON did not affect the glutathione redox system. In gene expression *Gpx4* showed minor changes, which was not consequent in the age-groups. *Gsr* showed a dual response in both age groups during the 24 hour, but the tendency was different in different ages. It should be emphasized that the gene expression of *Gss* showed strong response to mycotoxin exposure, but the observed changes tended to the opposite direction in the different age groups, while to the same direction in both mycotoxin treated groups in the same age groups. In 1-week-old chicken continuous decrease was observed, while in the 3-week-old group continuous elevation occurred as a result of both mycotoxin exposure. Based on these results *Gss* should be considered as an efficient biomarker of T-2 toxin or DON exposure.

In summary DON and T-2 toxin induced elevated ROS formation in both animal species, which affected lipidperoxidation in different levels and activated the glutathione redox system. These may be in association with the activation of Keap1-Nrf2-ARE pathway, which regulates the expression of the antioxidant genes, resulting in changes in gene expression in present studies (in common carp *Keap1*, *Nrf2*, *Gpx4a*, *Gpx4b*; in chicken *Gpx4*, *Gsr*, *Gss*). Based on my studies *Gpx4a* and *Gpx4b* in common carp, while *Gss* in chicken are indicative markers to evaluate the changes in the presented molecular targets.

Different sensitivity for trichothecene mycotoxins was investigated in animal species was investigated, and in case of chicken age-dependent differences was also observed as effect of both DON and T-2 toxin treatments in the selected biomarkers. Indeed, expression of some genes (*Gsr* or *Gss*) showed higher sensitivity to short-term mycotoxin exposure than other markers, as it was found in DON exposure in chicken.

M1 IRODALOMJEGYZÉK

1. Abedi E, Sahari MA. (2014): Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* 2:443–463.
2. Ademoyero AA, Hamilton PB. (1989): Influence of degree of acetylation of scirpenol mycotoxins on feed refusal by chickens. *Poult. Sci.* 68:854-856.
3. Ademoyero AA, Hamilton PB. (1991): Mouth lesions in broiler chickens caused by scirpenol mycotoxins. *Poult. Sci.* 70:2082-2089.
4. Anater A, Manyes L, Meca G, Ferrer E, Luciano FB, Pimpão CT, Font G. (2016): Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture* 451:1–10.
5. AOAC (1984): Official Methods of Analysis 28054 B. 14th ed. Association of the Official Analytical Chemists, Arlington
6. Arunachalam D, Doohan FM. (2013): Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Tox. Lett.* 217:149–158.
7. Awad WA, Böhm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Zentek J. (2006): Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poult. Sci.* 85:974-979.
8. Awad WA, Böhm J, Razzazi-Fazeli E, Hulan HW, Zentek J. (2004): Effects of deoxynivalenol on general performance and electrophysiological properties of intestinal mucosa of broiler chickens. *Poult. Sci.* 83:1964-1972.
9. Awad WA, Böhm J, Ghareeb K, Zentek J. (2013): The Toxicological Impacts of the Fusarium Mycotoxin, Deoxynivalenol, in Poultry Flocks with Special Reference to Immunotoxicity. *Toxins*, 5(5), 912-925
10. Awad WA, Vahjen W, Aschenbachv JR, Zentek J. (2011): A diet naturally contaminated with the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON) downregulates gene expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens *Livest. Sci.* 140:72–79.
11. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2014, Article ID 360438, 31 pages.
12. Balogh K, Bócsai A, Pelyhe Cs, Zándoki E, Erdélyi M, Szabó-Fodor J, Mézes M. (2015): Effects of long-term feeding of graded levels of T-2 toxin-contaminated diets on performance, some lipid peroxide and glutathione redox status parameters of broiler chickens. *J. Poult. Sci.*, 52:176-182.
13. Balogh K, Heincinger M, Fodor J, Mézes M. (2009): Effects of long term feeding of T-2 and HT-2 toxin contaminated diet on the glutathione redox status and lipid peroxidation processes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Act. Biol. Szegediensis* 5:23-27.
14. Bamburg JR, Riggs NV, Strong FM. (1968): The structure of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*. *Tetrahedron Lett.* 24:3329–3336.
15. Banerjee K, Basu S, Das S, Sinha A, Biswas MK, Choudhuri SK. (2016): Induction of intrinsic and extrinsic apoptosis through oxidative stress in drug-resistant cancer by a newly synthesized Schiff base copper chelate. *Free Radic. Res.* 50:426-446.
16. Banning A, Kipp A, Brigelius-Flohe R. (2012): Glutathione peroxidase 2 and its role in cancer. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds: *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*, Springer, New York, pp. 271–282.

17. Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. (1997): Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS Lett.* 410:210–212.
18. Barnes K, Evenson J, Raines A, Sunde R. (2009): Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity. *J Nutr.* 139:199-206.
19. Beasley V. (ed.) (1989): *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects.* CRC Press, Boca Raton
20. Benner MJ, Drew RE, Hardy RW, B. D. Robison, BD (2010): Zebrafish (*Danio rerio*) vary by strain and sex in their behavioral and transcriptional responses to selenium supplementation *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 157: 310–318.
21. Berlett BS, Stadtman ER. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272:20313-20316.
22. Berry M, Banu L, Chen Y, Mandel S, Kieffer J, Harney J, Larsen P. (1991): Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature.* 353:273-276.
23. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. (1993): Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 12:3315–3322.
24. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. (2013): Masked mycotoxins: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* 57:165-186.
25. Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. (2007): Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 265-282.
26. Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Butterly MS, McCormick S, Tume NE. (2014): Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:11798–11803.
27. Bloom DA, Jaiswal AK. (2003): Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278:44675–44682.
28. Bócsai A, Pelyhe Cs, Zándoki E, Ancsin Zs, Szabó-Fodor J, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K. (2016): Short-term effects of T-2 toxin exposure on some lipid peroxide and glutathione redox parameters of broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100:520-525.
29. Bondy GS, Pestka JJ. (2000): Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 3:109-143.
30. Boonchavit B, Hamilton PB, Burmeister HR. (1975): Interaction of T-2 toxin with *Salmonella* infections of chicken. *Poult. Sci* 54:1693-1696.
31. Brake J, Hamilton PB, Kittrell RS. (2000): Effects of the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on feed consumption, body weight and oral lesions of broiler breeders. *Poult. Sci.* 79:856-863.
32. Brecht DS, Hwang PM, Snyder SH. (1990): Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770.

33. Brigélius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiessn M, Kloppeln KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. (1994): Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 269:7342-7348.
34. Buettner GR, Jurkiewicz BA. (1993): Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic. Biol. Med.* 14:49–55.
35. Cai L, Cherian MG. (2003): Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper- or cadmium-metallothioneins. *Tox. Lett.* 136:193-198.
36. Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Calabrese EJ. (2009) Vitagenes, cellular stress response and acetylcarnitine: relevance to hormesis. *Biofactors* 35:146–160.
37. Cao C, Leng Y, Huang W, Liu X, Kufe D. (2003): Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278:39609–39614.
38. Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M., Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR., Vernet P. (2009): Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* 119:2074-2085.
39. Chandratre CA, Telang AG, Badgular PC, Raut SS, Sharma AK. (2014): Toxicopathological alterations induced by high dose dietary T-2mycotoxin and its residue detection in Wistar rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67:124–138.
40. Chaudhari M, Jayaraj R, Bhaskar ASB, Rao PVL. (2009a): Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. *Toxicology* 262:153-161.
41. Chaudhari M, Jayaraj R, Santhosh SR, Rao PVL. (2009b): Oxidative damage and gene expression profile of antioxidant enzymes after T-2 toxin exposure in mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 23:212-221.
42. Chaudhary M., Rao PVL. (2010): Brain oxidative stress after dermal and subcutaneous exposure of T-2 toxin in mice. *Food Chem. Toxicol.* 48:3436-3442.
43. Che Z, Liu Y, Wang H, Zhu H, Hou Y, Ding B. (2011): The protective effects of different mycotoxin adsorbents against blood and liver pathological changes induced by mold-contaminated feed in broilers. *Asian Austral J. Anim.* 24, 250-257.
44. Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG. (1998): Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J. Nutr.* 128:1070-1076.
45. Chi MS, Mirocha CJ. (1978): Necrotic oral lesions in chickens fed diacetoxyscirpenol, T-2 toxin and crotoxin. *Poult. Sci.* 57:807-808.
46. Choi K, Kim J, Kim GW, Choi C. (2009): Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr. Neurovasc. Res.* 6:213-222.
47. Choudhary C, Kumar C, Gnani F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. (2009): Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834–840.
48. Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. (1993): Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular seleniumdependent glutathione peroxidase, GSHPx- GI. *J. Biol. Chem.* 268:2571-2576.

49. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshov JH. (2004): Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res.* 64:962-968.
50. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. (2005): The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell. Biol.* 25:7637–7644.
51. Conrad M. (2009): Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. *Biochim. Biophys. Acta* 1790:1575-1585.
52. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17:1195-1214.
53. Corley R, Swanson S, Buck W (1985): Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine. *J. Agric. Food Chem.* 33:1085-1089.
54. Cundliffe E, Cannon M, Davies J. (1974): Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:30-34.
55. Cundliffe E, Davies JE. (1977): Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:491-499.
56. D’Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. (1999): Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity *Anim. Feed Sci. Technol.* 80:183–205.
57. Dänicke S, Ueberschär KH, Halle I, Matthes S, Valenta H, Flachowsky G. (2002): Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. *Poult. Sci.* 81:1671-1680.
58. Dänicke S, Ueberschär KH, Valenta H, Matthes S, Matthäus K, Halle I. (2004): Effects of graded levels of Fusarium-toxin-contaminated wheat in Pekin duck diets on performance, health and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Br. Poult. Sci.* 45:264-272.
59. Davies KJ. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* 50:279-289.
60. Dear TN, Campbell K, Rabbitts TH. (1991): Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry* 30:10376-10382.
61. Desjardins AE, Hohn TM, McCormick SP. (1993): Trichothecene biosynthesis in Fusarium species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.* 57:595-604.
62. Diaz DE. (ed.) (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham
63. Dickinson BC, Chang CJ. (2011): Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chem. Biol.* 7:504-511.
64. Dong W, Azcona-Olivera JI, Brooks KH, Linz JE, Pestka JJ. (1994): Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5, and 6 during exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide in the EL-4 thymoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127:282-290.
65. Döll S, Baardsen G, Koppe W, Stubhaug I, Dänicke S. (2010): Effects of increasing concentrations of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone or ochratoxin A in diets for

- Atlantic salmon (*Salmo salar*) on growth performance and health. In: The 14th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Qingdao, China, p. 120.
66. Droge W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. Review. *Physiol. Rev.* 82:47-95.
 67. Dvorska JE, Pappas AC, Karadas F, Speake BK, Surai PF. (2007): Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145:582–587.
 68. Edwards MD, Brancaccio M, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH. (2016): Rhythmic expression of cryptochrome induces the circadian clock of arrhythmic suprachiasmatic nuclei through arginine vasopressin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113:2732-2737.
 69. El Golli-Bennour E, Bacha H. (2011): Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: mycotoxins' exploration. *Toxicology* 287: 1–7.
 70. Ellison R, Kotsonis F. (1974): In vitro metabolism of T-2 toxin. *Appl. Microbiol.* 27:423.
 71. Engel RH, Evens AM. (2006): Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front. Biosci.* 11:300-312.
 72. Enkvetchakul B, Anthony NB, Bottje WG. (1995): Liver and blood glutathione in male broiler chickens, turkeys, and quail. *Poult Sci*; 74:885-889.
 73. Eriksen G, Pettersson H. (2004): Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:205-239.
 74. Eriksen GS. (2003): Metabolism and toxicity of trichothecenes, PhD thesis, University of Uppsala, Uppsala
 75. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. (2015): Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 6:183-197.
 76. Esworthy RS, Yang L, Frankel PH, Chu FF. (2005): Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J. Nutr.* 135:740-745.
 77. European Commission (2013): Commission recommendation on the presence of T-2 and HT-2 toxins in cereals and cereal products (Text with EEA relevance 2013/165/EU). Off. J. European Union, L91/12, pp. 1-4.
 78. Farkas T, Csengeri I, Majoros F, Oláh J. (1980): Metabolism of fatty acids in fish: III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. *Aquaculture* 20:29-40.
 79. Feinberg B, Mclaughlin CS. (1989): Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley VR. (ed.): *Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiologic effects*. Vol. I. CRC Press; Boca Raton, pp. 27–35.
 80. Ferencz Á. (2010): A Metal-responsive transcription factor-1 és a glutation peroxidáz család tagjait kódoló gének azonosítása és expressziójának jellemzése pontyban. Doktori (PhD) értekezés, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 95 p.
 81. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. (2007): Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42:153–164.
 82. Fioramonti J, Dupuy C, Dupuy J, Bueno L. (1993): The mycotoxin, deoxynivalenol, delays gastric emptying through serotonin-3 receptors in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1255-1260.

83. Frankic T, Pajk T, Rezar V, Levart A, Salobir J (2006) The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food Chem. Toxicol.* 44:1838–1844.
84. Fritz KS, Galligan JJ, Hirschey MD, Verdin E, Petersen DR. (2012): Mitochondrial acetylome analysis in a mouse model of alcohol-induced liver injury utilizing SIRT3 knockout mice. *J. Proteome Res.* 11:1633–164.
85. Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, Lei XG. (1999): Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 27:605-611.
86. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. (2002): Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) *Mol. Cell. Biochem.* 236:7–12.
87. Grenier B, Dohnal I, Shanmugasundaram R, Eicher SD, Selvaraj RK, Schatzmayr G, Applegate TJ. (2016): Susceptibility of Broiler Chickens to Coccidiosis When Fed Subclinical Doses of Deoxynivalenol and Fumonisin-Special Emphasis on the Immunological Response and the Mycotoxin Interaction. *Toxins.* 8(8).231.
88. Ghyselinck NB, Jimenez C, Courty Y, Dufaure JP. (1989): Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 85:631-639.
89. Girish CK, Devegowda G. (2006): Efficacy of glucomannancontaining yeast product (Mycosorb®) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 19:877-883.
90. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. (2006): NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72:1493-1505.
91. Grim JM, Hyndman KA, Kriska T, Girotti AW, Crockett EL. (2011): Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish. *J. Exp. Biol.* 214:3751-3759.
92. Gromer S, Johansson L, Bauer H, Arscott L, Rauch S, Ballou D, Williams C, Schirmer R, Arnér E. (2003): Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12618-12623.
93. Grove JF. (1993) Macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 10:429-448.
94. Guan S, He J, Young JC, Zhu H, Li X-Z, Ji C, Zhou T. (2009): Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta. *Aquaculture* 290:290–295.
95. Guo X, Song J, Yu Y, Wei J. (2014): Can recombinant human glutathione peroxidase 1 with high activity be efficiently produced in *Escherichia coli*? *Antiox. Redox Sign.* 20:1524-1530.
96. Gutteridge JM, Halliwell B. (1990): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15:129-135.
97. Gyongyossy-Issa MI, Christie EJ, Khachatourians GG. (1984): Charge-shift electrophoretic behavior of T-2 toxin in agarose gels. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1182-1184.
98. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
99. Halliwell B. (1991): Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 91:14-30.
100. Handy DE, Lubos E, Yang Y, Galbraith JD, Kelly N, Zhang YY, Leopold JA, Loscalzo J. (2009): Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J. Biol. Chem.* 284:11913-11921.

101. Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Elissalde MH, Phillips TD. (1991): Hematologic and immunologic toxicity of deoxynivalenol (DON)-contaminated diets to growing chickens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46:410-416.
102. He CH, Fan YH, Wang Y, Huang CY, Wang XC, Zhang HB.(2010): The individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B1 on primary hepatocytes of *Cyprinus carpio*. *Int. J. Mol. Sci.* 11:3760–3768.
103. Hermes E, Ferencz A. (2009): Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (gpx4) genes in common carp. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 150:101-106.
104. Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P. (2007): Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:15747–15752.
105. Hoerr FJ, Carlton WW, Yagen B, Joffe AZ. (1982): Mycotoxicosis caused by either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in the diet of broiler chickens. *Fund. Appl. Toxicol.* 2:121-124.
106. Hoerr FJ. (2003): Mycotoxicoses. In: Saif YM. (ed.). *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa State University Press; Ames, pp. 1103-1132.
107. Holladay SD, Smith BJ, Luster MI. (1995): B-lymphocyte precursor cells represent sensitive targets of T2 mycotoxin exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131:309-315.
108. Holmgren A. (1977): Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J. Biol. Chem.* 252: 4600-4606.
109. Hooft JM, Elmor AEHI, Encarnação P, Bureau DP. (2011): Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON). *Aquaculture* 311:224-232.
110. Horvath I, Varga M. (1961): Enzymatic inactivation of trichothecin and crotoxin *Nature*, 192: 88.
111. Huang J-Q, Li D-L, Zhao H, Sun L-H, Xia X-J, Wang K-N, Luo X, Lei XG. (2011): The selenium deficiency disease exudative diathesis in chicks is associated with down-regulation of seven common selenoprotein genes in liver and muscle. *J. Nutr.* 141:1605–1610.
112. Huff WE, Doerr JA, Hamilton PB, Vesonder RF. (1981): Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in broiler-chickens. *Poult Sci.* 60:1412–1414.
113. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y. (2003): Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:278–286.
114. Imai H, Nakagawa Y. (2003): Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 145–169.
115. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. (2004): Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1208–1213.
116. Jacob RA, Burri BJ. (1996): Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:985S-990S.
117. Janero DR. (1998): Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9:515-540.
118. Jeffery CJ. (1999): Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24:8-11.

119. Jennings P, Limonciel A, Felice L, Leonard MO. (2013): An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult. *Arch. Toxicol.* 87:49-72.
120. Jiang J, Shi D, Zhou XQ, Yin L, Feng L, Liu Y, Jiang WD, Zhao Y. (2015): Effects of glutamate on growth, antioxidant capacity, and antioxidant-related signaling molecule expression in primary cultures of fish enterocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 41:1143-1153.
121. Jossé L, Li X, Coker RD, Gourlay CW, Evans IH. (2011): Transcriptomic and phenotypic analysis of the effects of T-2 toxin on *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of mitochondrial involvement. *FEMS Yeast Res.* 11:133-150.
122. Kamalavenkatesh P, Viaramuthu S, Balachandran C, Murali Manohar B, Dhinakar, Raj GD. (2005): Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. *Mycopathologia* 159:273-279.
123. Kaplan M, Aviram M. (1999): Oxidised low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37:777-787.
124. Kapoor BB, Smit H, Verighina IA. (1976): The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Marine Biol.* 13:109-239.
125. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. (2009): Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 47:1304-1309.
126. Kidd MT, Hagler WM Jr, Qureshi MA. (1995): Trichotecene mycotoxins depress the mononuclear-phagocytic system of young turkeys. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 17: 385-398.
127. Kieliszek M, Błażej S. (2016): Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. *Molecules* 21:609. doi:10.3390/molecules21050609
128. Kimura M, Tokai T, O'Donnell K, Ward TJ, Fujimura M, Hamamoto H, Shibata T, Yamaguchi I. (2003): The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Lett.* 539:105-110.
129. Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont I, Moukha S, Dano SD, Creppy EE. (2005): Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213: 56–65.
130. Konjevic D, Srebocan E, Gudan A, Lojkic I, Severin K, Sokolovic M. (2004): A pathological condition possibly caused by spontaneous trichotecene poisoning in Brahma poultry: first report. *Avian Pathol.* 33:377-380.
131. Kovács M. (szerk) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. *Agroinform Kiadó, Budapest*, 156. p.
132. Köhle C, Bock KE. (2007): Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* 73:1853-1862.
133. Kravchenko LV, Galash VT, Avren'eva LT, Kranauskas AE. (1989): On the sensitivity of carp, *Cyprinus carpio*, to mycotoxin T-2. *J. Ichthyol.* 29:156-160.
134. Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP. (1996): Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J. Cell Biol.* 133:1083-1093.
135. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300:1439–1443.

136. Kryukov GV, Gladyshev VN. (2000): Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells* 5:1049–1060.
137. Kubena LF, Swanson SP, Harvey RB, Fletcher OJ, Rowe LD, Phillips TD. (1985): Effects of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat to growing chicks. *Poult. Sci.* 64:1649–1655.
138. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2014): Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* 94:739–777.
139. Lawrence T. (2009): The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 1(6): a001651
140. Leal M, Shimada A, Ruíz F, González de Mejía E. (1999): Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicol. Lett.* 109:1–10.
141. Lei XG, Wang X. (2012): Glutathione peroxidase 1, diabetes. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN. (eds.): *Selenium: Its molecular biology and role in human health*, Springer, New York, p. 261–270.
142. Leonard SS, Harris GK, Shi X. (2004): Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37:1921-1942.
143. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. (2000): The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60: 3927–3939.
144. Liang H, Van Remmen H, Frohlich V, Lechleiter J, Richardson A, Ran Q. (2007): Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356: 893–898.
145. Liang H, Yoo SE, Na R, Walter CA, Richardson A, Ran Q. (2009): Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J. Biol. Chem.* 284:30836–30844.
146. Lien AP-H, Hua H, Chuong P-H. (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4:89–96.
147. Liu CP, Fu J, Lin SL, Wang XS, Li S. (2014): Effects of dietary selenium deficiency on mRNA levels of twenty-one selenoprotein genes in the liver of layer chicken. *Biol. Trace Elem. Res.* 159:192–198.
148. Liu L, Wu S, Tam MF. (1993): Nucleotide sequence of class-a glutathione S-transferases from chicken liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1216:332-334.
149. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C(T)$) method. *Methods* 25:402–408.
150. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
151. Lu SC. (2009): Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30:42–59.
152. Lu SC. (2013): Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830:3143–3153.
153. Lun AK, Young LG, Moran ET Jr, Hunter DB, Rodriguez JP. (1986): Effects of feeding hens a high level of vomitoxin-contaminated corn on performance and tissue residues. *Poult. Sci.* 65:1095-1099.
154. Lundby A, Lage K, Weinert BT, Bekker-Jensen DB, Secher A, Skovgaard T, Kelstrup CD, Dmytriiev A, Choudhary C, Lundby C, Olsen JV. (2012): Proteomic analysis of lysine

- acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep* 2: 419–431.
155. Mahaffey K. (2004): Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environ. Res.* 95:414-428.
 156. Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L. (1995): Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376:651-660.
 157. Maiorino M, Thomas JP, Girotti AW, Ursini F. (1991): Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13:131–135.
 158. Manikonda PK, Jagota A. (2012): Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology* 13:511–524
 159. Mannes AM. (2013): Dissecting the role of selenothiol- versus thiol-based catalysis using the model enzyme glutathione peroxidase 4 (GPx4). PhD thesis, Ludwig-Maximilian–University, München, 109 pp.
 160. Manning BB, Abbas HK, Wise DJ, Greenway T. (2014): The effect of feeding diets containing deoxynivalenol contaminated corn on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquacult. Res.* 45:1782–1786.
 161. Manning BB, Li MH, Robinson EH, Gaunt PS, Camus AL, Rottinghaus GE. (2003): Response of channel catfish *Ictalurus punctatus* to diets containing T-2 toxin. *J. Aquat. Anim. Health* 15:230–239.
 162. Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2012): Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *Plos ONE* 7:e33066.
 163. Martinez JI, Garcia RD, Galarza AM. (1982): The kinetic mechanism of glutathione peroxidase from human platelets. *Thromb. Res.* 27:197–203.
 164. Matejova I, Faldyna M, Modra H, Blahova J, Palikova M, Markova Z, Franc A, Vicenova M, Vojtek L, Bartonkova J, Sehonova P, Hostovsky M, Svobodova Z. (2016): Effect of T-2 toxin-contaminated diet on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* (in press)
 165. Matés JM. (2000): Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153:83–104.
 166. Matkovics B, Szabó L, Sz. Varga I. (1988): Lipidperoxidáció és a redukált glutation anyagcsere enzimek aktivitás meghatározása biológiai mintákban. *Laboratóriumi Diagnosztika* 15: 248-250.
 167. Maul R, Warth B, Kant JS, Schebb NH, Krska R, Koch M, Sulyok M. (2012): Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various species. *Chem. Res. Toxicol.* 25:2715–2717.
 168. McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. (2004): Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:8852-8857.
 169. McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. (2011): Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3:802–814.

170. McKean C, Tang L, Billam M, Tang M, Theodorakis CW, Kendall RJ, Wang JS. (2006): Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. *J. Appl. Toxicol.* 26:139-147.
171. Meissonnier GM, Laffitte J, Raymond I, Benoit E, Cossalter AM, Pinton P, Bertin G, Oswald IP, Galtier P. (2008): Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs. *Toxicology* 247:46-54.
172. Mézes M, Barta M, Nagy G. (1998): Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Res. Vet. Sci.* 66:19–23.
173. Mézes M, Matkovics B. (1986): A lipidperoxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése. In: Csaba Gy. (szerk.): *A Biológia Aktuális Problémái*. Medicina, Budapest Vol. 34, pp. 61-105.
174. Mills GC. (1957): Hemoglobincatabolism. I. Glutathione peroxidase, an enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229:189-197.
175. Mishra S, Dwivedi PD, Pandey HP, Das M. (2014): Role of oxidative stress in deoxynivalenol induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 72:20–29.
176. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. (2012): The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol.* 2:200.
177. Miyazaki S, Motoi Y. (1992): Tissue distribution of monomeric glutathione peroxidase in broiler chicks. *Res. Vet. Sci.* 53:47-51.
178. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. (1994): Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9926–9930.
179. Morais S, Pratoomyot J, Taggart JB, Bron JE, Guy DR, Bell JG, Tocher DR. (2011): Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC Genomics* 12:255.
180. Moriarty P, Reddy C, Maquat L. (1998): Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 18:2932-2939.
181. Moss MO. (2002): Mycotoxin review-2. *Fusarium*. *Mycologist*, 16:158–161.
182. Mu P, Xu M, Zhang L, Wu K, Wu J, Jiang J, Chen Q, Wang L, Tang X, Deng Y. (2013): Proteomic changes in chicken primary hepatocytes exposed to T-2 toxin are associated with oxidative stress and mitochondrial enhancement. *Proteomics*, 13:3175-3188.
183. Murale DP, Manjare ST, Lee YS, Churchill DG. (2014): Fluorescence probing of the ferric Fenton reaction via novel chelation. *Chem. Commun.* 50: 359-361.
184. Murphy MP. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1–13.
185. Naiki-Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, Takahashi S, Yamashita H, Tsuda H, Ogawa K, Shirai T. (2007): Gpx2 is an overexpressed gene in rat breast cancers induced by three different chemical carcinogens. *Cancer Res.* 67:11353-11358.
186. Nauser T, Steinmann D, Grassi G, Koppenol WH. (2014): Why selenocysteine replaces cysteine in thioredoxin reductase: a radical hypothesis. *Biochemistry-US.* 53:5017-5022.
187. Nestic K, Ivanovic S, Nestic V. (2014): Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 228:101-120.

188. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. (2009): The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284:13291-13295.
189. Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. (2005): Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem.* 280:32485-92.
190. Noblanc A, Kocer A, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Conrad M, Drevet JR. (2011): Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J. Androl.* 32:641–650.
191. Nowak-Göttl U, Fiedler B, Hüge A, Niederstadt T, Thedieck S, Seehafer T, Stoll M. (2011): Plasma glutathione peroxidase in pediatric stroke families. *J. Thromb. Haemost.* 9:33-38.
192. Osselaere A, Santos R, Hautekiet V, Backer PD, Chiers K, Ducatelle R, Croubels S. (2013): Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small intestine. *PLoS ONE* 8:e69014.
193. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. (1998): Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32. 69-75.
194. Pacitti D, Wang T, Page M, Martin S, Sweetman J, Feldmann J, Secombes C. (2013): Characterization of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their modulation by in vitro selenium exposure. *Aquat. Toxicol.* 130-131:97-111.
195. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. (2007): From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antiox. Redox Signal* 9:775-806.
196. Parent-Massin D. (2004): Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicol. Lett.* 153:75–81.
197. Patel SA, Velingkaar NS, Kondratov RV. (2014): Transcriptional control of antioxidant defense by the circadian clock. *Antiox. Redox Signal* 20:2997-3006.
198. Pauly JL, Paszkiewicz G. (2011): Cigarette smoke, bacteria, mold, microbial toxins, and chronic lung inflammation. *J. Oncol.* 2011:819129
199. Pelyhe Cs, Kövesi B, Zándoki E, Kovács B, Szabó-Fodor J, Mézes M, Balogh K. (2016): Effect of 4-week feeding of deoxynivalenol or T-2-toxin-contaminated diet on lipid peroxidation and glutathione redox system in the hepatopancreas of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Mycotox. Res.* 32:77–83.
200. Penglase SJ. (2014): The effects of selenium on methylmercury toxicity in zebrafish. PhD thesis, University of Bergen, Bergen, 65 pp.
201. Pepper MP, Vatamaniuk MZ, Yan X, Roneker CA, Lei XG. (2011): Impacts of dietary selenium deficiency on metabolic phenotypes of diet-restricted GPX1-overexpressing mice. *Antioxid Redox Signal.* 14:383-390.
202. Perjési P. (szerk.) (2014): Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Pécsi Tudományegyetem, Pécs.
203. Pestka JJ, Bondy GS. (1990): Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68:1009-1016.
204. Pestka JJ, Yan D, King LE. (1994): Flow cytometric analysis of the effects of in vitro exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and IgA+ cells. *Food Chem. Toxicol.* 32: 1125–1136.

205. Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ. (2004): Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.* 153:61-73.
206. Petri S, Körner S, Kiaei M. (2012): Nrf2/ARE signaling pathway: key mediator in oxidative stress and potential therapeutic target in ALS. *Neurol. Res. Internat.* Article ID 878030, 7 pages.
207. Pierron A, Alassane-Kpembé I, Oswald IP. (2016): Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. *Anim. Nutr.* 2:63–68.
208. Pietsch C, Bucheli TD, Wettstein FE, Holm PB. (2011): Frequent biphasic cellular responses of permanent fish cell cultures to deoxynivalenol (DON). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256: 24–34.
209. Pietsch C, Katzenback BA, Garcia-Garcia E, Schulz C, Belosevic M, Burkhardt-Holm P. (2015): Acute and subchronic effects on immune responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) after exposure to deoxynivalenol (DON) in feed. *Mycotox. Res.* 31:151–164.
210. Pietsch C, Kersten S, Valenta H, Dänicke S, Schulz C, Kloas W, Burkhardt-Holm P. (2014a): In vivo effects of deoxynivalenol (DON) on innate immune responses of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Food Chem. Toxicol.* 68:44–52.
211. Pietsch C, Schulz C, Robiero P, Kloas W, Burkhardt-Holm P. (2014b): Organ Damage and Hepatic Lipid Accumulation in Carp (*Cyprinus carpio* L.) after Feed-Borne Exposure to the Mycotoxin, Deoxynivalenol (DON) *Toxins* 6:756–778.
212. Pietsch C. (2015): Impact of Natural Toxins on Common Carp. In: Pietsch C, Hirsch P. (eds.): *Biology and Ecology of Carp*. CRC Press, Boca Raton, pp. 334-376.
213. Pietsch C, Burkhardt-Holm P. (2015): Feed-borne exposure to deoxynivalenol leads to acute and chronic effects on liver enzymes and histology in carp. *World Mycotox. J.* 8:619 – 627.
214. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16:359-364.
215. Poston HA. (1983): Biological effects of dietary T-2 toxins on rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 2: 79-88.
216. Prasath NB, Rao GVS, Balachandran C, Manohar BM. (2009): Effect of T-2 toxin on haematological and serum biochemical parameters and immune response status in turkey poults. *Indian J. Vet. Pathol.* 33, 173-176.
217. Prelusky D, Hartin K, Trenholm H, Miller J. (1988): Pharmacokinetic fate of ¹⁴C labelled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10:276-286.
218. Prelusky DB. (1994): The effect of deoxynivalenol on serotonergic neurotransmitter levels in pig blood. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 29:(6)
219. Rahman K. (2007): Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* 2: 219–236.
220. Rezar V, Frankic T, Narat M, Levart A, Salobir J. (2007): Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86:1155–11160.
221. Rikans LE, Hornbrook KR. (1997): Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362:116–127
222. Rikans LE, Moore DR, Snowden CD. (1991): Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1074:195–200
223. Rizzo AF, Atroshi F, Ahotupa M, Sankari S, Elovaara E. (1994): Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 41:81–90.

224. Rocher C, Lalanne J, Chaudière J. (1992): Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 205: 955-960.
225. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. (2004): Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36.1: 1-9.
226. Rushmore TH, King RG, Paulson KE, Pickett CB. (1990): Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3826–3830.
227. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. (1991): Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 266:11632–11639.
228. Sanden M, Jorgensen S, Hemre GI, Ornsrud R, Sissener NH. (2012): Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating dietary toxic effects of deoxynivalenol contamination in aquaculture feeds. *Food Chem. Toxicol.* 50: 4441-4448.
229. SCF, Scientific Committee on Food (1999): Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins, Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin. European Commission, Health & consumer protection Directorate C- Scientific Opinions. SCF/CS/CNTM/MYC/25 Rev 6 Final.
230. Schmidt-Heydt M, Magan N, Geisen R. (2008): Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 284:142–149.
231. Schneider M, Förster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, de Angelis M, Hrabé W.W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M. (2009): Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.* 23:3233–3242.
232. Sedlak J, Lindsay RH. (1968): Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.* 25:192-205.
233. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. (2008): Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab.* 8:237–248.
234. Selma Y, Gülden ZO. (2008): Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2062–2090.
235. Sergent T, Parys M, Garsou S, Pussemier L, Schneider YJ, Larondelle Y. (2006): Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.* 164:167–176.
236. Sharma RP. (1993): Immunotoxicity of mycotoxins. *J. Dairy Sci.* 76:892-897.
237. Shepard BD, Tuma DJ, Tuma PL. (2010): Chronic ethanol consumption induces global hepatic protein hyperacetylation. *Alc. Clin. Exp. Res.* 34:280–291.
238. Sies H. (1991): Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91(3C):31S-38S.
239. Sies H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82:291-295.
240. Simsek S, Ovando-Martínez M, Ozsisli B, Whitney K, Ohm JB. (2013): Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in hard red spring wheat grown in the USA. *Toxins* 5:2656–2670.
241. Slauch JM. (2011): How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol. Microbiol.* 80:580–583.

242. Smith TK. (1992): Recent advances in the understanding of *Fusarium trichothecene* mycotoxicoses. *J. Anim. Sci.* 70:3989-3993.
243. Sobocanec S, Balog T, Sverko V, Marotti T. (2005): Metenkephalin modulation of age-related changes in red cell antioxidant status. *Physiol Res* 54:97–104
244. Sobocanec S, Balog T, Kusić B, Sverko V, Sarić A, Marotti T (2008): Differential response to lipid peroxidation in male and female mice with age: correlation of antioxidant enzymes matters *Biogerontology* 9:335–343
245. Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova B, Zeman L, Kizek R. (2010): Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol.* 3: 94–99.
246. Sokolovic M, Garaj-Vrhovac V, Ramic S, Simpraga B. (2007): Chicken nucleated blood cells as a cellular model for genotoxicity testing using the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 45:2165-2170.
247. Sokolovic M, Garaj-Vrhovac V, Simpraga B. (2008): T-2 toxin incidence and toxicity in poultry. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 59:43-52.
248. Spitz DR, Adams DT, Sherman CM, Roberts RJ. (1992): Mechanisms of cellular resistance to hydrogen peroxide, hyperoxia, and 4-hydroxy-2-nonenal toxicity: the significance of increased catalase activity in H₂O₂-resistant fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 221-227.
249. Strasser A, Carra M, Awad GW, Böhm J. (2013): Protective effects of antioxidants on deoxynivalenol-induced damage in murine lymphoma cells. *Mycotox. Res.* 29:203–208.
250. Sudakin DL. (2003): Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol. Lett.* 143:97–107.
251. Sunde RA, Hadley KB. (2010): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) is highly regulated in male turkey poults and can be used to determine dietary selenium requirements. *Exp. Biol. Med.* 235: 23-31.
252. Surai PF, Dvorska JE, Sparks NHC, Jaques KA. (2002): Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defence. In: Lyons TP, Jaques KA. eds: *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 131-142.
253. Surai PF. (1999): Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *Br Poult Sci*;40:397-405
254. Surai PF, Fisinin VI, Karadas F. (2016): Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition* 2. 1-11
255. Suzuki T, and Yamamoto M. (2015): Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radic Biol Med.*88(Pt B):93-100.
256. Suzuki M, Otsuki A, Lukwete NK, Yamamoto M. (2016): Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Cur. Opin. Toxicol.* 1: 29–36.
257. Sverko V, Balog T, Sobocanec S, Gavella M, Marotti T. (2002): Age-associated alteration of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in CBA and AKR mice. *Exp Gerontol* 37:1031–1039
258. Swanson S, Corley R. (1989): The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins. In: Beasley VR. (ed.): *Trichothecene mycotoxicosis pathophysiologic effects*. Vol. I. CRC Press, Boca Raton, pp. 37-61.
259. Swanson SP, Helaszek C, Buck WB, Rood JHD, Haschek WM. (1988): The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.* 26: 823–829.
260. Szigeti G. (1997): *Az állategészségügyi jelentőségű gombák (Az állatorvosi mikológia alapjai)*. Europharma, Budapest, pp. 96.

261. Takagi T, Wakasa N, Miyashita K. (1987): Formation of conjugated diene and triene products in lipoxygenase oxidation of C18, C20, C22 PUFAs. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64:1320-1323.
262. Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. (1990): Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem. (Tokyo)* 108:145-148.
263. Thisse C, Degraeve A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht-Pflumio S, Krol A, Thisse B, Lescure A. (2003): Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr. Patterns.* 3:525-532.
264. Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. (1990): Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation: in situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 265:454-461.
265. Tobias S, Rajic I, Vanyi A. (1992): Effect of T-2 toxin on egg production and hatchability in laying hens. *Acta Vet. Hung.* 40:47-54.
266. Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. (2013): Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology.* 14:461-482.
267. Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. (2008): Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 10:1501-14.
268. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. (2009): Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 81, 449-504.
269. Ueno Y, Nakajima M, Sakai K, Ishii K, Sato N, Shimada N. (1983): Comparative toxicity of trichothecene mycotoxins: Inhibition of protein synthesis in animal cells. *J. Biochem.* 74: 285-292.
270. Ueno Y. (1977): Mode of action of trichothecenes. *Ann. Nutr. Aliment.* 31:885-900.
271. Uhlig S, Ivanova L, Fæste CK. (2013): Enzyme-assisted synthesis and structural characterization of the 3-, 8- and 15-glucuronides of deoxynivalenol. *J. Agric. Food Chem.* 61:2006-2012.
272. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285:1393-1396.
273. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839:62-70.
274. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. (1982): Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.* 710:197-211.
275. Venkatesh PK, Vairamuthu S, Balachandran C, Manohar BM, Raj GD. (2005): Induction of apoptosis by fungal culture materials containing cyclopiazonic acid and T-2 toxin in primary lymphoid organs of broiler chickens. *Mycopathologia* 159:393-400.
276. Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJ, Sips AJ. (2005): Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.* 43:31-40.
277. Volodymyr IL. (2011): Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids.* 2012: Article ID 736837, 26 pages

278. Walshe J, Serewko-Auret MM, Teakle N, Cameron S, Minto K, Smith L, Burcham PC, Russell T, Strutton G, Griffin A, Chu FF, Esworthy S, Reeve V, Saunders NA. (2007): Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res.* 67:4751-4758.
279. Wan D, Huang L, Pan Y, Wu Q, Chen D, Tao Y, Wang X, Liu Z, Li J, Wang L, Yuan Z. (2014): Metabolism, distribution, and excretion of deoxynivalenol with combined techniques of radiotracing, high-performance liquid chromatography ion trap time-of-flight mass spectrometry, and online radiometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 62:288–296.
280. Wang J, Fitzpatrick DW, Wilson JR. (1998): Effects of the trichothecene mycotoxin T-2 toxin on neurotransmitters and metabolites in discrete areas of the rat brain *Food Chem. Toxicol.* 36:947-953.
281. Wang L, Harris SM, Espinoza HM, McClain V, Gallagher EP. (2012): Characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione metabolizing peroxidase (gpx4) isoforms in Coho salmon olfactory and liver tissues and their modulation by cadmium. *Aquat. Toxicol.* 114-115: 134-141.
282. Wang X, Wang W, Cheng G, Huang L, Chen D, Tao Y, Pan Y, Hao H, Wu Q, Wan D, Liu Z, Wang Y, Yuan Z. (2014): High risk of embryo-fetal toxicity: placental transfer of T-2 toxin and its major metabolite HT-2 toxin in BeWo cells. *Toxicol. Sci.* 137:168-178.
283. Wang X, Zhang Y, Chang Y, Duan D, Sun Z, Guo X. (2016a): Elevation of IGFBP2 contributes to mycotoxin T-2-induced chondrocyte injury and metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478:385-391.
284. Wang X, Zuo Z, Zhao C, Zhang Z, Peng G, Cao S, Hu Y, Yu S, Zhong Z, Deng J, Ren Z, (2016b): Protective role of selenium in the activities of antioxidant enzymes in piglet splenic lymphocytes exposed to deoxynivalenol. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 47:53-61.
285. Warner RL, Brooks K, Pestka JJ. (1994): In vitro effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on T-cell interleukin production and IgA secretion. *Food Chem. Toxicol.* 32:617-625.
286. Weber M, Balogh K, Fodor J, Erdélyi M, Ancsin Z, Mézes M. (2010): Effect of T-2 and HT-2 toxin during the growing period on body weight, lipid peroxide and glutathione redox status of broiler chickens *Acta Vet. Brno* 79:27–31.
287. Weber M, Fodor J, Balogh K, Erdélyi M, Mézes M. (2006): Dose-dependent effect of T-2 toxin on the immunity against newcastle disease virus in chickens. *Acta Vet. Brno* 75: 387-391.
288. Weiss S, Sunde R, (2001): Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem. J.* 357: 851-858.
289. Wen J, Mu P, Deng Y. (2016): Mycotoxins: cytotoxicity and biotransformation in animal cells *Toxicol. Res.* 5: 377-387.
290. Wong J, Magun BE, Wood LJ. (2016): Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 11:1391–1401.
291. Wood GE. (1992): Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* 70:3941–3949.
292. Woodward B, Young LG, Lun AK. (1983): Vomitoxin in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 35:93–101.
293. Wortmann M, Schneider M, Pircher J, Hellfritsch J, Aichler M, Vegi N, Kölle P, Kuhlencordt P, Walch A, Pohl U, Bornkamm GW, Conrad M, Beck H. (2013): Combined deficiency in glutathione peroxidase 4 and vitamin E causes multiorgan thrombus formation and early death in mice. *Circ. Res.* 113:408-417.

294. Wu F, Groopman JD, Pestka JJ. (2014a): Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5:351–372.
295. Wu H, Wang X, Yang W, Nüssler AK, Xiong LY, Kuča K, Dohnal V, Zhang XJ, Yuan ZH. (2014b): Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Arch. Toxicol.* 88:1309–1326.
296. Wu Q, Dohnal V, Huang L, Kuca K, Yuan Z. (2010): Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metab. Rev.* 42:250-267.
297. Wu Q, Huang L, Liu Z, Yao M, Wang Y, Dai M, Yuan Z. (2011): A comparison of hepatic in vitro metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens and carp. *Xenobiotica* 41:863–873.
298. Wulund L, Reddy AB. (2015): A brief history of circadian time: The emergence of redox oscillations as a novel component of biological rhythms. *Perspect. Sci.* 6: 27-37.
299. Wyatt RD, Colwell WM, Hamilton PB, Burmeister HR. (1973a): Neural disturbances in chickens caused by dietary T-2 toxin. *Appl. Microbiol.* 26:757-761.
300. Wyatt RD, Hamilton PB, Burmeister HR. (1973b): The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* 52:1853-1859.
301. Yan W, Chen X. (2006): GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 281:7856-7862.
302. Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ. (2000): Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: Relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164:149–160.
303. Yang L, Yu Z, Hou J, Deng Y, Zhou Z, Zhao Z, Cui J. (2016): Toxicity and oxidative stress induced by T-2 toxin and HT-2 toxin in broilers and broiler hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 87: 128-137.
304. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. (2003): The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 496–502.
305. Yao H, Zhao W, Zhao X, Fan R, Khoso PA, Zhang Z, Liu W, Xu S. (2014): Selenium deficiency mainly influences the gene expressions of antioxidative selenoproteins in chicken muscles. *Biol. Trace Elem. Res.* 161:318–327.
306. Yoo MH, Gu X, Xu XM, Kim JY, Carlson BA, Patterson AD, Cai H, Gladyshev VN, Hatfield DL. (2010): Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease. *Antiox. Redox Signal* 12:819-827.
307. Young JC, Zhou T, Yu H, Zhu H, Gong J. (2007): Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes *Food Chem. Toxicol.* 45:136–143.
308. Zheng W, Xu H, Lam SH, Luo H, Karuturi RK, Gong Z. (2013): Transcriptomic analyses of sexual dimorphism of the zebrafish liver and the effect of sex hormones. *PLoS ONE* 8:e53562.
309. Zhou HR, Islam Z, Pestka JJ. (2005): Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol Sci.* 87: 113-122.
310. Zhuang Z, Yang D, Huang Y, Wang S. (2013): Study on the apoptosis mechanism induced by T-2 Toxin. *PLoS ONE* 8: e83105.
311. Ziprin RL, Elissalde MH. (1990): Effect of T-2 toxin on resistance to systemic *Salmonella typhimurium* infection of newly hatched chickens. *Am. J. Vet. Res.* 51:1869-1872.

312. Zoidis E, Pappas AC, Georgiou CA, Komaitis E, Feggeros K. (2010): Selenium affects the expression of GPx4 and catalase in the liver of chicken. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 155: 294–300.

Webes hivatkozások:

1. Biomin World Mycotoxin Survey (2015): <https://www.biomin.net/en/blog-posts/2015-biomin-mycotoxin-survey-out-now/>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori kutatásaim és tanulmányaim alatt rengeteg segítséget kaptam, amelyért minden kollégámnak köszönettel tartozom. Kutatásaim során végzett munkámban tanácsaikkal, javaslataikkal irányítottak és segítettek témavezetőim, **Dr. Mézes Miklós** és **Dr. Kovács Balázs**, akiknek ezért hálával és köszönettel tartozom. Külön szeretném megköszönni témavezetőimnek, hogy mindig nyitottak voltak az ötleteimre és elképzeléseimre és teret engedtek ezek megvalósításának, amellyel önállóságomat és szakmai fejlődésemet támogatták. Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Balogh Krisztiánnak** a kísérletek tervezésével, lebonyolításával és az eredmények kiértékelésével kapcsolatos segítségéért és támogatásáért. Külön köszönetet szeretnék mondani **Balláné Dr. Erdélyi Mártának, Bócsai Andreának, Pálvölgyiné Györkös Elvirának, Ancsin Zsoltnak és Fernye Csabának**, akik a kísérletek szervezésében és gyakorlati kivitelezésében nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget. Hálámat szeretném kifejezni a **Regionális Egyetemi Tudásközpont**, illetve a **Halgazdálkodási tanszék** munkatársainak, kollégáimnak, barátaimnak, akik segítettek abban, hogy a molekuláris biológiai laboratóriumi munkákban megfelelő gyakorlatot szerezzek és önállóan dolgozhassak. Külön szeretném megköszönni a rengeteg segítséget **Reining Mártának, Ósz Ágnesnek** és **Uri Csillának** a laboratóriumban nyújtott segítségükért és barátságukért. Köszönetet szeretnék mondani **Kövesi Benjáminnak**, volt szakdolgozómnak, jelenlegi doktoranduszunknak, a lelkes hozzáállásáért és kitartó, önálló munkájáért. Szeretném megköszönni a rengeteg adminisztratív segítséget és támogatást **Lakatos Tündének**, valamint a **Takarmányozástani tanszék** minden dolgozójának a támogatást és biztatást.

Végezetül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom **Páromnak** a tőle kapott folyamatos támogatásért, biztatásért és megértő türelemért, valamint **Családomnak** és **Barátaimnak** a támogatásért és lelkesítésért.

Köszönettel tartozom továbbá a következő pályázatoknak, amelyek anyagi támogatásával kísérleteimet végeztem:

- Bolyai János Kutatási Ösztöndíjak (BO/261/13. Dr. Balogh Krisztián és BO/499/13. Szabó-Fodor Judit)
- Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA PD-104823. Dr. Balogh Krisztián)
- Kutató Kari Kiválósági Támogatás 9878-3/2016/FEKUT (SZIE MKK)
- Új Nemzeti Kiválóság Program 2016/2017 (ÚNKP) Predoktori Ösztöndíj (Pelyhe Csilla)
- Nemzeti versenyképességi és kiválósági program (NKVP_16_1_2016_0016)
- Felsőoktatási hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatása (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008)