MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

AZ AFLATOXIN ÉS SZTERIGMATOCISZTIN BIOLÓGIAI HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PONTY FAJBAN

Doktori értekezés tézisei

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 jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

1.1 A kutatás előzményei

Az akvakultúra jelenleg a világ egyik leggyorsabban fejlődő iparága, 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. 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. Korábbi kísérleteink során más mikotoxinok, így például a T-2 toxin, továbbá a deoxinivalenol (DON), az ochratoxin A (OTA) és a fumonizin B_1 (FB_1) hatását vizsgáltuk 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.

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. 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 és azt azonos szerven fejtik ki.

1.2 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.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 A kísérletek során alkalmazott mikotoxinok és a mesterségesen szennyezett takarmányok elkészítése

2.1.1 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése

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) törzset alkalmaztak.

A pontyokkal végzett kísérletben kereskedelmi forgalomban lévő Aqua Garant Classic™ takarmányt használtunk, amelyet ledaráltunk, majd azt az AFB_1-et ismert koncentrációban tartalmazó kukoricadarával kevertük össze. A STC-nel kezelt csoportok esetében a STC-t etanolban oldottuk, majd azt a takarmányra permeteztük a vizsgálni kívánt koncentrációhoz szükséges mennyiségben. 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.

A kontroll, valamint a mesterségesen szennyezett takarmányok aflatoxin tartalmának meghatározása immunaffinitás előtisztítást követően nagy felbontású folyadékkromatográfiás módszerrel, fluorimetriás detektálással, a STC meghatározására pedig HPLC-UV módszerrel történt. A takarmányok vizes szuszpenziójának adagolása pipetta segítségével történt.

2.2 Kísérleti protokoll és mintavételezés

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. 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 májmintát a molekuláris biológiai vizsgálatokhoz.

2.3 Génexpressziós vizsgálatok

2.3.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció

A kísérleti állatok májmintáiból NucleoZOL reagenssel teljes RNS-t tisztítottam, majd a genomi DNS szennyeződést DNáz I kezeléssel távolítottam el. 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 cDNS-t készítettem, amelyből a qPCR méréseket végeztem.

2.3.2 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 ki. A mérésekhez a Step One Plus™ Real-Time PCR systems készüléket használtam, Maxima SYBRGreen qPCR Master Mix felhasználásával 5 ismétlésben. 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 SYBRGreen jelet minden ciklus extenzió-lépésének végén detektálta a berendezés.

2.3.3 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 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.

2.4 Statisztikai értékelés

A kísérleti eredmények statisztikai értékeléséhez leíró statisztikai számításokat, egytényezős és kétutas varianciaanalízist (ANOVA) végeztem. Az eredmények normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel, a variancia homogenitását pedig Bartlett teszttel ellenőriztem. A számítások GraphPad Prism 7.0 szoftverrel történtek.

3 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

3.1 Rövidtávú AFB_1 terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése

A kísérlet során három emelkedő dózisú AFB_1 terhelés hatását vizsgáltam a glutation redox rendszer egyes elemeire, valamint a rendszer szabályozásáért felelős gének expressziójára.

Korábbi kísérleteinkből ismert volt, hogy 19 ± 1 °C víz hőmérsékleten, a kísérlet során alkalmazott ponty súlykategóriában, a takarmány átlagos tranzitideje 16 óra. Ez tehát az az időtartam, amely meghatározza a mikotoxinok biológiai hozzáférhetőségének idejét és a bélcsatornából történő felszívódásuk időtartamát.

A kísérlet során alkalmazott dózisok (1. táblázat) meghatározásánál az Európai Unió által a takarmány alapanyagokra 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.

1. táblázat: A kísérlet során alkalmazott AFB_1 dózisok az egyes csoportokban (µg/kg testtömeg)

Kezelési csoport	Kontroll	A1 (alacsony)	A2 (közepes)	A3 (magas)
AF	<1,0	1,46	2,92	5,85

A 24 órás kísérlet időtartama alatt mortalitást, illetve szubletális tüneteket egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam, amelynek hátterében feltételezhetően a viszonylag alacsony dózis állhat, mivel az AFB_1-re különösen érzékeny szivárványos pisztráng esetében a *per os* LD_{50} érték 500 µg/kg testtömeg.

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. 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. 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. 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. Ezenkívül az *nrf2* transzkripciót számos más transzkripciós faktor is szabályozza, így például az aril-szénhidrogén-receptor (AhR) és az NF-κB.

A glutation-redox rendszer elemeit kódoló gének (*gpx4a* és *gpx4b*) expressziója, kezdeti gátlást követően a kontrollhoz képest elnyújtott emelkedést mutattak, amely a 16. órai mintavétel után jelentkezett, sőt némely esetben az emelkedés mértéke csak tendenciaszerű volt. Az ezeket transzkripciós faktorként aktiváló *nrf2* gén expressziója viszont az alkalmazott dózisok hatására a 8. órában nem változott, míg a 16. órában csökkent. 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 jelen kísérletben leírt rövidtávú hatások a korábbi irodalmi adatokkal közvetlenül nem vethetők össze, mert ilyenek a ponty fajra vonatkozóan nem állnak rendelkezésre.

Az AFB_1 kezelés hatására az egyes kísérleti csoportokon belül a mintavételi időpontok között szignifikáns mértékű eltéréseket tapasztaltam minden vizsgált gén esetében. Ezek a változások mind a mikotoxinnal kezelt, mind a kontroll csoportban kimutathatóak voltak. Ennek hátterében feltételezhetően a gyomorszondán keresztül történt egyszeri takarmány adag bejuttatása áll, de abban szerepe lehetett jelenleg még nem ismert faktoroknak, továbbá a biológiai cirkadián ritmusnak is. A fény-sötét ciklus ugyanis a halak cirkadián ritmusát befolyásoló kulcsfontosságú tényező.

Ezzel kapcsolatban fontosnak tartom kiemelni, hogy bár az általam alkalmazott 12:12 óra fényprogram eltért a természetes ritmustól, de ez a hatás minden vizsgálati csoportban azonos volt. A cirkadián ritmust ugyanakkor az alkalmazott fényprogram megzavarhatta, amely hatással lehetett az antioxidáns enzimek egyes elemeire, továbbá a membrán transzporterekre is mind mRNS, mind pedig fehérje szinten.

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

3.2 Rövidtávú STC terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése

A takarmányok STC-szennyezettségéről jelenleg kevés adat áll rendelkezésre. Annak mennyiségét az Európai Unió a takarmányokban még ajánlati (határ)érték szinten sem szabályozza. Emiatt az AFB_1-gyel végzett kísérlet során alkalmazott dózisok 10x mennyiségét alkalmaztam. A STC toxicitását ugyanis számos közleményben az AFB_1 1/10 értékének becsülték. A testtömegre vonatkoztatott dózisokat a 2. táblázatban tüntettem fel.

2. 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

Ponty fajra vonatkozóan a szakirodalomban LD_{50} értékként 211 µg/kg takarmány koncentrációt adtak meg. Ugyanakkor, a kísérlet 24 órás időtartama alatt mortalitást, illetve szubletális tüneteket egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltam bár 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. Ennek hátterében a STC AFB_1-hez viszonyított kisebb toxicitása állhat.

Az Nrf2-Keap1 útvonalban szerepet játszó gének expresszióját jelentős mértékben befolyásolta az STC terhelés. A *keap1* 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 8. órai mintavételkor az S3 csoportban, míg a 24. órai mintavételkor az S1 csoportban nem tapasztaltam szignifikáns mértékű eltérést. Az *nrf2* 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.

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.

Korábbi 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-vel kezelték az állatokat.

A halakban kiemelkedően fontos antioxidáns szereppel bíró foszfolipid-hidroperoxid GPx gének (*gpx4a* és *gpx4b*) 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.
A *gs* gén 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.
Ezzel szemben a *gr* gén 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 szabályozott gének, expressziója a 8. órai gátlást követően a 16. és 24. órai mintavételkor indukció követett.

Az STC kezelés hatására az egyes kísérleti csoportokon belül is szignifikáns eltéréseket tapasztaltam a mintavételi időpontok között.

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.

A kezelés x idő együttes hatását minden gén esetében ebben a kísérletben is sikerült statisztikailag alátámasztanom, amely azt mutatja, hogy nem csak az alkalmazott dózisnak, de 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.

3.3 Rövidtávú AFB_1-STC terhelés eredményeinek összefoglalása és megbeszélése

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. 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 3. táblázatban mutatom be. Az alkalmazott dózisok az előző két kísérlet alapján kerültek kiválasztásra. A kísérlet 24 órás időtartama alatt mortalitást, valamint szubletális tüneteket nem tapasztaltam.

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

Kezelési csoport	Kontroll	AFB_1	STC	AFB_1+STC
AFB_1	<1,0	0,95	-	0,95
STC	<1,0	-	10,27	10,27

Az eredmények azt mutatják, hogy az AFB_1 és STC együttes alkalmazása szinergikusan 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 glutation-S transzferáz (*gst*) expresszióját. Az Nrf2 ubikvitinációjában szerepet játszó Keap1-et kódoló *keap1* gén expressziója kettős választ mutatott a vizsgálat során. A 8. és 16. órai mintavételkor gátlást, míg a 24. órai mintavételkor indukciót tapasztaltam az AFB_1-gyel és STC-nel együttesen kezelt csoportban, amely a szinergens hatást erősíti meg az AFB_1 és a STC között.

Az *nrf2* gén expressziója, az alkalmazott dózisok hatására a 8. órában, csak az AFB1 és a két mikotoxint együttesen tartalmazó takarmánnyal kezelt csoportban változott, míg a 16. és 24. órában az AFB1 és STC-nel kezelt csoportban csökkent értékeket tapasztaltam. Ennek alapján feltételezhető, hogy az alkalmazott dózisok hatására még nem következett be olyan mértékű oxidatív stressz, amely az általam vizsgált gének expressziója szintjén is megnyilvánult.

A foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz gének (*gpx4a* és *gpx4b*) 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 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.

A glutation szintetáz és a glutation reduktáz gének expressziója hasonlóan változott. A kezdeti, 8. órai, mintavételkor az AFB_1-gyel, valamint az AFB_1-gyel és STC-nel együttesen kezelt csoportokban indukciót tapasztaltam, amelyet ezt követően eltérő mértékű gátlás követett a 16. és 24. órában. Az *nrf2* gén expressziója az AFB_1-gyel és 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.

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.

Ebben a kísérletben is sikerült a kezelés x idő együttes hatását minden általam vizsgált 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.

4 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1 Következtetések

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 kísérlet során mértem az *nrf2*, a *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 történtek. 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, mindig az aktuális lehalászástól függtek.

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, míg a harmadik kísérletben 0,95 µg AFB_1/kg; 10,27 µg STC/kg; valamint 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 ismereteink 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. Ugyanakkor a takarmányok 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. 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.

Az 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 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.

4.2 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 nyomon követésére más kémiai szerkezetű mikotoxinok vonatkozásában is.

Az AFB_1, továbbá az STC szerkezete és a CYP450 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 CYP450 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.

5. 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 ***keap 1*** **és** ***nrf2*** gének expressziójában kezdeti gátlást követően aktiváció következett be. 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, de a 24. órában már nem szignifikáns mértékben azt meghaladta. 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 expressziója ko-expozíció hatására kevésbé aktiválódott. A *gpx4a* expressziójában 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.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Tudományos közlemények folyóiratban:

Kövesi B, Balogh K, Pelyhe Cs, Mézes M 2017 A szterigmatocisztin mikotoxin toxikus hatásai az állati szervezetre – irodalmi áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja; 139(7), 427-432. [IF:0.196]

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Mézes M, Balogh K 2018 Changes of lipid peroxidation and glutathione redox system, and expression of glutathione peroxidase regulatory genes as effect of short-term aflatoxin B1 exposure in common carp. Toxicon, 144, 103–108. [IF:2.276]

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Miklós M, Balogh K 2019 Effect of short-term sterigmatocystin exposure on lipid peroxidation and glutathione redox system and expression of glutathione redox system regulatory genes in common carp liver. Toxicon, 161, 50-56. [IF: 2.201]

Kövesi B, Kulcsár S, Ancsin Z, Zándoki E, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K 2021 Individual and combined effects of aflatoxin B1 and sterigmatocystin on lipid peroxidation and glutathione redox system of common carp liver. Toxins, 13(2), 109. [IF: 3.531]

Konferencia kiadványban megjelent közlemények:

Kövesi B, Pelyhe Cs, Balogh K, Mézes M 2016 A szterigmatocisztin biológiai hatásai brojlercsirkében és pontyban. LVIII. Georgikon Napok. Keszthely, p. 95 (ISBN:978-963-9639-84-3)

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Balogh K, Mézes M 2017 Aflatoxin B1 rövidtávú hatása az antioxidáns védőrendszer szabályozására pontyban. LIX. Georgikon Napok. Keszthely, p. 114 (ISBN 978-963-9639-88-1)

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Balogh K, Mézes M 2017 Aflatoxin B1 hatása a ponty antioxidáns védőrendszerének szabályozására rövidtávú toxinexpozíciót követően; Magyar Szabadgyök-kutató Társaság IX. kongresszusa, Gödöllő, p. 30.

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Balogh K, Mézes M 2017 Investigation of the effects of aflatoxin B1 on parameters of the antioxidant defence system and lipid peroxidation in common carp; 6th Scientific day of animal breeding in Gödöllő, International Conference; Gödöllő

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Balogh K, Mézes M 2018 Szterigmatocisztin rövidtávú hatásának vizsgálata az antioxidáns védőrendszer szabályozására pontyban. LX. Georgikon Napok. Keszthely, p. 90 (ISBN 978-963-9639-91-1)

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Balogh K, Miklós M 2018 Short term effects of sterigmatocystin on the regulation of the antioxidant system in common carp; FIBOK2018, Budapest, p. 71.

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Mézes M, Balogh K 2018 Szterigmatocisztin hatása az antioxidáns rendszer szabályozására pontyban rövidtávú toxinexpozíciót követően. Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2018 Konferencia, Lillafüred,

Kövesi B, Zándoki E, Balogh K, Mézes M 2019 Investigation of short-term multi-mycotoxin effects on the regulation of the antioxidant system in common carp (Cyprinus Carpio L.); 41st Mycotoxin Workshop, Lisbon, Portugal

Könyvfejezet

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

Kövesi B, Kulcsár Sz, Balogh K 2020 Egyes mikotoxinok által előidézett oxidatív stressz és annak hatásai az antioxidáns rendszerre, valamint annak szabályozására pontyban (Cyprinus carpio L.) In: Poór P., Mézes M., Blázovics A. (szerk.) Oxidatív stressz és antioxidáns védekezés a növényvilágtól a klinikumig, Budapest, Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság, 146-151.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Tudományos közlemények folyóiratban:

Pelyhe Cs, **Kövesi B,** Zándoki E, Kovács B, Szabó-Fodor J, Mézes M, Balogh K 2016 Effect of 4-week feeding of deoxynivalenol- or T-2-toxin-contaminated diet on lipid peroxidation and glutathione redox system in the hepatopancreas of common carp (Cyprinus carpio L.) Mycotoxin Research, 32(2), 77–83.

Pelyhe Cs, **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 Veterinaria Hungarica, 64(4), 449–466.

Erdélyi M, Balogh K, Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Nakade M, Zándoki E, Mézes M, Kovács B 2018 Changes in the regulation and activity of glutathione redox system, and lipid peroxidation processes in short-term aflatoxin B1 exposure in liver of laying hens; Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 102(4), 947–952.

Nakade M, Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Balogh K, Kovács B, Szabó-Fodor J, Zándoki E, Mézes M, Erdélyi M 2018 Short-term effects of T-2 toxin or deoxynivalenol on glutathione status and expression of its regulatory genes in chicken; Acta Veterinaria Hungarica, 66(1), 28–39.

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Szabó-Fodor J, Zándoki E, Erdélyi M, Kovács B, Mézes M, Balogh K 2018 Age-dependent effects of short-term exposure of T-2 toxin or deoxynivalenol on lipid peroxidation and glutathione redox system in broiler chickens; World Mycotoxin Journal 11(4), 611-624.

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Kovács B, Erdélyi M, Kulcsár S, Mézes M, Balogh K 2018 Multi-trichothecene mycotoxin exposure activates glutathione-redox system in broiler chicken; Toxicon, 153, 53-57.

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(6), 178.

Balogh K, **Kövesi B,** Zándoki E, Kulcsár Sz, Ancsin Zs, Erdélyi M, Dobolyi Cs, 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(7), 201.

Kövesi B, Cserháti M, Erdélyi M, Zándoki E, Mézes M, Balogh K 2020 Lack of dose- and time-dependent effects of aflatoxin B1 on gene expression and enzymes associated with lipid peroxidation and the glutathione redox system in chicken; Toxins, 12(2), 84.

Kövesi B, Kulcsár Sz, Zándoki E, Szabó-Fodor J, Mézes M, Balogh K, Ancsin Zs, Pelyhe Cs 2020 Short-term effects of deoxynivalenol, T-2 toxin, fumonisin B1 or ochratoxin on lipid peroxidation and glutathione redox system and its regulatory genes in common carp (Cyprinus carpio L.) liver; Fish Physiology and Biochemistry, 46(6), 1921–1932.

Kövesi B, Kulcsár Sz, Cserháti M, Erdélyi M, Ancsin Zs, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, 2021 Modification of the effects of aflatoxin B1 on the glutathione system and its regulatory genes by zeolite; Acta Veterinaria Hungarica. online first doi: 10.1556/004.2021.00002

Tudományos folyóiratban megjelent konferencia absztraktok:

Kulcsár Sz, **Kövesi B,** Mézes M, Balogh K, Zándoki E 2019 The Fusarium mycotoxins effect on glutathione system in broiler chicken, Toxicology Letters; 314 pp. S113-S114. , 2 p. /conf. 55th Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX) - Toxicology - Science Providing Solutions

Konferenciakiadványban megjelent közlemények:

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B 2016, Combined effect of T-2 toxin and deoxynivalenol on regulation of the glutathione redox system in broiler chicken, International Conference on Biotechnology and Welfare In Animal Science with a Session on the 7th Poultry Days, Krakow

Kövesi B, Pelyhe Cs, Mézes M, Kovács B, Balogh K 2016, Short term Effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on GPx4 gene expression in common carp (Cyprinus carpio L.) "FIBOK2016" Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Program és összefoglalók p 55, Gödöllő

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B 2016, Rövidtávú DON vagy T-2 toxin terhelés hatása az antioxidáns rendszer szabályozására ponty fajban (Cyprinus carpio) XL. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas

Pelyhe Cs, **Kövesi B,** Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B 2016 DON és T-2 toxin együttes hatása az antioxidáns rendszer szabályozására ponty fajban (Cyprinus carpio) XL. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas

Kövesi B, Pelyhe Cs, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B 2016 Trichotecénvázas mikotoxinok együttes hatása az antioxidáns rendszer szabályozására rövidtávú toxinexpozíciót követően pontyban. Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2016 Konferencia, Hajdúszoboszló, p. 68.

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Mézes M, Kovács B, Balogh K 2017 Multi-mycotoxin effects on the regulation of the glutathione-redox system in broiler chicken; 39th Mycotoxin Workshop, Bydgoszcz

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Mézes M, Balogh K, Kovács B 2017 Multi-mycotoxin effects on the regulation of the glutathione-redox system in common carp (Cyprinus carpio L.); 39th Mycotoxin Workshop, Bydgoszcz

Ihos E, Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K 2017 Effect of aflatoxins in farm animals; 6th Scientific day of animal breeding in Gödöllő, International Conference; Gödöllő

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Mézes M, Kovács B, Balogh K 2017 Common effect of trichothecene mycotoxins on the glutathione-redox system and its regulation in broiler chicken; 6th Scientific day of animal breeding in Gödöllő, International Conference; Gödöllő

Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Kovács B, Mézes M, Balogh K 2017 Trichotecénvázas mikotoxin terhelés hatása pontyok (Cyprinus carpio L.) glutation redox paramétereire és annak szabályozására; Magyar Szabadgyök-kutató Társaság IX. kongresszusa, Gödöllő, p. 29.

Kövesi B, 2017 Az aflatoxin és a deoxinivalenol pontyok antioxidáns rendszerének szabályozására gyakorolt hatásának vizsgálata; SZIE Kiváló Tehetségei Konferencia, Gödöllő; p. 69.

Ihos E, Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K 2018 Effect of aflatoxins on the expressions of several genes of the antioxidant system in broiler chicken. LX. Georgikon Napok. Keszthely, p. 90 (ISBN 978-963-9639-91-1)

Kulcsár Sz, **Kövesi B**, Miklós M, Balogh K, Zándoki E 2018 Combined effect of some Fusarium mycotoxins on lipid peroxidation and glutathione redox systems in poultry. LX. Georgikon Napok. Keszthely, p. 90 (ISBN 978-963-9639-91-1)

Mézes M, Pelyhe Cs, **Kövesi B**, Zándoki E, Balogh K 2018 T-2 toxin és deoxinivalenol együttes hatása a lipidperoxidációra és a glutation-redox rendszerre, valamint annak szabályozására brojlercsirkében, Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2018 Konferencia, Lillafüred, p. ?.

Kulcsár Sz, **Kövesi B**, Mézes M, Balogh K, Zándoki E, Ancsin Zs 2018 Egyes fusarium mikotoxinok együttes hatásának vizsgálata a baromfi lipidperoxidációs folyamataira és glutation rendszerére. Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2018 Konferencia, Lillafüred,

Kulcsár Sz, **Kövesi B**, Mézes M, Balogh K, Zándoki E 2019 Effect of multi-mycotoxin exposure of Fusarium mycotoxins on glutathione redox system in poultry, 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture: Book of Abstracts, pp. 38 ISSN: 2459-5551

Szabó-Rubina T, Kovács-Weber M, **Kövesi B**, Balogh K, Mézes M, Kovács B 2019 Mycotoxins induced DNA damage in common carp (Cyprinus carpio): investigations using LORDQ-PCR and DNA repair gene expression analyses. 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture: Book of Abstracts, pp. 175. ISSN: 2459-5551

Kövesi B, 2019 Az aflatoxin és deoxinivalenol együttes hatásának vizsgálata az antioxidáns rendszer szabályozására pontyok vese- és lép szöveteiben; SZIE Kiváló Tehetségei Konferencia, Gödöllő,

Kövesi B, Zándoki E, Mézes M, Balogh K 2019 Aflatoxin B1 és deoxinivalenol együttes hatásának vizsgálata az antioxidáns védőrendszer szabályozásra ponty fajban. Magyar Szabadgyök-kutató Társaság X. kongresszusa, Szeged, p. 32

Kulcsár Sz, **Kövesi B,** Mézes M, Balogh K, Zándoki E 2019 Egyes Fusarium mikotoxinok rövidtávú terhelésének hatása a baromfi glutation rendszerére és annak szabályozására. Magyar Szabadgyök-kutató Társaság X. kongresszusa, Szeged, p. 31

Balogh K, Zándoki E, Ancsin Zs, **Kövesi B,** Kulcsár Sz, Erdélyi M, Mézes M, Dobolyi Cs, Kukolya J 2019 Aflatoxinnal és szterigmatocisztinnel szennyezett takarmány hatása brojlercsirkék glutation redox és lipidperoxidációs paramétereire. Magyar Szabadgyök-kutató Társaság X. kongresszusa, Szeged, p. 28

Mézes M, Kulcsár Sz, **Kövesi B**, Zándoki E, Balogh K 2019 Fusarium mikotoxinok együttes hatásának vizsgálata rövidtávú terhelés során a baromfi glutation redox rendszerére és annak szabályozására, Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2019 Konferencia, Szeged, p. 60.

Kövesi B, Kulcsár Sz, Zándoki E, Mézes M, Balogh K 2019 Ochratoxin A hatása a glutation-redox rendszerre valamint annak szabályozására brojlercsirkében, Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2019 Konferencia, Szeged, p. 120

Kulcsár Sz, **Kövesi B**, Mézes M, Balogh K, Zándoki E 2019 Három együttesen előforduló Fusarium mikotoxin rövidtávú terhelésének hatása a brojlercsirke lipidperoxidációs folyamataira és glutation rendszerére, Magyar Toxikológusok Társasága TOX'2019 Konferencia, Szeged, p. 108.