

Az MTA rendes tagjának székfoglaló előadása, 2016.

Mézes Miklós

MIKOTOXINOK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ:
OK VAGY OKOZAT

ÖSSZEFOGLALÓ

A gazdasági állatok takarmányait, valamint az élelmiszer alapanyagokat és az élelmiszereket szennyező toxikus anyagok közül, a globális felmelegedés által előidézett fokozott penészgomba fertőzés veszélye miatt, jelentős figyelem irányul a mikotoxinokra. Ezek a toxikus vegyületek, a penészgombák másodlagos metabolizmus termékei, amelyek jelentős része, egyéb toxikus hatásaik mellett, a sejtekben oxidatív stresszt indukálnak, ezzel sejtkárosodást, sőt akár a sejtek pusztulását idézve elő.

Saját vizsgálataink során a gabonaféléket gyakran fertőző *Fusarium* penészek által termelt trichotecénvázis mikotoxinok közül a T-2 toxin hatásait követtük nyomon *in vivo* állatkísérletes modellekben.

Számos irodalmi adat és saját eredményeink is alátámasztják, hogy a T-2 toxin oxidatív stresszt idéz elő. A hatás mértéke azonban függ az állatfajtól, a mikotoxin dózistól és az expozíció időtartamától. Az egymásnak ellentmondó kísérleti eredmények alapján azonban felmerült a kérdés, hogy az oxidatív stresszt közvetlenül a mikotoxin idézte elő, vagy annak háttérében az oxidatív stresszhatások ellen az evolúció során kialakult, antioxidáns védőrendszer, károsodása áll. Jól ismert ugyanis, hogy az antioxidáns védelem hatékonyságának csökkenése oxidatív stresszt indukál.

Az antioxidáns védőrendszer elemei közül vizsgálataink középpontjában a glutation redox rendszer – redukált glutation, glutation-peroxidáz, glutation-reduktáz - állt. Az antioxidáns védőrendszer enzimatisz elemeinek, valamint egyes kis molekulatömegű antioxidánsok szintézisében kiemelt szerepet betöltő enzimek szintézisét az újabb kutatások eredményei alapján a Keap1/Nrf-2 transzkripció faktorok szabályozzák. Az Nrf-2 hatására aktiválódik az antioxidáns válaszelem (ARE), és ennek révén fokozódik az antioxidáns géneket kódoló klaszter expressziója.

Az oxidatív stressz ún. hierarchikus modelljének értelmében gyenge vagy mérsékelt oxidatív stresszhatások a Keap1 gátlásán keresztül aktiválják az Nrf-2/ARE útvonalat, amely aktiválja egyes antioxidáns hatású gének expresszióját, majd következményesen azok szintézisét.

Erőteljes oxidatív stressz esetén viszont egy másik, az NFκB útvonalon keresztül szabályozott, útvonal aktiválódik, amelynek hatására, az antioxidáns rendszer aktivációja nélkül, apoptózis következik be,

Saját vizsgálataink eredményei alapján a T-2 toxin, az általunk alkalmazott dózis-tartományokban, és különösen rövidtávon, mérsékelt oxidatív stresszt indukál. Erre bizonyíték, hogy kezdeti gátlást követően, amelynek hátterében a Keap1 hatására az Nrf-2 fokozott mértékű ubiquinilációja áll, a későbbiekben aktiválódik az Nrf2/ARE útvonal és fokozódik az antioxidáns génklaszter expressziója. Ennek alapján tehát a kérdésre, mely szerint a mikotoxinok által előidézett hatás hátterében mi áll, az a válasz adható, hogy a trichotecénvázis mikotoxinok, részben kémiai szerkezetükből adódóan, képesek oxigén szabadgyök képződést, azaz oxidatív stresszt indukálni a sejtekben.

Eredményeink arra is felhívják a figyelmet, hogy gyakorlati körülmények között, amikor a mikotoxin terhelés kismértékű, azaz csak mérsékelt oxidatív stressz alakul ki, annak hatására hatékonyan aktiválódik az antioxidáns védelem, emiatt lipid peroxidációs folyamatok csak ritkán mutathatók ki. Gyakorlati szempontból ez azt jelenti, hogy ilyen, mérsékelt, oxidatív stresszhatások esetén a védelem hatékonyan növelhető természetes eredetű antioxidánsokkal, így például fitobiotikumokkal. Erőteljes mikotoxin terhelés esetén azonban antioxidánsok alkalmazásával ez a kedvező hatás már nem érhető el, mert a folyamat eltérő szabályozási útvonalakon keresztül valósul meg, azaz az antioxidáns védelem aktivációja helyett, sejtelhalás következik be.

BEVEZETÉS

A mikotoxinok egyes fonalas gombák másodlagos metabolizmus termékei, amelyek termelődését jellemzően valamilyen környezeti stressz-hatás indukálja (Schmidt-Heydt et al, 2008). A gazdasági állatok takarmányait szennyezve dózisfüggő mértékben termelés kiesést, illetve toxikus válaszreakciót váltanak ki (Diaz, 2005). Vizsgálataink során az ún. „A” típusú trichotecénvázas mikotoxinok közé tartozó a T-2 toxint és annak legfontosabb metabolitját a HT-2 toxint a *Fusarium tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. graminearum* penészgombák termelik (Moss, 2002). A T-2 toxin a mérsékelt éghajlati égövbe tartozó országokban, így Magyarországon, viszonylag jelentős arányban fordul elő (1. táblázat) gabonamagvakban (Biomim World Mycotoxin Survey, 2015) és egyúttal ezt tekintik a leginkább toxikus trichotecénvázas mikotoxinnak (Bamburg et al, 1968).

1. táblázat Egyes fontosabb mikotoxinok előfordulása gabonamagvakban Európában

	Aflatoxin B1	Zearalenon	Deoxinivalenol	T-2 toxin	Fumonizin	Ochratoxin A
Vizsgált mintaszám	1163	2894	3684	2051	1543	1188
Szennyezett minta	11%	64%	77%	42%	54%	26%
Pozitív minták (µg/kg)	6	213	1288	25	898	7
Maximum (µg/kg)	153	8888	34861	685	15383	150
EU határérték (µg/kg)	20	2000	5000	250	20000	250

A gazdasági állatok jellemzően a takarmánnyal, veszik fel a mikotoxinokat, ugyanakkor már a bőrrel való érintkezés révén is felmaródásokat és lokális gyulladást indukálnak, amely a szájüreget és a gasztrointesztinális rendszert érinti (Nesic et al, 2014). A T-2 toxin, mint lipofil karakterű molekula, könnyen átjut a membránokon (Gyongyossy-Issa et al, 1984), a gyomorból kismértékben, a vékonybélből viszont hatékonyan felszívódik (Eriksen és Petterson, 2004). Biológiai felezési ideje átlagosan 20 perc, azonban 80%-a HT-2 toxinná alakul, ami hasonló toxicitású (SCF, 1999).

A T-2 toxin kiválasztása konjugált formában a vizelettel vagy az epén keresztül a bélsárral ürül (Swanson és Corley, 1989). A különböző állatfajok között azonban jelentős különbséget mutattak ki a felszívódás mértékében, szervezeten belüli eloszlásában, metabolizmusában és kiválasztásában (Wu et al, 2011; Maul et al, 2012). A T-2 toxin LD₅₀ értéke 1 hetes brojlercsirkénél 4,97 mg/kg testtömeg (Huff et al, 1981), halakra vonatkozóan azonban nem áll rendelkezésre adat a szakirodalomban.

A trichotecénvázis mikotoxinok, így a T-2 toxin gazdasági állatoknál általában csak szubklinikai tüneteket idéznek elő, így növekedésbeli lemaradást, takarmány-visszautasítást, csökkent takarmány-értékesülést és emiatt csökkent termelést, növekvő mortalitást és jelentősebb érzékenységet, a fertőző betegségekkel szemben. A klinikai tünetek baromfi fajoknál hányásban, hasmenésben, bágyadtságban, csökkent immunválasz készségben, csökkenő spermaminőségben, alacsony keltethetőségben (Sokolovic et al, 2008), halaknál pedig ezek mellett még anémia formájában jelentkeznek (Anater et al, 2016).

HIPOTÉZIS

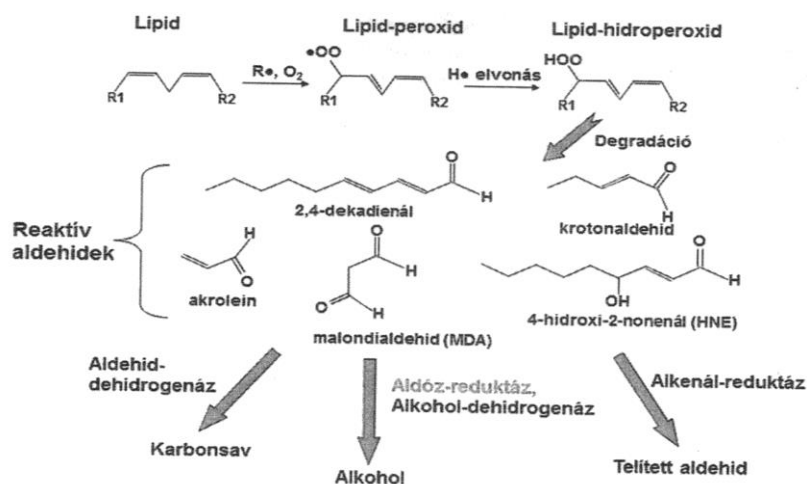
Számos korábbi vizsgálat során bizonyítást nyert, hogy a T-2 toxin hatására az állati szervezetben fokozódik a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása, amely kihat a biológiai antioxidáns rendszer működésére is (Tsuchida et al, 1984; Rizzo et al, 1992; Mézes et al, 1998; Surai et al. 2002; Arunachalam és Doohan, 2013). A trichotecénvázis mikotoxin-expozíció és a reaktív oxigéngyök (ROS) képződés összefüggésével kapcsolatosan ugyanakkor megoszlanak a vélemények azzal kapcsolatban, hogy a mikotoxinok közvetlenül, vagy közvetve, azaz az antioxidáns védőrendszer működésének befolyásolása révén idéznek-e elő oxidatív stresszt (Wen et al, 2016). Egyes vizsgálatokban ugyanis nem találtak közvetlen reaktív oxigén vegyületeket (ROS) képződést indukáló hatást, sőt azok mennyisége akár még csökkent is a trichotecénvázis mikotoxinokkal összefüggésben (Bin-Umer et al, 2014). A T-2 toxin kémiai szerkezetéből adódóan reaktívak, a 12,13 epoxi csoport megléte miatt, ezáltal ROS képződést indukálhatnak (Chandratre et al, 2014). Brojlercsirkénél számos adattal rendelkezünk a trichotecénvázis mikotoxinokkal összefüggő lipidperoxidációs hatásokról, de jellemzően szubkrónikus expozíciót követően (Smith, 1992; Mézes et al, 1998; Surai et al, 2002; Weber et al, 2010).

Az ellentmondó, dózis-hatás összefüggést nem mutató, eredmények alapján az alapprobléma nem dönthető el, ez képezte vizsgálataink célját, azaz annak eldöntése, hogy a T-2 toxin által kiváltott oxidatív stressz annak oka, vagy az antioxidáns rendszer zavara miatt, annak okozata.

A LIPID PEROXIDÁCIÓ FOLYAMATA

A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) olyan gyökök vagy molekulák, amelyek minden aerob szervezetben megtalálhatók (Dickinson és Chang 2011). Közös jellemzőjük, hogy külső elektronhéjukon párosítatlan elektront tartalmaznak, ezáltal reaktívak, mivel valamely más atomról vagy molekuláról elektront vonnak el, így további gyökképződést indukálnak (Jacob és Burri, 1996).

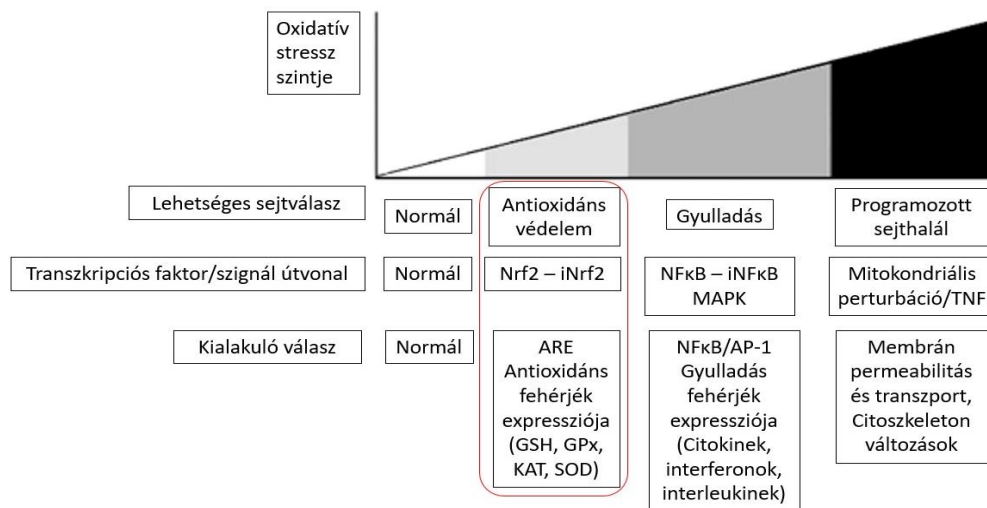
A lipidperoxidáció iniciációs lépésében a ROS valamely többszörösen telítetlen zsírsavról egy elektront von el, amelynek hatására lipidgyök keletkezik, amely ezt követően a szomszédos kettős kötésekről von el elektronokat, propagáció indul meg (1. ábra). Ennek során konjugált diének és triének keletkeznek (Takagi et al, 1987). A folyamat terminációs szakaszában degradálódnak a zsírsav molekulák, amelynek során metastabil termékek, így malondialdehid vagy 4-hidroxi-2-nonenál, keletkeznek. A lipidperoxidációs folyamatok következtében a membránok elvesztik integritásukat, fluiditásukat, valamint permeabilitásuk is nő (Gutteridge és Halliwell 1989), amely sejtpusztuláshoz vezet (Mézes és Matkovic 1986).



1. ábra A lipidperoxidáció folyamata

A szervezetben, számos élettani folyamat során is képződik ROS, például egyes enzimatikus folyamatok, vagy a mitokondriális légzési lánc során (Murphy, 2009). A ROS képződés fiziológias szinten tartását a biológiai antioxidáns védelmi rendszer biztosítja, amennyiben azonban a ROS képződés és az antioxidáns védelem egyensúlya felbomlik, oxidatív stressz alakul ki (Sies, 1991).

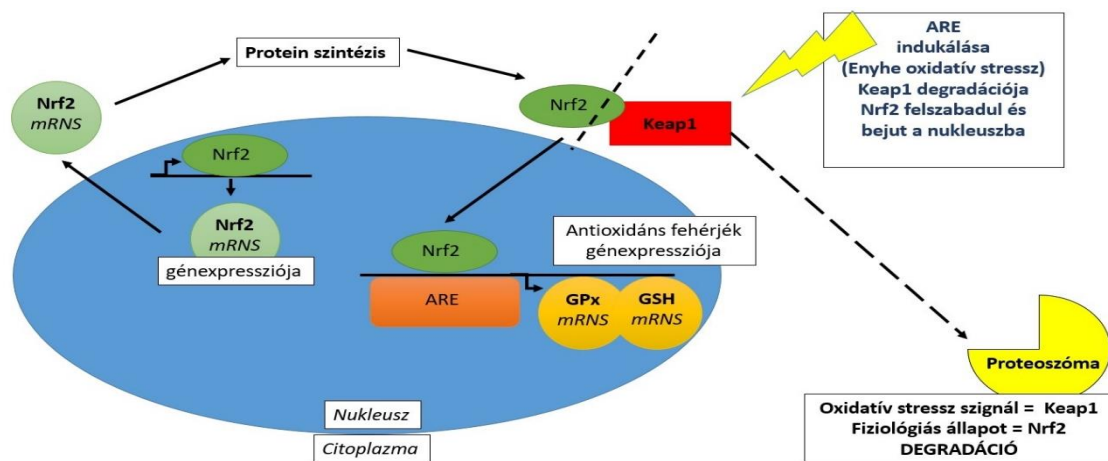
Oxidatív stresszt bármely az állati szervezetet érő stresszhatás is előidézhetheti, így például a mikotoxin terhelés, amelynek oka lehet a fokozott mértékű szabadgyök képződés, vagy a nem kielégítő antioxidáns védelem (Surai and Fisinin, 2015). Az ilyen stresszhatások ellen kialakuló válaszreakciók értékelésére számos modellt dolgoztak ki, ezek közül például az orvostudományban az ún. „vitagén” koncepciót (Calabrese et al, 2007), amelyet később baromfira is adaptáltak (Surai and Fisinin, 2016). A vitagén koncepció lényege, hogy a szervezetben a reaktív oxigén vegyületek termelődés olyan szignálként funkcionál, amely számos, a védekezésben szerepet játszó gént aktivál. Ebbe a csoportba tartoznak az antioxidáns enzimek is. Egy másik modell, az oxidatív stressz mértéke alapján határozta meg a válaszreakció mértékét, amelyet az ún. hierarchikus modellben (2. ábra) foglaltak össze (Gloire et al, 2006).



2. ábra Az oxidatív stresszre adott sejt szintű válaszok hierarchikus modellje

Ez utóbbi modell alapján az alacsony szintű oxidatív stressz hatására az antioxidáns enzimek génexpressziója indukálódik, amely a Keap1-Nrf2-Antioxidáns válaszelem (ARE) útvonalon (3. ábra) keresztül valósul meg (Moi et al, 1994). Ennek kulcseleme az Nrf2 (nuclear factor

E2-related factor 2) transzkripciós faktor. Az ARE folyamatos aktiválódásának elkerülése érdekében azonban termelődik egy Nrf2 represszor fehérje (Keap1 vagy iNrf2) is, amely azt a citoszolban megköti, majd ubiquinizációt követően a proteoszómában lebontásra kerül (Kaspar et al, 2009). Oxidatív stressz körülmények között viszont csökken a Keap1 Nrf2-höz történő kötődése és, foszforilációt követően bejut a sejtmagba ahol aktiválja az antioxidáns válaszelemet. Ennek hatására olyan gének expressziója indukálódik, amelyeknek szerepe van az antioxidáns védelemben (Petri et al, 2012).



3. ábra: a Keap1-Nrf2-Antioxidáns válaszelem (ARE) útvonál (Lushchak, 2011 nyomán)

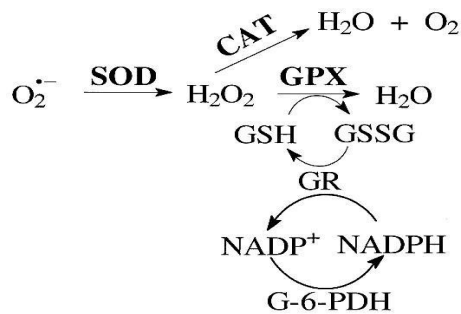
Amennyiben az oxidatív stressz mértéke elér egy kritikus szintet, aktiválódik a programozott sejthalál szignál útvonál, a tumor nekrozis faktor (TNF) hatására, valamint a kaspáz kaskád aktiválódásával mitokondriumok perturbációja következik be. A sejtek, a membránalkotó többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek oxidatív károsodása révén, olyan mértékben károsodnak, hogy azt az antioxidáns védőrendszer már nem képes kontrollálni, ennek hatására nekrozis alakul ki (Choi et al, 2009).

BIOLÓGIAI ANTIOXIDÁNS RENDSZER

Az oxidatív stressz hatásainak kivédésére az evolúció során a biológiai antioxidáns védelmi alakult ki (Sies, 1997). Ebbe a rendszerbe kis molekulatömegű antioxidánsok és enzimek tartoznak. A nem-enzimatis védelem egyik legfontosabb tagja a glutation (GSH), egy tripeptid. Szintézisének kulcsenzime a glutation-szintetáz, amely a glutamát és cisztein

kapcsolódását követően egy glicint kapcsol a peptidlánchoz (Espinosa-Diez et al, 2015). A GSH oxidációját követően glutation diszulfiddá (GSSG) dimerizálódik. A GSH a glutation peroxidáz (GPx) és glutation-S-transzferáz (GST) ko-szubsztrátjaként részt vesz az enzimatis antioxiáns védelmemben is. A GSSG redukcióját a glutation-reduktáz (GR) végzi, hidrogén donorként NADPH-t felhasználva (4. ábra).

Az antioxiáns védelem enzimjei a szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz (CAT), a glutation-S-transzferáz (GST) és a glutation peroxidáz (GPx). Az antioxiáns enzimek olyan módon semlegeítik a reaktív oxigén gyököket, hogy azokat redukáló reakciókat katalizálnak (Espinosa-Diez et al, 2015).



4. ábra Az antioxiáns védőrendszer főbb elemei

Vizsgálataink középpontjában a GPx állt, amelyről brojler csirkék májában kimutatták, hogy annak 30%-a szelén-dependens GPx, 42%-a pedig szelén-independens (GST), míg az általunk vizsgált GPx4 aktivitás 28% (Miyazaki és Motoi, 1992). Halakban, ezek közül pontyban, a GPx4 két formáját (*gpx4a*, *gpx4b*) azonosították és megállapították, hogy pontyban a *gpx4a* mRNS szintje nagyobb, míg a *gpx4b* mRNS szint alacsony (Hermesz és Ferencz 2009).

A glutation S-transzferáz enzimcsalád elsősorban a Fázis II detoxifikáló enzimek közé tartozik, amelyek glutation segítségével az elektrofil xenobiotikumok konjugációját katalizálják (Liu et al, 1993). Ezen túlmenően, nem szelén-dependens glutation-peroxidáz aktivitással is rendelkeznek (Rahman, 2007). A harmadik védelmi vonalba tartoznak az ún. repair molekulák és enzimek, így az általunk is vizsgált glutation-reduktáz (GR) (Davies, 2000).

SAJÁT VIZSGÁLATOK

Vizsgálataink elsődleges célja a hipotézisben felvázolt probléma megoldása, azaz az ok-okozat kérdésének megválaszolása. Első lépésként hagyományos, hosszútávú, terheléses kísérletek során követtük nyomon T-2 toxin terhelés során a lipidperoxidációs folyamatokat és a glutation redox rendszer változásait. Vizsgálataink ezen szakaszában a kiválasztott paraméterek mennyiségének/aktivitásának változására koncentráltunk, az azokat befolyásoló molekuláris mechanizmusok nyomkövetése nélkül. A második szakaszban egy újszerű, rövidtávú vizsgálati protokollt dolgoztunk ki, amelynek során hipotézisünk az volt, hogy a hatások hosszú távon esetleg neutralizálódhatnak, míg rövid távon a T-2 toxin direct hatásait less módunk detektálni. Vizsgálataink ezen szakaszában a hagyományosnak tekinthető biokémiai vizsgálatok mellett már a szabályozási útvonalak egyes lépésire is figyelmet fordítottunk, első lépésként génexpresszió szinten.

Mikotoxinok termeltetése

A kísérletekhez felhasznált mikotoxinokat kollaboráció keretében az MTA-KE Mikotoxinok az élelmiszerláncban kutatócsoport bocsátotta rendelkezésünkre. A mikotoxin termelése kukoricadara szubsztráton történt, a T-2 toxin esetében a *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299-es törzs felhasználásával.

A lipidperoxidációs markerek mérési módszerei

A folyamat iniciációs lépése során keletkező konjugált dién és -trién tartalmat AOAC módszerrel mértük 2,2,4-trimetil-pentánnal történt extrakciót követően. A malondialdehid (MDA), mint a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációja során keletkező metastabil végtermék mérését a Matkovics et al. (1988) által módosított módszerrel mértük.

A glutation redox rendszer egyes elemeinek mérési módszerei

A redukált glutation koncentrációt a májminták 1:9 homogenátum 10.000 g szupernatans frakciójában Sedlak és Lindsay (1968) módszerével mértük. A GPx aktivitását azonos rendszerben határoztuk meg GSH és kumul-hidroperoxid ko-szubsztrátok jelenlétében végpontos direkt assay-vel (Matkovics et al, 1988). A máj 1:9 homogenátumok 10.000 g szupernatans frakciójának fehérjetartalmát Lowry et al. (1951) módszerével mértük.

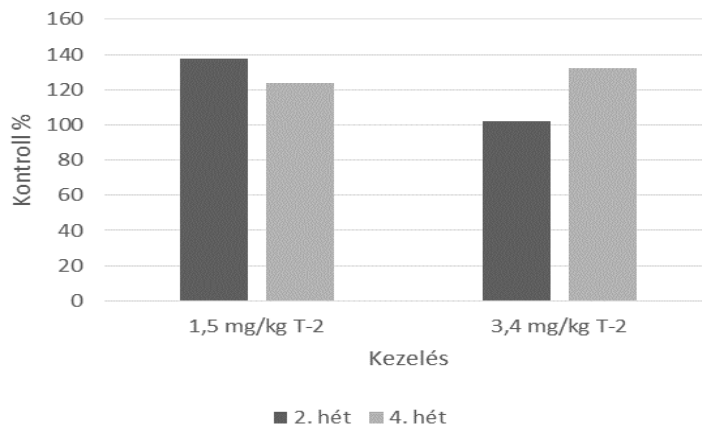
Génexpressziós vizsgálatok

RNS tisztítás és reverz transzkripció PCR

A kísérleti állatok májmintáiból RNS-t tisztítottunk. Mintánként 1000 ng RNS-ből random nonamerrel végzett reverz transzkripcióval cDNS-t hoztunk létre, amelyből kezelésenként poolokat hoztunk létre és ezekből történtek a qPCR mérések, SYBRGreen módszerrel. A primereket szakirodalmi adatok alapján választottuk (Hermesz és Ferencz, 2009; Jiang et al, 2015).

SZUBKRÓNIKUS T-2 TOXIN TERHELÉS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA BAROMFIBAN

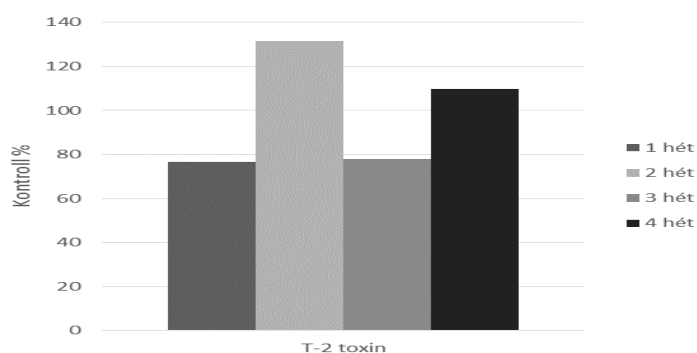
Hosszútávú, 28 napos, kísérletünkben brojlercsirkéknél nem tapasztaltuk a lipidperoxidációs folyamatok intenzitásának növekedését, sőt az enzimatis antioxiidáns rendszert is csupán mérsékelten aktiválta a T-2 toxin expozíció (5. ábra). Hasonló megállapításokat tettek egy másik, 17 napos, vizsgálatban is (Frankic et al, 2006). Yang et al. (2016) ugyanakkor brojlercsirkékben T-2 toxin expozíció hatására *in vitro* és *in vivo* modellekben egyaránt leírták az antioxiidáns védelmi rendszer enzimatis tagjainak aktivitás növekedését, sőt a GPx génexpressziójának növekedését.



5. ábra Brojlercsirke májhomogenizátum GPx4 aktivitásának változása szubkrónikus T-2 toxin terhelés hatására

SZUBKRÓNIKUS T-2 TOXIN TERHELÉS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PONTYBAN

Halak antioxidáns rendszerére és lipidperoxidációs folyamataira vonatkozóan jelenleg kevés adat áll rendelkezésre a mikotoxinok hatásaival összefüggésben (Anater et al., 2016). Megállapították, hogy a T-2 toxin hatására a glutation S-transzferáz (GST) aktivitása nőtt a ponty májában (Kravchenko et al. 1989). Itt bemutatott vizsgálatunkban a lipidperoxidációs markerek nem mutattak változást, sőt nem változott a GSH szint sem, viszont a 3 hétre szignifikánsan csökkent a GPx4 aktivitás (6. ábra).



6. ábra A GPx4 aktivitás változása ponty májában szubkrónikus T-2 toxin terhelés hatására

A hosszútávú vizsgálatok eredményei alapján úgy tűnt, hogy a T-2 toxin közvetlenül nem indukál lipidperoxidációs változásokat, azaz a hatások háttérében feltehetően az antioxidáns védelmi rendszer csökkent hatékonyságú működése áll, amely azonban hosszabb távon, a xenobiotikum transzformációs folyamatok aktivációjának eredményeképpen, fokozódik a mikotoxok, így a T-2 toxin, detoxifikációja. A hosszútávú vizsgálatok eredményei azonban, összhangban a korábbi szakirodalmi adatokkal, részben ellentmondó eredményekre vezettek. Felmerült viszont, hogy rövidtávú terhelési protokoll alkalmazásával a xenobiotikum transzformáció adaptációjának hiánya miatt a T-2 toxin közvetlen hatásai korrektebb módon is kimutathatók lehetnek. Ilyen, rövid távú, gazdasági állatokkal végzett, *in vivo* vizsgálati eredmény azonban csak kevés található a szakirodalomban.

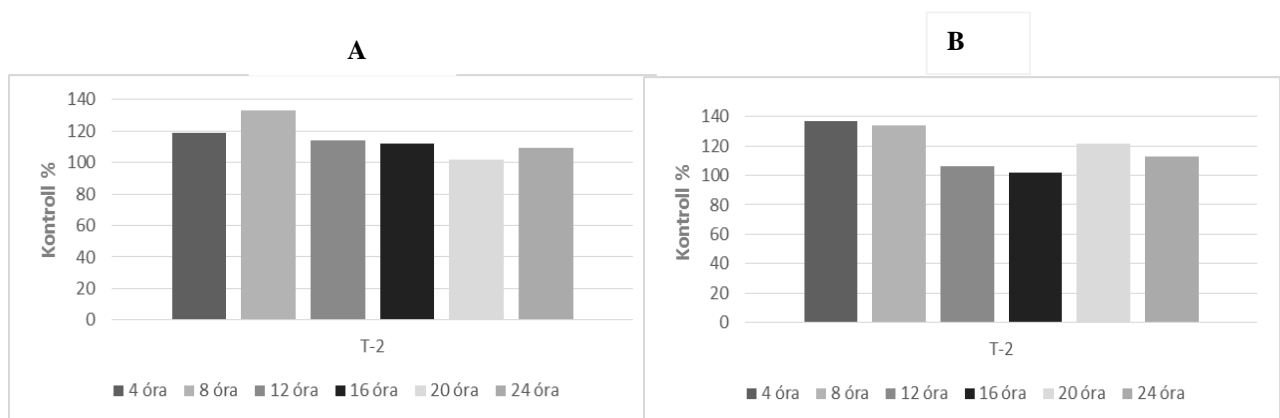
AKUT T-2 TOXIN TERHELÉS HATÁSA BAROMFIBAN AZ ÉLETKOR FÜGGVÉNYÉBEN

Ezzel a vizsgálattal kettős célunk volt, egyrészt fel kívántuk mérni a rövidtávú terhelés során kialakuló változásokat a lipidperoxidációs folyamatokra és a glutation redox rendszerre, egyúttal összefüggésben az életkori változásokkal. Utóbbi célkitűzésünk háttérében az a feltételezés állt, hogy a korai életszakaszban (1 hetes életkor) még kevésbé fejlett a xenobiotikum transzformáló enzimrendszer, ezért feltehetően a hatások is markánsabban jelentkeznek.

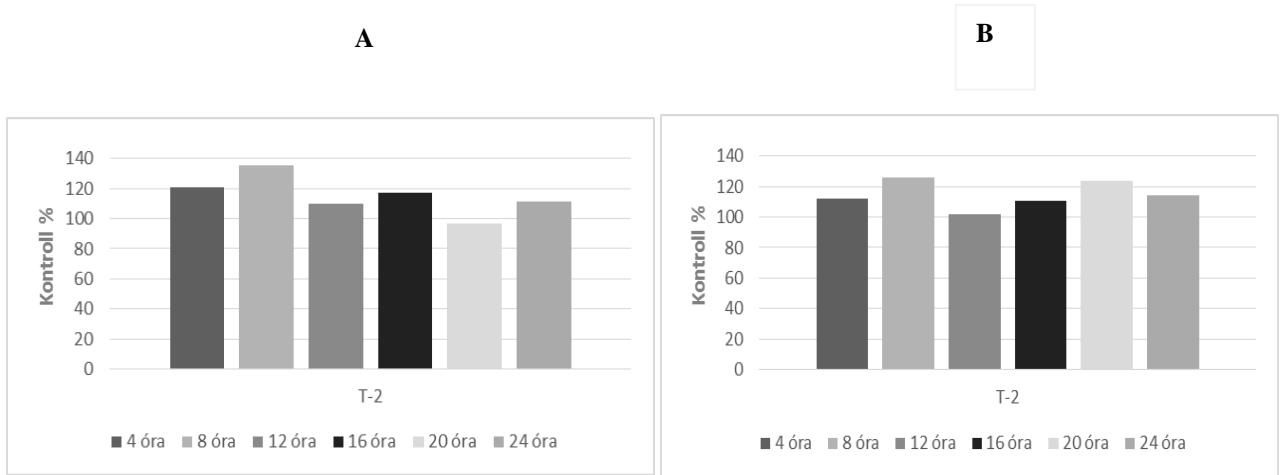
A vizsgálat eredményei azonban csak részben támasztották alá feltételezésünket, mert például, amíg 1 hetes korban a lipidperoxidációs paraméterek lényegében nem változtak, addig 3 hetes korban már jelentősen megnőtt a lipidperoxidáció terminális szakaszára utaló malondialdehid mennyisége.

A fokozott lipidperoxidáció viszont csak részben, és nem konzekvens módon, aktiválta az antioxidáns rendszert. Így például csak 3 hetes életkorban nőtt a redukált glutation mennyisége (7. ábra) és a GPx4 aktivitása (8. ábra). Ez az életkorral összefüggő eltérés feltevésünk szerint a posztnatalis fejlődés során folyamatosan kialakuló adaptációs mechanizmusokkal lehet összefüggésben.

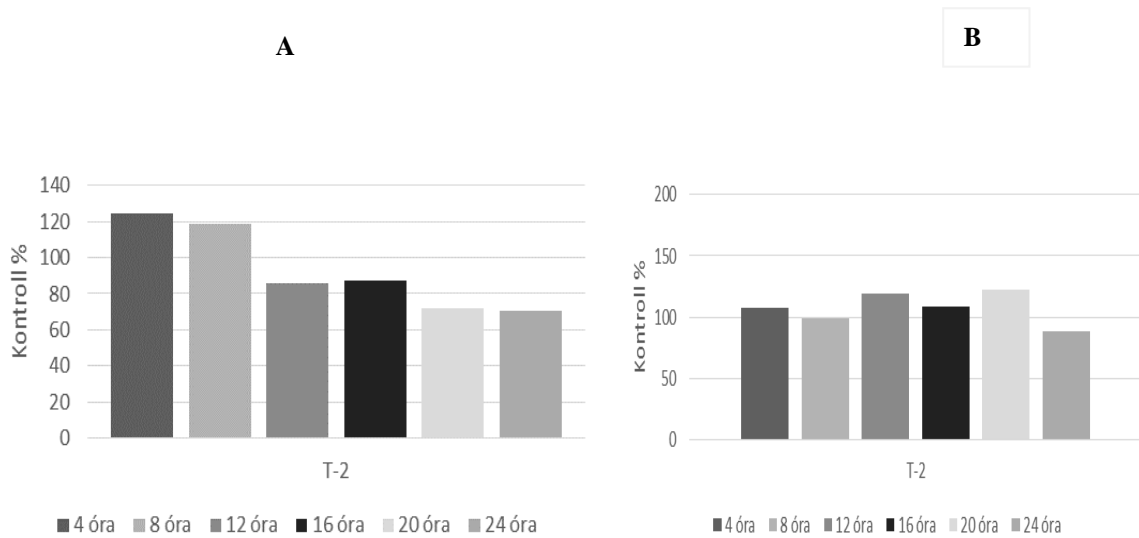
A GPx4 gén expressziójával kapcsolatban véleményünk szerint vagy a T-2 toxin terhelés által kiváltott antioxidáns stressz mértéke nem érte el azt a szintet, amelynek hatására bekövetkezett volna az antioxidáns válaszelem aktivációja, vagy a Keap-1/Nrf2/ARE útvonal aktivációjának hatása a vizsgált időtartam alatt a GPx4 génextpresszió szintjén még nem érvényesült (9. ábra).



7. ábra Brojlercsirke máj GSH koncentrációjának változása akut T-2 toxinterhelés hatására 1 hetes (A) és 3 hetes (B) életkorban



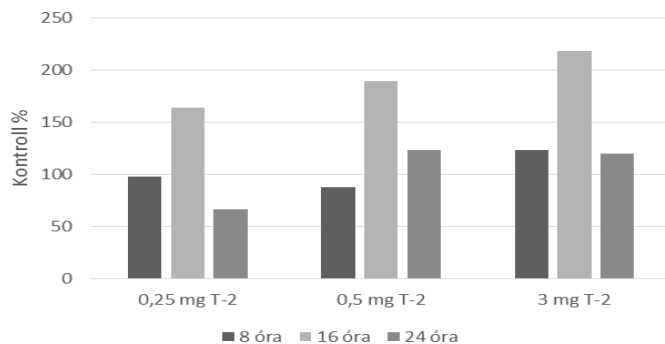
8. ábra Brojlercsirke máj GPx4 aktivitásának változása akut T-2 toxinterhelés hatására 1 hetes (A) és 3 hetes (B) életkorban



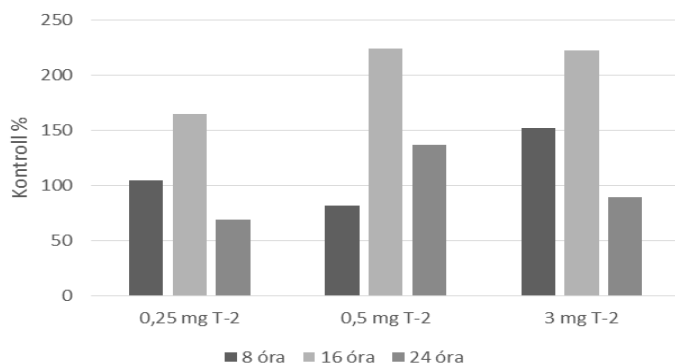
9. ábra Brojlercsirke máj GPx4 gén expressziójának változása akut T-2 toxinterhelés hatására 1 hetes (A) és 3 hetes (B) életkorban

ELTÉRŐ DÓZISBAN ADAGOLT T-2 TOXIN AKUT TERHELÉS HATÁSA PONTYBAN

Pontyok májában a T-2 toxin terhelés hatására az egyszeri per os kezelést követő 16. órában emelkedett meg szignifikáns mértékben úgy a GSH koncentráció (10. ábra), mint a GPx4 aktivitás (11. ábra). Ez az időpont egybeesik a takarmányrészek bélcsatornán való áthaladásának idejével az adott tartási hőmérsékleten, azaz erre az időpontra a takarmánnyal bejuttatott T-2 toxin feltételezhetően már felszívódott a bélcsatornából és ez idézte elő a változásokat, ugyanakkor a lipidperoxidációs paraméterek ebben az időszakban lényegi változásokat nem mutattak.



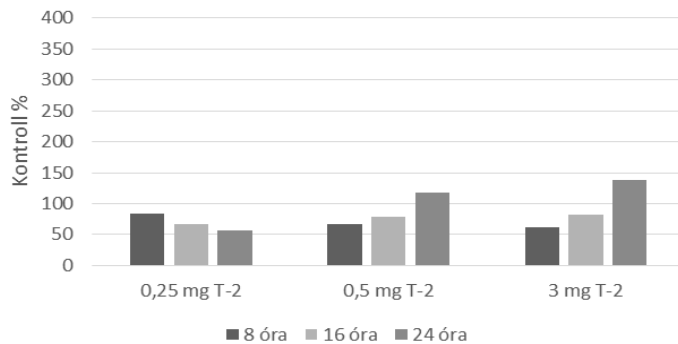
10. ábra A máj GSH koncentrációjának változása ponty májában akut T-2 toxinterhelés során



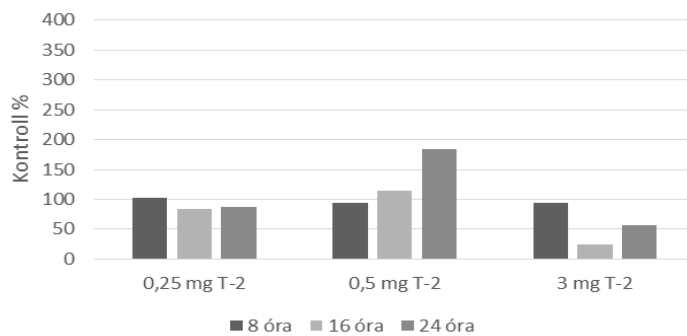
11. ábra A máj GPx4 aktivitásának változása ponty májában akut T-2 toxinterhelés során

Amennyiben feltételezzük, hogy fokozott oxigén szabadgyök képződés miatt a T-2 toxin hatására aktiválódnak a lipidperoxidációs folyamatok, akkor szükségesnek tartottuk azt is megvizsgálni, hogy ez az oxidatív stressz, a hierarchikus modell alapján, milyen erősségűnek

tekinthető. Ennek eldöntésére alkalmas ítéltük a Keap1/Nrf2 útvonal nyomkövetését, azaz a Keap1 (12. ábra) és az Nrf2 génexpresszió (13. ábra) mértékének változását vizsgálni.

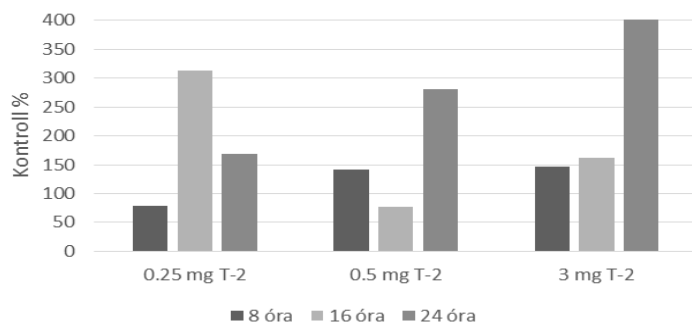


12. ábra A Keap-1 génexpresszió változása ponty májában akut T-2 toxinterhelés során



13. ábra Az Nrf-2 génexpresszió változása ponty májában akut T-2 toxinterhelés során

A Keap-1 és az Nrf-2 gének expressziója részben azonos mértékben és irányban változott a kisebb dózisok hatására, a nagyobb dózis esetén viszont a fokozott mértékű Keap-1 génexpresszió csökkent Nrf-2 génexpresszióval társult. Ezek ismeretében megvizsgáltuk a GPx4 gének expresszióját is, hogy az ARE aktivációja, illetve gátlása is felmérhető legyen. A két GPx4 gén közel azonos irányú és mértékű változásokat mutatott, ezért itt a GPx4a génexpresszió változását mutatjuk be (14. ábra).



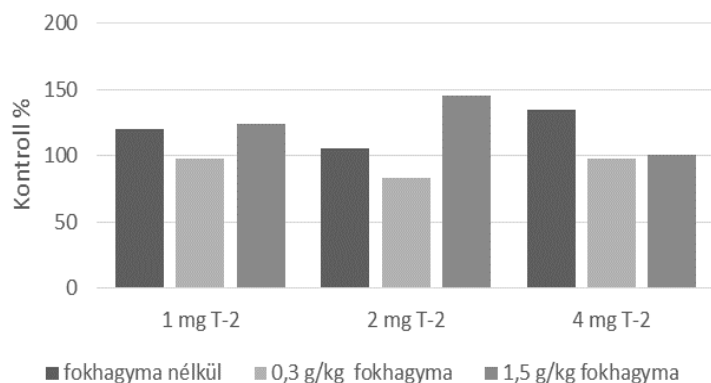
14. ábra A GPx4a génepxresszió változása ponty májában akut T-2 toxinterhelés során

A GPx4 változása arra utal, hogy a Keap-1/Nrf-2 szabályozási útvonal génepxresszió szinten részben magyarázza az antioxidáns válaszelem (ARE) aktivációját, illetve gátlását, tendencia jellegében pedig arra utal, hogy a T-2 toxin hatására, nagyobb T-2 toxin terhelés hatására, fokozódik a Keap-1, de csökken az Nrf-2 gének expressziója, míg a GPx4a gén expressziója időszakban nő. Ezt az eredményt magyarázhatja, hogy a Keap-1 és az Nrf-2 hatása fehéjreként érvényesül, amely csak bizonyos időbeli eltéréssel szintetizálódik a transzkripciót követően.

AZ ANTIOXIDÁNS RENDSZER TÁMOGATÁSA A T-2 TOXIN ÁLTAL KIVÁLTOTT OXIDATÍV STRESSZ HATÁSAIVAL SZEMBEN GYÓGNÖVÉNYKIVONATOK FELHASZNÁLÁSÁVAL

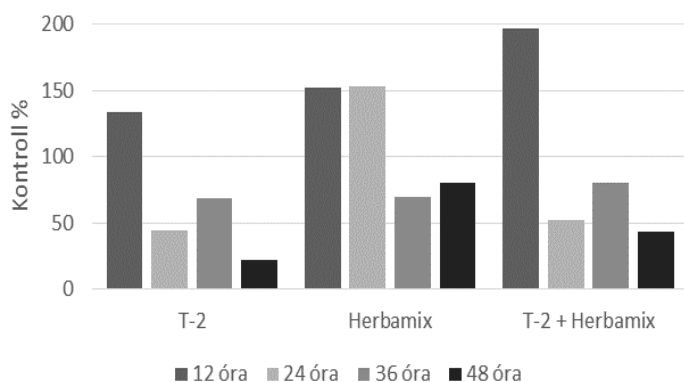
A T-2 toxin ROS képződést indukáló hatását alapul véve kézenfekvőnek tűnt, hogy a kedvezőtlen hatások csökkentésére alkalmasak lehetnek az antioxidánsok. Ezek közül saját vizsgálataink során a fokhagymaolaj, valamint egy gyógynövénykeverék hatását vizsgáltuk.

A fokhagymaolaj használatát korábbi eredményeink közül azok indokolták, amelyek szerint az oxidatív stressz korai szakaszában, arra válaszként, megnő a GSH termelődése, amelyet irodalmi adatok szerint a fokhagymaolajban lévő bioaktív szulfidril vegyületek is támogathatnak (Wu et al, 2001). Ezt a feltevést támasztja alá saját vizsgálatunk erdménye is (15. ábra), amely szerint fokhagymaolaj hatására nagy dózisu T-2 toxin terhelés hatására nő a máj GSH tartalma. Az eredmények alapján tehát levonható az a következtetés, hogy a fokhagymaolaj, bizonyos koncentráció tartományban, hatékonyan támogathatja T-2 toxinterhelés során a máj antioxidáns védelmét.

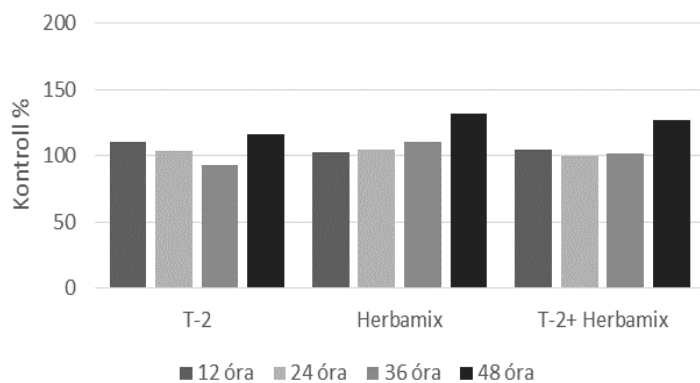


15. ábra Fokhagymaolaj kiegészítés hatása brojlercsirkék májának GSH tartalmára T-2 toxinterhelés során

Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy gyógynövény keverék jól ismert májvédő, ezen belül részben antioxidáns, hatása révén, kedvező hatást fejthet ki T-2 toxinterhelés során. Ebben szerepe lehet a keveréket alkotó egyes gyógynövények bioaktív hatóanyagai azon, ma már ismert, azon hatásának is, hogy indukálják egyes, xenobiotikum transzformációban résztvevő gének (Sazaki et al, 2005), így az általunk is vizsgált glutation szintetáz, expresszióját (16. ábra), amelynek hatására fokozódik a GSH szintézise is (17. ábra).



16. ábra Gyógynövény keverék hatása a máj glutation-szintetáz gén expressziójára T-2 toxinterhelés során brojlercsirkében



17. ábra Gyógynövény keverék hatása brojlercsirke májának GSH tartalmára T-2 toxinterhelés során

Eddig elért eredményeink alapján tehát levonhatók az alábbi következtetések:

- a hierarchia modell alapján a T-2 toxin mérsékelt ROS képződést és következményesen lipidperoxidációs folyamatokat indukál,
- a ROS képződés a terhelést követő idő függvényében előbb gátolja, majd növeli a glutation redox rendszer mennyiségét/aktivitását befolyásoló gének expresszióját, amelynek hátterében a Keap1-Nrf2-ARE szabályozási útvonal ROS indukálta változásai állnak.

JÖVŐBENI KUTATÁSI TERVEK

Kutatásaink eddigi eredményei alapján körvonalazódni látszik egy olyan hálózat, amely az oxidatív stresszhatásokat előidéző tényezők által előidézett, az általunk vizsgált mikotoxinok molekuláris szinten bekövetkező változásait jellemezheti, annak függvényében, hogy a hatás milyen erősségű oxidatív stresszt idéz elő.

A hálózat számos eleme ma még nem ismert, azok minél pontosabb feltárása, nem csupán *in vivo*, de *in vitro* rendszerekben is további kutatásaink egyik fő célja.

További célunk az egyes mikotoxinok között fennálló szinergens, additív vagy antagonistikus hatások felmérése, miután a gyakorlatban a gazdasági állatok által fogyasztott takarmányok nem egy adott mikotoxinnal, hanem általában azok nem pontosan ismert összetételű keverékével szennyezettek.

Szintén a gyakorlat számára is fontos adatokkal szolgálhatnak azok a mostanában megkezdett kutatásaink is, amelyek célja természetes eredetű anyagok, különösen egyes antioxidáns hatású fitobiotikumok, lehetséges hatásának felmérése a mikotoxinok káros hatásainak csökkentése érdekében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatásainkat elsősorban hazai, emellett nemzetközi együttműködő partnerek segítették, akik egyrészt hozzájárultak kutatásaink elméleti hátterének megalapozásához, a kollaborációk keretében pedig olyan metodikai segítséget kaptunk, amely nélkül itt bemutatott eredményeink lényegesen szerényebbek lettek volna.

Hazai és külföldi partnerintézmények: Kaposvári Egyetem, Állatélettani és Állathigiénia Tanszék, MTA-KE Mikotoxinok az élelmiszerláncban kutatócsoport, MTA KOKI Molekuláris Neuroendokrinológia Csoport, Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Állatélettani és Takarmányozástani Tanszék, Scottish Agricultural College, Auchincruive (Skócia), University of Thessaloniki, Thessaloniki (Görögország), Friedrich Loeffler Institut, Institute of Animal Nutrition, Braunschweig (Németország)

Külön köszönetet szeretnék mondani a Szent István Egyetem Mezőgazdaság és Környezettudományi Karának a lehetőségért, hogy kutatásainkat folyamatosan folytathattuk. Köszönöm volt és jelenlegi kollégáimnak, doktoranduszaimnak és diákjaimnak, akik munkája nélkül a bemutatott kísérleteket nem tudtam volna elvégezni. Ötleteikkel, olykor tanácsaikkal, de mindenekelőtt kutatás iránti elkötelezettségükkel nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy kutatásaink számos sikertelen próbálkozás mellett olykor kiváló eredményeket hoztak.

Köszönet illeti azokat a kollégákat, akik megtiszteltek azzal, hogy közös projekteken dolgozhattunk az MTA-KE Állattenyésztési és Állathigiéniai (2006-2011), majd az MTA-KE Mikotoxinok az élelmiszerláncban (2011-2017) keretében.

Végül, de nem utolsósorban, hálával tartozom mesterimnek, hogy elindítottak a kutatói pályán, családomnak pedig azért a biztos hátterért, amely munkásságom alapját szolgáltatta.

A SZÉKFOGLALÓ ELŐADÁS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT FONTOSABB PUBLIKÁCIÓK

- Mézes M, Barta M, Nagy G (1998): *Res. Vet. Sci.* **66**: 19-23.
- Weber M, Balogh K, Erdélyi M, Mézes M (2006): *J. Poult. Sci.* **43**: 222-227.
- Weber M, Fodor J, Balogh K, Erdélyi M, Mézes M (2006): *Acta Vet. Brno* **75**: 387-391.
- Weber M, Stiller Sz, Balogh K, Wágner L Erdélyi M, Mézes M. (2007): *Acta Vet. Hung.* **55**: 21-27.
- Weber M, Fodor J, Balogh K, Wágner L, Erdélyi M, Mézes M (2008): *Acta Vet. Brno* **77**: 45-49.
- Surai PF, Mézes M, Melnichuk SD, Fotina TI (2008): *Krmva (Zagreb)* **50**: 35-43.
- Pál L, Dublec K, Weber M, Balogh K, Erdélyi M, Szigeti G, Mézes M (2009): *Acta Vet. Hung.* **57**: 75-84.
- Erdélyi M, Weber M, Balogh K, Ancsin Zs, Mézes M (2011): *Acta Vet. Brno* **80**: 287-292.
- Ancsin Zs, Erdélyi M, Szabó-Fodor J, Mézes M (2013): *World Mycotox. J.* **6**: 73-81.
- Balogh K, Bócsai A, Pelyhe Cs, Zándoki E, Erdélyi M, Szabó-Fodor J, Mézes M (2015): *J. Poult. Sci.* **52**: 176-182.
- Bócsai A, Ancsin Zs, Fernye Cs, Zándoki E, Szabó-Fodor J, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K (2015): *Europ. Poult. Sci.* **79**: 115. doi: 10.1399/eps.2015.115
- Pelyhe Cs, Kövesi B, Zándoki E, Kovács B, Szabó-Fodor J, Mézes M, Balogh K (2016): *Mycotoxin Res* **32**:77-83.
- Bócsai A, Pelyhe Cs, Zándoki E, Ancsin Zs, Szabó-Fodor J, Erdélyi M, Mézes M, Balogh K (2016): *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **100**: 520-525.

FELHASZNÁLT IRODALMAK JEGYZÉKE

- Anater A, Manyes L, Meca G et al. (2016): *Aquaculture* **451**: 1-10.
- AOAC (1984). *Official Methods of Analysis 28054 B*. 14th ed. Association of the Official Analytical Chemists, Arlington
- Arunachalam D, Doohan FM (2013): *Toxicol. Lett.* **217**: 149-158.
- Bamburg JR., Riggs NV, Strong FM. (1968): *Tetrahedron Lett.* **24**: 3329-3336.
- Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Butterly MS et al. (2014): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**: 11798-11803.
- Biomim World Mycotoxin Survey (2015): <https://www.biomim.net/en/blog-posts/2015-biomim-mycotoxin-survey-out-now/>
- Calabrese V, Guagliano OE, Sapienza M et al. (2007): *Neurochem. Res.* **32**: 757-773.
- Chandratre CA, Telang AG, Badgular PC et al. (2014): *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **67**: 124-138.
- Choi K, Kim J, Kim GW et al. (2009): *Curr. Neurovasc. Res.* **6**:213-222.
- Davies KJ. (2000): *IUBMB Life Sci.* **50**:279-289.
- Diaz, D. E. (ed.) (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham
- Dickinson B. C., Chang CJ. (2011): *Nature Chem. Biol.* **7**:504-511.
- Eriksen G, Pettersson H (2004). *Anim. Feed Sci. Technol.* **114**:205-239.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D et al. (2015): *Redox Biol.* **6**:183-197.
- Frankic T, Pajk T, Rezar V et al. (2006): *Food Chem. Toxicol.* **44**:1838-1844.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. (2006): *Biochem. Pharmacol.* **72**:1493-1505.
- Gutteridge JM, Halliwell B (1990): *Trends Biochem. Sci.* **15**: 129-135.

- Gyongyossy-Issa MI, Christie EJ, Khachatourians GG. (1984): *Appl Environ Microbiol.* 47:1182-1184.
- Hermesz E, Ferencz A (2009): *Comp Biochem Physiol* 150C:101-106.
- Huff WE, Doerr JA, Hamilton PB et al. (1981): *Poult. Sci.* 60:1412–1414.
- Jacob RA, Burri BJ (1996): *Am. J. Clin. Nutr.* 63:985S-990S.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2009): *Free Radic Biol Med.* 47:1304-1309.
- Kravchenko LV, Galash VT, Avreneva LT. et al. (1989): *J. Ichthyol.* 29: 156-160.
- Liu L, Wu S, Tam MF (1993): *Biochim. Biophys. Acta* 1216:332-334.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. (1951): *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lushchak VI (2011): *Comp. Biochem. Physiol.* 153C:175-190.
- Matkovics B, Szabó L, Sz. Varga I. (1988): *Laboratóriumi Diagnosztika* 15: 248-250.
- Maul R., Warth B., Kant JS. et al. (2012): *Chem Res Toxicol* 25:2715–2717.
- Mézes M, Matkovics B (1986): A lipidperoxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése. In: Csaba Gy. (ed.): *A Biológia Aktuális Problémái.* Vol. 34. Medicina, Budapest, pp. 61-105.
- Mézes M, Barta M, Nagy G (1998): *Res. Vet. Sci.* 66: 19–23.
- Miyazaki S, Motoi Y. (1992): *Res Vet Sci.* 53:47-51.
- Moi P, Chan K, Asunis I et al. (1994): *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91: 9926–9930.
- Moss MO. (2002): *Mycologist.*16:158–161.
- Murphy MP (2009). *Biochem. J.* 417:1–13.
- Nesic K, Ivanovic S, Nesic V. (2014): *Environ. Contam. Toxicol.* 228:101-120.
- Petri S, Körner S, Kiaei M (2012): *Neurol. Res. Internat.* Article ID 878030.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC (1966): *Anal. Biochem.* 16: 359-364.
- Rahman K. (2007): *Clin. Interv. Aging* 2: 219–236.
- Rizzo AF, Atroshi F, Ahotupa M et al. (1994): *Zentralbl Veterinarmed A* 41:81–90.
- Sasaki K, Wada K, Tanaka Y et al. (2005): *J. Med. Food* 8: 184-189.
- SCF, Scientific Committee on Food (1999): Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins, Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin. European Commission, Health & consumer protection Directorate C- Scientific Opinions. SCF/CS/CNTM/MYC/25 Rev 6 Final, Brussels.
- Schmidt-Heydt M, Magan N, Geisen R. (2008): *FEMS Microbiol. Lett.* 284: 142–149.
- Sedlak J, Lindsay RH (1968): *Anal. Biochem.* 25: 192-205.
- Sies H (1997): *Exp. Physiol.* 82:291-295.
- Smith TK. (1992): *J. Anim. Sci.* 70:3989-3993.
- Sokolovic M, Garaj-Vrhovac V, Simpraga B (2008): *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 59:43-52.
- Surai PF, Fisinin VI (2015): Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: Applications in chick placement and pig weaning. *J. Vet. Sci. Med.* 3 (1): 16.
- Surai PF, Fisinin VI (2016): Antioxidant system regulation: from vitamins to vitagenes. In: Watson RR, de Meester F. (eds.): *Handbook of cholesterol.* Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp.451-481.
- Surai PF, Dvorska JE, Sparks NHC, Jaques KA (2002): Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defence. In: Lyons TP, Jaques KA (eds): *Nutritional biotechnology in the feed and food industries.* Nottingham University Press, Nottingham, pp. 131-142.
- Swanson S and Corley R (1989). The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, VR (ed): *Trichothecene mycotoxicosis pathophysiological effects.* Vol. I. CRC Press, Boca Raton, pp. 37-61.
- Takagi T, Wakasa N, Miyashita K. (1987): *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64:1320-1323.
- Tsuchida M, Miura T, Shimizu T et al. (1984): *Biochem. Med.* 31:147-166.
- Weber M., Balogh K, Fodor J et al. (2010): *Acta Vet. Brno,* 79: 27–31.

Wen J, Mu P, Deng Y, (2016). *Toxicol. Res.* 5: 377-387.
Wu CC, Sheen LY, Chen HW et al (2001): *Food Chem. Toxicol.* 39:563-569.
Wu Q., Huang L., Liu Z. et al. (2011): *Xenobiotica* 41:863–873.
Yang L, Yu Z, Hou J et al. (2016): *Food Chem. Toxicol.* 87: 128-137.