



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

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 doktori iskola vezetőjének jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A társ-témavezető jóváhagyása

1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

1.1 A kutatás előzményei

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 monogasztrikus gazdasági állataink legfőbb, kérődző állatainknak pedig fontos takarmány alapanyagai, amelyekkel azonban toxikus anyagok is bekerülhetnek a takarmányokba.

A trichotecénaváz mikotoxinok a *Fusarium* penészgomba fajok másodlagos anyagcsere termékei. Gazdasági jelentőségük és gyakorlati előfordulásuk alapján ennek a mikotoxin családnak 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 változásokat tükrözi. Ezek jelentős része azonban vagy *in vitro* modellekkel végzett vizsgálatokon, vagy *in vivo*, de általában szubletális, szubkrónikus vagy krónikus 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 kimutatott biokémiai változások ugyanis csak egy folyamat végső állapotát jelzik, amelynek során egyre fokozódó mértékű károsodás, de akár adaptáció is előfordulhat.

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

Ezen túlmenően, a mikotoxinok, így a T-2 toxin és a DON, a halak, illetve a 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 hatására 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 májában rövidtávú T-2 toxin vagy DON terhelés során.

1.2 Célkitűzések

1. Vizsgálataim fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljam egyes trichotecénavázás mikotoxinok (T-2 toxin és DON) hatását a lipidperoxidációs folyamatokra, valamint a glutation redox rendszer egyes elemeinek változására, valamint azok *de novo* szintézisének szabályozására a terhelést követő első 24 órában két eltérő élettani sajátosságokkal rendelkező állatfajban, a pontyban és 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 meghatározni 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 peroxidáz enzim fehérjét 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 transzkripciósi 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.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Mikotoxinok termeltetése és a kísérletesen szennyezett takarmányok elkészítése

2.1.1 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése

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.

A brojlercsirkékkel folytatott kísérletek során ismert koncentrációban trichotecénvázas mikotoxinokat tartalmazó kukoricadarát a tervezett koncentráció eléréséhez szükséges mennyiségben kevertünk a különböző csoportok brojler nevelő teljes értékű takarmánykeverékéhez.

A pontyokkal végzett kísérlet során kereskedelmi forgalomban lévő Aqua Garant Classic™ takarmányt ledaráltuk majd a T-2 toxint vagy DON-t ismert koncentrációban tartalmazó kukoricadarával kevertük össze. Az egyes kezelési csoportok adagjait közvetlenül felhasználás előtt 1:4 arányban desztillált vízzel hígítottuk, annak érdekében, hogy az gyomorszondán keresztül adagolható legyen.

A mesterségesen szennyezett és a kontroll takarmányok DON és T-2 toxin tartalmának mérése immunaffinitás előtisztítást követően nagy felbontású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel történt.

2.2 Kísérleti protokoll és mintavételezés

2.2.1 Pontyokkal végzett vizsgálatok

A pontyokkal végzett vizsgálatok során gyomorszondán keresztül egyszeri alkalommal juttattam a kontroll vagy a mikotoxinokkal mesterségesen szennyezett takarmányt a halak emésztőcsatornájába. A kísérlet indításakor, 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* májmintát vettem a biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. A tranzitidő megfigyelése céljából metil-narancs indikátorral 1% mennyiségben kiegészített takarmányt juttattam egy külön csoport emésztőcsatornájába.

2.2.2 Brojlercsirkékkel végzett vizsgálatok

Az eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletben *ad libitum* etetéses kísérletet állítottam be 1 és 3 hetes életkorú madarakkal. A kísérlet indulásakor, 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 mintát vettem a biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz.

2.3 Biokémiai módszerek

A malondialdehid (MDA) koncentrációt a máj natív homogenizátumában mértem Matkovic et al. (1988) által módosított Placer et al. (1966) által leírt módszer szerint. A redukált glutation-koncentrációt (GSH) a májból készített 1:9 homogenizátum 10.000 szupernatans frakciójában mértem Sedlak és Lindsay (1968) módszerével. A glutation-peroxidáz (E.C. 1.11.1.9) (GPx) aktivitását a máj 1:9 homogenizátum 10.000 g szupernatans frakciójában mértem Matkovic et al. (1988) módszere szerint. A 10.000 g szupernatans frakció fehérjetartalmát pedig annak a Folin-fenol reagenssel adott színreakciója alapján mértem (Lowry et al., 1951), ahol szarvasmarha szérum albumin szolgált standardként.

2.4 Génexpressziós vizsgálatok

2.4.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció

A kísérleti állatok májmintáiból, 5 mg szövetből Trizol reagenssel teljes RNS-t tisztítottam, a gyártó előírásai szerint. Az RNS koncentrációját, tisztaságát és integritását ellenőriztem, ahol az OD 260/280 mutató esetén a 2.0 érték feletti mintákat fogadtam el. A genomi DNS szennyeződést DNáz kezeléssel távolítottam el, a gyártó leírása alapján. Mintánként 1000 ng RNS-ből random nonamerrel (9-mer) reverz transzkripció során cDNS-t hoztam létre mindkét vizsgált állatfaj esetén. A cDNS-ből kezelési csoportonként poolokat hoztam létre, egyedenként egyenlő mennyiségű cDNS-ből, amelyből a qPCR méréseket végeztem.

2.4.2 Real-time PCR vizsgálatok pontyban

Az *Nrf2*, *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 méréseket Step One Plus™ Real-Time PCR systems készülékkel végeztem, Maxima SYBRGreen qPCR Master Mix felhasználásával, 5 ismétlésben. A qPCR hőmérsékleti profil a *Gpx4a* és *Gpx4b* génekre: 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95°C 15 sec, 55°C 30 sec és 72°C 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.

2.4.3 Real-time PCR vizsgálatok házityúkban

A *Gpx4*, a *Gss* és a *Gsr* célgének valamint a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*Gapdh*) belső kontroll gén expresszióját kvantitatív, real-time PCR-rel vizsgáltam, duplex qPCR módszerrel. A célgénekre és a háztartási génre tervezett specifikus primerek és eltérő fluoreszcens festékekkel jelölt dual labelled (MGB-NFQ) TaqMan próbák lehetővé tették a két géntermék egyidejű vizsgálatát. A méréseket Step One Plus™ Real-Time PCR systems készülékkel végeztem, Maxima Probe qPCR Master Mix felhasználásával, 5 ismétlésben. 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.

2.4.4 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 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).

2.5 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 dózisok és az idő együttes hatását vizsgáltam a paraméterekben. Ennek eredményeképpen megállapítható, hogy az időnek (H) és a kezelésnek (T), illetve a két tényezőnek együttesen (TxH) van e szignifikáns hatása az egyes paraméterekben bekövetkező változásokra.

3 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

3.1 Pontyokkal végzett kísérletek

A tranzitidőt a metilnarancssal színezett takarmány bejuttatásától a színes ürülék első megjelenéséig eltelt idő alapján határoztam meg mikotoxin terhelésben nem részesült állatokban.

Az egynyaras pontyokkal végzett kísérletben a 19 ± 1 °C vízhőmérsékleten a takarmány tranzitideje 16 óra volt.

A vizsgálatban résztvevő pontyok esetében a takarmányt egyszeri alkalommal, gyomorszonda segítségével juttattam a halak emésztőcsatornájába, ezáltal a tranzitidő meghatározza a mikotoxinok biológiai elérhetőségének idejét is, ugyanis közvetőlegesen ez az időtartam áll rendelkezésre azok felszívódására a bélcsatornából, mivel ezt követően nem történt további takarmány felvétel. Ennek alapján feltételeztem, hogy a tranzitidő hossza összefüggést mutat a mikotoxin terhelés hatására kialakuló biokémiai és génexpressziós változások idejével.

3.1.1 A rövidtávú T-2 toxin terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése

1. táblázat A kísérlet során alkalmazott T-2 toxin dózisosok 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

Ponty fajra a szakirodalomban nem áll rendelkezésre LD₅₀ érték a T-2 toxinra vonatkozóan. Ennek alapján olyan dózisosokat választottam, amelyek más állatfajok esetében már bizonyítottan toxikusnak tekinthetők, melyeket az 1. táblázatban tüntettem fel.

A legnagyobb alkalmazott dózis esetén 19%-os mortalitást tapasztaltam a kezelést követő 8. és 16. óra között. Szakirodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a T-2 toxin halakban is a leginkább toxikus trichotecénvázas mikotoxin, amelyet saját korábbi vizsgálataim eredményei is megerősítettek.

A lipidperoxidációs paraméterekben T-2 toxin hatására csak kismértékű eltérést tapasztaltam a kontroll csoporthoz viszonyítva, annak mind 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, a CT, valamint az MDA értékek esetében is a 8. és 16. órában. Ennek alapján levonható az a következtetés, hogy a T-2 toxin, az általam alkalmazott dózistartományban csak mérsékelten növelte a lipidperoxidációs folyamatok intenzitását a vizsgálat 24 órája alatt.

Az antioxidáns rendszer a T-2 toxin hatására gyorsan aktiválódott, amelyet az bizonyított, hogy a 16. órában nagymértékű emelkedést tapasztaltam mindhárom kezelt csoportban, mind a GPx aktivitásban, mind pedig a GSH tartalomban. Fontos kiemelni azt is, hogy eredményeim alapján nem csak a dózis nagyságának, de a kezeléstől eltelt időnek, illetve ezen két paraméternek együttes hatása is kimutatható volt minden kísérleti csoportban. A kitettség megszűnésével (16 órás tranzitidő), a 24. órára, ugyanakkor a glutation redox rendszer mennyisége/aktivitása visszatért a kontroll szintre.

Az eredmények tükrében 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 volt kimutatható. Eredményeim azonban csak közvetve vethetőek össze más, pontyokkal végzett, kísérletek eredményeivel, mivel hasonló paramétereket eddig csak hosszabb távú, szubkrónikus, expozíciót követően vizsgáltak.

A 24 órás kísérleti időszak első 16 órája kulcsfontosságúnak bizonyult, amely feltevésem szerint összefügg a takarmány tranzitidejével, az ugyanis meghatározza a mikotoxin felszívódására rendelkezésre álló időt. 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, jellemzően visszatértek a kontroll szintre.

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. 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 az *Nrf2* génexpressziója csökkent a 16. órában a kontrollhoz képest. A 24. órában a *Keap1* esetén a T2 és T3 csoportokban, míg az *Nrf2* esetén 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. A halakban kiemelkedően fontos antioxidáns szereppel bíró foszfolipid hidroperoxid glutation peroxidáz gének (*Gpx4a* és *Gpx4b*) esetében az idő függvényében eltérő változásokat tapasztaltam. A *Gpx4a* esetén a 8. órában a génexpresszió emelkedését, míg a *Gpx4b* esetén csökkenését, a 24. órában viszont mindkét gén expresszió indukcióját észleltem a kontrollhoz viszonyítva, ami a *Gpx4a* esetén dózisfüggő tendenciát is mutatott, és a legnagyobb dózis esetén kiemelkedően nagymértékű volt. A *Gpx4b* vizsgálati paraméter esetében azt is fontosnak tartom kiemelni, hogy 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 útvonálnak a mikotoxinok hatására bekövetkező ROS képződés által kiváltott aktivációjával, vagy éppen gátlásával.

A szakirodalomban jelenleg kevés T-2 toxinnal 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 fokozottan növekvő mortalitást tapasztaltam, ugyanakkor az oxidatív stresszel összefüggő korábban mások által leírt változások, mivel azok hosszú távú terhelés hatására következtek be, a jelen kísérletemben leírt rövidtávú hatásokkal közvetlenül nem vethetőek össze.

A T-2 toxinnal egyszeri, gyomorszondán keresztül történt terhelés során az eltérő dózisú 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, ugyanis nem csak a kezelt, de 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.

Ebben a kísérletben a kezelés x idő együttes hatását több esetben statisztikailag is sikerült 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 a T-2 toxinnal kapcsolatban, így például egyes humán sejtvonalakban.

3.1.2 A rövidtávú DON terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése

Ponty fajra a szakirodalomban nem áll rendelkezésre LD₅₀ érték a DON mikotoxinra vonatkozóan. Ennek alapján olyan dózisokat választottam, amelyek más állatfajok esetében már bizonyítottan toxikusnak tekinthetők, amelyeket a 2. táblázatban tüntettem fel.

2. táblázat A kísérlet során alkalmazott DON 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

A kísérlet 24 órás időtartama alatt mortalitást egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam, amelynek hátterében a DON más trichotecénvázas mikotoxinokhoz, így a T-2 toxinhoz viszonyított kisebb toxicitása állhat.

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 és CT érték, továbbá az MDA koncentrációja 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 DON hatására lipidperoxidációs folyamatok indukálódtak, annak iniciációs és terminációs szakasza egyaránt, amelynek hátterében a DON által indukált ROS képződés állhat. Ezen paraméterek esetén viszont a változások a T-2 toxin terhelés hatására csak kisebb mértékben, és csak tendenciaszerűen jelentkeztek.

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 dózisonál a GPx aktivitásban és a GSH tartalomban. 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.

A biokémiai változások szempontjából, a T-2 toxinhoz hasonlóan, a 24 órás kísérleti időszak első 16 órája bizonyult kulcsfontosságúnak, amely összefüggésben állhat a tranzitidő hosszával. Ezt támasztja alá az a megfigyelésem is, 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.

A Keap1-Nrf2 útvonalban szerepet játszó fehérjék génexpresszióját szintén befolyásolta a DON terhelés. A *Keap1* 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 8. órában csökkent a D1 csoportban, majd ezt követően 16. órában emelkedett a D1 és D2, ami a 24. órában már csak a D2 csoportban volt kimutatható. A D3 csoportban ugyanakkor a kísérlet 24 órája alatt csak kismértékű eltérések voltak kimutathatóak. Az *Nrf2* 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, dóziszfüggő 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. A *Keap1* és *Nrf2* gének expressziója esetén, tehát a T-2 toxinhoz hasonlóan kettős változásokat tapasztaltam, azonban eltérő tendenciában, amelyek azonban nem mutattak egyértelmű összefüggést sem a dózissal sem az idővel, egyik mikotoxin esetében sem. A *Gpx4a* és *Gpx4b* expressziója kezdeti gátlást követően, a kontrollhoz képest emelkedést mutatott, amely a T-2 toxinhoz hasonlóan elnyújtottan, csak a 16. órában történt mintavételt követően jelentkezett, azonban a legtöbb esetben azonban az emelkedés mértéke a kontrollhoz képest csak tendenciaszerű volt.

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, ugyanakkor az oxidatív stresszel összefüggő korábban, mások által leírt változások, mivel azok hosszú távú terhelés hatására következtek be, a jelen kísérletemben leírt rövidtávú hatásokkal közvetlenül nem vehetőek össze.

DON hatására a kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között szignifikáns eltéréseket tapasztaltam a lipidperoxidációs folyamatok markerei, a glutation redox rendszer egyes elemeinek 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, amelyek feltehető okára vonatkozóan korábban már utaltam.

Ebben a kísérletben statisztikailag a kezelés x idő hatását is alátámasztottam a legtöbb paraméter esetében, amely azt jelzi, hogy nem csak az alkalmazott dózissal, hanem a kezeléstől eltelt időnek is kulcsfontosságú szerepe van a kialakuló hatásokban, valamint azok mértékében. *In vitro* modellekben, sejtvonalakkal végzett vizsgálat során is leírtak már korábban, a DON-al kapcsolatban, nem csak dózis-, de egyidejűleg időfüggő változásokat is.

3.2 Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletek

A tranzitidőt a metilnarancssal színezett takarmány etetésétől a színes ürülék megjelenéséig számított idő alapján határoztam meg, mikotoxin terhelésben nem részesült állatokban, mindkét korcsoportban. Az egy hetes brojlercsirkékkel végzett kísérletben a takarmány bélcsatornán való áthaladásának ideje 5 óra 45 perc, a három hetes brojlercsirkékkel végzett kísérletben is szinte azonos, 5 óra 40 perc volt.

A kísérlet során a madarak a teljes időszak (24 óra) alatt *ad libitum*, folyamatosan fogyaszthatták a T-2 toxinnal vagy DON-nal mesterségesen szennyezett vagy kontroll takarmányt. A takarmányfelvétel napi ritmusa, valamint a tranzitidő egyaránt összefüggésben állhat a T-2 toxin vagy DON terhelés hatására kialakuló első 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 génexpressziós változásokkal. Ez a hatás leginkább a mikotoxinnal szennyezett takarmány első felvételét követő időszakban először megjelenő válaszokban nyilvánulhat meg, a továbbiakban azt ugyanis a takarmányfelvétel napi ritmusa már elfedheti.

Az eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletekben alkalmazott mikotoxin dózisok a 3. táblázatban láthatóak.

3. táblázat Eltérő életkorú brojlercsirkékkel végzett kísérletekben alkalmazott mikotoxin dózisok

Mennyiség a takarmányban (mg/kg takarmány)		
Kontroll	T-2 toxin	DON
T-2 < 0,02; DON < 0,02	5,77	4,86
1 hetes állatok (mg/testtömeg kg)		
Kontroll	T-2 toxin	DON
T-2 < 0,02; DON < 0,02 (mg/kg takarmány)	1,35	1,75
3 hetes állatok (mg/testtömeg kg)		
Kontroll	T-2 toxin	DON
T-2 < 0,02; DON < 0,02 (mg/kg takarmány)	0,77	1,29

3.2.1 A rövidtávú T-2 toxin terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése 1 hetes állatok esetén

A kísérlet során az alkalmazott dózis mellett elhullást nem tapasztaltam, amelyet egy hasonló dózissal végzett korábbi rövidtávú etetési kísérletben is tapasztaltunk. A trichotecénvázis mikotoxinokra a baromfifajok, 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.

A trichotecénvázis 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, az MDA tartalom azonban nem változott a kísérlet 24 óras időtartama alatt. A glutation redox rendszer viszont aktiválódott, amelyet az bizonyít, hogy a kísérleti időszak első 8 órájában szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a GSH tartalomban és a GPx aktivitásban 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* génexpressziója előbb, a 8. óráig emelkedett, majd a kontroll szint alá csökkent. Ehhez hasonló változásokat mutatott a *Gss* expressziója is, amely a 8. óráig meghaladta, majd azt követően alatta maradt a kontroll csoport értékeinek, ami a 24. órában már szignifikáns mértékű volt. Ezt a kettős hatást a *Gsr* esetében is tapasztaltam, ami kezdeti, a 4. órára, emelkedésben, majd ezt követően, a 16. órára, csökkenésben nyilvánult meg.

Összefoglalva elmondható, hogy 1 hetes csirkékben T-2 toxin terhelés hatására kismértékben fokozódtak a lipidperoxidációs folyamatok, a glutation redox rendszer rövid időn belül aktiválódott, majd visszatért a kontroll szintre. Szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam a génexpressziós értékekben is, amely valamennyi vizsgált gén esetén hasonló tendenciát mutatott. A kezdeti expresszió növekedést, a 8. órától csökkent mértékű expresszió követte, ami ezt követően alacsony szinten is maradt. Folyamatos toxin terhelésnél hosszú távon ez feltételezhetően a gének által kódolt enzimek csökkent mennyiségét/aktivitását eredményezi, ami különböző „feedback” mechanizmusokon keresztül visszahathat a gének expressziójára is.

Brojlercsirkéknél számos adattal rendelkezünk a trichotecénvázis mikotoxinokkal, így a T-2 toxinnal összefüggő lipidperoxidációs hatásokról, de jellemzően csak szubkrónikus expozíciót követően. Korábbi vizsgálatokban megállapították, hogy T-2 toxin terhelés hatására *in vivo* brojlercsirkékben hosszú- és rövidtávon, valamint *in vitro*, primer hepatocitákban, 48 óra alatt fokozódott a ROS termelés, amely aktiválta az enzimátikus antioxidáns rendszert mind génexpresszió, mind pedig fehérje szinten, amely alátámasztja az általam leírt, 24 óras periódus során, megfigyelt eredményeket.

A legtöbb általam vizsgált paraméterben 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. Fontosnak tartom azonban kiemelni, hogy a vizsgálatban alkalmazott folyamatos megvilágítás a természetes cirkadian ritmust megzavarhatta az antioxidáns rendszer egyes elemeiben mind fehérje, mind pedig mRNS szinten, mivel azonban minden csoport azonos környezeti hatásoknak volt kitéve, ezért az egyes csoportok közötti különbség megfelelően vizsgálható volt.

Korábbi tanulmányokban, baromfifélékben, T-2 toxin hatására, mind dózis-, mind időfüggő, változásokat tapasztaltak az antioxidáns rendszer elemeiben.

3.2.2 A rövidtávú T-2 toxin terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése 3 hetes állatok esetén

A kísérlet során 0,77 mg T-2 toxin/kg testtömeg dózis mellett, elhullást nem, 12,77%-os takarmány-visszautasítást viszont tapasztaltam, hasonlóan az 1 hetes állatokhoz, amelyet korábbi hasonló dózissal végzett rövidtávú etetési vizsgálatok is alátámasztanak. A trichotecénvázis mikotoxinokra a házityúk ugyan kevésbé érzékeny, de a T-2 toxint tekintik ezek közül a leginkább toxikusnak.

T-2 toxin terhelés hatására a 3 hetes madarak májában a lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA kismértékben már a 8. órában emelkedett, a CD és 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.

A glutation redox rendszer T-2 toxin hatására aktiválódott, amelyet az bizonyít, hogy a kísérlet első 8 órájában szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a GSH tartalomban és a GPx aktivitásban, ami viszont a későbbiekben visszatért a kontroll szintre, majd a 20. óránál lehetett ismét szignifikáns mértékű emelkedést kimutatni, ami viszont az 1 hetes állatoknál nem jelentkezett.

A glutation redox rendszer szabályozásában T-2 toxin terhelés hatására szintén szignifikáns mértékű változások következtek be. A *Gpx4* génexpressziója ugyan nem változott jelentős mértékben, a *Gss* génexpressziójának tendenciája viszont folyamatos emelkedést mutatott, ami a 12., 20. és 24. órában már szignifikáns mértékű volt a kontrollhoz viszonyítva, ami viszont az 1 hetes állatoknál tapasztaltakhoz képest ellentétes tendencia. A *Gsr* expressziójában a kísérlet 16. és 24 órájában csökkenést mértem. A *Gsr* esetében szintén eltérő változások voltak a két vizsgált korcsoportban, mivel az 1 hetes állatokban kettős választ tapasztaltam, míg a 3 hetes állatoknál az expresszió mértéke a T-2 toxin hatására csökkent.

Korábbi vizsgálatokban, és más állatfajoknál is, megfigyelték, hogy a kísérleti állatok életkora befolyásolja a ROS képződés mértékét, valamint egyes fehérjék szintézisét is.

Korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy T-2 toxin terhelés hatására fokozódott a ROS képződés, amely következményesen aktiválta az enzimikus antioxidáns védőrendszert úgy génexpresszió, mint fehérje szinten, amelyet a korábbiakban részletesen kifejtettem.

A legtöbb általam vizsgált paraméter tekintetében szignifikáns eltéréseket tapasztaltam továbbá a kísérleti csoportokon belül is az egyes mintavételi időpontok között. A cirkadián ritmus változásának hatását az antioxidáns rendszerre korábban már szintén részletesen tárgyaltam.

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, amit a korábbiakban már részletesen ismertettem.

3.2.3 A rövidtávú DON terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése 1 hetes állatok esetén

A kísérlet során takarmány-visszaautasítást vagy elhullást nem tapasztaltam az alkalmazott 1,75 mg/ kg testtömeg dózis mellett, hasonlóan más, hasonló dózistartományban végzett rövidtávú etetési vizsgálatok eredményeihez. Amint arra a korábbiakban már utaltam a trichotecénaváz mikotoxinokra a baromfifajok, azon belül a házityúk, csak kevésbé érzékenyek, emellett a DON, a T-2 toxinhoz viszonyítva, kevésbé toxikus.

DON terhelés hatására 1 hetes madarak májában, a T-2 toxinhoz hasonlóan, a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző konjugált diének és triének, valamint a terminációs szakasz markere, az MDA tartalom, sem változott szignifikáns mértékben a vizsgált 24 órás periódus alatt. A glutation redox rendszerben szintén nem tapasztaltam szignifikáns mértékű változásokat a 24 órás DON expozíció alatt, ami viszont a toxikusabb T-2 toxin hatására, mindkét vizsgált korcsoportban, indukálódott. A glutation redox rendszer szabályozásában azonban szignifikáns változások következtek be a DON terhelés hatására is. A *Gpx4* génexpressziója a szennyezett takarmány felvételét követően emelkedett, a 8. órában már szignifikáns mértékben eltért a kontrolltól, majd a kontroll szintre csökkent, ami 1 hetes madaraknál megegyezett a T-2 toxinnal tapasztaltakkal. Ezzel szemben a *Gss* génexpresszió tendenciájában csökkenést tapasztaltam, amely szignifikáns mértékű volt a 8., 16. 20. és 24. órában, míg ezzel ellentétes, emelkedő értéket, csak a 12. órában mértem, tehát a hatás kettős volt, de a csökkenés dominánsabb volt. A *Gsr* génexpressziója esetén szintén kettős hatást tapasztaltam, a 4. és 12. órában emelkedést, majd ezt követően, a 16. órában, csökkenést.

Brojlercsirkéknél már számos adattal rendelkezünk a trichotecénaváz mikotoxinokkal, elsősorban a T-2 toxinnal, összefüggő lipidperoxidációs hatásokról, de jellemzően szubkrónikus expozíciót követően. Más vizsgálatok során viszont azt is megállapították, hogy brojlercsirkék vékonybelében oxidatív stressz alakul ki DON-nal szennyezett takarmány felvételét követően, amelynek hátterében a hemoxigenáz és a xantin-oxidoreduktáz enzimek génexpressziójának indukciója állhat. A szakirodalomban azonban ellentmondó adatok is találhatóak a DON terhelés és a ROS képződés összefüggésére vonatkozóan, és ezen tanulmányok főképp csak DNS károsodást állapítottak meg.

A máj vizsgálata alapján összefoglalva elmondható, hogy 1 hetes brojlercsirkék kevésbé érzékenyen reagáltak a DON terhelésre a lipidperoxidációs folyamatok és a glutation redox rendszer markereinek tekintetében, ugyanakkor szignifikáns különbségeket mutattam ki a génexpressziós változásokban. Fontosnak tartom azt is kiemelni, hogy a *Gss* gén esetében a génexpresszió tendenciájában jellemzően csökkenést figyeltem meg a vizsgált 24 órás periódus alatt, amely hasonló volt a T-2 toxin esetében megfigyelt tendenciához az egy hetes állatoknál.

A legtöbb paraméternél szignifikáns eltéréseket tapasztaltam az egyes csoportokon belül is a mintavételi időpontok között. Csirke agyban korábban bizonyították, hogy a cirkadián ritmus befolyásolja a GPx aktivitását és a GSH mennyiségét, amelyet korábban már részletesen kifejtettem. Amint arra brojlercsirkékkel végzett kísérleteim kapcsán már utaltam, a vizsgálat során alkalmazott folyamatos megvilágítás eltért a természetes nappali-éjszakai órák számától, mivel azonban minden csoport azonos környezeti hatásoknak volt kitéve, ezért az egyes csoportok közötti különbség megfelelően vizsgálható volt, bár a természetes cirkadián ritmust ez bizonyosan megzavarta.

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 azonban statisztikailag ezt nem tudtam alátámasztani. Megjegyzendő, hogy ezen paraméterek esetében a DON önálló hatását sem lehetett kimutatni.

3.2.4 A rövidtávú DON terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése 3 hetes állatok esetén

A kísérlet alatt, 1,29 mg/ kg testtömeg dózis mellett, elhullást nem tapasztaltam, amelyet más, etetéses vizsgálatok eredményei is alátámasztanak. Ennek oka feltehetően az, hogy a trichotecénvázis mikotoxinokra, kiemelten a DON-ra, a házityúk kevésbé érzékeny.

DON terhelés hatására a 3 hetes madarak májában a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CD és 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 viszont ezen paraméterekben nem tapasztaltam szignifikáns mértékű változást. Ennek háttérében az egységnyi testtömegre számított DON toxinfelvétel mértéke, valamint a takarmányfelvétel napi aktivitásában fennálló különbségek, továbbá az antioxidáns rendszer eltérő mértékű aktivitása állhatnak. Emiatt feltehető, hogy a két korcsoport toxinterhelése, emiatt a ROS képződés mértéke is eltérő lehet.

A glutation redox rendszerben fehérje/tripeptid szinten nem tapasztaltam változásokat a 24 órás DON expozíció alatt, hasonlóan az 1 hetes állatoknál kapott értékekkel, ugyanakkor ellentétben a T-2 toxinnál tapasztaltakkal, amelynek háttérében a DON kisebb toxicitása állhat.

A glutation redox rendszer szabályozásában ugyanakkor DON terhelés hatására szignifikáns mértékű változások következtek be. A *Gpx4* génexpressziója a 20. órában DON hatására szignifikáns mértékben nőtt, hasonlóan az egy hetes állatoknál tapasztaltakhoz, azonban ez a fiatal madarakban már korábban, a 8. órában, bekövetkezett. A *Gss* expresszió tendenciájában is folyamatos emelkedést tapasztaltam, a 24. órás vizsgálati időszak első 20 órájában, amelynek mértéke DON terhelés hatására szignifikáns volt a kontrollhoz viszonyítva 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 a DON esetében is. A *Gsr* esetében kettős hatást tapasztaltam, a génexpresszió a 16. óráig csökkent, a 12. és 16. órában a kontrollhoz képest már szignifikáns mértékben, majd ezt követően, a 20. órára emelkedett. A *Gsr* esetében ez a kettős hatás mindkét korcsoportra, és mindkét általam vizsgált mikotoxinra, jellemző volt, de a változások tendenciája és annak mértéke eltért. Az életkorral összefüggő különbségek háttérében az eltérő aktivitású/mennyiségű és génexpressziójú antioxidáns rendszer állhat, amelyet már a korábbiakban is részletesen ismertettem.

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 főképp csak a génexpressziós változásokban voltak kimutathatók. Fontosnak tartom azt is kiemelni, hogy a lipidperoxidációs folyamatok markereinek értékei nem emelkedtek, hanem többnyire változatlanok maradtak, vagy csökkentek a kontroll értékekhez viszonyítva, melynek háttérében a DON terhelés által kismértékben indukált antioxidáns rendszer állhat. A *Gss* expressziója tendenciaszerűen és folyamatosan emelkedett, míg a *Gsr* esetében kettős hatás volt megfigyelhető.

A legtöbb általam vizsgált paraméter esetében szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam a kísérleti csoportokon belül az egyes mintavételi időpontok között, amelynek a cirkadián ritmussal való összefüggését a korábbiakban már ismertettem.

A DON hatására a lipidperoxidációs paraméterek és az egyes vizsgált gének expressziójának mértéke többségében szignifikáns mértékben eltérő volt a kezelés x idő összefüggésében, a glutation redox rendszer esetén azonban ezt statisztikailag nem tudtam alátámasztani, igaz, hogy ezekben a paraméterekben a DON önálló hatását sem tudtam egyértelműen bizonyítani az alkalmazott dózisok mellett.

4 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.

.

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 Következtetések

Vizsgálataim elsődleges célja az volt, hogy felmérjem T-2 toxin vagy 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 eltérő életkorú brojlercsirkék esetén, 24 órás időszak alatt, amelynek során az egyes paraméterekben kimutatható időbeli változásokat is nyomon tudtam követni. Célom volt továbbá felmérni a vizsgált állatfajokban a takarmányrészek bélcsatornán való áthaladásának tranzitidejét is, amely a mikotoxinok bélcsatornából való felszívódására rendelkezésre álló idő miatt összefüggésben állhat az először megjelenő válaszreakciók bekövetkezésének idejével és azok mértékével.

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

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 a glutation-peroxidáz (GPx) aktivitását, valamint a redukált glutation (GSH) 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 takarmányértékesítés mellett. Ennek révén napjainkban a brojlercsirkék metabolizmusa rendkívül intenzív. A ponty ezzel szemben kevésbé szélsőségesen nemesített, változó testhőmérsékletű állatfaj, amelyek metabolikus aktivitását elsődlegesen a környezeti hőmérséklet befolyásolja.

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

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 alkalmazott 4,86 mg/kg takarmány szennyezettségi szint csak szélsőséges esetekben fordulhat elő. A pontyoknál alkalmazott T-2 dózisok pedig 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 még a gyakorlatban is előfordulhat.

Jól ismert, hogy a brojlercsirkék kevésbé érzékenyek a trichotecénvázis mikotoxinok iránt, és a domesztikált baromfifélék között is ez a legkevésbé érzékeny állatfaj. Halakra vonatkozóan ugyanakkor csak kevés adat áll rendelkezésünkre az egyes mikotoxinok iránti érzékenység vonatkozásában. A ponty általánosságban közepesen érzékeny fajnak tekinthető, azonban csak rendkívül kevés adat áll rendelkezésre a trichotecénvázis mikotoxinokra vonatkozóan.

Az általam alkalmazott dózisok hatására elhullást csak a legnagyobb T-2 toxinnal terhelt csoportban tapasztaltam a pontyoknál, ami 19% volt. Brojlercsirkék esetén elhullás nem volt, a T-2 toxin hatására azonban 10%-ot meghaladó mértékű takarmány-visszautasítás jelentkezett mindkét vizsgált korcsoportban. 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 kevésbé reaktív metabolitok keletkeznek.

Annak ellenére, hogy a ROS képződés mértéke eltérő volt, a glutation redox rendszer általam vizsgált paramétereiben mindkét mikotoxin minden alkalmazott dózisának 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 expozíció 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 releváns 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 trichotecénvázis 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 a glutation redox rendszer aktivációját indukálná. A génexpressziós eredmények alapján ugyanakkor levonható az a következtetés, hogy a DON által indukált ROS képződés már elérte azt a küszöb értéket, ami indukálja a glutation redox rendszer szabályozásában résztvevő gének expresszióját. 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 génexpresszió mértékében kettős hatást tapasztaltam, ezek tendenciája azonban eltérő volt mind a korcsoportok, mind az alkalmazott mikotoxin expozíciók esetén.

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 követésére. A génexpressziós változásokban kimutatott eltérések 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 fehérje szinten még nem, de mRNS szinten már kimutatható.

5.2 Javaslato

Az utóbbi években a szakirodalomban illetve az adatbázisokban már minden vizsgált gén szekvenciája mindkét általam vizsgált állatfajra vonatkozóan elérhető, ami kutatásaim kezdetekor még nem volt teljes mértékben ismert. Ennek alapján javaslom eddigi eredményeimre alapozva a kutatások folytatását akár új cél génekkel 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 antagonista 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 információhoz juthatunk arra vonatkozóan, hogy mely természetes hatóanyagokkal támogatható az állatok szervezete a mikotoxinok káros hatásaival szemben.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Tudományos közlemények folyóiratban:

Bócsai A, **Pelyhe C**, Zándoki E, Ancsin Z, Szabó-Fodor J, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K: Short-term effects of T-2 toxin exposure on some lipid peroxide and glutathione redox parameters of broiler chickens, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100:(3) pp. 520-525. (2016)

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Kovács B, Szabó-Fodor J, Mézes M, Balogh K: Short-term effects of t-2 toxin or deoxynivalenol on lipid peroxidation and the glutathione system in common carp, *Acta Veterinaria Hungarica* 64:(4) pp. 449-466. (2016)

Balogh K, Bócsai A, **Pelyhe C**, Zándoki E, Erdélyi M, Szabó-Fodor J, Mézes M: 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, *Journal of Poultry Science* 52:(3) pp. 176-182. (2015)

Tudományos folyóiratban megjelent konferencia absztraktok:

Balogh K, **Pelyhe C**, Zándoki E, Szabó-Fodor J, Mézes M: Effects of single oral doses of trichothecene mycotoxins on young common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Toxicology Letters* 238:(2S) p. S282. (2015) EUROTOX 2015. Porto, Portugália: 2015.09.13 -2015.09.16.

Pelyhe C, Kövesi B, Kovács B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Effects of trichothecene mycotoxins on gene expression and activity of glutathione redox system in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Frontiers In Marine Science*, (DOI: 10.3389/conf.FMARS.2015.03.00028) XV European Congress of Ichthyology, Porto, Portugal.

Konferenciakiadványban megjelent közlemények

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Kovács B, Mézes M, Balogh K: Trichotecénaváz mikotoxin terhelés hatása pontyok (*Cyprinus carpio* L.) glutation redox paramétereire és annak szabályozására. In: Mézes Miklós (szerk.) Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság IX. Kongresszusa és az MTA ÉKB Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2017.08.25-2017.08.26. Gödöllő: SZIE, 2017. p. 29. (ISBN: 978-963-269-666-9)

Pelyhe C, Kovács B, Zándoki B, Mézes M, Balogh K: Effects of short-term exposure of T-2 toxin and deoxynivalenol on gene expression and activity of the members of the glutathione redox system in broiler chicken In: 37th Mycotoxin Workshop: Conference Abstracts. 164 p. Konferencia helye, ideje: Bratislava, Szlovákia, 2015.06.01-2015.06.03. Paper P81. 1 p.

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Eltérő dózisu trichotecénaváz mikotoxin terhelés hatása pontyok (*Cyprinus carpio* L.) lipidperoxidációs és glutation redox paramétereire In: Pannon Egyetem Georgikon Kar Állattudományi és Állattenyésztési Tanszék (szerk.) XXI. Ifjúsági Tudományos Fórum. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2015.05.21 (Pannon Egyetem Georgikon Kar) Veszprém: Pannon Egyetem, 2015. Paper 03. 6 p. (ISBN: 978-963-9639-78-2) CD kiadvány

Kövesi B, **Pelyhe C**, Kovács B, Mézes M, Balogh K: T-2 toxin és deoxinivalenol terhelés rövidtávú hatása a gpx4 gén expressziójára ponty fajban (*Cyprinus carpio*) In: Darvas Béla, Bakonyi Gábor, Biró Borbála, Major Jenő, Mörtl Mária, Vehovszky Ágnes (szerk.) V. Ökotoxikológiai Konferencia: előadás és poszter kötete, 46 p. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2015.11.20 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2015. pp. 21-22. (ISBN: 978-963-89452-5-9)

Pelyhe C, Kovács B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Rövid távú T-2 toxin és deoxinivalenol terhelés hatásai brojler csirkék glutation redox paramétereire In: Pannon Egyetem Georgikon Kar Állattudományi és Állattenyésztéstani Tanszék (szerk.) XXI. Ifjúsági Tudományos Fórum Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2015.05.21 (Pannon Egyetem Georgikon Kar) Veszprém: Pannon Egyetem, 2015. Paper 04. 6 p. (ISBN: 978-963-9639-78-2) CD kiadvány

Pelyhe C, Kovács B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Trichotecénvázas mikotoxinokkal szennyezett takarmány rövidtávú etetésének hatása brojlercsirkék lipidperoxidációs és glutation redox paramétereire Mennyiségi/aktivitási és génexpressziós változások In: Nagy Zita Barbara (szerk.) 57. Georgikon napok. Kivonat-kötet. Programfüzet, valamint az elhangzó és poszter előadások rövid kivonatainak gyűjteménye. [57th Georgikon Scientific Conference.]. 132 p. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2015.10.01-2015.10.02. Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Kar, 2015. p. 91. (ISBN: 978-963-9639-81-2)

Pelyhe C, Bócsai A, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Age-dependent effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on some lipid peroxide and antioxidant parameters in chicken In: Bene Szabolcs (szerk.) 20th Youth Scientific Forum: University of Pannonia Georgikon Faculty. 600 p. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2014.05.23-2014.05.24. Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, 2014. pp. 349-364. (ISBN: 978-963-9639-57-7)

Pelyhe C, Bócsai A, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Effect of feed-borne trichothecene mycotoxins on the lipid peroxidation processes and the glutathione redox system of common carps (*Cyprinus carpio*) In: Bene Szabolcs (szerk.) 20th Youth Scientific Forum: University of Pannonia Georgikon Faculty. 600 p. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2014.05.23-2014.05.24. Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, 2014. pp. 335-348. (ISBN: 978-963-9639-57-7)

Pelyhe C, Balogh K, Zándoki E, Bakti G, Mézes M: Eltérő dózisu T-2 toxin terhelés hatása brojlercsirkék bizonyos szöveteinek lipidperoxidációs és glutation redox paramétereire In: Pannon Egyetem Georgikon Kar (szerk.) XIX. Ifjúsági Tudományos Fórum. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2013.04.25 Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, 2013. Paper 9. (ISBN: 978-963-9639-51-5)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Tudományos közlemények folyóiratban

Kövesi B, Balogh K, **Pelyhe C**, Mézes M: A szterigmatocisztin mikotoxin toxikus hatásai az állati szervezetre: Toxic effects of sterigmatocystin in animals, Magyar Állatorvosok Lapja 139:(7) pp. 427-432. (2017)

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Kovács B, Szabó-Fodor J, Mézes M, Balogh K: 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.), Mycotoxin Research 32:(2) pp. 77-83. (2016)

Pelyhe C, Mézes M: Myths and facts about the effects of nanoselenium in farm animals – mini-review, European Chemical Bulletin 2:(12) pp. 1049-1052. (2013)

Konferenciakiadványban megjelent közlemények

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Kovács B, Balogh K: Multi-mycotoxin effects on the regulation of the glutathione-redox system in broiler chicken Konferencia helye, ideje: Bydgoszcz, Lengyelország, 2017.06.19-2017.06.21. 2017. 134 p. 39th Mycotoxin Workshop (ISBN: 978-83-946861-3-0)

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B: Multi-mycotoxin effects on the regulation of the glutathione-redox system in common carp (*Cyprinus carpio* L.) Konferencia helye, ideje: Bydgoszcz, Lengyelország, 2017.06.19-2017.06.21. 2017. p. 135. 39th Mycotoxin Workshop (ISBN: 978-83-946861-3-0)

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Kovács B, Balogh K: Multi-mycotoxin effects on the regulation of the glutathione-redox system in broiler chicken. 134 p. Konferencia helye, ideje: Bydgoszcz, Lengyelország, 2017.06.19-2017.06.21. 2017. p. 135. 39th Mycotoxin Workshop (ISBN: 978-83-946861-3-0)

Kövesi B, **Pelyhe C**, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Rövidtávú aflatoxin terhelés hatása pontyok májának lipidperoxid és antioxidáns státuszára In: Bene Szabolcs (szerk.) XXIII. Ifjúsági Tudományos Fórum. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2017.05.26 Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Kar, 2017. pp. 1-6. (ISBN: 978-963-9639-87-4)

Kövesi B, **Pelyhe C**, Zándoki E, Balogh K, Mézes M: Aflatoxin B1 hatása a ponty antioxidáns védőrendszerének szabályozására rövidtávú expozíciót követően In: Mézes Miklós (szerk.) Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság IX. Kongresszusa és az MTA ÉKB Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2017.08.25-2017.08.26. Gödöllő: SzIE, 2017. p. 30. (ISBN: 978-963-269-666-9)

Balogh K, Tokodi N, Zándoki E, Szabó-Fodor J, **Pelyhe Cs**, Bócsai A, Mézes M: Effects of fumonisin contaminated diet on glutathione redox system and lipid peroxidation processes in broiler chickens In: József Bieniek (szerk.) International Conference on Biotechnology and Welfare in Animal Science with a session on „7th Poultry Days”. Konferencia helye, ideje: Krakko, Lengyelország, 2016.06.23-2016.06.24. Krakko: University of Agriculture in Krakow, 2016. p. 125. (ISBN: 978-83-64758-38-6)

Kövesi B, **Pelyhe C**, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B: DON és T-2 toxin együttes hatása az antioxidáns rendszer szabályozására pontyban rövidtávú toxinexpozíciót követően In: Bene Sz (szerk.) XXII. Ifjúsági Tudományos Fórum. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2016.05.26 Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, 2016. pp. 1-6. (ISBN:978-963-9639-83-6)

Kövesi B, **Pelyhe C**, Balogh K, Mézes M: A szterigmatocisztin biológiai hatásai brojlercsirkében és pontyban In: Nagy Z B (szerk.) LVIII. Georgikon Napok. Kivonat-kötet: Programfüzet, valamint az elhangzó és poszter előadások rövid kivonatainak gyűjteménye. 166 p. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2016.09.29 -2016.09.30. Keszthely: Pannon Egyetem Georgikon Kar, 2016. p. 95. (ISBN: 978-963-9639-84-3)

Kövesi B, **Pelyhe C**, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B: Trichotecénvázis mikotoxinok együttes hatása az antioxidáns rendszer szabályozására rövidtávú toxinexpozíciót követően pontyban Konferencia helye, ideje: Hajdúszoboszló, Magyarország, 2016.10.13. 2016. TOX'2016

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B: Combined effect of T-2 toxin and deoxynivalenol on regulation of the glutathione redox system in broiler chicken In: József Bieniek (szerk.) International Conference on Biotechnology and Welfare in Animal Science with a session on „7th Poultry Days”. Konferencia helye, ideje: Krakó, Lengyelország, 2016.06.23 - 2016.06.24. Krakó: University of Agriculture in Krakow, 2016. p. 161. (ISBN:978-83-64758-38-6)

Pelyhe C, Kovács B, Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Hosszútávú T-2 toxin és deoxynivalenol terhelés hatásainak vizsgálata a glutathion redox rendszer paramétereire és a lipidperoxidációs folyamatokra egynyaras pontyban In: Rónyai A, Adorján A, Bozáné B E, Józsa V (szerk.) XXXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás. 84 p. Konferencia helye, ideje: Szarvas, Magyarország, 2015.05.20 -2015.05.21. Szarvas: p. 62.

Pelyhe C, Kövesi B, Zándoki E, Kovács B, Mézes M, Balogh K: Ochratoxin A és fumonizin B1 terhelés rövidtávú hatása a gpx4 gén expressziójára ponty fajban (*Cyprinus carpio*) In: Darvas Béla, Bakonyi Gábor, Biró Borbála, Major Jenő, Mörthl Mária, Vehovszky Ágnes (szerk.) V. ÖKOTOXIKOLÓGIAI KONFERENCIA: előadás és poszter kötete. 46 p. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2015.11.20 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2015. pp. 31-32. (ISBN: 978-963-89452-5-9)

Pelyhe C, Kovács B, Ferenczi Sz, Bócsai A, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Evaluation of hepatic glutathione-S-transferase gene expression related to T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken In: Maráz A, Pfeiffer I, Vágvölgyi Cs (szerk.) Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2014": Program és összefoglalók. 100 p. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2014.03.07 Szeged: JATEPress Kiadó, 2014. p. 75. (ISBN: 978-963-315-167-9)

Pelyhe C, Kovács B, Ferenczi Sz, Bócsai A, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Short-term effect of T-2 toxin and deoxynivalenol on glutathione-S-transferase gene expression in chicken liver In: University of Agriculture in Krakow (szerk.) III International Conference of PhD Students: Multidirectional Research in Agriculture and Forestry. Konferencia helye, ideje: Kraków, Lengyelország, 2014.03.22 Krakó: University of Agriculture in Krakow, 2014. p. 11. (ISBN:978-83-7759-037-9)

Pelyhe C, Zándoki E, Mézes M, Balogh K: Hosszútávú trichotecénvázas mikotoxin terhelés hatásainak vizsgálata a glutation redox rendszer paramétereire, valamint a lipidperoxidációs folyamatokra pontyban In: XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás. Konferencia helye, ideje: Szarvas, Magyarország, 2014.05.28-2014.05.29. p. 44.

Kútvölgyi G, Czimmer G, **Pelyhe C**, Magosi Z, Török E, Stefler J, Kovács A: Complex viability, acrosome and morphology evaluation of spermatozoa of subfertile stallions Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2013.10.03-2013.10.05.m13th WEVA Congress