



**EGYES *FUSARIUM* MIKOTOXINOK EGYÜTTES HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A
HÁZI TYÚK LIPIDPEROXIDÁCIÓS FOLYAMATAIRA ÉS GLUTATION REDOX
RENDSZERÉRE**

Doktori értekezés

Kulcsár Szabina

Gödöllő

2023

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

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

Témavezető: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

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

Dr. Balogh Krisztián

egyetemi docens, PhD

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



A programvezető aláírása



A témavezető jóváhagyása



A társ-témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	I
Rövidítések jegyzéke	IV
1. Bevezetés és problémafelvetés	1
2. Célkitűzések	2
3. Szakirodalmi áttekintés	4
3.1 Mikotoxinok	4
3.2 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és fumonizin B1 általános jellemzői	4
3.3 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és fumonizin B1 toxikodinámiai jellemzői	6
3.3.1 Egyéni hatások	7
3.3.2 Kombinált hatások	9
3.3.3 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és a fumonizin B1 összefüggése az oxidatív stresszel	11
3.4 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és fumonizin B1 toxikokinetikai jellemzői	13
3.5 Az oxidatív stressz kialakulása és molekuláris jellemzői	14
3.5.1 Lipidperoxidációs folyamatok	16
3.5.2 Hierarchikus oxidatív stressz modell	17
3.5.2.1. Alacsony mértékű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók	17
3.5.2.2. Közepes és nagymértékű oxidatív stressz által kiváltott sejtszintű válaszreakciók	20
3.6 Antioxidáns védelmi rendszer	20
3.6.1 Enzimatis védelem	21
3.6.1.1. Glutation-peroxidáz enzim család	21
3.6.2 Nem enzimatis védelem	24
4. Anyag és módszer	26
4.1 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése és mennyiségének meghatározása	26
4.2 Kísérleti protokollok	27
4.2.1 A kísérletek helyszíne	27
4.2.2 Kísérleti állatok és tartásuk	27
4.2.3 Mintavételezés	28
4.3 Biokémiai vizsgálatok	28
4.3.1 Lipidperoxidációs markerek mérési módszerei	28

4.3.2 A glutation redox rendszer markereinek mérési módszerei.....	29
4.4 Génexpressziós vizsgálatok.....	30
4.4.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR	30
4.4.2 Real-time PCR	30
4.4.3 Statisztikai értékelés.....	31
5. Eredmények és értékelésük.....	33
5.1 T-2/HT-2 toxin, DON/2-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 mikotoxinok rövidtávú egyéni hatásainak vizsgálata tojótyúkban	33
5.1.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban	33
5.1.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban.....	35
5.1.3 Egyéni mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban	36
5.1.4 Megbeszélés	39
5.2 T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata tojótyúkban.....	42
5.2.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban	42
5.2.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban.....	44
5.2.3 Multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban	45
5.2.4 Megbeszélés	48
5.3 T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata tojótyúkban	51
5.3.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban	51
5.3.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban.....	53
5.3.3 Trichotecén-vázis multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban.....	55
5.3.4 Megbeszélés	58
5.4 T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata brojlercsirkében.....	60
5.4.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban	60
5.4.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban.....	61
5.4.3 Multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban	63
5.4.4 Megbeszélés	66
5.5 Emelt dóziszú T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata brojlercsirkében	69
5.5.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban	69

5.5.2	Glutation redox rendszer paramétereinek változása a vérplazmában	71
5.5.3	Multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban	73
5.5.4	Megbeszélés	76
6.	Összefoglaló következtetések és javaslatok.....	77
6.1	Következtetések.....	77
6.2	Javaslatok.....	80
7.	Új tudományos eredmények.....	81
8.	Összefoglaló.....	82
9.	Summary	84
MI	Irodalomjegyzék	i

Rövidítések jegyzéke

AhR	Aromás szénhidrogén receptor
ANOVA	Variancia analízis
3-AcDON	3-acetil-dezoxinivalenol
15-AcDON	15-acetil-dezoxinivalenol
ARE	Antioxidáns Válaszelem
Caco-2	Humán (kaukázusi) vastagbél adenokarcinóma sejtvonala
CAT	Kataláz
CD	Konjugált dién
cDNS	Komplementer DNS
CFU-GM	Telepképző egység-granulocita, makrofág
cGPx4	Citoszol glutation-peroxidáz 4
CYP1A2	Citokróm P450 enzimrendszer 1. alcsalád, A2. tagja
CYP 450	Citokróm P450
CHO-K1	Kínai hörcsög petefészek sejtvonala
CT	Konjugált trién
Ct	Küszöb ciklus
DON	Dezoxinivalenol
EFsec	Szelenocisztein specifikus elongációs faktor
FB1	Fumonizin B1
GAPDH	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GH3	Patkány hipofízis adenoma sejtvonala
GPx	Glutation-peroxidáz
GPX4	Glutation-peroxidáz-4
GSH	Redukált glutation
GSR	Glutation-reduktáz
GSS	Glutation-szintetáz
GSSG	Glutation-diszulfid
GST	Glutation-S-transzferáz
HaCaT	Humán keratinocita sejtvonala
IBV	Bronchitis vakcina
IFN- α	Interferon-alfa
IgA	Immunoglobulin-A
IL	Interleukin
IPEC-J2	Differenciálódott sertés bélhámsejtek
κ	Kappa
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KO	knock-out
LD ₅₀	Medián letális dózis
LOOH	Lipid-hidroperoxid
LOQ	Detektálhatósági határérték
MAPK	Mitogén-aktivált protein kinázok
MDA	Malondialdehid
MGB	Minor Groove Binder
mGPx4	Mitokondriális glutation-peroxidáz 4
mRNS	Hírvivő RNS - Messenger RNS
MUC	Intestinalis mucin
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
N2a	Egér neuroblasztóma sejtvonala
NDV	Newcastle-betegség vírusa
NF κ B	Nukleáris faktor- κ B

nGPx4	Nukleáris glutation-peroxidáz 4
NOS	Nitrogén-oxid szintáz
Nrf2	Nuclear factor E2-related factor 2
PCR	Polimeráz-lánreakció
phGPx	Foszfolipid-hidroperoxid glutation-peroxidáz (GPX4)
PKA	Protein-kináz A
PUFA	Többszörösen telítetlen zsírsavak
qPCR	Quantitative (real-time) PCR
ROI	Reaktív oxigén intermedierek
ROS	Reaktív oxigén szabadgyökök
RQ	Relatív kvantifikáció
Se	Szelén
SeC	Szelenocisztein
SECIS	Szelenocisztein inszerciós szekvencia
SGLT-1	Na ⁺ -függő glükóz/galaktóz transzporter
sMaf	Musculoaponeurotikus fibroszarkóma
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
TBARS	Tiobarbitursavval reaktív anyagok
TNF- α	Tumor nekrosis faktor alfa
tRNS	Transzfer RNS
Trx	Tioredoxin-reduktázok
ttm	Testtömeg
Vero	Emlős eredetű állandó sejtvonal
WHO	Egészségügyi Világszervezet
XRE	Xenobiotikum Válasz Elem
ZnT-1	Cink transzporter

1. BEVEZETÉS ÉS PROBLÉMAFELVETÉS

A mikotoxinok környezetszennyező kémiai anyagok, a fonalgombák másodlagos anyagcsere termékei, amelyek az állatok, illetve az emberek szervezetébe bejutva mikotokózisokat idézhetnek elő. Több évre visszamenően takarmány alapanyagok és kész takarmányok mikotoxin szennyezettségének felmérése alapján elmondható, hogy Európában leggyakrabban a *Fusarium* mikotoxinok előfordulásával kell számolni. Ezek közül a leginkább jelentősek a dezoxinivalenol (DON), a fumonizin B1 (FB1) és a T-2 toxin, valamint annak toxikus metabolitja a HT-2 toxin.

A takarmány- és élelmiszer-analitikai vizsgálatok eredményei rámutattak arra, hogy ezek a mikotoxinok általában nem önmagukban, hanem együttesen fordulnak elő természetes körülmények között. Felmerül a kérdés, hogy ezek a vegyületek milyen módon befolyásolhatják egymás hatását az állati és emberi szervezetben. Az interakció jellegét számos tényező befolyásolhatja, így például függ az állatfajtól, az ivartól, a tápláltsági állapottól és a toxin expozíció időtartamától. Eddigi ismereteink alapján elmondható, hogy az együttes hatás az esetek többségében jelentősebb, mint azt az egyes mikotoxinok külön-külön kifejtett hatása alapján becsülnénk (Smith et al., 2016). Ez azért fontos, mert a javaslati vagy a kötelező érvényű határértékek egy-egy mikotoxin önálló hatásán alapulnak.

A mikotoxinokkal kapcsolatos eddigi kutatások *in vitro* és gazdasági állatokkal végzett *in vivo* kísérletekben a különböző toxinok dózistól és expozíciós időtől függő hatásait mutatják be. Ezek között azonban kevés az alacsony dózisu kölcsönhatás vizsgálat, illetve a *Fusarium* toxinok együttes hatásának elemzése. Kísérleteimben ezért a hazánkban leggyakrabban előforduló *Fusarium* penészgombák által termelt mikotoxinok kölcsönhatásaira fókuszáltam. Olyan mértékű expozíciókat alkalmaztam, amelyek határérték körüliek, így gyakorlati körülmények között gyakran előfordulhatnak.

A fent említett mikotoxinok madarak szervezetére, ezen belül az általam vizsgált glutation redox rendszerre és lipidperoxidációs folyamatokra kifejtett hatásairól viszonylag kevés információval rendelkezünk. Ennek okán kísérleteimhez modell szervezetként a gazdaságilag jelentős brojlercsirkét és tojótyúkot választottam. Egyes *Fusarium* toxinok jól ismert módon oxidatív stresszt indukálnak, amelynek hatására az állati szervezetben fokozódik a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása, amely kihat a biológiai antioxidáns rendszer működésére. Feltehető a kérdés, hogy a T-2 toxin, DON és a FB1 mikotoxinokat együtt alkalmazva fokozzák, vagy gátolják-e egymás hatását a lipidperoxidációs folyamatokra és az antioxidáns védekező mechanizmusokra a tojótyúkok és a brojlercsirkék szervezetében?

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az általam elvégzett kutatás célja az volt, hogy felmérje az egyes mikotoxinok eltérő mennyiségével mesterségesen szennyezett takarmány rövid távú etetésének hatását a mikotoxinok metabolizációjában és raktározásában fontos szervben (máj) a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs fázisaira, valamint ezzel párhuzamosan a glutation redox rendszer egyes tagjainak mennyiségére vagy aktivitására, valamint ennek génexpresszió szintű szabályozására.

1. Vizsgálataim fő célkitűzése az volt, hogy a három *Fusarium* mikotoxin, a T-2 toxin és annak toxikus metabolitja, a HT-2 toxin, a DON és annak toxikus metabolitjai [3-acetil DON (3-AcDON), 15-acetil DON (15-AcDON)] és a FB1 együttes hatását vizsgáljam rövid távú (72 órás) etetési kísérletekben brojlercsirkében és tojótyúkban. A kezelések során a toxin koncentrációkat úgy határoztam meg, hogy azok az Európai Unióban (EU) által megállapított, takarmányokra vonatkozó javaslati határértékeket (2006/576/EK), illetve annak kétszeres és négyszeres mennyiségét tükrözzék.

2. Céлом volt továbbá felmérni, hogy a vizsgált mikotoxinok együttes alkalmazása egyszeri expozíciót követő hatása rövidtávon milyen irányban és mértékben befolyásolja a tojótyúkok és a brojlercsirkék lipidperoxidációs folyamatait jelző markereket, a glutation redox rendszerének egyes elemeit, valamint azok szabályozásáért felelős egyes transzkripciós faktorokat kódoló gének expresszióját.

A vizsgálatok során az alábbi paramétereket vizsgáltam:

a) testsúly, elhullás, takarmányfogyasztás

b) klinikai biokémiai paraméterek:

a lipidperoxidációs folyamatok esetében az iniciációs szakasz markereit (konjugált dién [CD] és konjugált trién [CT]), valamint a terminációs szakasz metastabil végtermékének (malondialdehid [MDA]) mennyiségét, a glutation redox rendszer működését jelző paramétereit (glutation-peroxidáz [GPx] aktivitását, valamint a redukált glutation [GSH] tartalmat

c) a glutation redox rendszer egyes elemeit kódoló gének (glutation-peroxidáz-4 [GPX4], glutation-szintetáz [GSS], glutation-reduktáz [GSR]), illetve a Nrf2/Keap1-ARE (*nuclear factor E2-related factor 2/kelch-like ECH-associated protein 1*/ Antioxidáns válaszelem) útvonalat kódoló egyes gének (*Keap1* és *Nrf2*) expressziós változásait

A fenti célok eléréséhez elvégzett kísérletek:

I. T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 terhelés rövidtávú egyéni hatásának vizsgálata tojótyúkban. Alkalmazott dózis: közepes (javaslati határérték kétszeres mennyisége).

II. T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata tojótyúkban. Alkalmazott dózisok: alacsony (javaslati határértékkel megegyező mennyiség), közepes (javaslati határérték kétszeres mennyisége).

III. T-2/HT-2 toxin és DON/3-AcDON/15-AcDON terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata tojótyúkban. Alkalmazott dózisok: alacsony (javaslati határértékkel megegyező mennyiség), közepes (javaslati határérték kétszeres mennyisége).

IV. T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata brojlersirkében. Alkalmazott dózisok: alacsony (javaslati határértékkel megegyező mennyiség), közepes (javaslati határérték kétszeres mennyisége).

V. Emelt dóziséjú T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata brojlersirkében. Alkalmazott dózisok: alacsony (javaslati határértékkel megegyező mennyiség), magas (javaslati határérték négyszeres mennyisége).

3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Mikotoxinok

A mikotoxinok előfordulása a takarmányokban és az élelmiszerekben világméretű probléma, mert állat- és humánegészségügyi veszélyeket, valamint gazdasági veszteségeket okoznak az élelmiszer- és takarmányiparban, valamint az állattenyésztésben. A mikotoxinnal vagy -toxinokkal együttesen szennyezett takarmány fogyasztása az állatoknál akut vagy krónikus megbetegedéseket, rendellenességeket okozhat, ami többek között a szaporodásbiológiai folyamatok zavarához vezet (Nayakwadi et al., 2020). Fő probléma azonban legtöbbször az, hogy az alacsony dózisu mikotoxin terhelés, amely például baromfi fajoknál akut toxikózist még nem idéz elő, anyagcserezavarokat, csökkent takarmányfelvételt, emiatt csökkent testsúlygyarapodást, továbbá csökkent tojástermelést és immunszuppressziót idézhet elő (Bryden, 2012).

A legutóbbi DSM *World Mycotoxin Survey* felmérés szerint 2022-ben Európában a *Fusarium* spp. által termelt mikotoxinok a takarmányozásra szánt gabonafélék nagy részében kimutathatóak voltak. A vizsgált mintákban a DON 46%, a fumonizinek 34%, a T-2 toxin pedig 24%-os gyakorisággal fordult elő (1. táblázat) (DSM, 2022).

1. táblázat: A szennyezések gyakorisága és mértéke a kutatásban vizsgált mikotoxinok esetén takarmányokban (DSM 2022)

	DON	T-2	FUM
Minták száma	8837	6303	6390
Szennyezett minták aránya (%)	46	24	34
Szennyezések mértékének átlaga (µg/kg)	797	44	708
Szennyezések maximum értéke (µg/kg)	445956	2014	38481
EU javasolt határértékek takarmányokban (µg/kg) (EU, 2006)	5000	250	20000

DON: DON és acetilált származékai (3- és 15 acetil-DON), **T-2:** T-2/HT-2 toxin, **FUM:** Fumonizin B1, B2, B3

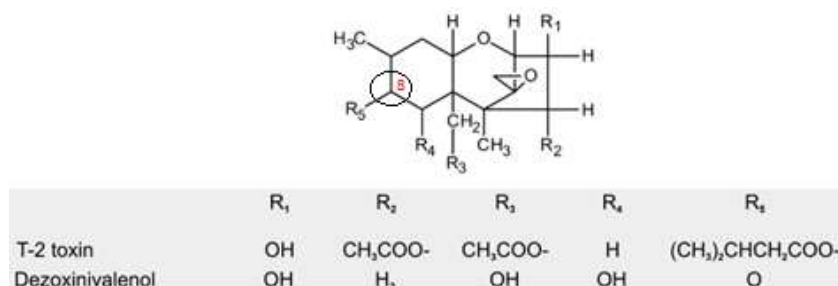
Az 1. táblázat adatai alapján a vizsgált takarmány minták nagy részének mikotoxin szennyezettsége átlagosan ugyan nem haladta meg az EU javasolt határértéket, viszont előfordultak kiugróan magas koncentrációk is. A baromfi fajok takarmányának legfőbb összetevője a kukorica. Az 1. táblázatban bemutatott értékekkel ellentétben a vizsgált kukoricaminták 60%-a volt pozitív DON-ra (átlagos érték 986 µg/kg), 51%-a fumonizinekre (átlagos érték 1480 µg/kg) és 36%-a T-2 toxinra (átlagos érték 92 µg/kg). Az átlagos mikotoxin szennyezettségi értékek ugyan alacsonyabbak voltak az EU által javasolt határértékeknél, de a minták körülbelül fele (46%) egynél több mikotoxint tartalmazott (DSM, 2022).

3.2 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és fumonizin B1 általános jellemzői

A *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák növényi kórokozók, amelyek már a termőterületen fertőzik a gabonaféléket, így a búzát, árpat és kukoricát, amelyek csökkenő termés hozamot, illetve mikotoxin szennyezettséget okoznak (Bennett &

Klich 2003). A termelő mikotoxin mennyisége függ egyes fizikai tényezőktől (nedvesség, relatív páratartalom, hőmérséklet, mechanikai sérülések), kémiai tényezőktől (szén-dioxid, oxigén, szubsztrát összetétele), valamint biológiai tényezőktől (növényfajta, stressz, rovarkártétel) (Frisvad, 1995).

A mérsékelt éghajlati övbe tartozó országokban a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok által termelt trichotecén-vázak mikotoxinok közül a DON-nak, valamint toxikus metabolitjainak (3-AcDON és 15-AcDON) és a T-2/HT-2 toxinnak van a legnagyobb jelentősége széleskörű és mérgező jellege miatt. Fontosabb toxintermelő gombafajok a *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* (T-2 toxin), valamint a *F. graminearum* és *F. culmorum* (DON) (Thrane et al, 2004). Kémiai szerkezetüket tekintve szeszkviterpén típusú vegyületek, amelyekre jellemző a 12,13-epoxid gyűrű és a 9,10 telítetlen kettőskötés, emiatt kémiaiag reaktívak (Varga et al., 2009). Az „A” és „B” típusú trichotecének a 8. szénatomon elhelyezkedő funkciós csoportok alapján különböztethetők meg. Az „A” típusú trichotecének közé tartozó T-2 toxin észterkötéssel, míg a „B” típusú trichotecének (DON, nivalenol) karbonil funkciós csoporttal rendelkeznek a 8. szénatomon (1. ábra) (McCormick et al., 2011).

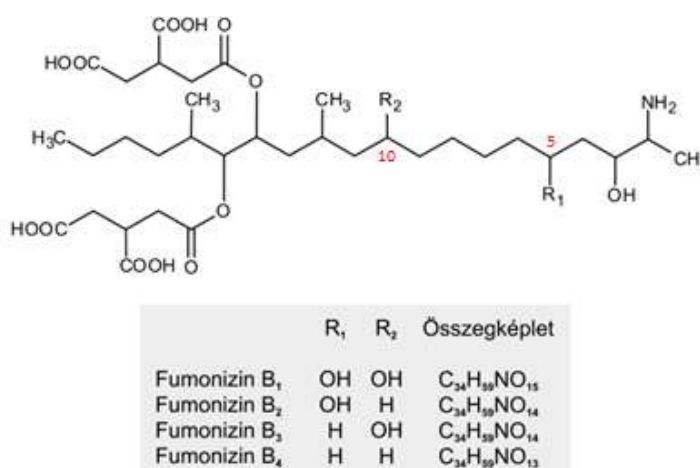


1. ábra: T-2 toxin és a DON szerkezete (Varga et al., 2009)

A trichotecén váz képződése a másodlagos metabolizmus útján egy pirofoszfát ciklizálásával kezdődik, amelynek során trichodién keletkezik. Oxigenizációt követően, amelyet a *Tri4* gén által kódolt citokróm P450 (CYP450) monooxygenáz katalizál, izotrichotriol képződik. Izomerációt követően izotrichodermol keletkezik, amelyből a folyamat eredményeként létrejön a T-2 toxin (McCormick & Alexander, 2002). A T-2 toxin és a HT-2 toxin szerkezete csak a 4. szénatom funkcionális csoportjában tér el egymástól. Mivel a T-2 toxin könnyen metabolizálódik HT-2 toxinná, ezt a két mikotoxint toxicitási szempontból együtt kezeljük (Canady et al., 2001). A „B” típusú trichotecének hasonló útvonalon keletkeznek, de az utolsó lépésnél a 3. vagy 15. szénatomról egy észteráz acetilcsoportot távolít el, amelyet a *Tri8* gén kódol. Az észteráz a DNS-szekvencia által meghatározott eltérő aktivitás miatt határozza meg a DON-ból az egyes metabolitok kialakulását: 3-AcDON, 15-AcDON (Alexander et al., 2011).

A fumonizinek közül a B-típus (FB) a leginkább toxikus és tanulmányozott (elsősorban a FB1), amely mind a termelő penészgombák tenyésztésében, mind a természetben előforduló szennyezett mintákban leginkább előforduló forma (Nelson et al., 1992). Leggyakrabban kukorica alapú takarmányokban, termékekben találhatóak meg. A legfontosabb termelők: *F. verticillioides* /korábban *F. moniliforme*/

és *F. proliferatum* (Thrane et al., 2004). Diészter jellegű vegyület, amelynek számos struktúranalógja ismert (FB2, FB3, FB4 stb.) (2. ábra).



2. ábra: A fumonizinek szerkezete (Varga et al., 2009)

A fumonizinek poliketid típusú, 19 vagy 20 szénatomszámú láncból álló lineáris vegyületek, hidroxil-, metil és trikarbalilsav oldalláncokkal. A fumonizin B szerkezeti analógok abban különböznek egymástól, hogy az 5. és a 10. szénatomon jelen vannak-e vagy hiányoznak a hidroxilcsoportok (Proctor et al., 1999). A *FUMI* gén fontos szerepet játszik a bioszintézisben, mert a poliketid-szintáz enzimet kódolja, amely a fumonizin poliketid gerincének keletkezéséért felel (Visentin et al., 2012). Hőstabil, a szfinganin szfingolipidekhez hasonló vegyületek (Sohár, 2007).

3.3 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és fumonizin B1 toxikodinámiai jellemzői

A mikotoxinok kémiai szerkezete, bioszintézise és hatásmódja heterogén. A takarmányok természetes úton szennyeződhetnek a mikotoxinokkal, így azok hatása hasonló lehet egyes peszticidek vagy nehézfém-szennyezések által okozott kórképekhez. A mikotoxikózis tünetei függenek a mikotoxinok típusától, az expozíció mértékétől és időtartamától, az adott állat korától, egészségi állapotától, ivarától, fajtájától, tartási és takarmányozási körülményeitől. A tünetek súlyosságát növelheti a vitaminhiány, az alultápláltság, fertőző betegségek, illetve más mikotoxinok vagy egyéb toxikus anyagok jelenléte (Bennett & Klich, 2003). Az egyes állatfajoknál jelentős különbségek figyelhetők meg a mikotoxinok felszívódásának mértékében, azok szervezeten belüli eloszlásában, metabolizmusában és kiválasztásában (Wang et al., 2022). A trichotecének és a fumonizinek a legtöbb gazdasági állatra nézve toxikusak. A sertések érzékenyebbek (Rotter, 1996), a kérődzők viszont ellenállóbbak a bendő mikrobiális aktivitásának köszönhetően. Az egyes mikotoxinok iránti érzékenységben feltételezhetően a mikotoxinok metabolizmusában részt vevő enzimek aktivitásának és génexpressziós különbségeinek eltérései állhatnak, amelynek következtében felborulhat a biotranszformáció I. és II. fázisa közötti egyensúly (Jouany et al., 2009).

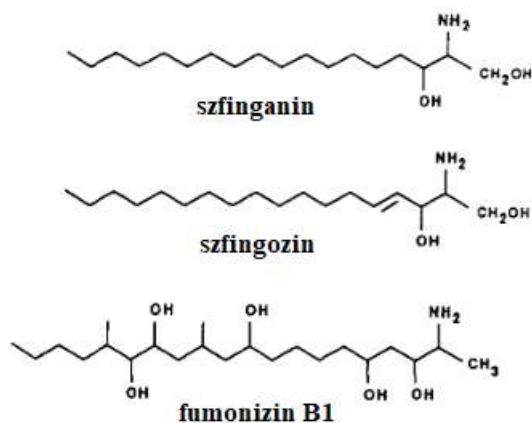
3.3.1 Egyéni hatások

Az „A” típusú trichotecének közé tartozó T-2 és HT-2 toxinok a takarmány alapanyagokban ugyan ritkábban fordulnak elő, de mérgezőbb hatásúak, mint a „B” típusú trichotecének, így a DON és származékai (3-AcDON, 15-AcDON). A DON/3-AcDON/15-AcDON akut toxicitása a T-2 toxinhoz képest ugyan kisebb, de gyakori előfordulásuk miatt nagyobb jelentőségük van. Már az első toxikológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a trichotecének gátolják az eukarióta sejtek fehérje- és DNS szintézisét, megakadályozva a peptidkötés kialakulását a 60S riboszomális alegység peptidil-transzferáz központjában. Ez a gátlás érintheti a fehérjeszintézis iniciációs, elongációs és terminációs szakaszát egyaránt (Cundliffe & Davies, 1977). Később kimutatták, hogy a trichotecének gátolják a mitokondriális fehérjeszintézist is (Pace et al., 1988) és kölcsönhatásba lépnek a fehérjék szulfhidril csoportjaival az epoxi gyűrű segítségével, gátolva funkciójukat (Ueno & Matsumoto, 1975). A mitokondriális diszfunkció viszont fokozott mértékű szabadgyök képződését idéz elő (Suneja et al., 1989), amely megváltoztatja a mitokondriális membránpotenciált (Bin-Umer et al., 2011), ezzel apoptotikus faktorok termelődését indukálva (Zhang et al., 2009). A DNS szintézis gátlásával olyan nukleáris faktorok aktiválódhatnak, mint a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B), amely tumorszupresszor, valamint a sejtnövekedést, és az apoptózist is szabályozza (Zhou et al., 2014). Ezek a mikotoxinok a sejtek fiziológiai állapotának megváltoztatásával citokin-termelést indukálhatnak (Bouhet & Oswald, 2005), továbbá fokozódhat a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α) génexpressziója, ezzel gyulladásos jelátviteli útvonalakat aktiválva (Chung et al., 2003). A T-2 toxin és a DON toxikus hatásai közé tartozik a membrántranszport és -funkció megzavarása is. A DON gátolja a Na⁺-függő glükóz/galaktóz transzportert (SGLT-1), amely a víz felszívódásáért felelős a bélben (Maresca et al., 2002), ez magyarázhatja a DON toxikózis egyik első tüneteként jelentkező hasmenést. A DON hatásai közül ugyanakkor az immuntoxicitást tartják a legjelentősebbnek. Dózistól és az expozíció időtartamától függően a DON és a T-2 toxin többféleképpen modulálja az immunfunkciókat. Nagy dózisban az immunsejtek apoptózisát és immunszuppressziót indukálják, míg kis mennyiségben fokozzák az immunsejtek proliferációját, a citokinek termelését, ezzel megzavarva a normális immunválaszokat, növelve a krónikus immunbetegségek kialakulásának kockázatát, továbbá a fertőzésekre való hajlamot (Li et al., 1997; Payros et al., 2016). Az „A” típusú trichotecének, mint például a T-2 toxin, kisebb immuntoxicitással bírnak, viszont immunszuppresszív hatással rendelkeznek (Ziprin & Elissalde, 1990). A T-2 toxin és a DON a vér-agy gáton átjutva neurotoxikus hatásúak is lehetnek, a szerotoninerg és a dopamin rendszer működésének befolyásolásával étvágytalanságot és emetikus tüneteket okozhat (Smith, 1992; Wang et al., 1993; Sokolović et al., 2008). A 12,13-epoxi gyűrűs szerkezet kémiaiag különösen reaktív, már kis dózisban károsíthatja az emésztőrendszer nyálkahártyáját, ezzel rontva a táplálóanyagok felszívódását (Albarenque et al., 1999; Payros et al., 2016).

A T-2 toxin és a DON baromfi fajoknál általában csak szubkrónikus és szubklinikai tüneteket idéznek elő, így például növekedésbeli lemaradást, csökkent takarmányfelvételt és -értékesülést, emiatt csökkent termelést és kisebb

testsúlygyarapodást. Megfigyelték emellett a lábbőr pigmentációjának zavarát, felmaródásokat a csőrön és szájüregben, továbbá tollképződési zavart, illetve fokozott érzékenységet a fertőző betegségekkel szemben (Sokolović et al., 2008). A két mikotoxin esetében különbségek általában csak a változások mértékében és súlyosságában vannak. Brojlersirkéknél akut mikotoxikózis ritkán alakul ki, míg hosszabb távú, alacsony dózisu terhelés esetén a trichotecének genotoxikus, citotoxikus és immunmoduláns hatásait egyaránt leírták (Sokolović et al., 2008; Payros et al., 2016). Amennyiben a takarmány kisebb mennyiségben szennyezett DON-nal (kevesebb, mint 5 mg/kg takarmány), akkor csökken a termelékenység, gyengül az immunitás és nagyobb lesz a fertőző betegségekre való hajlam (Awad et al., 2013). Kis koncentrációban a DON növeli a szérum immunglobulin A (IgA) szintjét, illetve hatással van mind a sejt által közvetített, mind a humorális immunitásra (Pestka & Bondy, 1990). A DON emellett kimutatható mértékben csökkenti a fertőző bronchitis vakcina (IBV) és a Newcastle-betegség vírusa (NDV) elleni antitestválaszt brojlersirkékben (10 mg DON/kg takarmány) (Ghareeb et al., 2012) és tojótúkokban (3,5-14 mg DON/kg takarmány) (Dänicke et al., 2002). Nagyobb dózisban a DON eróziókat okoz a gyomor-béltraktus nyálkahártyáján, amely a későbbiekben gyulladáshoz és megnövekedett bélhám átteresztőképesség kialakulásához (leaky gut syndrome) vezet (Lun et al., 1986). Baromfifélékben a T-2 toxikózis első tünetei a csökkenő takarmányfelvétel, emiatt a testtömeg gyarapodás és a növekedési intenzitás csökkenése (Sokolović et al., 2008). Tojótúkoknál csökken a tojástermelés (Tobias et al., 1992), nagy toxin szennyezettségi szint esetén (20 mg/kg takarmány) pedig romlik a tojás minősége és a keltethetőség (Pier et al., 1980). A T-2 toxin LD₅₀ értéke 7 napos brojlersirkénél 4,97 mg/kg ttm., míg a HT-2 toxin esetében 7,22 mg/kg ttm. (Sokolović et al., 2008). DON esetében brojlersirkéknél az LD₅₀ érték 140 mg/kg ttm. (Huff et al., 1981).

A fumonizinek közé tartozó FB1 az állatokban, így a baromfi fajokban is, számos toxikológiai hatásért felelős. Kutatási eredmények alapján emberben a lehetségesen rákkeltő (Group 2B) mikotoxinok közé sorolták (IARC, 2002). A FB1 molekuláris szerkezete, a hosszú poliketid lánc, és a szfingolipidek szfingoid gerince hasonló, ezért a fumonizinek a szfingolipidek metabolizmusára hatnak, mint a szfingozin szerkezeti analógjai (3. ábra) (Wang et al., 1991).



3. ábra: Szfinganin, szfingozin és a fumonizin B1 gerincének szerkezete (Weibking et al., 1993)

A szfingolipidek esszenciális komponensei az eukarióta membránoknak és szerepük van a sejtnövekedésben és differenciálódásban. A FB1 a szervezet egyik fontos enzimjének, a szfingozin-N-aciltranszferáznak inhibitora, amely a *de novo* szfingolipid bioszintézisben és a szfingolipid anyagcseréből származó szabad szfingoid bázisok reacetilezésében játszik szerepet. Emiatt a szfinganin és a szfingozin mennyisége nő, a ceramid szint viszont csökken és gátolt lesz a szfingolipidek képződése (Di Bartolomeo et al., 2000; Riley et al., 2001). A szfingolipidek mennyiségének csökkenése és a folsavtranszport gátlása rendellenes gerincvelőcsőzáródást idéz elő egér embriókban (Marasas et al., 2004; Sadler et al., 2002). A FB1 neurotoxikus hatással is rendelkezik, mert károsítja a szfingozin bioszintetikus útvonalát, amely az agy- és idegszövet fontos alkotórésze (Stockmann-Juvala et al., 2006), továbbá citotoxikusak lehetnek a mikroglia sejtekre és az asztrocitákra (Osuchowski et al., 2005). A FB1 a szfingozin-N-aciltranszferáz gátlásával növeli a szabad szfingoid bázisok szintjét, amelyek rendkívül reaktív molekulák, ennek révén DNS károsodást, kaspáz-3 aktivitás növekedést, emiatt apoptózist idéznek elő humán fibroblasztokban *in vitro* (Galvano et al., 2002). FB1 toxikózist jellemzően emelkedett mennyiségű szabad szfinganin és szfingozin bázisok mutatják, amelyet máj-, vese- és zsírszövetben figyeltek meg madárfajok esetén (Tardieu et al., 2006; Benlasher et al., 2012). A baromfi fajok ugyanakkor kevésbé érzékenyek a FB1-re, emiatt a mikotoxin terhelésnek legtöbbször nincsenek klinikai tünetei. Nagy dózis alkalmazásánál azonban fiatal brojlercsirkékben májkárosodást figyeltek meg 75 mg FB1/kg takarmány etetésénél. Ennél alacsonyabb dózis hosszú távú alkalmazásánál megnövekedett szabad szfinganin és szfingozin bázis szintet mértek ugyan, de szövettani elváltozásokat nem tapasztaltak (Weibking et al., 1993). FB1 terhelés morfológiai és funkcionális változásokat idézett elő csirke makrofágokban *in vitro*, ami arra utal, hogy a FB1 expozíció immunszuppresszív hatású, ezzel a csirkék bakteriális fertőzésekre való érzékenységét növelheti (Qureshi & Hagler, 1992). Nagy dózis (>100 mg FB1/takarmány) fiatal állatokban csökkenti a testtömeg gyarapodást, valamint megnövekedett relatív szervtömeget, hasmenést és angolkórt figyeltek meg (Brown et al., 1992; Ledoux et al., 1992). 30 hetes tojótyúkوك szerveiben 2 mg FB1/kg ttm. terhelést követően az FB1 felhalmozódását vizsgálták Vudathala és mtsai (1994). Eredményeik szerint a különböző szervek és szövetek FB1 koncentrációja elhanyagolható volt (<10-15 µg FB1/kg szövet), kivéve a máj (530 µg/kg) és a vese (210 µg/kg) egyes területeit. A tojás sárgájában, fehérjéjében és héjában szintén nagyon alacsony volt (<10-15 µg FB1/kg) a felhalmozódás mértéke.

3.3.2 Kombinált hatások

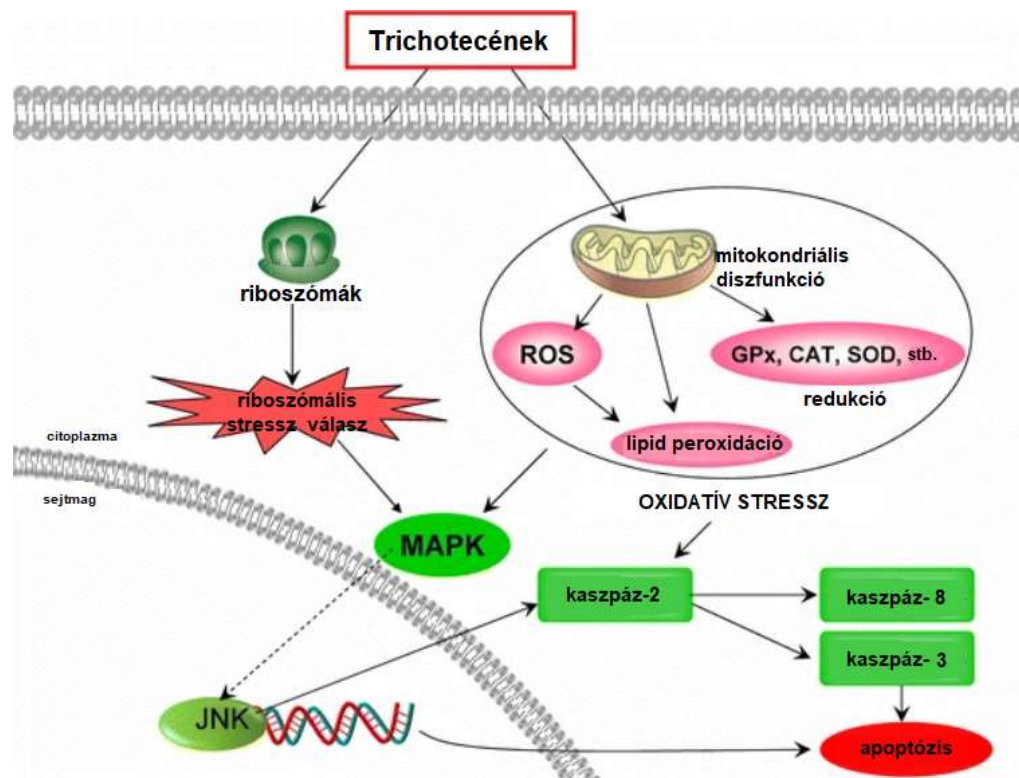
A mikotoxinok együttes előfordulása a takarmányokban eltérő toxikus hatásokat idézhet elő, azaz fokozhatják vagy gátolhatják egymás hatását. A mikotoxinok kölcsönhatása lehet additív, ekkor a hatás a vizsgált toxinok egyedi hatásainak összege alapján számítható, lehet szinergista, amikor a mikotoxin-kombináció hatása a vártnál nagyobb a vizsgált mikotoxinok egyedi hatásainak összegéhez viszonyítva, valamint antagonista, amikor a mikotoxin kombináció hatása az egyéni hatásonál alacsonyabb (Smith et al., 2016). A közelmúltban számos *in vivo* rövid (szubakut) és hosszú távú (szubkrónikus) vizsgálatokat végeztek laboratóriumi és gazdasági állatokkal, ahol a

mikotoxinok közötti kölcsönhatásokat vizsgálták. Emellett *in vitro* modelleket is gyakran használnak a mechanizmusok pontosabb megértéséhez, különösen a mikotoxin keverékek sejtspecifikus funkcióra gyakorolt hatásaira vonatkozóan (Klarić, 2012). A legtöbbet vizsgált paraméterek a sejtek életképessége, proliferációja, apoptózis/nekrózis, DNS és oxidatív károsodás, fehérjeszintézis és immunotoxicitás. Megfigyelték, hogy a kombinált hatások függenek a mikotoxinkeverékek típusától és koncentrációjától, a kísérleti modelltől, a sejtek típusától, valamint az expozíció idejétől (Smith et al., 2016). DON+T-2 toxin esetében antagonizmust figyeltek meg akut expozíciónál (24-72 óra) kínai hörcsög CHO-K1 (kínai hörcsög petefészkek sejtvonala) és majom Vero (emlős eredetű állandó sejtvonala) sejtjein (Ruiz et al., 2011a; Ruiz et al., 2011b), illetve additív kölcsönhatást humán progenitor sejtek (telepképző egység-granulocita, makrofág (CFU-GM)) esetében 14 napos expozíciónál (Ficheux et al., 2012). Alacsony koncentrációban (<0,5 µM DON és 20 µM FB1) a DON+FB1 együttes alkalmazásánál antagonista hatást figyeltek meg a CFU-GM, illetve differenciálódott sertés bélhám sejtvonalakon (IPEC-J2) (Ficheux et al., 2012; Wan et al., 2013). Az eddigi *in vitro* vizsgálatok alapján általánosságban elmondható, hogy a legtöbb mikotoxin-keverék additív vagy szinergista hatást fejt ki, amely hangsúlyozza a multi-mikotoxin kísérletek fontosságát (Smith et al., 2016). A baromfi fajok takarmányozása során többféle gabonaforrást használnak, így fennáll a lehetősége annak, hogy a takarmányban egyidejűleg megtalálható legyen a T-2 toxin, a DON és a FB1 (Kubena et al., 1997). *In vivo* kölcsönhatás vizsgálatok során főleg a gazdasági állatok termelési paramétereit, a takarmányfogyasztását, testtömeg-változását, szervi elváltozásait, a vér biokémiai és hematológiai paramétereit, illetve az oxidatív stressz és az antioxidáns rendszer markereinek változását vizsgálták (Fremy et al., 2019). Egy brojlercsirkékkel végzett korábbi kutatásban (Kubena et al., 1997) additív toxicitást írtak le, kikeléstől 21 napos korukig, 300 mg/kg FB1+5 mg/kg T-2 toxin tartalmú takarmány etetésénél, amelyben csökkent testtömeg növekedést, takarmányfogyasztást és -értékesítést, szájüregi elváltozásokat, illetve növekvő mértékű mortalitást és a szervek relatív tömegének növekedését figyeltek meg. 300 mg/kg FB1+15 mg/kg DON kombinációja szinergista hatást eredményezett a vérszérum koleszterinszintjére és aszpartát-dehidrogenáz aktivitására. A két paraméter értékének növekedése szignifikánsan nagyobb volt, mint ami a mikotoxinok együttes hatása esetén az egyedi hatások alapján várható lett volna. Kubena et al. (1989) egy hosszútávú kísérletben szintén nagy dózisu, 4 mg/kg T-2 toxin+16 mg/kg DON kombinációját vizsgálták. Klinikai tüneteket, mint például a szájüregi elváltozásokat, illetve csökkent testtömeg gyarapodást itt is tapasztaltak. A hivatkozott szerzők szerint számos olyan paraméterre (pl.: testtömeg, a vér koleszterinszintje) volt hatással a mikotoxinok kombinációjának alkalmazása, amit az adott mikotoxinok önmagukban nem befolyásoltak jelentősen. Ez azt jelzi, hogy a vizsgált kombinációk potenciálisan nagyobb problémát jelenthetnek a baromfiipar számára, mint az egyes mikotoxinok jelenléte külön-külön. A T-2 toxint és a DON-t az EU javaslati határértékek dózisaiban egyidejűleg alkalmazták egy szubkrónikus vizsgálatban (Pelyhe et al., 2018). Az eredmények szerint az antioxidáns rendszer már alacsony dózis esetén is aktiválódott a brojlercsirkék májában, ami megakadályozta a lipidperoxidációs folyamatok fokozódását, ezzel megfelelő antioxidáns védekezésre utalva. Klinikai tüneteket nem

tapasztaltak, amelynek oka a brojlercsirkék mérsékelt toleranciája lehet a vizsgált mikotoxinokkal szemben (Dänicke et al., 2001; Eriksen és Pettersson, 2004). A DON és a FB1 kombinációja az EU javaslati mennyiségek (5 mg DON + 20 mg FB1/kg takarmány) alkalmazásakor megváltoztatta a brojlercsirkék epésbél nyálkarétegét, az intestinalis mucin (MUC) génexpressziójának csökkentésével és a mucin monoszacharid összetételének módosításával. Ezek mellett csökkent a bélben található cink transzporter (ZnT-1) génexpressziója, illetve befolyásolta az intracelluláris metionin homeosztázist, amelyek a sejt antioxidáns aktivitásának megőrzésében fontosak (Antonissen et al., 2015). Korlátozott mennyiségű adat áll csak rendelkezésre az egyes fusariotoxinok közötti kölcsönhatásokról baromfiban. Az említett kutatások alapján azonban elmondhatjuk, hogy a vizsgált mikotoxinok együttes hatása már az EU által javasolt maximális mennyiségben is okozhat toxikus hatást, ezzel szinergizmusra utalva.

3.3.3 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és a fumonizin B1 összefüggése az oxidatív stresszel

A trichotecén-vázás mikotoxinok, az epoxi csoport megléte miatt, reaktív vegyületek, amelyek képesek szabadgyököket generálni, ebbe beleértve a reaktív oxigén fajtákat (ROS). Ezek a DNS károsodását, a fehérjék oxidációját és lipidperoxidációt indukálnak, ami a membránok integritásának, a sejt redox jelátvitelének és antioxidáns állapotának megváltozásához vezet (Chandratre et al., 2014). A ROS képződés és következményesen a lipidperoxidáció az elektrontranszport lánc gátlása miatt is fokozódhat, amelyet a T-2 toxin hatásaként figyeltek meg mitokondriális membránokban (Zhuang et al., 2013). A mitokondriális diszfunkció növeli a ROS szintjét, emiatt az antioxidáns rendszerben kimerül az intracelluláris redukált glutation (GSH) mennyisége és csökken az antioxidáns enzimek, így pl. a glutation-peroxidáz (GPx), szuperoxid-dizmutáz (SOD) és kataláz (CAT) aktivitása (Hou et al., 2013). A fent említett folyamatok aktiválják a kaszpáz-2 útvonalat, az apoptotikus szignálok pedig elsősorban a kaszpáz-8 és kaszpáz-3 útvonalon keresztül továbbítódnak (Huang et al., 2007). A trichotecének ismertek az eukarióta fehérjeszintézist gátló hatásukról, emellett a riboszómákhoz kötődve aktiválják a mitogén-aktivált protein kinázokat (MAPK). A „riboszómális stressz” jelátviteli útvonal pedig apoptózist idézhet elő (Sehata et al., 2005) (4. ábra).



4. ábra: A trichotecének oxidatív stressz által közvetített toxicitásának feltételezett mechanizmusa (Wu et al., 2014)

A fentiek mellett a T-2 toxin, a DON és a FB1 közvetett módon is indukálhatnak oxidatív stresszt a xenobiotikum transzformáló rendszer (pl. CYP 450 enzimesalád) aktivációja (Yuan et al., 2013), vagy az általuk indukált gyulladásos folyamatok (Ravindran et al., 2011) révén. A gyulladásos folyamatok immunreakciókat indukálhatnak (Ito et al., 1982), amelyek szintén fokozzák a ROS képződést. Említett mikotoxinok ugyanakkor immunszuppresszív hatással is rendelkezhetnek, amely befolyásolja az oxidatív stressz mértékét (Mekhancha-Dahel et al., 1990). Korábbi kutatások alapján elmondhatjuk, hogy a kísérleti állatok szervezetében a trichotecénvázis mikotoxinok hatására fokozódnak a lipidperoxidációs folyamatok, amely hatással van a biológiai antioxidáns rendszer működésére (Mézes et al., 1999; Surai et al., 2002). Chaudhari et al. (2009) vizsgálati eredményei szerint a T-2 toxin által kiváltott oxidatív stressz a patológiás folyamatok kialakulásának egyik fő oka. Kísérletükben egereket intraperitoneálisan T-2 toxinnal (5,61 vagy 11,22 mg/kg ttm.) kezelve 24 óra múlva a malondialdehid (MDA) koncentráció háromszoros növekedését észlelték az agyban, amely fokozott mértékű lipidperoxidációra utal. A nagyobb dózis (11,22 mg/kg ttm.) alkalmazásakor már 4 óra elteltével mind az antioxidáns hatású glutation-S-transzferáz (GST), mind a SOD aktivitása nőtt. Chaudhary és Rao (2010) a T-2 toxin által okozott bőrgyulladás és bőrsérülés egyik lehetséges okának is az oxidatív stresszt tartják. A ROS szignifikáns mértékű növekedése egerek bőrében már 3 órával a T-2 toxin expozíció után megfigyelhető volt (Agrawal et al., 2012). A T-2 toxin által kiváltott oxidatív stressz hozzájárulhat továbbá a porckárosodás patológiás folyamatához Kashin-Beck betegségben (Chen et al., 2012). A ROS képződés, a GSH tartalom kimerülése, valamint a fokozott lipidperoxidáció differenciált egér embrionális őssejtekben arra utalt, hogy az oxidatív

stressz a T-2 toxin citotoxicitásának egyik fő mechanizmusa (Fang et al., 2012). A DON, mint „B” típusú trichotecén szintén oxidatív stresszt indukáló hatással bír. Humán bélsejtvonalban, a Caco-2 sejtekben, a DON (1-150 μM) szignifikáns mértékben növelte a MDA termelését 10 μM koncentrációtól kezdődően (Kouadio et al., 2005). DON-nal szennyezett kukoricával (DON 3,1 mg/kg) etetett egerek vér- és szövetmintáiból az oxidatív stressz markereit vizsgálták. A mikotoxin terhelés növelte a GPx aktivitást és a MDA koncentrációját a szérumban és a májban (Hou et al., 2013). Brojlercsirkékben a GPx aktivitása, illetve a glutation-peroxidáz-4 gén (*GPX4*) expressziója szignifikánsan emelkedett a kontroll csoporthoz képest 48 órás DON (16,12 mg/kg) terhelést követően (Nakade et al., 2018). A FB1 befolyásolja a szfingolipidek anyagcseréjét. A szfingozinnal és a szfinganinnal meglévő szerkezeti homológia lehetővé teszi, hogy a FB1 a ceramid-szintáz enzimek kompetitív inhibitoraként működjön. A szfingolipidek metabolizmusának zavara miatt csökken a ceramid relatív koncentrációja, ugyanakkor a szabad szfingoid bázisok (szfingozin és szfinganin), valamint a szfingozin-1-foszfát mennyisége nő, ami azok reaktivitása miatt oxidatív stresszhez vezethet (Riley et al., 2001). Ezen kívül számos további tanulmány utalt a lipidperoxidációs folyamatok vagy az oxigén szabadgyökök fokozott képződésére a FB1 hatásaként (Galvano et al., 2002; Wang et al., 2016; Khan et al., 2018; Cao et al., 2022). Ideg- és glia sejtvonalakban *in vitro* kimutatták, hogy a FB1 nagy dózisban (100 μM) csökkenti a sejtek életképességét és GSH szintjét, amelynek oka, hogy fokozza a ROS termelődését és a lipidperoxidációt (Stockmann-Juvala et al., 2004a; Stockmann-Juvala et al., 2004b).

3.4 A T-2 toxin, dezoxinivalenol és fumonizin B1 toxikokinetikai jellemzői

A mikotoxinok biotranszformációja a bélhámsejtekben, a vesében vagy a májban megy végbe. Az I. fázisban azokat a mikroszómális CYP 450 enzimes család epoxidációs, hidroxilációs és demetilációs folyamatok során kevésbé hidrofób karakterű molekulává alakítja. A II. fázisban glükoronid vagy szulfát konjugáció megy végbe, amelynek célja a metabolitok epén vagy a vizeleten keresztül történő kiválasztásának elősegítése (Kuca et al., 2008).

A trichotecén-vázis mikotoxinok, így a T-2 toxin és a DON kisméretű, amfipatikus molekulák, amelyek passzív transzporttal jutnak át a sejtmembránokon (Middlebrook & Leatherman, 1989; Wannemacher & Winer, 1977). Könnyen felszívódnak a bőrön, a nyálkahártyán és a gyomor-bélrendszer epithel rétegén keresztül, ami lehetővé teszi a szervezetbe bejutott trichotecének gyors megoszlását (Wannemacher & Winer, 1977). A T-2 toxin a szövetekben kevésbé stabil, így például 0,15 mg/kg ttm./nap dózis beadását követően 72 órával annak 95%-a csak metabolizálódott formában mutatható ki a szervezetben (WHO, 1990). Kismértékű felhalmozódást csak a limfoid szervekben (Kuca et al., 2008), a tejben és a tojásban találtak (Yoshizawa et al., 1980). A T-2 toxin felezési ideje a vérplazmában kevesebb, mint 20 perc (Young et al., 2007), mivel gyorsan átalakul főképp HT-2 toxinná, illetve más metabolitokká, amelyek glükuronid konjugátumok formájában ürülnek. A szervezetbe bekerült T-2 toxin szinte teljes mennyisége metabolizálódik a bél- és májmikroszómák CYP 450 észterázai segítségével (Cavret & Lecoer, 2006). Egyes *Fusarium* fajok a DON két acetilált formáját is képesek előállítani, a 3-acetil-DON-t és a 15-acetil-DON-t, amelyek a

DON prekurzorai. A *Fusarium*-mal fertőzött gabonamagvakban ezért megtalálhatóak az acetilált formák is (Alizadeh et al., 2016). A DON metabolizmusa, elsősorban annak de-epoxidációja, brojlercsirkékben már a bélcsatornában végbemegy egyes mikrobiális enzimek hatására („first pass” hatás) (Pierron et al., 2016). Fő metabolitjai a DOM-1, DON-3-szulfát és a DON-3-glükuronid, amelyek toxicitása lényegesen alacsonyabb az alapvegyületnél. A DON glükuronsavval való konjugálása és annak a vizelettel történő eliminációja a fődetoxifikációs útvonal (Wu et al., 2014). A baromfi fajok a „first pass” hatás miatt, amely gyakorlatilag nem toxikus DOM-1 metabolitot eredményez, kevésbé érzékenyek a DON-ra, mint más gazdasági állatfajok. A „first pass” hatásért különböző gasztrointesztinális mikrobiális enzimek a felelősek, amelyek a toxinok oxidációját, redukcióját vagy hidrolízisét és konjugációját végzik (Rotter, 1996). Ennek eredménye az alacsony mértékű felszívódás, illetve akkumuláció a szövetekben (Prelusky et al., 1986).

A fumonizinek szerkezetileg különböznek a legtöbb mikotoxintól, alacsony mértékű a bélcsatornából történő felszívódás és gyors plazma elimináció jellemző rájuk, továbbá nem választódnak ki a tejjel. Brojlercsirkékkel és pulykákkal végzett kutatások azonban kimutatták, hogy felhalmozódhat a szövetekben, főképp a májban (Laurain et al., 2021; Tardieu et al., 2021). Tíz napon keresztül 45 mg FB1/kg takarmány terhelést követően sertések májában a FB1 még 10 nappal a toxinéxpozíció befejezése után is kimutatható volt (Fodor et al., 2008). A FB1 metabolitjai megtalálhatóak a bélsárban, de az epében nem, ezért azt feltételezik, hogy a FB1 részben a vastagbélben metabolizálódik bakteriális enzimek által (Shephard et al., 1995). Így például a sertések bélbaktériumai a FB1-et annak hidrolizált metabolitjaivá (hidrolizált FB1, aminopentol) alakítják. A legvalószínűbb metabolikus folyamat egy propán-1,2,3-trikarbonsav oldallánc eltávolítása, amellyel részben hidrolizált forma jön létre. *In vitro* vizsgálatok szerint a hidrolizált FB1 toxicitása az eredeti molekulához hasonló (Caloni et al., 2002). Kis mennyiségben aminopentol is keletkezhet a trikarbalilsav oldalláncok eltávolításával, amely hidrofób molekula, így hatékonyan felszívódik (Fodor et al., 2007). Patkányokkal végzett kísérletek kimutatták, hogy ez a metabolit mérgezőbb hatású, mint az alapvegyület (Hendrich et al., 1993). A ceramid-szintáz enzim az acilezés folyamatában vehet részt, illetve a palmitoil-CoA jelenlétében az aminopentol is acilálódik, és N-palmitoil-aminopentol keletkezik, amely a ceramid-szintáz erősebb inhibitora (Humpf et al., 1998). Így, ha a FB1 hatékonyan metabolizálódik aminopentollá, a fenti útvonal aktiválódik. A bélhámsejtekben a trikarbalilsav oldalláncokat elvesztő aminopentol biológiailag jobban hozzáférhető, mint a FB1, emiatt kockázatértékelésében a FB1 metabolitjai is relevánsak (Caloni et al., 2002).

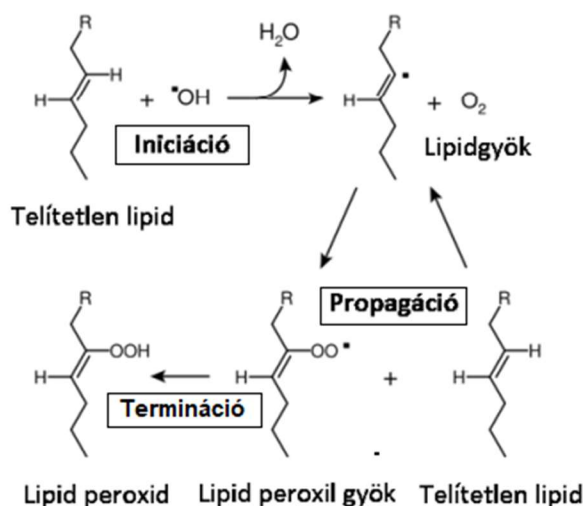
3.5 Az oxidatív stressz kialakulása és molekuláris jellemzői

A bioszférában a legfontosabb elektronakceptor a molekuláris oxigén, amely könnyen befogadja a párosítatlan elektronokat. Ha az oxigén redukciója nem teljes, akkor részlegesen redukált gyökök alakulnak ki, amelyeket összefoglaló néven reaktív oxigén intermediereknek (ROI) vagy reaktív oxigén gyököknek (ROS) neveznek. Ide tartozik a szuperoxid anion gyök ($O_2^{\cdot -}$), a hidrodioxil (HO_2^{\cdot}) és a hidroxil gyök (OH^{\cdot}), valamint az alkilperoxil (ROO^{\cdot}) és az alkoxil (RO^{\cdot}) gyök. Ezen gyökök részt vehetnek

a szabadgyökös láncreakciók megindításában és továbbterjedésében, ennek révén potenciálisan károsíthatják a sejteket (Riley, 1994). A ROS keletkezhet egyrészt külső, exogén tényezők hatására, mint például a magas hőmérséklet, az ionizáló-, vagy UV-sugárzás, illetve különböző xenobiotikumok expozíciójának eredményeként, továbbá egyes élettani folyamatok során, mint például a mitokondriális légzési lánc és bizonyos enzimek (xantin-oxidáz, ciklooxygenázok, CYP 450, lipoxigenázok) fiziológias működése során (Halliwell, 1991). Emellett termelődhetnek az immunrendszer működése során is a polimorfonukleáris granulociták „oxidative burst” mechanizmusa révén (Gougerot-Pocidalo et al., 2002). Fiziológias körülmények között fontos szerepet töltenek be egyes jelátviteli útvonalakban, a sejtszintű folyamatok szabályozásában, az apoptózis és a nekrozis indukciójában (Bolisetty & Jaimes, 2013). Az evolúció során különböző mechanizmusok alakultak ki a ROS fiziológias szinten tartásához és mennyiségének szabályozásához, részben kompartmentációval, részben antioxidáns védekezéssel. Utóbbiak közül például stabil szabadgyököket képző, a lipidperoxidáció láncreakció kiteljesedését gátló antioxidáns vegyületekkel (pl. aszkorbát, α -tokoferol), valamint enzimrendszerekkel (pl. szuperoxid-dizmutáz, kataláz, peroxidázok, tioredoxin reduktáz), amelyek csökkentik a képződő ROS intracelluláris koncentrációját. A szervezet antioxidáns védekező képességét meghaladó mennyiségű ROS termelése ugyanakkor oxidatív stresszt eredményez, és az ebből eredő szövetkárosodás szerepet játszhat bizonyos betegségek kialakulásában (Riley, 1994). A ROS vegyületek kémiaiilag reaktívak, emiatt a szervezet makromolekuláit (DNS, RNS, fehérjék, lipidek) károsíthatják (Goetz & Luch, 2008). A sejt és a sejtorganellum membránokat alkotó foszfolipid kettősrétegben nagy mennyiségben megtalálható többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) kiemelten érzékenyek az oxidatív károsodásokra. Ennek eredményeként a biológiai membránok elvesztik fluiditásukat, integritásukat és megnő permeabilitásuk (Richard et al., 2008). A reaktív oxigéngyökök károsíthatják a DNS szerkezetét: egy vagy kettős száltörést, a bázisok módosulását, a dezoxiribóz módosulását, valamint DNS-fehérje keresztkötések kialakulását eredményezheti. A lipidek peroxidatív károsodásának eredményeként létrejövő metabolitok (pl. MDA vagy 4-hidroxi-2-nonenál) hatására DNS adduktok jöhetnek létre, amely pontmutációk kialakulásához vezethetnek (Halliwell, 1999). Az RNS molekula sérülése pedig hatással lehet az RNS lánc integritására, emiatt a fehérjeszintézisre és így a sejtek működésére is (Martinet et al., 2004). A reaktív oxigéngyökökkel való közvetlen reakció, vagy az oxidatív stressz hatására kialakuló másodlagos melléktermékekkel (pl. MDA) való indirekt reakció során oxidálódhatnak a fehérje-összetevők. Így például az aminosav oldalláncok vagy a fehérje váz, amely konformációs változásokat indukálhat, ennek révén a fehérjék denaturációját és aggregációját okozhatja. Ez a folyamat végül hozzájárul a szövetek gyulladásához és a sejthalálhoz (Goetz & Luch, 2008). A ROS gátolja egyes enzimek működését az aminosavak, főképp a szulfhidril csoporttal rendelkező cisztein és metionin, oxidációjával. A fehérjék oxidatív károsodása következtében megváltoznak azok fizikai és kémiai tulajdonságai, ebbe beleértve az oldhatóságot, a proteolízisre való hajlamot, továbbá az enzimaktivitást (Stadtman, 1990).

3.5.1 Lipidperoxidációs folyamatok

A ROS által előidézett sejtkárosodás függ a ROS képződésének helyétől. Mivel a kompartmentalizáció kulcsfontosságú a sejtek életképességéhez, a membránszerkezet károsodása általában sejthalál (nekrózis vagy apoptózis) indukciót idéz elő. A membránfunkció oxidatív károsodása történhet közvetlenül a lipidekben található többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációján keresztül, közvetve a lipidszintézis gátlásán, vagy a lipázok aktiválásán keresztül. Miután a szubcelluláris membránok nagy mennyiségben tartalmaznak többszörösen telítetlen zsírsavakat, a membránokon belüli reaktív gyökök képződése számos zsírsav peroxidációját eredményezheti (Goetz & Luch, 2008). Az lipidperoxidáció folyamata három szakaszra osztható (5. ábra). Kezdeti lépésként a többszörösen telítetlen zsírsavakról a ROS elektront von el (iniciáció), így a kettős kötések átrendeződnek, amelynek során konjugált diének (CD) és konjugált triének (CT) jönnek létre. A keletkező lipid szabadgyökök, amelyek a szomszédos kettős kötésekről vonnak el elektronokat, peroxidatív láncreakciót indítanak el, a telítetlen kettőskötések felbomlanak és oxidálódnak (propagáció). A folyamatot a terminációs fázis zárja, melynek során a zsírsavak feldarabolódnak és metastabil végtermékek (pl. malondialdehid, 4-hidroxi-2-nonenál) keletkeznek (Halliwell & Chirico, 1993).

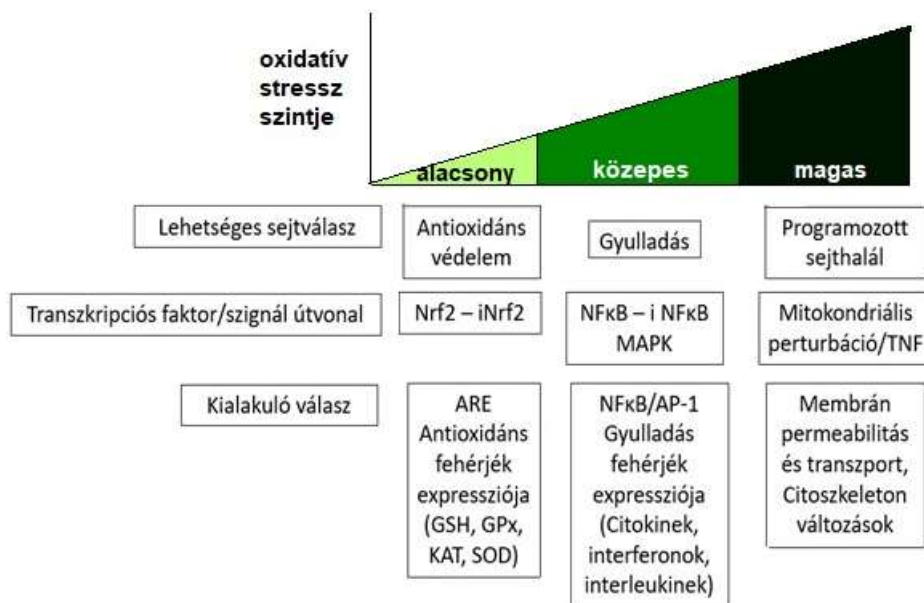


5. ábra: A lipidperoxidáció folyamata: 1. iniciáció, 2. propagáció, 3. termináció (Young & McEneny, 2007)

Amennyiben például a GSH-függő glutation-peroxidázok (GPx) nem redukálják a keletkező szabadgyököket, akkor átmenetifém-ionok (pl. vas-ionok) jelenlétében a lipid-hidroperoxidok (LOOH) tovább bomlanak alkoxil, alkil, vagy hidroxilgyökké, amelynek révén további szabadgyökös láncreakció indul el (Gardner, 1989). A keletkezett peroxil és alkoxil gyökök, aldehidek (malondialdehid) és más termékek károsítják a fehérjéket, például malondialdehid-acetaldehid addukt képződésével, amely immunogén és gyulladáskeltő hatással bír (Tuma, 2002). A mitokondriumban a szabadgyökök a mátrix enzimeket és az elektrontranszportlánc tagjait is károsíthatják (Vladimirov et al., 1980). A lipidperoxidáció ezek mellett csökkenti a membránok fluiditását, károsítja a specifikus membráncsatornákat és inaktíválja a membránhoz kötött enzimeket (Halliwell & Chirico, 1993).

3.5.2 Hierarchikus oxidatív stressz modell

Az oxidatív stressz hatásai a keletkező reaktív gyökök mennyiségétől függenek, a szervezet ugyanis képes leküzdeni az alacsony mértékű oxidatív terhelést, viszont mérsékelt oxidatív terhelés hatására már apoptózis vagy nekrozis is indukálódhat a sejtekben. Az eltérő mértékű oxidatív stressz hatására bekövetkező sejt szintű változások során a különböző útvonalakat aktiváló transzkripciós faktorokat a „hierarchikus oxidatív stressz modell”-ben foglalták össze (Gloire et al., 2006) (6. ábra).

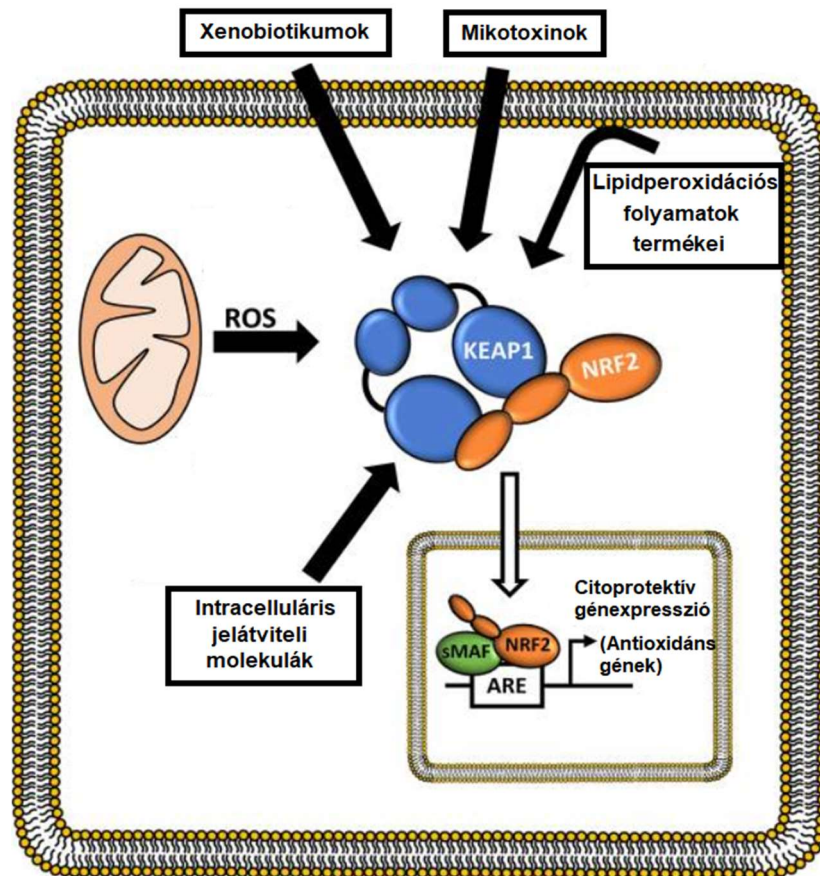


6. ábra: Hierarchikus oxidatív stressz modell Az oxidatív stressz mértékétől függően, a ROS képződés hatására a sejtben különböző redox-érzékeny transzkripciós útvonala aktiválódhatnak molekuláris és fehérje szinten. (Gloire et al., 2006 nyomán)

3.5.2.1. Alacsony mértékű oxidatív stressz által kiváltott sejt szintű válaszreakciók

Az alacsony mértékű oxidatív stresszre bekövetkező elsődleges indukálható védekezés a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) - *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2) - Antioxidáns válaszelem (ARE) útvonala, amely sejtvédelmi funkciókat ellátó fehérjéket, enzimeket kódoló gének expresszióját váltja ki (Halliwell & Gutteridge 1985). Homeosztatisz körülmények között az Nrf2, amely az oxidatív stresszválasz szabályozásáért felelős transzkripciós faktor, a Keap1 represszor fehérjéhez kötött formában van jelen majd ubiquitinációt követően a 26S proteasómában lebomlik, elkerülve ezzel a célgénnek szükségtelen mértékű folyamatos expresszióját. Oxidatív stressz, azaz a sejtek redox állapotának megváltozása, hatására, amit a Keap1-en belüli szenzor-cisztein érzékel, az Nrf2 és Keap1 közötti kapcsolat felbomlik, ezzel az Nrf2 elkerüli az ubiquitinációt, felhalmozódik a sejtben és foszforilációt követően bejut a sejtmagba, ahol összekapcsolódik egy sMaf (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) fehérjével, amely megkönnyíti az ARE-hoz való kötődést és elősegíti a stresszválaszban részt vevő gének expresszióját (7. ábra). Ezek a gének olyan fehérjéket kódolnak, amely közvetlenül vagy közvetve részt vesznek az antioxidáns védekezésben, a detoxifikációban és a metabolizációban. Így például aktiválja a

glutation bioszintézisért felelős és a reaktív oxigén gyökök detoxifikációjában résztvevő enzimek (pl. glutation-peroxidázok, glutation-S-transzferázok, glutation-reduktáz), valamint a tioredoxin antioxidáns rendszer enzimjeinek (pl. szulfiredoxin, glutaredoxin) expresszióját. Emellett fontos szerepe van a xenobiotikum-metabolizáló enzimek, valamint a hidrogén donor funkciót ellátó NADPH képződéshez szükséges enzimek expressziójának szabályozásában (Baird & Yamamoto, 2020).



7. ábra: Keap1-Nrf2 útvonal a celluláris stresszek széles skáláját érzékeli és továbbítja a citoprotektív Antioxidáns válaszselem (ARE) számára és az antioxidáns védelmi rendszerben résztvevő gének expresszióját indukálja. Az endogén és exogén stresszmolekulák képesek közvetlenül kötődni a Keap1-en belüli reaktív cisztein-csoportokhoz, ami az Nrf2 stabilizálódását és citoprotektív transzkripciós folyamatok fokozódását eredményezi (Baird & Yamamoto, 2020 nyomán).

Az Nrf2 szerepét az oxidatív stresszválasz kiváltásában az Nrf2-KO egerekkel végzett vizsgálat igazolta, amelyben ezek az állatok fokozott érzékenységet mutattak a toxikus vegyületekre és szignifikáns mértékben csökkent az oxidatív stresszválasz vad típusú egerekhez képest (Aoki et al., 2001; Ramos-Gomez et al., 2001). Keap1-KO egerekkel végzett kísérlet pedig bebizonyította, hogy Keap1 hiányában mind az Nrf2, mind a stresszválasz célgének konstitutívan aktiválódtak, ami meggyőzően mutatta, hogy a Keap1 felelős az oxidatív stresszválasz szabályozásáért (Wakabayashi et al., 2003).

Az Nrf2 viszonylag instabil fehérje, ami arra utal, hogy hatása további szabályozási útvonalakon keresztül is megvalósulhat. A sejtmagban való túlzott mértékű felhalmozódását a proteoszómák gátolják, amelyek ubikvitinációt követően lebontják (McMahon et al., 2004). Ez a Keap1-független Nrf2 szabályozás citoplazmatikus és nukleáris egyaránt lehet (He et al., 2020). Az Nrf2 transzkripcióját egyéb útvonalak is

befolyásolhatják, így például az *Nrf2* gén promóter régiójában található egy ARE szekvencia, amelynek következtében az *Nrf2* autoregulálja saját expresszióját, amely az Nrf2 perzisztens nukleáris felhalmozódásához vezet (Kwak et al., 2002). Az *Nrf2* gén transzkripcióját az aril-szénhidrogén receptor (AhR) is modulálja, amely részt vesz a xenobiotikum-metabolizáló enzimek szabályozásában, ezzel elősegítve a hatékonyabb xenobiotikum transzformációt (Miao et al., 2005). Úgy gondolják továbbá, hogy az *Nrf2* génexpressziója epigenetikai szinten is szabályozott (DNS-metiláció, hiszton módosítások) (Cheng et al., 2016).

Mikotoxinok hatása a Keap1-Nrf2 útvonalon keresztül

A mikotoxinok által előidézett toxikózisokkal kapcsolatos vizsgálatok szerint vagy az Nrf2-ARE útvonal aktiválása, vagy ennek az útvonalnak a gátlása lehet az egyik fő oka a mikotoxinok toxicitásának emberben és állatokban (Huang et al., 2020). A mikotoxinok szabadgyök képző tulajdonságuk révén aktiválhatják a Nrf2-ARE útvonalat, amelynek következtében fokozódik az antioxidáns enzimeket kódoló gének expressziója, így az antioxidáns fehérjék szintézise. A mikotoxinok ugyanakkor különböző mechanizmusokon keresztül gátolhatják is ezt az útvonalat, amely rontja a sejt oxidatív stresszre adott válaszát, így például a védelmi útvonalak is gátlódhatnak. A T-2 toxin hatása az *Nrf2* expressziójára a dózistól és a kezelési időtől függően eltérő. Alacsony dózisban és rövid ideig alkalmazott T-2 toxin terhelés emlőssejtekben, így pl. patkány agyalapi mirigyből izolált GH3 sejtekben *in vitro* a protein kináz-A (PKA) jelátviteli útvonal fokozott működését eredményezte, amely indukálta az PKA-Nrf2 útvonalat. Ennek hatására szignifikáns mértékben nőtt a SOD, a glutation-peroxidáz 1 (GPx-1) és a kataláz (CAT) aktivitása, valamint az ezeket kódoló és más antioxidáns gének expressziója is (Deyu et al., 2018). Nagyobb dózisban és hosszabb expozíció során viszont T-2 toxin hatására az Nrf2 útvonal gátlását figyelték meg egér neuroblasztóma (N2a) sejtekben, ami oxidatív stresszt, mitokondriális diszfunkciót és a p53 útvonal aktiválásával apoptózist indukált (Zhang et al. 2018). A DON hatása *in vitro* emberi bőrből spontán transzformált aneuploid, keratinocita HaCaT sejtekben az *Nrf2* expressziója az expozíció idejétől függött, 6 és 12 órás kezelést követően nőtt, míg 24 óra elteltével már csökkent és a p35-től független apoptotikus szignálok aktiválódtak. A DON emellett oxidatív stresszt idézett elő, amit az antioxidáns enzimek aktivitásának növekedése, a GSH koncentráció csökkenése, valamint az MDA- és a fehérje-karbonil-szintek emelkedése bizonyított (Mishra et al., 2016). A DON-nal szennyezett takarmány fogyasztása sertésekben a bélhámsejtekben indukált oxidatív stresszt, ennek hatására pedig aktiválódtak az Nrf2 és NF- κ B jelátviteli útvonalak (Zha et al., 2020). A DON hatására az Nrf2 jelátviteli útvonal aktiválódását, az antioxidánsok szintjének csökkenését és oxidatív károsodást figyelték meg fiatal amur bélhámsejtekben (Huang et al. 2018). A DON által kiváltott oxidatív stresszre, annak mértékétől függően, az Nrf2 és az NF- κ B útvonalak aktiválódnak, ami arra utal, hogy a sejtek így védekeznek a mikotoxin által kiváltott károsodások ellen (Del Regno et al., 2015). A fumonizin B1 szintén oxidatív stresszt előidézve aktiválja az Nrf2-ARE antioxidáns útvonalat. Egereket 5 mg FB1/kg takarmány terhelésnek tettek ki 21 és 42 napig. A hereszövetben a kezelési idő növekedésével több apoptotikusan elhalt sejtet, továbbá megnövekedett mennyiségű gyulladásozó faktorokat mutattak ki

(NF- κ B, TNF- α). Az *Nrf2* expressziója a kezelési idő növekedésével emelkedett, ezzel indukálva az antioxidáns enzimek szintézisét. A FB1 tehát ROS termelődést indukál, amelynek révén hatással van az antioxidáns enzimekre és a gyulladáshoz vezető mediátorokra. Ezek mellett apoptózist is indukálhat, befolyásolhatja a sejtek képződését és gátolhatja a sejtfejlődést (Ouyang et al., 2022). Pontyokkal végzett kísérletben az 1,96 mg/kg takarmány FB1 egyszeri orális kezelést követően a ROS szignifikáns emelkedését idézte elő a májban, amely 16 óra elteltével aktiválta a glutation redox rendszert. A *Keap1* és az *Nrf2* génexpressziója viszont nem növekedett, ami arra utal, hogy az antioxidáns védelem aktiválása valamely Keap1-Nrf2 független útvonalon valósult meg (Kövesi et al., 2020).

3.5.2.2. Közepes és nagymértékű oxidatív stressz által kiváltott sejt szintű válaszreakciók

A megnövekedett mennyiségű ROS, amelyet az antioxidáns rendszer már nem képes eliminálni, gyulladáshoz vezető folyamatot indít el az NF- κ B aktiválása révén. A gyulladás a szervezet nemspecifikus védekező reakciója a kórokozók vagy toxikus anyagokkal szemben (Gloire et al., 2006). A gyulladáshoz vezető folyamat magában foglalja az immunsejtek aktiválását, ami számos gyulladáshoz vezető citokin felszabadulásához vezet, mint például a TNF- α , IFN- γ és IL- α , amelyek arra készítik a szervezetet, hogy csökkentse a sejtek károsodását és helyreállítsa a sérült szöveteket. A citokinek két hatása közötti egyensúly határozza meg a gyulladás irányát. A korai gyulladáshoz vezető reakciókban a gyulladást elősegítő faktorok, mint például az IL-1 β , IFN- γ és TNF- α elősegítik a gyulladáshoz vezető választ, míg a gyulladásgátló faktorok, például az IL-4 és IL-10 gátolják azt (Neurath 2014).

Nagyobb mértékű oxidatív stressz a mitokondriális membrán pórusok perturbációját és az elektrontranszfer megzavarását idézi elő, ami sejthalált okoz nem fiziológiás (nekrózis) vagy szabályozott (apoptózis) útvonalon keresztül. Azok a mechanizmusok, amelyek révén a ROS apoptózist okoz, jellemzően a receptor aktiváció, a kaszpáz aktiválás és a mitokondriális diszfunkció (Ryter et al., 2007). Amennyiben a sejteket olyan mértékű oxidatív károsodás éri, amelynek hatására a fehérjék nagymértékben denaturálódnak, a membránalkotó többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek is jelentősen károsodnak és nekrosis alakul ki. Ennek következtében a sejttartalom az extracelluláris mátrixba jut, ami gyulladáshoz vezető folyamatok kialakulásához vezet (Tan et al., 1998).

3.6 Antioxidáns védelmi rendszer

A ROS létrejöttét és káros hatásait az antioxidáns védelmi rendszer próbálja kiküszöbölni. Oxidatív stresszről akkor beszélhetünk, ha felborul az egyensúly a védelmi rendszer és a ROS keletkezése között, ami a szabadgyökök felgyülemléséhez vezet. Ezt több tényező is előidézheti, pl. az antioxidáns enzimeket kódoló gének mutációja, gyulladáshoz vezető folyamatok vagy a ROS túlzott mértékű képződése, a ROS-t generáló anyagok túlzott jelenléte vagy a mitokondriális légzési lánc aktivitásának nagyarányú fokozódása (Espinosa-Diez et al., 2015). Az antioxidáns védelmi rendszer működését transzkripciós faktorok szabályozzák. Amint arra korábban már utaltam az Nrf2-nek jelentős szerepe van az oxidatív stresszre adott adaptív válaszokban, mivel

részt vesz az antioxidáns enzimek, fehérjék expressziójának indukciójában (Surai & Fisinin, 2016). A magasabb rendű szervezetekben a biológiai antioxidáns védelmi rendszert enzimatis és nem-enzimatis alkotókra oszthatjuk.

3.6.1 Enzimatis védelem

Ide tartoznak az antioxidáns enzimek, így a szuperoxid-dizmutázok (SOD), a kataláz (CAT), a glutation-S-transzferázok (GST), a glutation-peroxidázok (GPx) és a tioredoxin-reduktázok (Trx). Az antioxidáns enzimek a reaktív oxigéngyököket általában redukív reakciók katalizálásával semlegesítik (Jeeva et al., 2015). A szuperoxid anion semlegesítését a mitokondriumokban és a mikroszómákban a SOD2 végzi. A CAT részben a mitokondriumokban, részben a peroxiszómákban bontja a H_2O_2 -ot (Chance et al., 1979). A GPx enzimek szintén fontos szerepet játszanak a sejt ROS elleni védelmében, különösen a citoszolban és a mitokondriumokban, mert a SOD1 és a SOD2 hatására keletkező H_2O_2 -t és a szerves hidroperoxidokat vízzé alakítják, amelyhez hidrogén donorként GSH-t használnak fel (Imai & Nakagawa, 2003). A tioredoxin reduktázok fontos intracelluláris redox szabályozó enzimek, mert szerepet játszanak a redox-érzékeny transzkripciós faktorok szabályozásában, oxidatív stressz jelenlétében aktiválva azokat (Calabrese et al., 2009). A glutation S-transzferázok hasonló aktivitással rendelkeznek, mint a glutation-peroxidázok, de elsősorban a szerves hidroperoxidok redukcióját katalizálják GSH ko-szubsztrát felhasználásával. Ennek különösen szelénhiányos állapotokban van jelentősége, amikor részben helyettesíthetik a szelénfüggő GPx izoenzimeket (Rahman, 2007). Kismértékű oxidatív stressz esetén a glutation redox rendszer, nagymértékű oxidatív stressz esetén pedig különböző javító molekulák és enzimek (pl. DNS javító enzimek, hősokk fehérjék, glutation-reduktáz, lipázok, peptidázok) nyújtanak védelmet. A javító molekulák és enzimek az oxidálódott antioxidánsok redukcióját, továbbá a makromolekulák károsodott szakaszainak kivágását és helyreállítását, fehérjék esetében pedig azok lebontását végzik (Matés et al., 2000).

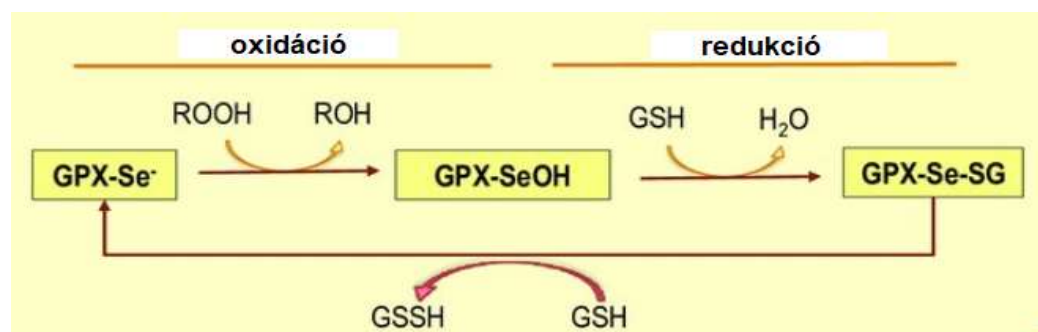
3.6.1.1. Glutacion-peroxidáz enzim család

A glutacion-peroxidáz (GPx) egy olyan enzimcsoport, amely jelen ismereteink szerint 8 izoenzimből áll. Ezek közül öt szelenoprotein, amelyek aktív centrumában szelenocisztein található (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 és GPx6). A másik három GPx enzim (GPx5, GPx7 és GPx8) aktív centrumában a szelenocisztein helyett cisztein található (Labunskyy et al., 2014). A GPx enzimek az antioxidáns rendszer fontos tagjai, mert a különböző izoenzimek a sejten belül eltérő kompartmentekben fordulnak elő. A GPx1 főként a citoszolban és a mitokondriumban található (Rotruck et al., 1973), míg a GPx2 főképp a vékonybél epithel sejtekben expresszálódik (Chu & Esworthy, 1995). A GPx3 egy szekretált enzim, amely a vérplazmában és az extracelluláris térben található meg. Expressziója a tüdőben és a vese tubulusokban kifejezett (Avissar et al., 1994).

A család többi tagjától eltérően a GPx4 foszfolipid-hidroperoxid glutacion-peroxidáz (phGPx), amely hidroperoxidázként működhet a lipid-peroxidok lipidalkoholokká történő redukálásában, ezzel csökkentve a lipidperoxidáció terjedését a membránon

belül (Forcina & Dixon, 2019). Hatása abban a tekintetben egyedülálló, hogy redukálja az összetett lipid-peroxidokat, így például a foszfolipid-hidroperoxidokat, még abban az esetben is, ha azok strukturált lipid-fehérje komplexekben, például lipoproteinekben vagy membránokban található. A membrán foszfolipidek esetében a GPx4 hatása abban az esetben is érvényesül, ha a foszfolipid hidroperoxidokat a membránfoszfolipáz A2 előzetesen nem hasítja ki a foszfolipid kettősrétegből (Imai & Nakagawa, 2003). Három különböző izoformája van, a citoszol (cGPx4), a mitokondriális (mGPx4) és a spermium nukleusz (nGPx4) izoenzim (Ursini, 1985). Utóbbi szerepe nem antioxidáns hatás, mert a spermium érési folyamatában vesz részt (Behne et al., 2002). Ezek a GPx4 izoformák ugyan hasonlóak, de N-terminális szekvenciájukban jelentős eltérések vannak. Eltérően a többi tetramer GPx-től a GPx4 monomer enzim. Más glutation-peroxidázokkal ellentétben a GPx4 a H₂O₂-t mellett redukálja a koleszterin- és koleszteril-észter-származékokat, valamint a timin-hidroperoxidot is (Forcina & Dixon, 2019).

A GPx izoenzimek katalitikus ciklusa két szakaszban megy végbe egy ún. ping-pong mechanizmussal, amikor az enzim aktív centruma az oxidált és redukált állapot között ingázik. Oxidatív fázisban valamely peroxidot redukálnak az aktív centrumban lévő szelenociszteinnel vagy ciszteinnel, amely egyidejűleg oxidálódik. A szeléntartalmú GPx-ek esetében az aktív centrumban lévő szelenolátot a hidroperoxid oxidálja és szelénsav-származék (GPx-SeOH) képződik. Az oxidálódott szelén teljes redukciója két egymást követő lépésben megy végbe; az elsőhöz GSH-re van szükség, amely glutationilezett enzimet, azaz szelenodiszulfidot eredményez. A redukációs lépésben egy második GSH-molekulával képez stabil végterméket, a glutation-diszulfidot, amely felszabadítja a redukált szelént a következő ciklusra. Megfigyelték, hogy a GPx4 hidroperoxidok redukáló kapacitása mind a szabad állapotú hidroperoxidok, mind a membránfoszfolipidekhez kötött hidroperoxidok esetében kimutatható (Imai & Nakagawa, 2003). A GPx4 ezen képessége egy nagy hidrofób felület jelenlétének köszönhető, amely szoros kapcsolatot tesz lehetővé a lipoproteinektől a membránokig terjedő strukturált lipid-protein szerkezetekkel (8. ábra) (Forcina & Dixon, 2019).

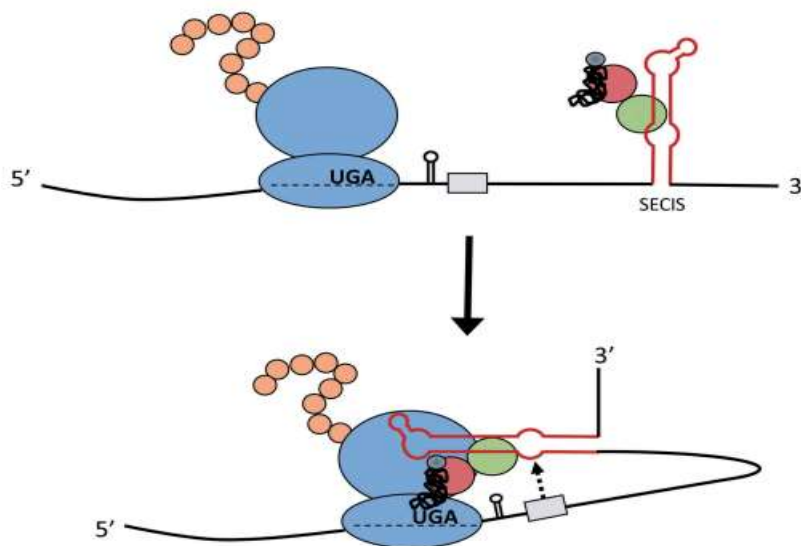


8. ábra: A GPx4 katalitikus ciklusa. A teljes folyamat két fázisból áll: oxidáció és redukció, melyeket a szelénsav intermedier (GPx-SeOH) köt össze, ami a glutation (GSH) rovására redukálódik. (Díaz et al., 2021).

A GPx5 mellékhere-specifikus enzim, amely a mellékherében és a szeminális plazmában található (Williams et al., 1998). A GPx6 csak a szaglóhamban és az

embrionális fejlődés során az őssejtekben található meg. Érdekes módon emberben szelenoprotein, rágsálókban és más fajokban viszont cisztein tartalmú (Kryukov et al., 2003). Az utolsó két GPx enzim (GPx7 és GPx8) a szelenocisztein helyett ciszteint tartalmaz aktív centrumában. A GPx7-et először emlőmirigy tumor sejtekből izolálták (Utomo et al., 2004), míg a GPx8-at eddig csak filogenetikai elemzésben azonosították (Toppo et al., 2008).

A glutation redox rendszer megfelelő működéséhez fontos a szelenocisztein (SeCys) elérhetősége, ami a szelén ellátottságtól, azaz az enzim bioszintézise során a hozzáférhető szelén koncentrációtól függ. Kimutatták, hogy szelénhiány esetén a GPx1 szintje egerek szívében, májában és veséjében jelentősen csökken. Ezzel szemben a szelén pótlása a GPx1 aktivitás növekedéséhez vezet. A szelenocisztein a ciszteinhez hasonló aminosav, de a specifikus szulfhidril csoportban kén helyett szelént tartalmaz. A szelenoprotein szintézist meghatározott mechanizmusok szabályozzák, amelyek befolyásolják a kódoló gén transzkripcióját, az RNS-feldolgozást, a translációt és a fehérjeszintézis poszttranszlációs lépéseit egyaránt. A szelenoproteinek élettani funkciói emiatt a szelenocisztein jelenlététől függenek, és annak bármely más aminosavra történő mutációja az enzim inaktiválódását eredményezi (Labunskyy et al., 2014). A GPx4 mRNA egy szelenocisztein inszerciós szekvencia (SECIS) elemet tartalmaz, amely a 3' nem transzlált régióban található. A SECIS elemet az UGA kodon kódolja, amely jellemzően stop kodonként funkcionál. Emiatt specifikus szabályozó fehérjékre van szükség ahhoz, hogy a szelenocisztein beépüljön a GPx4-be (és más szelenoproteinekbe) (9. ábra) (Christensen & Burgener, 1992).



9. ábra: Szelenocisztein inszerciós szekvencia (SECIS) elem működése. A 21. aminosav, a szelenociszteinnek a szintetizálódó fehérjélánchoz kapcsolása az UGA stop kodon átkódolásával történik. A szelenoprotein mRNA rendelkezik egy 3' szárhurok szerkezettel (SECIS szekvenciával) amely szükséges a szelenocisztein beépüléséhez (Cockman et al., 2019).

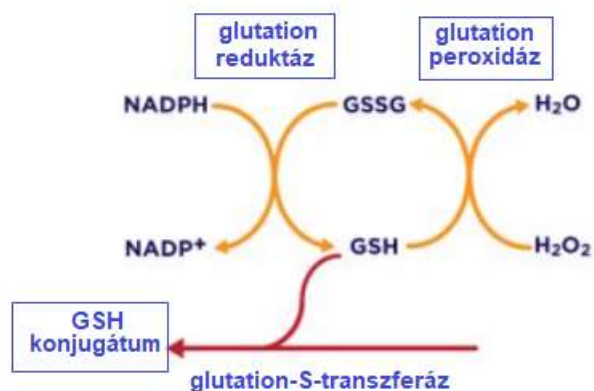
Ebben az UGA transzlációs folyamatban szerepet játszó tényezők közé tartozik az mRNS specifikus másodlagos szerkezete (SECIS), egy egyedi tRNS (Sec-tRNS), egy RNS-kötő fehérje (SBP2) és egy speciális elongációs faktor (EFsec) (Díaz et al., 2021). A GPx4 működését ezek mellett más tényezők is befolyásolják. Rendelkezik például olyan allosztérikus kötőhellyel, amely lehetővé teszi az enzim inaktiválását anélkül, hogy a szelenocisztein aktív helyére kötődne. Ehhez az allosztérikus helyhez kovalensen kötődhetnek különböző inhibitorok, pl. az ólomvegyületek, amelyek ezáltal gátolják a GPx4 működését és annak lebomlását idézi elő (Liu et al., 2022).

3.6.2 Nem enzimatis védelem

Ebbe a csoportba tartoznak a kis molekulatömegű antioxidánsok, így például az aszkorbinsav, a tokoferolok, a húgysav, a karotinoidek, a polifenolok és a redukált glutation (GSH). Ide tartoznak továbbá egyes fémkötő (kelátképző) fehérjék (ferritin, metallothionein, albumin), amelyek szerepe abban van, hogy az átmeneti fémeket (pl. vas és réz), valamint egyéb ROS képződést indukáló fémeket főképp kelát kötésben tartanak, ennek révén megakadályozzák Fenton-típusú reakciók kialakulását (Mirończuk-Chodakowska, et al., 2018). Ezek közül kiemelt jelentőségű a ferritin (Stochs & Bagchi, 1995), valamint a metallothionein (Baird et al., 2006) hatása. A kis molekulatömegű antioxidánsok nukleofil és redukáló molekulák, amelyek képesek megszakítani a szabadgyökök által kiváltott láncreakciót, miközben reaktívvá válnak, de azt követően gyorsan redukálódnak (Mirończuk-Chodakowska, et al., 2018). Az aszkorbinsav intra- és extracelluláris vizes fázisú antioxidáns, amely elsősorban a ROS mennyiségét csökkenti (Njus et al., 2020). A tokoferolok fizikailag kapcsolódnak a membrán foszfolipideihez, ezáltal közvetlenül védik azokat az oxidatív károsodástól. Oxidációt követően tokoferil-kinonná alakulnak, amely kevésbé hidrofób, ezért részben kilép a membránból. A tokoferil-kinont elsősorban az L-aszkorbinsav redukálja, így ismét hidrofób lesz és újra kapcsolódhat a membrán foszfolipideihez (Tokarz et al., 2013).

A GSH egy tripeptid (gamma-L-glutamil-L-ciszteinil-glicin), és az egyik legelterjedtebb antioxidáns molekula, amely megtalálható a citoszolban, a mitokondriumban és az endoplazmatikus retikulumban. A GSH a citoszolban két ATP-függő lépésben szintetizálódik. Az első lépés a glutaminsav és cisztein összekapcsolása a gamma-glutamilcisztein-szintáz enzim által, így gamma-glutamilcisztein keletkezik. Ezt követi a glicin kapcsolódása a gamma-glutamilcisztein C-terminálisához, amit a GSH-szintetáz enzim katalizál. A gamma-glutamilcisztein képződése sebességkorlátozó reakció a GSH szintézisében, és a keletkező GSH is gátolhatja a saját szintézisét a gamma-glutamilcisztein-szintáz gátlásán keresztül, amely ilyen módon a sejt GSH koncentrációjának szabályozásáért, azaz a sejtek redox állapotának fenntartásáért felelős mechanizmusnak is tekinthető. A szintézis további limitáló tényezője a sejtek szabad cisztein tartalma. A GSH rendkívül ellenálló az intracelluláris degradációval szemben, ugyanakkor redukált formája tiol (szulfhidril) csoportot tartalmaz, amely oxidatív stressz esetén oxidálódik (Bounous et al., 2003). A ROS redukcióját követően két oxidált GSH dimerizációja glutation-diszulfidot (GSSG) eredményez, így a GSH/GSSG arány az oxidatív stressz egyik

meghatározójaként is használható. A glutation-diszulfid redukálását a glutation-reduktáz (GSR) végzi, amelynek során hidrogén donorként a NADPH szolgál. A GSH közvetlenül is reagálhat szuperoxid-anionnal és más szabadgyökökkel, de elsősorban az enzimatis antioxiáns rendszerben játsszik szerepet a GPx-ok és a glutation-S-transzferázok (GST) ko-szubsztrátjaként. Különbözö xenobiotikumokat a GST konjugálja a GSH-hoz, így azok nem lépnek reakcióba a sejtalkotókkal (10. ábra) (Zitka et al., 2012).



10. ábra: A glutation redox rendszer A GSH-t oxidálják a szabadgyökök közvetlenül, vagy a glutation-peroxidáz közreműködésével. Az oxidált glutation gyök összekapcsolódik egy másik glutation gyökkel és glutation-diszulfid keletkezik (GSSG). A GSSG redukálását a glutation-reduktáz (GSR) végzi (Arbor Assays, 2016).

A GSH-nak számos más funkciója is van, így például cisztein tartalék, szerepe van a nitrogén-oxid szállításában és tárolásában, részt vesz az ösztrogének, leukotriének és prosztaglandinok metabolizmusában, továbbá redukálja a ribonukleotidokat és dezoxiribonukleotidokat, valamint konjugáló ágens a xenobiotikum transzformációban (Bounous et al., 2003).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 A takarmányok kísérletes mikotoxin szennyezése és mennyiségének meghatározása

A kísérletekben felhasznált a takarmányokat mesterségesen T-2 toxinnal, DON-nal és FB1-gyel szennyeztük. A T-2 toxint a *Fusarium sporotrichioides* (NRRL 3299), a DON-t a *Fusarium graminearum* (NRRL 5883), a FB1-et pedig a *Fusarium verticillioides* (MRC 826) törzssel termeltettük kukoricadara szubsztráton Fodor és mtsai. (2006) módszere szerint. A kísérleti mikotoxinok és metabolitjaik, a T-2/HT-2 toxin (Trebstein et al., 2008), DON, 3-AcDON, 15-AcDON (Premier et al., 2006) és FB1 (Shephard et al., 1990) tartalmának meghatározása fluoreszcens detektorral felszerelt HPLC-vel (Jasco FP-4025, Easton, USA) történt, immunaffinitás előtisztítást követően. Az immunaffinitás előtisztítása kettős extrakciós eljárással, vízzel és metanollal, valamint Myco6in1+® multi-mikotoxin immunaffinitás oszloppal (Vicom, Milford, USA) történt, a gyártó utasítása szerint. A kontroll takarmányban a T-2/HT-2 toxin, a DON/3-AcDON/15-AcDON és a FB1 tartalom a detektálhatósági határérték (LOQ) alatt volt a kontroll takarmányban. Az 2. és a 3. táblázat a kísérletekben használt takarmányok mikotoxin tartalmát mutatja.

2. táblázat: A tojótyúkokkal végzett kísérletekben felhasznált takarmányok mikotoxin tartalma (mg/kg takarmány)

1. Egyéni mikotoxin kísérlet (EU javaslati határérték kétszeres mennyisége)			
Kísérleti csoport	T-2/HT-2	DON/3-AcDON/15-AcDON	FB1
Kontroll	<0,02	<0,02	<0,02
T-2/HT-2 toxinnal kezelt csoport	0,45/0,36	<0,02	<0,02
DON-nal kezelt csoport	<0,02	8,68/0,11/0,05	<0,02
FB1-el kezelt csoport	<0,02	<0,02	38,10
2. Multi-mikotoxin kísérlet: T-2/HT-2 toxin, DON, FB1 (alacsony dózis: EU javaslati határértékkel megegyező mennyiség, közepes dózis: javaslati határérték kétszeres mennyisége)			
Kontroll	<0,02	<0,02	<0,02
Alacsony dózis	0,26/0,36	4,78/0,59/1,55	19,21
Közepes dózis (2x)	0,43/0,31	9,11/0,09/0,06	41,20
3. Multi-mikotoxin kísérlet: T-2/HT-2 toxin és DON (alacsony dózis: EU javaslati határértékkel megegyező mennyiség, közepes dózis: javaslati határérték kétszeres mennyisége)			
Kontroll	<0,02	<0,02	<0,02
Alacsony dózis	0,24/0,10	4,68/1,21/0,36	<0,02
Közepes dózis (2x)	0,41/0,21	9,14/0,04/0,11	<0,02

3. táblázat: A brojlersirkékkel végzett kísérletekben felhasznált takarmányok mikotoxin tartalma (mg/kg takarmány)

1. Multi-mikotoxin kísérlet (alacsony dózis: EU javaslati határértékkel megegyező mennyiség, közepes dózis: javaslati határérték kétszeres mennyisége)			
Kísérleti csoport	T-2/HT-2	DON/3-AcDON/15-AcDON	FB1
Kontroll	<0,02	<0,02	<0,02
Alacsony dózis	0,20/0,03	4,07/0,23/0,55	21,44
Közepes dózis (2x)	0,47/0,15	10,68/0,12/1,25	37,78
2. Emelt dózisú multi-mikotoxin kísérlet (alacsony dózis: EU javaslati határértékkel megegyező mennyiség, magas dózis: javaslati határérték négyszeres mennyisége)			
Kontroll	<0,02	<0,02	<0,02
Alacsony dózis	0,23/0,12	4,56/1,89/0,40	18,59
Magas dózis (4x)	0,78/0,09	18,68/1,05/0,98	75,16

4.2 Kísérleti protokollok

4.2.1 A kísérletek helyszíne

Vizsgálataimat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszékén végeztem. A brojlercsirkékkel és tojótyúkokkal folytatott takarmányozási kísérletek helyszíne a Tanszék Kísérleti Tere volt, amely mikotoxinokkal kapcsolatos vizsgálatokhoz szükséges állatkísérleti engedéllyel rendelkezik (Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerbiztonsági, Földnyilvántartási, Növény és Talajvédelmi, valamint Erdészeti Osztály PE/EA/1964-7/2017).

4.2.2 Kísérleti állatok és tartásuk

Vizsgálataimhoz *in vivo* modellként brojlercsirkét (Cobb 500 kakas, 21 napos életkor) és tojótyúkot (Tetra SL, 49 hetes életkor, átlagos napi tojástermelés $\cong 90\%$) alkalmaztam. A kísérleti csoportokat 4 nappal a mikotoxin terhelés megkezdése előtt alakítottuk ki, amelynek során egyedi mérlegeléssel meghatároztuk az egyes csoportokba kerülő madarak testtömegét, ügyelve arra, hogy az egyes kísérleti csoportok között az átlagos testtömeg ne térjen el 5%-nál nagyobb mértékben. A mikotoxinok egyéni hatásainak vizsgálatokor (n=78) a T-2/HT-2 toxin, DON/2-AcDON/15-AcDON és FB1 mikotoxinokkal mesterségesen szennyezett takarmánnyal etettem az állatokat. A kísérlet 0. napján abszolút kontrollként vettünk mintát (n=6), a kísérleti csoportok pedig a következőképp alakultak: kontroll csoport (n=18) és különböző mikotoxinokkal kezelt 3 db csoport (T-2 toxin: n=18; DON: n=18; FB1: n=18). Az egyes kísérleti csoportokba tartozó madarakat két alcsoportra (n=9) bontva helyeztük el a kísérlet helyszínéül szolgáló teremben. A multi mikotoxin vizsgálatokban (n=60) a három napos akklimatizációs időt követően a kísérlet 0. napján abszolút kontrollként kísérleti csoportonként 2-2 állatból (n=6) mintát vettünk majd 12 órás takarmánymegvonást követően megkezdtük a 3 napos etetési kísérletet egy kontroll (mikotoxin kiegészítést nem tartalmazó, n=18) és két különböző mikotoxin mennyiséggel kiegészített takarmány etetésével (n=36). Az állatokat mélyalmon tartottuk folyamatos megvilágítás mellett. A folyamatos megvilágítás eltér a vonatkozó EU állatjóléti előírásoktól, de a kísérlet során azért alkalmaztam, hogy a kísérleti állatok takarmányfelvételét maximalizáljam a rövid távú etetési időszak alatt. Ivóvizet és takarmányt az állatok *ad libitum* fogyaszthatták. Alomanyagként fenyőfa forgácsot használtam. A brojlercsirkék kokcidiosztatikumot és mikotoxin-kötőanyagot nem tartalmazó nevelő teljes értékű takarmánykeverékének (Vitafort brojler nevelőtáp) energia- és táplálóanyag-tartalma (13,4 MJ/kg AME, 20% nyersfehérje, 10% nyerszsír, 3,5% nyersrost, 35 mg/kg E-vitamin és 0,25 mg/kg szelén) megfelelt a brojlercsirkékre vonatkozó követelményeknek (Magyar Takarmánykódex, 2004). A tojótyúkok kereskedelmi forgalomban kapható kokcidiosztatikumot és mikotoxin kötőanyagot nem tartalmazó tojó teljes értékű takarmánykeveréket fogyasztottak (Vitafort „Arany” tojótáp). Ennek jellemzői: 11,97 MJ/kg AME, 89,20% szárazanyag, 16,10% nyersfehérje, 2,50% nyerszsír, 5,50% nyersrost, 0,79% lizin, 0,38% metionin, 0,71% metionin+cisztein, 4,12% kalcium, 0,48% foszfor és 0,17% nátrium. A kísérletekhez felhasznált takarmányt a

kukoricadara szubsztráton termelt mikotoxinok hozzákeverésével állítottuk elő olyan módon, hogy az ismert mikotoxin tartalmú szubsztrát-penészgomba keveréket az adott kísérleti csoport számára szükséges mennyiségét kevertük a takarmányhoz. Az alacsony dózisu keverékben az alkalmazott mikotoxin koncentrációk az EU javaslati határértéknek feleltek meg (T-2 és HT-2 toxin: 0,25 mg/kg [2013/165/EU ajánlás]; DON: 5 mg/kg [2006/576/EK ajánlás]; FB1: 20 mg/kg [2006/576/EK ajánlás]). Ezek a szennyezettségi értékek a mérsékelt éghajlaton előforduló időszakos szennyeződést tükröznek, míg a közepes és magas dózisu kísérleti csoport takarmánya a gyakorlati szennyezettségi szintnél többet tartalmazott abból a célból, hogy rövid időn belül is jól detektálható változásokat idézhessen elő.

A vizsgálatok ideje alatt rögzítettem az elhullást, valamint mértem a testtömeget, a kísérleti csoportok takarmány fogyasztását, a takarmány visszautasítás mértékének meghatározásához.

4.2.3 Mintavételezés

A kísérlet 0. napján véletlenszerűen 1-1 állatból vettünk mintát minden ismétlésből, a kísérletesen szennyezett takarmányok etetésének kezdetét követően pedig a 24., 48. és 72. órában kezelésként, véletlenszerűen kiválasztott 6-6 egyedből. A mintavételeket megelőzően mértem a madarak élosúlyát. Elvéreztetés során teljes vért gyűjtöttem, majd *post mortem* máj mintát vettem a biokémiai és génexpressziós vizsgálatokhoz. A vérvétel heparint tartalmazó vérvételi csövekbe történt. A vérminták hűtött környezetben (+4 °C) tároltam majd az alakos elemeket 10 percig történő centrifugálással (1500 fordulat/perc) (Mikro 220, Hettich, Kirchlengern, Németország) választottam el a vérplazmától. A vérplazma Eppendorf csövekbe történt kimérését (1000 µl minta/Eppendorf cső) követően a vérelemzke és fehérvérsejt frakció eltávolítását követően a vörsvérsejtekből kétszer desztillált vízzel 1:9 arányú hemolizátumot állítottam elő. A vérplazmát a mérések elvégzéséig -80°C-on tároltam. A biokémiai vizsgálatokhoz a májmintákat lefagyasztásig (kb. 2 óra) jégen tartottam, majd felhasználásig -80 °C-on tároltam. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz vett májmintákat a mintavételt követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztem, majd felhasználásig -80°C-on tároltam.

4.3 Biokémiai vizsgálatok

A biokémiai vizsgálatokhoz a mintákat szobahőmérsékleten felengedtem, majd a májmintákat 1:9 arányú fiziológiás sóoldat (0,65% (w/v) NaCl) hozzáadásával homogenizátumot készítettem. A malondialdehid tartalom meghatározása a natív homogenizátumokból, a glutation redox rendszer markereinek meghatározás pedig a homogenizátumok centrifugálása (10000 g, 3 perc, 4°C) után nyert felülúszóból, azaz a mikroszómális frakcióból történt.

4.3.1 Lipidperoxidációs markerek mérési módszerei

A CD-ek és CT-ek meghatározása a májminták lipid tartalmának 2,2,4-trimetilpentánban való kivonását követően az abszorpciós spektrum (CD: 232 nm; CT: 268

nm) alapján történt (SpectroStar Nano, BMG Labtech, Offenburg, Németország) (AOAC, 1984).

A malondialdehid koncentrációt savanyú közegben, magas hőmérsékleten való komplex képzéssel, 2-tiobarbitursavval (Sigma, St. Louis, USA) határoztam meg. A savas közeg beállításához 10% (w/v) triklór-ecetsavat (Carlo Erba, Rodano, Olaszország) használtam. A reakcióidő 20 perc volt 100°C-on. Lehűtés után, centrifugálást (2500 fordulat/perc, 4°C) követően az abszorbancia mérése a felülúszóból a reagens vakkal szemben 535 nm hullámhosszon történt. A standard 1,1,3,3-tetra-etoxi-propán (Fluka, Buchs, Svájc) volt (Placer et al., 1966, Matkovics et al., 1988).

4.3.2 A glutation redox rendszer markereinek mérési módszerei

4.3.2.1 A redukált glutation koncentráció meghatározása

A minták redukált glutation koncentrációjának meghatározását Sedlak és Lindsay (1968) módszerével végeztem. A módszer alapja a glutation szabad SH- csoportjának szulfhidril-reaktív vegyülettel való színes komplexképző reakciója. A minták fehérje tartalmát 10% (w/v) triklór ecetsavval (Carlo Erba, Rodano, Olaszország) kicsaptam, majd centrifugálást követően (10.000 g, 3 perc, 4°C) a felülúszóból végeztem a méréseket. A módszer előnye, hogy a fehérje kicsapása miatt a fehérje eredetű SH-csoportok zavaró hatása a minimumra csökkenthető. A reakcióban szulfhidril-reagenseként 5,5-ditiobis-(2-nitro-benzoészav) (Sigma, St. Louis, USA) szolgált, amely a reaktív SH-csoportokkal sárga színű komplexet képez. A GSH koncentráció a komplex fényelnyelésének 412 nm-es hullámhosszán, az abszorbancia mérésével meghatározható. A komplexképződéshez szükséges lúgos közeget trisz-hidroximetilaminometán (Sigma, St. Louis, USA) pufferrel (pH:8,9) állítottam be. A GSH koncentrációt a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtam meg.

4.3.2.2 A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása

A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározásának alapja, hogy a GSH a glutation-peroxidáz enzim hatására glutation-diszulfiddá oxidálódik reaktív oxigéngyökök jelenlétében. A vizsgálati rendszerben (Matkovics et al., 1988) az enzim korszubsztrátjaként GSH-t (Sigma, St. Louis, USA) és kumul-hidroperoxidot (Merck, Darmstadt, Németország) használtam. Az inkubáció 10 perc volt szobahőmérsékleten (25±2 °C), a reakció leállítása fehérjekicsapással történt 10% (w/v) triklór-ecetsavval (Carlo Erba, Rodano, Olaszország). A GSH mennyiségének csökkenését 5,5-ditiobis-(2-nitro-benzoészav) -val (Sigma, St. Louis, USA) képzett komplex fényelnyelésének 412 nm hullámhosszon történt abszorbancia mérésével határoztam meg. Az enzimaktivitást egységben fejeztem ki, amely 1 nmol GSH oxidációját jelenti percenként a használt rendszerben 25 °C-on. Az enzimaktivitást a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtam meg.

4.3.2.3 A fehérjekoncentráció mérése

A GSH koncentrációt és a GPx aktivitást a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtam meg, amelyhez mértem a minták fehérjekoncentrációját. A vérplazma és a

vörösvérsejt hemolizátum minták fehérjetartalmát biuret reakcióval határoztam meg (Weichselbaum, 1946), amelynek alapja, hogy a biuret-reagensben található Cu^{2+} ionok reakcióba lépnek a fehérjék peptidkötéseivel, amely lúgos közegben kék színű komplexet ad, amelynek abszorpciós maximuma 546 nm. A kialakult szín arányos a minták összfehérje koncentrációjával. A szövetminta homogenizátumok 10.000 g felülúszó frakciójának fehérjetartalma Folin-fenol reagensnek (Sigma, St. Louis, USA) fehérjékkel adott színreakciója alapján kerül megállapításra (Lowry et al., 1951). A reakció során Cu^{2+} ionok Cu^+ ionokká redukálódnak, majd a tirozin és a triptofán reziduumok redukálják a Folin-Ciocalteu-reagenst (foszfor-molibdát és foszfor-wolframát), amelynek eredményeként kék színű komplex képződik. A komplex abszorpciós maximuma 750 nm. Standardként a vérplazma és vörösvérsejt hemolizátum minták esetében DunaCAL kalibrációs standard (Diagnosticum, Budapest, Magyarország), míg a szövetminták esetén szarvasmarha szérum albumin (Sigma, St. Louis, USA) szolgált.

4.4 Génexpressziós vizsgálatok

4.4.1 RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR

A kísérleti állatok májából, a jobb lebény *disztális* részéből 6-10 mg mintát vettem, amelynek teljes RNS tartalmát NucleoZOL reagenssel extraháltam (Macherey-Nagel, Düren, Németország) a gyártó előírásai szerint. Ezt követően az RNS-t izopropanollal kicsaptam, 75% (v/v) etanollal mostam majd RN-áz mentes vízben feloldottam. Az RNS tisztítást követően a genomi DNS szennyeződést a gyártói protokoll alapján DNáz I (Thermo Fisher Scientific, San José, USA) segítségével távolítottam el. A DNáz kezelt RNS integritását, koncentrációját és tisztaságát agaróz gélben (1,5 %; w/v) nanofotométer (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, San José, USA) segítségével vizsgáltam. Azokat a mintákat fogadtam el, amelyek OD 260/280 mutatója 2,0 feletti értékeket adott. Az RNS-ből kezelési csoportonként pool-okat hoztam létre, egyedenként azonos mennyiségű RNS-ből (n=6). Ezt követően 1000 ng pool-ozott RNS-ből random nonamerrel (9-mer) reverz transzkripcióval a gyártó protokollja alapján (RevertAID Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, San José, USA) cDNS-t készítettem. A cDNS mintákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam egy éjszakát és a következő napon használtam fel qRT-PCR méréshez. Irodalmi adat (Kendziorski et al., 2003) és korábbi kísérleteink eredményei alapján nem találtunk mérhető különbséget abban az esetben, ha a meghatározást összevont (pool-ozott) és nem egyedi mintákból végeztük.

4.4.2 Real-time PCR

A glutation-peroxidáz 4 (*GPX4*), a glutation-szintetáz (*GSS*), a glutation-reduktáz (*GSR*), az Nrf2 (*Nrf2*) és Keap1 (*Keap1*) célgének, valamint a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*) belső (háztartási) kontroll gén expresszióját real-time PCR-rel, duplex qPCR módszerrel határoztam meg. Belső kontrollgénként azért a *GAPDH* gént választottam, mert annak expressziója irodalmi adatok alapján nem mutat kölcsönhatást az oxidatív stresszel és a mikotoxin expozícióval tyúk fajban (Yang et al., 2016; Awad et al., 2011). A célgénekre és a háztartási génre tervezett specifikus

primerek és eltérő fluoreszcens festékekkel jelölt (MGB- minor groove binder) TaqMan próbák lehetővé tették két géntermék egyidejű vizsgálatát (4. táblázat).

4. táblázat: A próbák szekvenciái és jelölésük

Gén	Próba	Fluoreszcens festék
<i>GAPDH</i>	CCAGCCAAGTATGATGAT	VIC
<i>GPX4</i>	CAGCCCAATGGAG	FAM
<i>GSS</i>	AGGAGGGGAACAACCTG	FAM
<i>GSR</i>	CTGGCACTTCGGCTC	FAM

A primereket és a próbákat a Primer Express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) szoftver segítségével terveztem (5. táblázat). A mérésekhez a Step One Plus™ Real-Time PCR systems (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) készüléket használtam, Maxima Probe qPCR Master Mix felhasználásával (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA), öt ismétlésben. A mérésekhez 12,5 µl végtérfogatban 2,31 µM/l primert és 5 ng cDNS-t használtam templátként. Minden mérés alkalmával, duplexként egy nontemplate kontrollt is beállítottam. A qPCR hőmérsékleti profil a következő volt: a *GPX4*, *GSS*, *GSR* és *Keap1* génekre 95 °C 10 perc elődenaturáció, majd 95°C 15 sec, 58°C 30 sec és 72°C 30 sec, 45 cikluson keresztül ismételve. Az *Nrf2* célgénnek 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 VIC és FAM jelet 72°C-on olvasta le a berendezés minden ciklusban az extenzió-lépésének végén. A Ct értékeket a cél- és kontroll gének esetén is a StepOne™/ StepOnePlus™ (v2.2) szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) határoztam meg és számítottam ki a delta Ct (ΔCt) és a delta-delta Ct értékeket ($-\Delta\Delta Ct$), végül az RQ (relatív kvantifikáció; $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) értékeket (Livak és Schmittgen, 2001).

5. táblázat: A vizsgálat során alkalmazott primer szekvenciák

Gén	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>GAPDH</i>	TGACCTGCCGTCTGGAGAAA	TGTGTATCCTAGGATGCCCTTCAG
<i>GPX4</i>	AGTGCCATCAAGTGGAACTTCAC	TTCAAGGCAGGCCGTCAT
<i>GSS</i>	GTACTCACTGGATGTGGGTGAAGA	CGGCTCGATCTTGTCCATCAG
<i>GSR</i>	CCACCAGAAAGGGGATCTACG	ACAGAGATGGCTTCATCTTCAGTG
<i>Keap1</i>	GCTCTTCGGAAACCCCT	GCCCAAGCCCACTACA
<i>Nrf2</i>	TTCCCGCTGGTTTACCTTAC	CGTTTCTTCTGCTTGTCTTT

4.4.3 Statisztikai értékelés

A kísérleti eredmények statisztikai értékeléséhez a GraphPad Prism 7.0 szoftvert (GraphPad Software, San Diego, USA) használtam. Az eredmények normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel, a variancia homogenitását pedig Bartlett teszttel ellenőriztem. Az átlag és a szórás értékek kiszámítása után egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) végeztem. Az ANOVA értékelés alapján az egyes mintavételi időpontokban az egyes csoportok értékeit paraméterenként hasonlítottam össze. A kísérleti csoportok középértékei között mutatkozó különbségek vizsgálatára a Tukey-féle többszörös összehasonlító post-hoc tesztet használtam ($p < 0,05$). A

dolgozatomban szereplő ábrák és táblázatok esetében a leíró statisztikai adatokat átlag \pm szórás formában adtam meg. A csoportátlagok grafikonokon történő bemutatása során a statisztikailag is igazolható eltéréseket eltérő betűjelöléssel (a, b, c) szemléltettem ($p < 0,05$).

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

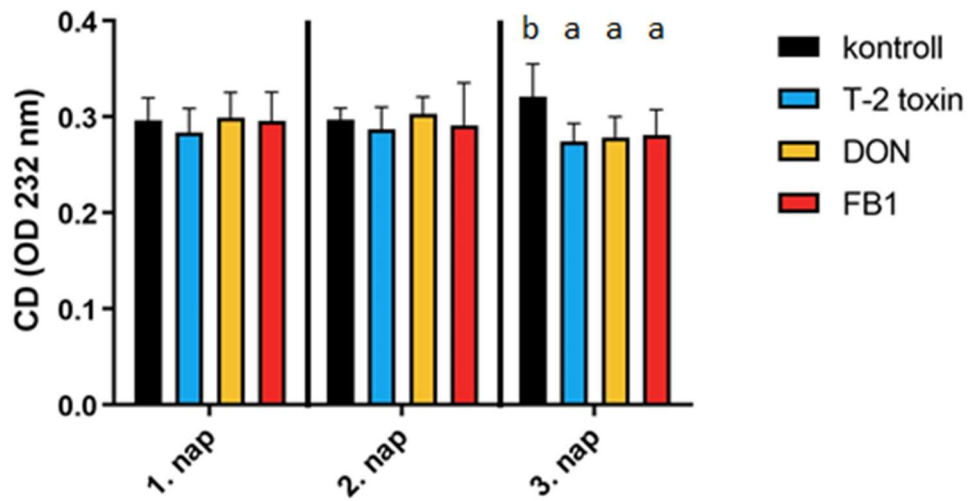
5.1 T-2/HT-2 toxin, DON/2-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 mikotoxinok rövidtávú egyéni hatásainak vizsgálata tojóttyúkban

Természetes körülmények között a takarmányokban általában több mikotoxin együttesen fordul elő, viszont az esetleges kölcsönhatások becsléséhez először ismernünk kell azok egyéni hatásait. Első lépésként ezért az egyes mikotoxinokkal egyéni vizsgálatot végeztem, amelynek során felmértem a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és a FB1 terhelés során a lipidperoxidációs folyamatokat és a glutation redox rendszer változásait. Az *in vivo* rövid távú (3 napos) etetési kísérletben az említett mikotoxinok EU-ban javasolt maximális mennyiségének (2006/576/EK, 2013/165/EU) kétszeresét alkalmaztam annak érdekében, hogy jól mérhető változásokat kapjak. A kezelésekhez felhasznált takarmányok mikotoxin tartalmát a 2. táblázatban tüntettem fel a mesterségesen szennyezett takarmány mikotoxin tartalmának laboratóriumi mérési eredményei alapján. A három napos kísérleti időszak alatt elhullást és takarmányvisszautasítást egyik kísérleti csoport között sem tapasztaltam.

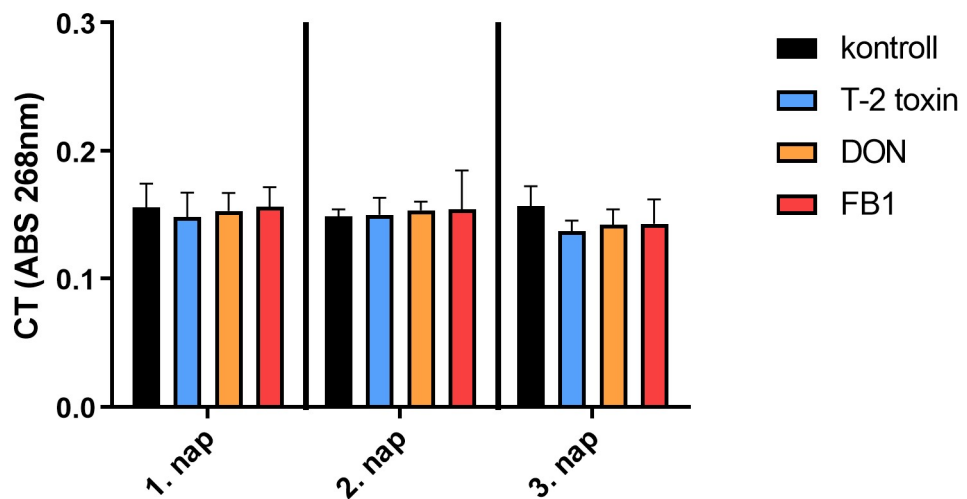
5.1.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban

A rövidtávú három napos kísérletben a tojóttyúkok májában a CD mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt mindhárom vizsgált mikotoxinnal kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest a 3. kísérleti napra (11. ábra). A CT mennyisége a vizsgált mikotoxinok hatására nem mutatott szignifikáns különbséget az egyes mintavételi időpontokban a kísérleti csoportok között (12. ábra).

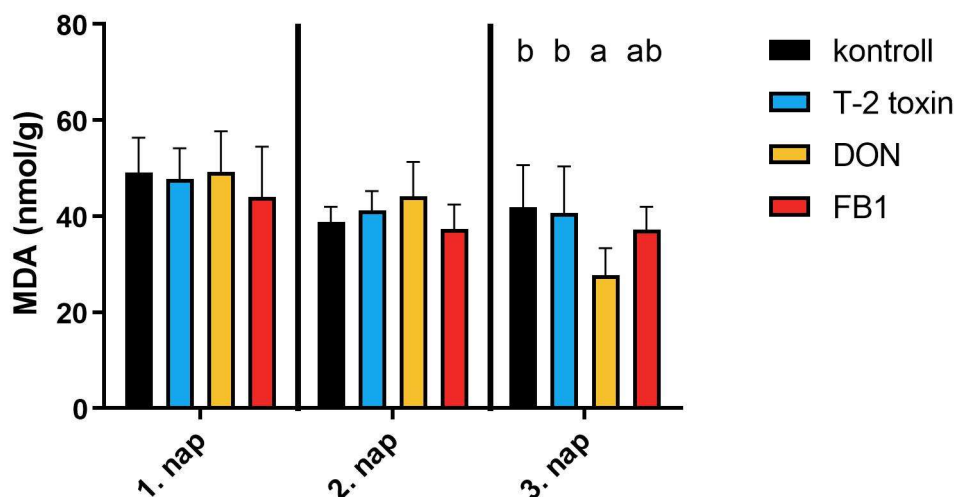
Emellett a lipidperoxidáció terminális fázisában keletkező MDA koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a DON-nal szennyezett takarmánnyal etetett tojóttyúkok májában a kontroll és a T-2 toxinnal kezelt csoporthoz képest szintén a 3. napra (13. ábra).



11. ábra: Konjugált diének mennyiségének változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



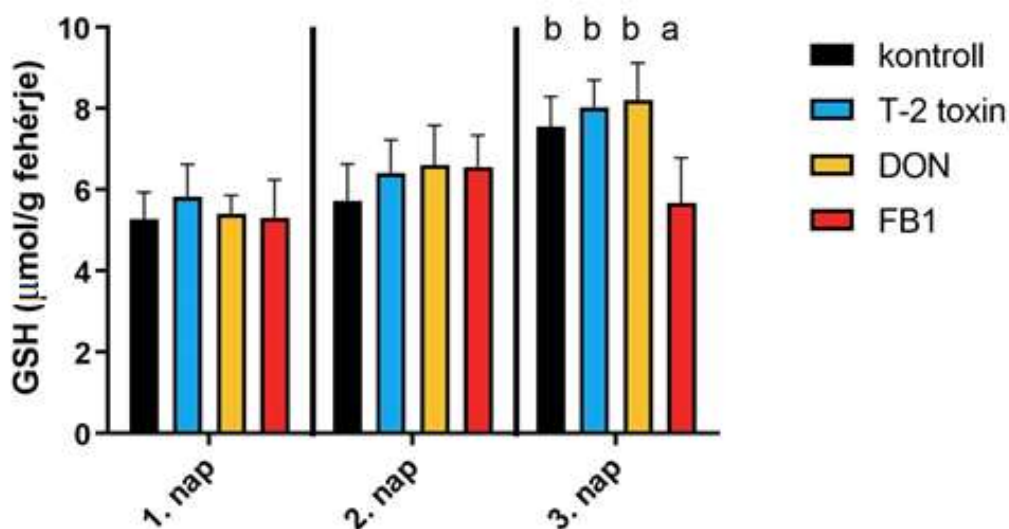
12. ábra: Konjugált triének mennyiségének változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány.



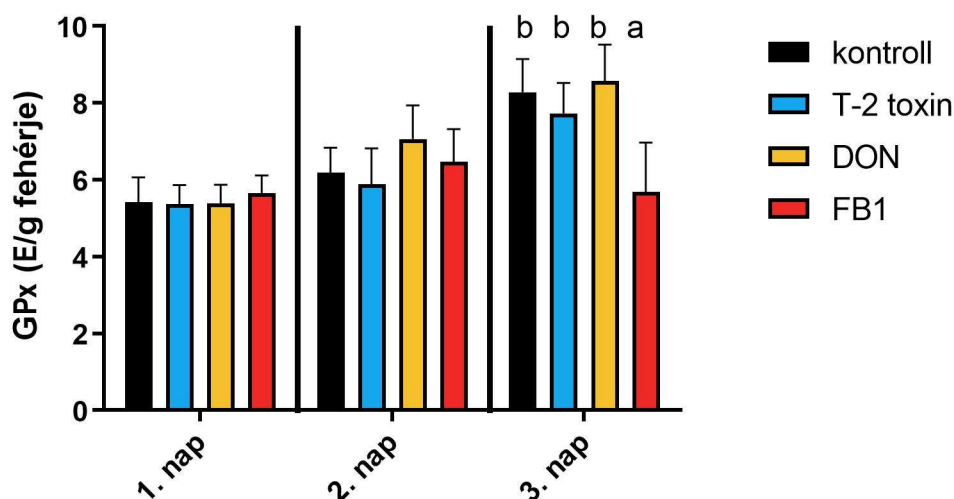
13. ábra: A malondialdehid mennyiségének változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns mértékű változást jelent.

5.1.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban

A GSH mennyisége (14. ábra) és a GPx aktivitása (15. ábra) a FB1 terhelés hatására szignifikánsan kisebb volt a kontroll és a két trichotecén-vázás mikotoxinnal kezelt csoporthoz képest a 3. kísérleti napra. Az 1. és a 2. napon vett minták mérési eredményei ugyanakkor nem mutattak szignifikáns különbségeket a kísérleti csoportok között.



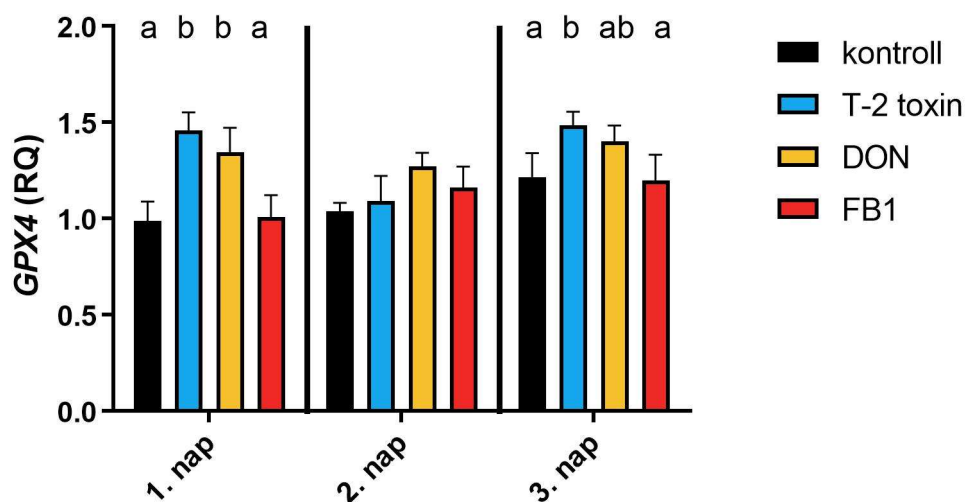
14. ábra: A redukált glutation mennyiségének változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



15. ábra: A glutation-peroxidáz aktivitásának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

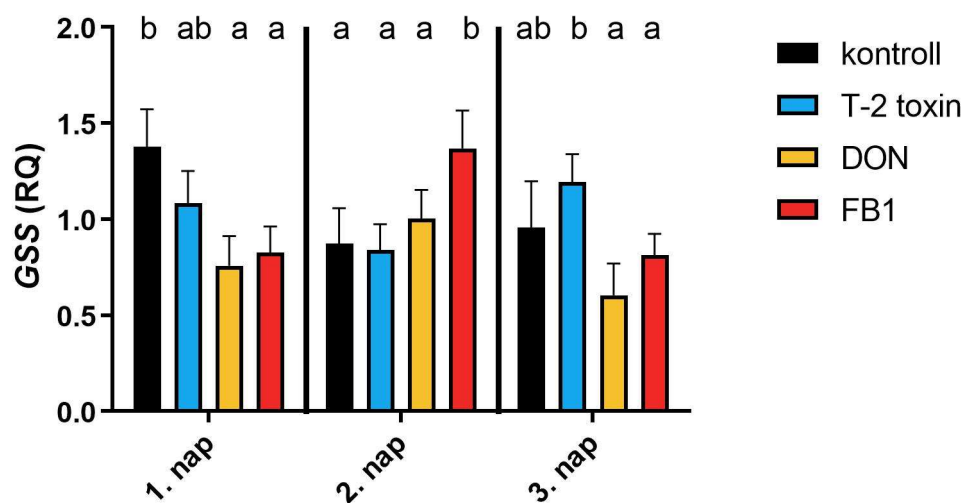
5.1.3 Egyéni mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban

A *GPX4* gén relatív expressziója jelentősen növekedett mindhárom kísérleti napon a kontroll csoporthoz képest a T-2 toxinnal és a DON-nal terhelt csoportokban. A 24. órában a T-2 toxinnal és a DON-nal terhelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt mind a kontroll, mind a FB1-gyel terhelt csoporthoz képest. A 48. órára nem tapasztaltam statisztikailag mérhető eltérést, majd a 72. órára szignifikánsan nagyobb volt a T-2 toxinnal terhelt csoportban a kontroll és a FB1-gyel terhelt csoporthoz képest. A DON-nal terhelt csoportban ugyanakkor nem tapasztaltam változást a többi kísérleti csoporthoz viszonyítva (16. ábra).



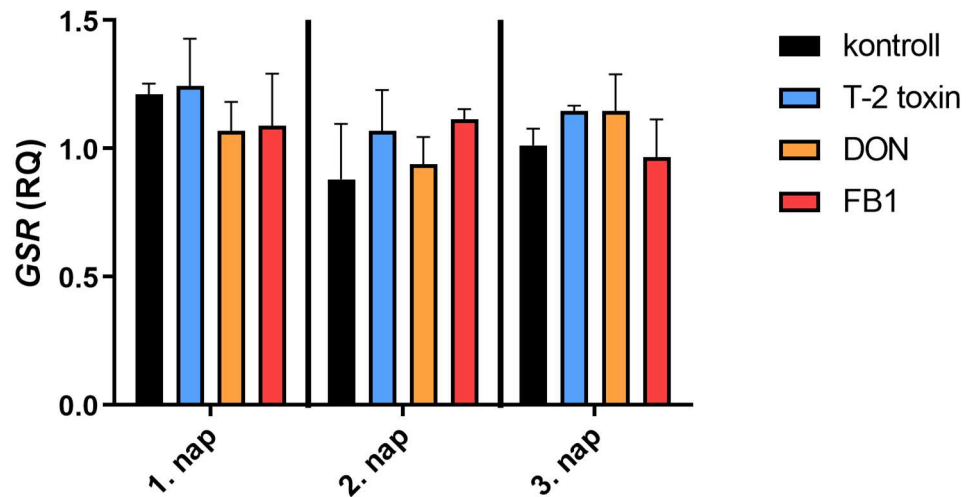
16. ábra: A *GPX4* génexpressziójának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns mértékű változást jelent.

A *GSS* génexpressziója az első napon szignifikánsan kisebb volt a DON és a FB1 csoportokban, a kontroll csoporthoz képest, a 2. napon viszont növekedést figyeltem meg a FB1-gyel kezelt csoportban a kontroll és a két trichotecénnel terhelt csoporthoz képest. A 3. napra a *GSS* nagyobb relatív génexpresszióját mértem a T-2 toxinnal terhelt csoportban a DON-nal és a FB1-gyel terhelt csoporthoz képest (17. ábra).



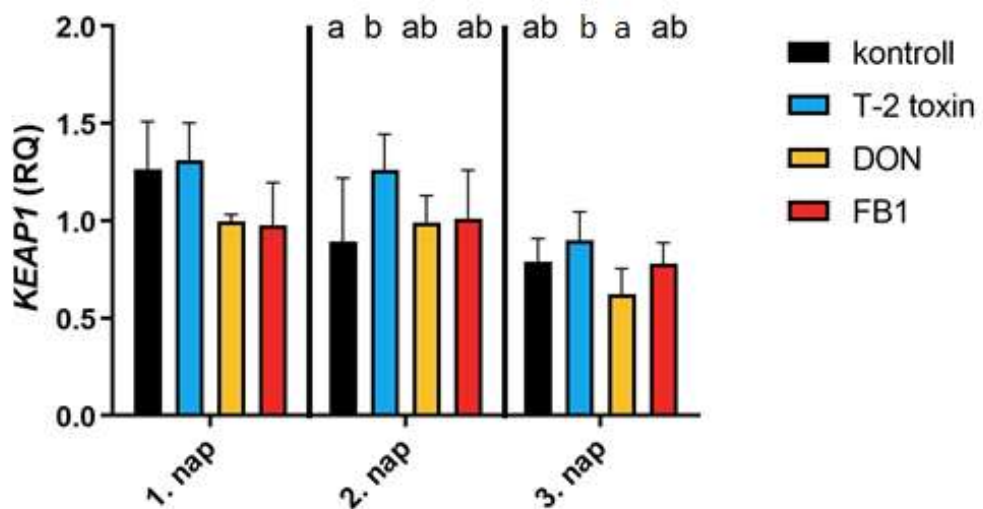
17. ábra: A *GSS* génexpressziójának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns eltérést jelent.

A *GSR* génexpressziójában az egyes kísérleti csoportok között az egyes mintavételi időpontokban szignifikáns mértékű különbségeket nem figyeltem meg (18. ábra).

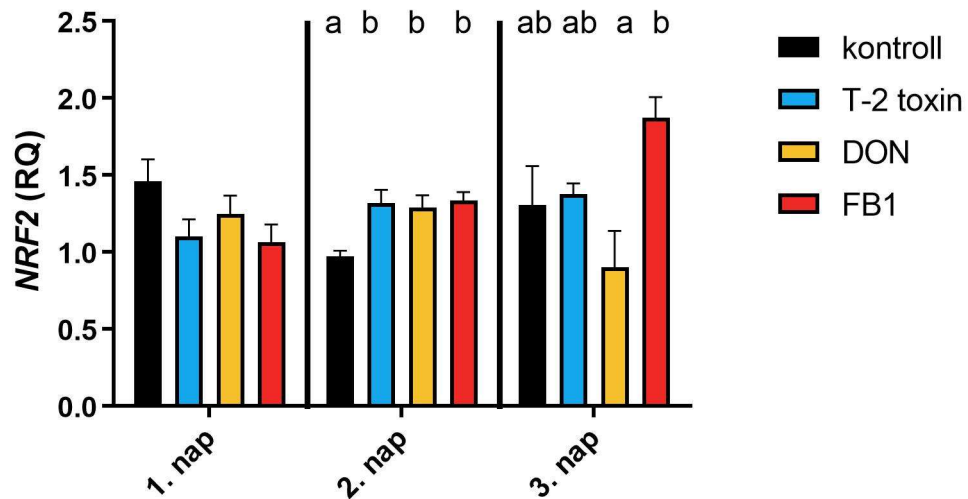


18. ábra: A *GSR* génexpressziójának változása a tojóttyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány.

A Keap1-Nrf2 szabályozási útvonalban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének expressziós változása a 2. és a 3. napon volt nagymértékű a mikotoxinokkal terhelt csoportokban a kontrollhoz képest. A *Keap1* génexpressziója szignifikánsan nagyobb volt a 2. napon a T-2 toxinnal terhelt csoportban a kontrollhoz képest. A 3. napra a DON-nal terhelt csoportban ugyanakkor kisebb relatív génexpressziót mértem a T-2 toxinnal szennyezett takarmánnyal etetett csoporthoz viszonyítva (19. ábra). Az *Nrf2* esetében a 2. napon figyeltem meg nagyobb értéket mindhárom mikotoxinnal terhelt csoportban a kontrollhoz képest. Emellett a 3. napon a FB1-gyel terhelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a relatív génexpresszió értéke a DON-nal terhelt csoporthoz viszonyítva (20. ábra).



19. ábra: A *Keap1* génexpressziójának változása a tojóttyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns eltérést jelent.



20. ábra: A *Nrf2* génexpressziójának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal egyedileg terhelt csoportok: „T-2 toxin”: 0,5 mg/kg; „DON”: 10 mg/kg; „FB1”: 40 mg/kg takarmány. a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns eltérést jelent.

5.1.4 Megbeszélés

A takarmányt szennyező mikotoxinok jelenléte az egyike a legjelentősebb problémának az állati termék előállításánál, éppen ezért különösen fontos ismerni az állati szervezetre kifejtett hatásmechanizmusukat. A három *Fusarium* mikotoxin, a T-2/HT-2 toxin, a DON/3-AcDON/15-AcDON és az FB1 jól ismertek oxigén-szabadgyök képző tulajdonságukról, amely oxidatív károsodást, így például lipidperoxidációt idéz elő, amit a glutation redox rendszer részben semlegesíteni képes. Az eredmények alapján a vizsgált mikotoxinok egyike sem indított el számottevő mértékű lipidperoxidációt. Ennek alapján feltehető, hogy az alkalmazott dózis még enyhe oxidatív stresszt sem idézett elő tojótyúk májában rövidtávú (72 óra) terhelés során. Ezzel szemben mindhárom vizsgált mikotoxin hatására a lipidperoxidáció iniciációs szakaszát jelző CD mennyiségének szignifikáns csökkenése, a DON/3-AcDON/15-AcDON hatására pedig a lipidperoxidáció terminációs szakaszát jelző MDA koncentráció jelentős csökkenése volt megfigyelhető. Ezeknek a csökkent értékeknek háttérben a mikotoxin expozíció hatására a májszöveti lipidek zsírsav-összetételének változása állhat, amelyet a FB1 és T-2 toxin hatásaként korábban már leírtak nyúlban (Szabó et al., 2016). Ehhez hasonló eredményt azonban eddig még nem publikáltak baromfi fajok esetében a szakirodalomban. A megváltozott zsírsav-összetétel befolyásolhatja a lipidek érzékenységét az oxigén-szabadgyökök által indukált oxidációra (Holman, 1954). A glutation redox rendszer markerei, a GSH mennyisége és a GPx aktivitása szintén csökkent a kontrollhoz képest a vizsgálat végén (72. óra) a FB1 hatására, a T-2/HT-2 toxin és a DON/3-AcDON/15-AcDON esetében viszont nem tapasztaltam változást. Ez a különbség feltehetően a glutation redox rendszer gyors aktiválódásának köszönhető a FB1 hatására, amely hatékonyan gátolta ugyan a lipidperoxidációt,

ugyanakkor a glutation redox rendszer gyors kimerülését eredményezte. Úgy tűnik, hogy nem állt rendelkezésre elegendő idő a glutation-diszulfid regenerációjára és *de novo* szintézisére és/vagy a GPx poszttranszlációs aktiválására. Ezt az eredményt támasztja alá egy korábbi tanulmány (Stockmann-Juvala et al., 2004a), ahol FB1 terhelés során azt találták, hogy csökkenti a GSH koncentrációját a májban az oxidatív stressz hatására. A GSH tartalom csökkenése ugyanakkor csökkenti a GPx aktivitását is, lévén az enzim ko-szubsztrája, így annak hiányában annak aktivitása is csökken. A DON/3-AcDON/15-AcDON, valamint a T-2/HT-2 toxin az alkalmazott dózisban ugyanakkor nem befolyásolta érdemben a glutation redox rendszert, feltehetően az oxidatív stressz hiánya miatt.

A mikotoxin expozíció eredményeként ugyanakkor szignifikáns mértékű különbségeket találtam a glutation redox rendszert szabályozó gének relatív expressziójában. A *GPX4* indukció volt detektálható a T-2/HT-2 toxinnal és a DON/3-AcDON/15-AcDON-nal terhelt csoportban 24 órás mikotoxin expozíció után, amely viszont a FB1-gyel terhelt csoportban nem volt megfigyelhető. Ez az eredmény arra utal, hogy a trichotecén-vázis mikotoxinok, így a T-2 toxin és a DON génexpressziós szinten gyorsan aktiválták az antioxidáns védekező rendszert, megakadályozva ezzel a lipidperoxidációs folyamatok kiteljesedését, még abban az esetben is, ha az adott mikotoxin egyébként ROS képződést indukál. Az FB1 nem minden esetben aktiválta a glutation redox rendszert génexpressziós szinten, ami arra utal, hogy a FB1 kisebb mértékű ROS képződést, azaz redox változásokat idéz elő a sejtekben. A *GSS* gén relatív expressziója azonban nőtt tojótúkok májában a 2. napon az FB1-terhelt csoportban és a 3. napon T-2/HT-2 toxin hatására. Ez a változás összefüggésben lehet a GSH tartalom csökkenésével FB1 hatására a 3. napon, amely arra utal, hogy a *GSS* expresszió fehérje, azaz enzimaktivitás, szinten csak később jelentkezik. A Keap1-Nrf2 szabályozási útvonalban szerepet játszó gének génexpressziós változása a 2. és a 3. napon jelentkezett a mikotoxinokkal terhelt csoportokban. A *Keap1* génexpressziójának növekedése a T-2/HT-2 toxinnal terhelt csoportban arra utal, hogy a három vizsgált mikotoxin közül a T-2/HT-2 hatására következett be legkorábban és legnagyobb mértékben redox változás a sejtben, lévén a Keap1 redox szenzitív fehérje (Velichkova & Hasson, 2005). Az *Nrf2* második napon megfigyelt növekedése mindhárom kezelt csoportban az oxidatív stressz hierarchikus modellje alapján arra utal, hogy az alkalmazott dózisok mellett alacsony mennyiségű ROS képződött a tojótúkok májában. Az *Nrf2* indukciójával keletkezett Nrf2 fehérje bejut a sejtbe és az Nrf2-ARE útvonalon keresztül aktiválja az antioxidáns gének expresszióját, amely magyarázhatja a *GPX4* fokozott expresszióját.

A relatív génexpresszió változásában mutatkozó különbségek szerint a T-2/HT-2 toxin és a DON/3-AcDON/15-AcDON az alkalmazott dózisban gyors ROS képződést, ennek hatására pedig gyors és hatékony antioxidáns választ indukál. Ugyanakkor az FB1 kevesebb ROS képződést generált; ezért nem nőtt jelentősen az összes glutation redox rendszert kódoló gén relatív expressziója. Az eredmények arra utalnak, hogy a rövid távú mikotoxin-expozíció elérte néhány, de nem mindegyik általam vizsgált antioxidáns gén expressziója aktiválásának küszöbét, amely a 3 napos vizsgálat során

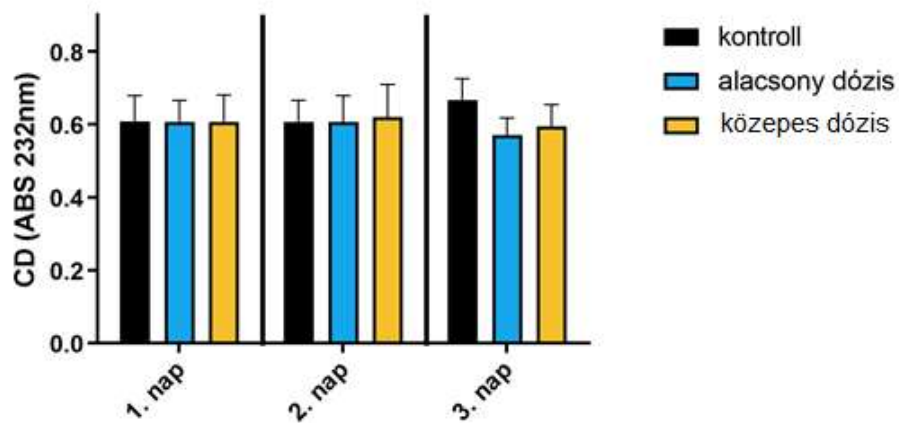
csak mRNS-szinten volt kimutatható, de fehérje expresszió, azaz enzimaktivitási szinten még nem.

5.2 T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata tojótyúkban

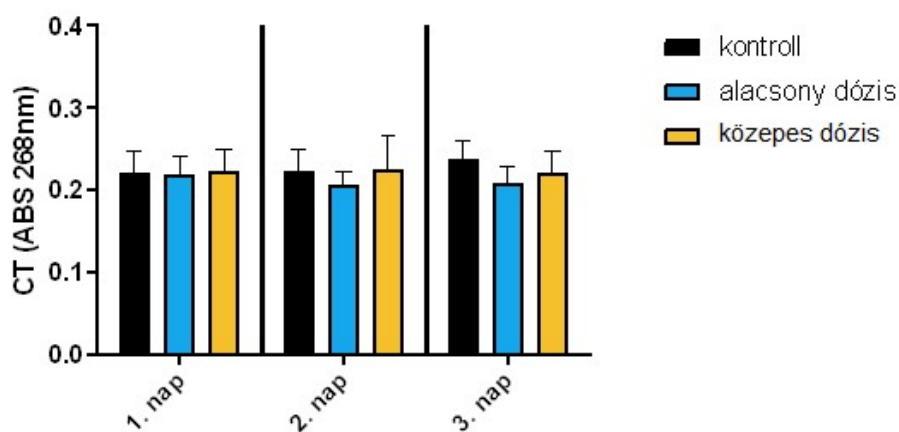
A kísérlet során a T-2/HT-2 toxin, a DON/3-AcDON/15-AcDON és a FB1 rövid távú (72 óra) együttes hatását vizsgáltam a glutation redox rendszer egyes elemeire, valamint a rendszer szabályozásáért felelős gének expressziójára. Az oxidatív stressz hatására kialakuló lipidperoxidációs folyamatok felmérésére mértem annak iniciációs és terminációs szakaszának markereit. Az „alacsony dózis” kísérleti csoportban az Európai Unió által baromfi takarmányokban javasolt maximális mennyiségeket (2006/576/EK, 2013/165/EU) alkalmaztam, míg a „közepes dózis” kísérleti csoportban ezeknek kétszeres értékeit. A takarmányok mikotoxin tartalmát a 2. táblázatban tüntettem fel, azok laboratóriumi mérési eredményei alapján. A három napos kísérleti időszak alatt elhullást és takarmányvisszautasítást egyik kezelési csoportban sem tapasztaltam.

5.2.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban

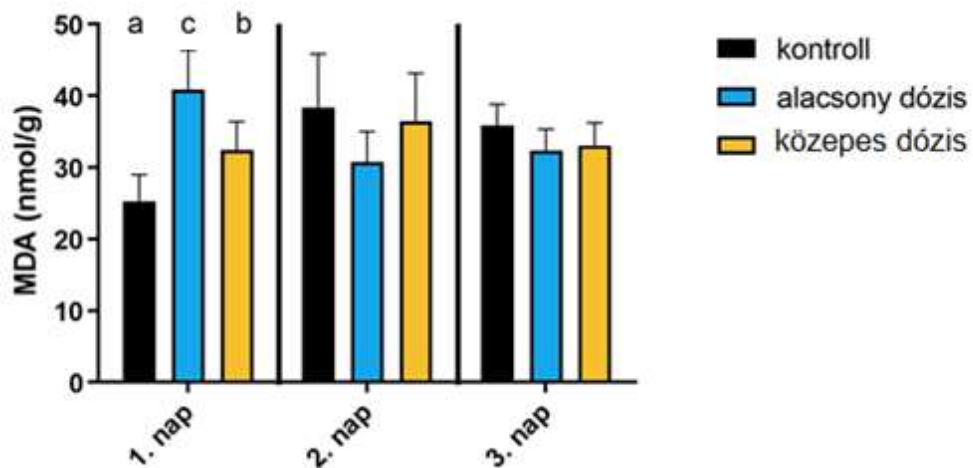
A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CD és CT mennyisége a vizsgált mikotoxin kombinációk hatására nem mutatott szignifikáns különbséget az egyes mintavételi időpontokban (21. és 22. ábra). A lipidperoxidáció terminációs fázisának markere, a MDA koncentrációja azonban a mikotoxin expozíció első napján szignifikánsan nagyobb volt alacsony dózisú expozíció hatására a kontroll és a közepes dózissal terhelt kezelt csoporthoz képest. A közepes dózissal kezelt csoportban szintén szignifikánsan nagyobb értéket mértem a kontroll csoporthoz képest (23. ábra).



21. ábra: Konjugált diének mennyiségének változása a tojótyúkok májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány.



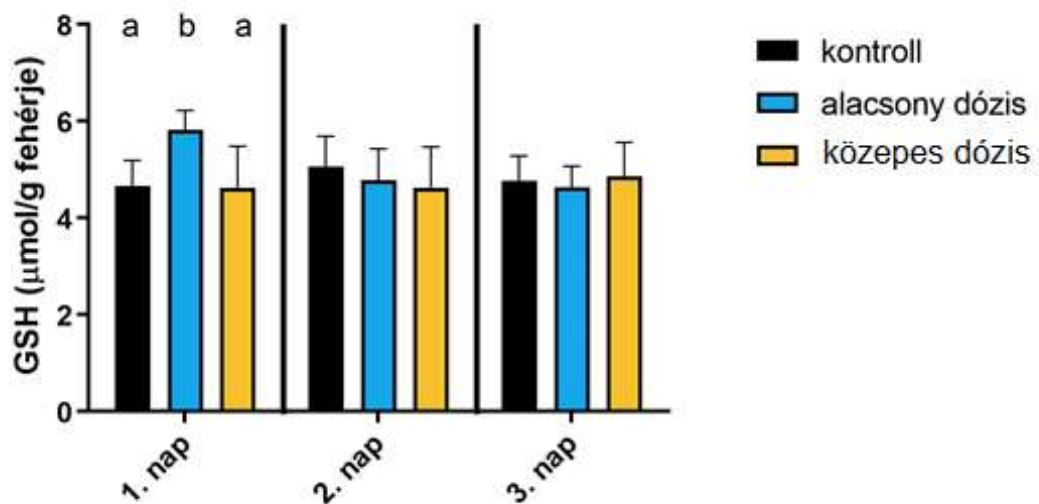
22. ábra: Konjugált triének mennyiségének változása a tojótyúkok májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány.



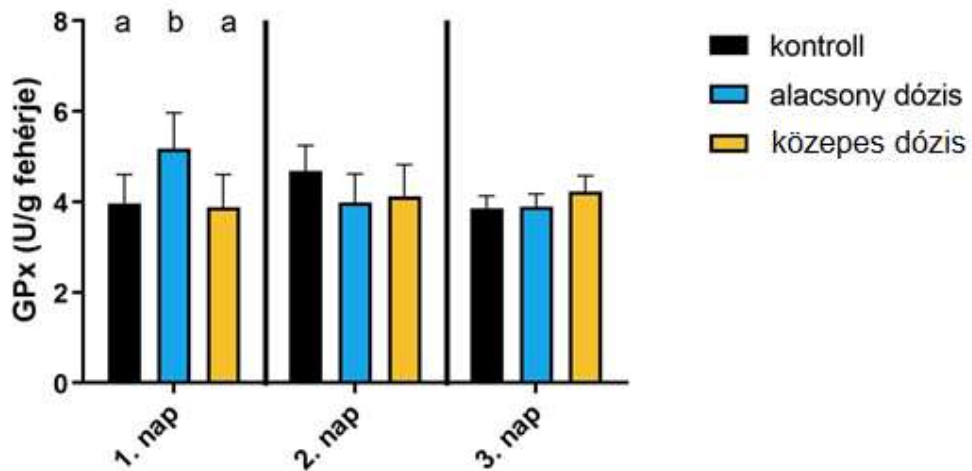
23. ábra: A malondialdehid mennyiségének változása a tojótúkok májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis:* T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis:* T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

5.2.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban

A GSH mennyisége (24. ábra) és a GPx aktivitása (25. ábra) csak az 1. napon volt szignifikánsan nagyobb az alacsony dózisu csoportban a kontroll és a közepes dózisu csoportokhoz képest a májban, ami már a 48. órára visszatért a kontroll csoport szintjére.



24. ábra: A redukált glutation mennyiségének változása a tojótúkok májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis:* T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis:* T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



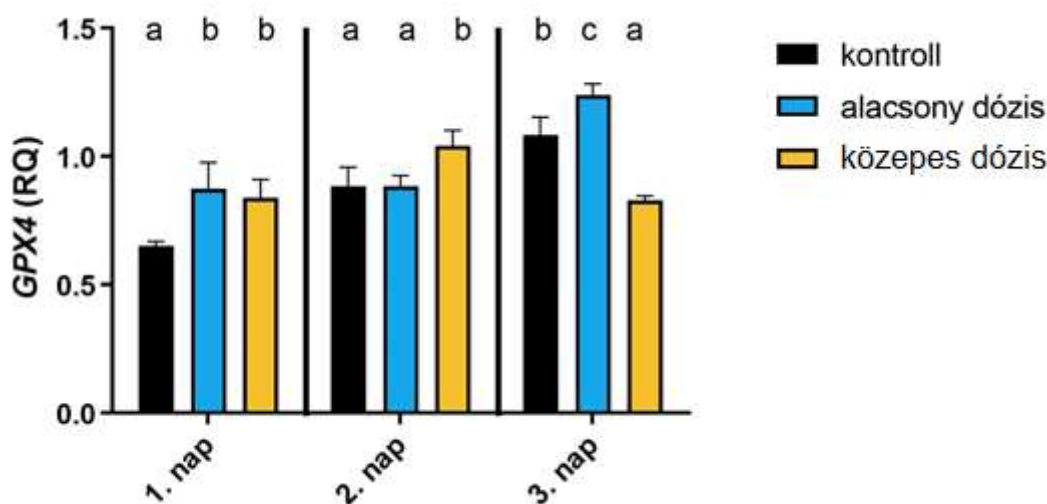
25. ábra: A glutation-peroxidáz aktivitásának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

5.2.3 Multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban

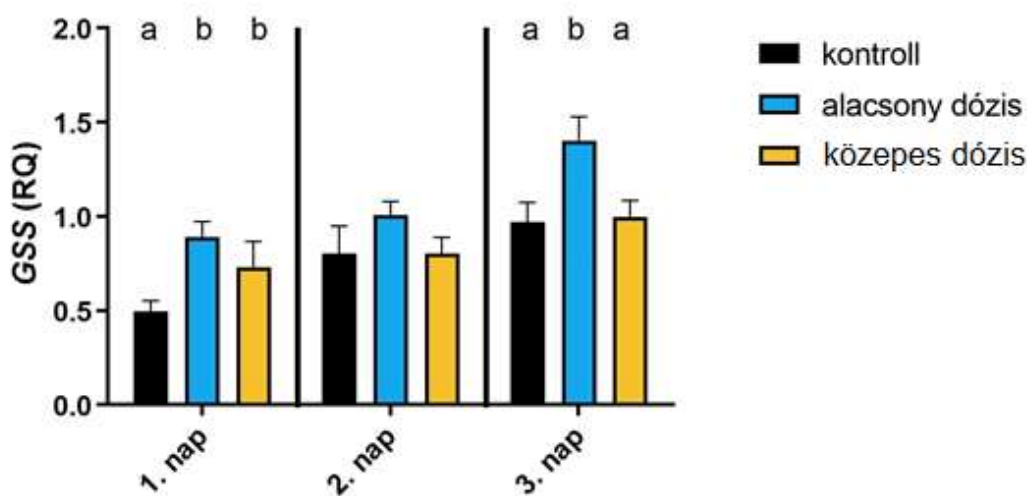
A *GPX4*, *GSS* és *GSR* gének expressziója az 1. napon szignifikáns mértékben nagyobb volt mind az alacsony, mind a közepes mikotoxin dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz képest.

A *GPX4* expressziója a 2. kísérleti napon további növekedést mutatott a közepes dózissal terhelt csoportban, amit a 3. napra szignifikáns csökkenés követett a kontroll és az alacsony dózissal terhelt csoportokhoz képest. Az alacsony dózissal terhelt csoportban szignifikáns növekedés volt tapasztalható kísérlet végére (3. nap) a kontroll és a közepes dózissal terhelt csoportokhoz képest (26. ábra).

A *GSS* expresszió szignifikánsan nagyobb volt mindkét terhelt csoportban a kontroll csoportokhoz képest az 1. napon és a 3. napon az alacsony dózissal terhelt csoportban a kontroll és a közepes dózissal terhelt csoportokhoz képest (27. ábra).



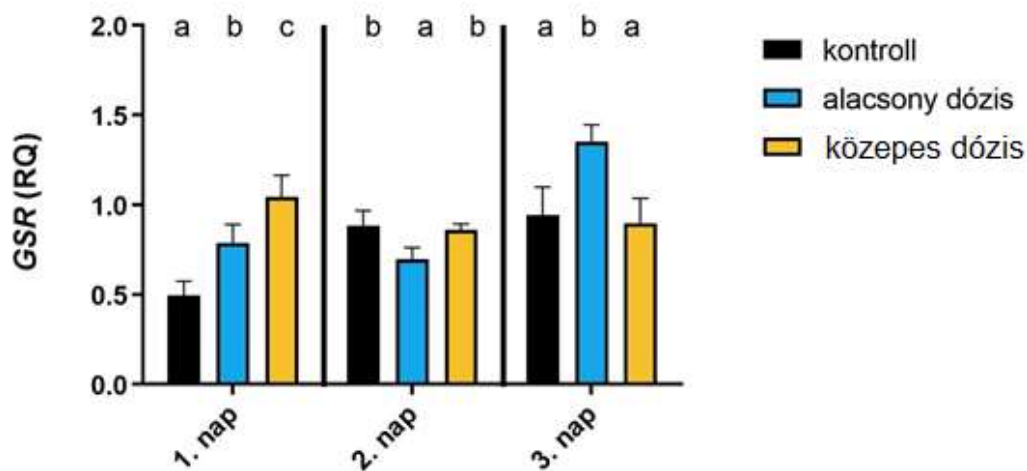
26. ábra: A *GPX4* génexpressziójának változása a tojótyúkok májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/ HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



27. ábra: A *GSS* génexpressziójának változása a tojótyúkok májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/ HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

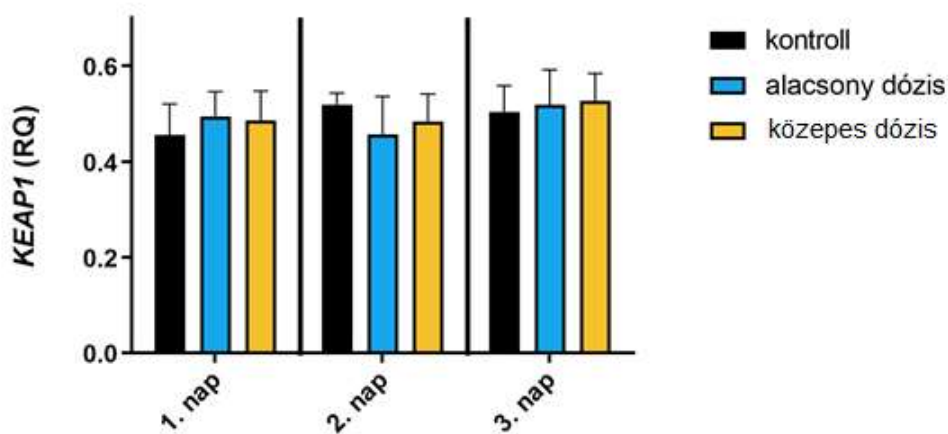
A *GSR* expressziója szignifikánsan nagyobb volt az 1. napon az alacsony és a közepes dózisú csoportokban a kontrollhoz képest, valamint dóziszfüggően eltért a mikotoxinnal terhelt csoportok között. A kísérlet 48. órájában csökkenést tapasztaltam az alacsony dózisú csoportban a másik két csoporthoz viszonyítva. A 72. órára a relatív

génexpresszió újra szignifikánsan nagyobb volt, de csak az alacsony dózissal terhelt csoportban (28. ábra).

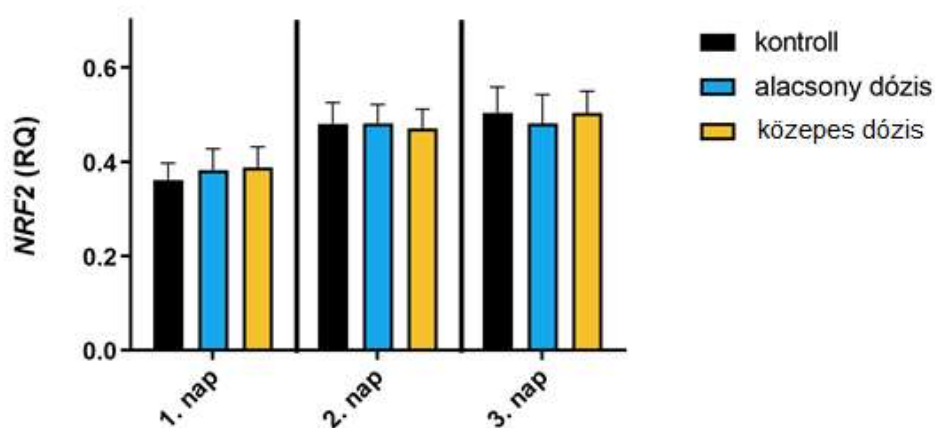


28. ábra: A *GSR* génexpressziójának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b, c jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

A *Keap1* és *Nrf2* expressziójában nem tapasztaltam szignifikáns eltérést az egyes csoportok között (29. 30. ábra).



29. ábra: A *Keap1* génexpressziójának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány.



30. ábra: Az *Nrf2* génexpressziójának változása a tojtyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány.

5.2.4 Megbeszélés

A multi-mikotoxin expozíció hatására bekövetkező biokémiai változások alapján levonható az a következtetés, hogy tojtyúk májában lipidperoxidációs folyamatok indukálódtak, amit annak terminációs szakaszában keletkező metastabil végtermék, az MDA, mennyiségének változásával bizonyítottam a kísérlet első napján. Az eltérés azonban csak az alacsony dózissal terhelt csoportban jelentkezett, azaz nem mutatott dózisfüggő összefüggést. Ennek oka az lehetett, hogy a mikotoxinok kisebb mennyisége gyorsabban és hatékonyabban szívódott fel a bélcsatornából, a nagyobb dózis hatására azonban feltételezhetően a membráncsatornák telítődése miatt ezek a folyamatok lassabban következtek be. A következő két napban ez a lipidperoxidációs marker a kontroll szintre csökkent, ami az antioxidáns védelem korai aktiválódását jelzi, hatékonyan gátolva a további lipidperoxidációt. Ez az eredmény korai ROS képződésre és lipidperoxidációra utal, főképp a vizsgált mikotoxinoknak az EU javaslati határértékeivel megegyező szennyezési szintek alkalmazásakor. A korai ROS képződés és a lipidek peroxidációja aktiválta az antioxidáns glutation redox rendszert, amit a megnövekedett GSH mennyiség és a GPx aktivitás támasztott alá az alacsony dózissal terhelt csoportokban a kísérlet első napján. A glutation redox paraméterek dózisfüggő változásai alátámasztják azt a hipotézist, hogy a májban megnyilvánuló változások összefüggésben vannak mikotoxinok felszívódásának sebességével és annak mértékével. Ezen túlmenően ezek a változások az alacsony dózisban mikotoxinokkal szennyezett takarmányok etetése során tojtyúk esetében is megfigyelhetők voltak (EU javaslati határértékeket alkalmazva), ami viszont arra utal, hogy az egyes mikotoxinok között szinergista hatás állhat fenn az antioxidáns rendszer aktiválása tekintetében. Ezt támasztják alá az egyedileg alkalmazott mikotoxinokkal végzett kísérletem eredményei is, ahol az EU által megállapított határérték kétszeres mennyiségét alkalmazva a T-2/HT-2 toxin, a DON/3-AcDON/15-AcDON és a FB1 szintén nem növelte a glutation redox rendszer mennyiségét (GSH) vagy aktivitását (GPx) (5.1.2. fejezet).

A *GPX4*, *GSS* és *GSR* gének relatív expressziója szignifikáns mértékben nagyobb volt az első napon mind az alacsony, mind a közepes dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz képest. Ez az eredmény arra utal, hogy a *Fusarium* multi-mikotoxin expozíció redox változásokat indukált a sejtekben ROS képződés révén, ami aktiválta az antioxidáns fehérjéket kódoló gének expresszióját. Ezeknek a géneknek fokozott mértékű expressziója azonban nem nyilvánult meg fehérje szinten (GSH és GPx) a közepes dózissal terhelt csoport esetében. Az eredmények alapján időbeli eltolódásra lehet következtetni a gének megnövekedett mértékű expressziója és a GSH és a GPx szintézisére gyakorolt hatás között, amely a fehérjeszintézishez szükséges teljes időtartamot figyelembe véve egyértelműnek tűnik. A génexpressziós vizsgálat eredményei ugyanakkor alátámasztották azt a hipotézist, hogy a kisebb dózisban alkalmazott mikotoxin kombináció hamarabb szívódik fel és éri el a májat, mint a nagyobb mennyiség. Ez lehetett az oka annak, hogy a közepes dózissal kezelt csoportokban annak hatására az első napon csak génexpressziós változásokat lehetett mérni, amely fehérje expresszió szinten még nem jelentkezett. A kísérlet további szakaszában pedig valószínűleg aktiválódott a xenobiotikum transzformáció második, azaz bioszintetikus konjugációs szakasza, amely a mikotoxinok konjugációja révén a kísérlet második napján már részben helyreállította a sejtek redox állapotát, amit a jelentéktelen mértékű *GSS* és még alacsonyabb mértékű *GSR* expresszió támaszt alá. A *GPX4* nagymértékű expressziója ugyanakkor még a 2. napon is tapasztalható volt a közepes dózissal terhelt csoportban, ami arra utal, hogy a redox változások a májsejtekben bizonyos időbeli eltéréssel ugyan, de nagyobb mértékű mikotoxin expozíció esetében is kialakulnak. Ezek az eltérések azonban eredményeim alapján még nem érik el azt a kritikus szintet, amely a GSH és a GPx szintézisének aktivációjához szükséges. Az antioxidáns enzimek génjeinek expressziója a harmadik napra megnövekedett az alacsony dózisú mikotoxin expozíció következtében, amit a mikotoxinok metabolizációja idézhet elő, mert ennek során további ROS képződés is bekövetkezhetett. Az alkalmazott mikotoxin kombináció sem alacsony, sem közepes dózisban nem aktiválta a Keap1/Nrf2/ARE útvonalat. Ebből arra lehet következtetni, hogy a kialakult oxidatív stressz mértéke nem érte el azt a szintet a májban, amelynek hatására bekövetkezett volna az antioxidáns válaszelem aktivációja a vizsgált időtartam (72 óra) alatt, vagy a hierarchikus oxidatív stressz modell alapján átlépett egy olyan küszöbértéket, amelynek hatására már nem elsősorban az Nrf2-ARE útvonal aktiválódása következett be.

A változások többsége az alacsony dózissal terhelt csoportban volt megfigyelhető, amiből arra következtethetünk, hogy a 3 napos multi-mikotoxin expozíció során a *Fusarium* mikotoxinok között szinergista hatás van az antioxidáns enzimek génexpressziós szintű aktivációjának, illetve a glutation redox rendszer egyes tagjainak mennyisége/aktivitása tekintetében.

Az általam vizsgált mikotoxinok az oxidatív stressz kiváltására kifejtett egyedi *in vivo* hatását brojlercsirkékben korábban már leírták, az alkalmazott dózisok viszont általában jelentős mértékben meghaladták az EU által javasolt határértékeket. A korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a T-2 toxin vagy a DON *in vivo* expozíciója növelte a ROS képződést a hosszú távú terhelés során (Balogh et al.,

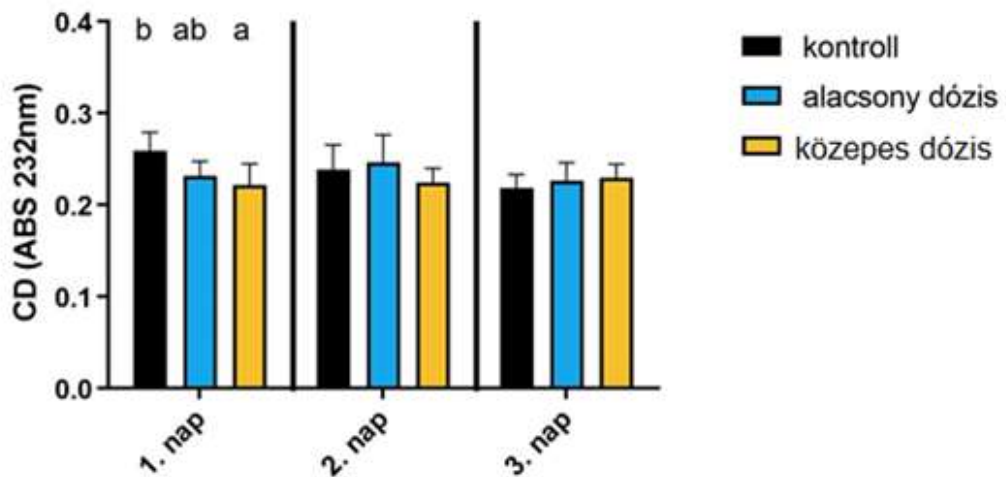
2015), ami aktiválta az antioxidáns védekezést mind génextpressziós, mind fehérje szinten. Egy másik kutatás eredményei szerint a FB1 szubakut expozíciója növelte a májban a lipidperoxidációt jelző tiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) szintjét, ami arra utalt, hogy oxidatív stresszt indukált a ceramid-szintáz gátlásával (Poersch et al., 2014). Vannak azonban tanulmányok az EU-által javasolt határértékekhez hasonló mennyiségű mikotoxinok kombinált expozíciójának hatásairól is. A T-2 toxin és a DON kombinált kis dózisú szubkrónikus expozíciója növelte a glutation redox rendszer mennyiségét, aktivitását és az azokat kódoló gének expresszióját. Ugyanakkor ezzel párhuzamosan nem volt szignifikáns mértékű lipidperoxidáció (Pelyhe et al., 2018), ami az antioxidáns védekezés megfelelő hatékonyságára utal. Egy korábbi kísérletben a FB1 + DON/3Ac-DON/15-AcDON esetében, az EU által javasolt koncentrációk alkalmazása során magasabb ROS-szintet mértek, mint ha az FB1-et önmagában alkalmazták (Antonissen et al., 2015). Ezek az eredmények multi-mikotoxin expozíció hatására jelentkező szinergista kölcsönhatásra utalnak a sejtek redox állapotának változása és az antioxidáns védelem aktiválódása tekintetében. Vizsgálataim során érdekes módon az EU-határértékeknek megfelelő dózisok alkalmazásakor lehetett a legtöbb változást tapasztalni az antioxidáns védőrendszer működését jelző markerek esetében, feltehetően már az alacsony mikotoxin koncentrációk hatására is kialakuló oxidatív stressz miatt, amelyet a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 kombinált hatása idézett elő.

5.3 T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata tojótyúkban

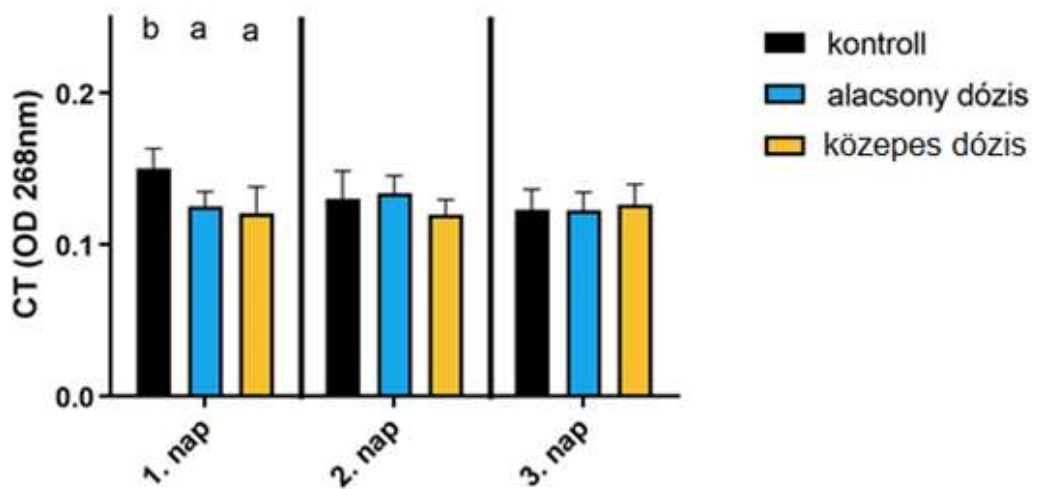
A két trichotecén-vázus fusariotoxin együttes hatását is megvizsgáltam a FB1 nélkül a glutation redox rendszer egyes elemeire, valamint a rendszer szabályozásáért felelős gének expressziójára tojótyúkban. Az oxidatív stressz kialakulásának felmérésére mértem a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs szakaszának markereit. Az „alacsony dózis” kísérleti csoportban az Európai Unió által baromfi takarmányokban javasolt maximális mennyiségeket alkalmaztam, míg a „közepes dózis” kísérleti csoportban ezeknek kétszeres értékei voltak. A kezelésekhez felhasznált takarmányok mikotoxin tartalmát a 2. táblázatban tüntettem fel a mesterségesen szennyezett takarmány mikotoxin tartalmának laboratóriumi mérési eredményei alapján. A három napos kísérleti időszak alatt elhullást és takarmányvisszautasítást egyik kezelési csoportban sem tapasztaltam.

5.3.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban

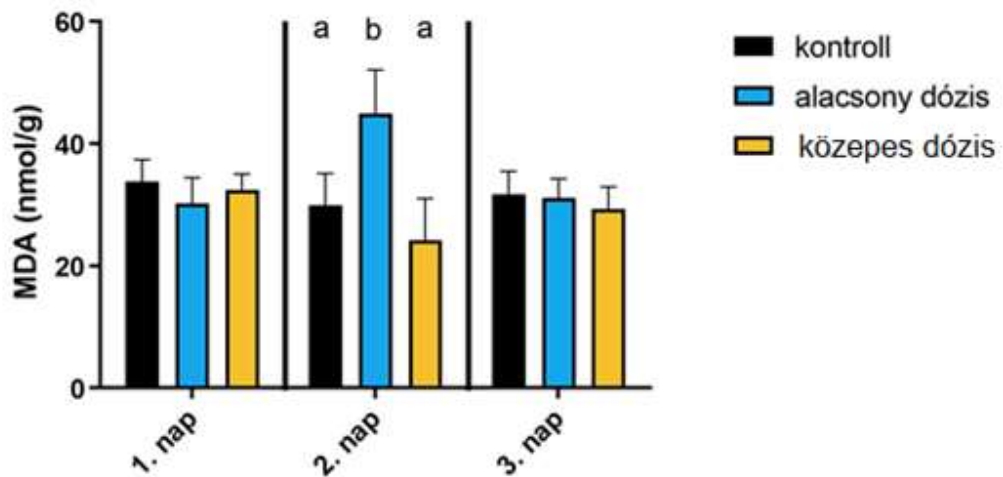
A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CD-ek és CT-ek mennyisége a multi-mikotoxin terhelés hatására csak kismértékben változott a kontrollhoz viszonyítva a májban. A CD-ek esetében a mikotoxinokkal szennyezett takarmány etetésének megkezdését követő 24. órában szignifikáns mértékű csökkenést tapasztaltam a közepes dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva. Az alacsony dózis esetében nem volt eltérés a kontrollhoz viszonyítva (31. ábra). A CT mennyisége szintén az első napon változott: a mikotoxin kombinációval terhelt csoportokban szignifikáns mértékben csökkent annak mennyisége a kontroll csoportéhoz képest (32. ábra). A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA koncentrációja a májban a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan nagyobb volt a mikotoxinokkal szennyezett takarmány etetését követő 48. órában az alacsony dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz és a közepes dózissal terhelt csoportéhoz képest. Ez a nagyobb érték viszont a 3. kísérleti napon már nem volt megfigyelhető (33. ábra).



31. ábra: A konjugált diének mennyiségének változása a tojóttyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.



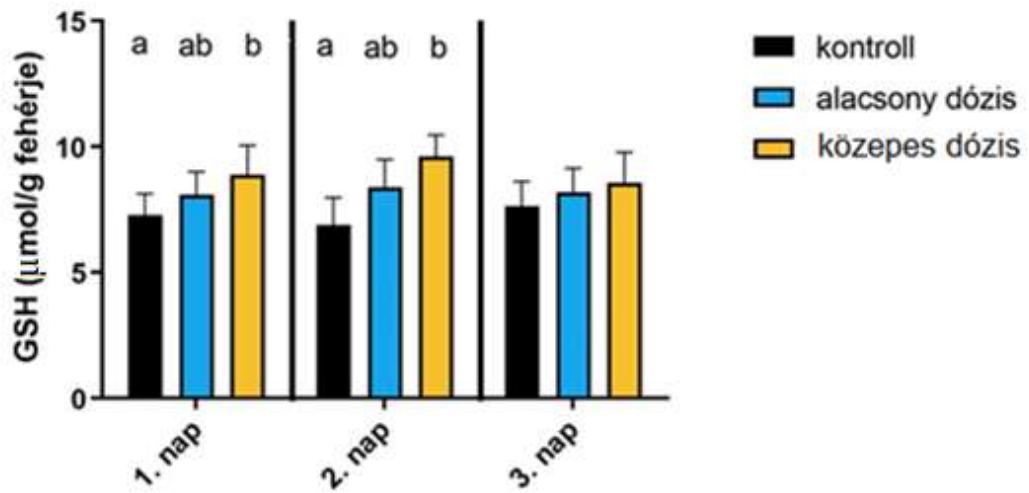
32. ábra: A konjugált triének mennyiségének változása a tojóttyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



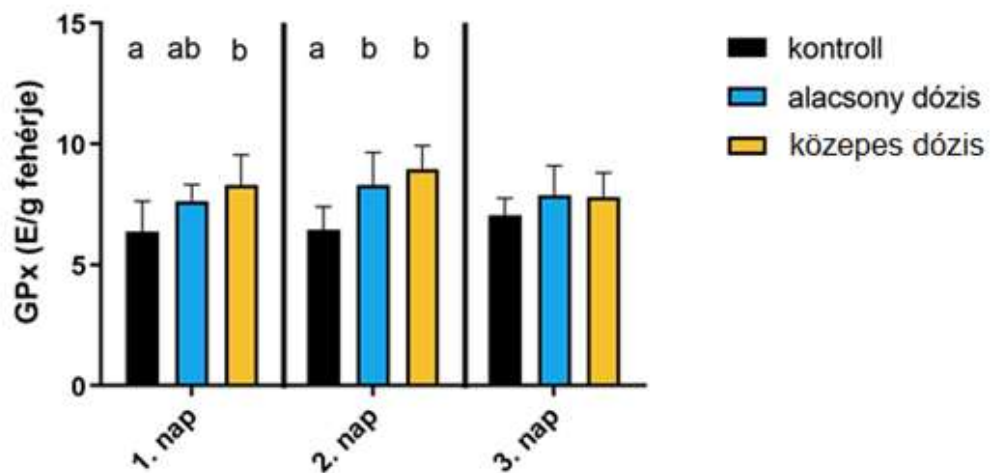
33. ábra: A malondialdehid mennyiségének változása a tojótyúkocok májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

5.3.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban

A glutation redox paraméterek közül a GSH tartalom a májban szignifikánsan nagyobb volt a közepes dózis hatására a kontroll csoporthoz képest a mikotoxin terhelés 24. és 48. órájában. A 72. órára azonban az előző mintavételek során tapasztalt nagyobb érték már nem volt kimutatható (34. ábra). A GPx aktivitás hasonlóan változott a kísérleti csoportokban, mint a GSH tartalom. A 24. órában szignifikánsan nagyobb értékeket mértem a közepes dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz képest, amely még a 48. órában is kimutatható volt. Továbbá az alacsony dózissal terhelt csoportban mért GPx aktivitás is szignifikánsan nagyobb volt a kontrollhoz képest. A mikotoxin terhelés 72. órájára ugyanakkor a kísérleti csoportok értékei a kontroll csoportban mért értékekre csökkentek (35. ábra).



34. ábra: A redukált glutation mennyiségének változása a tojtyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.



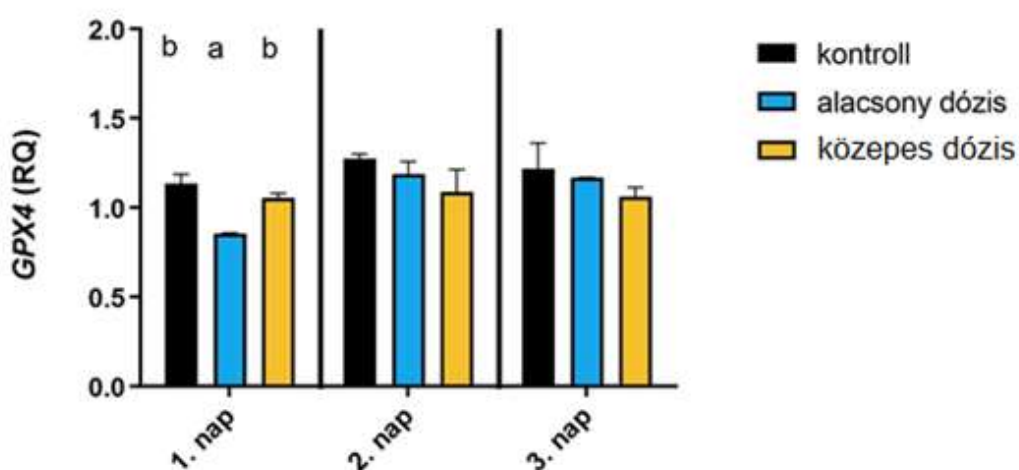
35. ábra: A glutation-reduktáz aktivitásának változása a tojtyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

5.3.3 Trichotecén-vázás multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban

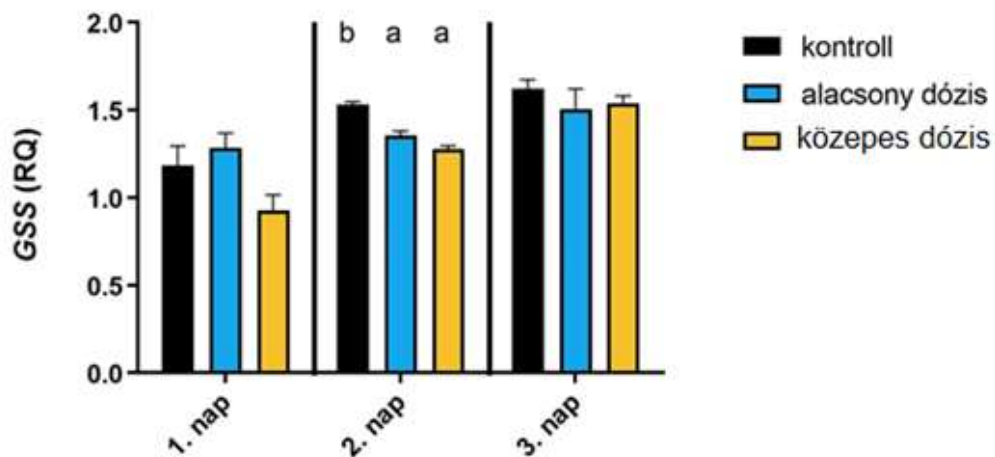
A *GPX4* génexpressziója az első napon a kontroll és a közepes dózissal terhelt csoportokhoz képest szignifikánsan kisebb volt az alacsony dózissal terhelt csoportban. A 2. és 3. napon viszont ez a csökkenés statisztikailag már nem volt igazolható (36. ábra).

A *GSS* génexpressziója a 2. napon szignifikánsan kisebb volt mindkét terhelt csoportban a kontrollhoz képest, amely a 3. napon már nem volt kimutatható (37. ábra).

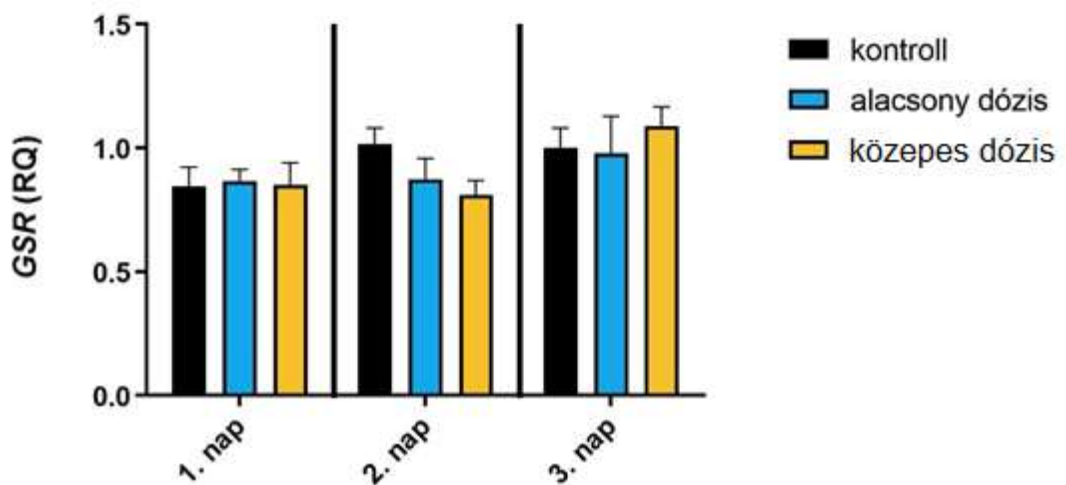
A *GSR* génexpressziója a kontrollhoz képest nem mutatott szignifikáns eltérést egyik kísérleti csoportban sem (38. ábra).



36. ábra: A *GPX4* génexpressziójának változása a tojótyúk májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

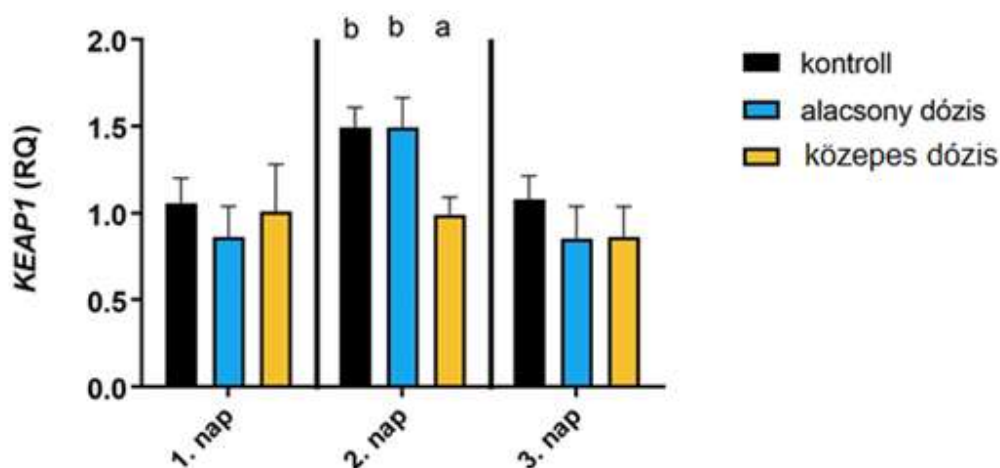


37. ábra: A *GSS* génextpressziójának változása a tojótyúkocok májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



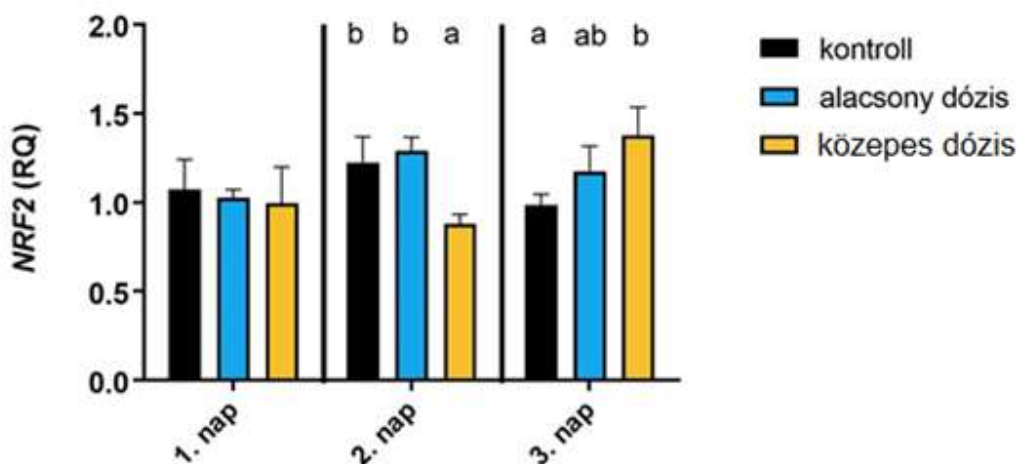
38. ábra: A *GSR* génextpressziójának változása a tojótyúkocok májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány.

A *Keap1* és *Nrf2* gének expressziója a kísérlet 2. napjára tért el a szignifikáns mértékben a kísérleti csoportok között. A *Keap1* gén kifejeződése a 2. napon a közepes dózissal terhelt csoportban szignifikánsan kisebb volt a kontroll és az alacsony dózissal terhelt csoportokhoz képest (39. ábra).



39. ábra: A *Keap1* génexpressziójának változása a tojótyúkocok májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

Az *Nrf2* expressziója a 2. napon szintén kisebb volt a közepes dózissal terhelt csoportban, míg a 3. napon szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest (40. ábra).



40. ábra: Az *Nrf2* génexpressziójának változása a tojótyúkocok májában a kísérlet 72 órája alatt. Trichotecén-vázás mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

5.3.4 Megbeszélés

A trichotecén-vázás mikotoxinok, így a T-2 toxin és a DON, közös tulajdonsága, hogy szerkezetükre jellemző az epoxi csoport jelenléte, amely miatt különösen reaktívak és képesek ROS képződést indukálni. Brojlercsirkékkel végzett *in vivo* vizsgálatok során a lipidperoxidációs folyamatok indukálódását tapasztalták, de többnyire szubkrónikus expozíciót követően és a mikotoxin egyéni hatásait vizsgálva (Mézes et al., 1999; Weber et al., 2010). Ugyanakkor kevés rövid távú gazdasági állatokkal végzett kísérlet ismert, amelyekben a trichotecén-vázás mikotoxinokat együtt alkalmazták.

A lipidperoxidációs folyamatok kezdetét jelző markerek mennyisége a multi-mikotoxin terhelés hatására csökkent a kísérlet első napján, amely a későbbiekben közel azonos volt, mint a kontroll értéke. Az itt megfigyelt tendenciák hasonlóak voltak a korábbi, tojótúkokkal végzett a mikotoxinokat egyedileg alkalmazott kísérletben tapasztaltakhoz (5.1.1. fejezet). A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA koncentrációja a 2. napon mutatott nagyobb értéket a kontrollhoz viszonyítva az alacsony dózissal terhelt csoportban. Ennek a változásnak a hátterében a lipidperoxidációs folyamatok fokozódása állhat, amely növelte a MDA tartalmat a 2. napon már az EU javaslati határértékkel megegyező dózisok alkalmazásánál. Egy másik rövid távú, brojlercsirkékkel végzett kísérletben közepes dózisban alkalmazott T-2 toxin csak a 3. napra növelte a máj MDA tartalmát (Bócsai et al., 2016). Egy szubkrónikus kísérletben az EU javaslati határértéknél kisebb mennyiségű DON expozíciója is növelte a brojlercsirkék májának MDA koncentrációját a vizsgálat végére, a 21. napra (Erdélyi et al., 2011). Egy tojótúkokkal végzett korábban bemutatott kísérletben azonban nem nőtt, hanem csökkent az MDA szint a DON-nal terhelt csoportban (5.1.1. fejezet). Ebben a kísérletben viszont az azonos mennyiségben alkalmazott mikotoxinokkal (T-2/HT-2 toxin + DON/3Ac-DON/15-AcDON) terhelt kezelt csoportban nem tapasztaltunk változást a kontroll csoporthoz képest. Az eddigi adatok alapján tehát elmondható, hogy dózis- és vizsgálati idő-függő módon változik a baromfi májában a lipidek peroxidációja.

A multi-mikotoxin vizsgálat során a tojótúkok májának glutation redox állapotában is mértem változást, amelyet a MDA tartalom növekedésére, azaz a lipidperoxidációra adott antioxidáns válaszként értékeltem. A GSH tartalom szignifikáns mértékben nagyobb volt a kísérlet első két napján a közepes dózis hatására, ahogyan a GPx aktivitás tekintetében is hasonló változás jelentkezett ugyanebben a kísérleti csoportban. A mikotoxin terhelés 72. órájában a kezelt csoportok értékei visszatértek a kontroll csoportban mért szintekre. Az előzőleg bemutatott DON és T-2 toxin egyéni hatásvizsgálatban viszont nem mértem a glutation redox rendszer markereinek változását (5.1.2. fejezet), emiatt az antioxidáns rendszer aktivációja tekintetében szinergista kölcsönhatásra következtettem. A tojótúkokkal végzett, korábban bemutatott multi-mikotoxin (T-2/HT-2 toxin + DON/3Ac-DON/15-AcDON+FB1) kísérletben (5.2.2. fejezet) az alacsony dózissal kezelt csoportban mértem nagyobb GSH mennyiséget és GPx aktivitást, amely ebben a vizsgálatban (T-2/HT-2 toxin+DON/3Ac-DON/15-AcDON) nem volt megfigyelhető. Feltételezhető, hogy a

mikotoxin kombinációban a FB1 jelenléte idézte elő már az alacsony dózisban a glutation redox rendszer aktivációját, amely FB1 nélkül csak a közepes dózis hatására volt mérhető.

A glutation redox rendszer szabályozásában a T-2 toxin és a DON terhelés szignifikáns mértékű változásokat okozott. A *GPX4* génexpressziója csökkent az alacsony dózissal terhelt csoportban az első napon, a 48. órára pedig a *GSS* génexpressziója csökkent mindkét terhelt csoportban. A kísérlet végére viszont az adott gének expressziója már nem mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest a terhelt csoportokban. A korábban elvégzett egyedi mikotoxinokkal végzett kísérletben (5.1.3. fejezet) a T-2/HT-2 toxin hatására a kísérlet végén a *GSS* gén expressziójának növekedését mértem, ennek alapján a kombinációban alkalmazott T-2/HT-2 toxin és DON/3-AcDON/15-AcDON expozíció a *GSS* gén aktivációja tekintetében antagonista hatásként feltételezhető. A *Keap1* és *Nrf2* gének expressziója az első és második napon azonos mértékben és irányban változott a közepes dózis hatására. A vizsgálat végére viszont fokozott mértékű *Nrf2* génexpressziót mértem, míg a *Keap1* gén esetében nem tapasztaltam eltérést. Ezt a génexpresszió szinten kimutatott növekedést azonban nem követte az antioxidáns gének által kódolt enzimfehérjék szintézise, amelynek oka a fehérjeszintézishez szükséges idő lehetett.

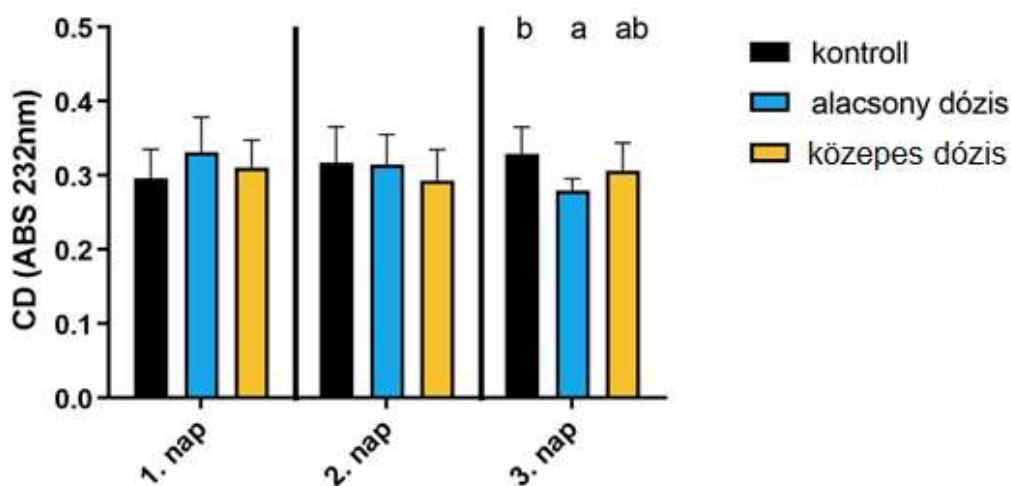
Az eredmények alapján megállapítható, hogy a 3 napos *Fusarium* multi-mikotoxin expozíció feltehetően ROS képződést eredményezett, amely együttes hatásaik révén a glutation redox rendszer aktiválásában mutatkozott meg. A második napon kialakult oxidatív stresszt, amely lipidperoxidációs folyamatokat indított el a tojótúkok májában a glutation redox rendszer a 3. napra hatékonyan eliminálta.

5.4 T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata brojlercsirkében

In vivo modellként brojlercsirkét választottam, mert az Európai Unió baromfihús termelésének legjelentősebb hányadát a vágócsirke teszi ki. Az alkalmazott mikotoxin dózisok megegyeztek az előző kísérletben leírtakkal: az „alacsony dózis” kísérleti csoportban az Európai Unió által javasolt maximális mennyiségeket alkalmaztam, míg a „közepes dózis” kísérleti csoportban ezeknek kétszeres értékeit. A 72 órás expozíciós idő alatt 24 óránként történtek a mintavételek. A takarmányok mért mikotoxin tartalmát a 3. táblázatban tüntettem fel. Az alacsony dózissal szennyezett takarmány etetése csökkentette a takarmányfelvételt, amelynek mértéke a kontrollhoz viszonyítva 89,54% volt, tehát a takarmány-visszautasítás 10,46%. A közepes dózissal terhelt csoportban a takarmányfelvétel a kontrollhoz képest 86,95% volt, azaz a takarmányfelvétel mértéke 13,05%-kal csökkent. A kísérlet ideje alatt elhullás nem volt.

5.4.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban

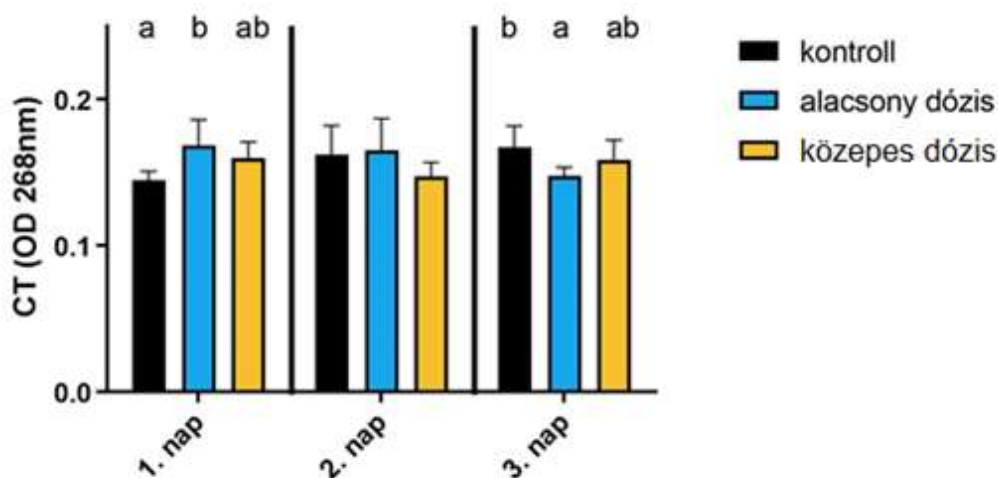
A CD értékek a 3. kísérleti napon csökkentek az alacsony dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz képest (41. ábra).



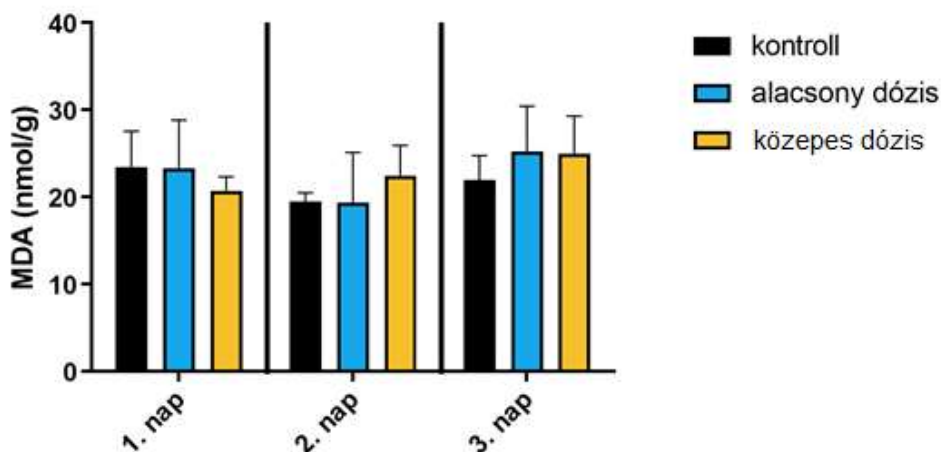
41. ábra: A konjugált diének mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns eltérést jelent.

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CT-ek mennyisége az alacsony multi-mikotoxin terhelés hatására szignifikáns mértékben nagyobb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva már az első napon. Ez a nagyobb érték a kísérlet 2. napján a kontroll értékre csökkent majd 3. napon már szignifikánsan kisebb értéket mértem a kontroll csoporthoz képest. A közepes dózis esetében ugyanakkor a kísérlet időtartama alatt nem volt szignifikáns eltérés a másik két csoporthoz viszonyítva (42. ábra). A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA

koncentrációja ugyanakkor nem mutatott statisztikailag igazolható eltérést a kísérleti csoportok között (43. ábra).



42. ábra: A konjugált triének mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns eltérést jelent.

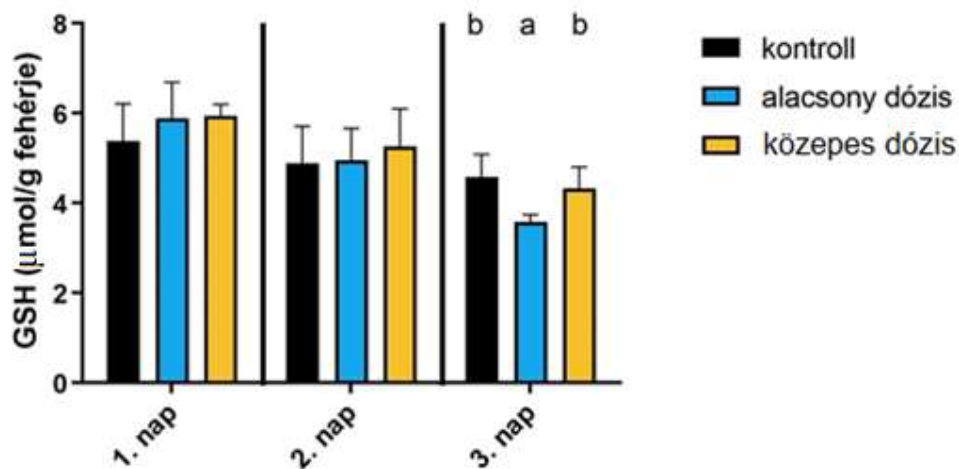


43. ábra: A malondialdehid mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány.

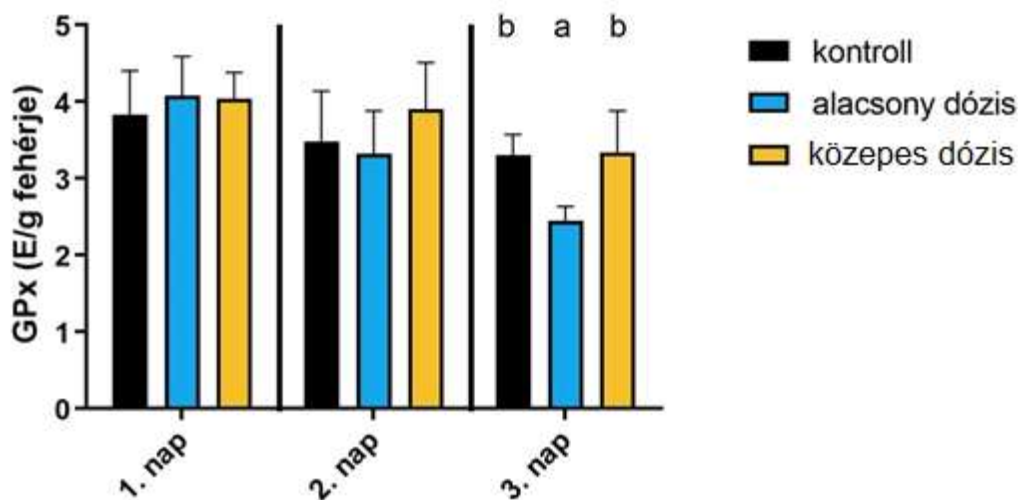
5.4.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a májban

A GSH tartalom az alacsony dózissal terhelt csoportban a harmadik napra szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll és a közepes dózisu csoport átlagos értéke (44. ábra). A GPx aktivitása a GSH-hoz hasonlóan változott, harmadik napon

szignifikánsan kisebb volt az alacsony dózissal terhelt csoportban a kontroll és a közepes dózissal terhelt csoportokhoz képest (45. ábra).



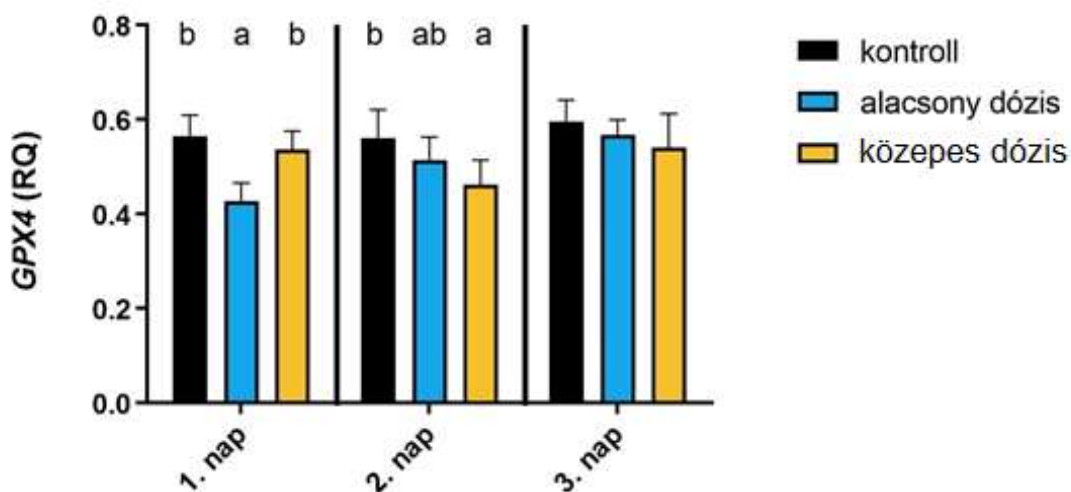
44. ábra: A redukált glutation mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



45. ábra: A glutation-peroxidáz aktivitásának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1, B2: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/ HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

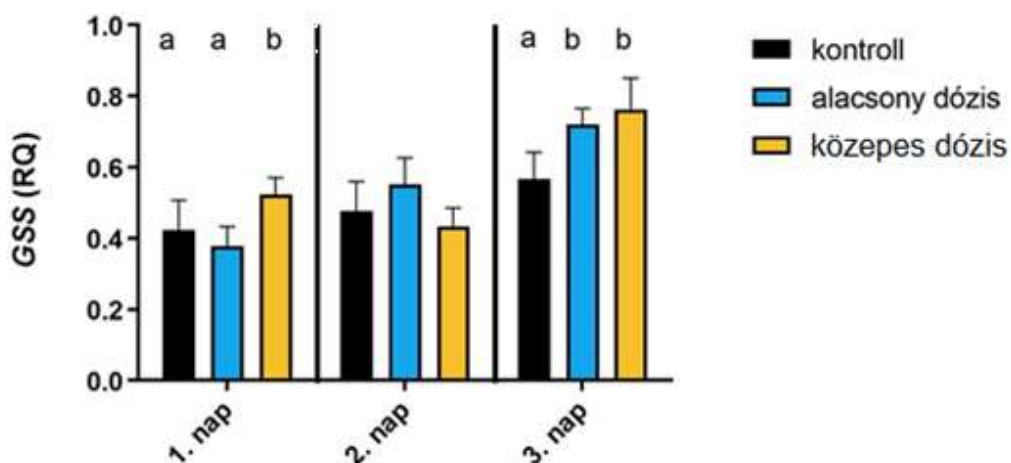
5.4.3 Multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban

A *GPX4* gén expressziója a kontroll és a közepes dózissal terhelt csoportokhoz képest az első napon szignifikánsan kisebb volt az alacsony dózissal terhelt csoportban. A 2. napon a közepes dózissal terhelt csoportban szignifikáns mértékben kisebb volt a génexpresszió a kontrollhoz képest. A kísérlet 3. napján szignifikáns különbség nem volt kimutatható (46. ábra).



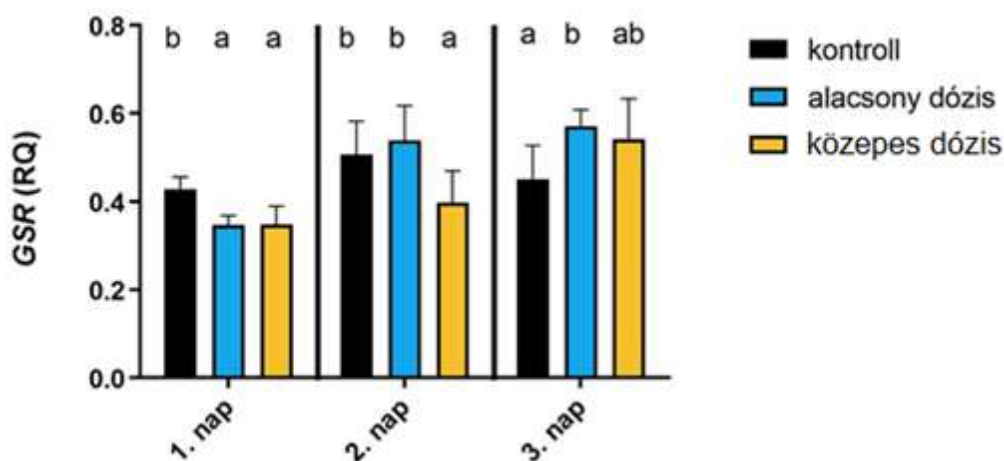
46. ábra: A *GPX4* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1, B2: 20 mg/kg takarmány, *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

A *GSS* génexpressziója a kísérlet 1. napján szignifikánsan nagyobb volt a közepes dózissal terhelt csoportban a kontroll és az alacsony dózissal terhelt csoporthoz viszonyítva. A 72. órára ugyanakkor mindkét terhelt csoportban szignifikáns mértékben nagyobb volt a génexpresszió értéke a kontroll csoporthoz képest (47. ábra).



47. ábra: A *GSS* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen kezelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

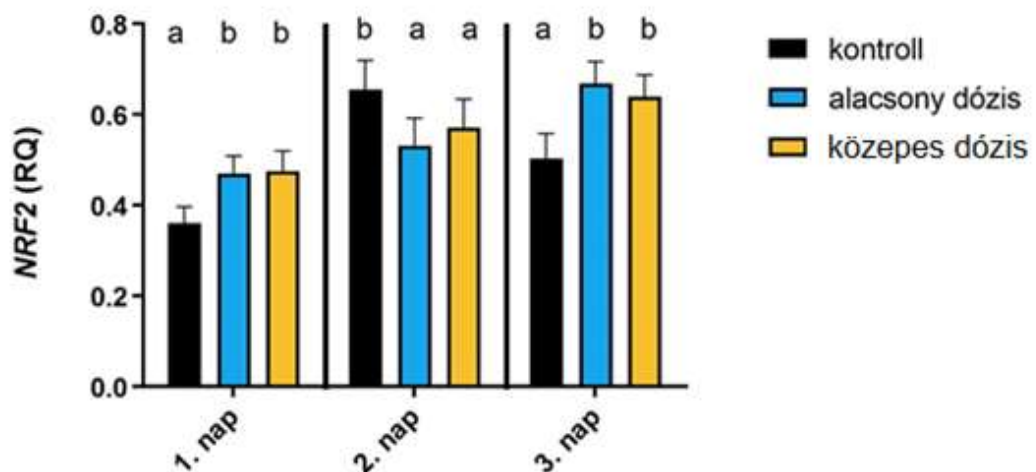
A glutation-reduktáz (*GSR*) génexpressziója az első napon szignifikánsan kisebb volt mindkét mikotoxin dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz képest. Ez a kisebb érték a 2. napon is kimutatható volt a közepes dózissal terhelt csoportban a kontroll és az alacsony dózissal terhelt csoportokhoz képest. A kísérlet 3. napján viszont szignifikánsan nagyobb értéket mértem az alacsony dózissal terhelt csoportban a kontrollhoz képest (48. ábra).



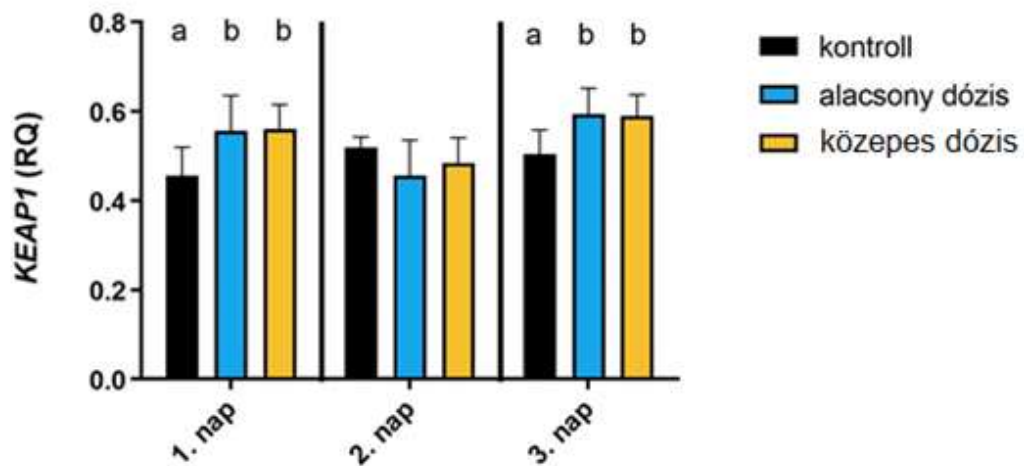
48. ábra: A *GSR* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen kezelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

Az *Nrf2* génexpressziója az első napon az alacsony és a közepes dózissal terhelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez a nagyobb értéket a 2. npra szignifikáns mértékben kisebb érték váltotta fel mindkét terhelt csoportban a kontrollhoz képest. Megjegyzendő azonban, hogy a kontroll csoportban az *Nrf2* gén expressziója ebben a mintavételi időpontban jelentősen nagyobb volt az 1. és a 3. napon mért értékekhez viszonyítva. A mikotoxin terhelésben részesült csoportokban a génexpresszió mértéke folyamatosan növekvő tendenciát mutatott a kísérlet ideje alatt. A 3. napon az első napon kapott eredményekkel megegyezően szignifikánsan nagyobb értéket figyeltem meg a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ebben az esetben azonban utalni kell arra is, hogy a kontroll csoport értéke ebben az időpontban az 1. napon mért értékhez hasonló volt (49. ábra).

A *Keap1* génexpressziója az *Nrf2* esetében megfigyeltektől eltérően alakult. A kontroll csoport értéke nem tért el jelentősen a három mintavételi időpontban, emiatt a 2. napon történt mintavételkor az egyes csoportok között nem volt szignifikáns különbség. A *Keap1* gén expressziója tehát a mikotoxin terhelés hatására kezdetben szignifikánsan növekedett, majd a 2. npra a kontroll szintjére csökkent, míg a 3. napon ismét emelkedett (50. ábra).



49. ábra: Az *Nrf2* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



50. ábra: A *Keap1* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *közepes dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg+ FB1: 40 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

5.4.4 Megbeszélés

A brojlercsirkékkel folytatott, 3 napig tartó multi-mikotoxin terheléses kísérlet során dózisfüggő, kismértékű takarmányvisszautasítást mértem, amely a trichotecén-vázás mikotoxinok jól ismert hatása (Smith, 1992). Ez a hatás még a FB1-gyel kombinálva is mérhető volt. Egy brojlercsirkékkel végzett korábbi kutatásban (Kubena et al., 1997) 300 mg/kg FB1+5 mg/kg T-2 toxin tartalmú takarmány etetésénél szintén csökkent takarmányfogyasztást figyeltek meg. A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CT-ek mennyisége nőtt az első napon az alacsony multi-mikotoxin terhelés hatására. A kísérlet végére azonban ez a kezdetben nagyobb koncentráció már csökkent a kontroll értékekhez képest. Ez az eredmény arra utal, hogy már az első napon lipidperoxidációs folyamatok aktiválódhattak a brojlercsirkék májában, a 3. napra viszont a folyamat során keletkező oxidálódott zsírsavak, valamint a máj membrán lipid-zsírsav összetételének változása miatt csökkent a lipidperoxidáció, feltehetően az oxidációra különösen hajlamos többszörösen telítetlen zsírsavak mennyiségének csökkenése miatt. A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs fázisának markereikhez hasonló változások voltak kimutathatók a glutation redox rendszer elemeinek változásában is. Az első napon oxidatív stressz alakult ki, amely lipidperoxidációs folyamatokhoz vezetett. Az MDA tartalom ugyanakkor nem változott ebben az időszakban, ami arra utal, hogy a lipidperoxidációs folyamatok feltételezhetően nem jutottak el a terminációs szakaszba, mert az antioxidáns rendszer eliminálta a képződő oxigén szabadgyököket, ezzel megakadályozva a láncreakció továbbterjedését. A kísérleti időszak végére emellett a megváltozott zsírsav-összetétel miatt feltehetően kevesebb lipid hidroperoxid is termelődött, így a csökkenő oxidatív stressz miatt csökkent a GSH mennyisége, és a GPx aktivitása is.

Szignifikáns mértékű különbségeket tapasztaltam a génexpressziós értékekben is, amely valamennyi vizsgált gén esetén hasonló tendenciát mutatott. A *GPX4* génexpressziója az első napon kisebb volt az alacsony dózissal kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva, amely a redox állapot megváltozását jelzi a májsejtekben. A *GSS* génexpressziója a kísérlet kezdetén nagyobb volt, de nem az alacsony, hanem a közepes dózissal kezelt csoportban. Peptid (GSH) szinten ugyanakkor nem volt változás. A relatív génexpresszió ezek szerint a közepes dózissal terhelt csoportban is indukálódott, de az oxidatív stressz mértéke viszont ebben a csoportban még nem ért el olyan szintet, amely aktiválta volna az antioxidáns, ezen belül a glutation redox rendszer, általam vizsgált elemeit. A glutation-diszulfid (GSSG) redukciójáért felelős *GSR* gén a 3. npra aktiválódott az alacsony dózissal kezelt csoportban, ugyanakkor ebben az időpontban a GSH tartalom csökkenését mértem, így ez a növekedés a sejt válaszreakciója volt a csökkent GSH tartalomra, de ez a hatás enzim fehérje szinten még nem nyilvánult meg. A *Keap1* és *Nrf2* gének expressziója részben azonos mértékben és irányban változott az alkalmazott dózisok hatására. Az első napon a kezelt csoportokban növekedést, majd a 2. npra csökkenést, a 3. npra pedig ismét emelkedést figyeltem meg. A 2. napon mért csökkenés azonban, ahogy erre már a korábbiakban utaltam, az *Nrf2* gén esetében összefüggésben van a kontroll csoportban mért kiemelkedően nagy értékkel. Amennyiben ettől a változástól eltekintünk, úgy az *Nrf2* gén expressziója tendenciaszerűen és folyamatosan nőtt a mikotoxin-terhelésben részesült csoportokban a kísérlet teljes időtartama alatt. Ez viszont arra utal, hogy a sejtekben a mikotoxinok hatására kialakuló redox változások és az ennek következtében kialakuló oxidatív stressz aktiválta az antioxidáns védelemben kiemelten fontos regulátor gén expresszióját (Baird & Yamamoto, 2020). A Keap-1/Nrf2 szabályozási útvonal aktiválódása mindkét mikotoxin dózis esetén kismértékű oxidatív stresszre utal (Gloire et al., 2006). Ennek az útvonalnak a hatása az első napon már fehérje szinten is érvényesül, de a kísérlet végén nem. Ebből arra következtethetünk, hogy kezdetben a preformált fehérjék poszttranszlációs folyamatok révén aktiválódtak, míg a kísérleti időszak végén a génexpressziót követően a fehérje molekulák a transzkripciót követően csak bizonyos időbeli eltéréssel szintetizálódnak.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a 3 napos *Fusarium* multi-mikotoxin expozíció ROS képződést eredményezett, amelyre mindkét dózissal kezelt csoportban génexpressziós szinten határozott válasz volt kimutatható. A génexpressziós változások azonban nem mutattak összefüggést a GSH mennyiségével és a GPx aktivitásával. Ennek hátterében a GPx, valamint a GSH szintézisében résztvevő enzimfehérjék poszttranszlációs módosítása állhat, amelynek során a polipeptid lánc különböző módosításokon megy keresztül, megváltoztatva annak működését, lokalizációját vagy más molekulákkal kialakított kapcsolatát (Shepard et al., 2010). A kapott eredmények alapján a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és a fumonizin B1 expozíció összetett toxikus hatására következtethetünk 21 napos brojlercsirkékben. Ezen folyamatok a lipidperoxidációs, de főképp a glutation redox rendszert általam vizsgált tagjainak változásában mutatkoztak meg a multi-mikotoxin terhelés időtartamától függően. Egy korábbi vizsgálat során brojlercsirkék májszövet homogenizátumban T-2 toxin hatására szintén dózis- és időfüggő változásokat

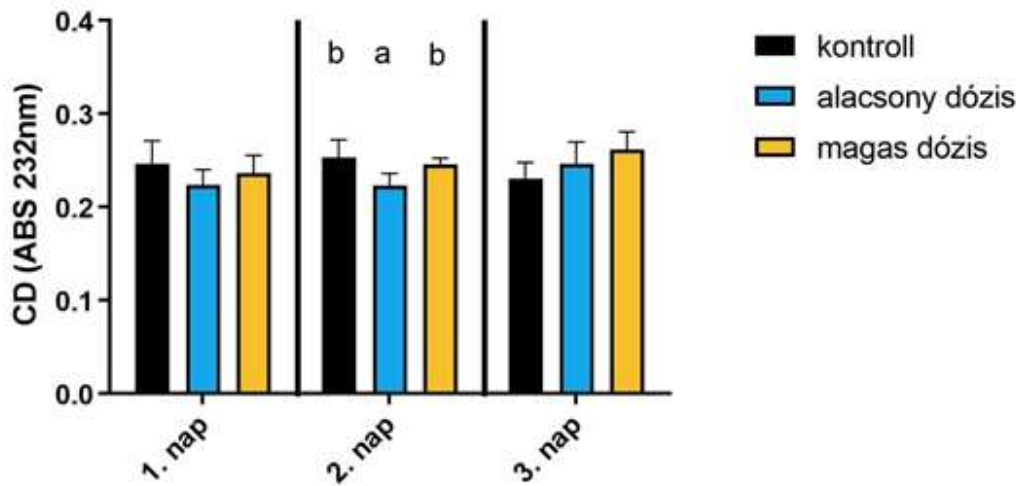
tapasztaltak az antioxidáns rendszer elemeiben (Yang et al., 2016). Vizsgálatom során a változások többnyire az egyes mikotoxinokat az EU által javasolt határérték mennyiségben alkalmazva jelentkeztek, ami arra utal, hogy az egyes mikotoxinok között az oxidatív stressz indukciója tekintetében szinergista hatás állhat fenn.

5.5 Emelt dózisú T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és fumonizin B1 terhelés rövidtávú együttes hatásának vizsgálata brojlercsirkében

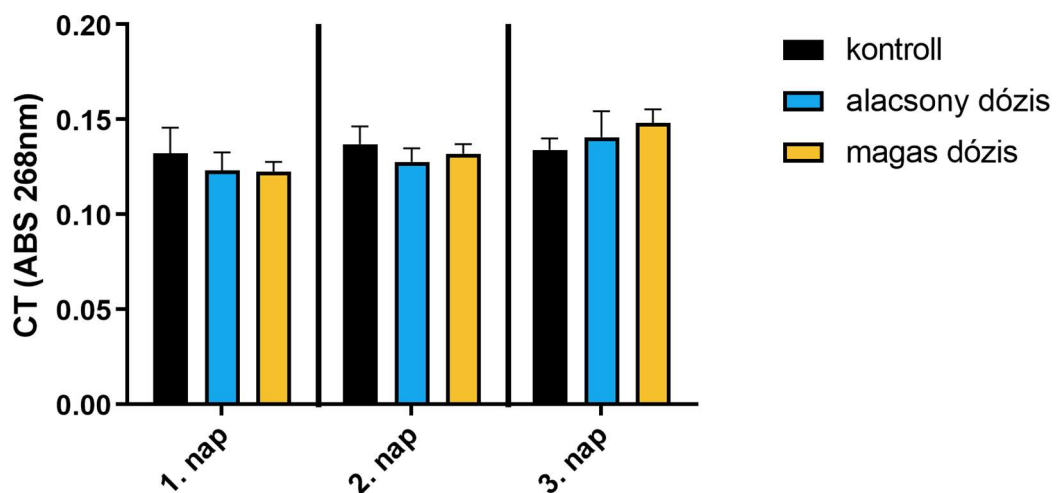
A 21 napos brojlercsirkékkel végzett etetési kísérlet során az Európai Unió által javasolt határértékek négyszeres mennyiségét alkalmaztam annak érdekében, hogy az előző kísérletben tapasztaltaknál nagyobb mértékű változásokat kapjak. A két kísérleti csoport a következőképpen alakult: „alacsony dózis” kísérleti csoportban az EU javaslati határértékekkel megegyező mennyiségű mikotoxin mennyiséggel szennyeztem a takarmányt, míg a „magas dózis” esetében ennek négyszeres mennyiségét alkalmaztam. A kísérletes szennyezéshez felhasznált takarmányok mikotoxin tartalmát a 3. táblázatban tüntettem fel, a szennyezett takarmány mikotoxin tartalmának laboratóriumi vizsgálati eredményei alapján. Elhullás a 3 napos kísérlet alatt nem jelentkezett és korábbi kísérletemtől eltérően érdemi mértékű takarmány-visszautasítást sem tapasztaltam.

5.5.1 Lipidperoxidációs paraméterek változása a májban

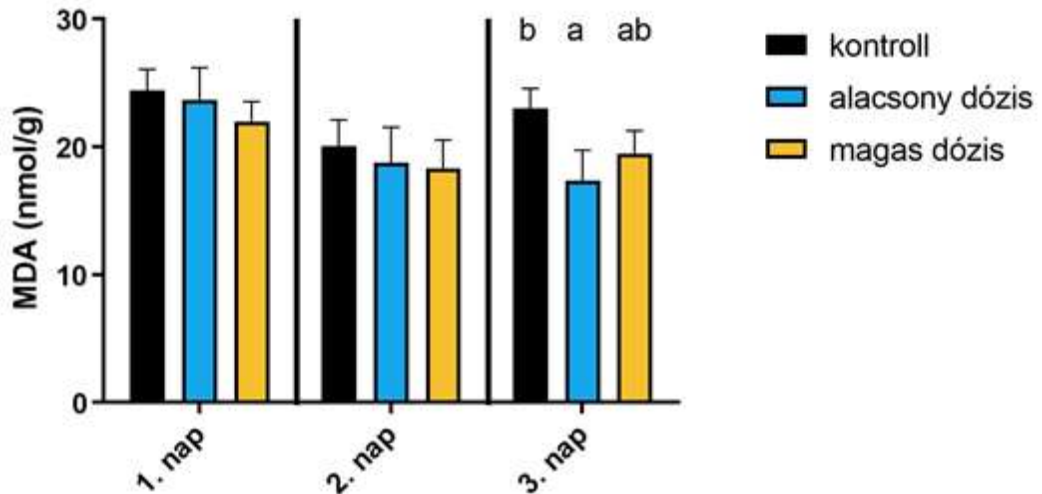
A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CD-ek mennyisége a multi-mikotoxin terhelés hatására a májban csak kismértékben változott a kontrollhoz viszonyítva. A mikotoxinokkal szennyezett takarmány etetésének megkezdését követő 48. órában ugyanakkor szignifikáns mértékben kisebb mennyiséget tapasztaltam az EU javaslati határértékeknek megfelelő mennyiségben szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban a kontrollhoz viszonyítva. Ennek négyszeres mennyiségű dózisa esetén ugyanakkor nem volt eltérés (51. ábra). A CT-ek mennyisége nem változott szignifikánsan a kísérleti időszak alatt (52. ábra). A lipidperoxidációs folyamatok terminációs szakaszát jelző MDA koncentrációja a májban a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan kisebb volt a mikotoxinokkal szennyezett takarmány etetését követő 72. órában az alacsony dózissal kezelt csoportban (53. ábra).



51. ábra: A konjugált diének mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/ HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



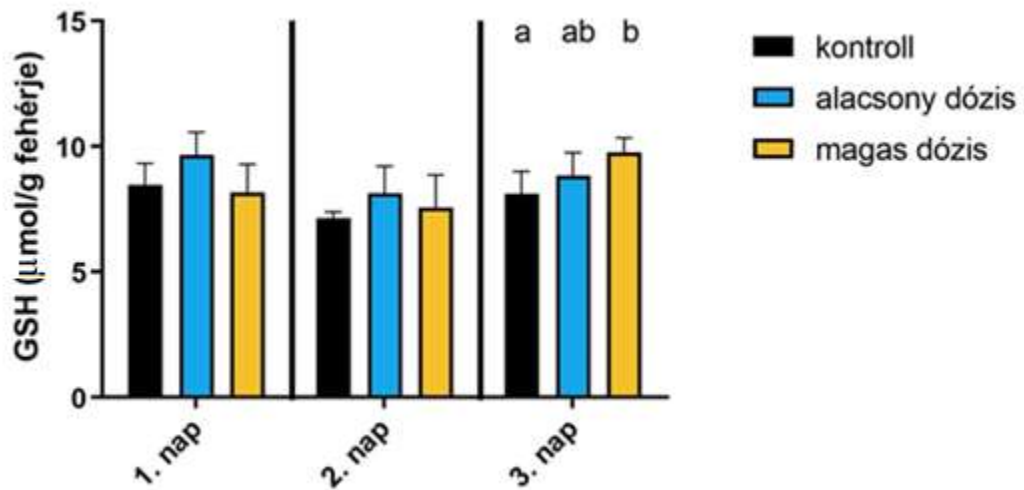
52. ábra: A konjugált triének mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/ HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány.



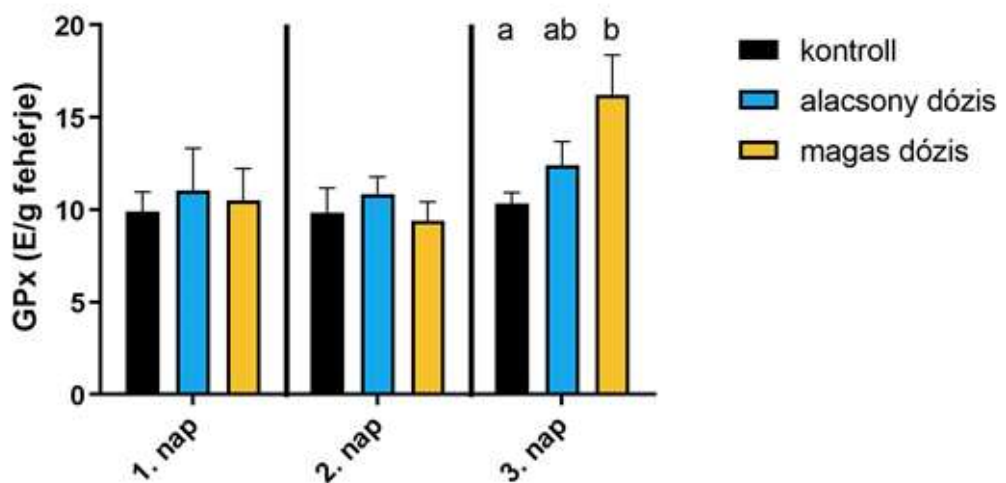
53. ábra: A malondialdehid mennyiségének változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/ HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

5.5.2 Glutation redox rendszer paramétereinek változása a vérplazmában

A glutation redox paraméterek közül a vérplazma GSH tartalmában a 72. órában dózis-hatás összefüggés volt kimutatható, de a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan nagyobb értéket csak a magas dózis hatására mutattam ki (54. ábra). A májban ugyanakkor a GSH tartalomban nem volt kimutatható mértékű változás. A GPx aktivitás a vérplazmában a kísérlet 72. órájában a nagyobb mikotoxin dózissal szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban szignifikáns növekedés volt kimutatható a kontrollhoz viszonyítva (55. ábra).



54. ábra: A redukált glutation mennyiségének változása a brojlercsirkék vérplazmájában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.



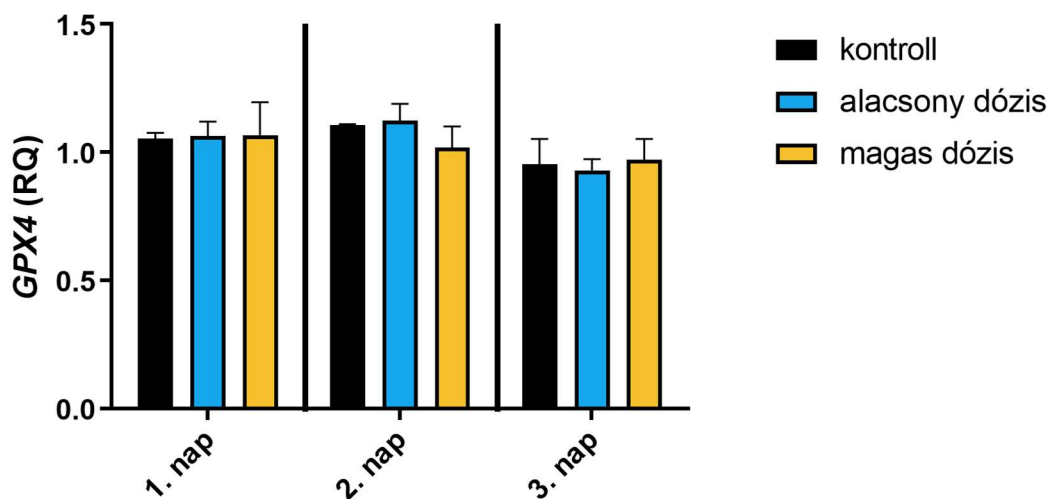
55. ábra: A glutation-peroxidáz aktivitásának változása a brojlercsirkék vérplazmájában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

5.5.3 Multi-mikotoxin terhelés hatása a glutation redox rendszer szabályozására a májban

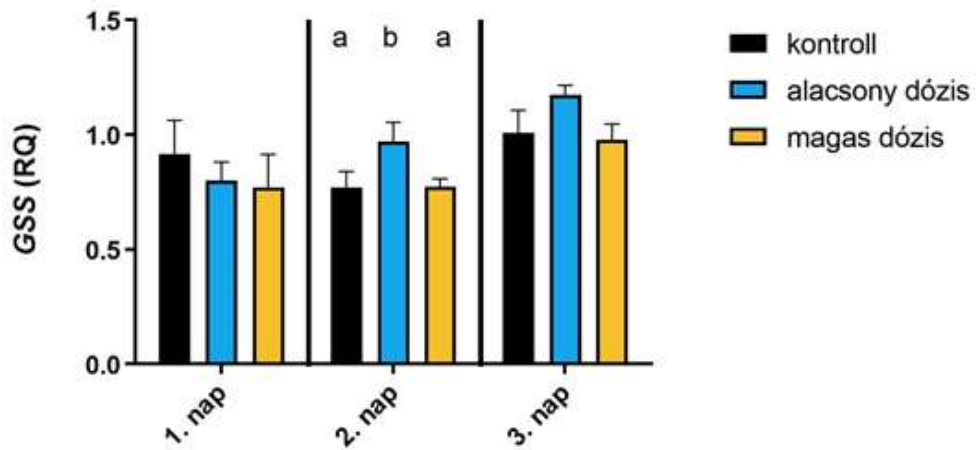
A *GPX4* génexpressziója a kísérleti időszak alatt a kontroll csoporthoz képest nem mutatott eltérést egyik kísérleti csoportban sem (56. ábra).

A *GSS* génexpressziója a kísérlet 48. órájára mutatott szignifikáns emelkedést az alacsony dózissal terhelt csoportban a kontroll és a magas dózissal terhelt csoportokhoz képest (57. ábra).

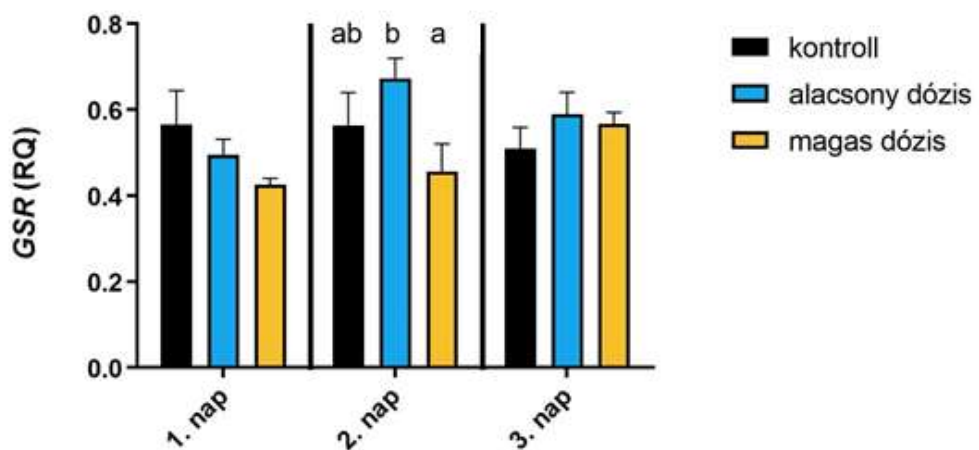
A *GSR* génexpressziója szintén a 48. órára mutatott szignifikáns mértékben nagyobb értéket az alacsony dózissal terhelt csoportban a magas dózissal terhelt csoporthoz képest, a kontroll csoporttól ugyanakkor nem tért el szignifikánsan. A 72. órában nem tapasztaltam szignifikáns mértékű változást, tendenciájában azonban mindkét terhelt csoportban nagyobb érték volt kimutatható a kontroll csoporthoz képest (58. ábra).



56. ábra: A *GPX4* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány.

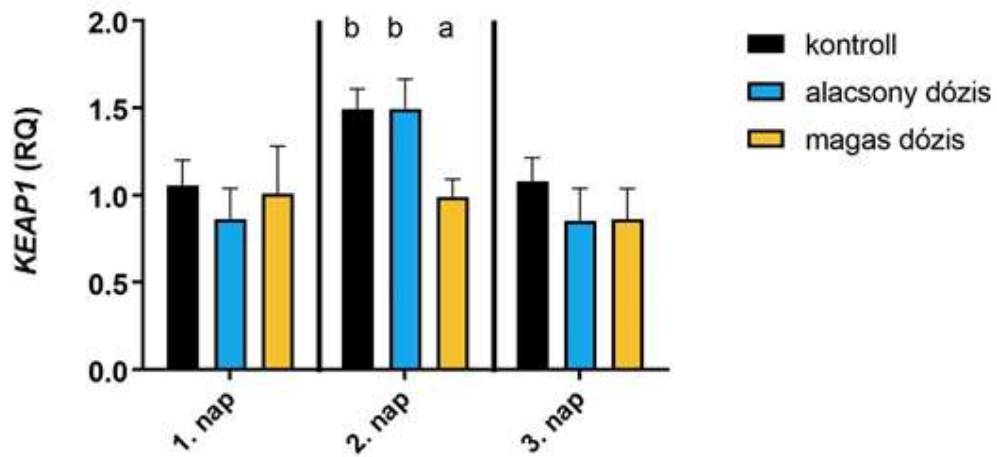


57. ábra: A *GSS* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).



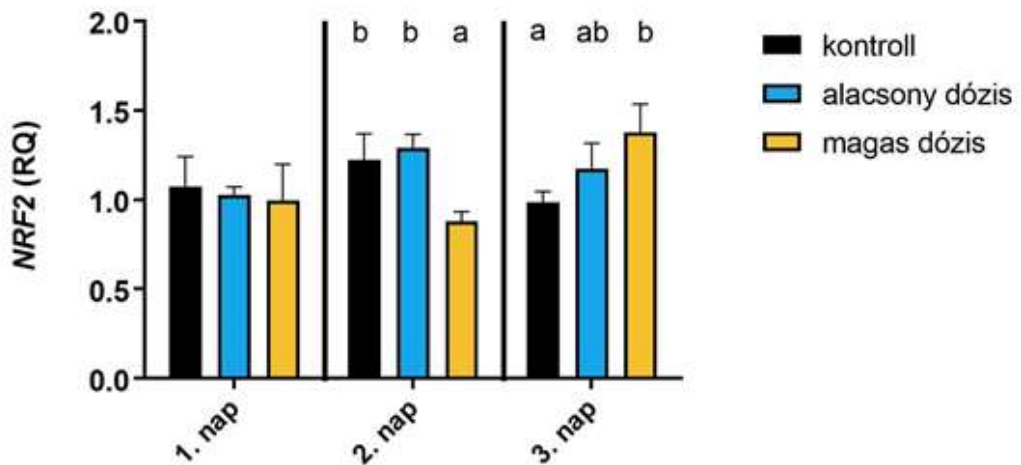
58. ábra: A *GSR* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

A *Keap1* és *Nrf2* gének expressziója hasonlóan alakult a 2. napon. A *Keap1* gén kifejeződése szignifikánsan kisebb volt a magas dózissal terhelt csoportban a kontroll és az alacsony dózissal terhelt csoportokhoz képest (59. ábra).



59. ábra: A *Keap1* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$).

Az *Nrf2* gén expressziója a *Keap1* génexpressziójához hasonlóan a 2. napon szignifikánsan kisebb, a 3. napon viszont szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest a magas dózissal terhelt csoportban (60. ábra).



60. ábra: Az *Nrf2* génexpressziójának változása a brojlercsirkék májában a kísérlet 72 órája alatt. Mikotoxinokkal együttesen terhelt csoportok: *alacsony dózis*: T-2/HT-2 toxin: 0,25 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 5 mg/kg+ FB1: 20 mg/kg takarmány; *magas dózis*: T-2/HT-2 toxin: 1 mg/kg+ DON/3-AcDON/15-AcDON: 20 mg/kg+ FB1: 80 mg/kg takarmány. Az a, b jelölés a szignifikáns eltéréseket mutatja a kezelési csoportok között ($p < 0,05$). Az „ab” jelölés nem szignifikáns különbséget jelent.

5.5.4 Megbeszélés

A lipidperoxidációs folyamatok iniciációs szakaszát jelző CD mennyisége a 48. órában szignifikánsan kisebb volt az EU javaslati határértékekkel megegyező dózisok alkalmazásakor a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ennek a csökkenésnek a hátterében a mikotoxin terhelés hatására a májszövet lipid-zsír-sav összetételében bekövetkező változás állhat, amelyet FB1 és T-2 toxin individuális terhelés hatására korábban nyúlban már kimutattak (Szabó et al., 2016). A megváltozott zsír-sav-összetétel befolyásolhatja a lipidek oxidáció iránti érzékenységet, azaz a reaktív oxigén gyökök hatására bekövetkező lipidperoxidációs folyamatokat (Holman, 1954). A MDA koncentrációja a kontrollhoz viszonyítva szintén csökkent a mikotoxinokkal szennyezett takarmány etetését követő 72. órában az alacsony dózissal kezelt csoportban. Ez az eredmény is alátámasztja azt, a CD esetében leírt, feltételezésemet, amely szerint a mikotoxin terhelés dózisfüggően befolyásolja a májszövet zsír-sav-összetételét. Ennek révén pedig a lipidperoxidációs folyamatok intenzitását is, amely a 48. órában még csak a folyamat iniciációs szakaszát jelző CD, míg egy nappal később már a terminációs szakaszra utaló MDA koncentrációban is kimutatható volt.

A GSH mennyisége és a GPx aktivitása nagyobb volt a vérplazmában a magas dózissal terhelt csoportban a kontroll csoporthoz képest a kísérlet végére (72. óra). Ez az eredmény arra utal, hogy a nagyobb mértékű mikotoxin terhelés hatására mérsékelt oxidatív stressz alakult ki, amelynek hatására aktiválódott a glutation redox rendszer, amely azonban csak a vérplazmában volt kimutatható. Ezt a hatást T-2 toxin és DON individuális terhelés során baromfiban korábban már megfigyelték (Nakade et al., 2018). A májban ugyanakkor a GSH mennyisége és a GPx aktivitása nem változott, ami arra utal, hogy a multi-mikotoxin terhelés hatására nem alakult ki olyan mértékű oxidatív stressz, amely a májban is kimutatható változást eredményezett volna. Miután a T-2 toxin és a DON közel azonos dózissal történt individuális terhelése során a májban nőtt a GSH tartalom és a GPx aktivitás (Nakade et al., 2018), ezért feltételezhető, hogy multi-mikotoxin terhelés hatására antagonistá hatás lép fel az oxidatív stressz indukcióját figyelembe véve.

A *GPX4* gén aktivációjának elmaradása magyarázatot adhat arra, hogy miért nem történt meg a glutation redox rendszer aktivációja fehérje szinten a májban. A *GSS* és a *GSR* génexpressziója azonban emelkedést mutatott a kísérlet 48. órájára az alacsony dózissal terhelt csoportban, amely kismértékű oxidatív stresszre utal. Ez lehet a magyarázata a GSH tartalom nem szignifikáns mértékű változásának a májban, amely a GSH szintézisében és redukciójában szerepet játszó enzimeket kódoló gének expressziója szintjén igen, de fehérje, azaz enzim, szinten már ne jelentkezett. Az alkalmazott mikotoxin kombináció magas dózisban csökkentette a *Keap1* és *Nrf2* génexpresszióját a második napon, a harmadik napra viszont növekedést mértem, de csak az *Nrf2* gén esetében. Ebből arra következtettem, hogy a kísérlet végére a magas dózissal terhelt csoportban kialakult oxidatív stressz mértéke a májban elérte azt a szintet, amelynek hatására bekövetkezett az *Nrf2*-indukált antioxidáns válaszelem aktiváció, ami viszont fehérje szinten még nem volt mérhető a kísérlet rövid időtartama alatt.

6. ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1 Következtetések

Ebben a fejezetben a kutatásaim fő témáját, a rövidtávú T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 egyedi és együttes alkalmazásának hatását célzó vizsgálataim eredményei alapján levonható általános következtetéseket és javaslatokat mutatom be.

A mesterségesen szennyezett, ismert mikotoxin tartalmú, illetve a mikotoxinokat a detektálhatósági határérték alatt tartalmazó kontroll takarmányt *ad libitum* fogyasztották az állatok. A toxin koncentrációk meghatározásához az Európai Unió által megállapított, a baromfi takarmányokban javasolt maximális mikotoxin mennyiségek (2006/576/EK és 2013/165/EU ajánlások) nyújtottak kiindulási alapot. A kísérletek során ezeknek a mennyiségeknek egyszeres, kétszeres vagy négyszeres értékeit alkalmaztam annak érdekében, hogy már rövidtávon is jól mérhető változásokat kapjak. Egy 2022-ben végzett felmérés szerint Európában a *Fusarium* nemzetségbe tartozó gombák által termelt mikotoxinok a takarmányozásra szánt gabonafélék nagy részében kimutathatóak voltak. A kimutatott mikotoxin mennyiségek ugyan átlagosan alacsonyabbak voltak az EU által javasolt határértékeknél, de kiugróan magas értékeket is találtak (DSM, 2022). A baromfi fajokat a *Fusarium* mikotoxinokra kevésbé érzékeny állatfajnak tekintik (Mézes et al., 1999), ezért általában csak szubkrónikus és szubklinikai tünetekből következtethetünk a fusariotoxinok jelenlétére, például növekedésbeli lemaradás, csökkenő takarmányfelvétel, csökkent tojástermelés és testsúlygyarapodás alapján (Sokolović et al., 2008). Kísérleteim alatt tojótyúkknál takarmány-visszautasítást nem tapasztaltam, a brojlercsirkékkel végzett multi-mikotoxin terhelés során viszont 10%-ot meghaladó mértékű takarmány visszautasítást tapasztaltam a javaslati határértékek és azok kétszeres mennyiségének alkalmazásakor. A T-2 toxin és a DON az agy szerotonin és dopamin rendszerének megzavarásával emetikus hatásúak (Smith, 1992; Sokolović et al., 2008). A FB1-gyel kombinációban egy kísérletben (5.4. fejezet) szintén tapasztaltam ezt a hatást, a többi vizsgálatban viszont vagy a rövid idő vagy az alacsony koncentrációk miatt ez a hatás nem jelentkezett. Az általam alkalmazott dózisok hatására elhullást egyik kísérlet során sem figyeltem meg.

Tojótyúkokkal végzett egyedi rövid távú vizsgálatban a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 mikotoxinok javaslati határértékeinek kétszeres mennyiségének expozíciója a harmadik napra csökkentette a lipidperoxidáció kezdeti szakaszát jelző CD mennyiségét, DON hatására pedig a terminációs szakaszban keletkező MDA tartalmat is. A FB1-gyel terhelt csoportban a glutation redox rendszer elemeinek mennyisége, illetve aktivitása is csökkent ebben az időpontban. A kísérlet végén mért változások összefüggésben állhatnak a takarmány tranzit idejével, azaz a mikotoxinnal mesterségesen szennyezett takarmány bélcsatornából történő felszívódásához, majd a mikotoxinok májba történő transzportjához szükséges időtartammal. Az eredmények azt mutatják, hogy az alkalmazott mikotoxinok befolyásolhatták a membrán foszfolipidek zsírsavösszetételét és ezáltal azok oxidáció iránti érzékenységet. A vizsgált mikotoxinok befolyásolták továbbá a glutation redox

rendszer egyes enzimjeit kódoló gének relatív génexpresszióját már az első napon, de ez a hatás nem jelentkezett a GSH mennyisége és a GPx aktivitás szintjén. Az Nrf2-ARE útvonal aktiválódása kismértékű oxidatív stressz jelenlétére utal, amely növelte az antioxidáns enzimeket kódoló gének expresszióját.

Tojótúkokkal végzett kombinált, 3 napos T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 expozíció az első napon ROS képződéshez vezetett madarak májában az alacsony dózissal terhelt csoportban, ami lipidperoxidációs folyamatokat indukált, amit az MDA megnövekedett mennyisége bizonyított. Erre válaszul aktiválódott az antioxidáns védelmi rendszer, amelyre a GSH tartalom és GPx aktivitás növekedése utalt. Ez a kombinált hatás génexpressziós szinten is megnyilvánult és a biokémiai paraméterek értékét is befolyásolta. A változások többnyire az egyes mikotoxinokat a EU által javasolt határértékben alkalmazva jelentkeztek, ami arra utal, hogy az egyes mikotoxinok között az oxidatív stressz indukciója tekintetében szinergista hatás állhat fenn. A másik lehetséges magyarázat, hogy a kisebb mennyiség a bélrendszerből gyorsabban felszívódik, majd a májban metabolizálódik, így gyorsabban idéz elő reaktív oxigéngyök termelést. A javasolt határértékek kétszeres mennyiségének expozíciója is növelte a MDA koncentrációját, illetve az antioxidáns gének (*GPX4*, *GSS*, *GSR*) relatív expresszióját az első napon. Az azonos koncentrációban vizsgált mikotoxinokat egyedileg alkalmazva ugyanakkor nem tapasztaltunk a *GSS* és *GSR* gének aktivációját, így a magasabb dózis esetében is az egyéni hatásoknál jelentősebb, azaz szinergista hatás valószínűsíthető.

Tojótúkok trichotecén-vázis mikotoxinokkal (T-2/HT-2 toxin + DON/3Ac-DON/15-AcDON) történt rövid távú egyidejű terhelésével céltom a hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkező mikotoxinok együttes hatásának vizsgálata volt, illetve az, hogy FB1 nélkül milyen eltérések mutatkoznak az előző kísérletben tapasztaltakhoz képest, így abból a FB1 hatására is következtethetem. Az eredmények alapján elmondható, hogy a multi trichotecén-vázis expozíció a második napon ROS képződést idézett elő, amely lipidperoxidációs folyamatokat indukált a mikotoxinok javaslati határértékkel megegyező mennyiségét alkalmazva. A FB1-et is tartalmazó mesterségesen szennyezett takarmány etetésekor már korábban, az első napon tapasztaltam ugyanezt a változást, ami arra utal, hogy a FB1 jelenléte fokozza a ROS képződést, illetve az korábban következik be. A glutation redox rendszer elemei ugyanakkor eltérően változtak: a GSH mennyisége és a GPx aktivitása a közepes dózis hatására növekedett, míg a FB1-et is tartalmazó multi-mikotoxin keverék hatására az alacsony dózis idézte elő ugyanezt a változást a kísérlet első napján. A FB1 jelenléte tehát felerősítette a T-2 toxin és DON oxidatív stressz generáló hatását, amely már a javaslati határértékek alkalmazásánál is megfigyelhető, enélkül viszont csak a közepes dózissal van ilyen hatása. A relatív génexpresszió (*GPX4*, *GSS*, *GSR*) többnyire csökkent majd a kontroll szinttel azonosult a kísérlet első napján. A FB1-et is tartalmazó multi-mikotoxin keverék hatására ugyanakkor az antioxidáns enzimeket kódoló gének expressziója általában nőtt mindkét dózissal terhelt csoportban. Ennek alapján levonható az a következtetés, hogy a FB1 hatására gyorsabban és hatékonyabban nő az antioxidáns fehérjéket kódoló gének expressziója. Az *Nrf2* gén

aktivációja csak a közepes dózis hatására következett be a kísérleti időszak harmadik napján, de ez az aktiváció még nem nyilvánult meg az antioxidáns gének szintjén.

Brojlercsirkékkel végzett két eltérő dózisban alkalmazott multi-mikotoxin expozíció is oxidatív stresszt indukált az állatok szervezetében. A tojótyúkokkal ellentétben a brojlercsirkék feltehetően érzékenyebbek a mikotoxinok hatásai iránt. Az általam alkalmazott mikotoxin mennyiségnél nagyobb dózis alkalmazásakor fiatal állatokban korábbi vizsgálatokban csökkent testtömeg gyarapodást, nagyobb relatív szervtömeget és hasmenést figyeltek meg például FB1 hatására (Brown et al., 1992). Saját vizsgálataim során az EU javaslati határértékek és azok kétszeres mennyiségének rövidtávú alkalmazása sem idézett elő változásokat az általam vizsgált paraméterekben. A mért génexpressziós változások fokozott ROS képződésre utalnak, de a glutation redox rendszer csak kismértékben aktiválódott mikotoxinokkal terhelt csoportokban és csak a kísérleti időszak kezdetén, annak első napján. A kismértékű és nem szignifikáns mértékű eltérések miatt a következő kísérletben megnöveltem a mikotoxin koncentrációkat, a magas dózissal kezelt csoportban már az EU javaslati határértékek négyszeres mennyiségét alkalmaztam. A glutation redox rendszer mennyisége (GSH) és aktivitása (GPx) a vizsgált *Fusarium* mikotoxinok hatására a vérplazmában nőtt, a májban viszont nem változott. Génexpressziós változások, a *GSS* és a *GSR* expressziója is növekedett, de csak az alacsony dózis hatására. Ez a hatás azonban csak génexpresszió szinten nyilvánult meg, de nem befolyásolta a biokémiai paramétereket a májban. Ennek alapján feltételezhető, hogy a nagyobb dózisú terhelés hatására mérsékelt oxidatív stressz alakult ki, amely azonban a májban még nem érte el az a kritikus szintet, amely a glutation redox rendszer érdemi aktiválódását váltotta volna ki.

Az általam elvégzett rövid távú kísérletek alapján elmondható, hogy a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és a FB1-et együtt alkalmazva a tojótyúk és a brojlercsirkék szervezetében oxidatív stresszt vált ki. A Keap1/Nrf2/ARE transzkripciós útvonal aktivációja mérsékelt oxidatív stressz jelenlétére utal, amelyet a glutation redox rendszer hatékonyan semlegesített az antioxidáns enzimeket kódoló gének hatékony expressziójának köszönhetően. A vizsgált *Fusarium* toxinok egyedi hatásai a javaslati határérték kétszeres mennyiségének alkalmazásakor eltérőek voltak a mikotoxinok együttes alkalmazásaiknál tapasztaltaktól. A kombinált hatás többnyire szinergista volt az egyes mikotoxinok között az oxidatív stressz indukciója tekintetében, amely arra utal, hogy további részletes vizsgálatok szükségesek multi-mikotoxin expozíció hatásainak felmérése céljából.

6.2 Javaslatok

A T-2/HT-2 toxin, a DON/3-AcDON/15-AcDON és a FB1 rövid távú hatásai baromfi esetében csak részben ismertek, a ROS képződésre gyakorolt hatásuk pedig ellentmondásos. A vizsgált mikotoxinok már az EU javaslati határértékek alkalmazásánál is oxidatív stresszt okoztak a tojótyúk szervezetében. A keresztszennyezések gyakorisága miatt egyre fontosabbá válnak az együttesen előforduló mikotoxinok kölcsönhatásának kutatása. Ennek alapján, eddigi eredményeimre alapozva javaslom a kutatások folytatását akár új célgénekkal együtt, illetve az általam vizsgált gének expressziós változásainak nyomkövetését más kémiai szerkezetű mikotoxinok vonatkozásában is.

Az általam vizsgált mikotoxinok esetében az AhR – Xenobiotikum Válasz Elem (XRE) útvonal vizsgálatát is javaslom az alábbi kutatásokra alapozva. Az AhR útvonal a xenobiotikus vegyületek, például a mikotoxinok méregtelenítő folyamataihoz kapcsolódik (Arenas-Huertero et al., 2019), míg az *Nrf2* útvonal az antioxidáns válasz fő szabályozója, amely a II. fázisú antioxidáns és sejtvédelmi funkciókat szabályzó gének transzkripciójáért felelős. A T-2 toxin indukálta az AhR expresszióját, és elősegítette az AhR transzlokációját a sejtmagba, valamint kötődését a XRE-hez (Liu et al. 2019). A DON esetében megfigyelték, hogy az *AhR1*, *AhR2* expressziós szintje nőtt brojler csirkékben. A FB1 pedig hatással van az AhR útvonalhoz kapcsolódó génekre azáltal, hogy fokozza a CYP1A2 expresszióját (Paraskeuas et al. 2021).

Mivel az interakció jellegét befolyásolhatja az állat faja, fajtája, ivara, tápláltsági állapota és az alkalmazott mikotoxinok dózisa, valamint az expozíció időtartama, ezért javaslom más gazdasági, vagy laboratóriumi állatfajon is elvégezni a kísérleteket, a javaslati vagy a kötelező érvényű határértékek használatával. Javaslom továbbá hosszútávú, krónikus vizsgálatok elvégzését is, hogy felmérjük a hosszú távú folyamatos mikotoxin felvétel hatását a sejtszinten bekövetkező redox változásokra és az ennek hatására bekövetkező oxidatív stresszre.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Tojóttyúkokkal végzett rövidtávú (72 óra) etetési kísérlet során megállapítottam, hogy a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 mikotoxinokat az EU által javasolt határérték mennyiségben együttesen alkalmazva a májban egyes lipidperoxidációs folyamatok indukálódtak, amelyre válaszként aktiválódott glutation redox rendszer, ami azt bizonyítja, hogy oxidatív stressz alakult ki. Az egyes vizsgált mikotoxinok egyedi hatásához képest a multi-mikotoxin hatás kifejezettebb volt, ami közöttük szinergista kölcsönhatásra utal.
2. Megállapítottam, hogy tojóttyúkokban vizsgált *Fusarium* toxinok az EU javaslati határérték kétszeres mennyiségének alkalmazása esetén az egyedi hatások eltérőek voltak azok együttes alkalmazásánál tapasztaltaktól. A mikotoxin kombináció ebben a dózisban alkalmazva lipidperoxidációs folyamatokat generált, illetve növelte egyes antioxidáns gének (*GSS*, *GSR*) relatív expresszióját, ami a mikotoxinok egyedi hatásainál nem volt megfigyelhető.
3. Megállapítottam, hogy T-2/HT-2 toxin és a DON/3-AcDON/15-AcDON együttes hatásai eltérőek voltak attól, ha hármas kombinációt T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON, FB1 alkalmaztam. A mikotoxin kombinációban a FB1 jelenléte felerősítette a két trichotecén-vázis mikotoxin oxidatív stressz generáló hatását tojóttyúkokban.
4. Megállapítottam, hogy brojlercsirkében a T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 mikotoxinok együttes expozíciójának hatására az *Nrf2* és *Keap1* gének relatív expressziója az EU javaslati határérték egyszeres és kétszeres mennyisége esetén is növekedett, ami mérsékelt oxidatív stressz kialakulására utal. Ennek hatására az antioxidáns válaszelem (ARE) aktivációja a redox-érzékeny gének (*GSS*, *GSR*) expresszióját eredményezte.
5. Megállapítottam, hogy T-2/HT-2 toxin, DON/3-AcDON/15-AcDON és FB1 mikotoxinok az EU javaslati értékeinek négyszeres mennyiségének alkalmazásának hatására a brojlercsirkék vérplazmájában nőtt a glutation redox rendszer mennyisége/aktivitása, amelynek hátterében az *Nrf2* gén aktivációja állhat a májban.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

A mikotoxinok előfordulása a takarmányban és az élelmiszerekben világméretű probléma, ami növekvő állat- és humánegészségügyi veszélyt, valamint gazdasági veszteségeket idéz elő az élelmiszer- és takarmányiparban. A takarmány alapanyagok és kész takarmányok mikotoxin szennyezettségének az elmúlt években történt felmérései alapján elmondható, hogy Európában leggyakrabban a *Fusarium* mikotoxinok előfordulásával kell számolni, amelyek közül a legjelentősebbek a T-2/HT-2 toxin, a dezoxinivalenol (DON) és metabolitjai (3-AcDON, 15-AcDON) valamint a fumonizin B1 (FB1). A monitoring vizsgálatok azt is kimutatták, hogy természetes körülmények között ezek a mikotoxinok többnyire együtt fordulnak elő. A mikotoxinok közötti kölcsönhatásokat vizsgálva megállapították, hogy a legtöbb mikotoxinkeverék additív vagy szinergista hatást fejt ki, amely alátámasztja a multi-mikotoxin keverékekkel végzett kísérletek fontosságát.

A fentiek alapján kutatásom célja annak a felmérése volt, hogy a fent említett *Fusarium* mikotoxinokkal eltérő mennyiségben mesterségesen szennyezett takarmányok etetése milyen multi-toxikus hatást vált ki a baromfi lipidperoxidációs folyamataira, a glutation redox rendszer elemeinek mennyiségére és aktivitására, illetve annak szabályozására génexpresszió szinten. A trichotecén-vázis mikotoxinok (T-2 toxin, DON) az epoxi csoport megléte miatt reaktív vegyületek, amelyek oxigén szabadgyök képződést generálnak az állati szervezetben. A FB1 ugyanakkor a szfingolipidek metabolizmusában zavart okozva idézhet elő oxidatív stresszt.

Kísérleteimet az egyes mikotoxinok egyedi hatásvizsgálatával kezdtem tojótúrákban a fent említett mikotoxinokkal. A rövid távú (72 óra) etetési kísérletben az EU-ban javasolt maximális mennyiségek kétszeresét alkalmaztam (T-2/HT-2 toxin: 0,5 mg/kg; DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg; FB1: 40 mg/kg takarmány). Az eredmények főképp a T-2 toxin és a DON hatására mutattak szignifikáns mértékű változást, génexpresszió szinten már az első napon aktiválták az antioxidáns védelmi rendszert, megakadályozva a lipidperoxidációs folyamatok kialakulását. A következő vizsgálatban a három mikotoxint együttesen alkalmaztam és két dózisban vizsgáltam azok hatását: alacsony dózisban (EU javaslati határértékekkel megegyező mennyiségek) és közepes dózisban (a határértékek kétszeres mennyiségei). A lipidperoxidációs és a glutation redox rendszer tagjainak értékeiben a változások többnyire az alacsony dózissal kezelt csoportban voltak megfigyelhetők, amely a mikotoxinok között fennálló szinergista kölcsönhatásra utal. Egy további kísérletben két trichotecén-vázis mikotoxin (T-2 toxin, DON) együttes hatását vizsgáltam tojótúrákban. Az alkalmazott dózisok az EU javaslati határértékek egyszeres és kétszeres mennyisége voltak. A három napos expozíció oxidatív stresszt idézett elő tojótúrák májában, amire a lipidperoxidációs folyamatok terminációs fázisában keletkező malondialdehid tartalom növekedése alapján lehet következtetni. Az antioxidáns rendszer aktivációja azonban a kialakult oxidatív stresszt semlegesíteni tudta.

Egy következő kísérletben 21 napos brojlercsirkék oxidatív paramétereit vizsgáltam az előbbi mikotoxin dózisok alkalmazásakor. A génexpresszió szinten kimutatott

változások ROS képződésre utalnak, de ez fehérje szinten az elvégzett rövidtávú kísérlet során nem érvényesült. A kismértékű változások miatt egy következő kísérletben nagyobb mikotoxin koncentrációkat alkalmaztam brojlercsirkében: a magas dózissal terhelt csoport az EU javaslati határértékek négyszeres mennyiségű mikotoxin expozícióban részesült. A glutation redox rendszer vizsgált elemeinek értékei, a GSH tartalom és a GPx aktivitás nagydózisú terhelés hatására a vérplazmában nőtt, de a májban nem változott. Ennek alapján feltételezhető, hogy nagy dózisú terhelés hatására mérsékelt oxidatív stressz alakult ki, amely azonban a májban még nem érte el az a kritikus értéket, amely a glutation redox rendszer érdemi aktiválódását váltotta volna ki.

Kísérleteim eredményei alapján a vizsgált mikotoxinok befolyásolták a glutation redox rendszer enzimeit kódoló egyes gének relatív expresszióját, ez a hatás viszont az általam elvégzett rövidtávú kísérletekben nem jelentkezett a redukált glutation mennyiségének és a glutation-peroxidáz aktivitásának szintjén. A három napos kísérletek alatt az oxidatív stressz kialakulása az alkalmazott dózistól és a terhelési időtől függött, de a keletkező reaktív oxigén szabadgyököket a glutation redox rendszer a vizsgálati időszak végére többnyire semlegesítette. A legtöbb változás multi-mikotoxin terhelés esetén az Európai Unió által javasolt határértékek alkalmazásánál volt mérhető, ezért javasolható a határértékek felülvizsgálata.

9. SUMMARY

The occurrence of mycotoxins in feed and food is a worldwide problem, which is explained by the increasing risks to animal and human health. Based on the assessment of the mycotoxin contamination of feed materials, the occurrence of *Fusarium* mycotoxins is the most common in Europe. These monitoring studies have shown that mycotoxins mostly occur together in natural conditions. Recently, several *in vivo* short-term and long-term studies have been done with farm animals, where the interactions between mycotoxins have been investigated. Based on the research so far, it can be said that the mycotoxin mixtures have an additive or synergistic effect, which emphasizes the importance of multi-mycotoxin experiments.

My research aimed to evaluate the multi-mycotoxin effect on the lipid peroxidation processes, the amount and/or activity of the elements of the glutathione redox system, and the transcription regulation of the expression of redox-sensitive and antioxidant genes in poultry. Trichothecene mycotoxins (T-2 toxin, DON) are chemically reactive compounds due to the presence of the epoxy group, capable of generating oxygen-free radicals. FB1 also can cause oxidative stress by disturbing the sphingolipid metabolism and can induce lipid peroxidation.

I started my experiments by investigating the individual effect of T-2/HT-2 toxin, DON, and FB1 in laying hens in a short-term (72 hours) experiment, with a double dose of the EU recommendation limit for mycotoxin contamination (T-2/HT-2 toxin: 0.5 mg/kg; DON/3-AcDON/15-AcDON: 10 mg/kg; FB1: 40 mg/kg feed). The results showed significant changes at the gene expression level, mainly as an effect of T-2 toxin and DON. The antioxidant defense system was activated on the first day, preventing the development of lipid peroxidation processes. In the following multi-mycotoxin study, a short-term (72 hours) feeding trial was performed with laying hens in two doses: low dose (EU-recommendation doses) and high dose (twice the low dose). Changes in lipid peroxidation and an increase in the markers of the glutathione redox system were mostly observed in the group treated with the low dose, which supposes a synergistic interaction between the mycotoxins was investigated. In the next experiment, the combined effect of two trichothecene mycotoxins (T-2 toxin, DON) was investigated in laying hens. A three-day multi-mycotoxin exposure caused oxidative stress in the liver of the laying hens. The marker of the termination phase of lipid peroxidation, the malondialdehyde content, was increased in the low-dose group. However, activating the antioxidant system adequately neutralized the oxidative stress by the end of the experimental period.

In a further experiment, I investigated the oxidative parameters of 21-day-old broiler chickens using the above-mentioned mycotoxin doses. Changes in the relative gene expression values assumed ROS formation; however, members of the glutathione redox system were synthesized to a small extent in the treated groups and only on the first day of the experiment. In the next study, the applied mycotoxin concentrations were higher due to the moderate response in the previous study. The high-dose group was used to quadruple the recommended EU recommended limit values. The amount (GSH) and activity (GPx) of the glutathione redox system was higher in the blood

plasma but not changed in the liver. Based on the results, it can be assumed that the high dose induced a low oxidative stress in blood plasma. Still, it was lower than the critical value to activate the antioxidant response in the liver.

According to the results, the examined mycotoxins influenced the relative expression of genes encoding the enzymes of the glutathione redox system. Still, this effect did not occur at the level of reduced glutathione and glutathione peroxidase activity. During the three-day experiment, the development of oxidative stress depended on the applied dose and treatment time, and the glutathione redox system was mostly capable of neutralizing the generated free radicals by the end of the experiment. Most changes were measured when applying the EU-proposed limit values; therefore, a revision of the limit values is recommended due to the multitoxic effects.

MI IRODALOMJEGYZÉK

1. Agrawal, M., Yadav, P., Lomash, V., Bhaskar, A. S. B., Rao, P. L. (2012): T-2 toxin induced skin inflammation and cutaneous injury in mice. *Toxicology*, 302(2-3), 255-265.
2. Albarenque, S. M., Shinozuka, J., Iwamoto, S., Nakayama, H., Doi, K. (1999): T-2 toxin-induced acute skin lesions in Wistar-derived hypotrichotic WBNILA-Ht rats. *Histology and histopathology*, 14(2), 337-342.
3. Alexander, N. J., McCormick, S. P., Waalwijk, C., van der Lee, T., Proctor, R. H. (2011): The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(5), 485-495.
4. Alizadeh, A., Braber, S., Akbari, P., Kraneveld, A., Garssen, J., Fink-Gremmels, J. (2016): Deoxynivalenol and its modified forms: are there major differences? *Toxins*, 8(11), 334.
5. 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. Microbiology*. 10, 2347.
6. Antonissen, G., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Janssens, G. P., De Baere, S., Croubels, S. (2015): Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(50), 10846-10855.
7. AOAC (1984): *Official Methods of Analysis* (28.054) 14th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 243.
8. Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K., Yamamoto, M. (2001): Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 173(3), 154-160.
9. Arbor Assays (2016): Simplify your Glutathione Measurements. <https://www.arborassays.com/supersensitive-easy-measurement-gsh/> (letöltve: 2023.10.05.)
10. Avissar, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R. H., Kerl, E. A., Cohen, H. J. (1994): Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 266(2), C367-C375.
11. Awad, W. A., Vahjen, W., Aschenbach, J. R., Zentek, J. (2011): A diet naturally contaminated with the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) downregulates gene expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. *Livestock Science*, 140, 72–79.
12. Awad, W., Ghareeb, K., Böhm, J., Zentek, J. (2013): The toxicological impacts of the *Fusarium* mycotoxin, deoxynivalenol, in poultry flocks with special reference to immunotoxicity. *Toxins*, 5(5), 912-925.
13. Baird, L., Yamamoto, M. (2020): The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40(13), e00099-20.
14. Baird, S.K., Kurz, T., Brunk, U. T. (2006): Metallothionein protects against oxidative stress induced lysosomal destabilization. *Biochemical Journal* 394 (1), 275–283.

12. Balogh, K., Bócsai, A., Pelyhe, C., Zándoki, E., Erdélyi, M., Szabó-Fodor, J., Mézes, M. (2015): Effects of long-term feeding of graded levels of T-2 toxin-contaminated diets on performance, some lipid peroxide and glutathione redox status parameters of broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 52(3), 176-182.
15. Behne, D., Pfeifer, H., Röthlein, D., Kyriakopoulos, A. (2002): Cellular and subcellular distribution of selenium and selenium-containing proteins in the rat. In: Roussel, A. M., Anderson, R. A., Favier, A. E. eds.: *Trace Elements in Man and Animals*. Springer, (10), 29-34.
16. Benlasher, E., Geng, X., Xuan Nguyen, N. T., Tardieu, D., Bailly, J. D., Auvergne, A., Guerre, P. (2012): Comparative effects of fumonisins on sphingolipid metabolism and toxicity in ducks and turkeys. *Avian Diseases*, 56(1), 120-127.
17. Bennett J. W., Klich M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
18. Bin-Umer, M. A., McLaughlin, J. E., Basu, D., McCormick, S., Tumer, N. E. (2011): Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation—Implication for the mechanism of toxicity. *Toxins*, 3(12), 1484-1501.
19. Bócsai, A., Pelyhe, C., Zándoki, E., Ancsin, Z., Szabó-Fodor, J., Erdélyi, M., Balogh, K. (2016): Short-term effects of T-2 toxin exposure on some lipid peroxide and glutathione redox parameters of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 520-525.
20. Bolisetty, S., Jaimes, E. A. (2013): Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6306-6344.
21. Bouhet, S., Oswald, I. P. (2005): The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1-2), 199-209.
22. Bounous, G., Sukkar, S., Molson, J. H. (2003): The antioxidant system. *Anticancer Research*, 23(2), 1411-1416.
23. Brown, T. P., Rottinghaus, G. E., Williams, M. E. (1992): Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. *Avian Diseases*, 450-454.
24. Bryden, W.L. (2012): Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134–158.
25. Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A. T., Calabrese, E. J. (2009): Vitagenes, cellular stress response, and acetylcarnitine: relevance to hormesis. *Biofactors*, 35(2), 146-160.
26. Caloni, F., Spotti, M., Pompa, G., Zucco, F., Stamatii, A., De Angelis, I. (2002): Evaluation of fumonisin B1 and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2. *Toxicon*, 40(8), 1181-1188.
27. Canady, R. A., Coker, R. D., Egan, S. K., Krska, R., Olsen, M., Resnik, S., Schlatter, J. (2001): T-2 and HT-2 toxins. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *WHO Food Additives Series*, 47, 557-597.

28. Cao, C., Xian, R., Lin, F., Li, X., Li, X., Qiang, F., Li, X. (2022): Fumonisin B1 induces hepatotoxicity in mice through the activation of oxidative stress, apoptosis and fibrosis. *Chemosphere*, 296, 133910.
29. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59, 527–606.
30. Chaudhari, M., Jayaraj, R., Bhaskar, A. S. B., Rao, P. L. (2009): Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. *Toxicology*, 262(2), 153-161.
31. Chaudhary, M., Rao, P. L. (2010): Brain oxidative stress after dermal and subcutaneous exposure of T-2 toxin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3436-3442.
32. Chen, J. H., Xue, S., Li, S., Wang, Z. L., Yang, H., Wang, W., Song, D., Zhou, X., Chen, C. (2012): Oxidant damage in Kashin-Beck disease and a rat Kashin-Beck disease model by employing T-2 toxin treatment under selenium deficient conditions. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(8), 1229-1237.
33. Christensen, M. J., Burgener, K. W. (1992): Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *The Journal of Nutrition*, 122(8), 1620-1626.
34. Chu, F. F., Esworthy, S. R. (1995): The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(2), 288-294.
35. Cavret, S., Lecoecur, S. (2006): Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 444-453.
36. Chandratre, C. A., Telang, A. G., Badgujar, P. C., Raut, S. S., Sharma, A. K., (2014): Toxicopathological alterations induced by high dose dietary T-2mycotoxin and its residue detection in Wistar rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 124–138.
37. Cheng, D., Wu, R., Guo, Y., Kong, A. N. T. (2016): Regulation of Keap1–Nrf2 signaling: the role of epigenetics. *Current Opinion in Toxicology*, 1, 134-138.
38. Chung, Y. J., Zhou, H. R., Pestka, J. J. (2003): Transcriptional and posttranscriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF- α expression by deoxynivalenol (vomitoxin). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193, 188–201.
39. Cockman, E. M., Narayan, V., Willard, B., Shetty, S. P., Copeland, P. R., Driscoll, D. M. (2019): Identification of the Selenoprotein S Positive UGA Recoding (SPUR) element and its position-dependent activity. *RNA Biology*, 16(12), 1682-1696.
40. Cundliffe, E., Davies, J. E. (1977): Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(3), 491-499.
41. Dänicke, S., Gareis, M., Bauer, J. (2001): Orientation values for critical concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in diets for pigs, ruminants and gallinaceous poultry. *Proceedings of the Society of Nutrition and Physiology*, 10, 171-174.
42. Dänicke, S., Ueberschar, K. H., Halle, I., Matthes, S., Valenta, H., Flachowsky, G. (2002): Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing

uncontaminated or *Fusarium* toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. *Poultry Science*, 81(11), 1671-1680.

43. Di Bartolomeo, S., Di Sano, F., Piacentini, M., Spinedi, A. (2000): Apoptosis induced by doxorubicin in neurotumor cells is divorced from drug effects on ceramide accumulation and may involve cell cycle-dependent caspase activation. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), 532-539.
44. Díaz, M., Mesa-Herrera, F., Marín, R. (2021): DHA and its elaborated modulation of antioxidant defenses of the brain: Implications in aging and AD neurodegeneration. *Antioxidants*, 10(6), 907.
45. Del Regno, M., Adesso, S., Popolo, A., Quaroni, A., Autore, G., Severino, L., Marzocco, S. (2015): Nivalenol induces oxidative stress and increases deoxynivalenol pro-oxidant effect in intestinal epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 285(2), 118-127.
46. Deyu, H., Luqing, C., Xianglian, L., Pu, G., Qirong, L., Xu, W., Zonghui, Y. (2018): Protective mechanisms involving enhanced mitochondrial functions and mitophagy against T-2 toxin-induced toxicities in GH3 cells. *Toxicology Letters*, 295, 41-53.
47. DSM (2022): <https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en/documents/dsm-world-mycotoxins-survey-2022-report.pdf>
48. Erdélyi, M., Weber, M., Balogh, K., Ancsin, Z., Mézes, M. (2011): The effect of feeding a diet naturally contaminated with deoxynivalenol on production traits and selected biochemical indicators of broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno*, 80(3), 287-292.
49. Eriksen, G. S., Pettersson, H. (2004): Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114(1-4), 205-239.
50. 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 Biology*, 6, 183-197.
51. EU (2006/576/EK): A Bizottság 2006/576/EK ajánlása a deoxinivalenol, a zearalenon, az ochratoxin-A, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról. *EU Hivatalos Lapja*, L229. 7.
52. Fang, H., Wu, Y., Guo, J., Rong, J., Ma, L., Zhao, Z., Zuo, D., Peng, S. (2012): T-2 toxin induces apoptosis in differentiated murine embryonic stem cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Apoptosis*, 17, 895-907.
53. Ficheux, A. S., Sibiril, Y., Parent-Massin, D. (2012): Co-exposure of *Fusarium* mycotoxins: in vitro myelotoxicity assessment on human hematopoietic progenitors. *Toxicol*, 60(6), 1171-1179.
54. Fodor, J., Németh, M., Kametler, L., Pósa, R., Kovács, M., Horn, P. (2006): Novel methods of *Fusarium* toxins' production for toxicological experiments. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 10, 277–285.
55. Fodor, J., Meyer, K., Gottschalk, C., Mamet, R., Kametler, L., Bauer, J. M., Horn, P., Kovács, P., Kovacs, M. (2007): *In vitro* microbial metabolism of fumonisin B1. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), 416-420.

56. Fodor, J., Balogh, K., Weber, M., Mézes, M., Kametler, L., Pósa, R., Mamet, R., Bauer, J., Horn, P., Kovács, F., Kovács, M. (2008): Absorption, distribution and elimination of fumonisin B1 metabolites in weaned piglets. *Food Additives and Contaminants*, 25(1), 88-96.
57. Forcina, G. C., Dixon, S. J. (2019): GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis. *Proteomics*, 19(18), 1800311.
58. Fremy, J. M., Alassane-Kpembi, I., Oswald, I. P., Cottrill, B., & Van Egmond, H. P. (2019): A review on combined effects of moniliformin and co-occurring Fusarium toxins in farm animals. *World Mycotoxin Journal*, 12(3), 281-291.
59. Frisvad, J. C. (1995): Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. *Stored Grain Ecosystems*, 251-288.
60. Galvano, F., Russo, A., Cardile, V., Galvano, G., Vanella, A., Renis, M. (2002): DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 40(1), 25-31.
61. Gardner, H. W. (1989): Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(1), 65-86.
62. Ghareeb, K., Awad, W. A., Böhm, J. (2012): Ameliorative effect of a microbial feed additive on infectious bronchitis virus antibody titer and stress index in broiler chicks fed deoxynivalenol. *Poultry Science*, 91(4), 800-807.
63. Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. (2006): NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493-1505.
64. Goetz, M. E., Luch, A. (2008): Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Letters*, 266(1), 73-83.
65. Gougerot-Pocidallo, M. A., El Benna, J., Elbim, C., Chollet-Martin, S., Dang, M. C. (2002): Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro-and anti-inflammatory cytokines. *Journal de la Société de Biologie*, 196(1), 37-46.
66. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1985): *Free radicals in biology and medicine*. First edition, Oxford University Press, Oxford
67. Halliwell, B. (1991): Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 14-22.
68. Halliwell, B., Chirico, S. (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715-725.
69. Halliwell, B. (1999): Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1-2), 37-52.
70. He, F., Ru, X., Wen, T. (2020): NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4777.
71. Hendrich, S., Miller, K. A., Wilson, T. M., Murphy, P. A. (1993): Toxicity of *Fusarium proliferatum*-fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: Effect of nutritional status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10), 1649-1654.

72. Holman, R. T. (1954): Autoxidation of fats and related substances. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, 2, 51-98.
73. Hou, Y. J., Zhao, Y. Y., Xiong, B., Cui, X. S., Kim, N. H., Xu, Y. X., Sun, S. C. (2013): Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse. *PLoS One*, 8(3), e60374.
74. Huang, C., Wu, P., Jiang, W. D., Liu, Y., Zeng, Y. Y., Jiang, J., Kuang, S., Tang, L., Zhang, Y., Zhou, X., Feng, L. (2018): Deoxynivalenol decreased the growth performance and impaired intestinal physical barrier in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 376-391.
75. 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.
76. Huang, P., Akagawa, K., Yokoyama, Y., Nohara, K., Kano, K., Morimoto, K. (2007): T-2 toxin initially activates caspase-2 and induces apoptosis in U937 cells. *Toxicology Letters*, 170(1), 1-10.
77. Huff, W. E., Doerr, J. A., Hamilton, P. B., Vesonder, R. F. (1981): Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in broiler chickens. *Poultry Science*, 60(7), 1412-1414.
78. Humpf, H. U., Schmelz, E. M., Meredith, F. I., Vesper, H., Vales, T. R., Wang, E., Menaldino, D. S., Liotta, D. C., Merrill, A. H. (1998): Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase: formation of N-palmitoyl-aminopentol produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin, AP1, and a new category of ceramide synthase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 19060-19064.
79. IARC (International Agency for Research on Cancer) (2002): IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. (82), 301-366. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC, Lyon France
80. Imai, H., Nakagawa, Y. (2003): Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 145-169.
81. Ito, H., Watanabe, K., Koyama, J. (1982): The immunosuppressive effects of trichothecenes and cyclochlorotrine on the antibody responses in guinea pigs. *Journal of Pharmacobio-dynamics*, 5(6), 403-409.
82. Jeeva, J. S., Sunitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesh, M., Krishnan, R. (2015): Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7(Suppl 2), S331.
83. Jouany, J. P., Yiannikouris, A., Bertin, G. (2009): Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options Méditerranéennes*, A, 85, 205-224.
84. Kendzierski, C.M., Zhang, Y., Lan, H., Attie, A.D. (2003): The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics* (4), 465-477.
85. Khan, R. B., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A. A. (2018): Fumonisin B1 induces oxidative stress in oesophageal (SNO) cancer cells. *Toxicon*, 141, 104-111.

86. Klarić, M. Š. (2012): Adverse effects of combined mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(4), 519-530.
87. Kouadio, J. H., Mobio, T. A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S. D., Creppy, E. E. (2005): Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213(1-2), 56-65.
88. Kövesi, B., Kulcsár, S., Zándoki, E., Szabó-Fodor, J., Mézes, M., Balogh, K., Ancsin, Zs., Pelyhe, C. (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.
89. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R., Gladyshev, V. N. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624), 1439-1443.
90. Kubena, L. F., Huff, W. E., Harvey, R. B., Phillips, T. D., Rottinghaus, G. E. (1989): Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Science*, 68(5), 622-626.
91. Kubena, L. F., Edrington, T. S., Harvey, R. B., Buckley, S. A., Phillips, T. D., Rottinghaus, G. E., Casper, H. H. (1997): Individual and combined effects of fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poultry Science*, 76(9), 1239-1247.
92. Kuca, K., Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D. (2008): Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism*, 9(1), 77-82.
93. Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T. W. (2002): Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 2883-2892.
94. Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. (2014): Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological Reviews*, 94(3), 739-777.
95. Laurain, J., Tardieu, D., Matard-Mann, M., Rodriguez, M. A., Guerre, P. (2021): Fumonisin B1 accumulates in chicken tissues over time and this accumulation was reduced by feeding algo-clay. *Toxins*, 13(10), 701.
96. Ledoux, D. R., Brown, T. P., Weibking, T. S., Rottinghaus, G. E. (1992): Fumonisin toxicity in broiler chicks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(3), 330-333.
97. Li, G., Shinozuka, J., Uetsuka, K., Nakayama, H., Doi, K. (1997): T-2 toxin-induced apoptosis in Peyer's patches of mice. *Journal of Toxicologic Pathology*, 10(1), 59-61.
98. Liu, Q., Wen, J., Zhu, J., Zhang, T., Deng, Y., Jiang, J. 2019. Aromatic hydrocarbon receptor regulates chicken cytochrome P450 1A5 transcription: A novel insight into T-2 toxin-induced gene expression and cytotoxicity in LMH cells. *Biochemistry and Pharmacology* 168, 319–329.
99. Liu, H., Forouhar, F., Lin, A. J., Wang, Q., Polychronidou, V., Soni, R. K., Xia, X., Stockwell, B. R. (2022): Small-molecule allosteric inhibitors of GPX4. *Cell Chemical Biology*, 29(12), 1680-1693.

100. 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.
101. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, (193) 265-275.
102. Lun, A. K., Young, L. G., Moran, J. E. T., Hunter, D. B., Rodriguez, J. P. (1986): Effects of feeding hens a high level of vomitoxin-contaminated corn on performance and tissue residues. *Poultry Science*, 65(6), 1095-1099.
103. Magyar Takarmánykódex (2004): Gazdasági állatok táplálékanyag szükséglete. II/II kötet, OMMI, Budapest
104. Marasas, W. F., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelberblom, W. C., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, D., Starr, L., Sullards, C., Roman, A., Voss, K. A., Wang, E., Merrill J. A. H. (2004): Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 711-716.
105. Maresca, M., Mahfoud, R., Garmy, N., Fantini, J. (2002): The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *The Journal of Nutrition*, 132(9), 2723-2731.
106. Martinet, W., De Meyer, G. R. Y., Herman, A. G., Kockx, M. M. (2004): Reactive oxygen species induce RNA damage in human atherosclerosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(5), 323-327.
107. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., Olalla, L., Segura, J. M., Blanca, M. (2000): Allergy to drugs: antioxidant enzymic activities, lipid peroxidation and protein oxidative damage in human blood. *Cell Biochemistry and Function: Cellular Biochemistry and its Modulation by Active Agents or Disease*, 18(2), 77-84.
108. Matkovichs, B., Szabó, L. Sz., Varga, I. (1988): Lipideroxidáció és a redukált glutation anyagcsere enzimek aktivitásának meghatározása biológiai mintákban. *Laboratóriumi Diagnosztika* (15), 248-250.
109. McCormick, S. P., Alexander, N. J. (2002): Fusarium Tri8 encodes a trichothecene C-3 esterase. *Applied and Environmental Microbiology*, (68), 2959–2964.
110. McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., Alexander, N. J. (2011): Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802-814.
111. McMahan, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31556-31567.
112. Mekhancha-Dahel, C., Lafarge-Frayssinet, C., Frayssinet, C. (1990): Immunosuppressive effects of four trichothecene mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 7(S1), S94-S96.

113. Mézes, M., Barta, M., Nagy, G. (1999): Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Research in Veterinary Science*, 66(1), 19-23.
114. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (21), 20340-20348.
115. Middlebrook, J.L., Leatherman, D.L. (1989): Specific associations of T-2 toxin with mammalian cells. *Biochemical Pharmacology*, (38), 3093–3102.
116. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., Zujko, M. E. (2018): Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68-78.
117. Mishra, S., Tewari, P., Chaudhari, B. P., Dwivedi, P. D., Pandey, H. P., Das, M. (2016): Deoxynivalenol induced mouse skin tumor initiation: Elucidation of molecular mechanisms in human HaCaT keratinocytes. *International Journal of Cancer*, 139(9), 2033-2046.
118. Nakade, M., Pelyhe, C., 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.
119. Nayakwadi, S., Ramu, R., Kumar Sharma, A., Kumar Gupta, V., Rajukumar, K., Kumar, V., Shirahatti, P. S., L, R., Basalingappa, K. M. (2020): Toxicopathological studies on the effects of T-2 mycotoxin and their interaction in juvenile goats. *PLoS One* 15, e0229463.
120. Nelson, P. E., Plattner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. (1992): Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 984-989.
121. Neurath, M. F. (2014): Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329-342.
122. Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y. J., Schlegel, H. B. (2020): Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 37-43.
123. Osuchowski, M. F., Sharma, R. P. (2005): Fumonisin B1 induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2 cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant. *Neurotoxicology*, 26(6), 981-992.
124. Ouyang, H., Zhu, H., Li, J., Chen, L., Zhang, R., Fu, Q., Li, X., Cao, C. (2022): Fumonisin B1 promotes germ cells apoptosis associated with oxidative stress-related Nrf2 signaling in mice testes. *Chemico-Biological Interactions*, 363, 110009.
125. Pace, J. G., Watts, M. R., Canterbury, W. J. (1988): T-2 mycotoxin inhibits mitochondrial protein synthesis. *Toxicon*, 26(1), 77-85.

126. Paraskeuas, V., Griela, E., Bouziotis, D., Fegeros, K., Antonissen, G., Mountzouris, K. C. (2021): Effects of Deoxynivalenol and Fumonisin on Broiler Gut Cytoprotective Capacity. *Toxins*. 13, 729.
127. Payros, D., Alassane-Kpembi, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., Oswald, I. P. (2016): Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*, 90, 2931-2957.
128. Pelyhe, C.; 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.
129. Pestka, J. J., Bondy, G. S. (1990): Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(7), 1009-1016.
130. Pier, A. C., Richard, J. L., Cysewski, S. J. (1980): Implications of mycotoxins in animal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(8), 719-724.
131. Pierron, A., Mimoun, S., Murate, L. S., Loiseau, N., Lippi, Y., Bracarense, A.-P. F.L., Schatzmayr, G., He, J.W., Zhou, T., Moll, W.-D., Oswald, I.P. (2016): Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Scientific Reports*, 6, 29105
132. Placer, Z. A., Cushman, L. L., Johnson, B. C. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl diadehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-364.
133. Poersch, A. B., Trombetta, F., Braga, A. C. M., Boeira, S. P., Oliveira, M. S., Dilkin, P., Mallmann, C. A., Figuera, M. R., Royes, L. F. F., Oliveira, M. S., Furian, A. F. (2014): Involvement of oxidative stress in subacute toxicity induced by fumonisin B1 in broiler chicks. *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), 180-185.
134. Prelusky, D. B., Hamilton, R. M. G., Trenholm, H. L., Miller, J. D. (1986): Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens. *Fundamental and Applied Toxicology*, 7(4), 635-645.
135. Premier, L.; Piérard, J.Y.; Anselme, M.; Tangni, E.K.; Motte, J.C.; Larondelle, Y. (2006): Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants*, 23, 1208–1218.
136. Proctor, R. H., Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Hohn, T. M. (1999): A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology*, 27(1), 100-112.
137. Qureshi, M. A., Hagler Jr, W. M. (1992): Effect of fumonisin-B1 exposure on chicken macrophage functions in vitro. *Poultry Science*, 71(1), 104-112.
138. Rahman, K. (2007): Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
139. Ramos-Gomez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T. W. (2001): Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-

- deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(6), 3410-3415.
140. Ravindran, J., Agrawal, M., Gupta, N., Rao, P. L. (2011): Alteration of blood brain barrier permeability by T-2 toxin: Role of MMP-9 and inflammatory cytokines. *Toxicology*, 280(1-2), 44-52.
 141. Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P., Visioli, F. (2008): Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research*, 57(6), 451-455.
 142. Riley, P. A. (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27-33.
 143. Riley, R. T., Enongene, E., Voss, K. A., Norred, W. P., Meredith, F. I., Sharma, R. P., Spitzbergák, J., Williams, DE., Carlson, DB., Merrill Jr, A. H. (2001): Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 109(suppl 2), 301-308.
 144. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179(4073), 588-590.
 145. Rotter, B. A. (1996): Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 48(1), 1-34.
 146. Ruiz, M. J., Franzova, P., Juan-García, A., Font, G. (2011a): Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells in vitro. *Toxicon*, 58(4), 315-326.
 147. Ruiz, M. J., Macáková, P., Juan-García, A., Font, G. (2011b): Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10), 2718-2724.
 148. Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A. M. (2007): Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(1), 49-89.
 149. Sadler, T. W., Merrill, A. H., Stevens, V. L., Sullards, M. C., Wang, E., Wang, P. (2002): Prevention of fumonisin B1-induced neural tube defects by folic acid. *Teratology*, 66(4), 169-176.
 150. Sedlak, J, Lindsay, R.H. (1968): Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.
 151. Sehata, S., Kiyosawa, N., Atsumi, F., Ito, K., Yamoto, T., Teranishi, M., Uetsuka, K., Nakayama, H., Doi, K. (2005): Microarray analysis of T-2 toxin-induced liver, placenta and fetal liver lesions in pregnant rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(1), 15-28.
 152. Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Theil, P. G., Gelderblom, W.C.A. (1990): Quantitative determination of fumonisins B1 and B1 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077-2087.
 153. Shephard, G. S., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Savard, M. E. (1995): Fate of a single dose of ¹⁴C-labelled fumonisin B1 in vervet monkeys. *Natural Toxins*, 3(3), 145-150.

154. Shepard, B. D., Tuma, D. J., Tuma, P. L. (2010): Chronic ethanol consumption induces global hepatic protein hyperacetylation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(2), 280-291.
155. Smith, T. K. (1992): Recent advances in the understanding of *Fusarium trichothecene* mycotoxicoses. *Journal of Animal Science*, 70(12), 3989-3993.
156. 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(4), 94.
157. Sohár P. (2007). Mikotoxinok az élelmiszerláncban, *Élelmiszervizsgálati közlemények: Élelmiszerminőség – Élelmiszerbiztonság (Különszám)*. LIII. Kötet: 60567. o.
158. Sokolović, M., Garaj-Vrhovac, V., Šimpraga, B. (2008): T-2 toxin: incidence and toxicity in poultry. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 59(1), 43-52.
159. Stadtman, E. R. (1990): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(4), 315-325.
160. Stochs, S.J., Bagchi. (1995): Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 321–336.
161. Stockmann-Juvala, H., Mikkola, J., Naarala, J., Loikkanen, J., Elovaara, E., Savolainen, K. (2004a): Oxidative stress induced by fumonisin B1 in continuous human and rodent neural cell cultures. *Free Radical Research*, 38(9), 933-942.
162. Stockmann-Juvala, H., Mikkola, J., Naarala, J., Loikkanen, J., Elovaara, E., Savolainen, K. (2004b): Fumonisin B1-induced toxicity and oxidative damage in U-118MG glioblastoma cells. *Toxicology*, 202(3), 173-183.
163. Stockmann-Juvala, H., Naarala, J., Loikkanen, J., Vähäkangas, K., Savolainen, K. (2006): Fumonisin B1-induced apoptosis in neuroblastoma, glioblastoma and hypothalamic cell lines. *Toxicology*, 225(2-3), 234-241.
164. Suneja, S. K., Wagle, D. S., Ram, G. C. (1989): Effect of oral administration of T-2 toxin on glutathione shuttle enzymes, microsomal reductases and lipid peroxidation in rat liver. *Toxicon*, 27(9), 995-1001.
165. Surai, P. F., Dvorska, J. E., Sparks, N. H., Jacques, K. A. (2002): Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defence. In: Lyons, T.P., Jaques, K.A. eds.: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 131-141.
166. Surai, P. F., Fisinin, V. I. (2016): Vitagenes in poultry production: Part 2. Nutritional and internal stresses. *World's Poultry Science Journal*, 72(4), 761-772.
167. Szabó, A., Szabó-Fodor, J., Fébel, H., Mézes, M., Bajzik, G., Kovács, M. (2016): Oral administration of fumonisin B 1 and T-2 individually and in combination affects hepatic total and mitochondrial membrane lipid profile of rabbits. *Physiology International (Acta Physiologica Hungarica)*, 103(3), 321-333.
168. Tan, S., Wood, M., Maher, P. (1998): Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*, 71(1), 95-105.

169. Tardieu, D., Tran, S. T., Auvergne, A., Babile, R., Benard, G., Bailly, J. D., Guerre, P. (2006): Effects of fumonisins on liver and kidney sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio during chronic exposure in ducks. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 51-60.
170. Tardieu, D., Travel, A., Le Bourhis, C., Metayer, J. P., Mika, A., Cleva, D., Boissieu, C., Guerre, P. (2021): Fumonisin and zearalenone fed at low levels can persist several days in the liver of turkeys and broiler chickens after exposure to the contaminated diet was stopped. *Food and Chemical Toxicology*, 148, 111968.
171. Thrane, U., Adler, A., Clasen, P. E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F., Ritieni, A. (2004): Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 257-266.
172. Tobias, S., Rajic, I., Vanyi, A. (1992): Effect of T-2 toxin on egg production and hatchability in laying hens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 40(1-2), 47-54.
173. Tokarz, P., Kaarniranta, K., Blasiak, J. (2013): Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology*, 14, 461-482.
174. Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., Tosatto, S. C. (2008): Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1501-1514.
175. Trebstein, A., Seefelder, W., Lauber, U., Humpf, H.-U. (2008): Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4968–4975.
176. Tuma, D. J. (2002): Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(4), 303-308.
177. Ueno, Y., Matsumoto, H. (1975): Inactivation of some thiol-enzymes by trichothecene mycotoxins from *Fusarium* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 23(10), 2439-2442.
178. Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects*, 839(1), 62-70.
179. Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D. S., Wang, Y. C. J., Lee, W. H. (2004): Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43522-43529.
180. Varga J., Téren J., Tóth B., Kocsubné S., Rigó K. (2009): Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek. JATE Press, Szeged, 112 p.
181. Velichkova, M., Hasson, T. (2005): Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crml1-dependent nuclear export mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 25(11), 4501–4513.
182. Visentin, I., Montis, V., Döll, K., Alabouvette, C., Tamietti, G., Karlovsky, P., Cardinale, F. (2012): Transcription of genes in the biosynthetic pathway for

fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Eukaryotic Cell*, 11(3), 252-259.

183. Vladimirov, Y. A., Olenev, V. I., Suslova, T. B., Cheremisina, Z. P. (1980): Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Advances in Lipid Research*, 17, 173-249.
184. Vudathala, D. K., Prelusky, D. B., Ayroud, M., Trenholm, H. L., Miller, J. D. (1994): Pharmacokinetic fate and pathological effects of ¹⁴C-fumonisin B1 in laying hens. *Natural Toxins*, 2(2), 81-88.
185. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, DR., Harada, T., Engel, JD., Yamamoto, M. (2003): Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature genetics*, 35(3), 238-245.
186. Wan, L. Y. M., Turner, P. C., El-Nezami, H. (2013): Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 276-283.
187. Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., Merrill Jr, A. H. (1991): Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14486-14490.
188. Wang, J., Fitzpatrick, D. W., Wilson, J. R. (1993): Effect of dietary T-2 toxin on biogenic monoamines in discrete areas of the rat brain. *Food and chemical toxicology*, 31(3), 191-197.
189. Wang, X., Wu, Q., Wan, D., Liu, Q., Chen, D., Liu, Z., Martínez-Larranaga, M. R., Martínez, M. A., Anadón, A., Yuan, Z. (2016): Fumonisins: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. *Archives of toxicology*, 90, 81-101.
190. Wang, Y., Li, J., Wang, X., Wu, W., Nepovimova, E., Wu, Q., Kuca, K. (2022): Deoxynivalenol and its modified forms: key enzymes, inter-individual and interspecies differences in metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 54(3), 331-342.
191. Wannemacher, R.W., Winer, S.L. (1977): Trichothecene mycotoxins. In: Sidell, R.R., Takafuji, E.T., Franz, D.R. eds.: *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*; Office of the Surgeon General at TMM Publications: Washington, DC, pp. 655–676.
192. Weber, M., Balogh, K., Fodor, J., Erdélyi, M., Ancsin, Z., Mézes, M. (2010): Effect of T-2 and HT-2 toxin during the growing period on body weight, lipid peroxide and glutathione redox status of broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno*, 79(1), 27-31.
193. Weibking, T. S., Ledoux, D. R., Bermudez, A. J., Turk, J. R., Rottinghaus, G. E., Wang, E., Merrill Jr, A. H. (1993): Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poultry Science*, 72(3), 456-466.
194. Weichselbaum, T. E. (1946): An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *American Journal of Clinical Pathology*, 16:40-43.

195. Williams, K., Frayne, J., Hall, L. (1998): Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Molecular Human Reproduction*, 4(9), 841-848.
196. WHO (1990): Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. *Environmental Health Criteria* 105. World Health Organisation, Geneva
197. Wu, Q. H., Wang, X., Yang, W., Nüssler, A. K., Xiong, L. Y., Kuča, K., Dohnal, V., Zhang, XJ. Yuan, Z. H. (2014): Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Archives of Toxicology*, 88, 1309-1326.
198. Yang, L., Yu, Z., Hou, J., Deng, Y., Zhou, Z., Zhao, Z., Cui, J. (2016): Toxicity and oxidative stress induced by T-2 toxin and HT-2 toxin in broilers and broiler hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 87, 128-137.
199. Yoshizawa, T., Swanson, S. P., Mirocha, C. J. (1980): T-2 metabolites in the excreta of broiler chickens administered ³H-labeled T-2 toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(6), 1172-1177.
200. Young, I. S., & McEneny, J. (2001): Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical society transactions*, 29(2), 358-362.
201. Young, J. C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., Gong, J. (2007). Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 136-143.
202. Yuan, Y., Zhou, X., Yang, J., Li, M., Qiu, X. (2013): T-2 toxin is hydroxylated by chicken CYP3A37. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 622-627.
203. Zha, A., Cui, Z., Qi, M., Liao, S., Chen, L., Liao, P., Tan, B. (2020): Dietary baicalin zinc supplementation alleviates oxidative stress and enhances nutrition absorption in deoxynivalenol challenged pigs. *Current Drug Metabolism*, 21(8), 614-625.
204. Zhang, X., Jiang, L., Geng, C., Cao, J., Zhong, L. (2009): The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol*, 54(4), 513-518.
205. Zhang, X., Wang, Y., Velkov, T., Tang, S., Dai, C. (2018): T-2 toxin-induced toxicity in neuroblastoma-2a cells involves the generation of reactive oxygen, mitochondrial dysfunction and inhibition of Nrf2/HO-1 pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 88-97.
206. Zhou, H. R., He, K., Landgraf, J., Pan, X., Pestka, J. J. (2014): Direct activation of ribosome-associated double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) by deoxynivalenol, anisomycin and ricin: a new model for ribotoxic stress response induction. *Toxins*, 6(12), 3406-3425.
207. Zhuang, Z., Yang, D., Huang, Y., Wang, S. (2013): Study on the apoptosis mechanism induced by T-2 toxin. *PLoS One*, 8(12), e83105.
208. Ziprin, R. L., Elissalde, M. H. (1990): Effect of T-2 toxin on resistance to systemic *Salmonella typhimurium* infection of newly hatched chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 51(11), 1869-1872.
209. Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., Kizek, R. (2012): Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 4(6), 1247-1253.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is köszönettel tartozom, **Dr. Mézes Miklós** és **Dr. Balogh Krisztián** témavezetőimnek, akik segítettek a kísérletek megtervezésében, a szakmai cikkek elkészítésében és publikálásában, amellyel szakmai fejlődésemet támogatták. Emellett a doktori képzésem és kutatásaim során a Takarmánybiztonsági Tanszék munkatársaitól érkező rengeteg segítségért is hatalmas köszönettel tartozom. Külön köszönetet szeretnék mondani **Kövesi Benjáminnak**, **Baloghné Dr. Zándoki Erikának**, **Balláné Dr. Erdélyi Mártának** és **Ancsin Zsoltnak**, akik a kísérletek megszervezésében és lebonyolításában nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget. Köszönöm a **Regionális Egyetemi Tudásközpont**, összes munkatársának, hogy helyet és eszközöket biztosítottak a génexpressziós vizsgálatok elvégzéséhez. Szeretném megköszönni az adminisztratív segítséget és támogatást **Jenei Szabó Krisztinának**.

Köszönettel tartozom továbbá a **HUN-REN-MATE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoportnak**, amely anyagi támogatásával kísérleteimet végezhettem, illetve számos hazai és külföldi konferencián részt vehettem.