



SZÉKFOGLALÓ ELŐADÁSOK
A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIÁN

MÉZES MIKLÓS

MIKOTOXINOK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ: OK VAGY OKOZAT?



Mézes Miklós

MIKOTOXINOK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ:
OK VAGY OKOZAT?

Székfoglaló előadások a Magyar Tudományos Akadémián

Mézes Miklós

MIKOTOXINOK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ:
OK VAGY OKOZAT?



Magyar Tudományos Akadémia, 2020

Az akadémiai székfoglaló előadás elhangzott 2016. október 12-én.

© Mézes Miklós, 2020

© Magyar Tudományos Akadémia, 2020

Magyar Tudományos Akadémia
1051 Budapest, Széchenyi István tér 9.
mta.hu

Kiadja: Magyar Tudományos Akadémia
A kiadásért felel: Lovász László, az MTA elnöke
Olvasószerkesztő: Szigeti László
Borító és tördelés: Ave Sophia | www.avesophia.hu
Nyomdai munkálatok: Prime Rate Kft.

ISSN 1419-8959

ISBN 978-963-508-944-4

ISBN 978-963-508-945-1 (PDF)

ISBN 978-963-508-946-8 (ePub)

DOI 10.36820/szekfoglalo.2020.mezes

Minden jog fenntartva!

I. 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 hatásai mellett, a sejtekben oxidatív stresszt indukál, 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 mikotoxindózistól 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 hátterében az oxidatív stresszhatások ellen az evolúció során kialakult antioxidáns védőrendszer károsodása áll-e. 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 enzimatikus elemeinek, valamint egyes kis molekulatömegű antioxidánsok szintézisében kiemelt szerepet betöltő enzimek szintézisét az újabb kutatások eredményei alapján a Keap1/Nrf2 transzkripció faktorok szabályozzák. Az Nrf-2 hatására aktiválódik az antioxidáns válaszelem (ARE), és ennek révén fokozódik az antioxidáns génklaszter 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 vi-

szont 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 dózistartományokban – és különösen rövid távon – 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 mi áll a mikotoxinok által előidézett hatás hátterében, az a válasz adható, hogy a trichotecénvázas mikotoxinok, részben kémiai szerkezetükből adódóan, képesek oxigénszabadgyök-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 lipidperoxidációs 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.

2. BEVEZETÉS

A mikotoxinok egyes fonalas gombák másodlagos metabolizmus termékei, amelyek termelődését jellemzően valamilyen környezeti stresszhatás indukálja (Schmidt-Heydt et al. 2008). A gazdasági állatok takarmányait szennyezve dóziszfüggő mértékben termelés kiesést, illetve toxikus válaszreakciót váltanak ki (Diaz 2005). Vizsgálataink során az ún. „A” típusú trichotecénvázas mikotoxinok közé tartozó T-2 toxin és annak legfontosabb metabolitja, a HT-2 toxin hatását követtük nyomon, amelyeket a *Fusarium tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*,

F. graminearum penészgombák termelik (Moss 2002). A T-2 toxin a mérsékelt éghajlati égőbe tartozó országokban, így Magyarországon viszonylag jelentős arányban fordul elő (1. táblázat) gabonamagvakban (Biomin World Mycotoxin Survey 2015), és egyúttal ezt tekintik a leginkább toxikus trichothecénvázaz mikotoxinnak (Bamburg et al. 1968).

1. táblázat: Egyes fontosabb mikotoxinok előfordulása gabonamagvakban Európában

	Aflatoxin B ₁	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	34 861	685	15 383	150
EU- határérték (µg/kg)	20	2000	5000	250	20 000	250

A gazdasági állatok jellemzően a takarmánnyal veszik fel a mikotoxinokat, ugyanakkor azok 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 lipofilkarakterű 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, amely hasonló toxicitású (SCF 1999).

A T-2 toxin kiválasztása konjugált formában a vizelettel vagy az epén keresztül a bélsárral ürül (Swanson–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 egyhetes brojlersirkénél 4,97 mg/kg testtö-

meg (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 takarmányértékesülést és emiatt csökkent termelést, növekvő mortalitást és jelentősebb érzékenységet a fertőző betegségekkel szemben. A klinikai tünetek baromfifajoknál hányásban, hasmenésben, báyadtságban, csökkent immunválaszkészségben, csökkenő spermaminőségben, alacsony keltethetőségben (Sokolovic et al. 2008), halaknál pedig ezek mellett még anémia formájában jelentkeznek (Anater et al. 2016).

3. 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–Doohan 2013). A trichotecénvázis mikotoxin-expozíció és a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének 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 a reaktív oxigén vegyületek (ROS) képződését indukáló közvetlen hatást, sőt azok mennyisége akár még csökkent is a trichotecénvázis mikotoxinokkal összefüggésben (Bin-Umer et al. 2014). A T-2 toxin kémiai szerkezetéből adódóan reaktív, mert 12, 13 epoxi csoportot tartalmaz, ezáltal ROS-képződést indukálhat (Chandratre et al. 2014). Brojlersírkéknél 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).

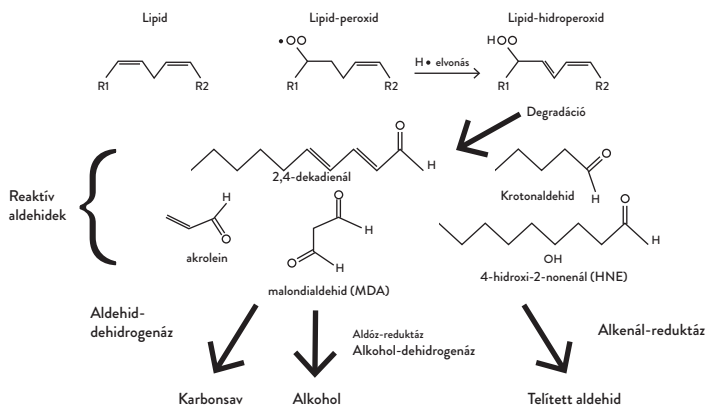
Az ellentmondó, dózis-hatás összefüggést nem mutató eredmények alapján az alapprobléma nem dönthető el, ez képezte vizsgálataink célját, azaz

annak eldöntése, hogy a T-2 toxin által kiváltott oxidatív stressz annak oka, vagy az antioxidáns rendszer zavara miatt annak okozata-e.

4. A LIPIDPEROXIDÁCIÓ FOLYAMATA

A reaktív oxigénszabadgyökök (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–Burri 1996).

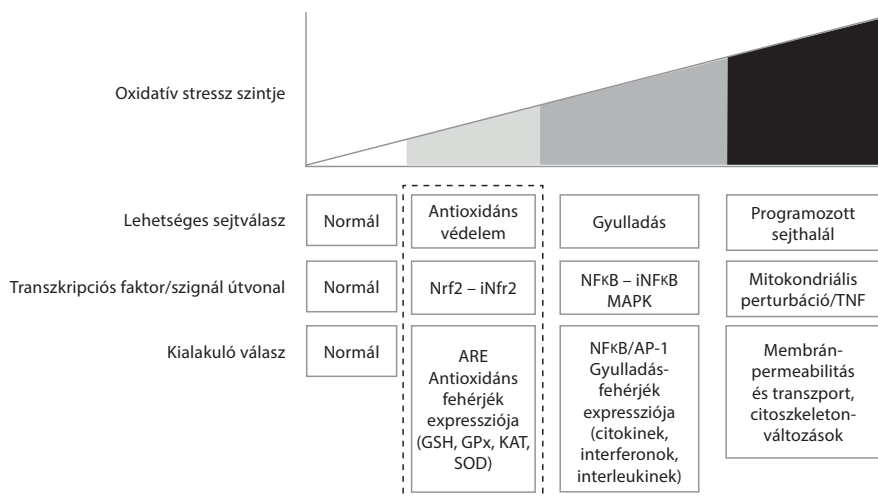
A lipidperoxidáció iniciációs lépésében a ROS valamely többszörösen telítetlen zsírsavról egy elektront von el, aminek hatására lipidgyök keletkezik, amely ezt követően a szomszédos kettős kötésekről von el elektronokat, és propagáció indul meg (1. ábra). Ennek során konjugált diének és triének keletkeznek (Takagi et al. 1987). A folyamat terminációs szakaszában degradálódnak a zsírsavmolekulák, aminek 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–Halliwell 1989), ami sejtpusztuláshoz vezet (Mézes–Matkovics 1986).



1. ábra: A lipidperoxidáció folyamata

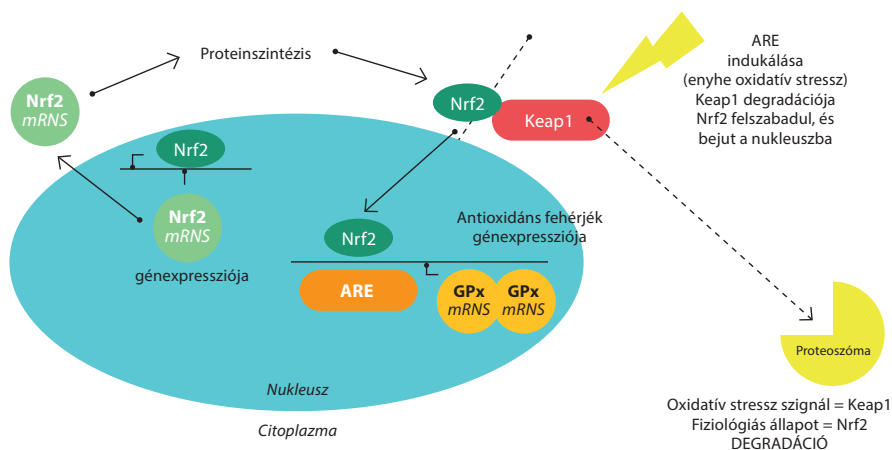
A szervezetben számos élettani folyamat során is képződik ROS, például egyes enzimatisz folyamatok vagy a mitokondriális légzési lánc során (Murphy 2009). A ROS-képződés fiziológiás szinten tartását a biológiai antioxidáns védelmi rendszer biztosítja, amennyiben azonban a ROS-képződés és az antioxidáns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

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



2. ábra: Az oxidatív stresszre adott sejtszintű válaszok hierarchikus modellje

Ez utóbbi modell szerint az alacsony szintű oxidatív stressz hatására az antioxidáns enzimek génexpressziója indukálódik, ami 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) transzkripció 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 lebomlik (Kaspar et al. 2009). Oxidatívstressz-körülmények között viszont csökken a Keap1 Nrf2-höz való kötődése, és foszforilációt követően bejut a sejtmagba, ahol aktiválja az antioxidáns válaszelemet. Ennek hatására olyan gének expressziója indukálódik, amelyeknek szerepük van az antioxidáns védelemben (Petri et al. 2012).



3. ábra: A Keap1-Nrf2-Antioxidáns válaszelem (ARE) útvonal

Forrás: Lushchak 2011 nyomán

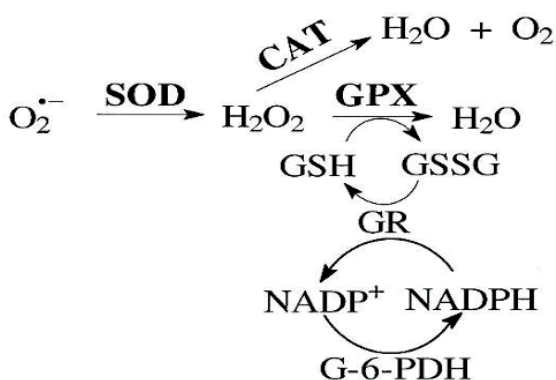
Amennyiben az oxidatív stressz mértéke elér egy kritikus szintet, aktiválódik a programozott sejthalál szignál útvonal, és a tumor nekrosis faktor (TNF) hatására, valamint a kaszpáz-kaspád aktiválódásával mitokondriumok perturbációja következik be. A sejtek – a membránalkotó többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek oxidatív károsodása révén – olyan mértékben károsod-

nak, hogy azt az antioxidáns védőrendszer már nem képes kontrollálni, ennek hatására nekrosis alakul ki (Choi et al. 2009).

5. A BIOLÓGIAI ANTIOXIDÁNS RENDSZER

Az oxidatív stressz hatásainak kivédésére az evolúció során kialakult a biológiai antioxidáns védelmi rendszer (Sies 1997). Ebben a rendszerbe kis molekulatömegű antioxidánsok és enzimek tartoznak. A nem enzimatisz 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 a glutation-S-transzferáz (GST) ko-szubsztrátjaként részt vesz az enzimatisz antioxidáns védelemben is. A GSSG redukcióját a glutation-reduktáz (GR) végzi, hidrogéndonorként NADPH-t felhasználva (4. ábra).

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



4. ábra: Az antioxidáns védőrendszer főbb elemei

Vizsgálataink középpontjában a GPx állt, amelyről brojlercsirkék májában kimutatták, hogy 30%-a szeléndependens GPx, 42%-a pedig szelénindependens (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–Ferencz 2009).

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

6. SAJÁT VIZSGÁLATOK

Vizsgálataink elsődleges célja a hipotézisben felvázolt probléma megoldása, azaz az ok-okozat kérdésének megválaszolása volt. Első lépésként hagyományos, hosszú távú, 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 ezeket befolyásoló molekuláris mechanizmusok nyomon követése nélkül. A második szakaszban újszerű, rövid távú vizsgálati protokollt dolgoztunk ki, amelynek során az volt a hipotézisünk, hogy a hatások hosszú távon esetleg neutralizálódhatnak, míg rövid távon a T-2 toxin direkt hatásait lesz módunk detektálni. Vizsgálataink ezen szakaszában a hagyományosnak tekinthető biokémiai vizsgálatok mellett már a szabályozási útvonalak egyes lépéseire is figyelmet fordítottunk, első lépésként a génexpresszió szintjén.

Mikotoxinok termeltetése: A kísérletekhez felhasznált mikotoxinokat kollaboráció keretében az MTA-KE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoport bocsátotta rendelkezésünkre. A mikotoxin termelése kukoricadara-szubszt-

ráton történt, a T-2 toxin esetében a *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299-es törzs felhasználásával.

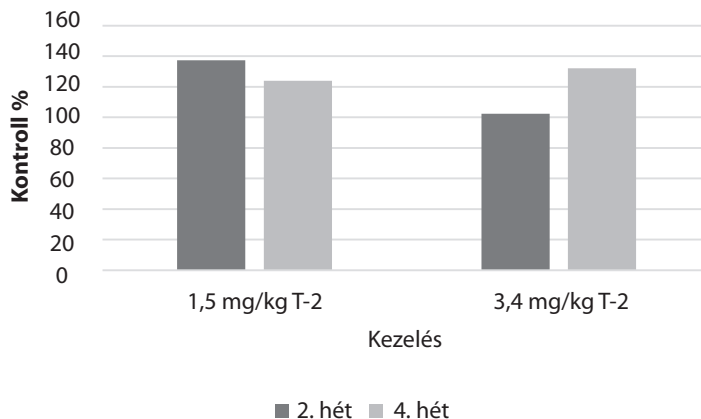
A lipidperoxidációs markerek mérési módszerei: A folyamat iniciációs lépése során keletkező konjugált dién és trién tartalmat AOAC-módszerrel mértük 2,2,4-trimetil-pentánnal történt extrakciót követően. A malondialdehid (MDA) mint a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációja során keletkező metastabil 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 kumulatív hidroperoxid koszubsztrátok 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, majd abból kezelésenként poolokat hoztunk létre, és ezekből zajlottak a qPCR-mérések, SYBRGreen módszerrel. A primereket szakirodalmi adatok alapján választottuk ki (Hermesz–Ferencz 2009; Jiang et al. 2015).

6.1. A szubkrónikus T-2 toxin terhelés hatásainak vizsgálata baromfiban

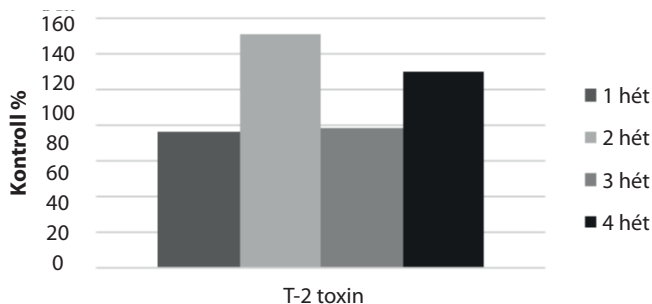
Hosszú távú (28 napos) kísérletünkben brojlersirkékben nem tapasztaltuk a lipidperoxidációs folyamatok intenzitásának növekedését, sőt az enzimatisz antioxi dász rendszer is csupán mérsékelten aktiválta a T-2 toxin expozíció (5. ábra). Hasonló megállapításokat tettek egy másik (17 napos) vizsgálatban is (Frankic et al. 2006). Yang et al. (2016) ugyanakkor brojlersirkékben T-2 toxin expozíció hatására *in vitro* és *in vivo* modellekben egyaránt leírták az antioxi dász védelmi rendszer enzimatisz tagjainak aktivitásnövekedését, sőt a GPx génexpressziójának növekedését.



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

6.2. A 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 glutathion-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 harmadik hétre szignifikánsan csökkent a GPx4-aktivitás (6. ábra).



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

A hosszú távú vizsgálatok eredményei alapján úgy tűnt, hogy a T-2 toxin közvetlenül nem indukál lipidperoxidációs változásokat, azaz a hatások hátterében feltehetően az antioxidáns védelmi rendszer csökkent hatékonyságú működése áll. Ami azonban hosszabb távon, a xenobiotikum-transzformációs folyamatok aktivációjának eredményeképpen fokozódik, a mikotoxinok, így a T-2 toxin detoxifikációja. A hosszú távú vizsgálatok eredményei azonban – összhangban a korábbi szakirodalmi adatokkal – részben ellentmondó eredményekre vezettek. Felmerült viszont, hogy rövid távú 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.

6.3. Akut T-2 toxin terhelés hatása baromfiban az életkor függvényében

Ezzel a vizsgálattal kettős célunk volt. Fel kívántuk mérni a rövid távú terhelés során kialakuló hatásokat a lipidperoxidációs folyamatokra és a glutation redox rendszerre, összefüggésben az életkori változásokkal is. Utóbbi célkitűzésünk hátterében az a feltételezés állt, hogy a korai életszakaszban (egyhetes 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 egyhetes korban a lipidperoxidációs paraméterek lényegében nem változtak, addig háromhetes korban már jelentősen megnőtt a lipidperoxidáció terminális szakaszára utaló malondialdehid mennyisége.

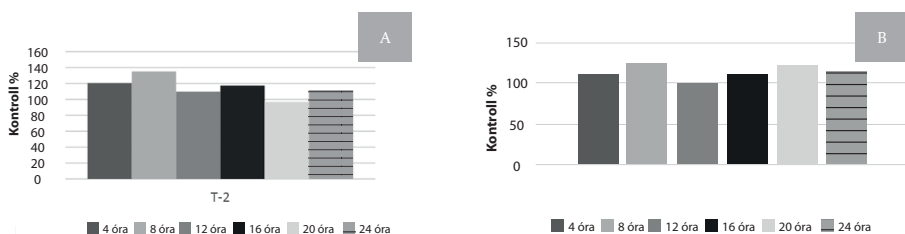
A fokozott lipidperoxidáció viszont csak részben és nem konzekvens módon aktiválta az antioxidáns rendszert. Így például csak háromhetes életkorban nőtt a redukált glutation mennyisége (7. ábra) és a GPx4 aktivitása (8. ábra). Ez az életkorral összefüggő eltérés feltevésünk szerint a posztnatális fejlődés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

A GPx4 gén expressziójával kapcsolatban véleményünk szerint vagy a T-2 toxin terhelés által kiváltott atioxidáns stressz mértéke nem érte el azt a szintet,

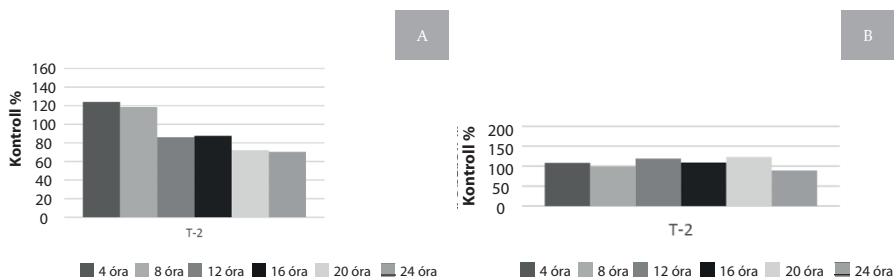
amelynek hatására bekövetkezett volna az antioxidáns válaszelem aktivációja, vagy a Keap-I/Nrf2/ARE útvonal aktivációjának hatása a vizsgált időtartam alatt a GPx4 génexpresszió szintjén még nem érvényesült (9. ábra).



7. ábra: Brojlcersirkemáj GSH-koncentrációjának változása akut T-2 toxin terhelés hatására egyhetes (A) és háromhetes (B) életkorban



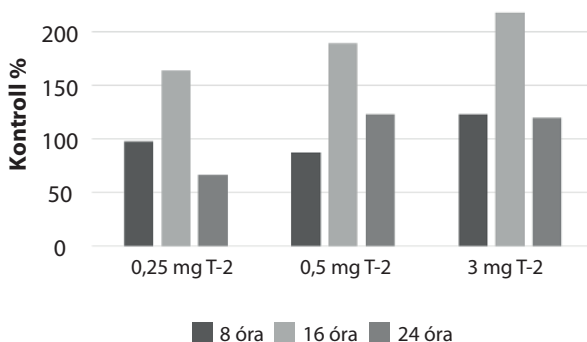
8. ábra: Brojlcersirkemáj GPx4-aktivitásának változása akut T-2 toxin terhelés hatására egyhetes (A) és háromhetes (B) életkorban



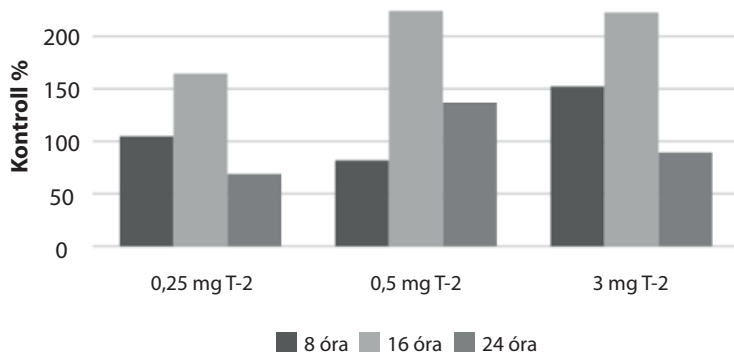
9. ábra: Brojlerscirrhosis máj GPx4 gén expressziójának változása akut T-2 toxin terhelés hatására egyhetes (A) és háromhetes (B) életkorban

6.4. 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 mind a GSH-koncentráció (10. ábra), mind a GPx4-aktivitás (11. ábra). Ez az időszakasz 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 nem mutattak lényegi változásokat.

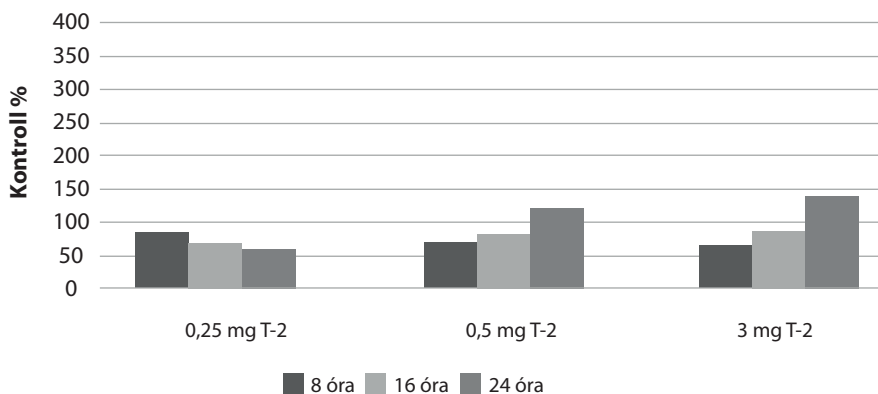


10. ábra: A máj GSH-koncentrációjának változása ponty májában akut T-2 toxin terhelés során

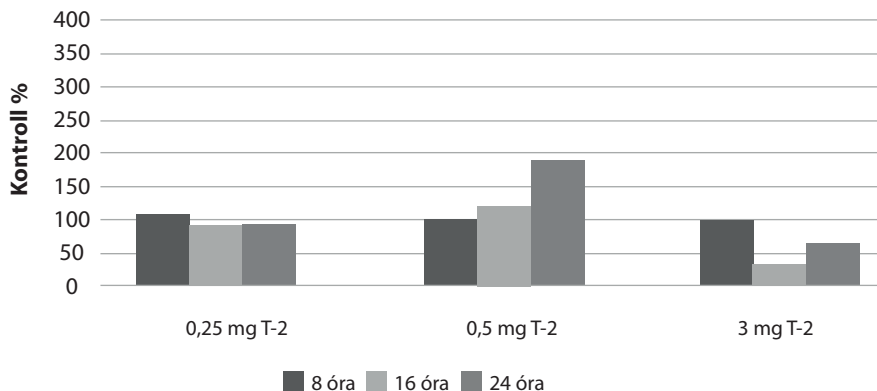


11. ábra: A máj GPx4-aktivitásának változása ponty májában akut T-2 toxin terhelés során

Mivel feltételeztük, hogy fokozott oxigénszabadgyök-képződés miatt a T-2 toxin hatására aktiválódnak a lipidperoxidációs folyamatok, azt is szükségesnek tartottuk megvizsgálni, hogy ez az oxidatív stressz a hierarchikus modell alapján milyen erősségűnek tekinthető. Ennek eldöntésére alkalmasnak ítéltük a Keap1/Nrf2 útvonal nyomon követését, azaz a Keap1 (12. ábra) és az Nrf2-génexpresszió (13. ábra) mértékének változását vizsgálni.

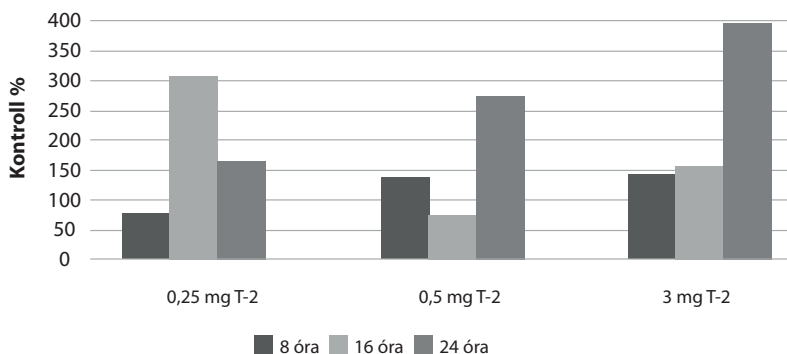


12. ábra: A Keap-1-génexpresszió változása ponty májában akut T-2 toxin terhelés során



13. ábra: Az Nrf-2-génexpresszió változása ponty májában akut T-2 toxin terhelés 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).



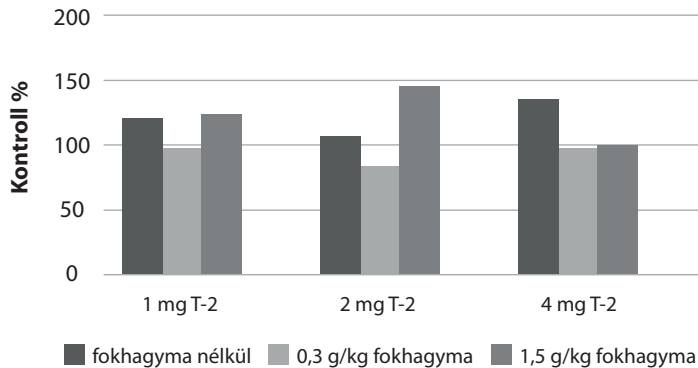
14. ábra: A GPx4a-génexpresszió változása ponty májában akut T-2 toxin terhelés során

A GPx4 változása arra utal, hogy a Keap-1/Nrf-2 szabályozási útvonal génexpressziósinten részben magyarázza az antioxidáns válaszelem (ARE) aktivációját, illetve gátlását. Tendenciajellegében pedig arra utal, hogy a T-2 toxin hatására, nagyobb T-2 toxin terhelés esetén fokozódik a Keap-1, de csökken az Nrf-2 gének expressziója, míg a GPx4a gén expressziója nő. Ezt az eredmény azzal magyarázható, hogy a Keap-1 és az Nrf-2 hatása fehérjeként érvényesül, amely csak bizonyos időbeli eltéréssel szintetizálódik a transzkripciót követően.

6.5. Az antioxidáns rendszer támogatása a T-2 toxin által kiváltott oxidatív stressz hatásaival szemben, gyógynövénykivonatok felhasználásával

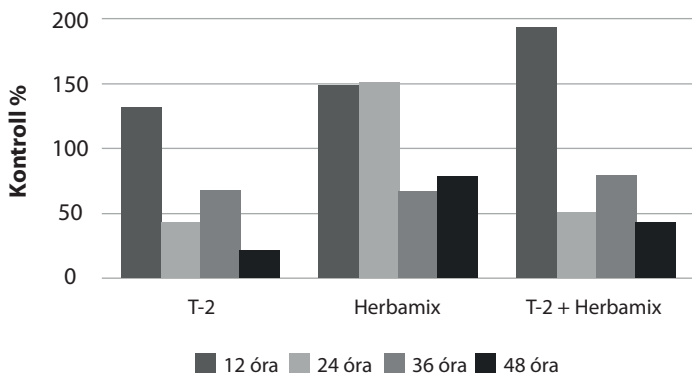
A T-2 toxin ROS-képződést indukáló hatását alapul véve kézenfekvőnek tűnt, hogy a kedvezőtlen hatások csökkentésére alkalmasak lehetnek az antioxidánsok. Ezek közül saját vizsgálataink során a fokhagymaolaj, valamint egy gyógynövénykeverék hatását vizsgáltuk.

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 eredménye is (15. ábra), amely szerint fokhagymaolaj hatására nagy dózisú T-2 toxin terhelés hatására nő a máj GSH-tartalma. Az eredmények alapján tehát levonható az a következtetés, hogy a fokhagymaolaj bizonyos koncentrációtartományban T-2 toxin terhelés során hatékonyan támogathatja a máj antioxidáns védelmét.

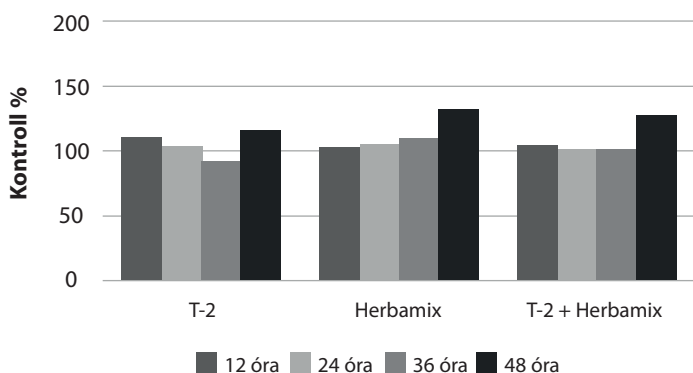


15. ábra: Fokhagymaolaj-kiegészítés hatása brojlercsirkék májának GSH-tartalmára T-2 toxin terhelés során

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



16. ábra: Gyógynövénykeverék hatása brojlercsírke májának glutation-szintetáz gén expressziójára T-2 toxin terhelés során



17. ábra: Gyógynövénykeverék hatása
brojlercsirke májának GSH-tartalmára T-2 toxin terhelés során

Eddig elért eredményeink alapján tehát levonhatók az alábbi következtetések:

- A hierarchiamodell 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, aminek hátterében a Keap1–Nrf2–ARE szabályozási útvonal ROS indukálta változásai állnak.

7. 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, minél pontosabb feltárásuk – nem csupán *in vivo*, de *in vitro* rendszerekben is – további kutatásaink egyik fő célja.

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

A gyakorlat számára szintén fontos adatokkal szolgálhatnak azok a mostanában megkezdett kutatásaink is, amelyek célja természetes eredetű anyagok, különösen a nagy antioxidáns tartalommal rendelkező fitobiotikumok lehetséges hatásának felmérése a mikotoxinok káros hatásainak csökkentése érdekében.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Hazai és külföldi partnerintézmények: Kaposvári Egyetem Élettani és Állathigiénia Intézeti 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 a kutatás iránti elkötelezettségükkel nagymértékben hozzájárultak, 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 Kutatócso-

port (2006–2011), majd az MTA-KE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutató-csoport (2011–2017) keretében.

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

A székfoglaló előadás témájában megjelent fontosabb publikációk

- 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
- 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.
- Erdélyi M. – Weber M. – Balogh K. – Ancsin Zs. – Mézes M. (2011): *Acta Vet. Brno*, 80: 287–292.
- Mézes M. – Barta M. – Nagy G. (1998): *Res. Vet. Sci.*, 66: 19–23.
- Pál L. – Dublec K. – Weber M. – Balogh K. – Erdélyi M. – Szigeti G. – Mézes M. (2009): *Acta Vet. Hung.*, 57: 75–84.
- Pelyhe Cs. – Kövesi B. – Zándoki E. – Kovács B. – Szabó-Fodor J. – Mézes M. – Balogh K. (2016): *Mycotoxin Res.*, 32: 77–83.
- Surai P. F. – Mézes M. – Melnichuk, S. D. – Fotina, T. I. (2008): *Krmva* (Zagreb), 50: 35–43.
- 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. – Fodor J. – Balogh K. – Wágner L. – Erdélyi M. – Mézes M. (2008): *Acta Vet. Brno*, 77: 45–49.
- Weber M. – Stiller Sz. – Balogh K. – Wágner L. – Erdélyi M. – Mézes M. (2007): *Acta Vet. Hung.*, 55: 21–27.

Felhasznált irodalom

- Anater, A. – Manyes, L. – Meca, G. et al. (2016): *Aquaculture*, 451: 1–10.
- AOAC (1984): *Official Methods of Analysis*. 28054 B. 14th ed. Arlington: Association of the Official Analytical Chemists.
- Arunachalam, D. – Doohan, F. M. (2013): *Toxicol. Lett.*, 217: 149–158.
- Bamburg, J. R. – Riggs, N. V. – Strong, F. M. (1968): *Tetrahedron Lett.*, 24: 3329–3336.
- Bin-Umer, M. A. – McLaughlin, J. E. – Butterly, M. S. et al. (2014): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 11798–11803.
- BioMin World Mycotoxin Survey (2015): <https://www.biomin.net/en/blog-post-s/2015-biomin-mycotoxin-survey-out-now/>
- Calabrese, V. – Guagliano, O. E. – Sapienza, M. et al. (2007): *Neurochem. Res.*, 32: 757–773.
- Chandratre, C. A. – Telang, A. G. – Badgular, P. C. et al. (2014): *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 124–138.
- Choi, K. – Kim, J. – Kim, G. W. et al. (2009): *Curr. Neurovasc. Res.*, 6: 213–222.
- Davies, K. J. (2000): *IUBMB Life Sci.*, 50: 279–289.
- Diaz, D. E. (ed.) (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham: Nottingham University Press.
- Dickinson, B. C. – Chang, C. J. (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, J. M. – Halliwell, B. (1990): *Trends Biochem. Sci.*, 15: 129–135.
- Gyongyossy-Issa, M. I. – Christie, E. J. – Khachatourians, G. G. (1984): *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1182–1184.
- Hermesz E. – Ferencz A. (2009): *Comp. Biochem. Physiol.*, 150C: 101–106.
- Huff, W. E. – Doerr, J. A. – Hamilton, P. B. et al. (1981): *Poult. Sci.*, 60: 1412–1414.

- Jacob, R. A. – Burri, B. J. (1996): *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 985S–990S.
- Kaspar, J. W. – Niture, S. K. – Jaiswal, A. K. (2009): *Free. Radic. Biol. Med.*, 47: 1304–1309.
- Kravchenko, L. V. – Galash, V. T. – Avreneva, L. T. et al. (1989): *J. Ichthyol.*, 29: 156–160.
- Liu, L. – Wu, S. – Tam, M. F. (1993): *Biochim. Biophys. Acta*, 1216: 332–334.
- Lowry, O. H. – Rosebrough, N. J. – Farr, A. L. et al. (1951): *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275.
- Lushchak, V. I. (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, J. S. 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. Budapest: Medicina, 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. USA*, 91: 9926–9930.
- Moss, M. O. (2002): *Mycologist.*, 16: 158–161.
- Murphy, M. P. (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, Z. A. – Cushman, L. L. – Johnson, B. C. (1966): *Anal. Biochem.*, 16: 359–364.
- Rahman, K. (2007): *Clin. Interv. Aging*, 2: 219–236.
- Rizzo, A. F. – 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, R. H. (1968): *Anal. Biochem.*, 25: 192–205.
- Sies, H. (1997): *Exp. Physiol.*, 82: 291–295.
- Smith, T. K. (1992): *J. Anim. Sci.*, 70: 3989–3993.
- Sokolovic, M. – Garaj-Vrhovac, V. – Simpraga, B. (2008): *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 59: 43–52.
- Surai P. F. – Fisinin, V. I. (2015): *J. Vet. Sci. Med.*, 3 (1): 16.
- Surai P. F. – Fisinin, V. I. (2016): Antioxidant system regulation: from vitamins to vitagenes. In: Watson, R. R. – de Meester, F. (eds.): *Handbook of Cholesterol*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 451–481.
- Surai P. F. – Dvorska, J. E. – Sparks, N. H. C. – Jaques, 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*. Nottingham: Nottingham University Press, 131–142.
- Swanson, S. – Corley, R. (1989): The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V. R. (ed): *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects*. Vol. I. Boca Raton: CRC Press, 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, C. C. – Sheen, L. Y. – Chen, H. W. 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. (9.ábra).

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.







