MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

AZ AFLATOXIN ÉS SZTERIGMATOCISZTIN BIOLÓGIAI HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PONTY FAJBAN

Doktori értekezés

Kövesi Benjámin

Gödöllő

2021

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

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

Témavezető: Dr. Balogh Krisztián

egyetemi docens, PhD

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

…….

Az iskolavezető aláírása

……

A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék I
Rövidítések jegyzéke III
1. Bevezetés és problémafelvetés 1
2. Célkitűzések 2
3. Szakirodalmi áttekintés 3
3.1 Az aflatoxin B_1 és szterigmatocisztin általános jellemzői 3
3.1.1 Az aflatoxin B_1 és a szterigmatocisztin toxikokinetikai jellemzői 5
3.1.2 Az aflatoxin B_1 és a szterigmatocisztin hatásai az állati szervezetre (toxikodinámiai jellemzők) 7
3.2 Az oxidatív stressz kialakulása, befolyásolása, hatása és molekuláris jellemzői 11
3.2.1 Az alacsony szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók 12
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 Az aflatoxin B_1 és a szterigmatocisztin kapcsolata a ROS képzés indukciójával és az oxidatív stresszel 17
3.2.5 Mikotoxinok hatása az Nrf2-ARE útvonalon 19
3.3 A szervezet antioxidáns rendszerének bemutatása 20
3.3.1 Az első védelmi szint 20
3.3.2 A második védelmi szint 21
3.3.3 A harmadik védelmi szint 23
3.4 Szelenoproteinek 23
3.4.1 A glutation-peroxidáz enzimcsalád, kiemelten a GPx4 25
4. Anyag és módszer 32
4.1 A kísérletek során alkalmazott mikotoxinok 32
4.1.1 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése 32
4.1.2 A takarmányok mikotoxin tartalmának meghatározása és annak módszere 32
4.2 Kísérleti protokollok 33
4.2.1 A vizsgálat helyszíne 33
4.2.2 Kísérleti állatok és tartásuk 33
4.3 Mintavételezés 34

4.4 Génexpressziós vizsgálatok 34
4.4.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR 34
4.4.2 Real-time PCR vizsgálatok ponty fajban 34
4.4.3 Real-time PCR eredmények kiértékelése 35
4.4.4 Statisztikai értékelés 35
5. Eredmények és értékelés 36
5.1 Rövidtávú AFB_1 terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására pontyok májában 36
5.1.1 Megbeszélés 40
5.2 Rövidtávú STC terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására pontyok májában 46
5.2.1 Megbeszélés 50
5.3 AFB_1-STC terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására pontyok májában 56
5.3.1 Megbeszélés 60
6. Összefoglaló következtetések és javaslatok 66
6.1 Következtetések 66
6.2 Javaslatok 69
7. Új tudományos eredmények 70
8. Összefoglaló 72
9. Summary 75
M1 Irodalomjegyzék i

Rövidítések jegyzéke

8-OHdG	8-hidroxideoxiguanozin
β-TrCP	*β -transducin repeat containing protein*
AF	Aflatoxin
AFB_1	Aflatoxin B_1
AFL	Aflatoxikol
Ahr	Aril hidrokarbon receptor
AKT	Protein kináz B
ANOVA	Variancia analízis - *Analysis of Variance*
ARE	Antioxidáns Válaszelem - *Antioxidant Response Element*
ARNT	*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*
Bac	β-aktin
BTB	*Broad komplex - Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac*
bZIP	Bázikus leucin zipzár
CAT	Kataláz
CBP	CREB-kötő fehérje - *CREB-binding protein*
cDNS	Komplementer DNS
cGMP	Ciklikus guanozin-monofoszfát
cGPx4	Citoszol glutation-peroxidáz4
Cry	Kriptokróm gén
CsMBE	CNC-sMaf-kötő elem
Ct	Küszöb ciklus
CTR	Karboxil-terminális régió
DISC	*Death-inducible signalling complex*
DGR	Kettős glicin ismétlődő domén - *Double glycine repeat domain*
DHA	Dokozahexaénsav
DHA*	Dehidroaszkorbinsav
DLGex	*Extended DLG tripeptide*
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DON	Deoxinivalenol
EGFR	Epidermális növekedési faktor
eEFSec	*Sec-specific translation elongation factor*
EPA	Eikozapentaénsav
EpRE	Elektrofíl Válaszelem - *Electrophil Response Element*
CYP	Citokróm P450
Cys	Cisztein
FAO	ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FB_1	Fumonizin B_1
GCL	γ-glutamil-cisztein ligáz
GES	Humán gyomorhámsejt - *gastric epithelium cells*
GPx	Glutation-peroxidáz
GSK3β	Glikogen-szintetáz-kináz 3
GR	Glutation-reduktáz
GS	Glutation-szintetáz vagy szintáz
GSH	Redukált glutation
GSSG	Glutation-diszulfid
GST	Glutation-S-transzferáz
HO-1	Hemoxigenáz-1
HSP	Hősokk fehérjék - *Heatshock proteins*
H_2O_2	Hidrogén-peroxid
IL	Interleukin
IVR	Közbeeső régió - *Intervening region*
Keap1 (iNrf2)	*Kelch-like ECH - associated protein 1*
LC_{50}	Medián letális koncentráció - *Median lethal concentration*
LD_{50}	Medián letális dózis - *Median lethal dose*

LcPUFA	Hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak - *Long chain polyunsaturated fatty acids*
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz - *Mitogen-activated protein kinase*
MDA	Malondialdehid
MDCK	Madin-Darby kutya vese (sejtvonal) - *Madin-Darby canine kidney cell line*
mGPx4	Mitokondriális glutation-peroxidáz 4
miR	MikroRNS
mRNS	Hírvívő RNS - *Messenger RNS*
Msr	Metionin-szulfoxid-reduktáz
MUFA	Egyszeresen telítetlen zsírsavak - *Monounsaturated fatty acids*
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
Neh	*Nrf2–ECH homology*
NF-κB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
nGPx4	Nukleáris glutation-peroxidáz 4
NMD	korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás - *Nonsense mediated decay*
NOS	Nitrogén-monoxid-szintáz
NQO1	*NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1*
Nrf2	*Nuclear factor E2-related factor 2*
NTR	N-terminális régió
OTA	Ochratoxin A
PCR	Polimeráz-láncreakció
Per	Period gének
phGPx	Foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz (=Gpx4)
PI3K	Foszfatidil inozitol 3 kináz
PUFA	Többszörösen telítetlen zsírsavak - *Polyunsaturated fatty acids*
qPCR	Real-time PCR
RNS	Ribonukleinsav
RNS*	Reaktív nitrogén gyökök
ROS	Reaktív oxigén szabadgyökök
RQ	Relatív kvantifikáció
RXRα	*Retinoic X receptor alpha*
SAT	Telített zsírsav
SBP2	SECIS-kötő fehérje 2 - *SECIS binding protein 2*
SCN	Szuprachiasmatikus mag - *Suprachiasmatic nucleus*
Se	Szelén
Sec	Szelenocisztein
SECIS	*Selenocysteine insertion sequence*
sMAF	*Small masculoaponeurotic fibrosarcoma*
SMCP	Spermium mitokondriumhoz kapcsolódó ciszteinben gazdag fehérje – *Sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein*
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
STC	Szterigmatocisztin
TAC	Teljes antioxidáns kapacitás - *Total Antioxidant Capacity*
TNF-α	Tumor nekrózis faktor alfa
tRNS	Transzfer RNS
TrxR	Tioredoxin reduktáz
ttm	Testtömeg
UTR	Nem transzlálódó régió - *Untranslated region*
XRE	Xenobiotikum válaszelem – *Xenobiotic response element*
ZEA	Zearalenon

1. BEVEZETÉS ÉS PROBLÉMAFELVETÉS

Az akvakultúra jelenleg a világ egyik leggyorsabban fejlődő iparága (FAO 2020), következésképpen egyre nagyobb mennyiségű takarmányt igényel. A hagyományos takarmány-alapanyagok, mint például a halliszt és a halolaj elérhetősége, ugyanakkor nem nőtt a kereslettel, amelynek következtében alternatív megoldásként a növényi fehérjék alkalmazása kezdett elterjedni, amelyek viszont jelentős mértékben növelhetik a mikotoxin szennyeződés, illetve a mikotoxin terhelés kockázatát (Naylor et al., 2009). Bár jelenleg még kevésbé ismert a mikotoxinok halakra és különböző vízi szervezetekre kifejtett hatása, ugyanakkor nő azon tanulmányok száma, amelyekben a mikotoxin terheléssel összefüggésben számos kórtani és növekedési problémát írnak le különböző halfajokban (Anater et al., 2016; Marijani et al., 2019; Pietsch, 2015). Korábbi kísérleteink során más mikotoxinok, így például a T-2 toxin (Pelyhe et al., 2016), továbbá a deoxinivalenol (DON), az ochratoxin A (OTA) és a fumonizin B_1 (FB_1) hatását vizsgáltuk (Kövesi et al., 2020) a ponty antioxidáns védelmi rendszerének egyes elemeire, illetve azok szabályozásáért felelős gének expressziójára.

Az elsősorban *Aspergillus* penészgomba fajok által termelt aflatoxin B_1 (AFB_1) és szterigmatocisztin (STC) által kiváltott toxikus hatásokról is már számos ismerettel rendelkezünk, ezek nagyrésze azonban vagy *in vitro* modelleken végzett kísérletek vagy *in vivo*, de többségében hosszan tartó, szubletális mikotoxin terhelések eredményein alapulnak.

Továbbá, a mikotoxinok, így az AFB_1 és a STC halak szervezetére kifejtett rövidtávú hatásai jelenleg még csak kevésbé ismertek, ezért kísérleteimhez a gazdasági szempontból is fontos ponty fajt választottam. Noha az aflatoxinokról már számos ismerettel rendelkezünk, az aflatoxikózis diagnosztizálásában, halakban, még mindig vannak bizonytalanságok. A halak korai aflatoxikózisát gyakran májkárosodás, gyenge növekedés, halvány kopoltyúk és immunszuppresszió jellemezi. Azonban az AFB_1 toxicitás legkorábbi jelei közé tartozik a testösszetétel változása és az oxidatív stressz (Pietsch 2020).

Ugyanakkor jelenleg még nem egyértelműen megválaszolható az a kérdés, hogy a fent említett két mikotoxin milyen mértékben indukál a halak szervezetében oxidatív stresszt, és az milyen sorrendben és mértékben indukálja az antioxidáns védelmi rendszer molekuláris markereit.

Az sem ismert továbbá, hogy a különféle mikotoxinokkal, így például AFB_1-gyel és STC-nel egyidejűleg szennyezett takarmány etetését követően a szervezet antioxidáns védőrendszere milyen módon reagál. A rutinszerűen vizsgált mikotoxinok esetében ugyanis a jelenleg érvényben lévő szabályozások olyan toxikológiai vizsgálatok adatain alapulnak, amelyek a mikotoxinok együttes hatásait nem, csupán csak egy mikotoxin-expozíciót vettek figyelembe (Speijers és Speijers 2004; Smith et al., 2016). Ugyanakkor a szervezetbe kerülve a különböző mikotoxinok kölcsönhatásba léphetnek egymással, következésképpen antagonista vagy szinergikus és/vagy additív hatást fejthetnek ki, különösen, ha hatásmechanizmusuk is hasonló (Oliveira és Vasconcellos 2020) és azt azonos szerven fejtik ki.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Vizsgálataim fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljam az *Aspergillus* penészgomba fajok által termelt AFB_1 és STC eltérő dózisainak egyszeri expozíciót követő rövidtávú hatását a glutation redox rendszer egyes elemeit, valamint az azok szabályozásáért felelős egyes transzkripciós faktorokat kódoló gének expressziójára.

2. Célom volt továbbá felmérni, hogy az AFB_1 és STC együttes alkalmazása egyszeri expozíciót követő hatása rövidtávon milyen irányban és mértékben befolyásolja a ponty glutation redox rendszerének egyes elemeit, valamint azok szabályozásáért felelős egyes transzkripciós faktorokat kódoló gének expresszióját.

A fenti célok eléréséhez az alábbi kísérleteket terveztem meg és állítottam be:

I. Egyszeri szubletális, rövidtávú (24 órás) AFB_1 terhelés hatásának vizsgálata egynyaras pontyok májában, három különböző dózis hatására;

II. Egyszeri szubletális, rövidtávú (24 órás) STC terhelés hatásának vizsgálata egynyaras pontyok májában, három különböző dózis hatására;

III. Egyszeri szubletális, rövidtávú (24 órás) AFB_1 és STC együttes hatásának vizsgálata egynyaras pontyok májában.

A kísérletek során vizsgáltam az Nrf2/Keap1-ARE (*kelch-like ECH-associated protein 1/ nuclear factor E2-related factor 2*/Antioxidáns válaszelem) útvonalat kódoló egyes gének (*keap1* és *nrf2*), a foszfolipid hidroperoxid glutation-peroxidáz enzimet kódoló gének (glutation-peroxidáz 4a és glutation-peroxidáz 4b (*gpx4a* és *gpx4b*)), valamint a glutation-szintetáz (*gs*) és a glutation-reduktáz (*gr*) enzimet kódoló gének expressziós változásait.

3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Az aflatoxin B_1 és szterigmatocisztin általános jellemzői

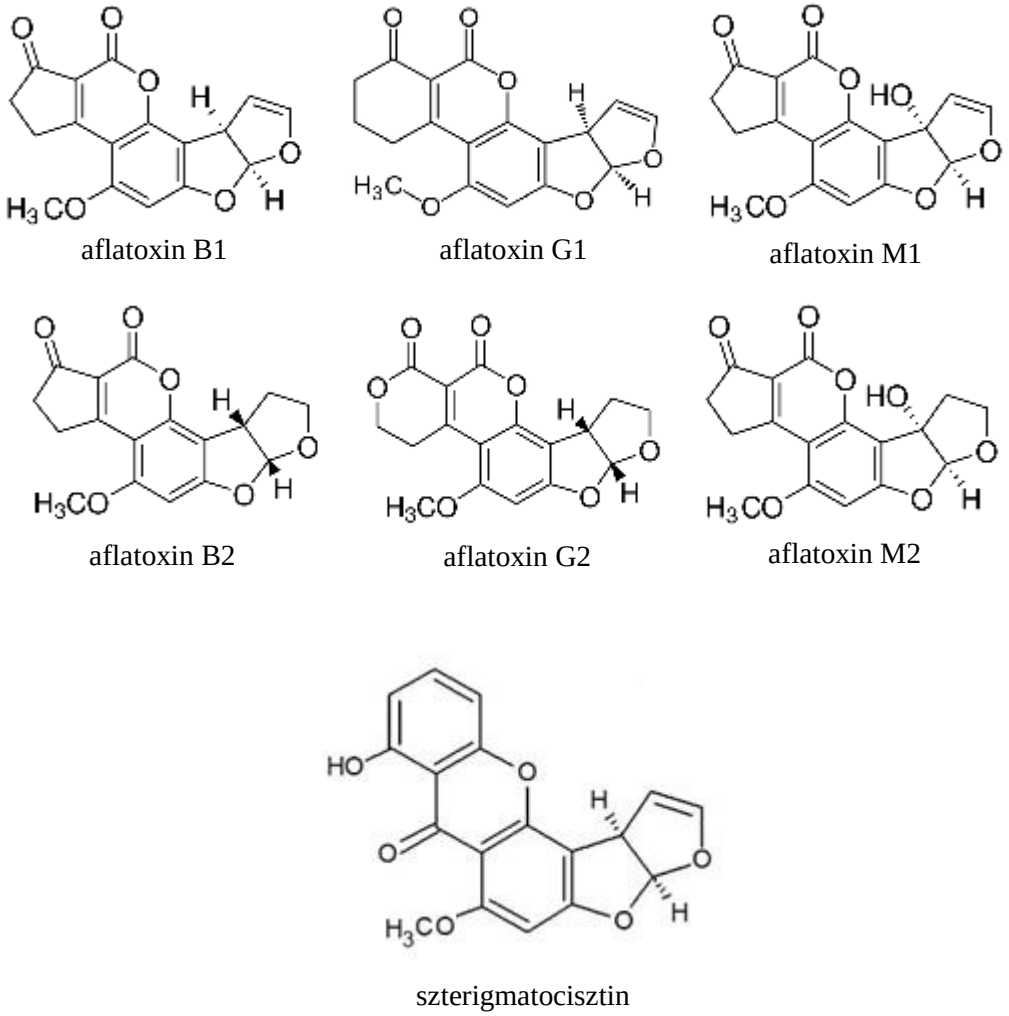
A mikotoxinok egyes fonalas gombák által termelt másodlagos anyagcsere-termékek (Alshannaq és Yu, 2017), amelyek élelmiszer- és takarmánybiztonsági szempontból globális problémát jelentenek, ugyanis azok a világ gabonatermelésének közel 25%-át szennyezik, és az aflatoxinok a pozitív minták 37,6%-ban kimutathatók (Andrade és Caldas, 2015). A legutóbbi BIOMIN *World Mycotoxin Survey* felmérés szerint az aflatoxin-szennyezettség Európában 2019-ben, a keveréktakarmányokban 8% (a pozitív minták átlaga 10 µg/kg), míg a gabonafélékben 21% (a pozitív minták átlaga 2 µg/kg) volt (BIOMIN 2019).

Az aflatoxinokat és a STC-t termelő *Aspergillus* penészek számára a meleg és párás éghajlati viszonyok, így Latin-Amerika, Ázsia és Ausztrália egyes területei az ideálisak. A globális felmelegedés következtében ugyanakkor Dél- és Közép-Európában is megjelentek a toxinogén, azaz mikotoxin termelésre képes törzsek (Miraglia et al., 2009; Dobolyi et al., 2013; Battilani et al., 2016; Dobolyi et al., 2021). Az aflatoxinok elsődleges forrásainak az *A. parasiticus*, *A. flavus* és *A. nominus* fajok toxinogén törzseit tekintik, de emellett más *Aspergillus* és *Emericella* fajok is termelhetik (Kumar et al., 2017). Rank és mtsai. (2011) vizsgálatuk eredményei alapján 55 olyan penészgombafajt neveztek meg, amelyek képesek a STC bioszintézisére, többek között olyan nemzetségek közül, mint az *Emericella*, az *Aspergillus*, a *Chaetomium*, a *Botryothrichum* és a *Humicola*. Bioszintézise alapján a STC az AFB_1 egyik előanyagának tekinthető, de bizonyos penészgomba fajokban, mint pl. az *A. nidulans* vagy az *A. versicolor* nem megy végbe a szterigmatocisztin O-metil-szterigmatocisztinné történő átalakítása, vagyis további bioszintézis az AFB_1 irányába, a konverzióhoz szükséges specifikus metil-transzferázt kódoló gének hiánya miatt (Yabe et al., 1989), ezért ezek a fajok tekinthetők a STC elsődleges forrásainak (Yu et al., 2004).

Az aflatoxin bioszintézisében megközelítőleg 30 gén vesz részt, amelyek az *A. flavus* és *A. parasiticus* fajok genomjában egy 75 kb méretű génklaszterben találhatóak (Yu 2012), míg a szterigmatocisztin termelésért elsődlegesen felelős *A. nidulans* nukleotid szekvenciájának feltárása eredményeként 25, az aflatoxin génklaszterrel homológ, gént írtak le (Ehrlich 2009, Caceres et al., 2020). Az aflatoxin bioszintézisért felelős génklasztert kifinomultan szabályozzák mind helyi (*aflR* és *aflS*), mind globális (*Velvet complex*) szabályozó elemek (Peles et al., 2019). Környezeti tényezők, így például a szén- és nitrogénforrások elérhetősége, a változó pH, a hőmérséklet és a fényviszonyok, valamint a gombasejtek redox státuszának változásai mind befolyásolják az aflatoxin termelést (Kulcsár et al., 2019, Caceres et al., 2020).

Az aflatoxinok szubsztituált kumarin származékok, amelyek közé jelenleg több mint 20 vegyület sorolható. Toxikológiai szempontból ezek közül a legfontosabbak a B_1, G_1 és M_1, amelyek kémiai szerkezetüket tekintve dihidro-furanofuránok és erősen toxikusak, míg a tetrahidro-furanofuránok közé tartozó B_2, G_2 és M_2 gyakorlatilag nem mérgezőek (Bbosa et al., 2013a) (1. ábra). A STC kémiailag egy szubsztituált

antrakinon alapvázhoz kapcsolódó bisz-dihidrofurán gyűrűt tartalmazó vegyület, amelynek biológiai aktivitásáért a bisz-dihidrofurán gyűrűben lévő 1,2 telítetlen kettőskötés a felelős (Terao 1983).



1. ábra: **A jelentősebb aflatoxinok és a szterigmatocisztin szerkezeti képlete**

Az aflatoxinok leggyakrabban gabonafélékben (kukorica, cirok, rizs, árpa és zab), olajos magvakban (szója, földimogyoró, gyapotmag, diófélék, pisztácia, mandula, mogyoró), valamint szárított gyümölcsökben és különböző fűszerekben fordulnak elő (Rushing és Selim, 2019). A takarmányok maximális AFB_1 mennyiségét az 574/2011/EU rendelet szabályozza, amely takarmány-alapanyagokra vonatkozóan 20 µg/kg takarmány értéket határozott meg. Az élelmiszerek és a takarmányok STC-tartalmáról jelenleg kevés adat áll rendelkezésre (Scudamore et al., 1997), annak mennyiségét az Európai Unió sem a takarmányokban, sem az élelmiszerekben még ajánlati (határ)értékszinten sem szabályozza (EFSA 2013). Előfordulását tekintve megtalálható gabonafélékben és gabona alapú termékekben, továbbá az élelmiszerek közül a zöld kávébabban, egyes fűszerekben, diófélékben és a sörben, valamint a sajtok felületén az érés és tárolás során (Battilani et al., 2009; Versilovskis et al., 2010).

3.1.1 Az aflatoxin B_1 és a szterigmatocisztin toxikokinetikai jellemzői

A gazdasági állatok a mikotoxinokat elsősorban a szennyezett takarmánnyal veszik fel, de felszívódhatnak a bőrrel való közvetlen érintkezés következtében is, ahol lokális gyulladást eredményeznek (Kemppainen 1988, Doi és Uetsuka 2014). Ezenfelül, a mikotoxinokat és gombaspórákat tartalmazó por belégzése révén az állatok tüdejében is kialakulhatnak gyulladások (Carvajal-Moreno, 2015).

Az aflatoxinok zsírban jól oldódó molekulák, ezért könnyen, az expozíció helyén, általában a gyomor-bél traktusból, elsősorban a vékonybélből, leghatékonyabban a duodenumból, passzív diffúzió révén szívódnak fel, de a tüdő alveolusokon keresztül is bejuthatnak a véráramba (Kumagai, 1989; Agag 2004; Bbosa et al., 2013a). Pettyes harcsánál (*Ictalurus punctatus*) például kimutatták, hogy az AFB_1 a kezelés után 4 órával volt a legnagyobb mennyiségben jelen a vérben, de plazmafehérjékhez erősen kötött állapotban (Plakas et al., 1991). Egy, tojótyúkokkal végzett, vizsgálatban pedig a takarmánnyal felvett AFB_1 mennyiségének csak 28%-át sikerült visszanyerni az első 24 óra alatt (Sawhney et al., 1973). Az AFB_1 biológiai felezési ideje hosszú, patkányban 53-63 óra, az alkalmazott dózistól függően (Firmin et al., 2010). Wong és Hsieh (1980) egerekkel, patkányokkal és majmokkal végzett vizsgálataik alapján azt állapították meg, hogy intravénás kezelést követően az AFB_1 kiválasztása az első 24 órában igen hatékony.

Az aflatoxintól eltérő kémiai tulajdonságai miatt a STC csak viszonylag kis hatékonysággal szívódik fel a bélcsatornából (Steyn és Thiel, 1976). Egy, patkányokkal végzett, kísérlet során, a kezelést követően 3 órával volt kimutatható a vérből (Wang et al., 1991). Az STC biológiai felezési ideje rövid, mindössze 30 perc (Wang et al., 1991).

Az állati szervezetben az AFB_1-t elsősorban a xenobiotikum transzformáció fázis I. enzimek (pl. a vegyes funkciójú oxidázok: a citokróm P450 enzimcsalád [CYP]) alakítják át epoxidációs, hidroxilációs és demetilációs folyamatok során (Rodríguez-Cervantes et al., 2010). Lazacfélékben alapvetően a CYP2K1 izoenzim katalizálja az AFB1 transzformációját (Williams és Buhler, 1983; Yang et al., 2000), míg emlősökben ugyanezért a CYP1A2 vagy a CYP3A4 a felelős a szervezetbe került mennyiségtől függően (Bbosa et al., 2013b). Az AFB_1 epoxidációja során keletkező AFB_1-*exo* és AFB_1-*endo* 8,9 epoxid sztereoizomerek közül az *exo* forma megközelítőleg 1000-szer toxikusabb (Iyer et al., 1994). Az epoxid forma instabil intermedier ($t_{1/2}$ ~ 0,5 s), amely ugyanakkor nagy affinitással képez DNS-, RNS- valamint fehérjeadduktokat (Eaton et al., 1994, Monson et al., 2015). Az epoxidáció hatékonysága, valamint az AFB_1 metabolizmusa azonban az egyes állatfajok, illetve még az azonos fajhoz tartozó egyedek között is jelentős eltérést mutat (Dohnal et al., 2014).

A szervezet xenobiotikum transzformáló enzimrendszere révén egyéb aflatoxin metabolitok is létrejöhetnek hidroxiláció útján, így például aflatoxin P_1, aflatoxin Q_1, valamint aflatoxin M_1 és M_2 (Rushing és Selim 2019), amelyek akut toxicitása és mutagén potenciálja alacsonyabb az alapvegyületnél (Hsieh et al., 1974; Stoloff et al., 1972). Az AFM_1 rákkeltő hatása szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*)

például az AFB_1-hez viszonyítva kisebb, annak kb. 30%-a (Sinnhuber et al., 1974), míg az AFQ_1 csupán csak 1%-a (Hendricks et al., 1980). Az aflatoxikol (AFL) elsősorban a máj citoszol frakciójában található, amely NADPH reduktáz hatására képződik (Lozano és Diaz, 2006; Partanen et al., 2010; Salhab és Edwards, 1977; Schoenhard et al., 1976). Rágcsálókkal ellentétben a halak gyorsan képesek az AFB_1-t AFL-lá, alakítani (Salhab és Edwards, 1977). Ennek rákkeltő hatása megközelítőleg az AFB_1 50%-a volt egy, a lazacfélék családjába tartozó fajjal végzett kísérletben (Schoenhard et al., 1981), míg mutagén pontenciálja, *in vitro*, 70%-a volt a kiindulási vegyületnek (Coulombe et al., 1982). Az AFL tehát nem tekinthető detoxifikációs útvonalnak, hiszen azonfelül, hogy DNS-addukt képző aktivitással rendelkezik (Loveland et al., 1988), a mikroszomális dehidrogenáz enzim hatására visszaalakulhat AFB_1-gyé, ezáltal növelve annak biológiai felezési idejét (Kumagai et al., 1983; Partanen et al., 2010; Wong et al., 1979; Chung et al., 1985).

Az STC szervezetben történő metabolizmusáról jelenleg kevés adattal rendelkezünk. Az AFB_1-hez hasonlóan a STC-ből is aktív epoxid keletkezik egy, a CYP3A4 által katalizált folyamat során (Yamazaki et al., 1995), amely ezt követően reakcióba lép a DNS egy guaninbázisával és 1,2-dihidro-2-(N_7-guanil)-1-hidroxi-STC adduktot hoz létre (Essigmann et al., 1979). A STC *in vitro* metabolizmusát rekombináns humán CYP enzimekkel (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2A13, és 3A4) vizsgálták, amelynek során három különböző metabolitot találtak, de ezek kémiai struktúráját egyértelműen eddig még nem tisztázták (Cabaret et al., 2010, 2011). Pfeiffer és mtsai. (2014) azt közölték, hogy patkány és humán máj mikroszómák túlnyomórészt katekol-9-hidroxi-STC-t alakítanak ki az aromás gyűrű hidroxilációján keresztül. A metabolitok közül STC-1,2-oxidot nem, STC-1,2-dihidrodiolt is csak kis mennyiségben tudtak izolálni. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az aromás gyűrű hidroxilációja – amely így egy katekolt hoz létre – a STC oxidatív metabolizmusában egy újszerű, de jelentős útvonalnak tekinthető.

A mikotoxinok a xenobiotikum transzformáció fázis II. enzimek (pl. glutation-S-transzferázok [GST] vagy UDP-glükuronil-transzferáz) hatására konjugáció (glutation-, glükuronsav- stb.) révén részben az epével (Dohnal et al., 2014), majd ezt követően a bélsárral, valamint a vizelettel, illetve halak és madarak esetében az ürülékkel távoznak (Santacroce et al., 2008; Yunus et al., 2011). Szakirodalmi adatok alapján a halak szervezetében az AFB_1 transzformációs és konjugációs útvonalai közül, a rágcsálókkal ellentétben, a glükuronidáció jelenti a fázis II. fő útvonalát (Degen és Neuman 1978). Szivárványos pisztrángban, ezüstlazacban (*Oncorhynchus kisutch*) és zebradánióban (*Danio rerio*) az AFM_1 és AFL_1 főképp glükuronid konjugátumként ürülnek az epén, majd az ürüléken keresztül (Loveland et al., 1984; Troxel et al., 1997).

Az AFB_1-hez hasonlóan a STC esetében is a fő metabolikus útvonal a glükuronidáció, amelynek során a kiindulási vegyület és a hidroxilált metabolitok részben az epével, részben a vizelettel ürülnek (Thiel és Steyn, 1973; Steyn és Thiel, 1976; Fushimi et al., 2014; Viegas et al., 2018). Cabaret és mtsai. (2010, 2011) két további konjugátumot is azonosítottak, a monohidroxilezett STC monoglükuronidját, illetve annak monoszulfátját.

3.1.2 Az aflatoxin B_1 és a szterigmatocisztin hatásai az állati szervezetre (toxikodinámiai jellemzők)

A mikotoxinok, így az AFB_1 és a STC, hatásait számos tényező befolyásolja, így például az adott állat faja, fajtája, ivara, kora, egészségi állapota, takarmányozási és tartási körülményei, továbbá a mikotoxin expozíció mértéke, illetve annak hossza, de hatással van rá más mikotoxinok vagy farmakológiailag aktív hatóanyagok jelenléte is (Zain 2011). A különböző állatfajoknál jelentős különbséget mutattak ki a mikotoxinok felszívódásának mértékében, azok szervezeten belüli eloszlásában, metabolizmusában és kiválasztásában is (Dohnal et al., 2014, Monson et al., 2015). Az egyes gazdasági állatfajok érzékenysége az AFB_1-re a következő sorrendben írható le: baromfifajok≥halfajok>sertés>kérődzők (Rawal et al., 2010). Az eddig vizsgált halfajok között pedig az érzékenységi rangsor: szivárványos pisztráng>szúnyogirtó fogasponty>ezüstlazac>pettyes harcsa>indiai ponty>nílusi tilápia (Santacroce et al., 2008). Az egyes halfajok közötti különbségek az érzékenység tekintetében nagymértékűek, amely feltételezhetően az AFB_1 metabolizmusában részt vevő enzimek aktivitásbeli és génexpressziós különbségeiből fakadnak, amelynek következtében felborulhat a biotranszformáció fázis I. és fázis II. közötti egyensúly (Santacroce et al., 2008).

Halaknál az AFB_1-re vonatkozóan a szakirodalomban több LD_{50} érték is található (Santacroce et al., 2008). Így például az AFB_1 *per os* LD_{50} értéke szivárványos pisztráng esetében 0,5 mg AFB_1/kg testtömeg (ttm), intraperitoneális kezelést követően pedig 0,81 mg AFB_1/kg ttm (Bauer et al., 1969, Lovell 1989). A szúnyogirtó fogasponty (*Gambusia affinis*) LC_{50} értéke hasonlóan alacsony, mindössze 681 µg AFB_1/l (McKean et al., 2006). Az AFB_1 LD_{50} értéke pettyes harcsa esetében, intraperitoneális kezelést, valamint 10 napos kitettséget követően 11,5 mg AFB_1/kg ttm (Jantrarotai és Lovell 1990) míg az indiai ponty (*Labeo rohita*) esetében szintén intraperitoneális kezelést és 10 napos expozíciót követően 12,6 mg AFB_1/kg ttm volt (Sahoo et al., 2003). A STC esetében két halfajra, pontyra (*Cyprinus carpio*) és zebradánióra vonatkozóan állnak rendelkezésre adatok, ahol az előbbi esetében LD_{50} értékként 211 µg STC/kg takarmány koncentrációt (Pietsch, 2015), míg utóbbi esetében LC_{50} értékként 240 µg/l koncentrációt adtak meg (Abedi és Scott 1969).

Az aflatoxinok, valamint a STC olyan szubkrónikus és szubklinikai tüneteket idéznek elő gazdasági állatoknál, mint például csökkent takarmányfelvétel, takarmány-visszautasítás, a táplálóanyagok csökkent felszívódása és értékesülése. Emiatt csökken a tej-, a hús-, és a tojástermelés, valamint az egyes fertőző betegségekkel szembeni ellenállóképesség (EFSA 2013; Peles et al., 2019). Aflatoxikózis, valamint STC mérgezés esetén klinikai tünetként megjelenhet hányás, véres hasmenés, görcs, tüdőödéma, valamint az immunválasz csökkenése, továbbá halaknál anémia, romló spermaminőség és emiatt csökkent termékenyülés (Bbosa et al., 2013a, EFSA 2013, Santacroce et al., 2008).

Az aflatoxinok és a STC halakra kifejtett hatásait vizsgáló tanulmányok száma korlátozott, bár az AFB_1-ről, más mikotoxinokkal összehasonlítva, már számos ismerettel rendelkezünk (Anater et al., 2016, Marijani et al., 2019).

Az aflatoxikózis első jelei halaknál a halvány kopoltyúk, májkárosodás, gyenge növekedési ütem és immunszuppresszió (Jantrarotai és Lovell 1990, Sahoo és Mukherjee 2001, Ahn Tuan et al., 2002, Akter et al., 2010). Svobodova és mtsai. (1982) arról számoltak be, hogy AFB_1-gyel 20-200 µg/kg dózisban szennyezett takarmány etetése nem volt hatással a táplálóanyag, azon belül a fehérje, hasznosulására és értékesülésére. Ezzel szemben 100 µg AFB_1/kg takarmány dózissal, 15-30 napig kezelt ponty ivadékok növekedési paraméterei szignifikáns mértékben csökkentek (Akter et al., 2010). Pettyes harcsa és nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) esetében az AFB_1 magasabb koncentrációja (1,88-100 mg/kg takarmány) szintén csökkentette a növekedés mértékét (Jantrarotai és Lovell 1990, Chavez-Sanches et al., 1994, Ahn Tuan et al., 2002, Encarnacao et al., 2009), míg alacsonyabb koncentrációnál (0,16 mg/kg takarmány) 7 hetes kezelést követően nem tapasztaltak ilyen hatást (Manning et al., 2011). Ugyanakkor amur (*Ctenopharyngodon idella*) ivadékok esetében is megfigyeltek gyenge növekedési teljesítményt, illetve deformációkat 60 napig tartó AFB_1 kezelést követően (Zeng et al., 2019). Az egyes halfajok eltérő reakciói összefüggésben állhatnak a víz hőmérsékletének hatásaként a tényleges metabolikus sebességgel, valamint ennek következtében az AFB_1 metabolizmusában mutatkozó különbséggel, ebbe beleértve az eltérő toxicitású AFB_1 metabolitok képződését is (Ngethe et al., 1993, Santacroce et al., 2008). A vizsgált halfajok közül a szivárványos pisztráng tűnik a leginkább érzékenynek mind az AFB_1, mind pedig a STC iránt, mivel már 0,4 µg AFB_1/kg takarmány koncentráció esetén 14%-kal nőtt a tumor, elsősorban a májtumor, képződés valószínűsége (Marijani et al., 2019). Érdekes, hogy a DNS-addukt képződés szintje zebradánióban 4x, míg ezüstlazacban 18x alacsonyabb volt az érzékeny szivárványos pisztránghoz viszonyítva (Troxel et al., 1997; Bailey et al., 1988). Az AFB_1 mutagén potenciálját jelezheti ponty vese sejtekre és eritrocitákra kifejtett negatív hatása is (Al-Sabti 1986). Ezen felül, He és mtsai. (2010) az AFB_1 toxikus hatásait írták le primer ponty májsejtekre 0,01 µg/ml koncentrációban, *in vitro* modellben. *In vivo* azonban 2 mg AFB_1/kg dózissal szennyezett takarmány még nem idézett elő májkárosodást, de nagyobb dózisok (20-200 mg/kg) hatására már kórszövettani elváltozásokat, így például máj disztrófiát figyeltek meg (Svobodova és Piskac 1980). Nílusi tilapiánál 100 mg AFB_1/kg takarmány dózis esetén súlyos májnekrózist találtak (Ahn Tuan et al., 2002), míg szivárványos pisztráng esetében az AFB_1-gyel természetes úton szennyezett takarmány etetését követően a májtumor előfordulásának gyakorisága is nőtt (Ashley, 1970).

A STC halakra kifejtett káros hatásairól jelenleg kevés adat áll rendelkezésre. Abdelhamid (1988) csökkent növekedést és izomfehérje tartalmat figyelt meg pontyban 3 hetes etetési kísérletet követően, amikor a halakat 0, 10, 50, 250 és 1250 µg STC/kg mesterségesen szennyezett takarmányokkal etettek. A STC rákkeltőnek bizonyult szivárványos pisztráng embriókon 0,5 µg STC/l koncentrációjú vizes szuszpenzióban való 14 napos inkubáció során (Hendricks et al., 1980). Nílusi tilapiánál STC-nel 1,6 µg/kg ttm dózissal szennyezett takarmány etetését követően sötétebb bőrszínt, kiegyensúlyozatlan úszást, valamint a szennyezett takarmányt fogyasztó halak között 25%-os mortalitást figyeltek meg. Az elhullott halak kopoltyúján hiperplasiát, ödémát és vérzéseket találtak (Mahrous et al., 2006).

Ugyanezen halfajnál, Abdel-Wahhab és mtsai. (2005) 1,6 µg STC/kg ttm dózis esetén megnövekedett számú kromoszóma-rendellenességet figyeltek meg a vesében.

Az állati szervezetben AFB_1-mérgezés esetén a máj, míg STC-mérgezés esetén a máj és a vese a leginkább érintett szervek (Bbosa et al., 2013b, Purchase és van der Watt, 1969). Az AFB_1 a májban nekrotikus elváltozásokat, az epevezeték proliferációját, ennek következtében icterust, valamint vérzéseket idéz elő (Dalvi 1986). A STC a májban degeneratív elváltozásokat és elhalást okoz a kezelés módjától függően. Egerekben *intraperitoneális* kezelést követően először a periportális zónában figyelhetők meg elváltozások, míg *per os* kezelt állatok esetében az elváltozások a centrális véna környékén voltak megfigyelhetők. A vesében a vérerek hyalinos degenerációja és vérzések, valamint elhalás jelentkezett. A fiatal állatok általában érzékenyebbek az AFB_1- és STC-toxikózisra, mint kifejlett társaik (Fujii et al., 1976). Inhalációt követően a tüdőben nem specifikus, de súlyos gyulladásos válaszreakciót figyeltek meg egérben (Miller et al., 2010).

Amint arra korábban már utaltam, a szervezetben a CYP enzimrendszer által katalizált metabolizációjuk során az AFB_1 és STC molekulából aktív epoxidok keletkeznek, amelyek szerkezetükből adódóan igen reaktívak és képesek a különböző makromolekulákkal, így a fehérjékkel, a nukleinsavakkal és a foszfolipidekkel reakcióba lépni, ennek révén genetikai, metabolikus, jelátviteli és sejtszerkezeti változásokat indukálva (Bbosa et al., 2013b, Benkerroum 2020). Ezek a reaktív epoxidok gátolják a DNS, az RNS, valamint a fehérjeszintézist, utóbbit az iniciáció, a transzkripció és a transzláció szintjén egyaránt (McLean és Dutton, 1995; Bbosa et al., 2013b).

A fehérjeszintézis gátlása direkt, vagy indirekt módon megakadályozza az immunsejtek proliferációját/differenciálódását, illetve megzavarja a lymphoid és vérképző szövetek működését (Oswald et al., 2005), ezáltal az AFB_1 egyaránt lehet immunstimuláns vagy immunszuppresszív vegyület (Benkerroum 2020), ugyanakkor szakirodalmi adatok alapján a STC-nek is lehet káros immunmoduláns hatása (EFSA 2013). A hatás ugyanakkor függ az expozíció hosszától, illetve az alkalmazott dózistól. Valtchev és mtsai. (2015) például megállapították, hogy alacsony dózis és rövid ideig történő expozíció stimulálja az immunrendszert, míg a hosszabb ideig tartó nagyobb dózisnak való kitettség immunszuppresszív hatású. Az AFB_1 toxikus hatásai közül a hepatokarcinogenitás mellett az immuntoxicitást tartják a legjelentősebbnek. Az immunrendszerre kifejtett hatást szivárványos pisztrángban, indiai pontyban, pontyban és amurban is leírták (Sahoo és Mukherjee, 2001, Bitsayah et al., 2018, Zeng et al., 2019). Szivárványos pisztránggal végzett kísérletben a szekunder antitest válasz megváltozását (Arkossh és Kaattari, 1987), valamint csökkent limfocita proliferációt (Ottinger és Kaattari 1998) tapasztaltak. Indiai pontyban, intraperitoneális kezelést követően, csökkent vérplazma fehérje, valamint immunglobulin szintet mértek (Sahoo és Mukherjee, 2001). Emellett pontyban csökkent lizozim aktivitást és immunglobulin tartalmat figyeltek meg a vérben (Bitsayah et al., 2018). Amurban is megfigyelték az immunszervek szerkezeti integritásának megváltozását (Zeng et al., 2019). Az AFB_1 mellett a STC káros immunmoduláns hatása is feltételezhető, ugyanis megállapították, hogy *in vitro* modellekben gátolta az interleukin (IL)-12 génexpressziót, valamint

befolyásolta az IL-2, az interferon-γ és az IL-4 termelést (Xing et al., 2005). *In vivo* egérmodellben viszont nagydózisú toxinkezelést követően a perifériás mononukleáris sejteket vizsgálva az immuntoleranciát és immunmodulációt szabályozó FoxP3+ T-sejtek aránya szignifikáns mértékben nőtt (Liu et al., 2012), Egy másik vizsgálatban pedig már egyszeri kezelés hatására is csökkent a proinflammatorikus tumor nekrózis faktor-α (TNF α), de nőtt az ugyancsak proinflammatorikus IL-6-szintje (Zhang et al., 2012).

Farkassügérrel (*Dicentrarchus labrax*) végzett kísérletben kimutatták, hogy AFB_1-gyel szennyezett takarmány etetésének hatására az állatok szokatlan úszási mintákat mutattak, amelyet az egyensúly elvesztésével hoztak összefüggésbe (El-Sayed és Khalil, 2009). Egy Dél-Amerikában honos harcsafélénél (*Bagrus bajad*) az AFB_1-gyel szennyezett takarmány etetésének hatására *hiperlokomóció*-t figyeltek meg, vagyis az idegrendszer túlzott stimulációjának eredményeként létrejövő folyamatos mozgást, amely a vér-agy gát károsodásával és a halak agyában található neurotranszmitterek mennyiségének és arányának változásával járó rendellenesség (Baldissera et al., 2018). Zebradánió lárváknál szintén megfigyelték AFB_1 kezelés hatására a neuronális aktivitásért és a neurogenezisért felelős gének expressziós változásait (Wu et al., 2019). Ezek alapján az AFB_1 neurotoxikus hatása egyértelműnek tűnik.

In vitro modellben, primer vesehámsejtekben, a STC teljes mértékben gátolta a mitózist, továbbá a sejtek 100%-ában elváltozásokat idézett elő a sejtmagban, már 24 órával a kezelést követően (Engelbrecht és Altenkirk, 1972). Xing és mtsai. (2011) a STC hatását humán gyomorhámsejteken (*gastric epithelium cells GES-1*) vizsgálták *in vitro*. Úgy találták, hogy a STC gátolta a GES-1 sejtek osztódását annak G2 fázisában (Xing et al., 2011). Hasonló megfigyelést tettek Huang és mtsai. (2014) is humán tüdősejtek vizsgálatakor. Ezek alapján a STC mitózisgátló hatása egyértelműen feltételezhető. Az AFB_1-8,9-epoxid erős biológiai aktivitása következtében a sejtciklus bármelyik szakaszát képes befolyásolni (Bbosa et al., 2013b). Így például kimutatták, hogy az AFB_1 indukálja a G2/M fázis leállását brojlercsirkék éhbelében *in vivo*; vesesejtekben pedig a G0/G1 fázis; humán sejtvonalakban pedig az S fázis leállását (Li et al., 2019).

A szervezetben az AFB_1 és STC CYP enzimrendszer által katalizált metabolizációja során létrejövő aktív epoxidok azok, amelyek azok genotoxikus hatásaiért felelősek, reakcióba lépnek a DNS egy guaninbázisával, de amíg az AFB_1 esetében egy *transz*-8,9-dihidro-8-(N_7-guanil)-9-hidroxi-AFB_1 addukt, addig a STC esetében egy 1,2-dihidro-2-(N_7-guanil)-1-hidroxi-STC addukt jön létre (Wild és Turner 2002, Essigmann et al., 1979). Az AFB_1 addukt jellemzően (60-80%-ban) főképp a p53/PT53 tumorszupresszor gén 249. kodonján hoz létre G-T transzverziót, vagy ritkábban G-A tranzíciót (Smith és Groopman 2018; Coskun et al., 2019). Az ennek következtében létrejövő fehérje nem képes a DNS-molekulákhoz kötődni, így elveszíti transzaktivációs képességét számos olyan p53-függő génpromóter felé, amelyek különféle létfontosságú sejtfunkciókért felelősek, ebbe beleértve a sejtciklus leállítását, az öregedést és az apoptózist, ami tumorképződéshez vezethet (Mello és Attardi 2018; Abbas és Dutta 2009). A STC genotoxikus hatása – DNS-addukt, illetve tumorképződés – a különböző vizsgált sejtvonalakban hozzávetőlegesen csak 0,1–

10% mértékben következett be az AFB_1-hez viszonyítva. Az eltérés a STC kémiai szerkezetéből adódik, ugyanis fenolos csoportot is tartalmaz, ami elősegíti a bioszintetikus konjugációját (pl. glutationnal), és ennek révén gyorsabb eliminációt tesz lehetővé még mielőtt az aktív epoxidok kialakulnának (Olson és Chu 1993). Kísérleti modellekben a STC kromoszómaaberrációkat, valamint testvérkromatida-cserét indukál (Curry et al., 1984, Ueda et al., 1984), továbbá azt is megfigyelték, hogy mind baktérium-, mind emlőssejtekben mutagén hatású (Baertschi et al., 1989; Noda et al., 1981).

In vitro kísérletekben, csirke lépben, AFB_1 hatására, nekrotikusan elhalt sejteket találtak (Peng et al., 2014), de apoptózist is megfigyeltek brojlercsirkék thymusában és *Bursa Fabricii*-jében (Peng et al., 2016, Chen et al., 2014), míg STC-nel végzett kezelést követően humán tüdő sejtvonalakban és limfocitákban szitén megfigyeltek apoptózist (Sun et al., 2002; Cui et al., 2017).

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

A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) olyan gyökök vagy molekulák, amelyek egy vagy több oxigénatomja külső elektronhéján egy vagy több párosítatlan elektront vagy antiparallel spinekkel rendelkező elektront tartalmaz, amelynek következtében igen reaktívak (Halliwell 2006). A ROS külső, exogén tényezők hatására, mint például az ionizáló-, az UV-sugárzás, a magas hőmérséklet vagy különböző xenobiotikumok, továbbá egyes élettani folyamatok során egyaránt képződhetnek (Halliwell 1991). Ilyen élettani folyamatok például bizonyos enzimatikus folyamatok, így a mitokondriális légzési lánc, amelynek során az elektrontranszportláncból felszabaduló elektronok kölcsönhatásba lépnek a molekuláris oxigénnel, de számos egyéb enzimatikus folyamat, mint a xantin-oxidáz, a ciklooxigenázok, a CYP és a lipoxigenázok fiziológiás működése során is keletkeznek ROS vegyületek (Finkel 2011). Ezenfelül keletkeznek a környezeti patogének elleni védekezés során is, az immunrendszer működése következtében, a polimorf nukleáris granulociták úgynevezett „*respiratory/oxidative burst*" mechanizmusa révén, továbbá a nitrogén-oxid szintáz (NOS) működése során is (Bhattacharyya et al., 2014). Nélkülözhetetlen szerepük van ugyanakkor bizonyos jelátviteli útvonalak aktiválásában, így például az apoptózisban, a nekrózisban, a sejtek növekedésében és az immunrendszer megfelelő működésében (Yang et al., 2013; Zuo et al., 2015). Reaktivitásuk miatt ugyanakkor fontos a ROS vegyületek mennyiségének fiziológiás szinten tartása, amelyért a biológiai antioxidáns védelmi rendszer felel. Amennyiben ez nem lehetséges, akár fokozott ROS képződés, akár az antioxidáns védelmi rendszer csökkent aktivitása következtében, akkor felbomlik a redox egyensúly és oxidatív stressz alakul ki (Sies 1991).

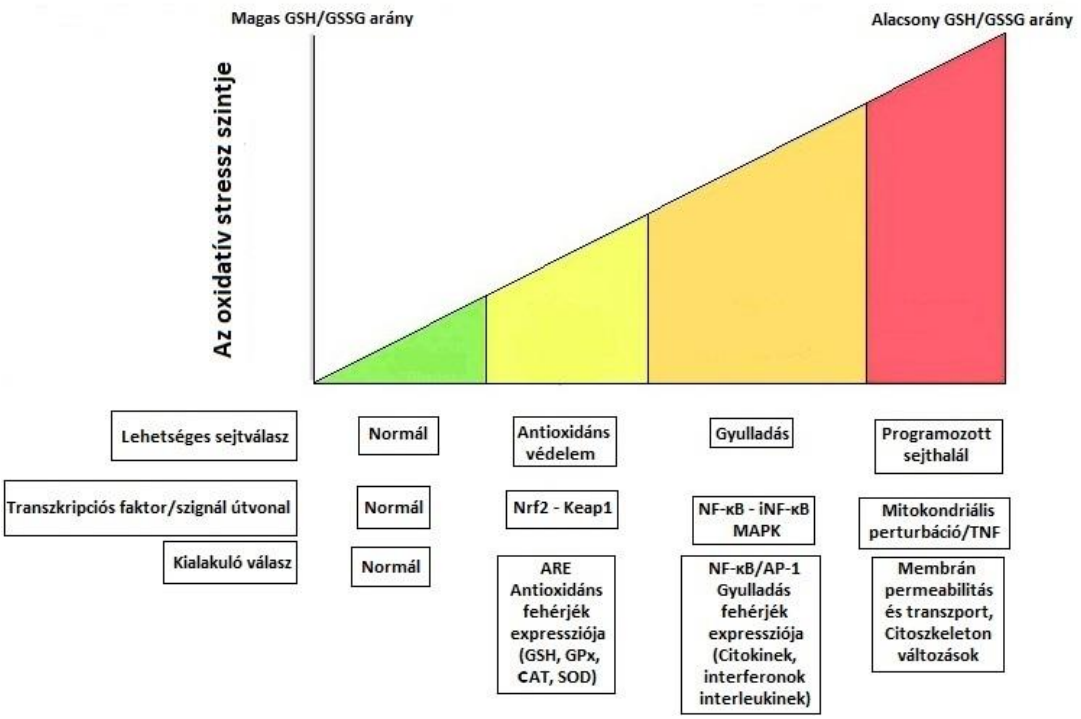
Az oxidatív stressz a szervezet bármely makromolekuláját (DNS, RNS, fehérjék, lipidek) képes károsítani (Cross et al., 1987). A sejt és a sejtorganellum membránokat alkotó foszfolipid kettősrétegben nagy mennyiségben megtalálható többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) kiemelten érzékenyek a (per)oxidatív károsodásokra, amelynek eredményeként a biológiai membránok elvesztik fluiditásukat,

integritásukat és megnő permeabilitásuk (Gutteridge és Halliwell 1990). A DNS oxidatív károsodása során a reaktív oxigéngyökök károsítják a purin és pirimidinbázisokat, valamint a dezoxiribózt, amely egy vagy kettős száltörést, a bázisok módosulását, a dezoxiribóz módosulását, valamint DNS-fehérje keresztkötések kialakulását eredményezheti (Klaunig et al., 2011). Ezenkívül a lipidek peroxidatív károsodásának eredményeként létrejövő metabolitok, mint pl. a malondialdehid (MDA) vagy a 4-hidroxi-2-nonenál, és azok exociklusos DNS-adduktjai hatására pontmutációk (inszerció, deléció) alakulnak ki (Kawai és Nuka, 2018). Az RNS-eket a DNS-hez hasonlóan szintén érhetik oxidatív károsodások, amelynek eredményeként keresztkötések alakulnak ki, valamint száltörés és a bázisok módosulása következik be. Az RNS főleg egyszálú bázisait nem védik hidrogénkötések vagy specifikus fehérjék, ezért hajlamosabbak az oxidatív károsodásra, amely hatással lehet az RNS lánc integritására, emiatt a fehérjeszintézisre és végeredményben a sejtek működésére. Bár az RNS oxidációja nem olyan végzetes, mint a genomi mutációk, ennek ellenére számos olyan neurodegeneratív kórképpel hozták ezeket is összefüggésbe, mint például a Parkinson- vagy az Alzheimer-kór (Liu et al., 2020). A fehérjék (per)oxidációja történhet a reaktív oxigéngyökökkel való közvetlen reakció, vagy az oxidatív stressz hatására kialakuló másodlagos melléktermékekkel - pl. MDA - való indirekt reakció során (Uchida et al., 1997). A ROS hatására oxidálódhatnak az aminosav oldalláncok vagy a fehérje váz (Weismann et al., 2011), amely a fehérje fragmentálódását vagy fehérje keresztkötések kialakulását eredményezheti. Az egyes aminosavak közül a cisztein és metionin a legérzékenyebbek az oxidatív károsodásokra a bennük található szulfhidril csoport miatt. A fehérjék oxidatív károsodása következtében megváltozhat azok fizikai és kémiai tulajdonságai, beleértve a konformációt, a szerkezetet, az oldhatóságot, a proteolízisre való hajlamot, továbbá az enzimaktivitást (Zhang et al., 2013).

Az oxidatív stressz mértékétől függően, a ROS képződés hatására a sejtben különböző redox-érzékeny transzkripciós útvonalak aktiválódhatnak, amelyeket az úgynevezett hierarchikus oxidatív stressz modellel jellemeztek (Gloire et al., 2006; Araujo és Nel 2009).

3.2.1 Az alacsony szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók

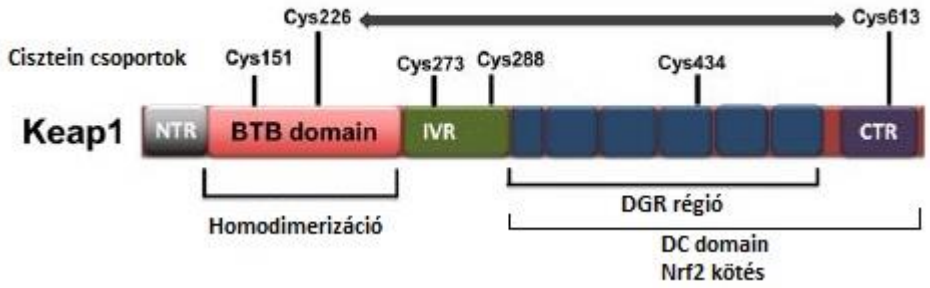
A hierarchikus oxidatív stressz modell szerint mérsékelt oxidatív stressz hatására az antioxidáns (SOD, CAT, GPx) és a detoxifikációs enzimek indukálódnak (2. ábra). Ennek hátterében az úgynevezett *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) - *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2) - Antioxidáns válaszelem (ARE) útvonal indukálódása áll. Az Nrf2 egy, a sejtekben konstitutívan expresszálódó, transzkripciós faktor (Baird és Yamamoto 2020), amelynek fiziológiás szintje általában alacsony az Nrf2 represszor fehérjének (iNrf2 vagy Keap1) köszönhetően (Itoh et al., 2010). A homodimer formában létező Keap1, amely az útvonal fő szabályozójaként működik, adapter fehérje a Cullin-3 E3 ubiquitin ligáz komplex számára (Kobayashi et al., 2004).



2. ábra: Az oxidatív stressz hierachikus modellje (Li et al., 2008 nyomán)
Az oxidatív stressz mértékétől függően különböző reakciós útvonalak aktiválódnak mind molekuláris, mind pedig fehérje szinten. Az alacsony oxidatív stressz hatására az Nrf2-Keap1-ARE útvonal aktiválódik, amely indukálja az antioxidáns enzimeket kódoló gének expresszióját (a háromszög sárga része); közepesen magas oxidatív stressz hatására az immun- és gyulladásos válaszok folyamataiban részt vevő gének csoportját szabályozó NF-κB és MAPK útvonal aktiválódik (a háromszög narancssárga része); magas szintű oxidatív stressz hatására apoptótikus folyamatok indukálódnak.

A Keap1 szerkezetét tekintve 5 funkcionális csoportból áll: N-terminális régió (NTR), BTB (*Broad complex, Tramtrack and Brick-a-brack*) domén, IVR (*intervening, közbeeső*) régió, a DGR (*double glycine repeat*) vagy Kelch domén és a C-terminális (CTR) régió (3. ábra). A DGR domén és a CTR együtt alkotják az úgynevezett DC doméneket. A BTB evolúciósan konzervált domén, amely elősegíti a homodimerizációt, illetve felelős a Keap1 és az Nrf2-specifikus Cullin-3 E3 ubiquitin ligáz adapter fehérje közötti kölcsönhatásért. A DC domén, amely magába foglalja a hat ismétlődő Kelch (kehely) motívumból álló DGR és CTR régiót a Keap1 Nrf2-vel való kötődéséért felelős. A BTB és a DGR domének között elhelyezkedő IVR domén nagyszámű reaktív cisztein csoporttal rendelkezik, amelyek közül a legfontosabbak a *Cys151*, *Cys273* és a *Cys288* (Lee és Hu 2020).

Halakban és kétéltűekben a *keap1* gén két formáját azonosították (*keap1a* és *keap1b*), míg hüllőkben, madarakban és emlősökben csak egy formája ismert. Filogenetikai elemzések szerint az emlős *keap1* gén a *keap1b* ortológja, de a *keap1a*-nak nem (Nguyen et al., 2020).



3. ábra: A Keap1 domén szerkezete (Carmona-Aparicio et al., 2015 nyomán)
A Keap1 5 funkcionális csoportból áll. (1) N-terminális régió (NTR), BTB (*Broad complex, Tramtrack and Brick-a-brack*) domén, amely a homodimerizációt segíti elő. (2) IVR (*intervening, közbeeső*) régió két fontos cisztein csoportot (Cys273 és Cys288) tartalmaz, amelyek az Nrf2 aktivitás repressziójában vesznek részt, (3) A DC domén, amely magában foglalja a (4) DGR (double glycin repeat), vagy Kelch domént, és a (5) C-terminális (CTR) régiót, amely az Nrf2-vel való kötődésért felelős

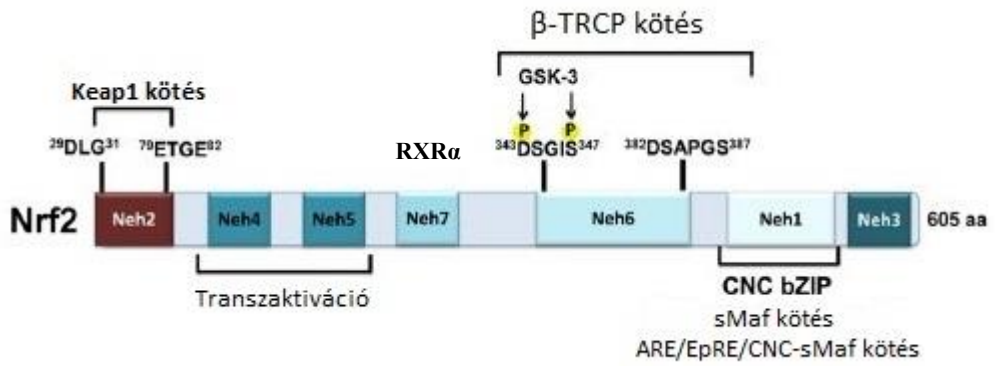
Az Nrf2 hét erősen konzervált funkcionális csoportból, Neh (1-7) doménekből áll (4. ábra) (He at al., 2020).

A Neh1 domén bázikus leucin cipzár (bZIP) szerkezetének köszönhetően az Nrf2 képes sMaf (K, G, F) fehérjékkel heterodimerizálódni, majd a DNS-hez kötődni. A Neh3-5 transzaktivátor domének, amelyek közül a Neh3 az úgynevezett kromo-ATPáz / helikáz DNS-kötő fehérje család tagjával, a CHD6-tal, míg a Neh4-5 domének a CBP-vel (*CREB-binding protein*) lépnek kölcsönhatásba. A Neh7 domén az RXRα-val (*retinoic X receptor alpha*) való kölcsönhatása révén gátolja az Nrf2 célgének expresszióját (He et al., 2020; Wang et al., 2013).

Az Nrf2 N-terminális részén található a degronként funkcionáló Neh2 domén, amely két alegységből, egy alacsony affinitású DLGex (*extended DLG*) és egy magas affinitású ETGE áll, amelyek az Nrf2 Keap1-hez történő kötődését szabályozzák. A két egység között elhelyezkedő hét lizin csoport az ubikvitinizáció célpontjai, amely így lehetővé teszi az Nrf2 transzkripciós aktivitásának negatív szabályozását, vagyis proteoszomális lebontását, fiziológiás körülmények között. A Neh2 domén két alegysége, az ETGE és a DLGex, amelyek Keap1-hez történő kötődése jelentősen különbözik egymástól, és amelyet az úgynevezett „*hinge and latch*" (zsanér és retesz) modellként írtak le. A Keap1 DC domén és az Nrf2 DLGex (retesz) egység kötődése gyors asszociációs és disszociációs kinetikát mutat, amely feltételezhetően lehetővé teszi a rendszer gyors reagálását az elektrofil és oxidatív stresszre adott reakcióban. Ezzel szemben a Keap1 DC domén és az Nrf2-ETGE (zsanér) kétlépéses folyamatban kapcsolódnak egymáshoz. Az első kötési lépést gyors asszociáció és disszociáció, a második kötési lépést viszont lassú reakciók jellemzik, amelynek segítségével stabilabb kötés alakul ki az Nrf2 és Keap1 között. Ez a két különálló kinetikai jellemző fontos szerepet tölthet be az oxidatív stressz érzékelésében (Fukutomi et al., 2014, Baird és Yamamoto 2020).

A Neh6 a Keap1-től független degron, amely szerinben gazdag domén és szintén két alegységből, DSGIS és DSAPGS, áll. A DSGIS egység reakcióba lép egy Cullin-3

alapú E3 ubiquitin ligáz adapter fehérjével, a β-TRCP-vel, amely az Nrf2-t csak foszforilált formában ismeri fel. Az Nrf2 foszforilációját a GSK3β végzi a DSGIS egység 335. és 338. szerin csoportjánál. A GSK3β aktiválódása a PI3K–AKT útvonalon keresztül történik.



4. ábra: Az Nrf2 domén szerkezete (Carmona-Aparicio et al., 2015 nyomán)
Az Nrf2 hét erősen konzervált funkcionális csoportot tartalmaz: a Neh1 az sMaf és DNS kötésért felelős, a Neh2 a Keap1-hez történő kötődésért felelős, a Neh3-5 a transzkripció aktiválásért felelős, a Neh6 az Nrf2 β-TRCP-Nrf2 lebontási útvonalért felelős, míg a Neh7 megköti az RXRα-t és gátolja az ARE génaktivitást

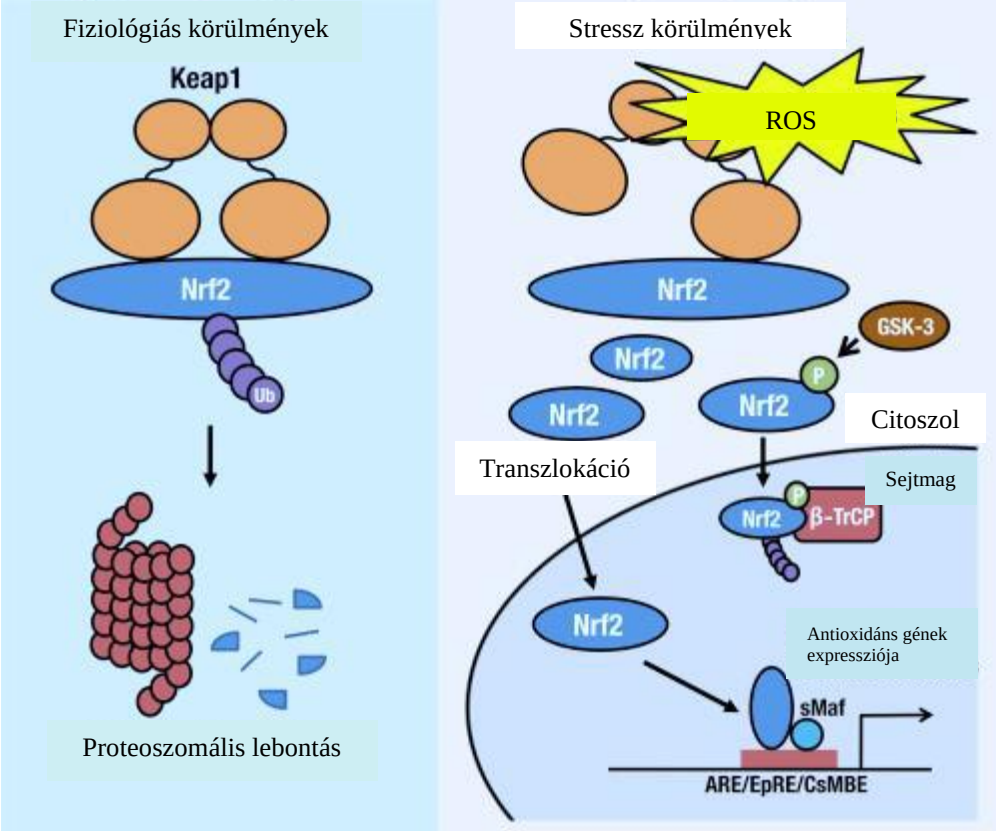
A Keap1 fehérje, vagy más néven iNrf2 (Nrf2 represszor), fiziológiás körülmények között ubikvitinizációt követően a 26S proteoszómába szállítja az Nrf2-t (Lee és Hu 2020), ahol lebontásra kerül ezáltal szabályozva, hogy normál körülmények között az Nrf2 alacsony szinten maradjon, elkerülve a célgének szükségtelen expresszióját. A Keap1-homodimer egy hibabiztos mechanizmus révén közvetlenül érzékeli az oxidatív stresszt, amelyben négy cisztein csoport, a *Cys226*, *Cys613* és *Cys622/624* vesz részt (Suzuki et al., 2019).

Az Nrf2 másik lebontási útvonalában kulcsfontosságú közvetítő a GSK-3β (*glycogen synthase kinase-3 β*), amelyet az AKT-közvetített foszforiláció gátol. Az Nrf2-t a GSK-3β foszforilálja lehetővé téve annak felismerését a β-TrCP (*β - transducin repeat containing protein*) fehérje számára. A β-TrCP-CUL1 E3 ubiquitin ligáz komplex által végzett ubikvitinizációt követően az Nrf2 a proteaszómában lebomlik (Yamamoto et al., 2018).

Érdekes módon a Keap1 által közvetített Nrf2 ubikvitináció és lebontás főként a citoplazmában hat, míg a Keap1-független Nrf2 stabilitási szabályozás citoplazmatikus és nukleáris egyaránt lehet, ami hozzájárul az Nrf2 által közvetített transzkripciós válasz megszűnéséhez (He et al., 2020).

Az *nrf2* transzkripcióját egyéb útvonalak is befolyásolhatják. Így például az *nrf2* gén promóter régiójában szintén található ARE szekvencia, amelynek következtében az *nrf2* képes saját transzkripciójának közvetlen aktiválására, ezáltal pozitív *feedback* mechanizmust biztosítva az Nrf2 hatások amplifikálására (Kwak et al., 2002). Ezenkívül az *nrf2* transzkripciót számos más transzkripciós faktor is szabályozza, így például az aril-szénhidrogén-receptor (AhR) (Miao et al., 2005) és az NF-κB (Nair et al., 2008).

Az *nrf2* poszt-transzkripciós szabályozásában számos mikroRNS (miR), átlagosan 22 nukleotid hosszúságú, egyszálú, nem-kódoló RNS, is részt vesz. Így például a miR-144, miR-28, miR-34, miR-93 és miR-153 (He et al., 2020), amelyek elnyomják a génexpressziót úgy, hogy szekvencia-specifikus módon megkötik az mRNS-molekulákat és ezt követően gátolják a fehérje transzlációt és destabilizálják a mRNS (O'Brien et al., 2018).



5. ábra: Az Nrf2-Keap1-ARE útvonal működése fiziológiás (A) és stressz (B) körülmények között (Suzuki et al., 2016 nyomán)

Fiziológiás körülmények között az Nrf2 az ETGE és DLGex alegységeken keresztül kapcsolódik a Keap1-hez, majd ubikvitinációt követően a 26S proteoszómában lebomlik;
Oxidatív stressz hatására az újonnan szintetizálódott Nrf2 bekerül a sejtmagba, ahol sMAF fehérjékkel kapcsolódik az ARE-hez és az antioxidáns védelmi rendszerben közvetve, vagy közvetlenül résztvevő gének expresszióját indukálja; a GSK-3β foszforilálja az Nrf2-t, amelyet így a β-TrCP felismer és ubikvitinációt követően az Nrf2 a proteoszómában lebomlik, ezzel megakadályozva az Nrf2 sejtmagban való túlzott mértékű felhalmozódását

Az Nrf2 felezési ideje fiziológiai körülmények között rövid, megközelítőleg 20 perc, ezzel szemben a Keap1 felezési ideje körülbelül 12 óra (Yamamoto et al., 2018). Oxidatív stressz hatására a Keap1 felezési ideje csökken (~3,4 óra; Taguchi et al., 2012), míg az Nrf2-é nő (~200 perc; Lee és Hu 2020), ami arra utal, hogy tartós stressz körülmények között a Keap1 lebomlása is hozzájárulhat az Nrf2-függő oxidatív stressz válaszhoz. Ezt követően az újonnan szintetizált Nrf2 bejut a sejtmagba, ahol összekapcsolódik egy sMaf (*small masculoaponeurotic fibrosarcoma*) fehérjével, amely megkönnyíti az ARE-hoz, más néven *Electrophil Response Element* (EpRE) vagy *CNC-sMaf binding element* (CsMBE)-hez való kötődést (Yamamoto et al., 2018). Az Nrf2-Maf heterodimer által felismert *cisz* aktivátor szekvencia az Nrf2 által szabályozott és az antioxidáns védelemért felelős fehérjéket kódoló gének promóter

régiójában található (Itoh et al., 1997). A kapcsolódást követően több, mint 500 olyan gén expressziója aktiválódik, amelyek közvetve vagy közvetlenül részt vesznek az antioxidáns védelemben, a detoxifikációban és a metabolizációban (5. ábra). Így például közvetlenül aktiválja a glutation bioszintézisért felelős enzimek, a reaktív oxigén gyökök detoxifikációjában résztvevő enzimek (pl. GPx, GST), valamint a tioredoxin antioxidáns rendszer enzimjeinek expresszióját. Ezenfelül fontos szerepe van a detoxifikációért felelős fázis I., illetve II. enzimek, valamint a fázis III. transzporter fehérjék expressziójának szabályozásában (Panieri et al., 2020).

3.2.2 A közepesen magas szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók

A reaktív oxigén gyökök mennyiségének, így az oxidatív stressz mértékének növekedésével nem elsősorban az Nrf2-Keap1/ARE útvonal aktiválódik, hanem az immun- és gyulladásos válaszok különböző folyamataiban részt vevő gének csoportját szabályozó NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (2. ábra). Közepesen erős oxidatív stressz hatására ugyanis aktiválódik az IκB kináz (IKK) komplex, amely foszforilálja az NF-κB represszor fehérjét, az IκBα-t, amelynek hatására ubikvitinációt követően a proteoszómában lebontásra kerül. Ennek eredményeként az NF-κB bejut a sejtmagba, ahol specifikus DNS promóter szekvenciákhoz kötődve citokinek, kemokinek, sejt adhéziós molekulák, pro- és antiapoptotikus, valamint az inflammaszóma szabályozásában résztvevő gének expresszióját aktiválja (Sivandzade et al., 2019; Yu et al., 2020).

3.2.3 A magas szintű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók

Az oxidatív stressz szintjének további emelkedésével, egy bizonyos szint felett, már az apoptotikus, vagy nekrotikus szignál útvonalak aktiválódnak (2. ábra). Az apoptózis vagy „programozott sejthalál" során megkülönböztetünk ún. „*extrinsic*", azaz receptor mediált és „*intrinsic*", vagyis a mitokondriumokon keresztüli útvonalat. Az „*extrinsic*" útvonal során a tumor nekrózis faktor (TNF) útvonal aktiválódik, amelynek során létrejön a DISC (*death-inducible signalling complex*), ami előbb a pro-kaszpáz-8, majd a kaszpáz-3 aktiválódását eredményezi. Az „*intrinsic*" útvonal során a mitokondriumból a membrán pórusok megnyílása (*transition pore*), valamint a membrán permeabilitás megváltozása következtében pro-apoptotikus fehérjék szabadulnak ki, amelyek a pro-kaszpáz-9 majd a kaszpáz-3 aktiválódásához vezethetnek (Redza-Dutordoir és Averill-Bates, 2016).

Nekrózis során a reaktív oxigéngyökök koncentrációjának további emelkedésével már olyan súlyos oxidatív károsodás érheti a sejtmembránt alkotó többszörösen telítetlen zsírsavakat, amelynek következtében a sejttartalom az extracelluláris mátrixba jut, ami helyi gyulladásos folyamatok kialakulásához vezethet (Webster 2012).

3.2.4 Az aflatoxin B_1 és a szterigmatocisztin kapcsolata a ROS képzés indukciójával és az oxidatív stresszel

A ROS reaktivitásuk miatt képesek más atomokról vagy molekulákról elektront elvonni, ezáltal további gyökképződést indukálhatnak (Phaniendra et al., 2015). A szervezetben fiziológiás körülmények között is folyamatosan keletkező szabadgyökök

alapszinten tartásáért (Halliwell 1991), vagyis a redox-egyensúly fenntartásáért, elsősorban az antioxidáns védőrendszer a felelős (Surai et al., 2019).

Az AFB_1 a guaniladdukt-képződés során ROS képződést is indukál (Heinonen et al., 1996), amelynek hatására lipidperoxidációs láncreakció indulhat be (Atroshi et al., 2000). A lipidperoxidációt tartják az egyik legfontosabb tényezőnek a mikotoxinok hatására bekövetkező májkárosodás során (Souza et al., 1999), amely a STC esetében is feltételezhető (Sivakumar et al., 2001). A STC, részben lipidperoxidációs folyamatokat indukáló hatása révén, károsíthatja a máj mikroszómák működését (Sivakumar et al., 2001), ami viszont jól ismert módon csökkentheti a xenobiotikum-transzformáló (CYP) rendszer működését (Mézes et al., 1996).

A STC és a ROS képződés összefüggésével kapcsolatban jelenleg még kevés adattal rendelkezünk. Egy *in vitro* vizsgálatban kimutatták a DNS károsodás dózisfüggő növekedését, a ROS szintek, valamint az oxidatív DNS károsodás markerének, a 8-hidroxideoxiguanozin (8-OHdG) mennyiségének növekedését is humán májsejtekben (Gao et al., 2015). Humán neuroblasztóma sejtekben, *in vitro* modellben, 24 órás STC terhelést követően, a sejtek életképességének dózis- és időfüggő csökkenését, fokozott ROS képződést és a lipidperoxidációs folyamatok indukálását, valamint a GSH és egyes antioxidáns enzimek aktivitásának csökkenését tapasztalták (Zingales et al., 2020). A szakirodalomban ugyanakkor kevés gazdasági állatokkal végzett vizsgálati eredmény található, de például egy STC-nel szennyezett takarmányt fogyasztó, brojlercsirkékkel végzett, 14 napos kísérletben megállapították, hogy mesterségesen fertőzött kukorica (1590 µg STC/kg takarmány), illetve nagy tisztaságú STC-terhelés (1570,5 µg STC/kg takarmány), a lipidperoxidációs folyamatok enyhe, de nem szignifikáns mértékű, emelkedését idézte elő (Balogh et al., 2019). Egy patkányokkal végzett, *in vivo*, rövid távú (24 óra) kísérletben emelkedett MDA tartalmat mértek, amikor azokat 10, 20 és 40 mg/kg ttm dózisban STC-nel kezelték (Dubravka et al., 2020). Ez viszont arra utal, hogy a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása nőtt, mert a MDA a folyamat egyik metastabil végterméke. Ezzel egyidejűleg az antioxidáns enzimek közül a vérplazma kataláz (CAT), valamint a vesében a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitásának növekedését, ugyanakkor a májban a glutation-peroxidáz (GPx) aktivitás csökkenését figyelték meg. Ezenfelül a STC szignifikáns mértékű DNS károsodást váltott ki mind a májban, mind a vesében.

Ezzel ellentétben nő azon tanulmányok száma, amelyek azt bizonyítják, hogy az AFB_1 toxikus hatásában jelentős szerepet játszik a ROS képződés, végső soron az oxidatív stressz indukciója (Marin és Taranu, 2012; da Silva et al., 2018; Benkerroum 2020).

A halak antioxidáns rendszerére és lipidperoxidációs folyamataira vonatkozóan is kevés adat áll rendelkezésre a mikotoxinok hatásaival összefüggésben (Anater et al., 2016). Az elérhető adatok jellemzően nílusi tilápiával végzett vizsgálatokból származnak. Így például egyszeri 6 mg AFB_1/ttm kg intraperitoneális kezelést követően, a GSH tartalom, a CAT aktivitás, illetve a teljes antioxidáns kapacitás (TAC) csökkenését, valamint fokozott lipid peroxidációt és GPx aktivitást, illetve *gpx* génexpressziót, tapasztaltak (El-Barbary 2015). Hassan és mtsai. (2020) egy 3 mg AFB_1/kg takarmány koncentrációban szennyezett takarmányt fogyasztó, nílusi

tilápiával végzett 84 napos kísérletben, az alkalmazott dózis hatására a MDA szint emelkedését, valamint a SOD, CAT és a lizozim enzimek aktivitásának csökkenését figyelték meg. Hasonló megfigyeléseket tettek Abdel-Daim és mtsai. (2020) is egy 30 napig tartó kísérletben, amikor az alkalmazott 2,5 mg AFB_1/kg takarmány koncentráció hatására a GSH mennyiségének, a GPx, a SOD és a CAT aktivitásának csökkenését, valamint a MDA tartalom emelkedését tapasztalták. Egy amurral végzett 60 napos etetési kísérletben emelkedő MDA és ROS értékek mellett, csökkent SOD, CAT, GPx, GST, GR aktivitást és GSH mennyiséget tapasztaltak a vesében és a lépben egyaránt. Megfigyelték továbbá az antioxidáns enzimeket kódoló gének expressziójának dózisfüggő változását is (Zeng et al., 2019). Egy pontyokkal végzett 21 napos etetéses kísérletben, emelkedő MDA tartalmat és CAT aktivitást, ugyanakkor a TAC csökkenését figyelték meg (Taheri et al., 2017). Egy másik, nílusi tilápiával végzett kísérletben megállapították, hogy 100 µg AFB_1/kg takarmány koncentráció mellett, 12 hetes kezelés során, a *gpx és gst* gének expressziója szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz viszonyítva (Mahfouz és Sherif 2015). Egy másik vizsgálatban (Mahfouz 2015) 0,2 mg AFB_1/kg takarmány dózisban szennyezett takarmány 16 hétig tartó etetését követően nőtt a *Cyp1a* és csökkent a *Sod*, *Il-1β*, valamint a *Tgf-β* mRNS szintje nílusi tilápia májában.

3.2.5 Mikotoxinok hatása az Nrf2-ARE útvonalon

Az egyes mikotoxinok szabadgyök képző és ennek révén oxidatív stresszt indukáló hatása aktiválhatja az ARE-t az Nrf2-Keap1 útvonalon keresztül (Kozieł et al., 2021), amelynek következtében fokozódik számos, az antioxidáns védelemben résztvevő gén, mint például a glutation bioszintézisért, valamint reaktív oxigén gyökök detoxifikációjában résztvevő enzimek expressziója, ebbe beleértve a glutation peroxidázokat is (Lee és Hu 2020). Megfigyelték, hogy az Nrf2 *knock-out* patkányok meglehetősen érzékenyek az AFB_1 toxicitással szemben, amelynek fő oka, hogy az AFB_1 detoxifikációjáért felelős enzimek expressziója jelentősen csökken (Taguchi et al., 2016). Ezzel szemben a Keap1 *knock-down* egerek, amelyekben az Nrf2 folyamatosan expresszálódik, a vad típushoz viszonyítva jobban ellenálltak a xenobiotikumoknak pl. a paracetamolnak. A Keap1 homozigóta *knock-down* egerek ugyanakkor alultápláltság miatt a választást követően elpusztultak, aminek oka a nyelőcső és gyomor hámrétegének megvastagodása (*hyperkeratosis*) volt (Wakabayashi et al., 2003). A Keap1 fehérje hiánya több egyéb rendellenességgel is összefüggést mutat, így például csont *hypoplasia*, rendellenes vesefejlődés és működés, valamint a hasnyálmirigy atrófia (Kopacz et al., 2020).

AFB_1 hatására a ROS, valamint az *nrf2* gén expressziójának koncentrációfüggő emelkedését figyelték meg. A NAD(P)H kinon dehidrogenáz 1 (NQO1), a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a hem-oxigenáz 1 (HO1) gének expressziója viszont csökkent primer csirke hepatocitákban és kardiomiocitákban *in vitro* modellben (Liu és Wang 2016; Wang et al., 2017). Ezzel ellentétben *in vivo* modellben csirke májban csökkent *nrf2* expressziót figyeltek meg 5 mg AFB_1/kg takarmány koncentráció hatására egy 28 napos kísérletben (Muhammad et al., 2018). Hasonló változást írtak le egy ugyancsak ROS képződést induláló másik mikotoxin, a T-2 toxin hatására is *in vivo* egér agyban (Chaudhary és Rao 2010). Egy másik, ugyancsak bizonyítottan ROS képződést

indukáló mikotoxin, az OTA, hatására 21 napos, brojlercsirkékkel végzett etetési kísérletünkben, a *Keap1* gén expressziójának emelkedését tapasztaltuk a májban 500 és 1000 µg OTA/kg takarmány dózis hatására. A vesében ugyanakkor a kontrollhoz viszonyítva alacsonyabb értékeket mértünk a 7. és 14. napon az 500 µg OTA/kg takarmány, valamint a 21. napon a 100 és 500 µg OTA/kg takarmány dózis hatására. Az *Nrf2* gén expressziója ugyanakkor mindkét szervben és mindhárom mintavételi időpontban a nagyobb dózis hatására emelkedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva (Kövesi et al., 2019).

A halak Nrf2-Keap1-ARE útvonalára vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az egyes mikotoxinok hatásaival összefüggésben. Zearalenon (ZEA) hatására az *nrf2* expresszió koncentrációfüggő csökkenését, de a *keap1a* expressziójának növekedését írták le amurokkal végzett 10 hetes etetési kísérlet során (Wang et al., 2019). DON szennyezett takarmány 60 napos etetését követően szintén megfigyelték az *nrf2* expresszió koncentrációfüggő csökkenését és a *keap1a* expressziójának növekedését amurok bélcsatornájában és kopoltyújában (Huang et al., 2018, 2020). Ezzel szemben egy pontyokkal végzett rövidtávú (24 órás) kísérlet során a DON és a T-2 toxin hatására az *nrf2* és a *keap1* expressziójának emelkedését és csökkenését egyaránt tapasztalták (Pelyhe et al., 2016).

A STC-nek az Nrf2-Keap1-ARE útvonalra kifejtett hatásáról a szakirodalomban nem találtam információt.

3.3 A szervezet antioxidáns rendszerének bemutatása

Az aerob szervezetekben a ROS/RNS* (reaktív nitrogén gyökök) okozta oxidatív károsodások ellen, a redox egyensúly fenntartása érdekében, egy hatékony védelmi rendszer, az ún. biológiai antioxidáns védelmi rendszer alakult ki, amelynek feladata, hogy megvédje a szervezetet az oxigéngyökök okozta sejtszintű, szöveti és szervi károsodásoktól. A szervezetben az antioxidáns védelmi rendszer három szintje alakult ki az oxidatív stressz megelőzésére (Ighodaro és Akinloye 2018).

3.3.1 Az első védelmi szint

Az első védelmi szintet az antioxidáns enzimek (SOD, CAT, GPx, GST és tioredoxin reduktáz [TrxR]) képviselik, amelyek gyökkioltó reakciókat katalizálva képesek a reaktív oxigéngyököket semlegesíteni (Ighodaro és Akinloye 2018). Ide tartoznak továbbá a fémkötő fehérjék (transzferrin, laktoferrin, hemopexin, metallothionein, cöruloplazmin, ferritin és mioglobin), amelyek az átmeneti fémek megkötésével akadályozzák meg a Fenton és Haber-Weiss típusú reakciók révén bekövetkező ROS képződést (6. ábra) (Leonard et al., 2004; Zoidis et al., 2018; Reyhani et al., 2019).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + OH^{-} \qquad (1)$$

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HO_2^{\cdot} + H^{+} \qquad (2)$$

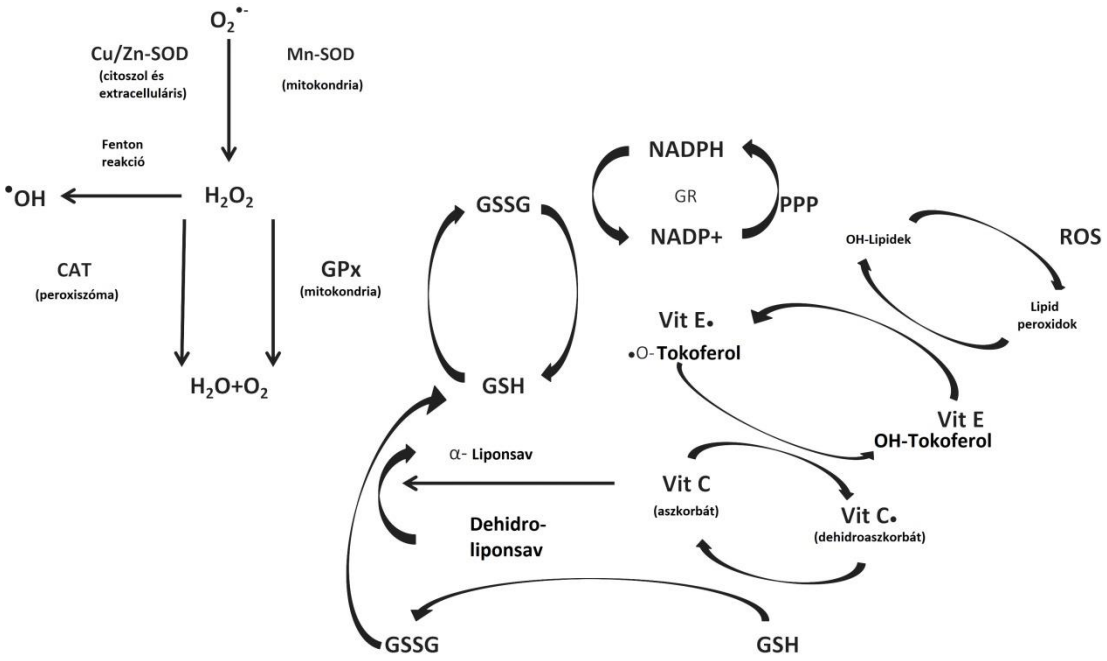
6. ábra: Fenton típusú reakció folyamata (Reyhani et al., 2019 nyomán)
Fém-mediált szabadgyökképződés, amelynek során az átmeneti fémek H_2O_2-vel reagálva toxikus hidroxil-gyök kialakulását eredményezik

Az enzimatikus védőrendszer fontos elemei a SOD-ok, amelyek a mitokondriumokban és a mikroszomákban folyamatosan keletkező szuperoxid-aniongyök hidrogén-peroxiddá történő átalakulását katalizálják (McCord és Fridovich, 2014). A SOD-nak három izoenzimjét azonosították: a CuZn-SOD (SOD1) az eukarióta sejtek citoszoljában található, míg egy ősibb típus a Mn-SOD (SOD2), a prokarióták és eukarióták mitokondriumában van jelen. A harmadik, extracelluláris-SOD (SOD3), az extracelluláris mátrixban található és a SOD1-hez hasonlóan réz-cink tartalmú (Surai 2016). A CAT a SOD működése során keletkező H_2O_2-t bontja vízre és O_2-re, amely elsősorban a peroxiszómákban található (Ighodaro és Akinloye 2018). A GPx enzimeknek fontos szerepük van a szervezetet érő oxidatív hatásokkal szembeni védekezésben a mitokondriumban és a citoszolban egyaránt, mivel a H_2O_2 mellett a szerves peroxidok redukcióját is katalizálják vízzé vagy alkohollá, amelynek során GSH-t használnak elektron donorként (Battin és Brumaghim 2009) (7. ábra). Bár a CAT és GPx működése hasonló, de a H_2O_2-hoz való affinitásuk jelentősen eltér, mert a GPx-nak az alacsony koncentrációban jelenlévő H_2O_2-hoz való affinitása nagyobb, mint a CAT-nak (Baud et al., 2004). Ez azt jelenti, hogy a glutation-redox rendszer az enyhe, míg a CAT a súlyos oxidatív stressz elleni védelemben játszik fontos szerepet (Jurkovič et al., 2008). A GST izoenzimek a fázis II. detoxifikáló enzimek közé tartoznak, amelyek a GSH, valamint számos endogén és exogén elektrofil vegyület, bioszintetikus konjugációját katalizálják (Townsend és Tew, 2003). Ezen felül, peroxidáz aktivitásuk miatt szelénhiányos állapotban, amikor a szelén-dependens GPx izoenzimek aktivitása csökken, fontos szerepet töltenek be az oxidatív stressz során keletkező szerves hidroperoxidok redukciójában (Müller et al., 2010; Alias 2016). A tioredoxin reduktáz szintén szeléntartalmú enzim, amely a tioredoxin redukciója mellett részt vesz a szelenit, a liponsav és a H_2O_2 redukciójában, valamint a dehidro-aszkorbinsav (DHA*) C-vitaminná történő regenerálásában (Arnér 2009). Emellett a tioredoxin rendszer fontos tiol/diszulfid redox szabályozó rendszer is, amelynek védő szerepe van a ROS által közvetített citotoxicitással szemben számos redoxérzékeny transzkripciós faktor, pl. NF-κB, Nrf2 aktivitásának szabályozásával (Lu és Holmgren 2014; Surai és Fisinin 2016).

3.3.2 A második védelmi szint

A második védelmi szintet azok a kis molekulatömegű, nem-enzimatikus antioxidánsok képviselik, amelyek elektron donorként funkcionálva képesek a szabadgyökök által előidézett láncreakciót leállítani, miközben átmenetileg önmaguk válnak reaktív gyökké (Pisoschi és Pop 2015) (7. ábra). Ezek a molekulák lehetnek hidrofil (glutation, húgysav, C-vitamin) vagy lipofil (E-vitamin, A-vitamin) karakterűek, míg más megközelítésben beszélhetünk nutriens és metabolikus antioxidánsokról (Pham-Huy et al., 2008). A nutriens antioxidánsok közé olyan exogén vegyületek sorolhatók, amelyeket a szervezet nem képes előállítani, tehát azokat takarmány vagy táplálék útján kell biztosítani. Ide tartozik a C-vitamin (pl. számos halfajnál), az E-vitamin, egyes flavonoidok és a karotinoidok (Pham-Huy et al., 2008). A lipofil α-tokoferol a foszfolipid membránokhoz kötődve fejti ki antioxidáns hatását. Az α-tokoferol sajátos elhelyezkedése a membránban lehetővé teszi hidroxilcsoportjának a lipid/víz határfelületen való elhelyezkedést, amely könnyű

hozzáférést biztosít a vízoldható L-aszkorbinsavnak az oxidáció során kialakult α-tokoferoxil gyök redukálásához (Marquardt et al., 2013). Az ennek során kialakult DHA*-t részben a GSH redukálja, vagy ebben a formában a vesén keresztül kiürül a szervezetből (Birben et al., 2012). A metabolikus antioxidánsok közé tartoznak azok az endogén vegyületek is, amelyeket a szervezet is képes szintetizálni, mint például az L-arginint, a koenzim Q10-et, a GSH-t vagy a melatonint (Droge 2002).



7. ábra: Az antioxidáns védelem résztvevői (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018 nyomán) Balra felül az enzimatikus rendszer fontosabb elemei, a szuperoxid-dizmutázok, a kataláz, és a glutation-peroxidáz, míg jobbra a fontosabb kis molekulasúlyú nem-enzimatikus antioxidánsok láthatók

A GSH a nem-enzimatikus antioxidáns védelmi rendszer egyik kiemelten fontos tagja, amely megtalálható a citoszolban, a mitokondriumban és az endoplazmatikus retikulumban (Lushchak 2012). A GSH egy három aminosavból álló (γ-Glu-Cys-Gly) peptid, amelynek, *de novo* szintézise két, ATP-függő, enzimatikus lépésben megy végbe. Első lépésben a glutamát és a cisztein kapcsolódását a γ-glutamil-cisztein ligáz (GCL) katalizálja, míg a következő lépésben a glutation-szintetáz (GS) összekapcsolja a glicint a dipeptiddel (Espinosa-Diez et al., 2015). A GCL egy heterodimer enzim, amely két alegységből áll: a GCLc alegység (73 kDa) felelős a katalitikus aktivitásért, míg a GCLc szabályozásáért a GCLm alegység (33 kDa) felelős (Lu 2013). Mind a GCLc-t, mind pedig a GS-t kódoló gének az Nrf2 szabályozása alatt állnak (Lu 2013). Normál körülmények között két fő tényező, a cisztein elérhetősége és a GCL aktivitás határozza meg a GSH szintézis sebességét (Lu 2013). Ezen kívül a GSH szintézisét alloszterikus folyamatok is szabályozzák; az intracelluláris GSH tartalom ugyanis egy bizonyos szint felett a GCL kompetitív gátlását eredményezi (Lu 2009, Lu 2013).

A glutation a szervezetben az egyik legnagyobb mennyiségben megtalálható antioxidáns molekula, amely redukált (GSH) és oxidált (glutation-diszulfid, GSSG) állapotban is jelen van. Redukált állapotban a cisztein aktív tiolcsoportja oxidatív stressz esetén képes elektront átadni a reaktív oxigén szabadgyököknek, ezáltal a GSH fontos szerepet tölt be az oxidatív stressz elleni védelemben (Lushchak 2012). Az elektron leadást követően a GSH maga is reaktívvá válik, glutatiil gyök jön létre, de a sejtekben található viszonylag magas koncentrációja miatt (1-10 mM), könnyen reagál egy másik reaktív glutatiil gyökkel, amelynek következtében GSSG jön létre. A GSH közvetlenül és közvetve is képes a ROS eliminálására. Egyrészt közvetlenül reagál a szuperoxid anionnal és más szabadgyökökkel, míg közvetett módon képes más antioxidáns molekulák, így például a DHA* redukálására (Espinosa-Diez et al., 2015). A sejtben a GSH homeosztázisát, a *de novo* szintézisen kívül, további faktorok is szabályozzák. Ilyenek például a sejten belüli felhasználás, az újrahasznosítás, vagy a sejtből történő efflux mértéke. Fontos szerepe van az enzimatikus antioxidáns védelmi rendszerben is a GPx és a GST ko-szubsztrátjaként. A GSSG-t a glutation-reduktáz (GR) redukálja NADPH felhasználásával. A glutationnak számos további funkciója is van a sejtekben. Így például cisztein tartalék, tárolja és szállítja a nitrogén-monoxidot (NO), részt vesz az ösztrogének a leukotriének és a prosztaglandinok metabolizmusában, a ribonukletoid dezoxiribonukleotidokká történő redukciójában, bizonyos transzkripciós faktorok működésében, valamint számos endogén vegyület és xenobiotikum transzformációjában (Halliwell és Guttridge 1989; Lushchak 2012).

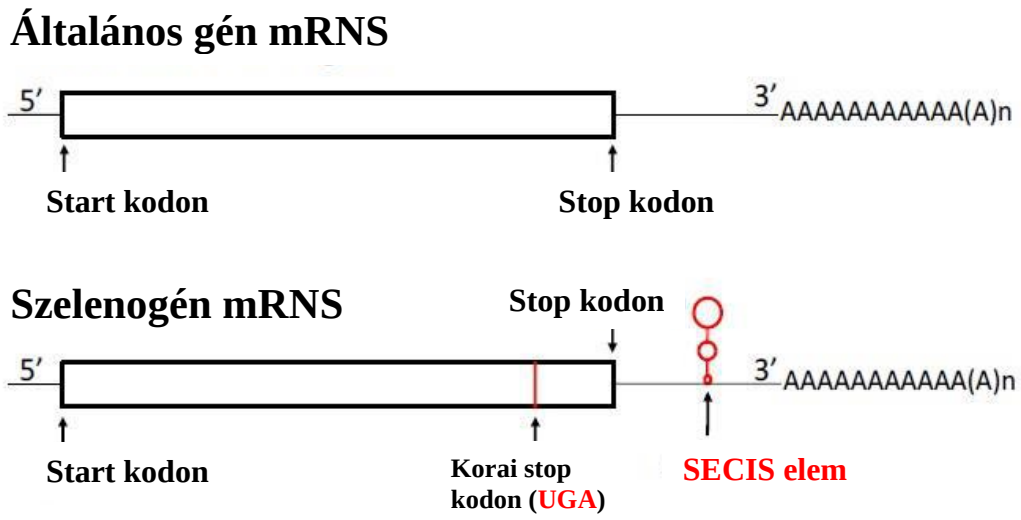
3.3.3 A harmadik védelmi szint

A harmadik védelmi szint fő elemei azok a „*repair*” (helyreállító) molekulák és enzimek, amelyek elsődleges feladata a károsodott makromolekulák (DNS, fehérje, lipid) helyreállítása (metionin-szulfoxid-reduktáz [Msr]; hősokk fehérjék [Hsp]); DNS-repair enzimek, GR), vagy azok eltávolítása (foszfolipázok, proteoszómák) (Surai et al., 2019).

3.4 Szelenoproteinek

Rágcsálókban 24, emberben 25 szelenoproteint azonosítottak, amelyek közül a legfontosabbak a szelén-dependens GPx-ok, amelyek aktív centrumában a szelén szelenocisztein formájában található (Kuršvietienė et al., 2020). A legnagyobb szelenoproteómákat csontos halakban találták, így például zebradánióban 38 szelenoproteint azonosítottak (Mariotti et al., 2012). A sugárúszójú halak korai evolúciójának teljes genomduplikációja miatt a csontos halakban számos szelenogént találtak duplikálva (Taylor et al., 2003).

Normál RNS-ek esetében a nyitott kereten belül (*open reading frame*) az UGA kodon a transzláció során STOP kodonként funkcionál. A szelenocisztein fehérjeláncba történő beépülését a szelenoprotein mRNS-ben található SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) elem, egy speciális *stem-loop* szerkezet az mRNS 3’UTR régiójában, valamint egyéb faktorok, teszik lehetővé. A SECIS elemre válaszul a szelenocisztein $tRNS^{[Ser]Sec}$ az UGA kodont szelenociszteinnek fordítja (8. ábra) (Labunskyy et al., 2014).



8. ábra: Az általános gének és a szelenogének szerkezeti felépítése (Penglase 2014 nyomán)
Az általános gének mRNS-e esetében a transzláció START kodonnal kezdődik és STOP kodonnal zárul, míg a szelenogének esetében az UGA korai stop kodon szelenociszteint kódol

A szelenoproteinek szintézise relatíve lassú folyamat, amely függ a szelén (Se) aktuális utánpótlásától is (Papp et al., 2007). Ugyanakkor, míg egyes szelenoproteinek expressziója Se-hiányos körülmények között szignifikánsan csökken, pl. GPx1, MsrB1, SelW és SelH, addig mások, így például a TR1 és TR3, fehérje expresszióját csak kevésbé szabályozza a szelén hozzáférhetőség. A szelenoprotein expresszió ilyenfajta „hierarchikus" szabályozása mRNS és transzlációs szinten történik, de annak mechanizmusa még nem teljesen feltárt (Sunde és Raines 2011).

Ha az általános RNS-ek nyitott leolvasási keretén belül genetikai mutációkból, *splicing* vagy transzkripciós hibákból következően, korai stop kodon alakul ki (UGA; UAA; UAG), akkor a korai terminációt hordozó mRNS-ből aberráns funkciójú C-terminálisan csonka fehérjék képződnek, amelyek eliminálásáért az úgynevezett nonsense mutáció által mediált RNS lebontási útvonal (*nonsense-mediated mRNA decay, NMD*) felelős (Nickless et al., 2017). A szelenoproteinek esetében az NMD szabályzó útvonalként funkcionál, amennyiben ugyanis a szelén ellátottság megfelelő, a SECIS elemhez kapcsolódó Sec-tRNS az UGA kodont szelenociszteinre fordítja, további két fehérje, a SECIS kötő fehérje-2 (*SECIS binding protein 2;* SBP2), és a Sec-specifikus transzlációs elongációs faktor (*Sec-specific translation elongation factor;* eEFSec) segítségével. A riboszómákhoz és a SECIS elemhez való kötődés mellett, az SBP2 kölcsönhatásba lép az eEFSec-kel, amely megkönnyíti a Sec beépülését a naszcens fehérjeláncba (Labunskyy et al., 2014). Szelénhiányos állapotokban ugyanakkor, a SECIS-hez kapcsolódó fehérje komplex elbomlik, mert az *open reading frame*-ben található UGA kodont STOP kodonként azonosítja a szervezet és az mRNS az NMD útvonalon keresztül elbomlik (Shetty és Copeland 2015). Ugyanakkor leírták azt is, hogy a szelenoproteinek szervezetben betöltött szerepe hatással van szintézisükre is. Ennek alapján megkülönböztethetünk „esszenciális" és „nem esszenciális" szelenoproteineket. Emiatt szelénhiányos állapotokban az „esszenciális" szelenoproteinek megtartják Sec beépítési hatékonyságukat, ezzel elkerülve az NMD szabályozást. A GPx4 például, amely elengedhetetlen a túléléshez, még alacsony szelén ellátottság mellett is NMD-rezisztens marad (Shetty és Copeland 2015).

A szelenogének evolúciós retenciója alapján a Sec katalitikus előnyére következtethetünk. Ciszteinnel (szelenocisztein helyett ciszteint tartalmazó enzim homológok) összehasonlítva, a szelenocisztein feltételezhetően növeli a fehérje stabilitását (Nauser et al., 2014) és a reaktív szabadgyökök okozta inaktivációval szembeni ellenállását (Snider et al., 2013). Lehetővé teszi továbbá az enzimaktivitást tágabb fiziológiai körülmények közt is, mint pl. szélesebb pH tartomány és szubsztrátspecifitás (Gromer et al., 2003). Ezenfelül a Sec gyakran nagyobb katalitikus aktivitást is eredményez, mint a cisztein tartalmú fehérje izoformák. Egyes GPx izoformákban például, ahol a Sec helyébe Cys kerül, megközelítőleg 100-1000-ed részére csökken az enzimaktivitás (Kim és Gladyshev 2005; Yu et al., 2014).

3.4.1 A glutation-peroxidáz enzimcsalád, kiemelten a GPx4

A GPx enzimcsalád a biológiai antioxidáns védelmi rendszer nélkülözhetetlen része, amelynek tagjai megtalálhatók a mitokondriumban, a citoszolban és a sejtmagban egyaránt (1. táblázat). Elsődleges szerepük a SOD működése során keletkező H_2O_2-t vízzé alakítani, valamint a szerves peroxidokat vízzé vagy alkohollá redukálni, amelyhez GSH-t használnak hidrogén donorként (Brigelius-Flohé és Maiorino 2013, Battin és Brumaghim 2009). Míg az enzimcsalád bizonyos tagjai a citoszol és a sejtorganellumok ROS okozta oxidatív károsodásai ellen hatnak, addig mások a membránok védelméért felelősek. Emlősökben eddig nyolc fehérjét azonosítottak, amelyek közül a GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 és GPx6 szelenociszteint tartalmaz, míg a GPx5, GPx7 és GPx8 cisztein tartalmú izoenzimek (Labunskyy et al., 2014). Filogenetikai vizsgálatok alapján a Cys tartalmú GPx7 és GPx8 egy ősi GPx4-ből fejlődött ki, ami a halak és az emlősök szétválása előtt történt, míg a GPx5 és GPx6, a család legfiatalabb tagjai, a GPx3 tandem duplikációjából származnak (Mariotti et al., 2012, Brigelius-Flohé és Maiorino 2013).

1. táblázat: A glutation-peroxidáz enzimcsalád tagjai, előfordulásuk és funkciójuk a szervezetben

Elnevezés	Rövidítés	Katalitikus központ	Lokalizáció	Funkció
glutation-peroxidáz 1 (klasszikus)	GPx1	Sec	citoszol	hemoglobin és a citoszol oxidatív stressz elleni védelme
glutation-peroxidáz 2 (gasztro-intesztinális)	GPx2	Sec	gyomor-bélrendszer epitélium, nyelőcső, máj (humán)	táplálékkal felvett szerves hidroperoxidok redukálása
glutation-peroxidáz 3 (extracelluláris)	GPx3	Sec	vérplazma	redoxpuffer
glutation-peroxidáz 4 (foszfolipid-hidroperoxidáz)	GPx4	Sec	citoszol, mitokondrium, sejtmag	liposzómák, biomembránok védelme, komplex hidroperoxidok redukálása, spermiumok szerkezeti stabilitásának segítése
glutation-peroxidáz 5 (mellékhere-specifikus)	GPx5	Cys	mellékhere	spermatozoák oxidatív stressz elleni védelme
glutation-peroxidáz 6	GPx6	Sec (ember) Cys (ragcsálók és más emlős fajok)	szaglóhám	szaganyagok anyagcseréje
glutation-peroxidáz 7	GPx7	Cys	endoplazmatikus retikulum	redox homeosztázis fenntartása, megfelelő fehérje folding
glutation-peroxidáz 8	GPx8	Cys	endoplazmatikus retikulum	ER-ból kikerülő H_2O_2 okozta oxidatív stressz elleni védelem, kálcium homeosztázis és jelátvitel

*Sec: szelenocisztein; Cys: cisztein

Az enzimcsalád első tagja az 1957-ben, szarvasmarha vörösvértestekből azonosított, klasszikus vagy celluláris GPx1, amely fontos szerepet játszik a hemoglobin oxidatív stressz elleni védelmében (Mills et al., 1957). A GPx1 ezen kívül csökkenti a lipid hidroperoxidok és más oldható hidroperoxidok mennyiségét is, amelyek a membránokat alkotó lipidekből szabadulnak fel a lipidperoxidációs folyamatok során (Martinez et al., 1982; Lubos et al., 2011). A GPx1 az antioxidáns védelmi rendszer fontos tagja (Labunskyy et al., 2014), amelyet az is bizonyít, hogy GPx1 *knock-out* egerekben az akut oxidatív stressz, szelénpótlástól függetlenül, letális (Lubos et al., 2011). A GPx1 emelkedett génexpressziója, ezáltal a H_2O_2, mint fontos jelátviteli molekula, csökkent koncentrációja viszont negatív hatással van a redox-érzékeny jelátviteli kaszkádrendszerekre, így például az inzulin elválasztás szabályozására (Lei és Wang 2012), az epidermális növekedési faktorra (EGFR) (Handy et al., 2009), valamint a TNF α-ra (Kretz-Remy et al., 1996). A GPx1 gén túlzott expresszióját az inzulinelválasztás szabályozására gyakorolt negatív hatása miatt összefüggésbe hozták a fokozott inzulinrezisztenciával, a hiperinzulinémiával, a hiperglikémiával, valamint az elhízás, és következményesen a metabolikus betegség kialakulásával (McClung et al., 2004; Matoušková et al., 2018).

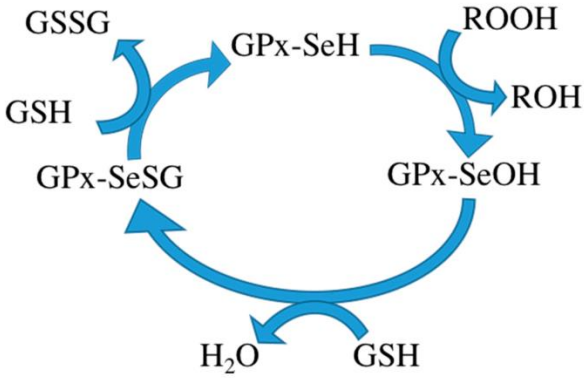
A GPx2 (vagy gasztrointesztinális GPx, GI-GPx) szintézisének szabályozásáért a korábban már említett Nrf2-Keap1/ARE útvonal felelős (Banning et al., 2005). Elsősorban a gyomor-bélrendszer epitéliumában, a nyelőcsőben, és emberben, a májban is expresszálódik. Fő feladata a táplálékkal felvett szerves hidroperoxidok redukálása (Chu et al., 1993). Az emésztőrendszer hámsejtjei által alkotott barrier, a gyulladásos folyamatok okozta emelkedett ROS, és az így kialakult oxidatív stressz hatására károsodhat, ezáltal nő az epitél sejtek permeabilitása, amelynek következtében a szervezetbe jutó patogén mikroorganizmusok fertőzést okozhatnak (Tian et al., 2017). Számos hámsejt eredetű tumorban is megfigyelték a GPx2 megnövekedett expresszióját (Peters et al., 2018). GPx2 *knock-out* egerekben viszont csak UV sugárzással lehetett daganatképződést indukálni (Walshe et al., 2007), amelynek oka feltételezhetően az egerek vastag- és csipőbelében mért emelkedett GPx1 expresszió (Florian et al., 2010). GPx1/GPx2 *knock-out* egerekben ugyanakkor spontán tumorképződést figyeltek meg (Esworthy et al., 2001). GPx2 *knock-down* tumorsejtvonalban azt is leírták, hogy G2/M fázisban ciklin B1 függő módon gátolta a sejtproliferációt (Naiki et al., 2014), sőt a bélhám kriptáiban apoptózist indukált (Müller et al., 2013).

A GPx3, vagy extracelluláris/vérplazma GPx, egy glikoprotein, amely elsősorban a vese proximális tubulus sejtjeiben expresszálódik, de szerepét az extracelluláris térben, főképp a vérben, keringve tölti be (Takahashi et al., 1990). GPx3 *knock-out* egerekben a vérplazma magas ROS szintje a NO hasznosulásának csökkenéséhez, alacsony vérplazma ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentrációhoz, vérrögök kialakulásához és P-szelektin indukcióhoz vezet, amely következményesen agyi infarktust (*stroke*) idéz elő (Pang et al., 2018; Jin et al., 2011). Érdekes módon a GPx3 túltermelődése (*overexpression*) egerekben hőérzékenységet okoz, amit feltehetően a H_2O_2 és a lipid hidroperoxidok csökkent mennyisége, következményesen pedig a Hsp70 indukciójának elmaradása idéz elő (Mirochnitchenko et al., 1995).

A foszfolipid hidroperoxid glutation-peroxidázt (phGPx), azaz a GPx4-t, Ursini et al. (1982) írták le először, mint a liposzómákat és a biomembránokat peroxidációtól védő fehérjét. A 23 kDa tömegű fehérje a citoszolban, a mitokondriumban, valamint a nukleuszban is megtalálható (Liang et al., 2009a). Szerkezetét tekintve monomer enzim, ezáltal eltér a többi, hagyományos GPx-tól, amelyek tetramerek (GPx1, 2, 3, 5, 6) (Ursini et al., 1985). Funkcióját tekintve szintén eltér az enzimcsalád többi tagjától ugyanis a GPx4 közvetlenül redukálja a membránokban és a lipoproteinekben található lipid-hidroperoxidokat (Ursini et al., 1995; Girotti és Korytowski 2017). A GPx1 normál működéséhez foszfolipid-hidroperoxidok esetében a peroxidált zsírsav acil részének hidrolitikus felszabadítása szükséges (Girotti 1998), ezért a GPx1 elsősorban a poláros hidroperoxidok, így például a H_2O_2 és az alkil-hidroperoxidok (pl. kumol-hidroperoxid) redukálásáért felelős (Girotti és Korytowski 2017). A GPx4 azonban képes redukálni egyéb, a lipoproteinekbe vagy membránokba integrálódott, komplex-hidroperoxidokat is, amelyek a koleszterin vagy koleszterin-észterek oxidációjából származnak (Liang et al., 2009b). A membrán-kötött α-tokoferollal együtt, amely lassítja a lipid-peroxil gyökök által katalizált láncreakciót, fontos szerepet játszik a membránok integritásának védelmében a foszfolipid-hidroperoxidok

redukálása révén (Maiorino et al., 2018). A redukció során ugyanakkor a GPx4 nemcsak GSH-t, de egyéb tiolokat is képes szubsztrátként felhasználni. Kimutatták például, hogy érett spermiumokban, ha a GSH limitáló tényező, a GPx4 egyes tiol fehérjékkel is reakcióba léphet protamin tiol peroxidázként funkcionálva. Ez azonban nem az oxidatív stressz elleni védelem része, hanem olyan módon segíti elő a spermiumok szerkezeti stabilitását, hogy egyes szerkezeti fehérjékben diszulfid kötések kialakulását katalizálja (Brigelius-Flohé és Maiorino 2013).

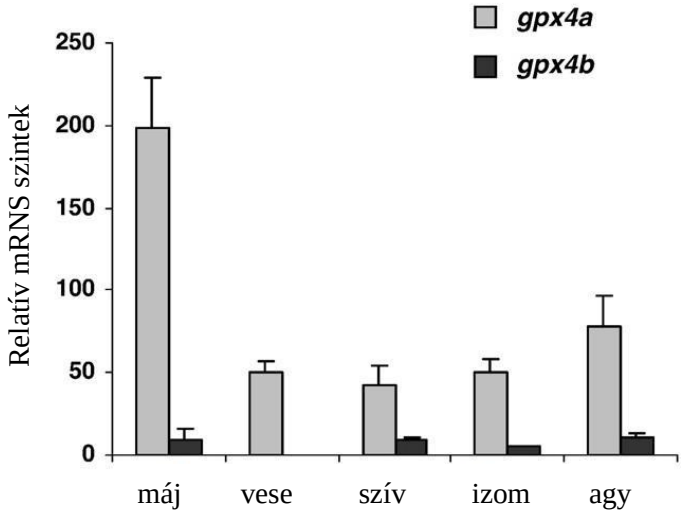
A GPx4 katalízise során a szelenociszteinből disszociált szelenolt (-Se-) egy hidroperoxid oxidálja, amelynek hatására szelénsav (-SeOH) és víz jön létre. A szelénsav reakcióba lép a szabad tiol (-SH) csoportokkal, tipikusan a GSH-val, amelynek során egy átmeneti szelenenil-diszulfidot hoz létre, amit viszont egy második GSH molekula elbont (9. ábra) (Conrad 2009, Huang et al., 2017).



9. ábra: **A GPx katalitikus ciklusa** (Huang et al., 2017 nyomán)

Három különböző, *alternative splicing* révén létrejött, GPx4 mRNS izoformát, úgymint a citoszol (cGPx4), a mitokondriális (mGPx4) és a nukleáris (nGPx4), különböztethetünk meg. A citoszol (rövid) forma mind az embrionális fejlődés során, mind pedig a felnőtt szervekben és szövetekben expresszálódik. Ugyanakkor a nukleáris és mitokondriális izoformák, amelyek NH_2-terminális szekvenciájukban különböznek a citoszol formától, csak a herében fejeződnek ki (Cardoso et al., 2017). A cGPx4 *knock-out* egerek már az embrionális fejlődés korai szakaszában elpusztulnak (Liang et al., 2009b), a nGPx4$^{-/-}$ és mGPx4$^{-/-}$ egerek viszont életképesek voltak (Labunskyy et al., 2014). A spermiumok érésének korai szakaszában a GPx4 magas szinten expresszálódik és katalitikusan is aktív, később azonban inaktiválódik és szerkezeti elemként funkcionál. A GPx4 a szulfhidril keresztkötések kialakítása révén nagy molekulatömegű térhálós polimereket hoz létre, ugyanis intramolekuláris szelenil-diszulfid hidakat képez a Sec és Cys csoportokkal. Ez a szerkezeti elem, az úgynevezett *Sperm Mitochondria-associated Cysteine-rich Protein*-nel (SMCP) együtt, a spermium közepén védőkapszulát hoz létre a mitokondrium-spirál körül (Maiorino et al., 2005; Labunskyy et al., 2014). Az mGPx4 izoforma hiánya hím egerekben infertilitást okozott az enzim gametogenezisben betöltött szerepe miatt (Schneider et al., 2009). Ilyen hatást ugyanakkor nGPx4 *knock-out* egerekben nem tapasztaltak (Conrad et al., 2005).

A GPx4 enzimek génexpressziójáról és halakban betöltött funkciójáról ugyan kevés információval rendelkezünk, de az már ismert, hogy halakban a GPx4 a teljes GPx aktivitás közel egyharmadáért felelős (Grim et al., 2011; Wang et al., 2012). Zebradánióban két génjét (*gpx4a* és *gpx4b*) azonosították és megfigyelték azok expresszióját már az embrionális fejlődés során is (Thisse et al., 2003). Ezüstlazacban szintén két *gpx4* gént azonosítottak (*gpx4a* és *gpx4b*), amelyek közül a *gpx4b* mRNS expresszió minden szövetben meghaladta a *gpx4a* expresszióját (Wang et al., 2012). Pontyban szintén két *gpx4* gént azonosítottak (*gpx4a* és g*px4b*), amelyek expressziója a májban volt a legnagyobb mértékű, majd ezt követően, közel azonos mértékben, az agyban, az izomban, a vesében és a szívben (Hermesz és Ferencz 2009). Említett szerzők kutatásuk során a legnagyobb *gpx4a* mRNS szintet a májban mérték, míg a *gpx4b* mRNS szint minden általuk vizsgált szövetben rendkívül alacsony volt (10. ábra) (Hermesz és Ferencz 2009). Zheng és mtsai. (2013) is kimutatták, hogy a *gpx4a* legnagyobb mértékben a zebradánió májában fordul elő. A *gpx1* paralogokhoz viszonyítva, mind a *gpx4a* mind a *gpx4b* körülbelül 3-szor akkora mennyiségben található meg szivárványos pisztráng májában (Pacitti et al., 2013), ellentétben az emlős máj *gpx1* mRNS mennyiséggel, ami közel 7-szer nagyobb volt, mint a *gpx4* (Weiss et al., 2001).

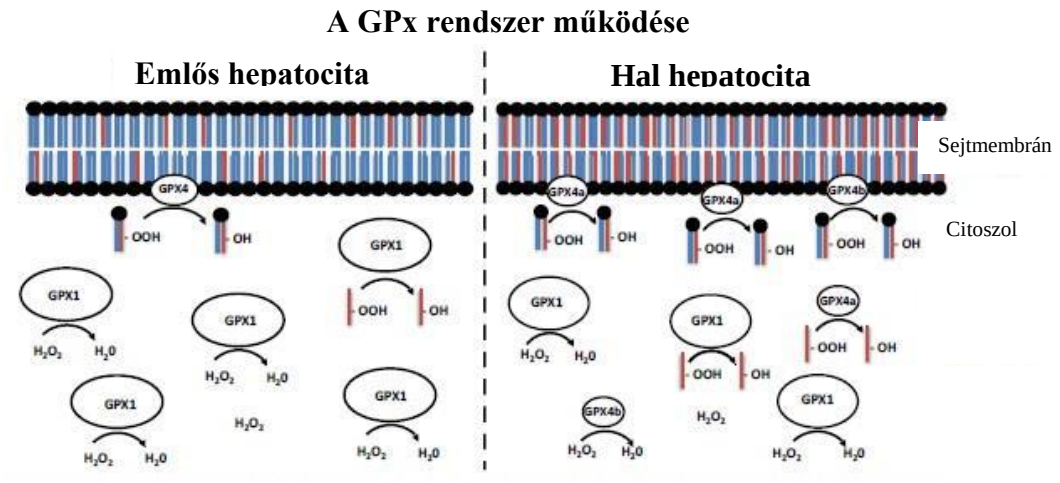


10. ábra: Relatív *gpx4a* és *gpx4b* mRNS szintek ponty májban, vesében, szívben, izomban és agyban (Hermesz és Ferencz 2009 nyomán)

A szárazföldi gerincesekkel összehasonlítva halakban az oxidációra érzékeny többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége (pl. dokozahexaénsav [DHA, C22:6 n-3] és eikozapentaénsav [EPA, C20:5 n-3]) lényegesen nagyobb (Mahaffey 2004). Ennek alapján feltételezhető, hogy a hidrofób sejtmembránokban található többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációjával szembeni védelmére nagyobb GPx4 aktivitás szükséges. Ezt bizonyítja, hogy a GPx4 aktivitás és a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége között pozitív korrelációt figyeltek meg különböző halfajokban (Grim et al., 2011).

Halakban a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (LcPUFA) mennyisége, emlős sejtekkel összehasonlítva, nagyobb, mint a rövid szénláncú többszörösen

telítetlen zsírsavaké (PUFA), vagy akár az egyszeresen telítetlen (MUFA) és telített (SAT) zsírsavaké (Xue et al., 2020). A zsírsavak megtalálhatók szabad formában a citoszolban, vagy membrán kötött állapotban a foszfolipidekben. Az LcPUFA-k igen érzékenyek az oxidációra, ami lipidperoxidációs láncreakcióhoz, következményesen a sejtmembránok károsodásához vezethet (Iuchi et al., 2019). Korábban már említettem, hogy mind a GPx4, mind a GPx1 izoforma képes a hidrofil peroxidok, mint pl. a H_2O_2 vagy a szabad zsírsav hidroperoxidok redukálására, a GPx4 pedig, szerkezetéből adódóan, szélesebb spektrumú szubsztrátspecifitással rendelkezik (Liang et al., 2009b; Girotti és Korytowski 2017). Ennek következtében a halak számára előnyös, ha a glutation-redox rendszerben a multifunkcionális GPx4 paralógok nagyobb arányt képviselnek, mint a GPx1 (11. ábra) (Penglase 2014).



11. ábra: **Emlős és hal GPx rendszer működésének elméleti modellje a hepatocitákban** (Penglase, 2014 nyomán).
Halakban a membrán foszfolipideket alkotó zsírsavak között nagyobb arányban találunk hosszú szénláncú többszörösen telítetlen, oxidációra érzékeny zsírsavakat. A GPx4, a GPx1-gyel ellentétben, nagyobb hatékonysággal eliminálja a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavakból keletkező lipidhidroperoxidokat, ezért az emlősökhoz képest a GPx4 enzimre nagyobb szükség van a halaknál
Piros vonal: hosszú szénláncú telítetlen zsírsavak (LcPUFA); kék vonal: egyszeresen telítetlen és telített zsírsavak

Az enzimcsalád elsőként felfedezett olyan tagja, amely szelenocisztein helyett ciszteint tartalmaz, a mellékhere-specifikus GPx5 (eGPx; Ghyselinck et al., 1989), amely nem szelenoprotein. Fontos szerepe van a spermatozoák oxidatív stressz károsodások elleni védelmében, amelyek veszélyeztetnék integritásukat és következésképpen a megtermékenyülés folyamatát (Chabory et al., 2009).

A homotetramer GPx6 (OMP; Dear et al., 1991) aktív centrumában, emberben szelenocisztein, rágcsálókban és más emlős fajokban pedig cisztein (Cys), található. A GPx6 mRNS-e a szaglóhámban expresszálódik és részt vesz a szaganyagok anyagcseréjében (Goltyaev et al., 2014).

A katalitikus centrumánban szelenocisztein helyett szintén ciszteint tartalmazó GPx7, amelyet először emlős mellrák sejtekből izoláltak (Utomo et al., 2004), és az endoplazmatikus retikulum lumenében található. A GPx7 szubsztrátjai a GPx4-hez hasonlóan szintén a foszfolipid hidroperoxidok. Noha a GPx7 tartalmazza a GSH-kötő

domént, de a többi GPx-tól eltérően nem mutat GPx aktivitást, hanem főleg a tioredoxinnal reagál. A GPx7, amellett, hogy csökkenti a ROS felhalmozódást a sejtben, és ezáltal részt vesz a redox homeosztázis fenntartásában, szerepe van a fehérjék globuláris szerkezetének kialakításában, azaz a *folding* mechanizmusban is (Chen et al., 2016).

A GPx család utolsó tagja a GPx8, amely a GPx7-hez hasonlóan Cys-t tartalmazó monomer enzim. Elsősorban az endoplazmatikus retikulum (ER) belső membránperoxidázaként fordul elő, aktív helyével az ER lumenébe nyúlva és a GPx7-hez hasonlóan fontos szerepe van a megfelelő fehérje *foldingban*. Ezen túlmenően szerepe van az ER-ból kikerülő H_2O_2 okozta oxidatív károsodások elleni védelemben (Ramming et al., 2014), valamint a kálcium homeosztázisban és jelátvitelben (Yoboue et al., 2017). A GPx8 transzkripciót a hipoxia-indukálható faktor 1α (*hypoxia-inducible factor 1α*) szabályozza. Azt is leírták, hogy GPx8 depléció az inzulin szignál kaszkádokat is befolyásolja (Bosello-Travain et al., 2015).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 A kísérletek során alkalmazott mikotoxinok

A kísérletekhez felhasznált mikotoxinok közül a nagy tisztaságú (99,0%) STC-t a Romer Labs (Tulln, Ausztria) cégtől szereztük be, míg az AFB_1-et, kollaboráció keretében, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezetbiztonsági Tanszék állította elő kukoricadara szubsztráton. Az AFB_1 termeléséhez egy *Aspergillus flavus* (ZT80) (Dobolyi et al., 2013) törzset alkalmaztak.

4.1.1 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése

A pontyokkal végzett kísérletben egy kereskedelmi forgalomban kapható extrudált, lassan süllyedő, növendék pontyok számára kifejlesztett (Aqua Garant Classic™, Garant-Tiernahrung, Pöchlarn, Ausztria) takarmányt használtunk, amelyet ledaráltunk, majd az AFB_1-et ismert koncentrációban tartalmazó kukoricadarával kevertük össze. A STC-nel kezelt csoportok esetében a STC-t először abszolút etanolban feloldottuk, majd azt egyenletesen a ledarált takarmányra permeteztük a vizsgálni kívánt koncentrációhoz szükséges mennyiségben. Az alaptakarmány AFB_1-et és STC-t, előzetesen elvégzett laboratóriumi vizsgálattal ellenőrizve a detektálhatósági határértéknél kisebb mennyiségben tartalmazott. Az egyes kezelési csoportok adagjait közvetlenül a felhasználás előtt 1:4 arányban desztillált vízzel hígítottuk, annak érdekében, hogy gyomorszondán keresztül adagolható legyen. Kontrollként az alaptakarmány vizes keverékét (1:4) alkalmaztuk. A takarmányok vizes szuszpenziójának adagolása pipetta segítségével történt.

4.1.2 A takarmányok mikotoxin tartalmának meghatározása és annak módszere

A kontroll, valamint a mesterségesen szennyezett takarmányok aflatoxin tartalmának meghatározása immunaffinitás előtisztítást követően nagy felbontású folyadékkromatográfiás (FAML-A-02:2016 AFLAPREP® HPLC) módszerrel, fluorimetriás detektálással (gerjesztés: 350 nm; emisszió: 430 nm) történt (Food Analytica Kft., Gyula). A STC meghatározására pedig HPLC-UV (abszorpciós maximum: 254 nm) módszert alkalmaztak (Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológia Tanszék). Az eredményeket a 2. táblázatban mutatom be.

2. táblázat: A kísérletekben felhasznált takarmányok mikotoxin tartalma (Aflatoxin – A1-A2-A3 csoportok; Szterigmatocisztin-S1-S2-S3 csoportok; Aflatoxin+Szterigmatocisztin-A-S-AS csoportok)

	Kezelési csoportok	Mennyiség (µg/kg takarmány)
Kontroll	Kontroll	AFB_1 <1,0; AFB_2 <1,0 STC<1,0
Aflatoxinnal kezelt csoportok	A1 (alacsony)	AFB_1: 93,5; AFB_2: 5,7
	A2 (közepes)	AFB_1: 187,1 AFB_2: 11,5
	A3 (magas)	AFB_1: 374,1 AFB_2: 23,0
Szterigmatocisztinnel kezelt csoportok	S1 (alacsony)	1000
	S2 (közepes)	2000
	S3 (magas)	4000
Aflatoxinnal és szterigmatocisztinnel kezelt csoportok	A (aflatoxin)	100
	S (szterigmatocisztin)	1000
	A+S (kombinált)	AFB_1: 100 STC: 1000

4.2 Kísérleti protokollok

4.2.1 A vizsgálat helyszíne

Vizsgálataim helyszínéül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszéke szolgált. A pontyokkal folytatott takarmányozási kísérleteket a Tanszék Kísérleti Terén végeztem. A halakon végzendő molekuláris biológiai vizsgálatokhoz szükséges állatkísérleti engedéllyel rendelkeztünk (Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága XIV-I-001/2304-4/2012).

4.2.2 Kísérleti állatok és tartásuk

Kísérleteimet Szarvasi P34 hibrid pontyokkal végeztem, amelyeket az Akasztói ÖKO 2000 Kft.-től szereztem be. A kezelés előtt egy hetes akklimatizációs időt alkalmaztunk, mely idő alatt az állatokat 200 L-s tartályokban tartottuk. Ezt követően a pontyokat véletlenszerűen osztottuk kontroll és mikotoxinokkal kezelt csoportokba (n=22/csoport). Tartásuk 4, azonos űrtartalmú (150 L), akváriumban történt. A 150 L-es akváriumokat 120 L-ig töltöttük, így az AFB_1-gyel végzett kísérletben a telepítési sűrűség 0,28 g/L, a STC-nel végzett kísérletben 0,22 g/L, míg az AFB_1-gyel és STC-nel végzett kísérletben 0,41 g/L volt. A kontroll és kezelt csoportok tartására szolgáló akváriumokba az esetleges mortalitás miatt 22 halat helyeztünk, amelyekből a vizsgálat során mintázott állatok száma 18 volt a vizsgálat 24 órás periódusa alatt. A random csoportosítás során véletlenszerűen kiválasztott 6 állatot abszolút kontrollként mintáztunk a 0. időpontban.

Az állatokat az akklimatizációs idő alatt fél-statikus rendszerben, naponta 30% mértékű vízcserével, pihentetett, folyamatosan átlevegőztetett csapvízben tartottuk, míg a kísérlet időtartama alatt statikus rendszerben, pihentetett, folyamatosan átlevegőztetett csapvízben. Az akklimatizációs idő alatt takarmányozás nem történt. A víz hőmérséklete 19 ± 1 °C volt. A kísérletek során a világítást automatavezérlésű fényprogram biztosította 12 óra világos és 12 óra sötét intervallumokra programozva. Az állatok testtömege a kísérlet indításakor az AFB_1-gyel végzett kísérletben 34,20 ± 3,99 g, a STC-nel végzett kísérletben 27,09 ± 5,38 g, míg az AFB_1-gyel és STC-nel végzett kísérletben 49,07 ± 8,85 g volt. A kísérlet során alkalmazott mikotoxin testtömegre vetített dózisok a 3. táblázatban láthatóak. A kísérletek során az egyes halaknak adagolt takarmány mennyiséget a halak testtömege alapján egyedenként határoztuk meg. A halak testtömegére vonatkoztatva a bejuttatandó takarmány mennyisége az AFB_1-gyel végzett kísérletben 1,46 %, a STC-nel végzett kísérletben 1,85 %, míg az AFB_1-gyel és STC-nel végzett kísérletben 1,02% volt. A takarmány adagolását megelőzően bódítást nem alkalmaztam.

3. táblázat: A kísérlet során alkalmazott mikotoxin dózisok az egyes csoportokban (µg/kg testtömeg)

Kezelési csoport	Kontroll	A1	A2	A3
AFB_1	<1,0	1,46	2,92	5,85
Kezelési csoport	Kontroll	S1	S2	S3
STC	<1,0	18,89	36,95	72,70
Kezelési csoport	Kontroll	A	S	A+S
AFB_1+STC	<1,0	0,95	10,27	0,95 + 10,27

4.3 Mintavételezés

A kísérlet kezdetén (n=6, abszolút kontroll), majd az egyszeri gyomorszondás kezelést követően a 8., 16. és 24. órában kezelésenként, véletlenszerűen kiválasztott 6-6 egyedből vettünk mintákat. Szegfűszeg olaj tartalmú vízben (≅0,3 mg/l) történő kábítást, majd dekapitációt követően az állatokból *post mortem* májmintát vettem a molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. A génexpressziós vizsgálatokhoz vett májmintákat a mintavételt követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

4.4 Génexpressziós vizsgálatok

4.4.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR

A kísérleti állatok májmintáiból, 5 mg szövetből, NucleoZOL reagenssel (Macherey-Nagel, Düren) teljes RNS-t tisztítottam a gyártó előírásai szerint. Ezt követően az RNS-t jéghideg izopropanollal kicsaptam, majd 75% (v/v)-os etanollal mostam, végül RN-áz mentes vízben feloldottam. Az RNS tisztítást követően a genomi DNS szennyeződést a gyártói protokoll alapján DNáz I (Thermo Fisher Scientific, San José) kezeléssel távolítottam el. A DNáz kezelt RNS integritását, koncentrációját és tisztaságát 1,5 %-os agaróz gélben és nanofotométer (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, San José) segítségével vizsgáltam. További vizsgálatra azon mintákat fogadtam el, amelyek OD 260/280 mutatója 2,0 feletti értékeket mutatott. Az RNS-ből kezelési csoportonként poolokat hoztam létre, egyedenként azonos mennyiségű RNS-ből (n=6), majd 1000 ng poolozott RNS-ből random nonamerrel (9-mer) reverz transzkripció során, a gyártó protokollja alapján (RevertAID Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, San José) cDNS-t készítettem, amelyből a qPCR méréseket végeztem.

4.4.2 Real-time PCR vizsgálatok ponty fajban

A glutation-peroxidáz 4a és b (*gpx4a* és *gpx4b*) továbbá a glutation-szintetáz (*gs*) és a glutation-reduktáz (*gr*) valamint az Nrf2 (*nrf2*), Keap1 (*keap1*) célgének, és a *β-actin* belső kontroll gén, expresszióját kvantitatív real-time PCR-rel, SYBRGreen módszerrel határoztam meg. A vizsgálatokhoz felhasznált primereket a szakirodalom alapján választottam (Hermesz és Ferencz, 2009; Jiang et al., 2015, Safari et al., 2016) ki (4. táblázat). A mérésekhez a Step One Plus™ Real-Time PCR systems (Thermo Fisher Scientific, San Jose) készüléket használtam, Maxima SYBRGreen qPCR Master Mix (1x final concentration) felhasználásával (Thermo Fisher Scientific, San Jose), 5 ismétlésben. A mérésekhez 12,5 µl végtérfogatban 2,31 µM primert és 5 ng cDNS-t használtam templátként. 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 72 °C 30 sec, 45 cikluson keresztül ismételve. Az *nrf2* és *keap1* célgének esetében pedig 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95 °C 15 sec, 60 °C 30 sec és 72 °C 30 sec, 45 cikluson keresztül. A *gs* és *gr* gének esetében 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95 °C 15 sec, 56,5 °C 30 sec és 72 °C 30 sec, 45 cikluson keresztül. A SYBERGreen jelet minden ciklus extenzió-lépésének végén detektálta a berendezés.

4. táblázat: A vizsgálat során alkalmazott primer szekvenciák

Gén	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
β-actin	GCAAGAGAGGTATCCTGACC	CCCTCGTAGATGGGCACAGT
gpx4a	GGAACCAGGAACAAATTCCC	AGATCCTTCTCCACCACGCTTG
gpx4b	CTACAAGGCAGAGTTTGACCTC	CTTGGATCGTCCATTGGTCC
gs	ACCATGACATACCGCTGACAT	TGTTCCCCATAGATCAGTAGAGGAT
gr	ACTCGTGCAGGTGTCTATGC	TTTGGAGTCTGCTTTGCCCT
keap1	GCTCTTCGGAAACCCCT	GCCCCAAGCCCACTACA
nrf2	TTCCCGCTGGTTTACCTTAC	CGTTTCTTCTGCTTGTCTTT

4.4.3 Real-time PCR eredmények kiértékelése

A PCR termék specifitását és a primer dimerek jelenlétét 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 (-ΔΔCt), végül az RQ (relatív kvantifikáció; $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) értékeket (Livak és Schmittgen, 2001).

4.4.4 Statisztikai értékelés

A kísérleti eredmények statisztikai értékeléséhez leíró statisztikai számításokat, egytényezős és kétutas varianciaanalízist (ANOVA) végeztem. A variancianalízis előtt az eredmények normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel, a variancia homogenitását pedig Bartlett teszttel ellenőriztem. A számítások GraphPad Prism 7.0 szoftverrel (GraphPad Software, San Diego) történtek. Az ANOVA értékelés alapján az egyes mintavételi időpontokban az egyes csoportok értékeit paraméterenként hasonlítottam össze.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

5.1 Rövidtávú AFB_1 terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására pontyok májában

A kísérlet során három emelkedő dózisú AFB_1 terhelés hatását vizsgáltam a glutation redox rendszer egyes elemeire, valamint a rendszer szabályozásáért felelős gének expressziójára. A kísérlet során alkalmazott dózisok a következők voltak: az A1 kezelési csoportban 1,46; az A2 csoportban 2,92; az A3 csoportban 5,85 µg/kg testtömeg mikotoxin dózisokat alkalmaztam, amelyet a 3. táblázatban mutattam be. Az alkalmazott dózisok megtervezéséhez az Európai Unió által a takarmányalapanyagokra megszabott maximális AFB_1 tartalom (20 µg/kg takarmány [574/2011/EK]) nyújtott kiindulási alapot. A 24 órás kísérlet alatt 8 óránként történtek a mintavételek.

A 24 órás vizsgálati időszak alatt elhullást, illetve szubletális tüneteket egyik kezelési csoportban sem tapasztaltam.

A *keap1* gén expressziójában a 8. órai mintavételkor minden kezelési csoportban, míg a 16. órai mintavételkor csak az A3 csoportban tapasztaltam szignifikáns mértékű csökkenést a kontrollhoz viszonyítva, ugyanakkor a 24. órában nem volt eltérés (5. táblázat).

Ezen paraméter esetében szignifikáns mértékű eltérést tapasztaltam a kontroll értékekben az egyes mintavételi időpontok között is, a 8. órában magasabb, míg a 24. órában alacsonyabb értéket mértem. Az A1 és A3 csoportban minden mintavételi időpontban alacsonyabb értéket mértem a 0. időponthoz viszonyítva, míg az A2 csoportban a 8. és 24. órában tapasztaltam szignifikáns mértékű csökkenést. A két-utas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett a *keap1* génexpresszióra (5. táblázat).

5. táblázat A *keap1* gén expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,02± 0,20**B**	1,56± 0,14^{c}**C**	0,94± 0,15^{b}**B**	0,41± 0,03**A**	T: < 0,0001 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
A1 (alacsony)		0,64± 0,13^{b}**AC**	0,77± 0,13^{b}**C**	0,42± 0,07**A**	
A2 (közepes)		0,62± 0,14^{b}**AC**	0,84± 0,19^{b}**BC**	0,44± 0,12**A**	
A3 (magas)		0,35± 0,09^{a}**A**	0,48± 0,08^{a}**AC**	0,58± 0,15**C**	

a, b,c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
A1 kezelési csoport: 1,46; A2 kezelési csoport: 2,92; A3 kezelési csoport: 5,85 µg AFB_1/kg testtömeg

Az *nrf2* gén expressziójában a 16. órában az A2 és A3 csoportban csökkenést, míg az A1 és A3 csoportokban a 24. órában a kontrollhoz viszonyítva emelkedést tapasztaltam (6. táblázat).

A kontroll értékekben is tapasztaltam szignifikáns mértékű eltérést, ugyanis a 16. órában magasabb értéket mértem, míg a többi mintavételi időpontban a mért értékek már nem tértek el szignifikáns mértékben. Az A1 csoportban a 16. és 24. órában volt magasabb az érték, míg az A2 csoportban csak a kezdeti (8. óra) időpontban volt csökkenés. Az A3 csoportban a 8. órában csökkenést, míg a 24. órában emelkedést tapasztaltam a 0. órai mintavételhez képest. A két-utas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett az *nrf2* génexpresszióra (6. táblázat).

6. táblázat A *nrf2* gén expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,06± 0,37**A**	0,68± 0,21**A**	1,90± 0,12^{c}**B**	0,76± 0,16^{a}**A**	T: < 0,0001 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
A1 (alacsony)		0,88± 0,15**A**	1,66± 0,28^{c}**B**	1,61± 0,49^{b}**B**	
A2 (közepes)		0,66± 0,09**B**	0,68± 0,20^{a}**AB**	0,88± 0,14^{a}**AB**	
A3 (magas)		0,65± 0,11**C**	1,25± 0,21^{b}**AB**	1,56± 0,13^{b}**B**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
A1 kezelési csoport: 1,46; A2 kezelési csoport: 2,92; A3 kezelési csoport: 5,85 µg AFB_1/kg testtömeg

A g*px4a* gén expressziója a 8. órában az A3 csoportban szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz viszonyítva, míg a 16. és 24. órában minden kezelési csoportban emelkedést tapasztaltam (7. táblázat).

A kontroll csoportban a 16. és 24. órában alacsonyabb értékeket tapasztaltam, mint a korábbi mintavételi időpontokban. Az A1 és A2 csoportokban minden mintavételi időpontban alacsonyabb értékeket mértem, mint a kísérlet kezdetekor, míg az A3 csoportban a 8. órai csökkenést, a későbbiekben a 0. órai értékekhez történő emelkedés követte. A két-utas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett a g*px4a* génexpresszióra (7. táblázat).

A g*px4b* gén esetében az A1 és A3 csoportokban a 8. órában szignifikáns mértékű expresszió csökkenést tapasztaltam a kontrollhoz képest, míg a 16. órában az A1 és A3 csoportokban, a 24. órában pedig minden kezelési csoportban szignifikáns mértékű emelkedést figyeltem meg (8. táblázat).

Ezen paraméter esetében is voltak a kontroll értékekben szignifikáns mértékű eltérések az egyes mintavételi időpontok között ugyanis a 16. és 24. órában a korábbi értékekhez képest kisebb értéket mértem. Az A1 csoport esetében bár alacsonyabb, de nem szignifikáns mértékű eltérést mértem, míg az A2 csoporban a 16. órában, az A3 csoportban pedig a 8. órában szignifikáns mértékű volt a csökkenés. A két-utas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett a g*px4b* génexpresszióra (8. táblázat).

7. táblázat A *gpx4a* gén expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,06**C**	0,84± 0,08^{b}**C**	0,33± 0,02^{a}**A**	0,57± 0,08^{a}**B**	T: < 0,0001 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
A1 (alacsony)		0,79± 0,11^{b}**A**	0,69± 0,07^{b}**A**	0,69± 0,13^{b}**A**	
A2 (közepes)		0,79± 0,07^{b}**AB**	0,68± 0,01^{b}**A**	0,80± 0,02^{b}**B**	
A3 (magas)		0,38± 0,03^{a}**A**	1,00± 0,13^{c}**C**	1,00± 0,06^{c}**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05), adott mintavételi időponton belül
A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
A1 kezelési csoport: 1,46; A2 kezelési csoport: 2,92; A3 kezelési csoport: 5,85 µg AFB_1/kg testtömeg

8. táblázat A *gpx4b* gén expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,10**BC**	1,02± 0,12^{c}**B**	0,64± 0,06^{a}**A**	0,68± 0,07^{a}**A**	T: < 0,0046 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
A1 (alacsony)		0,85± 0,07^{b}**BC**	0,90± 0,08^{bc}**BC**	0,99± 0,17^{bc}**BC**	
A2 (közepes)		1,11± 0,15^{c}**C**	0,76± 0,09^{ab}**A**	0,90± 0,06^{b}**AB**	
A3 (magas)		0,53± 0,05^{a}**A**	1,03± 0,16^{c}**BC**	1,08± 0,18^{c}**BC**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05) adott mintavételi időponton belül
A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
A1 kezelési csoport: 1,46; A2 kezelési csoport: 2,92; A3 kezelési csoport: 5,85 µg AFB_1/kg testtömeg

A *gs* gén expressziója az A1 csoportban a 8. órában szignifikáns mértékben emelkedett, míg az A3 csoportban csökkent a kontrollhoz viszonyítva, viszont a 16. órában minden kezelési csoportban, míg a 24. órában az A1 és A3 csoportokban szignifikáns mértékű emelkedést figyeltem meg (9. táblázat).

A kontroll csoportban a 16. és 24. órai mintavételkor alacsonyabb értékeket mértem, mint a korábbi mintavételi időpontokban. Ezzel ellentétben az A1 csoportban a 8. és 16. órai mintavételkor szignifikáns mértékű emelkedést figyeltem meg. Az A3 csoportban a 8. órában csökkenést, míg a 24. órában emelkedést tapasztaltam a 0. órai mintavételhez képest. A két-utas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett a *gs* génexpresszióra (9. táblázat).

A *gr* gén esetében az A2 és A3 csoportokban a 8. órában szignifikáns mértékű expresszió csökkenést, míg a 16. órában az A1 csoportban szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam. A 24. órára az értékek kontroll közeli szintre tértek vissza (10. táblázat).

Az időbeni változásokat tekintve a kontroll csoportban mindhárom mintavételi időpontban csökkent a *gr* gén expressziója a 0. órához képest. Az A1 csoportban a 8. és 24. órai mintavételkor csökkent, míg a 16. órában ennek értéke megemelkedett. Ugyanakkor az A2 és A3 csoportban minden mintavételi időpontban csökkent

expresszió értékeket mértem a 0. órához viszonyítva. A két-utas ANOVA eredményeként megállapítható volt, hogy a kezelés (T), az idő (H) és kezelés x idő (TxH) együttesen egyaránt szignifikáns mértékű hatással rendelkezett a *gr* génexpresszióra (10. táblázat).

9. táblázat A *gs* gén expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,01**B**	0,95± 0,06^{b}**B**	0,45± 0,05^{a}**A**	0,62± 0,06^{a}**A**	T: < 0,0001 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
A1 (alacsony)		1,44± 0,17^{c}**A**	3,64± 0,44^{d}**C**	1,15± 0,15^{b}**B**	
A2 (közepes)		1,12± 0,17^{b}**B**	0,77± 0,09^{b}**A**	0,62± 0,07^{a}**A**	
A3 (magas)		0,29± 0,07^{a}**A**	1,19± 0,22^{c}**BC**	1,30± 0,12^{b}**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05) adott mintavételi időponton belül

A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)

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

A1 kezelési csoport: 1,46; A2 kezelési csoport: 2,92; A3 kezelési csoport: 5,85 µg AFB_1/kg testtömeg

10. táblázat A *gr* gén expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,11**C**	0,79± 0,07^{b}**B**	0,67 ± 0,12^{ab}**AB**	0,56± 0,10^{ab}**A**	T: < 0,0001 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
A1 (alacsony)		0,83± 0,14^{b}**A**	1,37± 0,24^{c}**B**	0,71± 0,06^{b}**A**	
A2 (közepes)		0,60± 0,04^{a}**B**	0,52± 0,11^{a}**AB**	0,41± 0,12^{a}**A**	
A3 (magas)		0,54± 0,04^{a}**A**	0,80± 0,10^{b}**B**	0,54± 0,03^{a}**A**	

a, b felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05) adott mintavételi időponton belül

A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)

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

A1 kezelési csoport: 1,46; A2 kezelési csoport: 2,92; A3 kezelési csoport: 5,85 µg AFB_1/kg testtömeg

5.1.1 Megbeszélés

A változó testhőmérsékletű, azaz poikiloterm állatoknál, mint például a halaknál, a környezeti paraméterek, elsősorban a víz hőmérséklete, határozzák meg a biokémiai reakciók sebességét, ezáltal a fiziológiai folyamatok ütemét, valamint az alapanyagcsere mértékét. A vízhőmérséklet befolyásolja továbbá az emésztőrendszer szekréciós aktivitását, a gyomor-bélrendszer perisztaltikáját, azaz a takarmány tranzitidejét, az emésztőenzimek aktivitását és a táplálóanyagok felszívódási sebességét (Volkoff és Rønnestad 2020). Korábbi kísérleteinkből (Pelyhe et al., 2016; Kövesi et al., 2020) ismert, hogy az általunk alkalmazott 19 ± 1 °C víz hőmérsékleten, a kísérlet során alkalmazott ponty súlykategóriában, a takarmány átlagos tranzitideje 16 óra. Ennek következtében ez az az időtartam, amely meghatározza a mikotoxinok biológiai hozzáférhetőségének idejét és a bélcsatornából történő felszívódásuk időtartamát.

Halaknál az AFB_1-re vonatkozóan a szakirodalomban több LD_{50} érték is található (Santacroce et al., 2008), de pontyra vonatkozóan nem találtam adatot. Emiatt a kísérlet során alkalmazott dózisok meghatározásánál az Európai Unió által a takarmányalapanyagokra meghatározott maximális AFB_1 tartalom (20 µg/kg takarmány [574/2011/EK]), valamint az adott ponty súly kategóriában, a gyakorlatban általánosan alkalmazott, testtömegre vonatkoztatott napi takarmány mennyiség nyújtott kiindulási alapot.

A kísérlet során az egyes vizsgált paraméterek változásának irányát és mértékét a 11. táblázatban összefoglalva mutatom be.

11. táblázat A *keap1, nrf2, gpx4a, gpx4b, gs és gr* gének expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 terhelés hatására

keap1			
	8. óra	16. óra	24. óra
A1 (alacsony)	↓	-	-
A2 (közepes)	↓	-	-
A3 (magas)	↓	↓	-
nrf2			
	8. óra	16. óra	24. óra
A1 (alacsony)	-	-	↑
A2 (közepes)	-	↓	-
A3 (magas)	-	↓	↑
gpx4a			
	8. óra	16. óra	24. óra
A1 (alacsony)	-	↑	↑
A2 (közepes)	-	↑	↑
A3 (magas)	↓	↑	↑
gpx4b			
	8. óra	16. óra	24. óra
A1 (alacsony)	↓	↑	↑
A2 (közepes)	-	-	↑
A3 (magas)	↓	↑	↑

gs			
	8. óra	16. óra	24. óra
A1 (alacsony)	↑	↑	↑
A2 (közepes)	-	↑	-
A3 (magas)	↓	↑	↑
gr			
	8. óra	16. óra	24. óra
A1 (alacsony)	-	↑	-
A2 (közepes)	↓	-	-
A3 (magas)	↓	-	-

- : a kontrollhoz viszonyítva nem volt szignifikáns eltérés

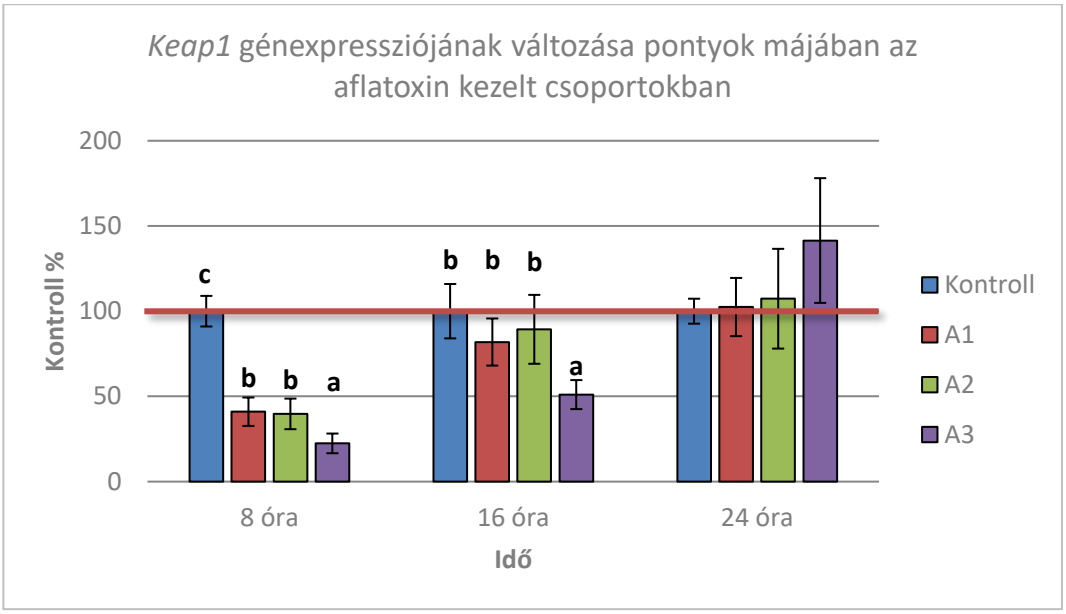
↓: a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű génexpresszió csökkenés történt

↑: a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű génexpresszió emelkedés történt

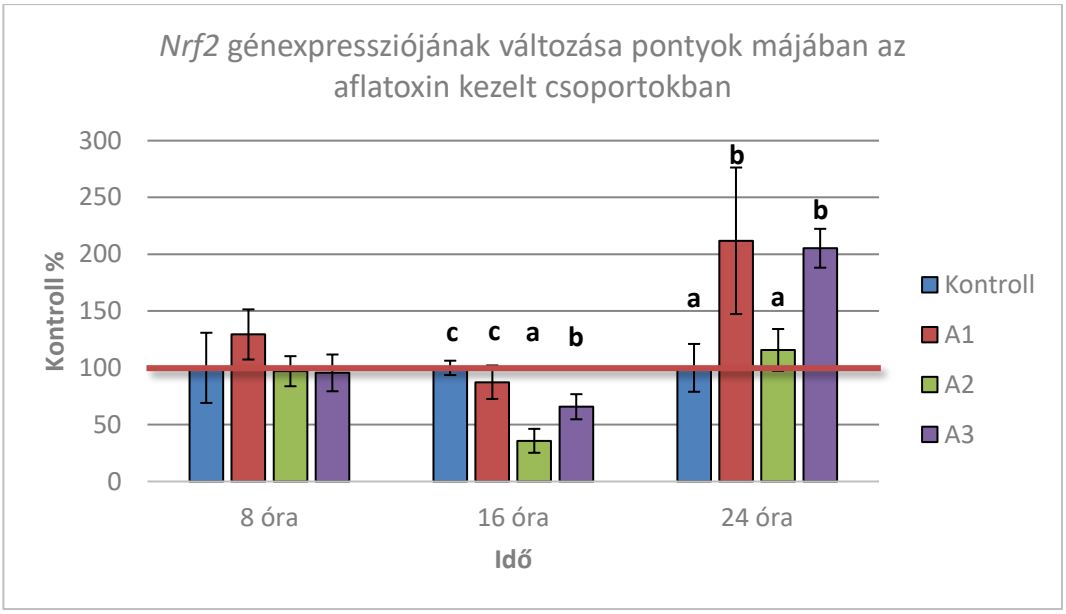
Az eredményekből látható, hogy a Keap1-Nrf2 szabályozási útvonalban szerepet játszó fehérjék génexpressziós szintű változásai elnyújtott és fluktuáló hatást mutattak.

A *keap1* gén esetében például kezdetben, 8. órai mintavételkor dózisfüggő csökkenést, majd később, a 16. órában, szintén génexpresszió gátlást, míg a 24. órában az alkalmazott dózisok hatására szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltam (12. ábra). Az *nrf2* génexpresszió esetében az eltolódás még nagyobb mértékűnek bizonyult, mert a kezdeti, 8. órában mért értékekben még nem volt változás és dózisfüggés sem volt tapasztalható. A 16. órában azonban a kontrollhoz képest csökkent génexpressziót találtam az A2 és A3 csoportokban, míg az alacsony dózis hatására eltérést nem tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva (13. ábra). A 24. órában a *keap1* esetében nem volt szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest, míg az *nrf2* esetében csak az A1 és A3 csoportokban tapasztaltam emelkedést. Ezek az eltérések, figyelembe véve a kísérletben alkalmazott szubletális dózisokat és az azok által kiváltott oxidatív stressz mértékét, jól magyarázhatók az oxidatív stressz hierarchikus modelljével (2. ábra). Ugyanakkor az *nrf2* transzkripcióját egyéb útvonalak is befolyásolhatják. Így például az *nrf2* gén promóter régiójában szintén található ARE szekvencia, amelynek következtében az *nrf2* képes saját transzkripciójának közvetlen aktiválására, ezáltal pozitív *feedback* mechanizmust biztosítva az Nrf2 hatások amplifikálására (Kwak et al., 2002). Ezenkívül az *nrf2* transzkripciót számos más transzkripciós faktor is szabályozza, így például az aril-szénhidrogén-receptor (AhR) (Miao et al., 2005) és az NF-κB (Nair et al., 2008).

Amint a ligand hozzákötődik az AhR-hez, a receptor szerkezeti változáson megy keresztül, bekerül a sejtmagba, ahol az *aril hidrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) transzkripciós faktorral heterodimert alkot (Denison és Nagy 2003). A ligand-kötött AhR/ARNT heterodimer hozzákötődik a DNS *cis* elemeihez, amely a Xenobiotikum Válaszelemet (*Xenobiotic Response Element* [XRE]) tartalmazza. Az *nrf2* gén promoter régiója is tartalmaz 3 XRE-szerű elemet, amelyet ennek alapján a redox változások mellett az AhR szintén aktiválhat (Miao et al., 2005). Az AFB_1 szerkezete és a CYP gének transzkripciós aktiválása következtében feltételezhetően AhR agonista (Mary et al., 2015; Ateş és Ortatatli, 2021), ezt azonban még nem sikerült bizonyítani (Arenas-Huertero et al., 2019). Humán hepatocita sejttenyészetekben például az AFB_1 az AhR által szabályozott CYP2B6 és a CYP3A5 citokróm gének fokozott expressziója mellett az RXR transzkripciós expresszióját is fokozta (Arenas-Huertero et al., 2019), amely az Nrf2 Neh7 doménjével kölcsönhatásba lépve gátolja az *nrf2* célgének expresszióját (He et al., 2020; Wang et al., 2013).

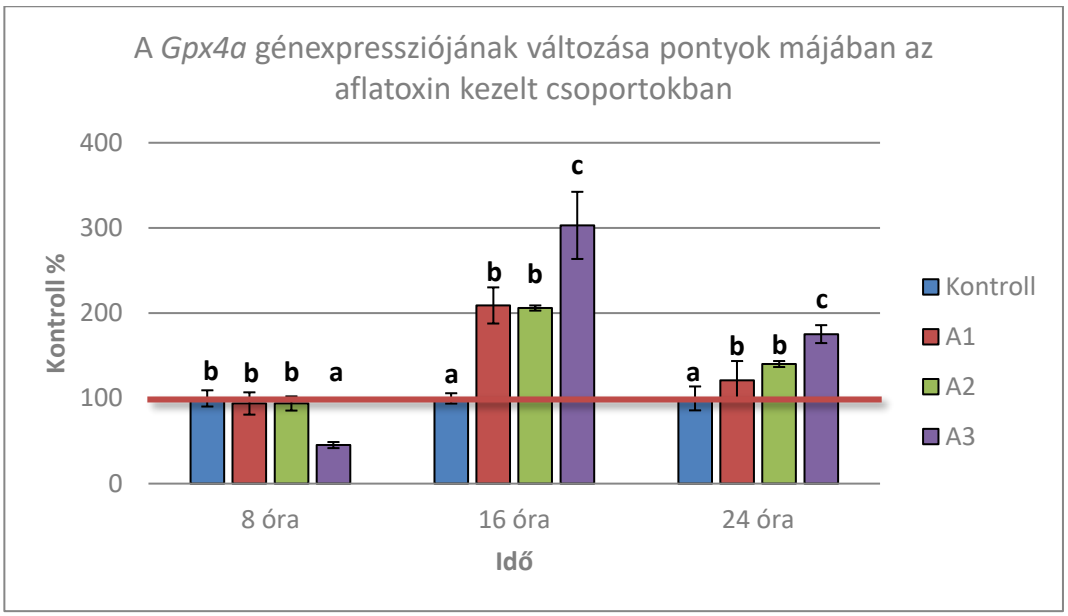


12. ábra A *keap1* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva. Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. A1: 1,46 µg AFB_1/kg ttm A2: 2,92 µg AFB_1/kg ttm A3: 5,85 µg AFB_1/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés szignifikáns eltérést mutat a kísérleti csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül; a jelölések hiánya azt mutatja, hogy az adott mintavételi időponton belül szignifikáns eltérések nem voltak az egyes csoportok között

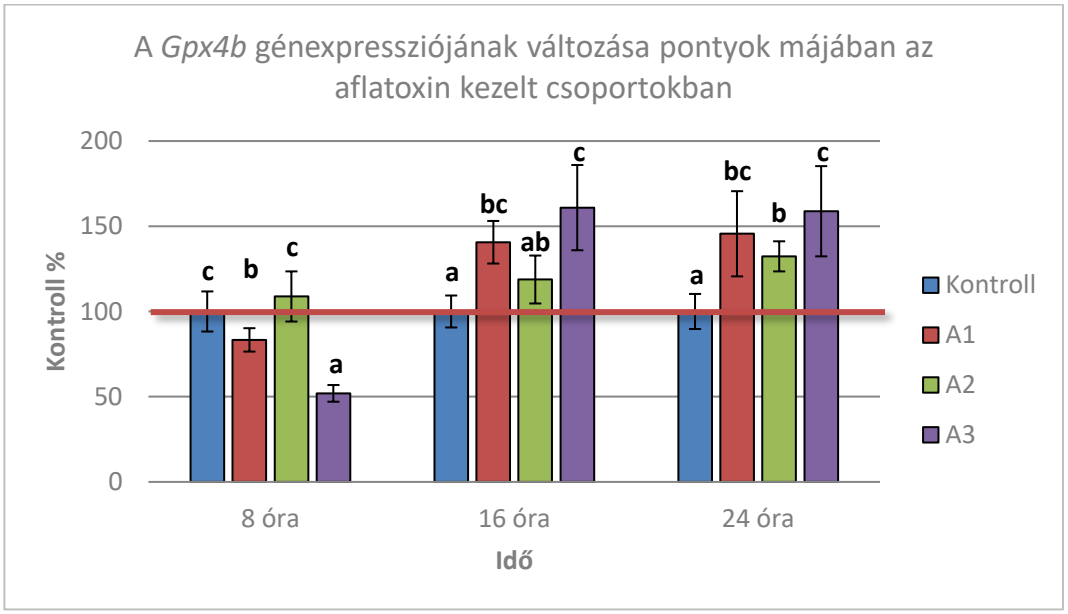


13. ábra Az *nrf2* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva. Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. A1: 1,46 µg AFB_1/kg ttm A2: 2,92 µg AFB_1/kg ttm A3: 5,85 µg AFB_1/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés szignifikáns eltérést mutat a kísérleti csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül; a jelölések hiánya azt mutatja, hogy az adott mintavételi időponton belül szignifikáns eltérések nem voltak az egyes csoportok között

A foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz gének (*gpx4a* [14. ábra] és *gpx4b* [15. ábra]) esetében az idő függvényében hasonló változásokat tapasztaltam. Mind a *gpx4a*, mind pedig a *gpx4b* gén esetében az A3 csoportban, a 8. órában a génexpresszió csökkenését, míg a 16. és 24. órában mindkét gén esetén a gének expressziójának indukcióját észleltem a kontrollhoz viszonyítva, ami a *gpx4a* esetén közel dózisfüggően változott.

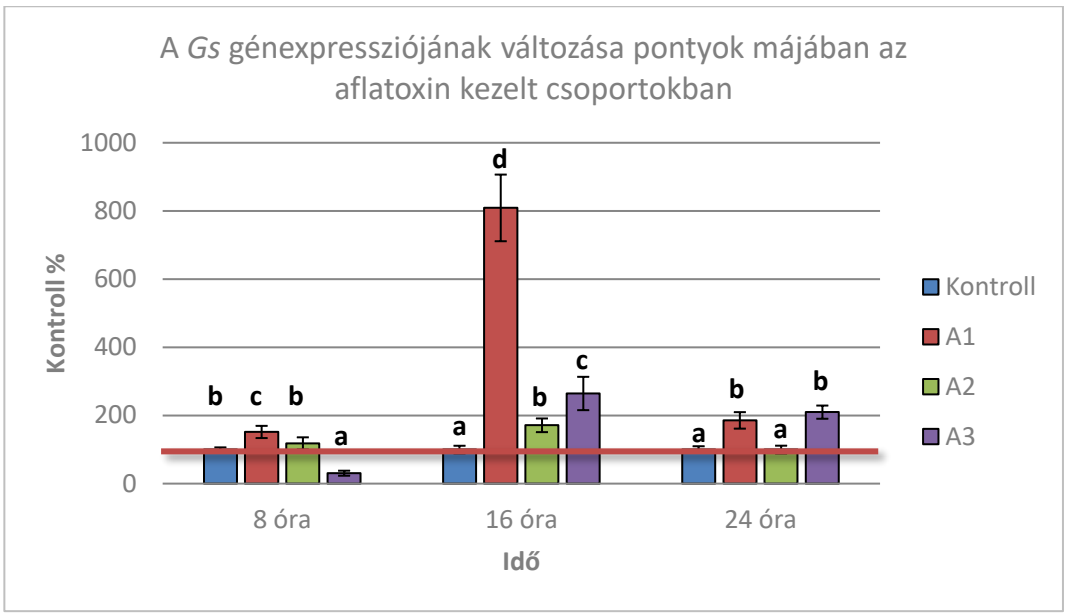


14. ábra A *gpx4a* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. A1: 1,46 µg AFB_1/kg ttm A2: 2,92 µg AFB_1/kg ttm A3: 5,85 µg AFB_1/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés szignifikáns eltérést mutat a kísérleti csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül



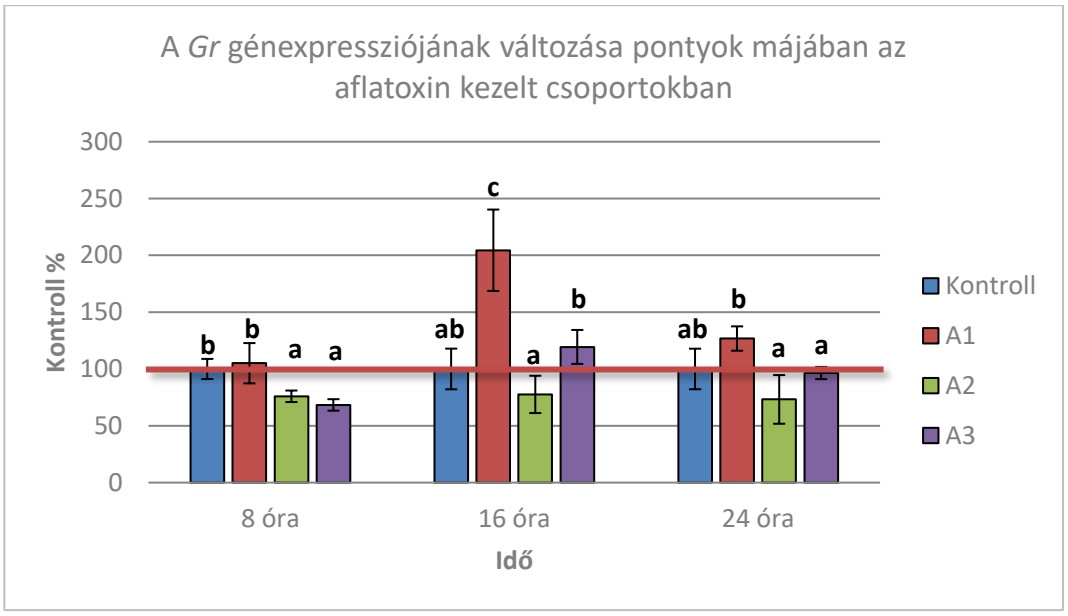
15. ábra A *gpx4b* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. A1: 1,46 µg AFB_1/kg ttm A2: 2,92 µg AFB_1/kg ttm A3: 5,85 µg AFB_1/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés szignifikáns eltérést mutat a kísérleti csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

A glutation redox rendszerben fontos szerepet játszó *gs* (16. ábra) gén esetén az A1 csoportban, minden mintavételi időpontban indukciót, míg az A2 és A3 csoportokban indukciót és gátlást egyaránt tapasztaltam a különböző mintavételi időpontokban. A *gs* gén expressziója a 16. órában minden alkalmazott dózis hatására emelkedett, míg a 24. órában már csak az A1 és A3 csoportokban tapasztaltam indukciót. Az A2 csoportban ugyanakkor a kísérlet 24 órája alatt csak kismértékű eltérések voltak.



16. ábra A *gs* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. A1: 1,46 µg AFB_1/kg ttm A2: 2,92 µg AFB_1/kg ttm A3: 5,85 µg AFB_1/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje. a, b, c, d jelölés szignifikáns eltérést mutat a kísérleti csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

A GSSG redukciójáért, azaz „újrahasznosításáért" felelős *gr* (17. ábra) gén esetében azt találtam, hogy a génexpresszió mértéke a 24 órás kísérlet alatt csupán kis mértékben változott. A 8. órában például dózisfüggő módon az A2 és A3 csoportokban csökkent, ugyanakkor a 16. órában csak az A1 csoportban emelkedett, míg a 24. órában a kontrollhoz képest statisztikailag kimutatható eltéréseket már nem lehetett kimutatni.



17. ábra A *gr* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. A1: 1,46 µg AFB_1/kg ttm A2: 2,92 µg AFB_1/kg ttm A3: 5,85 µg AFB_1/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje. a, b, c jelölés szignifikáns eltérést mutat a kísérleti csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

A glutation-redox rendszer elemeit kódoló gének expressziója, egy kezdeti gátlást követően a kontrollhoz képest elnyújtott emelkedést mutatott, amely csak a 16. órai

mintavétel után jelentkezett, de az emelkedés mértéke statisztikailag nem volt szignifikáns. Az *nrf2* gén expressziója az alkalmazott dózisok hatására a 8. órában nem változott, míg a 16. órában csökkent értékeket tapasztaltam az A2 és A3 kezelés hatására. Ennek alapján feltételezhető, hogy az AFB_1 terhelés hatására kialakult oxidatív stressz mértéke a hierarchikus oxidatív stressz modell alapján vagy átlépett egy küszöbértéket, amelynek hatására már nem elsősorban az Nrf2-ARE útvonal aktiválódása következik be, vagy az alkalmazott dózisok hatására még nem következett be olyan mértékű oxidatív stressz, amely az általam vizsgált gének expressziója szintjén is megnyilvánult.

A szakirodalomban, noha az AFB_1 az egyik leginkább vizsgált mikotoxin, halakra vonatkozóan (Santacroce et al., 2008) az elérhető adatok jellemzően csak nílusi tilápiával végzett, rendszerint hosszú távú és a kísérletemben alkalmazottnál lényegesen nagyobb dózisokkal végzett vizsgálatokból származnak, így a jelen kísérletben leírt rövidtávú hatásokkal közvetlenül nem vethetők össze.

Az AFB_1 kezelés hatására az egyes kísérleti csoportokon belül a mintavételi időpontok között szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam minden általam vizsgált gén esetében. Ugyanakkor ezek a változások mind a mikotoxinnal kezelt, mind a kontroll csoportban kimutathatóak voltak. Ennek hátterében feltételezhetően a gyomorszondán keresztül történt egyszeri takarmány adag bejuttatása, jelenleg még nem ismert faktorok, továbbá a biológiai cirkadián ritmus is szerepet játszhatott. Az általam alkalmazott 12:12 óra fényprogram eltért ugyan a természetes ritmustól, de ez a hatás minden vizsgálati csoportban azonos volt, így a mikotoxin terhelés által kiváltott hatások megfelelően vizsgálhatóak voltak. A cirkadián ritmust ugyanakkor az alkalmazott fényprogram megzavarhatta, amely hatással lehetett a CYP enzimrendszer, a II. fázisú, valamint az antioxidáns enzimek egyes elemeire egyaránt, továbbá a membrántanszporterekre is mind mRNS, mind pedig fehérje szinten (Zheng et al., 2021). Ezen felül a cirkadián ritmus az *Nrf2* expressziójának szabályozásán keresztül az antioxidáns enzimek génexpresszióját is befolyásolhatja (Zheng et al., 2021).

A kísérletben a kezelés x idő együttes hatását minden egyes gén esetben sikerült statisztikailag is alátámasztanom, amely azt mutatja, hogy nem csak az alkalmazott dózisnak, hanem a kezeléstől eltelt időnek, és azon belül a cirkadián ritmusnak is, kulcsfontosságú szerepe lehet a kialakuló hatások tekintetében. Korábban *in vitro* MDCK sejtvonalakkal végzett vizsgálat során is leírták az AFB_1-gyel kapcsolatban, hogy az nem csak dózis-, hanem időfüggő változásokat is mutat (Parveen et al., 2014).

5.2 Rövidtávú STC terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására pontyok májában

Ahogy azt a szakirodalmi áttekintés során már említettem az élelmiszerek és a takarmányok STC-tartalmáról jelenleg még kevés adat áll rendelkezésre (Scudamore et al., 1997), annak mennyiségét az Európai Unió sem a takarmányokban, sem az élelmiszerekben még ajánlati (határ)értékszinten sem szabályozza (EFSA 2013). Emiatt a fent tárgyalt AFB_1-gyel végzett kísérletben használt dózisok, 10x mennyiségét alkalmaztam, mert az STC toxicitását számos közleményben az AFB_1 1/10 értékének becsülték. A kísérletemben alkalmazott, testtömegre vonatkoztatott dózisokat a 12. táblázatban tüntettem fel (µg/kg testtömeg).

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

Kezelési csoport	Kontroll	S1 (alacsony)	S2 (közepes)	S3 (magas)
STC	<1,0	18,89	36,95	72,70

A 24 órás STC kezelés hatására a kezelési csoportokban elhullást, továbbá szubletális tüneteket nem tapasztaltam.

A *keap1* gén expressziójában a 8. órai mintavételkor az S1 és S2 csoportban, míg a 16. órai mintavételkor minden alkalmazott dózis hatására, szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva. A 24. órai mintavételkor viszont csak az S2 és S3 csoportokban volt szignifikáns mértékű emelkedés (13. táblázat).

Az időbeni változásokat tekintve a kontroll csoportban mért érték a 8. órában emelkedett, majd a 16. és 24. órában csökkent. Az S1 csoportban a 8. órai növekedést, csökkenés követte a 16. órában, ami a 24. órára még alacsonyabb szintre csökkent. Az S2 csoportban minden mintavételi időpontban szignifikáns emelkedést mértem, ugyanakkor az S3 csoportban a 8. órai kontroll közeli szintet követete jelentős mértékű emelkedés a 16. és 24. órában (13. táblázat).

13. táblázat A *keap1* gén expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,03± 0,26**B**	1,59± 0,06^{a}**C**	0,35± 0,13^{a}**A**	0,37± 0,10^{a}**A**	T: < 0,0001 H: < 0,0001 TxH: < 0,0001
S1 (alacsony)		2,86± 0,21^{c}**C**	1,05± 0,15^{b}**B**	0,54± 0,09^{a}**A**	
S2 (közepes)		2,29± 0,40^{b}**D**	1,99± 0,06^{c}**D**	1,43± 0,08^{b}**C**	
S3 (magas)		1,29± 0,18^{a}**B**	1,91± 0,31^{c}**C**	1,86± 0,28^{c}**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05) adott mintavételi időponton belül

A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)

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

S1 kezelési csoport: 18,89; S2 csoport: 36,95; S3 csoport: 72,70 µg STC/kg testtömeg

Az *nrf2* gén expressziója a kezelést követő 8. órában szignifikáns csökkenést mutatott az S1 csoportban a kontrollhoz viszonyítva, míg a 16. és 24. órai mintavételkor minden kezelési csoport hatására szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam (14. táblázat).

A kontroll csoportban a 16. és 24. órai mintavételkor jelentős mértékben csökkent a gén expressziója a 0. órai időponthoz képest. Ezzel ellentétben az S1 csoportban a 8.

órai mintavételkor alacsonyabb, míg a 16. és 24. órai mintavételkor magasabb génexpresszió értékeket mértem. Az S2 és S3 csoportban az expressziós szintek hasonlóan alakultak; az első 16 órában kontroll közeli szinteket mértem, amelyet a 24. órára indukció követett (14. táblázat).

14. táblázat A *nrf2* gén expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,01± 0,12**B**	1,12± 0,14^{b}**B**	0,35± 0,18^{a}**A**	0,35± 0,05^{a}**A**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
S1 (alacsony)		0,62± 0,10^{a}**A**	2,28± 0,34^{c}**D**	1,41± 0,20^{b}**C**	
S2 (közepes)		1,05± 0,15^{b}**B**	1,12± 0,20^{b}**B**	1,44± 0,26^{b}**C**	
S3 (magas)		1,13± 0,08^{b}**B**	1,34± 0,34^{b}**B**	1,76± 0,18^{b}**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05) adott mintavételi időponton belül

A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)

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

S1 kezelési csoport: 18,89; S2 csoport: 36,95; S3 csoport: 72,70 µg STC/kg testtömeg

A *gpx4a* gén esetében a 8. órai mintavételkor szignifikáns mértékű csökkenést figyeltem meg az S1 és S3 csoportban, míg a 16. órai és 24. órai mintavételkor minden kezelési csoportban szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva (15. táblázat).

A *gpx4a* gén expressziójának időbeni változásait tekintve a kontroll csoportban mért értékek a *keap1* és *nrf2* gén expressziójához hasonló változásokat mutattak, ugyanis a 8. órai emelkedést a 16. és 24. órában csökkenés követte. Az S1 csoportban folyamatosan emelkedő, a 16. és 24. órára már szignifikáns mértékben eltérő értékeket mértem a 0. órai kontrollhoz viszonyítva. Az S2 csoportban a 8. és 24. órai mintavétel alkalmával, míg az S3 csoportban mindhárom mintavételi időpontban tapasztaltam szignifikáns mértékű emelkedést a kísérlet kezdetekor mért értékhez képest (15. táblázat).

15. táblázat A *gpx4a* gén expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,12**B**	2,50± 0,09^{c}**C**	0,43± 0,23^{a}**A**	0,39± 0,06^{a}**A**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
S1 (alacsony)		1,19± 0,09^{a}**B**	1,49± 0,23^{b}**C**	1,78± 0,19^{b}**C**	
S2 (közepes)		2,36± 0,18^{c}**C**	1,26± 0,21^{b}**B**	2,42± 0,22^{c}**C**	
S3 (magas)		1,79± 0,12^{b}**C**	2,54± 0,37^{c}**D**	2,32± 0,32^{c}**D**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05) adott mintavételi időponton belül

A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)

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

S1 kezelési csoport: 18,89; S2 csoport: 36,95; S3 csoport: 72,70 µg STC/kg testtömeg

A *gpx4b* gén expressziója szignifikáns mértékű emelkedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva az expozíciót követő 8. órában az alacsony dózisú STC kezelés hatására (S1 csoport), míg a 16. és 24. órai mintavételkor hasonló változások következtek be,

mint a *gpx4a* gén expressziója esetében, azaz minden kezelési csoportban szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam (16. táblázat).

A kontroll csoportban mért *gpx4b* génexpressziós változások, a *keap1*, *nrf2* és *gpx4a* gének expressziójához hasonló változásokat mutattak, ugyanis a kezdeti, 8. órai emelkedést a 16. és 24. órában csökkenés követte a 0. órai mintavételhez viszonyítva. Ezzel szemben az S1, S2 és S3 csoportokban a 0. órai mintavételhez viszonyítva minden mintavételi időpontban szignifikáns mértékben emelkedett *gpx4b* génexpressziót tapasztaltam (16. táblázat).

16. táblázat A *gpx4b* gén expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,07**B**	1,42± 0,17^{a}**C**	0,33± 0,07^{a}**A**	0,48± 0,04^{a}**A**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
S1 (alacsony)		2,61± 0,16^{b}**D**	1,69± 0,14^{b}**C**	1,34± 0,17^{b}**C**	
S2 (közepes)		1,67± 0,23^{a}**C**	3,05± 0,28^{d}**E**	2,04± 0,08^{c}**D**	
S3 (magas)		1,41± 0,19^{a}**C**	2,51± 0,30^{c}**E**	1,87± 0,37^{c}**D**	

a, b, c, d felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D, E nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
S1 kezelési csoport: 18,89; S2 csoport: 36,95; S3 csoport: 72,70 µg STC/kg testtömeg

A *gpx4b* gén expressziójához hasonlóan, a *gs* gén expressziója is a 8. órai mintavételkor csökkent szignifikáns mértékben az alacsony STC dózis (S1 csoport) hatására. Ugyanakkor ezt követően a 16. és 24. órai mintavételkor mindhárom alkalmazott dózis hatására szignifikáns mértékű *gs* génexpresszió növekedést tapasztaltam a kontroll csoporthoz viszonyítva (17. táblázat).

A *gs* gén expressziója is hasonlóan alakult, mint a feljebb említett géneké. A kontroll csoportban a 0. órai mintavételhez hasonlítva a 8. órában emelkedést, míg a 16. és 24. órai mintavételkor csökkenést tapasztaltam. Az S1 csoportban a 16. és 24. órai mintavételkor tapasztaltam szignifikáns emelkedést, míg az S2 és S3 csoportban a 0. órai mintavételhez viszonyítva a génexpresszió növekedésének mértéke mindhárom mintavételi időpontban szignifikáns volt a kontrollhoz viszonyítva (17. táblázat).

A *gr* gén expressziója a kezelést követő 8. órában szignifikáns mértékű csökkenést mutatott az S1 és S3 csoportokban a kontrollhoz viszonyítva, míg a 16. órai mintavételkor minden alkalmazott dózis hatására szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam, amit a 24. órára kontroll közeli szintekre történt csökkenés követett (18. táblázat).

Az időbeni változásokat tekintve a kontroll csoportban mért érték a 8. órában emelkedett, majd a 16. és 24. órában a kezdeti szint közeli értékre csökkent. Az S1 és S3 csoportban a 16. és 24. órában emelkedést tapasztaltam. Az S2 csoportban ugyanakkor a 0. időponthoz viszonyítva a kezdeti (8. órai) emelkedést, a 16. és 24. órára csökkenés követte (18. táblázat).

17. táblázat A *gs* gén expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,10**B**	2,55± 0,29^{bc}**C**	0,44± 0,14^{a}**A**	0,75± 0,14^{a}**AB**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
S1 (alacsony)		1,01± 0,21^{a}**B**	1,56± 0,15^{b}**C**	1,65± 0,19^{b}**C**	
S2 (közepes)		2,67± 0,34^{c}**D**	2,00± 0,21^{c}**C**	2,79± 0,21^{d}**D**	
S3 (magas)		2,07± 0,23^{b}**D**	3,57± 0,33^{d}**C**	2,08± 0,12^{c}**D**	

a, b, c, d felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
S1 kezelési csoport: 18,89; S2 csoport: 36,95; S3 csoport: 72,70 µg STC/kg testtömeg

18. táblázat A g*r* gén expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,02**AB**	2,26± 0,30^{b}**C**	0,94± 0,13^{a}**A**	1,35± 0,26**B**	T: 0,0031 H: <0,0001 TxH: <0,0001
S1 (alacsony)		1,04± 0,11^{a}**B**	1,74± 0,15^{c}**C**	1,46± 0,25**C**	
S2 (közepes)		2,65± 0,14^{b}**C**	1,34± 0,08^{b}**B**	1,27± 0,10**B**	
S3 (magas)		1,30± 0,36^{a}**BC**	1,54± 0,17^{bc}**C**	1,44± 0,36**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
S1 kezelési csoport: 18,89; S2 csoport: 36,95; S3 csoport: 72,70 µg STC/kg testtömeg

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 minden vizsgált gén expressziójára.

5.2.1 Megbeszélés

A STC halakra kifejtett hatásairól a szakirodalomban jelenleg kevés adat áll rendelkezésre (Oliveira és Vasconcelos 2020). A takarmány bélcsatornán történő áthaladásának ideje, vagyis a tranzit idő, expozíciós időablakként is értelmezhető, amely meghatározza a mikotoxinok felszívódásának idejét a belekből, mivel a takarmányt egyszeri alkalommal juttattuk az állatok szervezetébe. Következésképpen ez az idő fontos szerepet játszik a vizsgált génekben bekövetkezett változásokban.

Ponty fajra vonatkozóan a szakirodalomban LD_{50} értékként 211 µg/kg takarmány koncentrációt adtak meg (Pietsch, 2015). Ugyanakkor, a kísérlet 24 órás időtartama alatt mortalitást egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam, noha az alkalmazott dózisok az adott ponty súly kategóriában, a gyakorlatban általánosan alkalmazott, testtömegre vonatkoztatott napi takarmány mennyiség alapján takarmány mennyiségre átszámítva az LD_{50} érték 5x, 10x és 20x voltak, amelynek hátterében a STC AFB_1-hez viszonyított kisebb toxicitása állhat (Terao 1983). Ezt a megállapításomat erősíti meg, hogy az AFB_1-gyel végzett kísérletben sem tapasztaltam elhullást a kísérlet 24 óra időtartama alatt.

A kísérlet során az egyes vizsgált paraméterek változásának irányát és mértékét a 19. táblázatban összefoglalva mutatom be.

19. táblázat A *keap1, nrf2, gpx4a, gpx4b, gs és gr* gének expressziójának változásai a pontyok májában STC terhelés hatására

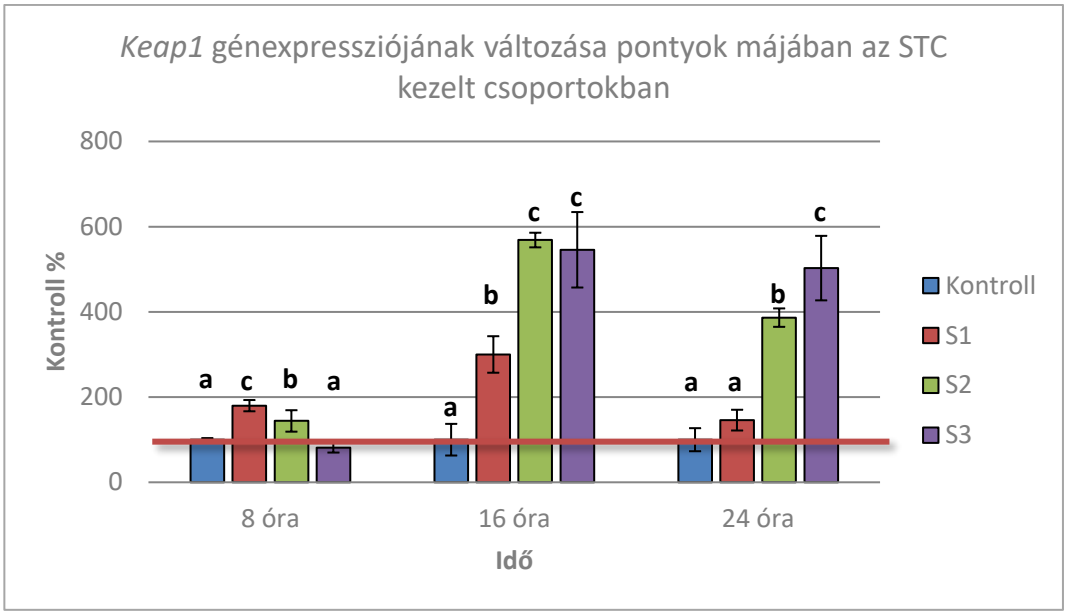
keap1			
	8. óra	16. óra	24. óra
S1 (alacsony)	↑	↑	-
S2 (közepes)	↑	↑	↑
S3 (magas)	-	↑	↑
nrf2			
	8. óra	16. óra	24. óra
S1 (alacsony)	↓	↑	↑
S2 (közepes)	-	↑	↑
S3 (magas)	-	↑	↑
gpx4a			
	8. óra	16. óra	24. óra
S1 (alacsony)	↓	↑	↑
S2 (közepes)	-	↑	↑
S3 (magas)	↓	↑	↑
gpx4b			
	8. óra	16. óra	24. óra
S1 (alacsony)	↑	↑	↑
S2 (közepes)	-	↑	↑
S3 (magas)	-	↑	↑
gs			
	8. óra	16. óra	24. óra
S1 (alacsony)	↓	↑	↑
S2 (közepes)	-	↑	↑
S3 (magas)	-	↑	↑
gr			
	8. óra	16. óra	24. óra
S1 (alacsony)	↓	↑	-
S2 (közepes)	-	↑	-
S3 (magas)	↓	↑	-

- : a kontrollhoz viszonyítva nem volt szignifikáns eltérés

↓: a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű génexpresszió csökkenés történt

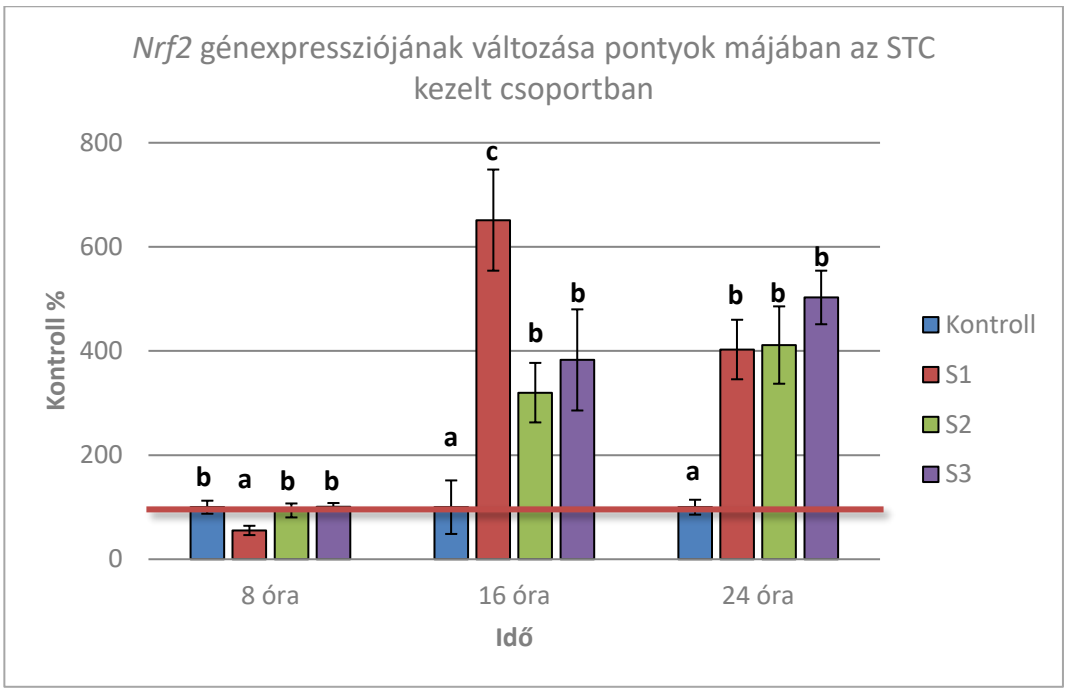
↑: a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű génexpresszió emelkedés történt

Az Nrf2-Keap1 útvonalban szerepet játszó gének expresszióját jelentős mértékben befolyásolta az STC terhelés. A k*eap1* (18. ábra) esetében az S2 csoportban minden mintavételi időpontban indukciót, míg az S1 és S3 csoportokban indukciót és kontroll szint körüli génexpressziót egyaránt tapasztaltam a különböző mintavételi időpontokban. A *keap1* génexpressziója a 8. órában az S1 és S2 csoportokban, a 16. órában mindenhárom kezelési csoportban, míg a 24. órában már csak az S2 és S3 csoportokban tapasztaltam dózisfüggő indukciót. A 8. órai mintavételkor az S3 csoportban, míg a 24. órai mintavételkor az S1 csoportban nem tapasztaltam szignifikáns mértékű eltérést.



18. ábra A *keap1* génexpressziós változása pontyok májában a STC-nel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. S1: 18,89 µg STC/kg ttm S2: 36,95 µg STC/kg ttm S3: 72,70 µg STC/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

Az *nrf2* (19. ábra) esetében a génexpresszió mértéke a 8. órában az S1 csoportban csökkent, az S2 és S3 csoportban nem változott a kontrollhoz képest, míg a 16. és 24. órában mindhárom STC-nel szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban szignifikáns mértékű indukciót lehetett kimutatni.

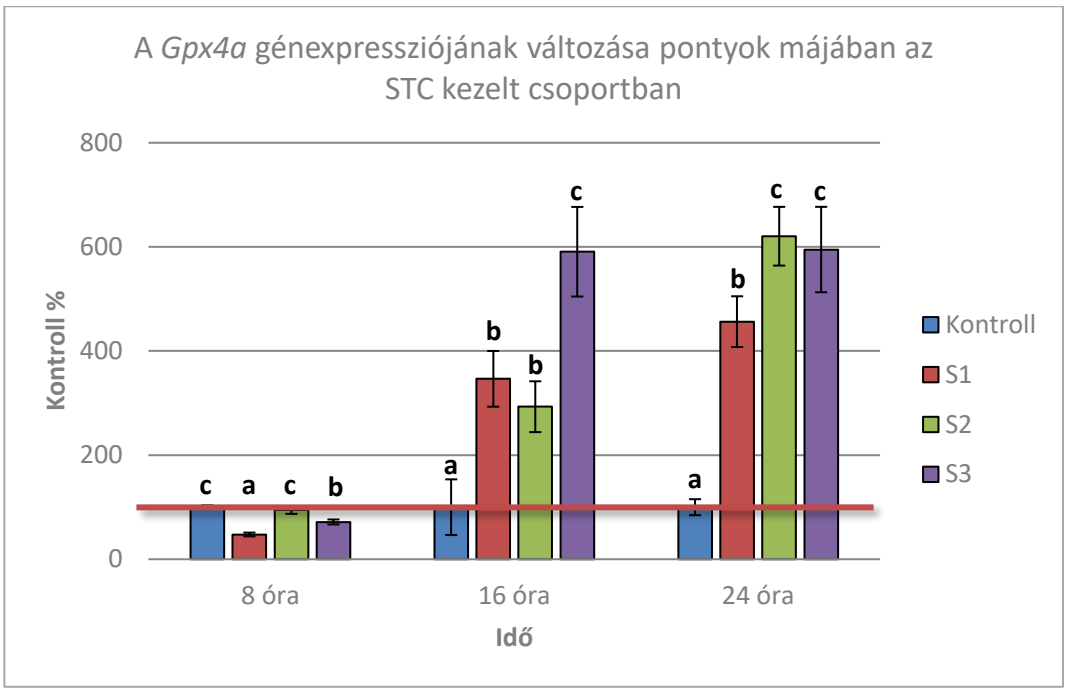


19. ábra Az *nrf2* génexpressziós változása pontyok májában a STC-nel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. S1: 18,89 µg STC/kg ttm S2: 36,95 µg STC/kg ttm S3: 72,70 µg STC/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

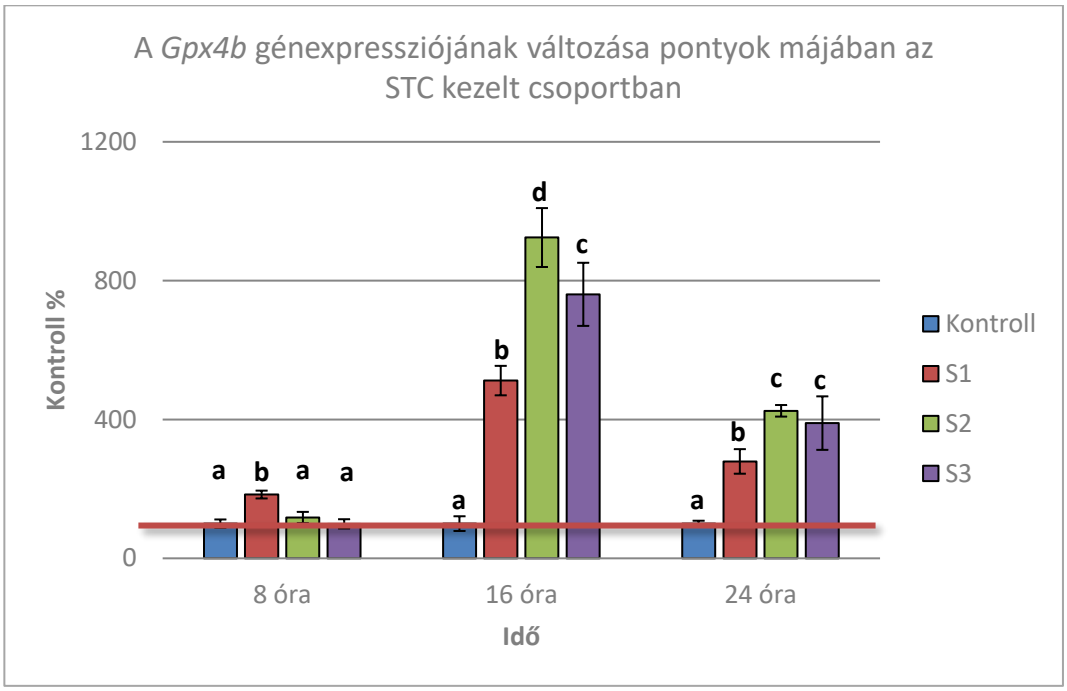
Az *nrf2* esetében jól látható, hogy a 8. órai mintavételkor az S1 csoportban a kezdeti gátlást, és az S2 és S3 csoportokban a kontroll közeli értékeket, a 16. és 24. órában erőteljes indukció követte. A *keap1* gén expressziója az S1 és S2 kezelési csoportokban már a 8. órai mintavételkor indukciót mutatott, amely a legalacsonyabb dózis esetében a 24 órára kontroll közeli értékre tért vissza. A hierarchikus oxidatív stressz modell alapján feltételezhető, hogy az alkalmazott dózisok hatására enyhe oxidatív stressz alakult ki. A modell szerint ugyanis alacsony oxidatív stressz hatására az Nrf2 fehérje a sejtmagba jutva aktiválja az antioxidáns enzimek génexpresszióját, míg jelentősebb ROS képződés hatására már nem az Nrf2-Keap1 útvonal aktiválódik, amelyhez viszont a Keap1 Nrf2-t gátló aktivitására van szükség.

Halakkal végzett kísérletek eredményeivel nem volt módom saját eredményeimet összevetni, mert ilyenek a szakirodalomban nem állnak rendelkezésre. Egy patkányokkal végzett 24 órás *in vivo* kísérlet eredményei azonban megerősítik eredményeimet abban a tekintetben, hogy szintén mérsékelt oxidatív stresszt tapasztaltak, amikor 10, 20 és 40 mg/kg testtömeg dózisban STC-nel kezelték az állatokat (Dubravka et al., 2020).

A halakban kiemelkedően fontos antioxidáns szereppel bíró foszfolipid-hidroperoxid GPx gének (*gpx4a* [20. ábra] és *gpx4b* [21. ábra]) közül a *gpx4a* expressziója, az *nrf2* expressziós változásaihoz hasonlóan, az S1 és S3 csoportokban, a kezdeti gátlást követően, a 16. és 24. órai mintavételkor erőteljes indukciót mutatott a kontrollhoz viszonyítva, míg a *gpx4b* gén esetében az alacsony dózis hatására az indukció már a 8. órai mintavételkor is megfigyelhető.



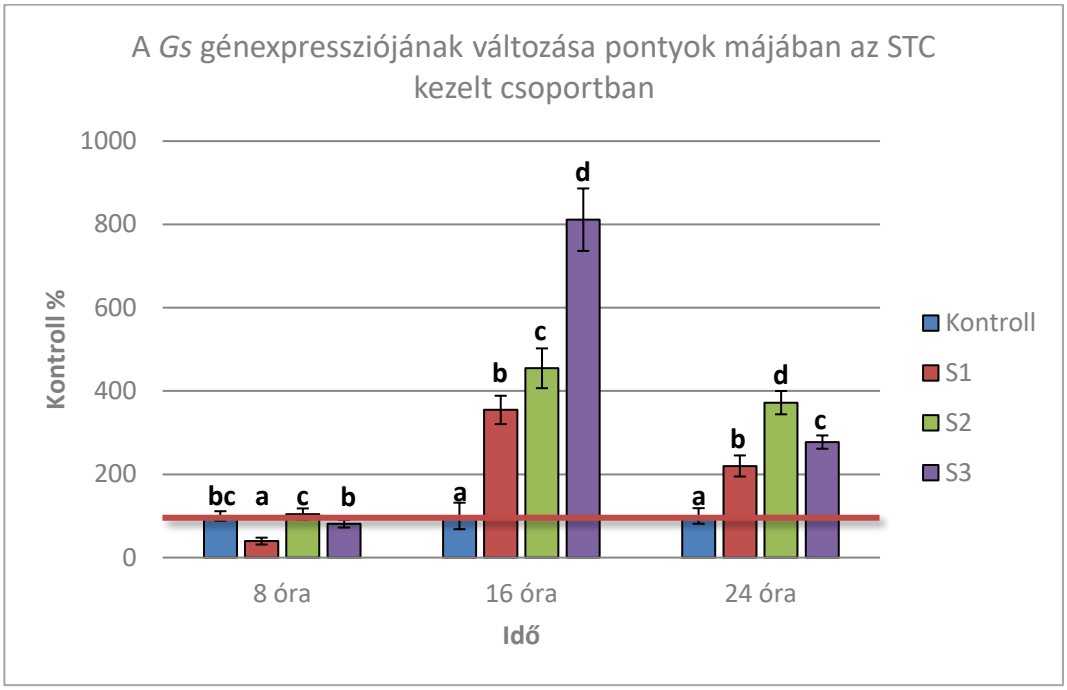
20. ábra A *gpx4a* génexpressziós változása pontyok májában a STC-nel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. S1: 18,89 µg STC/kg ttm S2: 36,95 µg STC/kg ttm S3: 72,70 µg STC/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül



21. ábra A *gpx4b* génexpressziós változása pontyok májában a STC-nel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. S1: 18,89 µg STC/kg ttm S2: 36,95 µg STC/kg ttm S3: 72,70 µg STC/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c, d jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

A *gs* gén (22. ábra) esetében is hasonló változásokat tapasztaltam, mint a korábban említett *gpx4a* gén esetében. Az S1 csoportban a kezdeti, 8. órai mintavételkor, szignifikáns mértékű génexpresszió gátlást lehetett kimutatni, a 16. és 24. órában azonban mindhárom STC-nel szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban

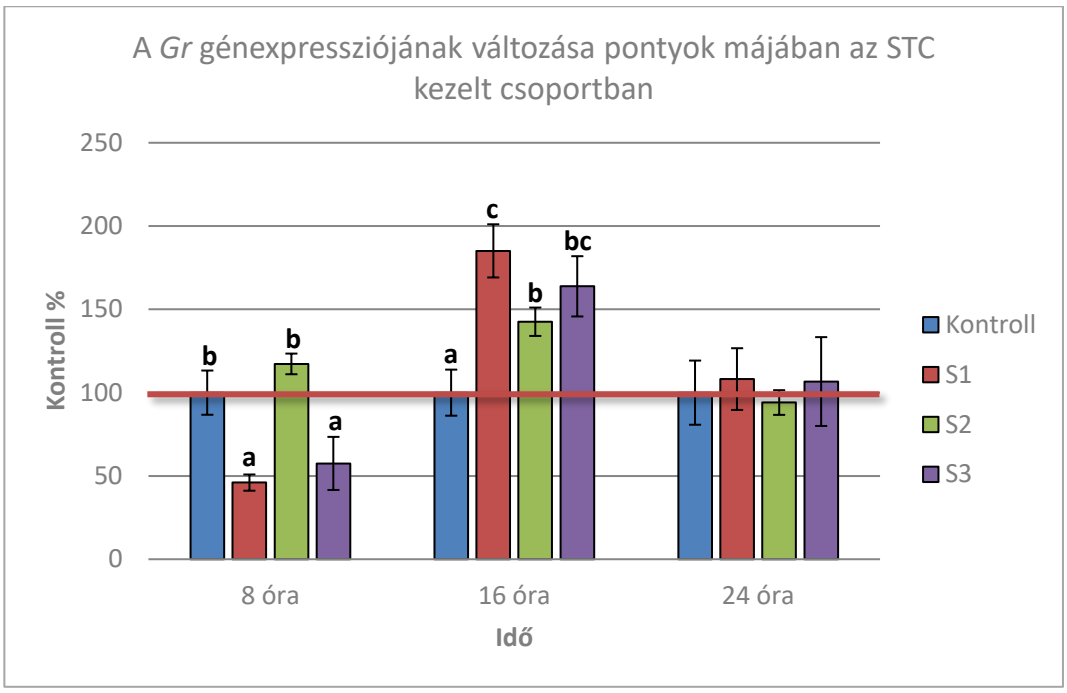
szignifikáns mértékű indukciót tapasztaltam. A mért értékek dózisfüggő alakulása ugyanakkor csak a 16. órában volt megfigyelhető.



22. ábra A *gs* génexpressziós változása pontyok májában a STC-nel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. S1: 18,89 µg STC/kg ttm S2: 36,95 µg STC/kg ttm S3: 72,70 µg STC/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje. a, b, c, d jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

Ezzel szemben a *gr* gén (23. ábra) a kezdeti, 8. órai mintavételkor az S1 és S3 csoportban mutatott szignifikáns mértékű gátlást, amelyet a 16. órában indukció követett. Ezt követően azonban, a 24. órára, a génexpresszió mértéke visszatért a kontroll szintre. Ezek alapján feltételezhető, hogy a kísérletben alkalmazott dózisok hatására enyhe oxidatív stressz alakult ki, hiszen az *nrf2*, valamint az általa szabályzott gének, expressziója a 8. órai gátlást követően a 16. és 24. órai mintavételkor indukció követett.

Az STC kezelés hatására a kísérleti csoportokon belül is szignifikáns eltéréseket tapasztaltam az egyes mintavételi időpontok között a vizsgált gének esetében. Ezek a változások ugyanakkor mind a mikotoxinnal kezelt, mind a kontroll csoportban kimutathatók voltak. Ennek hátterében feltételezhetően a gyomorszondán keresztül történő egyszeri takarmány adag bejuttatása, jelenleg még nem ismert faktorok, valamint a biológiai cirkadián ritmus is szerepet játszhatott. Bár az általam alkalmazott fényprogram eltér a természetes fény-sötét ritmustól, ugyanakkor ez a hatás minden vizsgálati csoportban azonos volt, így a mikotoxin terhelés által kiváltott hatások megfelelően vizsgálhatóak voltak. Ebben a kísérletben is sikerült a kezelés x idő együttes hatását minden egyes gén esetben statisztikailag is alátámasztanom, amely azt mutatja, hogy nem csak az alkalmazott dózisnak, hanem a kezeléstől eltelt időnek is kulcsfontosságú szerepe van a kialakuló hatások tekintetében. Az STC esetében is megfigyeltek, *in vitro*, humán neuroblasztóma sejtekkel (SH-SY5Y) végzett kísérletben dózis és időfüggő változásokat egyaránt (Zingales et al., 2020).



23. ábra A g*r* génexpressziós változása pontyok májában a STC-nel kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. S1: 18,89 µg STC/kg ttm S2: 36,95 µg STC/kg ttm S3: 72,70 µg STC/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül; a jelölések hiánya azt mutatja, hogy azt adott mintavételi időponton belül szignifikáns eltérések nem voltak az egyes csoportok között

5.3 AFB_1-STC terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására pontyok májában

A harmadik, szintén pontyokkal végzett gyomorszondás kísérlet során, az AFB_1 és a STC önálló, valamint kombinált hatását vizsgáltam a glutation redox rendszer egyes elemeinek, valamint az azok szabályozásáért felelős gének expressziójára. A kezeléshez alkalmazott takarmányok mikotoxin tartalmát a 2. táblázatban mutatom be (µg/kg takarmány). Az AFB_1 kezelési csoportban 0,95; az STC csoportban 10,27, míg az AFB_1-et és STC-t egyaránt tartalmazó AFB_1+STC csoportban 0,95+10,27 µg/kg testtömeg mikotoxin dózisokat alkalmaztam (3. táblázat). A dózisokat a korábbi vizsgálataim során kapott eredmények alapján választottam ki.

A kísérlet 24 órás időtartama alatt az általam alkalmazott dózisok hatására mortalitást, valamint szubletális tüneteket egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam.

A *keap1* gén expressziója szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz viszonyítva az AFB_1 kezelés hatására, míg STC kezelt csoportban szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam a 8. órai mintavételkor. A 16. és 24. órai mintavételkor szignifikáns mértékű emelkedést az AFB_1+STC kezelés hatására tapasztaltam, míg a 24. órai mintavételkor szignifikáns csökkenést mértem az AFB_1 kezelés hatására (20. táblázat).

Az időbeni változásokat tekintve a kontroll csoportban a 8. és 16. órában emelkedett a génexpresszió a 0. órához képest. Az AFB_1 csoportban a 8. és a 16. órában, az STC és az AFB_1+STC csoportban pedig mindhárom mintavételi időpontban emelkedett értéket mértem a kísérlet kezdetekor mért expresszióhoz képest (20. táblázat).

20. táblázat A *keap1* gén expressziójának változásai pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,04± 0,33**A**	3,95± 0,17^{b}**C**	2,40± 0,09^{a}**B**	1,59± 0,19^{b}**A**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
AFB_1		2,81± 0,25^{a}**B**	2,58± 0,22^{a}**B**	0,69± 0,11^{a}**A**	
STC		5,07± 0,35^{c}**D**	2,34± 0,24^{a}**C**	1,62± 0,19^{b}**B**	
AFB_1+STC		3,61± 0,66^{b}**B**	3,65± 0,36^{b}**B**	4,54± 0,84^{c}**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
AFB_1 kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1/kg ttm; STC kezelési csoport: 10,27 µg STC/kg ttm; AFB_1+STC kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1+ 10,27 µg STC/kg ttm

Az *nrf2* gén expressziója a 8. órai mintavételkor szignifikáns mértékben emelkedett az AFB_1 és AFB_1+STC kezelések hatására a kontrollhoz viszonyítva. A 16. órai mintavételkor viszont a génexpresszió szignifikáns mértékben csak az AFB_1+STC hatására emelkedett, míg az AFB_1 kezelés szignifikáns mértékű csökkenést eredményezett. A 24. órai mintavételkor az AFB_1 kezelés hatására szignifikáns mértékű csökkenést tapasztaltam mind a kontroll, mind az STC és az AFB_1+STC csoportokhoz viszonyítva. Ezzel szemben, ugyanebben az időpontban történt

mintavételkor az AFB_1+STC kezelés hatására szignifikáns mértékben nagyobb értékek jelentkeztek a többi kezelési csoporthoz viszonyítva (21. táblázat).

A mintavételi időpontok tekintetében a kontroll csoportban a 16. és 24. órában, az STC csoportban a 16. órában, míg az AFB_1+STC csoportban minden mintavételi időpontban nagyobb értéket mértem. Ezzel ellentétben az AFB_1 csoportban a 24. órában csökkenést tapasztaltam (21. táblázat).

21. táblázat A *nrf2* gén expressziójának változásai pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,03**A**	0,94± 0,07^{a}**A**	1,84± 0,18^{b}**C**	1,57± 0,12^{c}**B**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
AFB_1		1,23± 0,19^{b}**A**	1,16± 0,18^{a}**A**	0,37± 0,02^{a}**B**	
STC		0,91± 0,16^{a}**A**	1,72± 0,30^{b}**B**	0,91± 0,10^{b}**A**	
AFB_1+STC		1,88± 0,17^{c}**B**	2,65± 0,23^{c}**D**	2,28± 0,32^{d}**C**	

a, b, c, d felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
AFB_1 kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1/kg ttm; STC kezelési csoport: 10,27 µg STC/kg ttm; AFB_1+STC kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1+ 10,27 µg STC/kg ttm

A *gpx4a* gén esetében a 8. órai mintavételkor szignifikáns mértékű csökkenést figyeltem meg az STC és AFB_1+STC hatására, míg a 16. órai mintavételkor minden mikotoxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban szignifikáns mértékű csökkenést tapasztaltam a kontroll csoporthoz viszonyítva. A 24. órai mintavételkor az AFB_1 és AFB_1+STC kezelés hatására szignifikáns mértékű csökkenést, míg az STC kezelt csoportban szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam (22. táblázat).

A kontroll csoportban minden mintavételi időpontban magasabb értéket tapasztaltam a 0. órához viszonyítva. Az AFB_1 csoportban a kezdeti, 8. órai, emelkedést a 16. és 24. órában történt mintavételkor csökkenés követte. Ezzel ellentétben az STC csoportban a 16. és 24. órában emelkedést tapasztaltam, míg az AFB_1+STC csoportban a kezdeti, 8. és 16. órai, emelkedést a 24. órában szintén csökkenés követte (22. táblázat).

A *gpx4b* gén expressziója esetében szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam az AFB_1 kezelés hatására a 24 órás kísérlet alatt kontroll és a STC csoportokhoz viszonyítva, míg az AFB_1+STC kezelés hatására szignifikáns mértékű emelkedést mértem a 16. és 24. órai mintavételkor az STC kezelt csoporthoz hasonlítva (23. táblázat).

Ezen paraméter esetében a kontroll értékek időbeli változását vizsgálva nem tapasztaltam szignifikáns mértékű eltérést. Ezzel ellentétben az AFB_1 csoportban minden mintavételi időpontban szignifikáns emelkedést, míg az STC csoportban folyamatos, a 24. órában pedig már szignifikáns mértékű csökkenést tapasztaltam a kezdeti értékhez képest. A két mikotoxin együttes alkalmazásának hatására a 16. órában tapasztaltam szignifikáns emelkedést a 0. órai mintavételhez képest (23. táblázat).

22. táblázat A *gpx4a* gén expressziójának változásai pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,07**A**	1,51± 0,06^{c}**B**	1,46± 0,02^{c}**BC**	1,34± 0,05^{c}**C**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
AFB_1		1,49± 0,18^{c}**D**	0,72± 0,07^{a}**C**	0,36± 0,04^{a}**B**	
STC		0,91± 0,08^{a}**A**	1,17± 0,07^{b}**B**	1,97± 0,16^{d}**C**	
AFB_1+STC		1,17± 0,07^{b}**B**	1,16± 0,09^{b}**B**	0,68± 0,02^{b}**C**	

a, b, c, d felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
AFB_1 kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1/kg ttm; STC kezelési csoport: 10,27 µg STC/kg ttm; AFB_1+STC kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1+ 10,27 µg STC/kg ttm

23. táblázat A *gpx4b* gén expressziójának változásai pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,00± 0,10**AB**	0,80± 0,14^{a}**A**	1,21± 0,09^{b}**B**	0,95± 0,06^{a}**A**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
AFB_1		1,29± 0,16^{c}**C**	3,95± 0,31^{c}**E**	2,90± 0,31^{c}**D**	
STC		0,87± 0,09^{ab}**AC**	0,79± 0,13^{a}**AC**	0,74± 0,05^{a}**C**	
AFB_1+STC		1,05± 0,08^{b}**A**	1,29± 0,17^{b}**C**	1,22± 0,18^{b}**AC**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
AFB_1 kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1/kg ttm; STC kezelési csoport: 10,27 µg STC/kg ttm; AFB_1+STC kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1+ 10,27 µg STC/kg ttm

A *gs* gén relatív expressziójában a 8. órai mintavételkor tapasztaltam szignifikáns mértékű emelkedést az AFB_1 és az AFB_1+STC kezelés hatására. A 16. órai mintavételkor viszont a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű csökkenést figyeltem meg az AFB_1 és a STC kezelés, míg a 24. órai mintavételkor az STC és az AFB_1+STC kezelés hatására (24. táblázat).

A *gs* gén expressziója esetében szintén nem tapasztaltam a kontroll csoportban szignifikáns mértékű eltérést a 0. órához viszonyítva. Ugyanakkor az AFB_1 csoportban a 16. órában, míg az STC csoportban mindhárom mintavételi időpontban szignifikáns mértékű csökkenést mértem. Az AFB_1+STC csoportban a 8. órában mért nagyobb értéket a 24. órára erőteljes csökkenés követte (24. táblázat).

24. táblázat A *gs* gén expressziójának változásai pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,01± 0,12**AB**	0,84± 0,15^{a}**AB**	1,09± 0,15^{b}**AB**	1,03± 0,15^{c}**AB**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
AFB_1		1,25± 0,33^{b}**A**	0,57± 0,15^{a}**C**	0,89± 0,07^{bc}**B**	
STC		0,60± 0,19^{a}**C**	0,67± 0,20^{a}**C**	0,29± 0,08^{a}**D**	
AFB_1+STC		3,35± 0,23^{c}**D**	1,18± 0,22^{b}**A**	0,68± 0,15^{b}**C**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0.05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0.05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
AFB_1 kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1/kg ttm; STC kezelési csoport: 10,27 µg STC/kg ttm; AFB_1+STC kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1+ 10,27 µg STC/kg ttm

A *gr* gén esetében a 8. órai mintavételkor az AFB_1 és az AFB_1+STC kezelés hatására szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltam. A 16. órai mintavételkor az STC kezelt csoport szignifikáns mértékű csökkenést mutatott a többi kezelési csoporthoz viszonyítva. A 24. órai mintavételkor a *gr* gén expressziójában szignifikáns mértékű csökkenést figyeltem meg minden kezelési csoportban a kontrollhoz viszonyítva (25. táblázat).

A kontroll értékekben is voltak szignifikáns mértékű eltérések az egyes mintavételi időpontok között, ugyanis a 16. órában a 0. órához képest nagyobb értéket mértem. Az AFB_1-gyel kezelt csoportban a kezdeti a 8. és 16. órai mintavételnél mért nagyobb értéket a 24. órára erőteljes csökkenés követte. A STC-nel kezelt csoportban a *gr* gén expresszióját folyamatos, a 24. órára már szignifikáns mértékű csökkenés jellemezte. A két mikotoxinnal egyidejüleg terhelt csoportban a kezdeti, 8. és 16. órai emelkedést, a 24. órára szintén a kontroll szintre történt csökkenés követte (25. táblázat).

25. táblázat A *gr* gén expressziójának változásai pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására (átlag ± SD, n=6)

	0. óra	8. óra	16. óra	24. óra	p-érték
Kontroll	1,01± 0,13**A**	0,89± 0,17^{a}**A**	1,49± 0,38^{b}**B**	1,17± 0,15^{b}**A**	T: <0,0001 H: <0,0001 TxH: <0,0001
AFB_1		2,21± 0,18^{c}**D**	1,60± 0,18^{b}**C**	0,73± 0,16^{a}**B**	
STC		0,86± 0,14^{a}**A**	0,77± 0,22^{a}**AB**	0,58± 0,13^{a}**B**	
AFB_1+STC		1,44± 0,22^{b}**B**	1,46± 0,18^{b}**B**	0,79± 0,15^{a}**A**	

a, b, c felsőindex jelölés az azonos oszlopban jelöli a szignifikáns eltéréseket a kezelési csoportok között (p<0,05)
A, B, C, D nagybetűs jelölés az azonos sorokban jelöli a szignifikáns eltéréseket, a mintavételi időpontok között (p<0,05)
Rövidítések: T – Kezelés hatása, H – Idő hatása, TxH – kezelés x idő hatása
AFB_1 kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1/kg ttm; STC kezelési csoport: 10,27 µg STC/kg ttm; AFB_1+STC kezelési csoport: 0,95 µg AFB_1+ 10,27 µg STC/kg ttm

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 vizsgált gének expressziójára.

5.3.1 Megbeszélés

A különféle mikotoxinokkal egyidejűleg szennyezett takarmány hatása kevéssé ismert, különös tekintettel a halakra. Az AFB_1 és STC együttes hatásáról a szakirodalomban kevés információval rendelkezünk (EFSA 2013). A szervezetben a különböző mikotoxinok kölcsönhatásba léphetnek egymással, következésképpen antagonista, szinergista és/vagy additív hatást fejthetnek ki, különösen, ha hatásmechanizmusuk hasonló (Oliveira és Vasconcellos 2020). A legutóbbi *BIOMIN World Mycotoxin Survey* felmérés szerint a vizsgált minták 71%-ban egynél több mikotoxint találtak (BIOMIN 2019). A rutinszerűen vizsgált mikotoxinok esetében a jelenleg érvényben lévő szabályozások olyan toxikológiai vizsgálatok adatain alapulnak, amelyek a mikotoxinok együttes hatásait nem, csupán csak egy mikotoxin-expozíciót vettek figyelembe (Speijers és Speijers 2004; Smith et al., 2016).

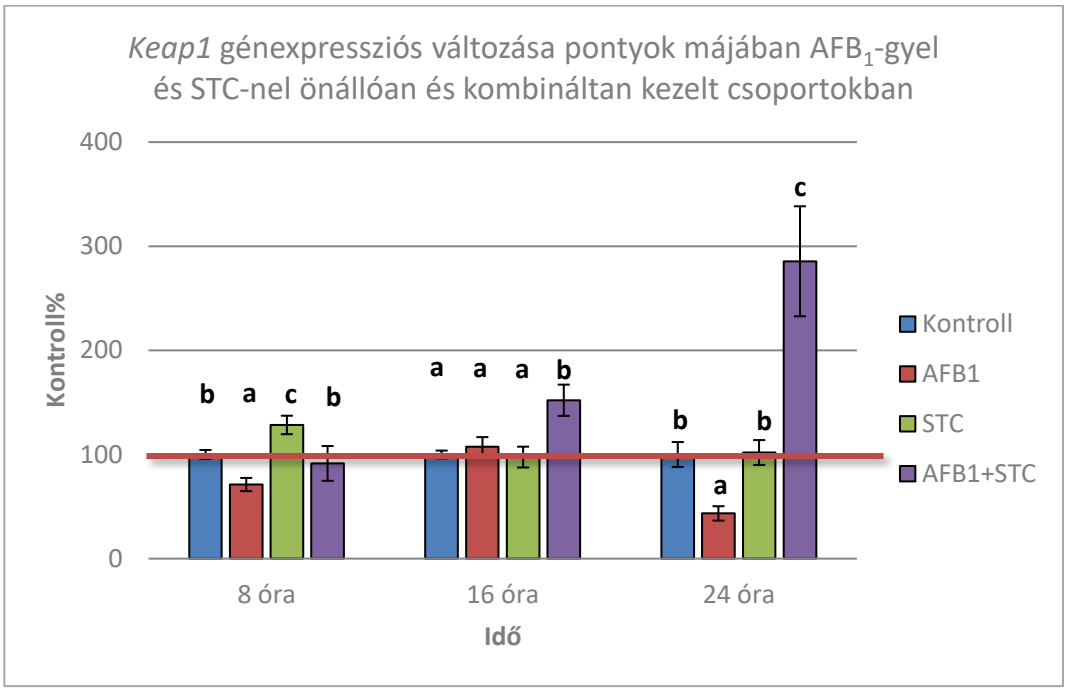
A kísérlet során az egyes vizsgált paraméterek változásának irányát és mértékét a 26. táblázatban összefoglalva mutatom be.

26. táblázat A *keap1, nrf2, gpx4a, gpx4b, gs és gr* gének expressziójának változásai a pontyok májában AFB_1 és STC terhelés hatására

keap1			
	8. óra	16. óra	24. óra
AFB_1	↓	-	↓
STC	↑	-	-
AFB_1+STC	-	↑	↑
nrf2			
	8. óra	16. óra	24. óra
AFB_1	↑	↓	↓
STC	-	-	↓
AFB_1+STC	↑	↑	↑
gpx4a			
	8. óra	16. óra	24. óra
AFB_1	-	↓	↓
STC	↓	↓	↑
AFB_1+STC	↓	↓	↓
gpx4b			
	8. óra	16. óra	24. óra
AFB_1	↑	↑	↑
STC	-	↓	-
AFB_1+STC	↑	-	↑
gs			
	8. óra	16. óra	24. óra
AFB_1	↑	↓	-
STC	-	↓	↓
AFB_1+STC	↑	-	↓
gr			
	8. óra	16. óra	24. óra
AFB_1	↑	-	↓
STC	-	↓	↓
AFB_1+STC	↑	-	↓

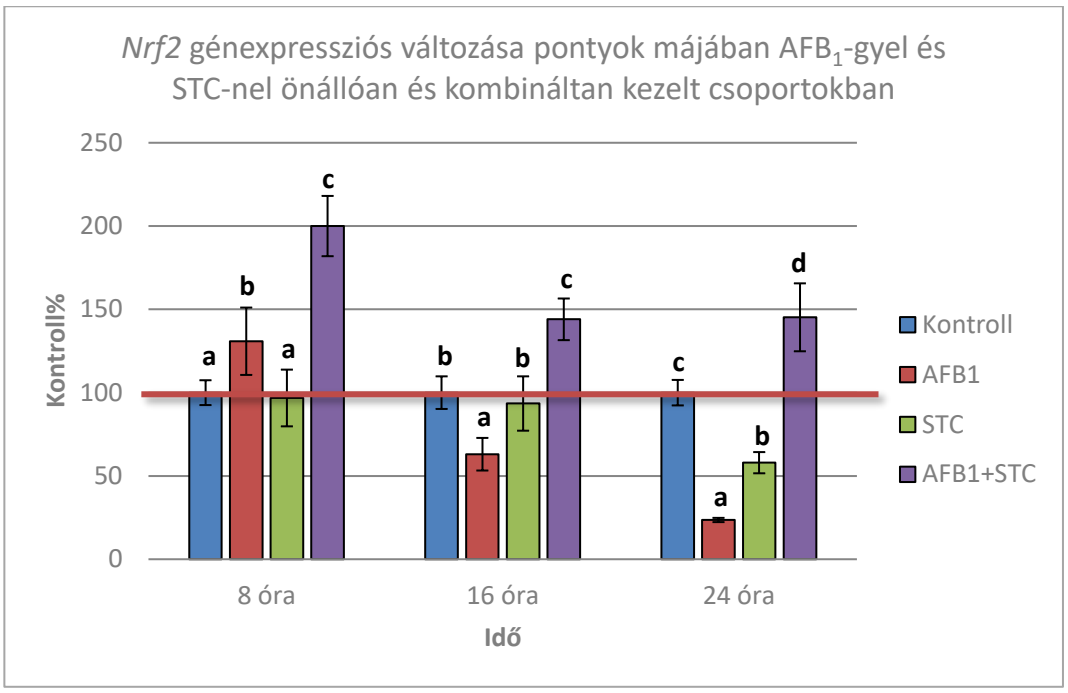
- : a kontrollhoz viszonyítva nem volt szignifikáns eltérés
↓: a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű génexpresszió csökkenés történt
↑: a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékű génexpresszió emelkedés történt

Az antioxidáns enzimek génexpresszióját szabályozó Nrf2-Keap1 útvonal által kódolt enzimek génexpressziója a 24 órás kísérlet során eltérően változott. A *keap1* (24. ábra) esetében az AFB_1 kezelt csoportban a 8. és 24. órában gátlást, a STC-nel kezelt csoportban a 8. órában, míg az AFB_1 + STC együttesen kezelt csoportban (AFB_1+STC) a 16. és 24. órában indukciót tapasztaltam.



24. ábra A *keap1* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel és STC-nel önállóan és kombináltan kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. AFB_1: 0,95 µg/kg ttm STC: 10,27 µg/kg ttm AFB_1+STC: 0,95+10,27 µg/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

Az *nrf2* (25. ábra) esetében az AFB_1+STC csoportban minden mintavételi időpontban indukciót, míg az AFB_1-gyel és STC-nel kezelt csoportokban indukciót és gátlást egyaránt tapasztaltam. Az AFB_1 csoportban a 8. órai indukciót a 16. és 24. órában gátlás követte, míg az STC csoportban csak a 24. órában tapasztaltam gátlást.



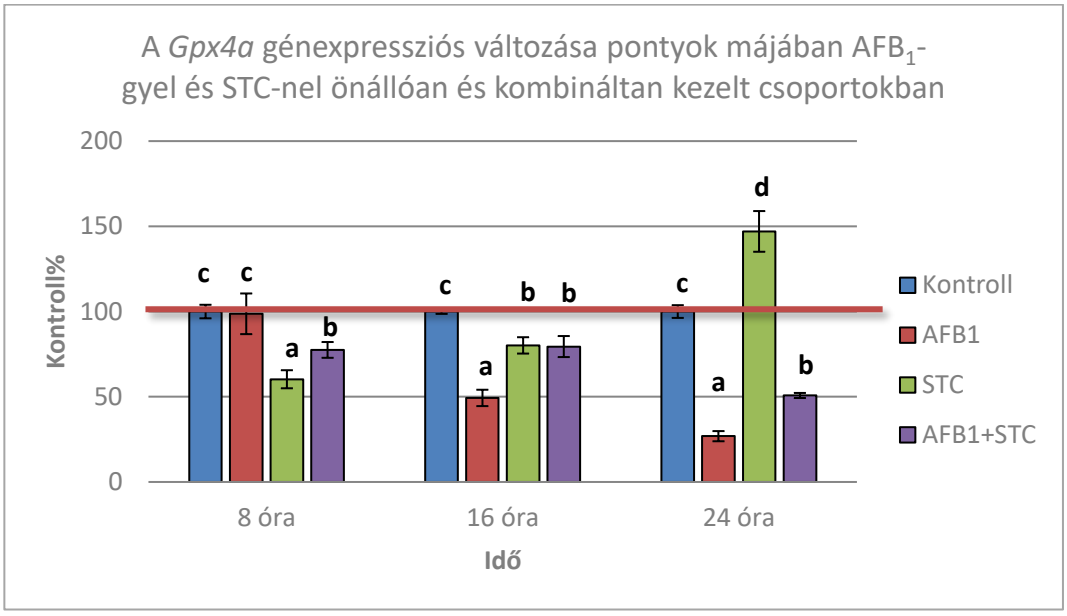
25. ábra Az *nrf2* génexpressziós változása pontyok májában az AFB$_1$-gyel és STC-nel önállóan és kombináltan kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. AFB$_1$: 0,95 µg/kg ttm STC: 10,27 µg/kg ttm AFB$_1$+STC: 0,95+10,27 µg/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje. a, b, c, d jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

Az eredmények azt mutatják, hogy az AFB$_1$ és STC együttes alkalmazása szinergista módon hat az *nrf2* gén expressziójára. Az AFB$_1$ hatására a 8. órai indukciót a 16. és 24. órai mintavételkor gátlás követte. Egy, brojlercsirkével végzett kísérlet során az AFB$_1$ expozíció szintén az *nrf2* gátlását eredményezte mRNS- és fehérjeszinten egyaránt, valamint a csökkentette a xenobiotikum transzformáció fázis II. gének, például a *gst* expresszióját (Muhammad et al., 2018). Az Nrf2 ubikvitinációjában szerepet játszó *keap1* gén expressziója kettős választ mutatott a vizsgálat során, mivel a 8. órai mintavételkor kontroll szint közeli értéket, míg a 16. és 24. órai mintavételkor indukciót tapasztaltam az AFB$_1$+STC csoportban, amely szinergikus hatást valószínűsít az AFB$_1$ és a STC között.

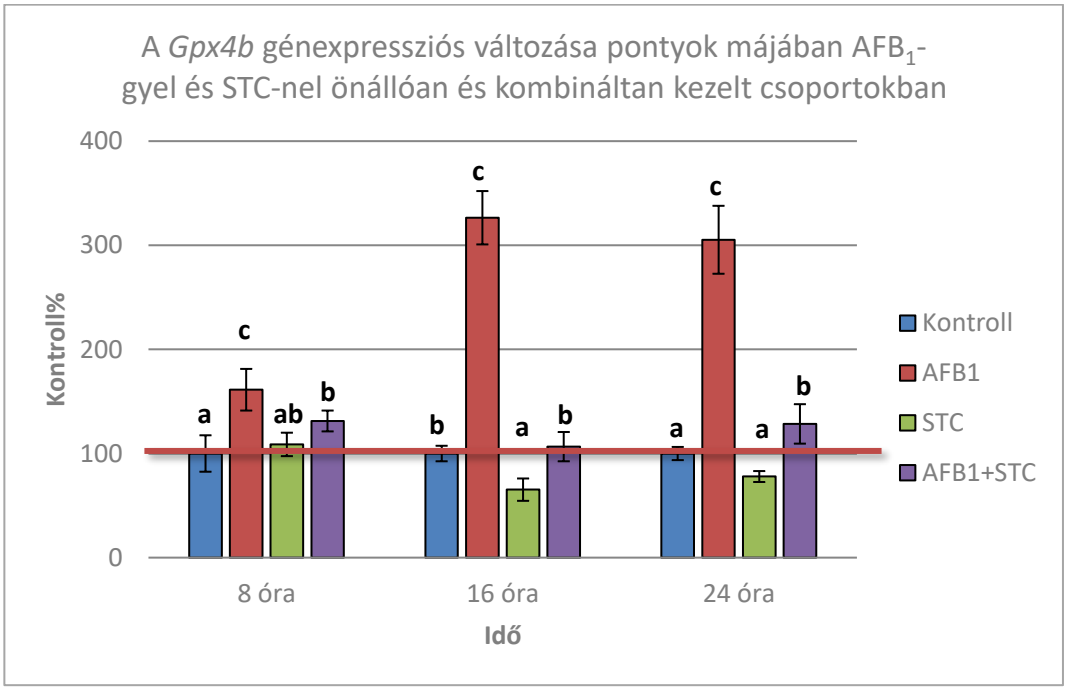
Az *nrf2* gén expressziója, az alkalmazott dózisok hatására a 8. órában, csak az AFB$_1$-gyel és a két mikotoxint együttesen tartalmazó takarmánnyal kezelt csoportban változott, míg a 16. és 24. órában az AFB$_1$-gyel és a STC-nel kezelt csoportban csökkent értékeket tapasztaltam, amely alapján feltételezhető, hogy az alkalmazott dózisok hatására még nem következett be olyan mértékű oxidatív stressz, amely az általam vizsgált gének expressziója szintjén is megnyilvánul.

A foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz gének (*gpx4a* [26. ábra] és *gpx4b* [27. ábra]) expressziója az egyes mintavételi időpontokban hol emelkedett, hol viszont csökkent. A *gpx4a* esetén az AFB$_1$-gyel kezelt csoportban a génexpresszió fokozatos csökkenését, míg a *gpx4b* esetén annak folyamatos indukcióját figyeltem meg a kontrollhoz viszonyítva. Az STC-nel kezelt csoportban ugyanakkor a kezdeti 8. és 16. órai gátlást a 24. órára indukció követte a *gpx4a* gén esetében, míg a *gpx4b* gén expressziója a 16. órai mintavételkor csökkent a kontrollhoz viszonyítva. Az

AFB_1+STC csoportban ugyanakkor a *gpx4a* gén mindhárom mintavételi időpontban gátlást, míg a *gpx4b* gén a 8. és 24. órában indukciót mutatott.



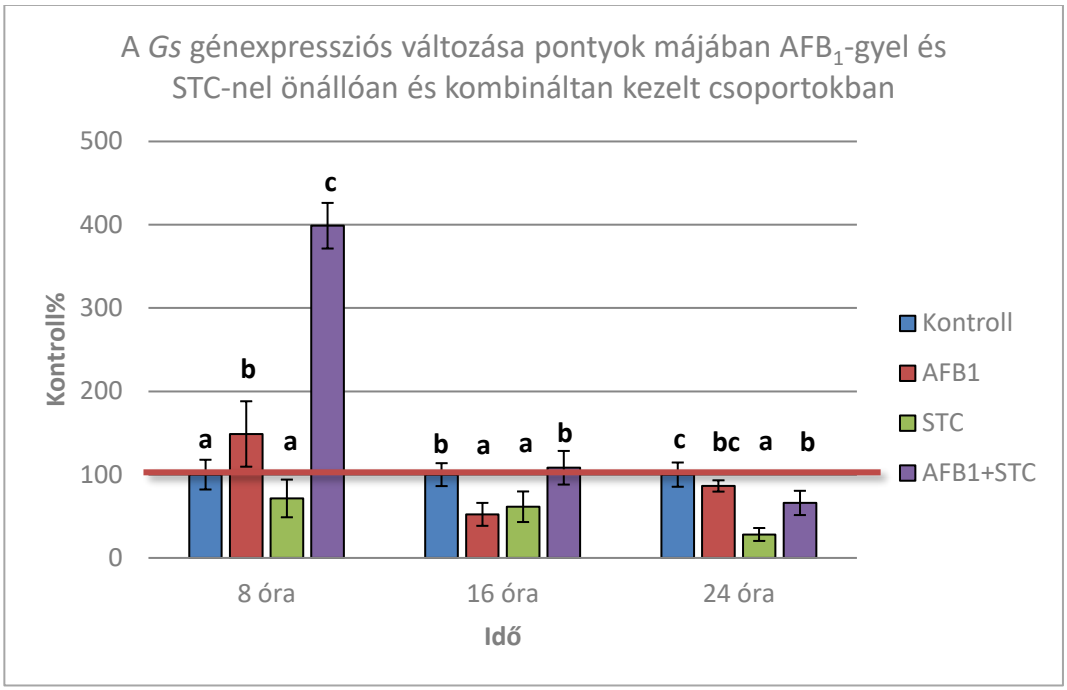
26. ábra A *gpx4a* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel és STC-nel önállóan és kombináltan kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. AFB_1: 0,95 µg/kg ttm STC: 10,27 µg/kg ttm AFB_1+STC: 0,95+10,27 µg/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c, d jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül



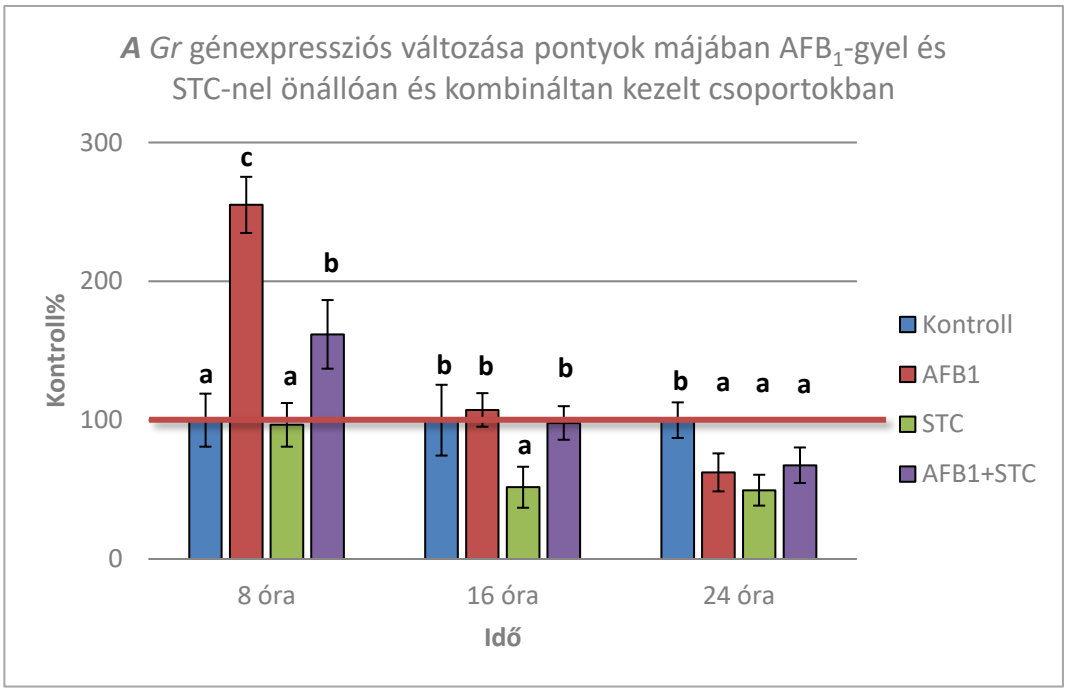
27. ábra A *gpx4b* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel és STC-nel önállóan és kombináltan kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. AFB_1: 0,95 µg/kg ttm STC: 10,27 µg/kg ttm AFB_1+STC: 0,95+10,27 µg/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

A *gs* (28. ábra) és *gr* (29. ábra) gének expressziója hasonlóan változott. A kezdeti, 8. órai, mintavételkor az AFB_1-gyel, valamint az AFB_1+STC kezelt csoportokban indukciót tapasztaltam, amelyet ezt követően eltérő mértékű gátlás követett a 16. és

24. órában. Az *nrf2* gén expressziója az AFB_1-gyel vagy STC-nel önállóan kezelt csoportokban a 24 órás kísérlet során a kontroll, vagy az alatti értékeket mutatott, amely magyarázhatja a vizsgált antioxidáns géncsoport alacsony expresszióját.



28. ábra A *gs* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel és STC-nel önállóan és kombináltan kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. AFB_1: 0,95 µg/kg ttm STC: 10,27 µg/kg ttm AFB_1+STC: 0,95+10,27 µg/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül



29. ábra A *gr* génexpressziós változása pontyok májában az AFB_1-gyel és STC-nel önállóan és kombináltan kezelt csoportokban 24 óra alatt, a kontroll százalékában ábrázolva, Kontroll=100%, piros vonallal jelölve. AFB_1: 0,95 µg/kg ttm STC: 10,27 µg/kg ttm AFB_1+STC: 0,95+10,27 µg/kg ttm; idő: toxin expozíció ideje.
a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p<0,05$) adott mintavételi időponton belül

Az AFB_1+STC kezelés hatására a kísérleti csoportokon belül és az egyes mintavételi időpontok között is szignifikáns eltéréseket tapasztaltam a vizsgált gének esetében. Ezek a változások ugyanakkor mind a mikotoxinnal kezelt, mind a kontroll csoportban kimutathatóak voltak. Ennek hátterében feltételezhetően a gyomorszondán keresztül történő egyszeri takarmány adag bejuttatása, jelenleg még nem ismert faktorok, valamint a biológiai cirkadián ritmus is szerepet játszhatnak, amelyben a fény-sötét ciklus kulcsfontosságú tényező. Bár az általam alkalmazott fényprogram eltér a természetes fény-sötét ritmustól, ugyanakkor ez a hatás minden vizsgálati csoportban azonos volt, így a mikotoxin terhelés által kiváltott hatások megfelelően vizsgálhatóak voltak. Ebben a kísérletben is sikerült a kezelés x idő együttes hatását minden általam viszgált gén esetében statisztikailag is alátámasztanom, amely azt mutatja, hogy nem csak az alkalmazott dózisnak, hanem a kezeléstől eltelt időnek is kulcsfontosságú szerepe van a kialakuló hatások tekintetében.

6. ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1 Következtetések

A korábbi fejezetekben az egyes kísérletek eredményei kerültek megbeszélésre. Ebben a fejezetben a rövidtávú AFB_1, STC, valamint együttes alkalmazásuk hatását bemutató eredményeim alapján levonható általános következtetéseket és javaslatokat mutatom be.

Vizsgálataim elsődleges célja volt, hogy 24 óra időtartam alatt felmérjem az AFB_1 és STC terhelést követően a glutation redox rendszer egyes elemeit kódoló, valamint az azok szabályozásában résztvevő gének expressziójában kimutatható változásokat ponty fajban. Célom volt továbbá felmérni, hogy ezen markerek, a két mikotoxin együttes alkalmazásakor, milyen sorrendben és mértékben változnak. A kísérletek során mesterségesen szennyezett, ismert mikotoxin tartalmú, valamint a mikotoxinokat a detektálhatósági határérték alatt tartalmazó kontroll takarmányt egyszeri adagban, szondán keresztül, juttattam az állatok szervezetébe.

Mindhárom kísérletben mértem a szakirodalom alapján rendelkezésemre álló *nrf2*, *keap1*, továbbá a halak esetében kiemelkedően fontos antioxidáns enzimet, a GPx4-et kódoló *gpx4a* és *gpx4b*, valamint a GPx4 ko-szubsztrátjának, a redukált glutationnak, szintézisében és annak oxidációját követő redukciójában résztvevő enzimeket kódoló *gs* és *gr* gének expressziós változásait.

A három kísérlet, három egymást követő évben, ősszel történt. Az állatok testtömege, ami a kísérlet indításakor az AFB_1-gyel végzett kísérletben 34,20 ± 3,99 g, a STC-nel végzett kísérletben 27,09 ± 5,38 g, míg az AFB_1-gyel és STC-nel végzett kísérletben 49,07 ± 8,85 g volt, mely mindig az aktuális lehalászástól függött.

Ennek megfelelően az AFB_1-gyel végzett kísérletben az alkalmazott dózisok 1,46; 2,92; és 5,85 µg/kg testtömeg, a STC-nel végzett kísérletben 18,89; 36,95 és 72,70 µg/kg testtömeg voltak. A harmadik kísérletben az egyedi dózisok 0,95 µg AFB_1/kg és 10,27 µg STC/kg; míg a ko-expozíció során 0,95 µg AFB_1/kg és 10,27 µg STC/kg testtömeg voltak. Fontos kiemelni, hogy az alkalmazott dózisok az adott ponty súly kategóriában, a gyakorlatban általánosan alkalmazott, testtömegre vonatkoztatott napi takarmány mennyiség alapján takarmány kg-ra számítva az AFB_1 esetében, az alacsonyabb dózisok (93,5, valamint 187,1 µg/kg takarmány) kirívó esetekben, a gyakorlatban is előfordulhatnak. Az alkalmazott STC-dózisok a gyakorlatban, jelenlegi tudomásunk szerint, nem fordulnak elő (1, 2, illetve 4 mg/kg takarmány).

Egy, 2019-ben végzett világszintű felmérés adatai szerint Európában az aflatoxin-szennyezettség keveréktakarmányokban 8%, az átlagos szennyezettség 10 µg/kg takarmány volt, 237 µg/kg takarmány maximum értékkel (BIOMIN 2019). Ugyanakkor a takarmányok, valamint az élelmiszerek STC-tartalmáról jelenleg kevés adat áll rendelkezésre. Fontosnak tartom továbbá megemlíteni, hogy a multi-mikotoxin előfordulás a 2019-es felmérés szerint a következőképpen alakult: mintánként átlagosan 34 mikotoxin és metabolit, továbbá a vizsgált minták 90%-a

legalább 10 mikotoxint és metabolitot tartalmazott. Ebből jól látható, hogy a multi-mikotoxin expozíció hatásainak felmérése rendkívül fontos feladat.

Halakra vonatkozóan jelenleg kevés adat áll rendelkezésre az egyes mikotoxinok iránti érzékenység tekintetében. Az eddig vizsgált halfajok között az aflatoxin iránt a következő érzékenységi sorrendet állították fel: szivárványos pisztráng>szúnyogirtó fogasponty>ezüstlazac>pettyes harcsa>indiai ponty>nílusi tilápia (Santacroce et al., 2008). Az egyes halfajok közötti különbségek az érzékenység tekintetében nagymértékűek, amely feltételezhetően az AFB_1, és hasonló hatása miatt az STC, metabolizmusában részt vevő enzimek aktivitásbeli és génexpressziós különbségeiből fakadnak, amelynek következtében felborulhat a biotranszformáció fázis I. és fázis II. közötti egyensúly (Santacroce et al., 2008).

Az általam alkalmazott dózisok hatására elhullást, illetve szubletális tüneteket egyik kísérlet során sem tapasztaltam, annak ellenére, hogy az alkalmazott STC dózisok a ponty fajra megadott LD_{50} értéknél, 211 µg STC/kg takarmány (Pietsch, 2015) nagyobbak voltak. Az AFB_1-re vonatkozóan a szakirodalomban nem találtam ponty fajra vonatkozó per os LD_{50} értéket.

Az AFB_1-gyel és STC-nel önállóan történt terhelések során az alkalmazott dózisok hatására kettős választ tapasztaltam a vizsgált gének expressziójában. Kezdeti, 8. órai, gátlást a 16. órára indukció követte, amely összefüggésben állhat a takarmány tranzit idejével, azaz a mikotoxinnal mesterségesen szennyezett takarmány bélcsatornából történő felszívódásához, majd a mikotoxinok májba történő transzportjához és végül a hatás kifejtéséhez ennyi idő szükséges. Az antioxidáns enzimek génexpresszióját transzkripció szinten szabályozó Nrf2-Keap1 útvonalat kódoló gének (*nrf2* és *keap1*) expressziója nagyobb dózisú AFB_1 terhelés hatására nagyobb mértékű gátlást mutatott. Ennek hatására a *keap1* gén expressziója mindhárom dózis (A1, A2, A3) esetében kisebb volt, mint a kontroll a 8. órában, és ez a 16. órában a legnagyobb dózis esetében is fennállt, de a 24. órában nem szignifikáns mértékben már meghaladta azt, míg a kísérleteim során alkalmazott legalacsonyabb testtömegre vetített dózis esetén (0,95 µg/kg ttm) a 8. órában kisebb volt, mint a kontroll. Az *nrf2* gén expressziója a 8. órai mintavételkor a legalacsonyabb testtömegre vetített dózis (0,95 µg/kg ttm) esetén volt nagyobb, mint a kontroll, míg a 16. órában a legalacsonyabb (0,95 µg/kg ttm), a közepes és legnagyobb dózis (A2, A3) esetében kisebb volt, ezzel szemben a 24. órában a legalacsonyabb testtömegre vetített AFB_1 dózis (0,95 µg/kg ttm) hatására kisebb, az alacsony (A1) és a legmagasabb dózis (A3) hatására pedig nagyobb volt, mint a konroll. Ezzel szemben a STC terhelés hatására a gátlás kisebb mértékűnek bizonyult, mert a *keap1* gén expressziója az alacsony és közepes dózis (S1, S2) esetében a 8. órára nőtt, majd a 24. órában az alacsony dózis (S1) kivételével ugyancsak meghaladta a kontrollban mért értéket. A legalacsonyabb testtömegre vetített dózis hatására (10,27 µg/kg ttm) ugyanakkor a kezdeti, 8. órai mintavételkor indukciót tapasztaltam. Az *nrf2* gén expressziója a legalacsonyabb testtömegre vetített dózis (10,27 µg/kg ttm) hatására a kezelést követő első 16 órában nem változott a kontroll értékekhez viszonyítva. Ugyanakkor annak mértéke a legalacsonyabb testtömegre vetített STC dózis (10,27 µg/kg ttm) hatására a 24. órai mintavételkor, míg

az alacsony dózis (S1) hatására a 8. órai mintavételkor alacsonyabb volt, ezzel szemben a 16. és 24. órában mindhárom alkalmazott dózis (S1, S2 és S3) hatására nagyobb volt, mint a kontroll. Az AFB_1-gyel és STC-nel együttesen történt terhelés hatására az *nrf2* gén expressziója mindhárom mintavételi időpontban (8. 16. és 24. óra), míg a *keap1* gén expressziója a 16. és 24. órára meghaladta a kontroll értékét. Ezek alapján feltételezhető, hogy az AFB_1 önmagában történő terhelésének hatására kialakult oxidatív stressz mértéke a hierarchikus oxidatív stressz modell alapján vagy átlépett egy küszöbértéket, amelynek hatására már nem elsősorban az Nrf2-ARE útvonal aktiválódása következik be, vagy az alkalmazott dózisok hatására még nem következett be olyan mértékű oxidatív stressz, amely az általam vizsgált gének expressziójában is megnyilvánult. A nagyobb dózisú STC terhelés hatására viszont az Nrf2-ARE útvonal aktiválódott, tehát a májban a STC, vagy az abból képződő reaktív metabolitok, hatékonyabban idéznek elő ROS képződést, vagy az AFB_1-gyel végzett kísérletemben alkalmazott dózisoknál ~10x nagyobb STC dózisok enyhe oxidatív stresszt idéznek elő. Az AFB_1-gyel és STC-nel együttesen történt terhelés hatására az *nrf2* egyértelműen aktiválódott, tehát a két mikotoxin együttes hatása összeadódhatott, azaz a hatásukra képződött reaktív metabolitok hatékonyabban idéztek elő ROS képződést, mint amikor azokat önállóan juttattam az állatok szervezetébe.

A mikotoxin terhelések hatására a glutation redox rendszer szabályozásában szerepet játszó gének esetében is szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam. A *gpx4a* gén expressziója alacsony dózisú (A1) AFB_1 terhelés hatására a 16. és 24. órára kisebb mértékben, míg a nagyobb dózisok (A2, A3) hatására jelentősen nagyobb volt, míg a legalacsonyabb testtömegre vetített dózis (0,95 µg/kg ttm) hatására alacsonyabb volt, mint a kontroll, míg a *gpx4b* gén expressziója minden alkalmazott dózis hatására a 16. és 24. órára jelentősen nőtt. A *gs* gén expressziója a legalacsonyabb testtömegre vetített dózis (0,95 µg/kg ttm), valamint az alacsony (A1) dózis esetén a 8. órára, míg a 16. órára mindhárom alkalmazott dózis (A1, A2 és A3), a 24. órára pedig az alacsony (A1) és magas (A3) dózisnál volt nagyobb, mint a kontroll. A *gr* gén expressziója a legalacsonyabb testtömegre vetített dózis (0,95 µg/kg ttm) esetében a 8. órára, míg az alacsony dózis (A1) hatására a 16. órára haladta meg a kontroll értéket. A STC-nel végzett kísérlet során a fent említett gének esetében (*gpx4a, gpx4b, gs* és *gr*) a kezdeti gátlást követő indukció markánsabb volt, mint az AFB_1 esetén. Ennek oka feltehetően az AFB_1-gyel végzett kísérletben alkalmazottnál nagyobb dózistartomány lehetett. Az AFB_1 és STC együttes alkalmazásakor a *gs* és *gr* gének expressziója a kezdeti, 8. órai, indukciót követően gátlást mutatott a 24. órában. Ennek oka a két mikotoxin önálló alkalmazásához képest alacsonyabb koncentráció lehetett. A kisebb mennyiség ugyanis a bélrendszerből feltehetően hamarabb felszívódik, de gyorsabban is metabolizálódik, így a reaktív oxigéngyökök mennyiségét is gyorsabban megemelheti. Ugyanakkor ezt a, feltehetően mérsékeltebb, ROS termelést a máj a 16. és 24. órára már hatékonyan képes volt semlegesíteni az antioxidáns enzimeket kódoló gének hatékony expressziójának köszönhetően.

6.2 Javaslatok

Az utóbbi években, a szakirodalomban egyre nő azon tanulmányok száma, amelyek az egyes mikotoxinok toxicitásában a szabadgyökök képződését és ennek révén az oxidatív stressz indukálását teszik felelőssé, ezért javaslom a kutatások folytatását az általam vizsgált gének expressziós változásainak nyomonkövetésére más kémiai szerkezetű mikotoxinok vonatkozásában is.

Az AFB_1, továbbá az STC szerkezete és a CYP gének transzkripciós aktiválása következtében mindkét mikotoxin feltételezhetően aril hidrokarbon receptor agonista, ezért javaslom a kutatások folytatását új célgének alkalmazásával, valamint az aril hidrokarbon receptor (AhR) – Xenobiotikum Válasz Elem (XRE) útvonal vizsgálatát, akár más kémiai szerkezetű, de szintén a CYP gént indukáló, mikotoxinok vonatkozásában is.

Végül pedig javaslom a kísérletek kiterjesztését annak vizsgálatára is, hogy a mikotoxinok milyen poszt-transzkripciós változásokat indukálhatnak az Nrf2-t szabályozó különböző miRNS-k esetében.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az elvégzett kísérletek alapján a következő megállapításokat tettem az alkalmazott dózisok és a vizsgált 24 órás időtartam kapcsán:

1. Megállapítottam, hogy eltérő dózisú (1,46, 2,92 és 5,85 µg/kg ttm.), egyszeri *per os* **aflatoxin B_1** terhelés hatására egynyaras pontyok májában:

A ***keap1*** gén expressziója mindhárom dózis esetében kisebb volt, mint a kontroll a 8. órában, és ez a 16. órában a legnagyobb dózis esetében is fennállt. Az ***nrf2*** gén expressziója a 16. órában a közepes és legnagyobb dózis esetében kisebb volt, míg a 24. órában a legalacsonyabb és legmagasabb dózis hatására volt nagyobb.

A ***gpx4a* és *gpx4b*** gének expressziója kezdeti, a legnagyobb dózis esetében megfigyelt gátlást követően dózisfüggően indukálódott, ami összefüggést mutat a Keap1-Nrf2-ARE útvonal aktiválódásával. A *gpx4a* expressziója a legalacsonyabb dózis hatására a 16. és 24. órára kisebb mértékben, míg a nagyobb dózisok hatására jelentősen nagyobb volt, mint a kontroll. A *gpx4b* gén expressziója mindhárom dózis hatására a 16. és 24. órára jelentősen nőtt.

A ***gs*** gén expressziója a legnagyobb dózis hatására a kezdeti gátlást követően a 16. órában minden alkalmazott dózis hatására indukálódott. A ***gr*** gén expressziója a közepes és magas dózis hatására a kezdeti gátlást követően a 16. órában az alacsony dózis hatására indukálódott. Így itt is feltételezhető a Keap1-Nrf2-ARE útvonal aktiválódása. A *gs gén* expressziója legalacsonyabb dózis esetén a 8. órára, míg a 16. és 24. órára a legalacsonyabb és a legnagyobb dózisnál volt nagyobb, mint a kontroll. A *gr* gén expressziója ugyancsak a legalacsonyabb dózis esetében a 16. órára haladta meg a kontrollban mért értéket.

2. Megállapítottam, hogy eltérő dózisban (18,89, 36,95 és 72,70 µg/kg ttm) alkalmazott, egyszeri *per os* **STC** terhelés hatására egynyaras pontyok májában:

Az ***nrf2*** gén expressziójában az alacsony dózis hatására kezdeti gátlás, majd minden alkalmazott dózis hatására aktiváció jelentkezett, de a kezdeti gátlás rövidebb idejű volt, mint az AFB_1 esetében. A ***keap1*** gén expressziója az alacsony és közepes dózis esetében a 8. órára nőtt, majd a 24. órában a legalacsonyabb dózis kivételével ugyancsak meghaladta a kontrollban mért értéket. Az *nrf2* gén expressziója a legalacsonyabb dózis hatására a 8. órára alacsonyabb, a 16. és 24. órában pedig valamennyi alkalmazott dózis hatására nagyobb volt, mint a kontroll.

A ***gpx4a*** gén expressziója az alacsony és magas dózis hatására kezdeti gátlást követően indukálódott, ami markánsabb volt, mint az AFB_1 esetében és összefüggést mutatott a Keap1-Nrf2-ARE útvonal aktiválódásával. A *gpx4a* gén expressziója a legalacsonyabb és legmagasabb dózis hatására a 8. órában kisebb, majd a 16. és 24. órára valamennyi alkalmazott dózis esetén pedig nagyobb volt, mint a kontroll. A *gpx4b* gén expressziója az alacsony dózisnál a 8. órában, majd a 16. és 24. órára valamennyi alkalmazott dózis esetén nagyobb volt, mint a kontroll.

A ***gs* és *gr*** gének a kezdeti gátlást követően indukálódtak, ami az AFB_1-hez képest markánsabb volt és itt is feltételezhető a Keap1-Nrf2-ARE útvonal aktiválódása. A *gs* gén expressziója a legalacsonyabb dózisnál a 8. órára kisebb, majd a 16. és 24. órára az összes vizsgált dózis hatására nagyobb volt, mint a kontroll. A *gr* gén expressziója a legalacsonyabb és legnagyobb dózis hatására a 8. órára kisebb, a 16. órára viszont valamennyi alkalmazott dózis esetén nagyobb volt, mint a kontroll.

3. Megállapítottam, hogy az **AFB_1** és **STC** 0,95 és 10,27 µg/kg testtömeg dózissal történt egyszeri *per os* ko-expozíciója hatására egynyaras pontyok májában:

Az ***nrf2*** gén jelentősebb mértékben aktiválódott, mint a két mikotoxin önálló alkalmazásakor, ami közöttük szinergens hatásra utal, azaz a ko-expozíció során hatékonyabban befolyásolták a redox-érzékeny gének expresszióját. A ***keap1*** gén expressziója a 16. és 24. órára, az *nrf2* gén expressziója pedig mindhárom mintavételi időpontban (8. 16. és 24. óra) meghaladta a kontroll értékét.

A ***gpx4a*** gén expressziójában ko-expozíció hatására mindhárom mintavételi időpontban gátlás mutatkozott, a *gpx4b* gén expressziója viszont a 8. és 24. órában nőtt.

A ***gs* és *gr* gének** expressziójában a kezdeti, 8. órai, aktivációt követően a 24. órai mintavételkor mérsékelt gátlás mutatkozott, ami szintén az alkalmazott mikotoxinok között fennálló szinergens hatást valószínűsíti.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

Az akvakultúra jelenleg a világ egyik leggyorsabban fejlődő iparága (FAO 2018). A globális haltermelés 2016-ban elérte a több mint 171 millió tonnát, amelynek 88%-át közvetlenül emberi fogyasztásra, míg 12%-át (20 millió tonna), halliszt és halolaj előállításához használták fel (Johny et al., 2019). Ennek az intenzív és gyors fejlődésnek természetes következménye a haltakarmány-gyártás közel 30%-os növekedése (Tacon 2004). A halolajtól és hallisztől való függőség mértékének csökkentésére az elmúlt években a haltakarmányozásban alternatív megoldásként a növényi fehérjék alkalmazása terjedt el, amelyek jelentős mértékben növelhetik a haltakarmányok mikotoxin szennyeződésének, ennek révén a halak mikotoxin terhelésének kockázatát. A mikotoxinok világszerte az élelmiszer- és takarmány alapanyagok leggyakoribb szennyezőanyagai. Egyes becslések szerint a világ gabonatermelésének 25%-a (Park et al., 1999), míg egy friss tanulmány szerint, az analítikai módszerek tökéletesedése miatt, ennél jóval nagyobb arányban (Eskola et al., 2020) szennyezett mikotoxinokkal. A takarmány alapanyagok mikotoxinokkal való szennyezettsége az állati egészség szempontjából fontos kockázati tényező. Jelenleg ugyan még csak kevésbé ismert az egyes mikotoxinok halakra és egyéb vízi szervezetekre kifejtett hatása, de folyamatosan nő azon tanulmányok száma, amelyek különböző halfajokban a mikotoxin terheléssel összefüggésben számos kórtani és növekedési problémát írtak le (Anater et al., 2016, Matejova et al., 2017, Pietsch 2020).

Az elsősorban *Aspergillus* penészgomba fajok által termelt AFB_1 és STC által kiváltott toxikus hatásokról számos ismerettel rendelkezünk, de ezek nagyrésze vagy *in vitro* modelleken végzett, vagy *in vivo*, de többségében hosszan tartó, szubletális mikotoxin terhelések eredményein alapulnak.

Fontos kérdés továbbá, hogy milyen módon reagál a különféle mikotoxinokkal, így például AFB_1-gyel és STC-nel egyidejűleg szennyezett takarmány etetését követően a szervezet antioxidáns védőrendszere és az annak enzimatikus tagjait kódoló gének expressziója. A rutinszerűen vizsgált mikotoxinok esetében, a jelenleg érvényben lévő szabályozások alapjait olyan toxikológiai vizsgálatok adatai alapján határozták meg, amelyekben csak a mikotoxinok individuális expozícióját vették figyelembe. Az állati szervezetben azonban a mikotoxinok kölcsönhatásba léphetnek egymással, következésképpen antagonista vagy szinergikus és/vagy additív hatást fejthetnek ki, különösképpen akkor, ha a hatásmechanizmusuk hasonló.

Az AFB_1 és a STC halak, így például a ponty, szervezetére kifejtett önálló és együttes rövidtávú hatásai jelenleg alig ismertek.

A toxikogenomikai vizsgálatok legfontosabb előnye, hogy már korai időpontban meghatározhatók és megjósolhatók az adott hatóanyag hatására bekövetkező változások a különböző biomarker gének vizsgálata alapján, még a sejt vagy szöveti szinten kimutatható károsodások kialakulása előtt.

Doktori munkám célja volt, hogy felmérjem az AFB_1 és STC terhelés önálló és együttes korai hatását a glutation redox rendszer egyes elemeit kódoló génekre (glutation-peroxidáz [*gpx4a*, *gpx4b*], glutation-szintetáz [*gs*], glutation-reduktáz [*gr*]),

valamint az ezek transzkripcióját befolyásoló redox érzékeny génekre (*nrf2, keap1*), a hazánkban legfontosabb étkezési halfajban, a pontyban.

A ponty táplálkozási sajátosságai miatt a rövidtávú, 24 órás kísérlet során, a mesterségesen szennyezett, ismert mikotoxin tartalmú, valamint a mikotoxinokat a detektálhatósági határérték alatt tartalmazó kontroll takarmányt egyszeri adagban szondán keresztül juttattam az állatok szervezetébe.

A három kísérlet, három egymást követő évben, ősszel történt. Az állatok testtömege a kísérlet indításakor az AFB_1-gyel végzett kísérletben 34,20 ± 3,99 g, a STC-nel végzett kísérletben 27,09 ± 5,38 g, míg az AFB_1-gyel és STC-nel végzett kísérletben 49,07 ± 8,85 g volt, az aktuális lehalászás függvényében.

Ennek megfelelően az AFB_1-gyel végzett kísérletben az alkalmazott dózisok 1,46; 2,92; és 5,85 µg/kg testtömeg, a STC-nel végzett kísérlet esetében 18,89; 36,95; és 72,70 µg/kg testtömeg voltak. A harmadik kísérletben az egyedi dózisok 0,95 µg AFB_1/kg; 10,27 µg STC/kg; míg a ko-expozció során 0,95 µg AFB_1/kg és 10,27 µg STC/kg testtömeg voltak.

Az általam alkalmazott dózisok hatására, a rövid időtartam (24 óra) alatt, elhullást, valamint szubletális tüneteket egyik kísérlet során sem tapasztaltam.

A nagyobb dózisú AFB_1 és STC terhelés hatására kettős választ, kezdeti, 8. órai, gátlást, majd azt követően a 16. órára indukciót tapasztaltam. Az alacsonyabb dózisok (0,95 µg AFB_1/kg ttm és 10,27 µg STC/kg ttm) hatására viszont korai indukciót és későbbi gátlást figyeltem meg. Az Nrf2-Keap1 útvonalat kódoló gének (*nrf2, keap1*) expressziós változásai alapján feltételezhető, hogy az AFB_1 terhelés hatására kialakult oxidatív stressz mértéke a hierarchikus oxidatív stressz modell alapján vagy átlépett egy küszöbértéket, amelynek hatására már nem elsősorban az Nrf2-ARE útvonal aktiválódása következik be, vagy az alkalmazott dózisok hatására még nem következett be olyan mértékű oxidatív stressz, amely az általam vizsgált gének expressziója szintjén is megnyilvánult. Ugyanakkor a nagyobb dózisú STC terhelés hatására az Nrf2-ARE útvonal aktiválódott, tehát a májban a STC, vagy az abból képződő reaktív metabolitok, hatékonyabban idéznek elő ROS képződést, vagy az AFB_1-gyel végzett kísérletemben alkalmazott dózisoknál ~10x nagyobb STC dózisok már enyhe oxidatív stresszt idéznek elő. A két mikotoxin együttes alkalmazásának hatására szintén megfigyeltem az Nrf2-Keap1 útvonal aktivációját, tehát a két mikotoxin között szinergens hatás jelentkezett, melynek hatására nagyobb mértékű ROS képződés feltételezhető. Ennek hátterében hasonló kémiai szerkezetük mellett hasonló hatásmechanizmusuk állhat.

A mikotoxin terhelések hatására a glutation redox rendszer szabályozásában szerepet játszó gének esetében is szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam, a *gpx4a*, a *gpx4b*, a *gs* és a *gr* gének esetében. Mind a négy gén esetében kezdeti gátlást követően indukciót tapasztaltam, ami a STC hatására markánsabb volt. Ennek hátterében az AFB_1-gyel végzett kísérletben alkalmazottnál nagyobb dózisok állhattak, amelyet a két mikotoxin toxikus hatást előidéző dózisa közötti általánosan elfogadott arány

alapján határoztam meg. Úgy tűnik azonban, hogy ez a dózis különbség az általam vizsgált marker gének expressziójára kifejtett hatás esetében lényegesen kisebb. A *gs* és *gr* gének expressziója az AFB_1-gyel, továbbá a két mikotoxinnal együttesen kezelt csoportban egy kezdeti, 8. órai, indukciót gátlás követte a 16. és 24. órában. A STC-nel önállóan kezelt csoportban viszont nem volt érdemi eltérés. A két mikotoxin tehát egymás hatását erősíteni látszik, azaz közöttük szinergens hatás feltételezhető. Ez a hatás viszont a szervezet számára kedvező, mert ennek révén hatékonyabban aktiválódik az antioxidáns védőrendszer, amely így a mikotoxinok hatására termelődő ROS hatását hatékonyabban képes eliminálni.

Az eredmények tükrében megállapítható, hogy pontynál már rövid idő alatt, az általunk alkalmazott vízhőmérséklet mellett 16 órán belül, az AFB_1 és a STC egyaránt ROS képződést indukált, ami eltérő mértékben ugyan, de feltételezhetően csak az eltérő dózisok következtében a glutation redox rendszer aktiválódását idézte elő. Eredményeim alapján a *gpx4a*, *gpx4b* és a *gs* gének expressziós változásai bizonyultak leginkább jelzésértékűnek a változások nyomonkövetésében.

9. SUMMARY

Aquaculture is currently one of the fastest growing food-producing industries in the world (FAO 2018). Global fish production reached more than 171 million tonnes in 2016, of which 88% was used directly for human consumption and 12% (20 million tonnes) for the production of fishmeal and fish oil (Johny et al., 2019). A natural consequence of this intensive and rapid development is a nearly 30% increase in fish feed production (Tacon 2004). As an alternative solution to reducing fish oil and fishmeal dependence, the use of plant proteins in fish feed has become widespread in recent years, which can significantly increase the risk of mycotoxin contamination in fish feed, thereby exposing fish to mycotoxins. Mycotoxins are the most common contaminants in food and feed ingredients worldwide. Some estimates suggest that 25% (Park et al., 1999), while due to improvements in analytical methods, even higher rate of world cereal production can be contaminated with mycotoxins (Eskola et al., 2020). Contamination of feed materials with mycotoxins is an important risk factor for animal health. Although the effects of certain mycotoxins on fish and other aquatic organisms are still less known, the number of studies describing pathological and growth problems associated with mycotoxin intake in different fish species is constantly increasing (Anater et al., 2016, Matejova et al., 2017, Pietsch 2020).

Toxic effects induced by aflatoxin B_1 (AFB_1) and sterigmatocystin (STC), mainly produced by Aspergillus species, are well known, but most are based on results from either in vitro models or in vivo, but mostly long-term, sublethal mycotoxin loads.

Another important question is how the antioxidant defence system and the expression of genes encoding its enzymatic members react after feeding an artificially infected feed with various mycotoxins such as AFB_1 and STC. For routinely tested mycotoxins, the basis of the current regulations in force was determined on the base of data from toxicological studies in which only individual exposure to mycotoxins was considered. However, in the animal, mycotoxins may interact with each other and consequently exert an antagonistic or synergistic and / or additive effect, especially if their mechanism of action is similar.

The individual and combined short-term effects of AFB_1 and STC on fish such as carp are currently poorly understood.

The main advantage of toxicogenomic studies is that the changes due to the active substance can be identified and predicted at an early stage based on the study of different biomarker genes even before the development of lesions at the cellular or tissue level.

The aim of my doctoral dissertation was to assess the independent and combined early effect of AFB_1 and STC intake on genes encoding certain elements of the glutathione redox system (glutathione peroxidase [*gpx4a, gpx4b*], glutathione synthetase [*gs*], glutathione reductase [*gr*]), and on genes encoding the redox sensitive transcription factors (*nrf2, keap1*), in the most important edible fish species in Hungary, in common carp.

Due to the nutritional characteristics of the carp, during the short-term 24-hour experiment, the artificially contaminated and control feed was applied in a single dose by gavage directly into the gut once.

In the experiment with AFB_1, the doses used were: 1.46; 2.92; and 5.85 µg / kg body weight, for the STC experiment: 18.89; 36.95 and 72.70 µg / kg body weight. In the third experiment the individual doses were 0.95 µg AFB_1 / kg; 10.27 µg STC / kg; and in co-exposition 0.95 AFB_1 / kg and 10.27 µg STC / kg body weight.

At the doses I used, I did not experience any mortality, nor sublethal effects in any of the experiments over a short period of time (24 hours).

Higher doses of AFB_1 and STC induced a double response, an initial inhibition at 8 h, and then an induction at 16 h. However, at lower doses (0.95 µg AFB_1 / kg b.w. and 10.27 µg STC / kg b.w.), I experienced early induction and later inhibition. Based on the expression changes of the genes encoding the Nrf2-Keap1 pathway (*nrf2*, *keap1*), it can be assumed that the degree of oxidative stress induced by AFB_1 loading, based on the hierarchical oxidative stress model, exceeded a threshold value that no longer primarily results in the activation of the Nrf2-ARE pathway, or the applied doses did not yet cause the degree of oxidative stress that was also manifested at the level of expression of the genes I studied. However, the Nrf2-ARE pathway was activated by higher doses of STC, so STC, or its reactive metabolites, are more effective in inducing ROS formation in the liver, or STC doses ~10x higher than those used in my experiment with aflatoxin cause mild oxidative stress. Activation of the Nrf2-Keap1 pathway was also observed when the two mycotoxins were co-administered, so a synergistic effect between the two mycotoxins can be assumed, leading to a higher degree of ROS formation. This may be due to their similar chemical structure and similar mechanism of action.

As a result of mycotoxin exposure, I also found significant differences in the genes involved in the regulation of the glutathione redox system, in the case of the *gpx4a*, *gpx4b*, *gs* and *gr* genes. For all four genes, induction was observed after initial inhibition, which was more pronounced as effect of STC. This may have been due to higher doses of STC than those used in the experiment with AFB_1, which were determined on the basis of the generally accepted ratio between the toxic doses of the two mycotoxins. However, this dose difference appears to be significantly smaller for the effect on the expression of the marker genes I studied. Expression of the *gs* and *gr* genes in the AFB_1 and two mycotoxin co-treated groups was induced at 8 h which was followed by an inhibition at 16 h and 24 h. However, there was no significant difference in the group treated with sterigmatocystine alone. Thus, the two mycotoxins appear to enhance the effect of each other, i.e. a synergistic effect between them can be assumed. This effect, on the other hand, is beneficial for the body, because it activates the antioxidant defense system more effectively, which can therefore more effectively eliminate the effect of ROS produced by mycotoxins.

In the light of the results, it can be stated that both AFB_1 and STC induced ROS formation in carp in a short time, 16 hours at the temperature we used, which, although

to varying degrees, presumably only resulted in activation of the glutathione redox system due to different doses. Based on my results, the expression changes of the gpx4a, gpx4b, and gs genes proved to be the most indicative in the follow-up of the changes.

M1 IRODALOMJEGYZÉK

574/2011/EU Rendelet a 2002/32/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv I. mellékletének a nitrit, a melamin és az Ambrosia spp. maximális szintjének, valamint bizonyos kokcidiosztatikumok és hisztomonosztatikumok átvitelének tekintetében történő módosításáról, továbbá az irányelv I. és II. mellékletének egységes szerkezetbe foglalásáról

Abbas, T., Dutta, A. (2009): p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. Nat. Rev. Cancer 9: 400-414.

Abdelhamid, A.M. (1988): Effect of sterigmatocystin contaminated diets on fish performance. Arch. Anim. Nutr. (Berlin) 38: 833-846.

Abdel-Daim, M.M., Dawood, M., Aleya, L., Alkahtani, S. (2020): Effects of fucoidan on the hematic indicators and antioxidative responses of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) fed diets contaminated with aflatoxin B_1. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 11: 12579-12586.

Abdel-Wahhab, M.A., Hasan, A.M., Aly, S.E., Mahrous, K.F. (2005): Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile tilapia fish (Oreochromis niloticus). Mutat. Res. 582: 20-27.

Abedi, Z.H., Scott, P.M. (1969): Detection of toxicity of aflatoxins, sterigmatocystin, and other fungal toxins by lethal action on zebra fish larvae. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52: 962-969.

Agag, B.I. (2004): Mycotoxins in foods and feeds: Aflatoxins. Assoc. Universal Bull. Environ. Res. 7: 173-191.

Ahn Tuan, N.A., Grizzle, J.M., Lovell, R.T., Manning, B.B., Rottinghaus, G.E. (2002): Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) fed diets containing aflatoxin B1. Aquaculture 212: 311-319.

Akter, A., Rahman, M., Hasan, M. (2010): Effects of aflatoxin B1 on growth and bioaccumulation in common carp fingerling in Bangladesh. Asia. Pac. J. Rural. Dev. 20: 1-13.

Al-Sabti, K. (1986): Clastogenic effects of five carcinogenic mutagenic chemicals on the cells of the common carp, Cyprinus carpio L. Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Toxicol. Pharmacol. 85: 5-9.

Alias, Z. (2016): The role of glutathione transferases in the development of insecticide resistance. In: Trdan S. (ed.) Insecticides Resistance. IntechOpen, Rijeka

Alshannaq, A., Yu, J.H. (2017): Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. Int. J. Environ. Res. Publ. Health 14: 632.

Anater, A., Manyes, L., Meca, G., Ferrer, E., Luciano, F.B., Pimpão, C.T., Font, G. (2016): Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. Aquaculture. 451:1-10.

Andrade, P.D., Caldas, E.D. (2015): Aflatoxins in cereals: worldwide occurrence and dietary risk assessment. World Mycotoxin J. 8: 415-431.

Araujo, J. A., Nel, A. E. (2009): Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. Part. Fibre Toxicol. 6: 24.

Arenas-Huertero, F., Zaragoza-Ojeda, M., Sánchez-Alarcón, J., Milić, M., Šegvić Klarić, M., Montiel-González, J.M., Valencia-Quintana, R. (2019): Involvement of Ahr pathway in toxicity of aflatoxins and other mycotoxins. Front. Microbiol. 10: 2347.

Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L. (1987): Effect of early aflatoxin B_1exposure on in vivo and in vitro antibody responses in rainbow trout, Salmo gairdneri. J. Fish Biol. 31: 19-22.

Arnér, E.S. (2009): Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. Biochim. Biophys. Acta 1790: 495-526.

Ashley, L.M. (1970): Pathology of fish fed aflatoxins and other antimetabolites In: S.F. Sniesko (ed.). Proceedings of the Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 5: 366-379.

Ateş, M., Ortatatli, M. (2021): Phase-1 bioactivation mechanisms of aflatoxin through AhR, CAR and PXR nuclear receptors and the interactions with Nigella sativa seeds and thymoquinone in broilers. Ecotoxicol. Environ. Saf. 208: 111774.

Atroshi, F., Biese, I., Saloniemi, H., Ali-Vehmas, T., Saari, S., Rizzo, A., Veijalainen P. (2000): Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. J. Pharm. Pharm. Sci. 3: 281-291.

Baertschi, S.W., Raney, K.D., Shimada, T., Harris, T.M., Guengerich, F.P. (1989): Comparison of rates of enzymatic oxidation of aflatoxin B1, aflatoxin G1, and sterigmatocystin and activities of the epoxides in forming guanyl-N7 adducts and inducing different genetic responses. Chem. Res. Toxicol. 2: 114-122.

Bailey, G.S., Williams, D.E., Wilcox, J.S., Loveland, P.M., Coulombe, R.A., Hendricks, J. D. (1988): Aflatoxin B1 carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. Carcinogenesis 9: 1919-1926.

Baird, L., Yamamoto, M. (2020): The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. Mol. Cell. Biol. 40: e00099-20.

Baldissera, M.D., Souza, C.F., Zeppenfeld, C.C., Descovi, S.N., Moreira, K., da Rocha, M., da Veiga, M.L., da Silva, A.S., Baldisserotto, B. (2018): Aflatoxin B1-contaminated diet disrupts the blood-brain barrier and affects fish behavior: Involvement of neurotransmitters in brain synaptosomes. Environ. Toxicol. Pharmacol. 60: 45-51.

Balogh, K., Kövesi, B., Zándoki, E., Kulcsár, S., Ancsin, Z., Erdélyi, M., Dobolyi, C., Bata-Vidács, I., Inotai, K., Szekeres, A., Mézes, M., Kukolya, J. (2019): Effect of sterigmatocystin or aflatoxin contaminated feed on lipid peroxidation and glutathione redox system and expression of glutathione redox system regulatory genes in broiler chicken. Antioxidants 8, 201.

Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., Brigelius-Flohé, R. (2005): The GI-GPx gene is a target for Nrf2. Mol. Cell. Biol. 25: 4914-4923.

Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Leggieri, M. C., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T. (2016): Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. Sci. Rep. 6: 24328

Battilani, P., Costa, L.G., Dossena, A., Gullino, M.L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., Gualla, A. (2009): Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. Scientific/ Technical Report submitted to EFSA. CFP/EFSA/CONTAM/2008/01, EFSA, Parma, pp. 26.

Battin, E. E., Brumaghim, J.L. (2009): Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. Cell. Biochem. Biophys. 55: 1-23.

Baud, O., Greene, A.E., Li, J., Wang, H., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A. (2004): Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. J. Neurosci. 24: 1531-1540.

Bauer, D.H., Lee, D.J., Sinnhuber, R.O. (1969): Acute toxicity of aflatoxins B1 and G1 in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Toxicol. Appl. Pharmacol. 15: 415-419.

Bbosa, G.S., Lubega, A., Kyegombe, D.B., Kitya, D., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W. W. (2013a): Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. In: Razzaghi-Abyaneh ed.: Aflatoxins. Recent andvances and future prospects. Intech Open, Rijeka

Bbosa, G.S., Kitya, D., Odda, J., Ogwal-Okeng, J. (2013b): Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. Health 5: 14-34.

Benkerroum, N. (2020): Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. Int. J. Environ. Res. Publ. Health 17: 423.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E. (2014): Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiol. Rev. 94: 329-54.

Biomin World Mycotoxin Survey. Annual Report No. 16. 2019. Available online: https://tinyurl.com/yxf38nwn (letöltve: 2021.03.04.).

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J. 5: 9-19.

Bitsayah, A., Banaee, M., Haghi, B.N. (2018): Effects of aflatoxin-contaminated feed on immunological parameters of common carp (Cyprinus carpio). Iran. J. Toxicol. 12: 7-12.

Bosello-Travain, V., Forman, H.J., Roveri, A., Toppo, S., Ursini, F., Venerando, R., Warnecke, C., Zaccarin, M., Maiorino, M. (2015): Glutathione peroxidase 8 is transcriptionally regulated by HIFα and modulates growth factor signaling in HeLa cells. Free Radic. Biol. Med. 81: 58-68.

Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M. (2013): Glutathione peroxidases. Biochim. Biophys. Acta 1830: 3289-3303.

Cabaret, O., Puel, O., Botterel, F., Pean, M., Bretagne, S. Delaforge, M. (2011): Contribution of uniformly 13C-enriched sterigmatocystin to the study of its pulmonary metabolism. Rapid Comm. Mass Spectr. 25: 2704-2710.

Cabaret, O., Puel, O., Botterel, F., Pean, M., Khoufache, K., Costa, J.M., Delaforge, M., Bretagne, S. (2010): Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. Chem. Res. Toxicol. 23: 1673-1681.

Caceres, I., Khoury, A.A., Khoury, R.E., Lorber, S., Oswald, I.P., Khoury, A.E., Atoui, A., Puel, O., Bailly, J.D. (2020): Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: a review. Toxins 12: 150.

Cardoso, B.R., Hare, D.J., Bush, A.I., Roberts, B.R. (2017): Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? Mol. Psychiatr. 22: 328-335.

Carmona-Aparicio, L., Pérez-Cruz, C., Zavala-Tecuapetla, C., Granados-Rojas, L., Rivera-Espinosa, L., Montesinos-Correa, H., Hernández-Damián, J., Pedraza-Chaverri, J., Sampieri, A. 3rd, Coballase-Urrutia, E., Cárdenas-Rodríguez, N. (2015): Overview of Nrf2 as therapeutic target in epilepsy. Int. J. Mol. Sci. 16: 18348-18367.

Carvajal-Moreno, M. (2015): Metabolic changes of aflatoxin B1 to become an active carcinogen and the control of this toxin. Immunome Res. 11: 1.

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: 2074-85.

Chaudhary, M., Rao, P.V.L. (2010): Brain oxidative stress after dermal and subcutaneous exposure of T-2 toxin in mice. Food Chem. Toxicol. 48: 3436-3442.

Chavez-Sanches, M.C., Martinez, C.A., Moreno, I.O., (1994): Pathological effects of feeding young Oreochromis niloticus diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. Aquaculture 127: 49-60.

Chen, K., Fang, J., Peng, X., Cui, H., Chen, J., Wang, F., Chen, Z., Zuo, Z., Deng, J., Lai, W., Zhou, Y. (2014): Effect of selenium supplementation on aflatoxin B_1-induced histopathological lesions and apoptosis in bursa of Fabricius in broilers. Food Chem. Toxicol. 74: 91-97.

Chen, Y. I., Wei, P. C., Hsu, J. L., Su, F. Y., Lee, W. H. (2016): NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. Am. J. Transl. Res. 8: 1626-1640.

Chu, F.F., Doroshow, J.H., Esworthy, R.S. (1993): Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. J. Biol. Chem. 268: 2571-2576.

Chung, W.M., Lin, J.K., Wu, K.C., Hsiung, K.P. (1985): In vitro interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxicol by rat erythrocytes. Biochem. Pharmacol. 34: 2566-2569.

Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., Bornkamm, G.W. (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.

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.

Coskun, E., Jaruga, P., Vartanian, V., Erdem, O., Egner, P.A., Groopman, J.D., Lloyd, R.S., Dizdaroglu, M. (2019): Aflatoxin-guanine DNA adducts and oxidatively induced DNA damage in aflatoxin-treated mice in vivo as measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution. Chem. Res. Toxicol. 32: 80-89.

Coulombe, R.A., Shelton, D.W., Sinnhuber, R.O., Nixon, J.E. (1982): Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Salmonella/trout hepatic enzyme activation system, Carcinogenesis 3: 1261.

Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D. (1987): Oxygen radicals and human disease. Ann. Intern. Med. 107: 526-545.

Cui, J., Wang, J., Huang, S., Jiang, X., Li, Y., Wu, W., Zhang, X. (2017): Sterigmatocystin induced apoptosis in human pulmonary cells in vitro. Exp. Toxicol. Pathol. 69:695-699.

Curry, P.T., Reed, R.N., Martino, R.M., Kitchin, R.M. (1984): Induction of sister-chromatid exchanges in vivo in mice by the mycotoxins sterigmatocystin and griseofulvin. Mutat. Res. 137: 111-115.

Dalvi, R.R. (1986): An overview of aflatoxicosis of poultry: its characteristics, prevention and reduction. Vet. Res. Commun. 10: 429-443.

Da Silva, E.O., Bracarense, A.P.F.L., Oswald, I.P. (2018): Mycotoxins and oxidative stress: where are we? World Mycotoxin J. 11: 113-134.

Dear, T.N., Campbell, K., Rabbitts, T.H. (1991): Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. Biochemistry 30: 10376-10382.

Degen, G., Neumann, H. (1978): Major metabolite of aflatoxin-B1 in rat is a glutathione conjugate. Chem. Biol. Interact. 22: 239-255.

Denison, M.S., Nagy, S.R. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43: 309-334.

Dobolyi, Cs., Sebok, F., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Szecsi, A., Toth, B., Varga, B., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Krifaton, C., Kukolya, J., (2013): Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. Acta Aliment. 42: 451-459.

Dobolyi, Cs., Inotai, K., Bata-Vidács, I., Sárkány, D., Csernus, O., Kocsubé, S., Tóth, B., Szekeres, A., Kukolya, J. (2021): Isolation and detailed characterisation of the first sterigmatocystin hyperproducer mould strain in Hungary. Acta Aliment. doi: 10.1556/066.2020.00326

Dohnal, V., Wu, Q., Kuča, K. (2014): Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. Arch. Toxicol. 88:1635-1644.

Doi, K., Uetsuka, K. (2014): Mechanisms of mycotoxin-induced dermal toxicity and tumorigenesis through oxidative stress-related pathways. J. Toxicol. Pathol. 27: 1-10.

Droge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82: 47-95.

Dubravka, R., Daniela, J., Andrea, H. T., Domagoj, K., Nevenka, K., Lada, R., Davor, Ž., Maja, P., Maja, Š.K. (2020): Sterigmatocystin moderately induces oxidative stress in male Wistar rats after short-term oral treatment. Mycotoxin Res. 36: 181-191.

Eaton, D.L., Gallagher, E.P. (1994): Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 34: 135-172.

EFSA (2013): EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. EFSA J. 11: 3254. pp. 81.

Ehrlich, K.C. (2009): Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis. Toxins 1: 37-58.

El-Barbary, M.I. (2015): Detoxification and antioxidant effects of garlic and curcumin in Oreochromis niloticus injected with aflatoxin B1 with reference to gene expression of glutathione peroxidase (GPx) by RT-PCR. Fish Physiol. Biochem. 42: 617-629.

El-Sayed, Y.S., Khalil, R.H. (2009): Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (Dicentrarchus labrax L.). Food Chem. Toxicol. 47: 1606-1609.

Encarnacao, P., Srikhum, B., Rodrigues, I., Hofstetter, U. (2009): Growth performance of Red tilapia (O. niloticus X O. mossambicus) fed diet contaminated with aflatoxin B1 and the use of a commercial product to suppress negative effects. World Aquaculture Congress, Veracruz, Mexico (Abstract).

Engelbrecht, J.C., Altenkirk, B. (1972): Comparison of some biological effects of sterigmatocystin and aflatoxin analogues on primary cell cultures. J. Natl. Cancer Inst. 48: 1647-1655.

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R. (2020): Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60: 2773-2789.

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.

Essigmann, J.M., Barker, L.J., Fowler, K.W., Francisco, M.A., Reinhold, V.N., Wogan, G.N. (1979): Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 179-183.

Esworthy, R.S., Aranda, R., Martín, M.G., Doroshow, J.H., Binder, S.W., Chu, F.F. (2001): Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281: G848-G855.

Fanjul-Moles, M.L., López-Riquelme, G.O. (2016): Relationship between oxidative stress, circadian rhythms, and AMD. Oxid. Med. Cell Longev. 2016: 7420637.

Finkel, T. (2011): Signal transduction by reactive oxygen species. J. Cell Biol. 194: 7-15.

Firmin, S., Gandia, P., Morgavi, D. P., Houin, G., Jouany, J. P., Bertin, G., Boudra, H. (2010): Modification of aflatoxin B1and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. Food Addit. Contam. Part A. 27: 1153-1160.

Florian, S., Krehl, S., Loewinger, M., Kipp, A., Banning, A., Esworthy, S., Chu, F.F., Brigelius-Flohé, R. (2010): Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. Free Radic. Biol. Med. 49: 1694-1702.

Fujii, K., Kurata, H., Odashima, S., Hatsuda, Y. (1976): Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. Cancer Res. 36: 1615-1618.

Fukutomi, T., Takagi, K., Mizushima, T., Ohuchi, N., Yamamoto, M. (2014): Kinetic, thermodynamic, and structural characterizations of the association between Nrf2-DLGex degron and Keap1. Mol. Cell. Biol. 34: 832-846.

Fushimi, Y., Takagi, M., Uno, S., Kokushi, E., Nakamura, M., Hasunuma, H., Shinya, U., Deguchi, E., Fink-Gremmels, J. (2014): Measurement of sterigmatocystin concentrations in urine for monitoring the contamination of cattle feed. Toxins 6: 3117-3128.

Gao, W., Jiang, L., Ge, L., Chen, M., Geng, C., Yang, G., Li, Q., Ji, F., Yan, Q., Zou, Y., Zhong, L., Liu, X. (2015): Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. Toxicol. In Vitro 29: 1-7.

Ghyselinck, N.B., Jimenez, C., Courty, Y., Dufaure, J.P. (1989): Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis. J. Reprod. Fertil. 85: 631-639.

Girotti A.W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. 39: 1529-1542.

Girotti, A.W., Korytowski, W. (2017): Cholesterol hydroperoxide generation, translocation, and reductive turnover in biological systems. Cell Biochem. Biophys. 75: 413-419.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. (2006): NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. Biochem. Pharmacol. 72: 1493-1505.

Goltyaev, M.V., Varlamova, E.G., Novoselov, V.I., Fesenko, E.E. (2014): Determination of mgpx6 and mselv gene mRNA expression during mouse postnatal development. Dokl. Biochem. Biophys. 457: 132-133.

Grim, J.M., Hyndman, K.A., Kriska, T., Girotti, A.W., Crockett, E.L. (2011): Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish. J. Exp. Biol. 214: 3751-3759.

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. U.S.A. 100: 12618-12623.

Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (1990): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem. Sci. 15: 129-135.

Halliwell, B. (1991): Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am. J. Med. 91: 14S-22S.

Halliwell, B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. 141: 312-322.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989): Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press,.Oxford.

Handy, D.E., Lubos, E., Yang, Y., Galbraith, J.D., Kelly, N., Zhang, Y.Y., Leopold, J.A., Loscalzo, J. (2009): Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. J. Biol. Chem. 284: 11913-11921.

Hassan, M.S., Nssar, K.M., Mohammady, E.Y., Amin, A., Tayel, S.I., El-Haroun, E.R. (2020): Nano-zeolite efficiency to mitigate the aflatoxin B1 (AFB_1) toxicity: Effects on growth, digestive enzymes, antioxidant, DNA damage and bioaccumulation of AFB_1 residues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 523: 735123.

He, C.H., Fan, Y.H., Wang, Y., Huang, C.Y., Wang, X.C., Zhang, H.B. (2010): The Individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B1 on primary hepatocytes of Cyprinus carpio. Int. J. Mol. Sci. 11: 3760-3768.

He, F., Ru, X., Wen, T. (2020): Nrf2, a transcription factor for stress response and beyond. Int. J. Mol. Sci. 21: 4777.

Heinonen, J.T., Fisher, R., Brendel, K., Eaton, D.L. (1996): Determination of aflatoxin B1 biotransformation and binding to hepatic macromolecules in human precision liver slices. Toxicol. Appl. Pharmacol. 136: 1-7.

Hendricks, J.D., Sinnhuber, R.O., Nixon, J.E., Wales, J.H., Masri, M.S., Hsieh, D.P. (1980): Carcinogenic response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to aflatoxin B1 and synergistic effect of cyclopropenoid fatty acids. J. Natl. Cancer Inst. 64: 523.

Hermesz, 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.

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. U.S.A. 104:15747-15752.

Hsieh, D.P.H., Salhab, A.S., Wong, J.J., Yang, S.L. (1974): Toxicity of aflatoxin Q1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 30: 237.

Huang, C., Wu, P., Jiang, W.D., Liu, Y., Zeng, Y.Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L. (2018): Deoxynivalenol decreased the growth performance and impaired intestinal physical barrier in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish Shellfish Immunol. 80: 376-391.

Huang, C., Feng, L., Liu, X.A., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhou, X.Q. (2020): The toxic effects and potential mechanisms of deoxynivalenol on the structural integrity of fish gill: Oxidative damage, apoptosis and tight junctions disruption. Toxicon 174: 32-42.

Huang, S., Wang, J., Xing, L., Shen, H., Yan, X., Wang, J., Zhang, X. (2014): Impairment of cell cycle progression by sterigmatocystin in human pulmonary cells in vitro. Food Chem. Toxicol. 66: 89-95.

Huang, Y., Ge, D.Y., Zong, H., Yin, J.X., Qu, X.N., Lv, S.W. (2017): Active site mimicry of glutathione peroxidase by glutathione imprinted selenium-containing trypsin. Catalysts. 7: 10.

Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. (2018): First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria J. Med. 54: 287-293.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y. (1997): An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem. Biophys. Res. Commun. 236: 313-322.

Itoh, K., Mimura, J., Yamamoto, M. (2010): Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. Antiox. Redox Signal. 13: 1665-1678.

Iuchi, K., Ema, M., Suzuki, M., Yokoyama, C., Hisatomi, H. (2019): Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells. Mol. Med. Rep. 19: 2767-2773.

Iyer, R.S., Coles, B.F., Raney, K.D., Thier, R., Guengerich, F.P., Harris, T.M. (1994): DNA adduction by the potent carcinogen aflatoxin B1: Mechanistic studies. J. Am. Chem. Soc. 116: 1603-1609.

Jantrarotai, W., Lovell, R.T. (1990): Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 2: 248-254.

Jiang, J., Shi, D., Zhou, X.Q., Yin, L., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., 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.

Jin, R.C., Mahoney, C.E., Coleman Anderson, L., Ottaviano, F., Croce, K., Leopold, J.A., Zhang, Y.Y., Tang, S.S., Handy, D.E., Loscalzo, J. (2011): Glutathione peroxidase-3 deficiency promotes platelet-dependent thrombosis in vivo. Circulation 123: 1963-1973.

Johny, A., Fæste, C.K., Bogevik, A.S., Berge, G.M., Fernandes, J., Ivanova, L. (2019): Development and validation of a liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the simultaneous determination of mycotoxins and phytoestrogens in plant-based fish feed and exposed fish. Toxins 11: 222.

Jurkovič, S., Osredkar, J., Marc, J. (2008): Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. Biochem. Med. (Zagreb). 18: 162-174.

Kawai, Y., Nuka, E. (2018): Abundance of DNA adducts of 4-oxo-2-alkenals, lipid peroxidation-derived highly reactive genotoxins. J. Clin. Biochem. Nutr. 62: 3-10.

Kemppainen, B.W., Riley, R.T., Pace, J.G. (1988): Skin absorption as a route of exposure for aflatoxin and trichothecenes. J. Toxicol. 7: 95-120.

Kim, H.Y., Gladyshev, V.N. (2005): Different catalytic mecha-nisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases. PLoS Biol. 3: e375.

Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. (2011): Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 254: 86-99.

Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004): Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. Mol. Cell. Biol. 24: 7130-7139.

Kopacz, A., Kloska, D., Forman, H.J., Jozkowicz, A., Grochot-Przeczek, A. (2020): Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1. Free Radic. Biol. Med. 157: 63-74.

Kozieł, M.J., Kowalska, K., Piastowska-Ciesielska, A.W. (2021): Nrf2: a main responsive element in cells to mycotoxin-induced toxicity. Arch Toxicol. doi: 10.1007/s00204-021-02995-4.

Kövesi, B., Cserháti, M., Erdélyi, M., Zándoki, E., Mézes, M., Balogh, K. (2019): Long-term effects of ochratoxin A on the glutathione redox system and its regulation in chicken. Antioxidants 8: 178.

Kövesi, B., Pelyhe, C., Zándoki, E., Mézes, M., Balogh, K. (2020): Combined effects of aflatoxin B1 and deoxynivalenol on the expression of glutathione redox system regulatory genes in common carp. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 104: 1531-1539.

Kretz-Remy, C., Mehlen, P., Mirault, M.E., Arrigo, A.P. (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.

Kumagai, S., Nakano, N., Aibara, K. (1983): Interactions of aflatoxin B1 and blood components of various species in vitro: interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxicol in the blood. Toxicol. Appl. Pharmacol. 67: 292-301.

Kumagai, S. (1989): Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 97: 88-97.

Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K., Kang, S.G. (2017): Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. Front. Microbiol. 7: 2170.

Kulcsár Sz., Kövesi B., Mézes M. (2019): Aflatoxins, oxidative stress and regulation of glutathione redox system. In: Kintzios, S., Mavrikou, S. eds.: Aflatoxins: Biochemistry, Toxicity, Public Health, Policies and Modern Methods of Analysis. Nova Science Publishers, New York, pp. 29-50.

Kuršvietienė, L., Mongirdienė, A., Bernatonienė, J., Šulinskienė, J., Stanevičienė, I. (2020): Selenium anticancer properties and impact on cellular redox status. Antioxidants (Basel) 9: 80.

Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W. (2002): Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 bycancer chemopreventive agents: Role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. Mol. Cell Biol. 22: 2883-2892.

Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2014): Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. Physiol. Rev. 94: 739-777.

Lazado, C.C., Voldvik, V. (2020): Temporal control of responses to chemically induced oxidative stress in the gill mucosa of Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Photochem. Photobiol. B Biol. 205: 111851.

Lee, S., Hu, L. (2020): Nrf2 activation through the inhibition of Keap1–Nrf2 protein–protein interaction. Med. Chem. Res. 29: 846-867.

Lei, X.G., 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, pp. 261-270.

Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X. (2004): Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radic. Biol. Med. 37: 1921-1942.

Li, H., Guan, K., Zuo, Z., Wang, F., Peng, X., Fang, J., Cui, H., Zhou, Y., Ouyang, P., Su, G., Chen, Z. (2019): Effects of aflatoxin B1 on the cell cycle distribution of splenocytes in chickens. J. Toxicol. Pathol. 32: 27-36.

Li, N., Xia, T., Nel, A.E. (2008): The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. Free Radic. Biol. Med. 44: 1689-1699.

Liang, H., Ran, Q., Jang, Y.C., Holstein, D., Lechleiter, J., McDonald-Marsh, T., Musatov, A., Song, W., Van Remmen, H., Richardson, A. (2009a): Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria. Free Radic. Biol. Med. 47: 312-320.

Liang, H., Yoo, S.E., Na, R., Walter, C.A., Richardson, A., Ran, Q. (2009b): Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. J. Biol. Chem. 284: 30836-30844.

Liu, Y., Wang, W. (2016): Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. Anim. Sci. J. 87: 1490-1500.

Liu, Y., Xing, X., Wang, J., Xing, L., Su, Y., Yao, Z., Yan, X., Wang, J., Zhang, X. (2012): Sterigmatocystin alters the number of FoxP3+ regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells in BALB/c mice. Food Chem. Toxicol. 50: 1920-1926.

Liu, Z., Chen, X., Li, Z., Ye, W., Ding, H., Li, P., Aung, L. (2020): Role of RNA oxidation in neurodegenerative diseases. Int. J. Mol. Sci. 21: 5022.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25:402-408.

Loveland, P.M., Nixon, J.E., Bailey, G.S. (1984): Glucuronides in bile of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) injected with [3H]aflatoxin B1 and the effects of dietary β-naphthoflavone. Comp. Biochem. Physiol. 78C: 13.

Loveland, P.M., Wilcox, J.S., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (1988): Comparative metabolism and DNA binding of aflatoxin B1, aflatoxin M1, aflatoxicol and aflatoxicol-M1 in hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Carcinogenesis 9: 441-446.

Lovell, R.T. (1989): Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York

Lozano, M.C., Diaz, G.J. (2006): Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species. Br. Poult. Sci. 47: 734-741.

Lu, J., Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. Free Radic. Biol. Med. 66: 75-87.

Lu, S.C. (2009): Regulation of glutathione synthesis. Mol. Aspects Med. 30: 42-59.

Lu, S.C. (2013): Glutathione synthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1830: 3143-3153.

Lubos, E., Loscalzo, J., Handy, D.E. (2011): Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antiox. Redox Signal. 15: 1957-1997.

Lushchak, V.I. (2012): Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. J. Amino Acids. 2012: 736837.

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.

Mahfouz, M.E., Sherif, A.H. (2015): A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. J. Basic Appl. Zool. 71: 48-59

Mahfouz, M.E. (2015): Ameliorative effect of curcumin on aflatoxin B1-induced changes in liver gene expression of *Oreochromis niloticus*. Cell. Mol. Biol. 49: 275-286.

Mahrous, K.F., Khalil, W.K.B., Mahmoud, M.A. (2006): Assessment of toxicity and clastogenicity of sterigmatocystin in Egyptian Nile tilapia. Afr. J. Biotechnol. 5: 1180-1189.

Maiorino, M., Roveri, A., Benazzi, L., Bosello, V., Mauri, P., Toppo, S., Tosatto, S.C., Ursini, F. (2005): Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. J. Biol. Chem. 280: 38395-38402.

Maiorino, M., Conrad, M., Ursini, F. (2018): GPx4, lipid peroxidation, and cell death: Discoveries, rediscoveries, and open issues. Antiox. Redox Signal. 29: 61-74.

Manning, B.B., Wise, D. J. Abbas, H. K., Peterson, B.C. (2011): Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diet containing aflatoxin from moldy corn do notexperience increased mortality after challenge with Edwardsiella ictaluri. J. World Aquacult. Soc. 42: 598-602.

Marijani, E., Kigadye, E., Okoth, S. (2019): Occurrence of fungi and mycotoxins in fish feeds and their impact on fish health. Int. J. Microbiol. 2019: 6743065.

Marin, D.E., Taranu, I. (2012): Overview on aflatoxins and oxidative stress. Toxin Rev. 31: 32-43.

Mariotti, M., Ridge, P.G., Zhang, Y., Lobanov, A.V., Pringle, T.H., Guigo, R., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2012): Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. PLoS ONE 7: e33066.

Marquardt, D., Williams, J.A., Kučerka, N., Atkinson, J., Wassall, S.R., Katsaras, J., Harroun, T.A. (2013): Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E. J. Am. Chem. Soc. 135: 7523-7533.

Martinez, J.I., Garcia, R.D., Galarza, A.M. (1982): The kinetic mechanism of glutathione peroxidase from human platelets. Thromb. Res. 27: 197-203.

Mary, V.S., Valdehita, A., Navas, J.M., Rubinstein, H.R., Fernández-Cruz, M.L. (2015): Effects of aflatoxin B_1, fumonisin B_1 and their mixture on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A induction. Food Chem. Toxicol. 75, 104-111.

Matejova, I., Svobodova, Z., Vakula, J., Mares, J., Modra, H. (2017): Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. J. World Aquacult. Soc. 48: 186-200.

Matoušková, P., Hanousková, B., Skálová, L. (2018): MicroRNAs as potential regulators of glutathione peroxidases expression and their role in obesity and related pathologies. Int. J. Mol. Sci. 19: 1199.

McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., Lei, X.G. (2004): Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 8852-8857.

McCord, J.M., Fridovich, I. (2014): Superoxide dismutases: you've come a long way, baby. Antiox. Redox Signal. 20: 1548-1549.

McKean, C., Tang, L., Billam, M., Tang, M., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J.S. (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.

McLean, M., Dutton, M.F. (1995): Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. Pharmacol. Ther. 65: 163-192.

Mello, S.S., Attardi, L.D. (2018): Deciphering p53 signaling in tumor suppression. Curr. Opin. Cell Biol. 51: 65-72.

Mézes, M., Virág, G., Barta, M., Abouzeid, A.D. (1996): Effect of lipid peroxide loading on lipid peroxidation and on the glutathione and cytochrome systems in rabbits. Acta Vet. Hung. 44: 443-450.

Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., Batist, G. (2005): Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. J. Biol. Chem. 280: 20340-20348.

Miller, J.D., Sun, M., Gilyan, A., Roy, J., Rand, T.G. (2010): Inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs induced by low molecular weight compounds from fungi from the built environment. Chem. Biol. Interact. 183: 113-124.

Mills, G.C. (1957): Hemoglobincatabolism. I. Glutathione peroxidase, an enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229: 189-197.

Miraglia, M., Marvin, H.J., Kleter, G.A., Battilani, P-, Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G.J. Vespermann, A. (2009): Climate change and

food safety: An emerging issue with special focus on Europe. Food Chem. Toxicol. 47: 1009-1021.

Mirochnitchenko, O., Palnitkar, U., Philbert, M., Inouye, M. (1995): Thermosensitive phenotype of transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 8120-8124.

Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., Zujko, M. E. (2018): Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Adv. Med. Sci. 63: 68-78.

Monson, M.S., Coulombe, R.A., Reed, K.M. (2015): Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B1 in poultry. Agriculture 5: 742-777.

Muhammad, I., Wang, H., Sun, X., Wang, X., Han, M., Lu, Z., Cheng, P., Hussain, M.A., Zhang, X. (2018): Dual role of dietary curcumin through attenuating AFB_1-induced oxidative stress and liver injury via modulating liver phase-I and phase-II enzymes involved in AFB_1 bioactivation and detoxification. Front. Pharmacol. 9: 554.

Müller, M., Banning, A., Brigelius-Flohé, R., Kipp, A. (2010): Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. Genes Nutr. 5: 297-307.

Müller, M.F., Florian, S., Pommer, S., Osterhoff, M., Esworthy, R.S., Chu, F.F., Brigelius-Flohé, R., Kipp, A.P. (2013): Deletion of glutathione peroxidase-2 inhibits azoxymethane-induced colon cancer development. PloS ONE 8: e72055.

Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., Sato, S., Suzuki, S., Shirai, T., Kohri, K., Takahashi, S. (2014): GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration-resistant prostate cancer. Carcinogenesis 35: 1962-1967.

Nair, S., Doh, S.T., Chan, J.Y., Kong, A.N., Cai, L. (2008): Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2-and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. Br. J. Cancer 99: 2070-2082

Nauser, T., Steinmann, D., Grassi, G., Koppenol, W.H. (2014): Why selenocysteine replaces cysteine in thioredoxin reductase: a radical hypothesis. Biochemistry-U.S. 53: 5017-5022.

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D. (2009): Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 15103-15110.

Ngethe, S., Horsberg, T.E., Mitema, E., Ingebrigtsen, K. (1993): Species differences in hepatic concentration of orally administered 3H-AFB_1 between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 114: 355-358.

Nguyen, V.T., Bian, L., Tamaoki, J., Otsubo, S., Muratani, M., Kawahara, A., Kobayashi, M. (2020): Generation and characterization of keap1a- and keap1b-knockout zebrafish. Redox Biol. 36: 101667.

Nickless, A., Bailis, J.M., You, Z. (2017): Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. Cell Biosci. 7: 26.

Noda, K., Umeda, M., Ueno, Y. (1981): Cytotoxic and mutagenic effects of sterigmatocystin on cultured Chinese hamster cells. Carcinogenesis 2: 945-949.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. (2018): Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front. Endocrinol. 9: 402.

Oliveira, M., Vasconcelos, V. (2020): Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. Toxins 12: 160.

Olson, J.J., Chu, F.S. (1993): Immunochemical studies of urinary metabolites of sterigmatocystin in rats. J. Agric. Food Chem. 41: 250-255.

Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I., Accensi, F. (2005): Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. Food Addit. Contam. 22: 354-360.

Ottinger, C.A., Kaattari, S.L. (1998): Sensibility of rainbow trout leucocytes to aflatoxin B1. Fish Shellfish Immunol. 8: 515-530.

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.

Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K.K. (2007): From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antiox Redox Signal. 9: 775-806.

Park, D.L., Njapau, H., Boutrif, E. (1999): Minimizing risks posedby mycotoxins utilizing the HACCP concept. FAO Food Nutr. Agric. J. 23: 49-56.

Pang, P., Abbott, M., Abdi, M., Fucci, Q.A., Chauhan, N., Mistri, M., Proctor, B., Chin, M., Wang, B., Yin, W., Lu, T.S., Halim, A., Lim, K., Handy, D.E., Loscalzo, J., Siedlecki, A.M. (2018): Pre-clinical model of severe glutathione peroxidase-3 deficiency and chronic kidney disease results in coronary artery thrombosis and depressed left ventricular function. Nephrol. Dial. Transplant. 33: 923-934.

Panieri, E., Telkoparan-Akillilar, P., Suzen, S., Saso, L. (2020): The NRF2/KEAP1 axis in the regulation of tumor metabolism: Mechanisms and therapeutic perspectives. Biomolecules 10: 791.

Partanen, H.A., El-Nezami, H.S., Leppänen, J.M., Myllynen, P.K., Woodhouse, H.J., Vähäkangas, K.H. (2010): Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. Toxicol. Sci. 113: 216-225.

Parveen, F., Nizamani, Z.A., Gan, F., Chen, X., Shi, X., Kumbhar, S., Zeb, A., Huang, K. (2014): Protective effect of selenomethionine on aflatoxin B1-induced oxidative stress in MDCK cells. Biol. Trace Elem. Res.157: 266-274.

Pei, J.F., Li, X.K., Li, W.Q., Gao, Q., Zhang, Y., Wang, X.M., Fu, J.Q., Cui, S.S., Qu, J.H., Zhao, X., Hao, D.L., Ju, D., Liu, N., Carroll, K.S., Yang, J., Zhang, E.E., Cao, J.M., Chen, H.Z., Liu, D.P. (2019): Diurnal oscillations of endogenous H2O2 sustained by p66Shc regulate circadian clocks. Nat. Cell Biol. 21: 1553-1564.

Peles, F., Sipos, P., Győri, Z., Pfliegler W.P., Giacometti, F., Serraino, A., Pagliuca, G., Gazzotti, T., Pócsi, I. (2019): Adverse effects, transformation and channeling of aflatoxins into food raw materials in livestock. Front. Microbiol. 10: 2861.

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

Peng, X., Chen, K., Chen, J., Fang, J., Cui, H., Zuo, Z., Deng, J., Chen, Z., Geng, Y., Lai, W. (2016): Aflatoxin B1 affects apoptosis and expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in thymus and bursa of fabricius in broiler chickens. Environ. Toxicol. 31:1113-1120.

Peng, X., Zhang, K., Bai, S., Ding, X., Zeng, Q., Yang, J., Fang, J., Chen, K. (2014): Histological lesions, cell cycle arrest, apoptosis and T cell subsets changes of spleen in chicken fed aflatoxin-contaminated corn. Int. J. Environ. Res. Publ. Health 11: 8567-8580.

Penglase, S.J. (2014): The effects of selenium on methylmercury toxicity in zebrafish. PhD thesis. University of Bergen, Bergen. 65 pp.

Peters, K.M., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N., Tsuji, P.A. (2018): Selenoproteins in colon cancer. Free Radic. Biol. Med. 127: 14-25.

Pfeiffer, E., Fleck, S.C., Metzler, M. (2014): Catechol formation: a novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11 methoxysterigmatocystin. Chem. Res. Toxicol. 27: 2093-2099.

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci. 4: 89-96.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L. (2015): Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Ind. J. Clin. Biochem. 30: 11-26.

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.

Pietsch, C. (2020): Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. Mycotoxin Res. 36: 41-62.

Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015): The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur. J. Med. Chem. 97: 55-74.

Plakas, S.M., Loveland, P.M., Bailey, G.S., Blazer, V.S., Wilson, G.L. (1991): Tissue disposition and excretion of 14C-labelled aflatoxin B1 after oral administration in channel catfish. Food Chem. Toxicol. 29: 805-808.

Purchase, I.F., van der Watt, J.J. (1969): Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. Food Cosmet. Toxicol. 7: 135-139.

Ramming, T., Hansen, H.G., Nagata, K., Ellgaard, L., Appenzeller-Herzog, C. (2014): GPx8 peroxidase prevents leakage of H_2O_2 from the endoplasmic reticulum. Free Radic. Biol. Med. 70: 106-116.

Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Varga, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C. (2011): Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. Fungal Biol. 115: 406-420.

Rawal, S., Kim, J.E., Coulombe, R. (2010): Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. Res. Vet. Sci. 89: 325-331.

Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. (2016): Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochim. Biophys. Acta 12: 2977-2992.

Reyhani, A., McKenzie, T.G., Fu, Q., Qiao, G.G. (2019): Fenton-chemistry-mediated radical polymerization. Macromol. Rapid Commun. 40: e1900220.

Rodríguez-Cervantes, C., Girón-Pérez, M., Robledo-Marenco, M., Marín, S., Velázquez-Fernández, J., Medina-Díaz, I., Rojas-Garcia, A., Ramos, A. (2010): Aflatoxin B1 and its toxic effects on immune response of teleost fishes: A review. World Mycotoxin J. 3: 193-199.

Rushing, B.R., Selim, M.I. (2019): Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. Food Chem. Toxicol. 124: 81-100.

Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nejadmoghadam, S., Jafar, A., (2016): Transciptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). Fish Shellfish Immunol. 55: 242-248.

Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C. (2001): Immunosuppressive effects of aflatoxin B1 in Indian major carp (*Labeo rohita*). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 24: 143-149.

Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., Jain, A.K., Mukherjee, A. (2003): Histopathological and electron microscopic studies of gills and opisthonephros of rohu, *Labeo rohita* to acute and subchronic aflatoxin B1 toxicity. Asian Fish. Sci. 16: 257-268.

Salhab, A.S., Edwards, G.S. (1977): Comparative in vitro metabolism of aflatoxicol by liver preparations from animals and humans. Cancer Res. 37: 1016-1021.

Santacroce, M.P., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzardo, C., Centoducati, G., Crescenzo, G. (2008): Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Rev. Fish Biol. Fisheries 18: 99-130.

Sawhney, D.S, Vadehra, D.V, Baker, R.C. (1973): The metabolism of 14C aflatoxins in laying hens. Poult. Sci. 52: 1302-1309.

Schneider, M., Förster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., Neumüller, C., Deutsch, M.J., Walch, A., Hrabé de Angelis, M., Wurst, 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.

Schoenhard, G.L., Lee, D.J., Howell, S.E., Pawlowski, N.E., Libbey, L.M., Sinnhuber, R.O., (1976): Aflatoxin B1 metabolism to aflatoxicol and derivatives lethal to Bacillus subtilis GSY 1057 by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver. Cancer Res. 36: 2040-2045.

Schoenhard, G.L., Hendricks, J.D., Nixon, J.E., Lee, D.J., Wales, J.H., Sinnhuber, R.O., Pawlowski, N.E. (1981): Aflatoxicol-induced hepatocellular carcinoma in rainbow trout (Salmo gairdneri) and the synergistic effects of cyclopropenoid fatty acids. Cancer Res. 41: 1011.

Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Chan, H.K., Collins, S. (1997): Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. Food Addit. Contam. 14: 157-173.

Shetty, S.P., Copeland, P.R. (2015): Selenocysteine incorporation: A trump card in the game of mRNA decay. Biochimie 114: 97-101.

Sies, H. (1991): Oxidative Stress. II. Oxidants and Antioxidants, Academic Press, London

Sinnhuber, R.O., Lee, D.J., Wales, J.H., Landers, M.K., Keyl, A.C. (1974): Hepatic carcinogenesis of aflatoxin M1 in rainbow trout (Salmo gairdneri) and its enhancement by cyclopropene fatty acids. J. Natl. Cancer Inst. 53: 1285.

Sivakumar, V., Thanislass, J., Niranjali, S., Devaraj, H. (2001): Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. Hum. Exp. Toxicol. 20: 398-403.

Sivandzade, F., Prasad, S., Bhalerao, A., Cucullo, L. (2019): NRF2 and NF-κB interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. Redox Biol. 21: 101059.

Smith, M.C., Madec, S., Coton, E., Hymery, N. (2016): Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. Toxins 8: 94.

Smith, J., Groopman, J. (2018): Aflatoxin. In: Boffetta, P., Hainaut, P., Eds.:. Encyclopedia of Cancer. Academic Press, London, pp. 30-43.

Snider, G.W., Ruggles, E., Khan, N., Hondal, R.J. (2013): Selenocysteine confers resistance to inactivation by oxidation in thioredoxin reductase: comparison of selenium and sulfur enzymes. Biochemistry 52: 5472-5481.

Souza, M.F., Tome, A.R., Rao, V.S. (1999): Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. J. Pharm. Pharmacol. 51: 125-129.

Speijers, G.J., Speijers, M.H. (2004): Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicol. Lett. 153: 91-98.

Steyn, M., Thiel, P.G. (1976): Biliary excretion of sterigmatocystin by vervet monkeys. Biochem. Pharmacol. 25: 265-266.

Stoloff, L., Verret, M.J., Dantzman, J., Reynaldo, E.F. (1972): Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23: 528.

Sun, X.M., Zhang, X.H., Wang, H.Y., Cao, W.J., Yan, X., Zuo, L.F., Wang, J.L., Wang, F.R. (2002): Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G1 on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. Biomed. Environ. Sci. 15: 145-152.

Sunde, R.A., Raines, A.M. (2011): Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. Adv. Nutr. 2: 138-150.

Surai, P.F. (2016): Antioxidant systems in poultry biology: Superoxide dismutase. Anim. Nutr. 1: 8.

Surai, P.F. Fisinin, V.I. (2016): Vitagenes in poultry production: Part 3. Vitagene concept development. World Poult. Sci. J. 72: 793-804.

Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I., Kidd, M.T. (2019): Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An Update. Antioxidants 8: 235.

Suzuki, M., Otsuki, A., Lukwete, N.K., Yamamoto, M. (2016): Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. Cur. Opin. Toxicol. 1: 29-36.

Suzuki, T., Muramatsu, A., Saito, R., Iso, T., Shibata, T., Kuwata, K., Kawaguchi, S. I., Iwawaki, T., Adachi, S., Suda, H., Morita, M., Uchida, K., Baird, L., Yamamoto, M. (2019): Molecular mechanism of cellular oxidative stress sensing by Keap1. Cell Rep. 28: 746-758.

Svobodova, Z., Piskac, A., Havlikova, J., Groch, L., (1982): Influence of feed with different contents of aflatoxin B1 on the carp health condition. Zivocisna Vyrobae UVTIZ 27: 811-820.

Svobodova, Z., Piskac, A. (1980): Effect of feeds with a low content of aflatoxin B1 on the health of carp (*Cyprinus carpio*). Zivocisna Vyrobae UVTIZ 25: 809-814.

Tacon, A.G.J. (2004): Fish meal and fish oil use in aquaculture: global overview and prospects for substitution. In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium (T. P. Lyons and K. A. Jacques eds). Nottingham University Press, Nottingham, pp. 433-448.

Taheri, S., Banaee, M., Haghi, B.N., Mohiseni, M. (2017): Evaluation of nephrotoxic effects of aflatoxins on common carp (*Cyprinus carpio*). Iran. J. Toxicol. 11: 51-58.

Taguchi, K., Fujikawa, N., Komatsu, M., Ishii, T., Unno, M., Akaike, T., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2012): Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109: 13561-13566.

Taguchi, K., Takaku, M., Egner, P. A., Morita, M., Kaneko, T., Mashimo, T., Kensler, T. W., Yamamoto, M. (2016): Generation of a new model rat: Nrf2 knockout rats are sensitive to aflatoxin B1 toxicity. Toxicol. Sci. 152: 40-52.

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. 108: 145-148.

Taylor, J.S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., Van de Peer, Y. (2003): Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. Genome Res. 13: 382-390.

Terao, K. (1983): Sterigmatocystin - a masked potent carcinogenic mycotoxin. J. Toxicol. Toxin Rev. 2: 77-110.

Thiel, P.G., Steyn, M. (1973): Urinary excretion of the mycotoxin, sterigmatocystin by vervet monkeys. Biochem. Pharmacol. 22: 3267-3273.

Thisse, C., Degrave, A., Kryukov, G.V., Gladyshev, V.N., 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.

Tian, T., Wang, Z., Zhang, J. (2017): Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. Oxid. Med. Cell Longev. 2017: 4535194.

Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003): The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene 22: 7369-7375.

Troxel, C.M., Reddy, A.P., O'Neal, P.E., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (1997): In vivo aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction to zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. Appl. Pharmacol. 143: 213.

Uchida, K., Sakai, K., Itakura, K., Osawa, T., Toyokuni, S. (1997): Protein modification by lipid peroxidation products: formation of malondialdehyde-derived N(epsilon)-(2-propenol) lysine in proteins. Arch. Biochem. Biophys. 346: 45-52

Ueda, N., Fujie, K., Gotoh-Mimura, K., Chattopadhyay, S.C., Sugiyama, T. (1984): Acute cytogenetic effect of sterigmatocystin on rat bone-marrow cells in vivo. Mutat. Res. 139: 203-206.

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.

Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutahtione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta. 839: 62-70.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L. (1995): Diversity of glutathione peroxidases. Meth. Enzymol. 252: 38-53.

Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D.S., Wang, Y. C., Desai, K.V., Green, J.E., Chen, P.L., Lee, W.H. (2004): Identification of a novel putative nonselenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. J. Biol. Chem. 279: 43522-43229.

Valtchev, I., Koynarski, T., Sotirov, L., Nikolov, Y., Petkov, P. (2015): Effect of aflatoxin B1 on moulard duck's natural immunity. Pak. Vet. J. 35: 67-70.

Vera, L.M., Migaud, H. (2016): Hydrogen peroxide treatment in Atlantic salmon induces stress and detoxification response in a daily manner. Chronobiol. Int. 33: 530-542.

Versilovskis, A., De Saeger, S. (2010): Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. Mol. Nutr. Food Res. 54: 136-147.

Viegas, C., Nurme, J., Piecková, E., Viegas, S. (2018): Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. Mycology 11: 91-104.

Volkoff, H., Rønnestad, I. (2020): Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. Temperature 7: 307-320.

Walshe, J., Serewko-Auret, M.M., Teakle, N., Cameron, S., Minto, K., Smith, L., Burcham, P.C., Russell, T., Strutton, G., Griffin, A., Chu, F.F., Esworthy, S., Reeve, V., Saunders, N.A. (2007): Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation. Cancer Res. 67: 4751-4758.

Wakabayashi, N., K. Itoh, J. Wakabayashi, H. Motohashi, S. Noda, S. Takahashi, S. Imakado, T. Kotsuji, F. Otsuka, D.R. Roop, T. Harada, J.D. Engel, Yamamoto, M. (2003): Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. Nat. Genet. 35: 238-245.

Wang, D.S., Sun, H.L., Xiao, F.Y., Ji, X.H., Liang, Y.X., Han, F.G., (1991): Distribution and excretion of 3H-sterigmatocystin in rats. IARC Scientific Publication, Lyon, pp. 424-426.

Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, L., Hayes, J.D., Wang, X.J., Tang, X. (2013): RXRα inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. Cancer Res. 73: 3097-3108.

Wang, W.J., Xu, Z.L., Yu, C., Xu, X.H. (2017): Effects of aflatoxin B1 on mitochondrial respiration, ROS generation and apoptosis in broiler cardiomyocytes. Anim. Sci. J. 88: 1561-1568.

Wang, Y.L., Zhou, X.Q., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Wang, S.W., Kuang, S.Y., Tang, L., Feng, L. (2019): Effects of dietary zearalenone on oxidative stress, cell apoptosis, and tight junction in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Toxins 11: 333.

Wang, L., Harris, S.M., Espinoza, H.M., McClain, V., Gallagher, E.P. (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.

Webster, K.A. (2012): Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. Future Cardiol. 8: 863-884.

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.

Weismann, D., Hartvigsen, K., Lauer, N., Bennett, K.L., Scholl, H.P.N., Issa, P.C., Cano, M., Brandstätter, H., Tsimikas, S., Skerka, C., Superti-Furga, G., Handa, J.T., Zipfel, P.F., Witztum, J.L., Binder, C.J. (2011): Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. Nature 478: 76-81.

Wild, C.P., Turner, P.C., (2002): The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis 17: 471-481.

Williams, D.E., Buhler, D.R. (1983): Purified form of cytochrome P-450 from rainbow trout with high activity toward conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-2,3-epoxide. Cancer Res. 43: 4752.

Wong, Z., Decad, G., Byard, J., Hsieh, D. (1979): Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B1 in rats in vivo and in primary hepatocyte culture. Food Cosmet. Toxicol. 17: 481-486.

Wong, Z.A., Hsieh, D.P.H. (1980): The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat and mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55: 115-125.

Wu, T.S., Cheng, Y.C., Chen, P.J., Huang, Y.T., Yu, F.Y., Liu, B.H. (2019): Exposure to aflatoxin B1 interferes with locomotion and neural development in zebrafish embryos and larvae. Chemosphere 217: 905-913.

Xing, L.X., Zhang, X.H., Li, Y.H., Yan, X., Wang, J., Wang, F. (2005): Effects of sterigmatocystin on HLA- I expression of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. J. Hyg. Res. 34: 454-456.

Xing, X., Wang, J., Xing, L.X., Li, Y.H., Yan, X., Zhang, X.H. (2011): Involvement of MAPK and PI3K signalling pathways in sterigmatocystin-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells. Mol. Nutr. Food Res. 55: 749-760.

Xue, X., Hall, J.R., Caballero-Solares, A., Eslamloo, K., Taylor, R.G., Parrish, C.C., Rise, M.L. (2020): Liver transcriptome profiling reveals that dietary DHA and EPA levels influence suites of genes involved in metabolism, redox homeostasis, and immune function in Atlantic Salmon (Salmo salar). Mar. Biotechnol. 22: 263-284.

Yabe, K., Ando, Y., Hashimoto, J., Hamasaki, T. (1989): Two distinct O-methyltransferases in aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2172-2177.

Yamazaki, H., Inui, Y., Wrighton, S.A., Guengerich, F.P., Shimada, T. (1995): Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in Escherichia coli and by human liver microsomes. Carcinogenesis 16: 2167-2170.

Yamamoto, M., Kensler, T.W., Motohashi, H. (2018): The KEAP1-NRF2 System: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. Physiol. Rev. 98: 1169-1203.

Yang, Y.H., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Wang-Buhler, J.L., Buhler, D.R. (2000): Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BVCYP2K1) as lauric acid (ω-1)-hydroxylase and aflatoxin B1 exo-epoxidase. Drug Metab. Disp. 28: 1279.

Yang, Y., Bazhin, A.V., Werner, J., Karakhanova, S. (2013): Reactive oxygen species in the immune system. Int. Rev. Immunol. 32: 249-270.

Yoboue, E.D., Rimessi, A., Anelli, T., Pinton, P., Sitia, R. (2017): Regulation of calcium fluxes by GPX8, a type-II transmembrane peroxidase enriched at the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane. Antiox. Redox Signal. 27: 583-595.

Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., Hu, H. (2020): Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. Signal Transduct. Target Ther. 5: 209.

Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennett, J.W. (2004): Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1253-1262.

Yu, J. (2012): Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. Toxins 4:1024-1057.

Yu, Y., Song, J., Guo, X., Wang, S., Yang, X., Chen, L., Wei, J. (2014): Characterization and structural analysis of human selenium-dependent glutathione peroxidase 4 mutant expressed in Escherichia coli. Free Radic. Biol. Med. 71: 332-338.

Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. (2011): Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. Toxins 3: 566-590.

Zain, M.E. (2011): Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 15: 129-144.

Zeng, Z.Z., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Zeng, Y.Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhou, X.Q., Feng, L. (2019): Dietary aflatoxin B1 decreases growth performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture 500: 1-17.

Zingales, V., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.J. (2020): Sterigmatocystin-induced cytotoxicity via oxidative stress induction in human neuroblastoma cells. Food Chem. Toxicol. 136: 110956.

Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D.U. (2013): Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53: 1191-1201.

Zhang, Y., Yao, Z.G., Wang, J., Xing, L.X., Xia, Y., Zhang, X.H. (2012): Effects of sterigmatocystin on TNF-alpha, IL-6 and IL-12 expression in murine peripheral blood mononuclear cells and peritoneal macrophages in vivo. Mol. Med. Rep. 5: 1318-1322.

Zheng, W., Xu, H., Lam, S.H., Luo, H., Karuturi, R.K., Gong, Z. (2013): Transcriptomic analyses of sexual dimorphism of the zebrafish liver and the effect of sex hormones. PLoS ONE 8: e53562.

Zoidis, E., Seremelis, I., Kontopoulos, N., Danezis, G.P. (2018): Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. Antioxidants 7: 66.

Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., Best, T.M. (2015): Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. Acta Physiol. (Oxf). 214: 329-348.

Webes hivatkozások:

The State of World Fisheries and Aquaculture (2020): http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf (letöltve: 2021. 06. 10.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori képzésem és kutatásaim során kollégáimtól érkező rengeteg segítségért hatalmas köszönettel tartozom. Hatalmas köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Balogh Krisztiánnak**, a kísérletek tervezésével, lebonyolításával és az eredmények statisztikai kiértékelésével, valamint a szakmai cikkek elkészülésével kapcsolatos segítségéért és támogatásáért. Hálával és köszönettel tartozom, **Dr. Mézes Miklósnak**, aki a kísérletek megtervezésével, a szakmai cikkek elkészítésével és publikálásával kapcsolatos segítségéért és támogatásért, az ötleteim iránti nyitottságáért, valamint belém vetett hitéért, amellyel önállóságomat és szakmai fejlődésemet segítette. Külön köszönetet szeretnék mondani **Kulcsár Szabinának** és **Ancsin Zsoltnak**, akik a kísérletek megszervezésében és lebonyolításában nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget. Hálámat szeretném kifejezni a Regionális Egyetemi Tudásközpont összes munkatársának, kollégáimnak, barátaimnak, akik segítettek abban, hogy a molekuláris biológiai laboratóriumi munkákban megfelelő gyakorlatot szerezzek és önállóan dolgozhassak. Köszönetet szeretnék mondani **Pelyhe Csillának**, volt kollégámnak, amiért az elejétől kezdve tanított, támogatott a labormunka során, valamint a rengeteg segítségéért és türelemért. Szeretném megköszönni a rengeteg adminisztratív segítséget és támogatást **Lakatos Tündének**, valamint a Takarmányozástani tanszék minden dolgozójának, különösen **Balláné Dr. Erdélyi Mártának**, a támogatást és bíztatást.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani **Páromnak** a tőle kapott folyamatos támogatásért, bíztatásért és megértő türelemért, valamint **Családomnak** és **Barátaimnak** a támogatásért és lelkesítésért.

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

- Új Nemzeti Kiválósági Program 2017/2018; 2018/2019; 2019/2020 (ÚNKP) Doktori Ösztöndíj
- Innovatív tudományos műhelyek a hazai agrárfelsőoktatásban (EFOP-3.6.3.-VEKOP-16-2017-00008)
- Szent István Ösztöndíj 2019