

# Diplomamunka

Varga Bence Tibor,

2019

Állatorvostudományi Egyetem  
Élettani és Biokémiai Tanszék  
Biokémiai Osztály

A T-2 toxin sejtkárosító hatásainak befolyásolása epoxid-hidroláz enzim  
segítségével csirke májsejttenyészetben

**Készítette:** Varga Bence Tibor



**Témavezetők:** Dr. Mackei Máté, PhD hallgató  
Dr. Barna Réka Fanni, PhD hallgató

Budapest, 2019

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	1
Bevezetés .....	2
A mikotoxinokról általában .....	2
A trichotecének.....	3
Kémiai szerkezetük és csoportosításuk .....	3
A T-2 toxin .....	4
Előfordulása és kémiai tulajdonságai .....	4
Metabolizmusa .....	5
Maszkolt mikotoxinok .....	5
A T-2 toxin sejszintű hatásai .....	6
Mikotoxikózis és állatfaji jellegzetességek .....	8
Mikotoxinok elleni védekezés lehetőségei.....	10
A mikotoxinok megkötése (adszorbeálása) .....	10
Antioxidánsok .....	10
Egyéb módszerek .....	11
Az epoxid-hidrolázokról általában .....	11
Sejttenyészetek.....	12
Célkitűzés.....	14
Anyag és módszer .....	15
Kísérleti állatok .....	15
Műtét és perfúzió.....	15
A sejtek izolálása és mosása .....	16
Az életképesség és az összsejtszám meghatározása.....	16
A felhasznált pufferek összetétele: .....	17
A sejtek kezelése és a mintavételek.....	18
Laboratóriumi mérések .....	18
Statisztika.....	20
Eredmények .....	21
Megbeszélés .....	25
Összefoglalás .....	27
Summary.....	29
Irodalom.....	30

## Rövidítések jegyzéke

BCA = bicinchoninic acid

BSA = bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)

CAT = kataláz

CCK-8 = cell counting kit 8

CTR = kontroll

DMSO = dimetil-szulfoxid

DON = deoxinivalenol

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

EGTA = etilén-glikol-bisz( $\beta$ -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav

EH = epoxid-hidroláz

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat)

FBS = fetal bovine serum (fötális borjú savó)

GPx = glutation-peroxidáz

GST = glutation-S-transzferáz

HPLC = magas nyomású folyadékkromatográfia

IgA = immunglobulin-A

IgE = immunglobulin-E

IL-2 = interleukin-2

IL-5 = interleukin-5

IL-6 = interleukin-6

IL-8 = interleukin-8

JAK/STAT = janus kinase/signal transducer and activator of transcription protein

MAPK = mitogen-activated protein kinase

NF- $\kappa$ B = nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NPCs = non-parenchymal cells (nem parenchymális sejtek)

P = tévedési valószínűség

PBS = phosphate-buffered saline (foszfát-pufferes sóoldat)

ROS = reactive oxygen species (reaktív oxigén gyökök)

SOD = szuperoxid dizmutáz

M-PER = mammalian protein extraction reagent

# Bevezetés

A mikotoxinok a mikroszkópikus gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek különféle biológiai hatásokkal rendelkeznek. Közülük számos faj termel olyan toxint, mely kiemelt állategészségügyi jelentőséggel is bír. Ezenkívül a különböző terményeket és takarmányokat szennyező gombák a növénytermesztés számára is komoly gazdasági veszteséget okoznak, továbbá közegészségügyi jelentőséggel is bírnak. A **növénytermesztésben** a termésátlag csökkenése, illetve a vetőmagok minőségének romlása okozza a legsúlyosabb gazdasági veszteségeket, ugyanis a gomba a növényből táplálóanyagokat használ fel, aminek következtében változnak a takarmány beltartalmi értékei, valamint csökken annak minősége és értékesíthetősége. Továbbá, ezen gombák elleni védekezés növeli az előállítás költségét. Az **állattenyésztésben** csökkent takarmányfelvétellel, rossz takarmányértékesítéssel, szaporodásbiológiai zavarokkal, csökkent fertőzésekkel szembeni ellenálló-képességgel, valamint esetenként az egyes toxinokra jellemző megbetegedések (mikotoxikózisok) kialakulásával kell számolni. A mikotoxinok **élelmiszerbiztonsági jelentőségét** részben az adja, hogy bizonyos mikotoxinok (pl. az aflatoxin) az állatok szervezetében felhalmozódhatnak, így állati eredetű élelmiszerek elfogyasztása az emberi szervezetet is jelentős mértékben károsíthatja (Rafai, 2003).

Minden olyan területen számolni kell a mikotoxin-szennyeződéssel, ahol gabonaféléket, vagy azok melléktermékeit használják fel takarmány-alapanyagként. Ennek alapján az állattenyésztésben a sertés és egyes baromfifélék vannak leginkább kitéve a mikotoxinok káros hatásainak. Fontos megjegyezni, hogy olyan növényi eredetű alapanyagok, melyek egyáltalán nem tartalmaznak mikotoxint, gyakorlati körülmények között tulajdonképpen nem állíthatóak elő, ezért kiemelten fontos a mikotoxinok hatásainak minél pontosabb ismerete és az azok elleni védekezés lehetőségeinek tökéletesítése (Antonissen et al., 2014).

## Irodalmi áttekintés

### A MIKOTOXINOKRÓL ÁLTALÁBAN

A mikotoxinok kártételére és hatásmechanizmusára irányuló kutatások még a múlt században kezdődtek. Ennek az volt az oka, hogy ekkor jelent meg Angliában egy addig ismeretlen kórkép (turkey X disease), ami több, mint 100.000 pulyka elhullásához vezetett. Később kiderült,

hogy a háttérben az állt, hogy a takarmány nagymennyiségű aflatoxint tartalmazott (Blount, 1961). Napjainkban azonban a heveny mérgezéssel szemben gyakoribb az idült mérgezés, mely esetén a súlygyarapodás csökkenése és a fertőzések számának növekedése figyelhető meg (Mackei et al., 2018).

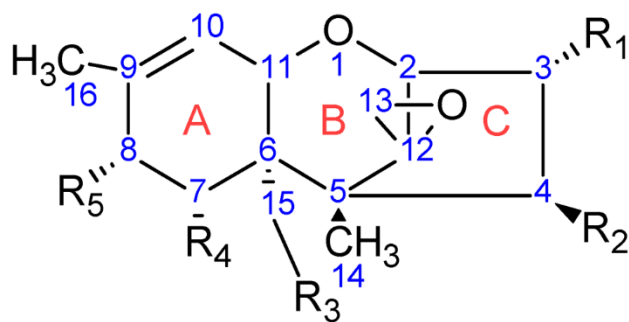
A mikotoxinokat termelő gombafajokat annak alapján, hogy növekedésükhöz milyen mennyiségű víztartalomra van szükségük, két csoportra oszjuk. E csoportosításnak megfelelően a szántóföldi penészgombák több, míg a raktári penészgombák kevesebb vizet igényelnek. A **raktári penészgombák** közé tartoznak az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok, melyek a helytelen tárolás következtében jelennek meg és szaporodnak el a takarmányban. Az általuk termelt fontosabb toxinok közé tartozik az aflatoxin, ochratoxin-A, citrinin, patulin, és a rubratoxin B. A **szántóföldi penészgombák** közé tartoznak a *Fusarium*-, az *Alternaria*-, illetve a *Stachybotrys* fajok. Fontosabb mikotoxinjaik a zearalenon és az olyan trichotecén vázas mikotoxinok, mint például a T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, fusarenon-X és fumonizinek (Balendres et al., 2019).

A legfrissebb felmérések szerint Európában a terményminták mintegy 60–70%-a szennyezett mikotoxinokkal. Ez az arány még magasabb (akár 80% feletti is lehet) a világ más területein, mint például Ázsiában és Amerikában (Mackei et al., 2018).

## A TRICHOTECÉNEK

### KÉMIAI SZERKEZETÜK ÉS CSOPORTOSÍTÁSUK

A trichotecének egy tetraciklikus szekszviterpenoid 12,13-epoxitrichotec-9-én gyűrűvel rendelkeznek (**1. ábra**), melynek a 12,13-epoxi gyűrűje felelős a toxikus hatásért.



**1. ábra:** A trichotecének alapváza  
(Shank et al., 2011)

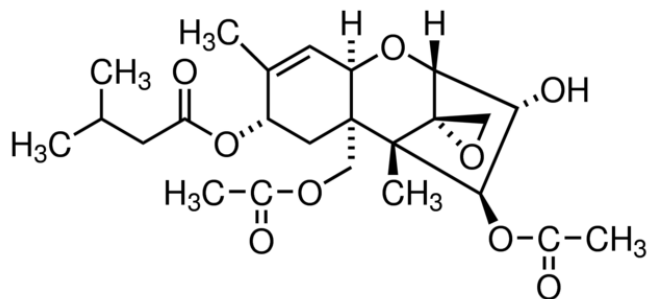
A kémiai szerkezetükre jellemző még, hogy található egy hidroxilcsoport a 3. C-atomon, egy acetiloxi-csoport a 4. és a 15. C-atomon, egy hidrogénatom a 7. C-atomon, valamint egy izovaleril-csoport kapcsolódik a 8. C-atomhoz egy észtercsoporton keresztül. A jellemző funkciós csoport alapján a trichotecének 4 csoportra oszthatók:

- Az **A CSOPORT** fő képviselői a **T-2 toxin** és a **HT-2 toxin**, melyek nem tartalmaznak karbonilcsoportot a 8. C-atomon.
- A **B CSOPORT** tagjai rendelkeznek karbonilcsoporttal a 8. szénatomon. Ide tartozik a **nivalenol** és a **deoxinivalenol**.
- A **C CSOPORT** trichotecénjei egy további epoxid csoporttal rendelkeznek, ami vagy a 7. és a 8. C-atom között, vagy pedig a 9. és a 10. C-atom között helyezkedik el. Ebbe a csoportba tartozik a **crotocin** és a **baccharin**.
- A **D CSOPORT** tagjai egy makrociklikus gyűrűvel rendelkeznek a 4. és a 15. szénatom között. Ide tartozik a **roridin** és a **satratoxin** (Adhikari et al., 2017).

## A T-2 TOXIN

### ELŐFORDULÁSA ÉS KÉMIAI TULAJDONSÁGAI

A T-2 toxint a természetben a *Fusarium* nemzetség fajai termelik, melyek közül a legfontosabbak *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. acuminatum* and *F. poae* fajok. Ezek a gombák főként a gabonaféléket fertőzik, így megtalálhatók a búzában, az árpában és a zabban is (Königs et al., 2009).



**2. ábra:** A T-2 toxin kémiai szerkezete  
(Forrás: <https://www.sigmaaldrich.com>)

A T-2 toxint (3- $\alpha$ -hidroxi-4- $\beta$ , 15-diacetoxi-8- $\alpha$  [3-metil-butiriloxi]-12,13-epoxitrichotec-9-én) a *Fusarium* penészgombák által termelt legtoxikusabb trichotecénvázis mikotoxinok tartják (2. ábra) (Adhikari et al., 2017). Deacetilált formája a HT-2 toxin. A két vegyület csak egy oldalláncban különbözik egymástól, mégpedig ez az oldallánc a T-2 toxin esetében egy acetilcsoport, míg a HT-2 toxinnál egy hidroxilcsoport (Wu et al., 2014).

A toxin mesterséges előállítása általában kutatási vagy kereskedelmi célokból történik. A T-2 toxint termelő gombafajokat legtöbbször agar táptalajon tenyésztik, ahonnan magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) izolálják. Kémiai szintézisére jelenleg még nincs jól alkalmazható módszer (Voyksner et al., 1987), meghatározására az elmúlt évtizedben a HPLC és a tömegspektrofotometria volt a leginkább használatos módszer (Alshannaq & Yu, 2017).

## METABOLIZMUSA

A T-2 toxint általában az állatok száján át, a takarmánnyal veszik fel. Mivel a toxin az emésztéssel szemben ellenálló, jelentős része eredeti formában a bélsárral kiürül, egy része viszont felszívódik a vékonybélből. A felezési ideje meglehetősen rövid. *In vivo* kísérletekből tudjuk, hogy leggyakoribb reakció az izovaleril-csoport észter hidrolízise és hidroxilációja, ugyanakkor deepoxidáció és glükuronsavas konjugáció is történik. A fő metabolit a HT-2 toxin, mely szintén jelentős toxikus hatással bír (Wu et al., 2010). A hidroxilációhoz a citokróm P450 enzimrendszerre is szükség van, mely során leginkább T-2 triol és a T-2 tetraol keletkezik az acetilkolin-észterázon keresztül. A metabolizmusban a bélflóra is részt vesz, mely során keletkező termékek nagymértékben függenek a baktériumfajtól és a pH-tól. A vörösvérsejtekben a T-2 toxin neosolaniollá, míg a fehérvérsejtekben HT-2 toxinná alakul (Königs et al., 2009).

## MASZKOLT MIKOTOXINOK

Manapság egyre nagyobb figyelmet kapnak az úgynevezett maszkolt és rejtett mikotoxinok. A jelenlegi besorolás szerint a mikotoxin-származékokat három csoportra oszthatjuk. Ezek a szabad formában jelenlévő mikotoxinok, a mátrixhoz kötött mikotoxinok, illetve a szerkezetükben módosított mikotoxinok. Az utóbbiak gyakran rendkívül toxikusak, illetve jelentőségüket tovább növeli, hogy a szervezet detoxifikáló folyamatai és a bélflóra révén egyaránt visszaalakulhatnak az eredeti szerkezetű, vagy akár a kiindulási molekulánál lényegesen toxikusabb vegyületekké. Továbbá az is problémát jelent, hogy a jelenleg használt vizsgálati módszerek alkalmazása csak a



szabad formában lévő mikotoxinok kimutatását teszi lehetővé, míg a mátrixhoz kötött és szerkezetükben módosult mikotoxinokét nem. Ebből következik, hogy az utóbbiak az élelmiszer és takarmányok mikotoxintartalmának becslésénél nem kerülnek beszámításra (Mackei et al., 2018).

A maszkolt mikotoxinok a növények mikotoxin metabolitjai. A növények úgy védekeznek a xenobiotikumok, így a mikotoxinok ellen is, hogy azokat polárisabb metabolitokká alakítják, melyeket a vakuólumokban szállítanak és ott tárolnak, vagy biopolimerekkel, például egyes sejtfal-összetevőkkel konjugálják azokat. Ez azokra a mikotoxinokra jellemző, melyek intenzív anyagcserét folytató növényekkel kerülnek kapcsolatba. A maszkolt mikotoxinoknak a jelentős része az „anyamolekulával” együtt fordul elő, amely növeli az állategészségügyi és a közegészségügyi kockázatot. Habár kevés információval rendelkezünk a maszkolt mikotoxinok toxicitásáról, de ez alapján tudjuk, hogy az eredeti molekulával szemben *in vivo* és *in vitro* is kevésbé toxikusak. Ez különösen igaz a legalaposabban vizsgált maszkolt mikotoxinra, a deoxinivalenol-3-glikozidra. A kisebb toxicitás ellenére valószínűleg a bélcsatornában a mikroorganizmusok hatására szabad formára hidrolizálnak, kiszámíthatatlanná téve ezzel a toxicitást. A metabolizmusuk módja jelentős mértékben fajfüggő (Berthiller et al., 2013).

## A T-2 TOXIN SEJSZINTŰ HATÁSAI

Toxicitásaért a 12,13-epoxi gyűrű felelős leginkább, ugyanis az epoxidok nukleofilokkal reagálnak, mely nukleofilok közé tartoznak a nukleinsavak bázisai és a fehérjék. Ez a magyarázata annak, hogy miért gátolja a T-2 toxin a DNS-, RNS- és részben ezekből következően a fehérjeszintézist is (Li et al., 2011). Ezek a hatások felelősek részben a toxin apoptózist kiváltó hatásaért, mely leginkább erőteljesen osztódó sejtekben érvényesül, így az immunrendszer egyes sejtjeiben (pl. limfocitákban), a gasztrointesztinális és a magzati szövetekben és a csontvelőben (Adhikari et al., 2017).

A T-2 toxin a fehérjeszintézisnek az iniciációs szakaszát gátolja azáltal, hogy a riboszóma 60S alegységéhez és a peptidil-transzferáz enzimhez kapcsolódik. Emellett a fehérjeszintézist oly módon is akadályozza, hogy kovalens kötéssel kapcsolódik a fehérjék szulfhidril csoportjaihoz, így módosítva azok szerkezetét, és ennél fogva gátolja az egyes DNS-polimerázokat, a terminális deoxiribonukleotid-transzferázt, a monoamino-oxidázt és számos más, a véralvadásban is résztvevő fehérjét is. Továbbá gátol bizonyos, az anyagcsere szempontjából nagy jelentőséggel

bíró enzimeket (pl. szukcinát-dehidrogenázt), melyek a citrátkörben kulcsszerepet játszanak (Murthy et al., 1985).

Intracellulárisan a T-2 toxin megváltoztatja a membránok szerkezetét, így a mitokondrium, a durvafelszínű endoplazmatikus retikulum és számos más membrán szerkezetét is. Emellett egyes, egereken végzett kutatások azt bizonyítják, hogy képes átjutni a placentán és károsítani a magzatot azáltal, hogy apoptózist idéz elő. Valamint szabályozza a szteroid hormonok szekrécióját patkányok petefészkének granulóza sejtjeiben a cAMP-PKA útvonalon keresztül (Adhikari et al., 2017).

A trichotecének toxikus hatásának fontos mechanizmusa a fokozott mértékű oxidatív stressz, mely által a T-2 toxin DNS-károsodást és apoptózist idéz elő. A trichotecének hatására fokozott szabadgyökképződés figyelhető meg a sejtekben, beleértve a reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkezését is, melyek lipidperoxidációt idéznek elő. A fokozott lipidperoxidáció és az antioxidáns hatású enzimek csökkent aktivitása végül apoptózishoz vezethet. Az antioxidáns enzimek közé tartozik a glutation-S-transzferáz (GST), a glutation-peroxidáz (GPx), a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a kataláz (CAT). Emellett bizonyos jelátviteli mechanizmusok is aktiválódnak az oxidatív stressz hatására, így MAPK, a JAK/STAT, és a NF- $\kappa$ B, illetve a kaszpáz-mediált apoptózisért felelős jelátviteli mechanizmus is (Wu et al., 2014; Zhuang et al., 2013).

A T-2 toxin immunszuppresszív hatással is rendelkezik, amely végeredményben szintén a fehérjeszintézist gátló hatásnak tulajdonítható. A nyirokszervekben limfocita depléciót idéz elő, és ezáltal leukopénia alakul ki (Wyatt et al., 1973). Továbbá a vörösvérsejt-képzést is gátolja a csontvelőben és a lépben, illetve jelentősen károsítja az ellenanyag-termelést, gátolja a limfociták osztódását és a dendritikus sejtek fejlődését. Emellett a toxin gátolja a T-sejtek IL-2 és IL-5 termelését is. A limfocita prekursorokon kívül a trichotecének célpontjai közé tartoznak a granulocyták, a monocyták és a erythrocyták képzéséért felelős sejtek is. A T-2 toxin tartós felvétele a gátolja a toll-like receptorok (TLR) működését, ezáltal akadályozza a baktériumok és vírusok hatására kialakuló gyulladást (Seeboth et al., 2012). Fontos megemlíteni, hogy a toxin immunszuppresszív hatása ronthatja a vakcinázások eredményességét is, ami csökkent ellenanyag titerekben nyilvánul meg (Kamalavenkatesh et al., 2005). Ezek mellett azonban az is lényeges, hogy egyes kutatások szerint kis mennyiségű toxin tartós felvétele a fentiekkel ellentétes módon immunstimulációs hatású, ami pedig megnövekedett IgA- és IgE-koncentrációban nyilvánul meg (Rosenstein et al., 1979).

## MIKOTOXIKÓZIS ÉS ÁLLATFAJ JELLEGZETESSÉGEK

A mikotoxinok okozta betegséget mikotoxikózisnak nevezzük. A mikotoxikózisok közös tulajdonságai, hogy takarmányozási eredetűek, háttérükben nincs specifikus kórokozó, ezért nem terjednek egyik állatról a másikra, és a szennyezett takarmány megvonásával a tünetek mérsékelhetők. A különböző gyógyszerekkel, így például antibiotikumokkal végzett kezelések az elsődleges ok megszüntetését tekintve sikertelenek, azokkal csak a másodlagosan, például fakultatív kórokozó baktériumok hatására kialakuló megbetegedések kezelhetők. Előfordulásuk gyakran időszakos, mivel számos, a takarmányokat szennyező gombafaj a toxintermeléséhez sajátos klimatikus tényezőket igényel. A diagnózishoz a gombaspórák kimutatása, azok nagy koncentrációja esetén sem elegendő, szükség van még a klinikai tünetek meglétére, továbbá a mikotoxinok célzott kimutatására a takarmányból és/vagy a szövetekből. A toxin és az azt termelő gomba együttes azonosítása azért szükséges a diagnózis felállításához, mert egy adott *genuson* belül toxint termelő és toxint nem termelő törzsek is megtalálhatók, melyek ugyanabban a takarmányban egyidejűleg jelen lehetnek. Emellett, amennyiben a mintából penészgomba nem tenyésztethető ki, az még nem jelenti feltétlenül a mikotoxinok hiányát is, ugyanis azok rendkívül ellenállóak, így bár a gomba a takarmány-előállítás során elpusztul, a mikotoxinok továbbra is jelen lehetnek. Ez az oka annak, hogy egyes mikotoxinok raktározott termékekben is gyakran előfordulnak (Tiwari and Sinha, 2010).

Fontos tudni, hogy az egyes toxinok eltérő koncentrációban mérgezőek. A következő táblázat (**1. táblázat**) azt mutatja, hogy mekkora dózistól toxikus az adott mikotoxin:

1. táblázat: Egyes mikotoxinok toxicitása szintek szerint (per os, mg/ttkg)	
Kicsi: < 10	aflatoxin, T-2 toxin
Közepes: 100-20	dezoxinivalenol, nivalenol, ochratoxin
Nagy: > 100	fumonizinek, zearalenon, verrukulogén

A toxicitás számos tényezőtől függ, többek között a szervezetbe való bejutás módjától, a toxin koncentrációjától és a kitettség hosszától, illetve az állat korától, nemétől és általános egészségi állapotától. A hatást befolyásolhatja továbbá, hogy egy adott időpontban milyen egyéb toxinnak van kitéve az állomány, ugyanis számos vizsgálatban számoltak be különféle mikotoxinok

szinergista, vagyis egymást erősítő, valamint antagonista, egymást gátló hatásairól (Huff et al., 1988).

A mikotoxikózisok akut és krónikus lefolyásúak egyaránt lehetnek. **Heveny** esetben hányást, hasmenést okoz, illetve az emésztő szervrendszerben és bőrrel érintkezve gyulladást és elhalást idéznek elő. Továbbá kialakulhat haemorrhagiás diathesis is a trombocitopénia vagy a véralvadási faktorok csökkent termelése, illetve a vérlemezke funkció gátlása, vagy ezek kombinációja miatt. Paresis és paralízis majdnem az összes állatfajban megfigyelhető, mely során végül súlyos vérnyomásesés is kialakulhat, ami halálhoz vezethet (Sokolović et al., 2008). Napjainkban azonban jellemzően **krónikus mérgezések** fordulnak elő, mely csökkent takarmányfelvétellel és ezáltal csökkent súlygyarapodással vagy tejtermeléssel jár (Whitlow & Hagler, 2005; Sklan et al., 2003). Az immunszuppresszív hatása miatt másodlagos bakteriális, vírusos vagy parazitás fertőzések elfedhetik a mikotoxikózisok tüneteit (Ziprin & Elisalde, 1990). A nyirokszervek kisebbek a normálisnál, melyet sokszor nehéz észrevenni a boncolás során (Adhikari et al., 2017).

Az egyes háziállatfajok eltérő mértékű érzékenységet mutatnak a trichotecének toxikus hatásaira:

- A **kérődzők** a T-2 toxinnal szemben ellenállóbbak, mint a monogasztrikus állatfajok, aminek a bendőben végbemenő intenzív deepoxidáció és deacetiláció az oka. A felszívódást követően leginkább a csontvelőkárosodás tünetei jelentkeznek. A szájüregben rendszerint enyhébb elváltozások figyelhetők meg, mint a nyálkahártya hiperémia és ödémája, míg az oltógyomorban sok esetben a nyálkahártya vérzése jelentkezik. A hemorrágiás diathesis kevésbé kifejezett, mint más fajok esetében (Gallo et al., 2015).
- A **baromfi** kevésbé érzékeny a toxin hatásaira, mint a monogasztrikus emlős haszonállatfajok. Baromfiban krónikus esetben a súlygyarapodás csökkenése mellett a toxin csökkenti a tojástermelést és a tojáshéj vastagságát is, valamint a tollazat minősége is romlik. Még kis dózisban is jelentősen csökken brojlercsirkékben a hematokrit érték, illetve a vérsérumban az összfehérje és a koleszterin mennyisége, viszont a húgysav-koncentráció és a laktát-dehidrogenáz aktivitása növekszik (Adhikari et al., 2017).

- **Sertésben** a T-2 toxin az előbb említettek mellett előidézhetheti a petefészek sorvadását is, illetve a HT-2 (fő metabolitja) az oxidatív stressz révén a petesejtek apoptózisát váltja ki. A szaporodásbiológiai zavarokon és a teratogén hatáson kívül a toxin karcinogén hatással nem rendelkezik (Quiroga et al., 2009).

## MIKOTOXINOK ELLENI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI

### A MIKOTOXINOK MEGKÖTÉSE (ADSZORBEÁLÁSA)

Számos készítmény van, melyet a takarmányba keverve adalékként csökkenti a toxin felszívódásának mértékét a bélcsatornából. Azonban azt fontos megjegyezni, hogy olyan szer nincs, amely egyaránt képes mindegyik mikotoxint megkötni és semlegesíteni. A **mikotoxinkötő vegyületek** hatása azon az elven alapul, hogy ezek egyrészt nagy felülettel, valamint jelentős számú kötőhellyel rendelkeznek. Azonban használatuknak korlátai is vannak, ugyanis számos mikotoxinkötő vegyület a mikotoxinok mellett a bélcsatornában egyes táplálóanyagokat (például vitaminokat, ásványi anyagokat) is megkötnék, amelyek emiatt csak csökkent mértékben szívódnak fel, így termelésük csökkenés vagy akár hiánytünetek is kialakulhatnak. Továbbá azt is figyelembe kell venni, hogy az egyes mikotoxin-kötő vegyületek kötési kapacitása pH-függő, tehát a hatásukat csak bizonyos bélszakaszokon fejtik ki, sőt ezt követően az előzőleg már megkötött mikotoxinok ismét szabaddá válhatnak és a bélcsatornából felszívódhatnak. A mikotoxinkötő vegyületek közé tartoznak a **szilikát alapú ásványi anyagok** (pl. nátrium-kalcium-aluminumszilikát), a **zeolitok**, a **bentonit**, az **aktív szén** és a **polivinilpirrolidon** (Rafai, 2003).

### ANTIOXIDÁNSOK

Ahogy már említettük, az oxidatív stressz kulcsfontosságú szerepet játszik a trichotecének toxicitásában. Egyes anyagok, mint például bizonyos vitaminok, a flavonoidok közé tartozó kvercetin, a szelén, a glükomannán, illetve bizonyos aminosavak antioxidáns hatást fejtenek ki a trichotecénnel szemben. Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy az **E- és a C-vitamin** csökkenti a lipidperoxidációt és különböző reaktív anyagok, gyökök mennyiségét, ezáltal véd az akut trichotecén toxikózissal szemben (da Silva et al., 2017). A **kvercetin** a flavonoidok közé tartozó vegyület, amely antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik. Az antioxidáns hatását a T-2 toxinnal szemben a SOD és a GPx aktivitásának növelésével fejtik ki. Szintén antioxidáns hatással

bír a **szelén**, amely a mikotoxinok vonatkozásában feltehetően membránstabilizáló hatása révén megakadályozza a vörösvérsejtek T-2 toxin okozta membránkárosodását. A **glükomannán** egy oldható, fermentálható növényi rost, amely sertéseknek takarmány-kiegészítésként adva véd a T-2 toxin vakcinázás során problémákat okozó immunszuppresszív hatásával szemben. A **N-acetil-L-cisztein** szulfhidril-csoportjai révén megköti a reaktív oxigén gyököket, így szintén alkalmas lehet a mikotoxinok által okozott káros hatások mértékének csökkentésére (Wu et al., 2014).

## EGYÉB MÓDSZEREK

Az antioxidánsokon és a toxinkötő adszorbenseken kívül **más módszerek** is szóba jöhetnek, mint például mikrobiális (pl. baktériumok vagy élesztő segítségével történő) biotranszformáció. A **mikrobiális biotranszformáció** ígéretes módszernek bizonyul, ugyanis specifikus, irreverzibilis és hatékony átalakítást kínál, ugyanakkor környezetbarát, mivel nem keletkeznek toxikus, illetve nem kívánatos melléktermékek. A **tejsavbaktériumok** gátolják a gombák növekedését és egyes mikotoxinokat is lebontanak, köztük a DON-t, az aflatoxinokat és a T-2 toxint is, így lehetőségként felmerülnek a gombák okozta problémák visszaszorításában az élelmiszertermelés és feldolgozás során. A tejsavbaktériumok mellett ígéretesnek bizonyul a nemrég azonosított *Devosia sp.* ANSB714 baktérium is, mely 24 óra alatt képes a DON toxin 97%-át lebontani. A tejsavbaktériumokon kívül az **élesztőgombák** közé tartozó *Geotrichum candidum* is képes a T-2 toxin szintjét csökkenteni gabonafélékben. Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert, de feltehetően az élesztő a T-2 toxint más összetevővé alakítja, vagy gátolja annak termelődését (Wu et al., 2014).

## AZ EPOXID-HIDROLÁZOKRÓL ÁLTALÁBAN

Az epoxid-hidroláz (EH) enzimek az epoxidok hidrolízisét katalizálják, így belőlük diol szerkezetű molekula keletkezik. Az EH-ok prokariótákban és eukariótákban is megtalálható enzimek, ahol különböző feladatot látnak el. A növényi EH-ok a kutin, valamint olyan anyagok bioszintézisében vesznek részt, melyek a növény védekező mechanizmusaiban játszanak szerepet. A mikrobiális epoxid-hidrolázok baktériumokban és gombákban találhatók meg, ahol katabolikus folyamatokat látnak el. A rovarok esetében a juvenilis hormon mennyiségének szabályozását végzik a juvenilis hormon-észterázzal együtt a hormon lebontása révén. Az emlős epoxid-hidrolázok mind az exogén, mind az endogén eredetű epoxidok detoxifikációjában vesznek részt

(Morisseau, 2013). Az epoxid-hidrolázokat a vegyiparban is felhasználják abból a célból, hogy az adott vegyületet az enantiomer párjától megtisztítsák, ezáltal tiszta epoxidokat állítsanak elő. Ezt az epoxid-hidrolázok magas enantiomer szelektivitása teszi lehetővé (van Loo et al., 2006).

Mikorbiális epoxid-hidrolázt termel a *Rhodococcus rhodochrous*, ami egy vörös pigmentet képző, Gram-pozitív baktérium, amely az *Actinobacteria* törzshöz és a *Nocardiaceae* családhoz tartozik. A baktériumot az iparban főként arra használják, hogy akrilnitrilből akrilamidot állítsanak elő. Fontos továbbá szénhidrogének, poliklórozott bifenilek és más aromás vegyületek bioremediációjában is. A bioremediáció egy olyan eljárás, mely során mikroorganizmusokat használnak fel szennyezőanyag lebontására, hogy annak szintjét elfogadható szintre csökkentsék. A törzs egyéb tagjai, mint például a *Streptomycesek*, a *Nocardiák*, a *Rhodococcusok* és a *Gordoniák* triglicerideket szintetizálnak és halmoznak fel. A *R. rhodochrous* esetében a triglicerid-felhalmozás az alternatív energiaforrások iránti igény miatt fontos, azonban e tulajdonságáról még korlátozottak az ismeretek (Shields-Menard et al., 2014).

## SEJTNYÉSZETEK

A sejtenyésztés során a sejteket az eredeti szövetből eltávolítva *in vitro* körülmények között tarjuk fenn, illetve szaporítjuk. A sejtenyészetek alkalmazása számos szempontból előnyös, ugyanis leegyszerűsített rendszerek, vagyis a velük végzett kutatások során kapott eredményeket kevesebb faktor befolyásolja, így azokat gyakran könnyebb értelmezni. Továbbá kiegészíti, megelőzi az élő állatokkal elvégzett kísérleteket, ami állatvédelmi szempontból is kívánatos. Ami a hátrányokat illeti, mivel leegyszerűsített rendszerről van szó, nem tudjuk teljes bizonyossággal kimondani, hogy *in vivo* körülmények között elvégzett kísérletek során is ugyanazokat a hatásokat tapasztalnánk, vagy sem. Más szóval a sejtenyészet arra alkalmas, hogy egy adott kérdést megválaszoljunk az adott sejtípuson az adott tényezők figyelembe vételével, de nem helyettesíti az *in vivo* kísérleteket (MacGowan et al., 2001). A sejtenyészetek főbb típusai:

- Az **izolált sejtek**, nem valódi sejtenyészetek, mert nem alakulnak ki a szövetre jellemző sejtkapcsoló struktúrák a sejtek között, így a kapott eredmények nem minden esetben extrapolálhatók jól a valóságra (Chaffey, 2003).
- A **primer sejtenyészetek** élő állatokból készülnek, melyek már hatékonyabban modellezik az *in vivo* viszonyokat, vagyis az élő állatra jellemző körülményeket (Mather and Barnes, 1998).

- A **sejtvonalak** jó osztódási potenciállal rendelkező sejtek, melyeket hosszú időn keresztül fenn lehet tartani. Nagy részük daganatos sejtvonal, ami azt jelenti, hogy tumorból nyerték ki őket. Szemben a primer sejtenyészetekkel, könnyen és jól fenntarthatók, viszont távolabb állnak az *in vivo* viszonyoktól, így gyakran korlátozott a levonható következtetések száma. A nem daganatos sejtvonalak viszonylag jól hasonlítanak az élő állatra és könnyen fenntarthatóak. Ezeket általában embrionális korú vagy újszülött állatból nyerik (Kaur and Dufour, 2012).

A primer hepatocita tenyészet kialakítása során egyrétegű, májsejteket tartalmazó sejtenyészetet hozunk létre. Ezzel a módszerrel a májsejtek néhány napig megőrzik az anyagcsere-aktivitásukat, illetve a különböző mediátorokkal szembeni reakciókészségüket, ezért gyakran alkalmazzák az ilyen tenyészeteket a máj működésének *in vitro* vizsgálatára. A májsejtenyészetek kialakításához a sejtek izolálására, majd azok tenyésztőedényre történő lerakására van szükség. Az izolálás történhet enzimatis emésztéssel módszerrel, amely során az izolált máj nagy erein keresztül kollagenáztartalmú oldatot áramoltatunk át a szerven. Az eredményességet növeli, ha az enzimatis emésztés előtt kelátképző anyaggal, például EDTA-tartalmú oldattal mossuk át a szervet. A kelátképző anyag a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok megkötése révén elősegíti a sejtek közötti dezmoszómális kapcsolatok fellazulását, megkönnyítve ezzel a sejtek izolálását. Azonban a máj intersticiális állományának emésztéséhez alkalmazott kollagenáz megfelelő aktivitásához  $\text{Ca}^{2+}$  ionok jelenlétére szükség van, így kollagenázzal történő perfúzió során ennek pótlásáról gondoskodni kell. Az izolált és sejtenyésztő edényre lerakott sejtek megfelelő körülmények között összefüggő sejtenyészetet hoznak létre (Mátis et al., 2017).

Mivel a máj a szervezetben többféle sejt együttműködésével válaszol egy-egy ingerre, mint például egyes anyagcseretermékekre, gyulladásokkeltő anyagokra, ezért az utóbbi időben megnőtt az igény olyan sejtenyészetek kialakítására, amelyek más sejteket is tartalmaznak. Azokat a sejtenyészeteket, amelyek több sejtípusból épülnek fel, ko-kultúrának nevezzük. A hepatocitákat tenyészthetjük máj eredetű nem-parenchymális sejtekkel (NPC-kel), különböző extrahepatikus sejtfeleségekkel, így fibroblast sejtekkel, aorta eredetű endotél sejtekkel vagy Ito-féle csillagsejtekkel (Thomas et al., 2005).



## Célkitűzés

A különféle takarmányokat és élelmiszereket szennyező mikotoxinok napjainkban világszerte egyre növekvő humán- és állat-egészségügyi jelentőséggel rendelkeznek. Számos kutatás foglalkozik a különböző mikotoxinok hatására a szervezetben bekövetkező folyamatokkal, az egyes, molekuláris szinten bekövetkező változások azonban sok esetben nem teljesen tisztázottak. Kísérletünk során csirke eredetű primer májsejtmodellel kívántuk tanulmányozni a trichotecénvázas mikotoxinok csoportjába tartozó T-2 toxin különböző koncentrációkban (10, 100, 1000 nmol/l) történő alkalmazása során fellépő sejtkárosító hatásokat. Továbbá az esetleges alternatív védekezési lehetőségek tekintetében a tápfolyadékhoz adagolt *Rhodococcus rhodochrous* baktérium eredetű epoxid-hidroláz enzim feltételezett protektív hatásait is vizsgálni kívántuk. A primer hepatocita sejtenyészetek alkalmazása kiemelt jelentőséggel bír abból a szempontból, hogy így a T-2 toxin specifikusan, csak a májsejtekre gyakorolt hatásait van lehetőségünk vizsgálni.

Kísérletünk során a kutatócsoportunk által előzetesen kidolgozott és validált sejtizolálási módszer segítségével kívántunk csirke eredetű primer hepatocita monokultúra tenyészeteket kialakítani. Mivel a T-2 toxin számos irodalmi adat alapján gátolja a fehérjeszintézist, így az erőteljes hatással lehet a májsejtek metabolikus aktivitására is. E feltételezett metabolikus változások nyomonkövetése céljából a toxinnal történő kezelést követően CCK-8 tesztet kívántunk elvégezni a sejtenyészeteken. Továbbá, mivel a toxin egyes források szerint intenzív, más eredmények szerint viszont csak elhanyagolható mértékű oxidatív stresszhatást idéz elő a szervezetben, a termelődött  $H_2O_2$  mennyiségének Amplex Red módszerrel történő meghatározásával kívántunk következtetéseket levonni a sejtenyészetek redox állapotára vonatkozólag. A fentieken túl a trichotecénvázas mikotoxinok általános immunmoduláló hatással is rendelkeznek, így arra kerestük a választ, hogy a T-2 toxinnal történő kezelés miképp befolyásolja a sejtek által termelt interleukin (IL)-6 és IL-8 koncentrációját.

# Anyag és módszer

## KÍSÉRLETI ÁLLATOK

A kísérlethez hímivarú 20-24 napos Ross-308 típusú brojlercsirkét használtunk, melyek a Gallus Kft. devecseri keltetőjéből származtak. Az állatok közvetlenül a kísérletet megelőzően érkeztek az Élettani és Biokémiai Tanszékre. Mivel a sejtizolálás az állatok beérkezését követően azonnal megtörtént, az Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának állásfoglalása értelmében nem volt szükség állatvédelmi engedélyre a kísérletek elvégzéséhez.

## MŰTÉT ÉS PERFÚZIÓ

Szén-dioxidos narkózist követően az állatot dekapitáltuk, és hanyatt fekvésben rögzítettük. A ventralis területről eltávolítottuk a tollakat, és a bőrt etanollal fertőtlenítettük. Ezután a coelomát aszeptikusan, tompa fejtéssel feltártuk, és megkerestük, majd kanüláltuk a *v. gastropancreaticoduodenalis*-t műanyag vénakanüllel (22 G). Ez képezte a perfúziós rendszer befolyó ágát. Ezt követte a kifolyó ág elkészítése, amely során apró metszést készítettünk ollóval a szív jobb pitvarán és abba üvegkanült vezetünk. A kollagenázos emésztés során a kollagenáz oldatot steril tripszinező lombikba vezetjük (ezt egy kis vízfürdőbe állítottuk, és folyamatosan melegen tartottuk) recirkuláció céljára.

A három lépésből álló perfúzió (**1. kép**) sebessége 30 ml/perc volt, a felhasznált oldatok hőmérsékletét 40°C-ra állítottuk be, és előzőleg Carbogennel buborékolattuk át azokat:

- A **első lépésben** 150 ml EGTA-tartalmú HANKS pufferrel vértelenítettük a májat, mely a benne lévő EGTA révén kelátot képez a kalciumionokkal, így a sejtkapcsoló struktúrák fellazulnak, és a sejtek izolálása lehetővé válik.
- A **második lépésben** ismét 150 ml HANKS pufferrel mostuk át a májat, ugyanis a következő lépésben használt kollagenáz működéséhez szükség van kalciumionokra, így el kellett távolítanunk az előző lépésben a májba juttatott EGTA-t.
- A **harmadik lépésben** az interstícium emésztése történt 100 ml kollagenázoldat perfúziójával, ami 100 mg IV. típusú kollagenázt tartalmaz. A kollagenázt a perfúzió közben oldottuk be frissen, továbbá az elfolyó oldatot steril tripszinező lombikban gyűjtöttük össze, melyet kis vízfürdőbe állítottunk, és folyamatosan melegen tartottunk. A

kollagenáztartalmú oldatot addig keringettük, míg az interstícium szét nem esett, amit a máj burkának ráncoltta válása és a jellegzetes márványszerű rajzolat megjelenése jelzett.



**1. kép:** A máj perfúziója (Forrás: saját kép)

## **A SEJTEK IZOLÁLÁSA ÉS MOSÁSA**

Ettől a lépéstől fogva steril fülke alatt, jégen dolgoztunk. A májat steril főzőpohárba helyeztük, és a burkát steril csipesz segítségével felvágtuk, majd a szervet 50 ml, előzőleg Carbogennel átbuborékolgatott, 2,5% BSA (bovine serum albumin)-val kiegészített HANKS pufferbe helyeztük. Az így kialakult szuszpenziót három réteg steril gézen át 50 ml-es steril centrifugacsőbe szűrtük, majd ezt a primer sejtsuszpenziót szintén BSA-val kiegészített HANKS pufferben 45 percig jégre hűtve tartottuk. A BSA alkalmazására azért van szükség, mert az megakadályozza a sejtek szőlőfürtszerű összetapadását, mely nagyban nehezítené a későbbi konfluens, jó életképességgel rendelkező sejtenyészetek kialakítását.

A sejtek izolálása során azokat BSA-val kiegészített HANKS pufferben 100 g-vel 3 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót elöntöttük, és az üledéket Williams Medium E-ben reszuszpendáltuk, majd mindezt további két alkalommal megismételtük.

## **AZ ÉLETKEPESÉG ÉS AZ ÖSSZSEJTSZÁM MEGHATÁROZÁSA**

A sejtek életképességét, illetve az összsejtszámot Bürker-kamrában tripánkék festéssel (10-szeres hígításban) határoztuk meg. Ennek során 200 µl tömény szuszpenzióhoz 800 µl Williams

Medium E-t adtunk, majd az így létrejövő hígított szuszpenzió 200 µl-éhez ugyancsak 200 µl tripánkéket adtunk. Ezután a kamrát fénymikroszkóp alá helyeztük, és meghatároztuk az 1 milliliterben található sejtszámot. Az összsejtszám meghatározása a sejtsuszpenziók hígításának meghatározása céljából szükséges, hogy a sejtek a lerakást követően ne helyezkedjenek el nagyon sűrűn, ami a megfelelő letapadásukat akadályozná, valamint befolyásolná a későbbi életképességüket. A sejtsuszpenzió lerakási hígítással koncentrációját  $10^6$ /ml-re állítottuk be.

#### **A FELHASZNÁLT PUFFEREK ÖSSZETÉTELE:**

- **HANKS puffer:**
  - steril desztillált vízzel 10-szeresére hígított HANKS törzsoldat (1000 ml szükséges a sejtizoláláshoz)
  - 4,7 ml 7,5 %-os  $\text{NaHCO}_3$ -oldat/1000 ml puffer
- **EGTA-tartalmú HANKS puffer:**
  - 200 ml HANKS puffer
  - 0,5 mmol/l EGTA
- **Kollagenázos puffer:**
  - 100 mg IV. típusú kollagenáz
  - 100 ml HANKS puffer
  - 7 mmol/l  $\text{CaCl}_2$
  - 7 mmol/l  $\text{MgCl}_2$
- **BSA-val kiegészített HANKS puffer:**
  - 50 ml HANKS puffer
  - 1,25 g BSA
- **Tápfolyadék:**
  - 500 ml Williams Medium E
  - 14,66 ml 7,5 %-os  $\text{NaHCO}_3$ -oldat → végkoncentráció: 0,22 %
  - 2,5 ml 10 mg/ml-es gentamicin törzsoldat → végkoncentráció: 50 mg/l
  - 5 ml 200 mmol/l-es glutamin törzsoldat → végkoncentráció: 2 mmol/l
  - 25 ml FBS (előzőleg hő inaktivált: 56 °C, 30 perc) – csak az első 24 órában került alkalmazásra a tápfolyadékban
  - 4 µg/l dexametazon
  - 20 IU/l inzulin

## **A SEJTEK KEZELÉSE ÉS A MINTAVÉTELEK**

A sejtek lerakása hatlyukú lemezekre történt (Greiner Bio-One Hungary Kft., Magyarország). Ennek során minden egyes lyukba ( $9,6 \text{ cm}^2/\text{lyuk}$ ) 1,5 ml sejtszuszpenziót mértünk. A sejttenyésztő edények előzetesen I. típusú kollagénnel kerültek bevonásra, mely a sejtek megfelelő letapadását biztosítja. A sejteket a lerakást követően 24 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 5%-os  $\text{CO}_2$  koncentráció mellett. A sejtek letapadása után, a lerakást követően 4 óra múlva lecseréltük a tenyészetek tápfolyadékát. Ezután a sejttenyészeteket T-2 toxinnal és epoxid-hidroláz enzimmel kezeltük 8 és 24 órás inkubációs időt alkalmazva. A T-2 toxinból több különböző koncentráció került kialakításra, mely alapján a következő csoportokat hoztuk létre:

- $T_0$  csoportok: 0 nmol T-2 toxin/l tápfolyadék
- $T_{10}$  csoportok: 10 nmol/l tápfolyadék
- $T_{100}$  csoportok: 100 nmol/l tápfolyadék
- $T_{1000}$  csoportok: 1000 nmol/l tápfolyadék

A toxint először DMSO (dimetil-szulfoxid)-ban oldottuk fel (aminek a koncentrációja 1 mmol/l), majd azt a kívánt koncentrációban a tápfolyadékhoz adagoltuk. Ezzel párhuzamosan, egyes csoportokat 2 g/ml koncentrációban epoxid-hidroláz enzimmel kezeltünk. A hatlyukú lemezekkel párhuzamosan, a sejtek metabolikus aktivitásának nyomonkövetését szolgáló tesztek elvégzése céljából, 96 lyukú lemezeken is elvégeztük a sejtek lerakását és az említett kezeléseket, melyeken a fentiekkel megegyező csoportokat alakítottuk ki. A kezeléseket a sejtek lerakása után 24 órával hajtottuk végre.

A kezeléseket után a tápfolyadékból mintát vettünk, illetve lizáltuk a sejteket. A lizálás M-PER puffer alkalmazásával (Thermo Fisher Scientific, USA) történt. A 6 lyukú lemezeket a tápfolyadék leszívását követően PBS-sel mostuk, majd a sejteket 500  $\mu\text{l}$  M-PER pufferben lizáltuk, és sejtkaparó segítségével távolítottuk el a tenyésztőedényről. A mintákat a későbbi vizsgálatok elvégzéséig  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A sejtlizátumok összfehérje-koncentrációját a későbbi mérések eredményeinek standardizálása céljából BCA módszerrel határoztuk meg (Thermo Fisher Scientific, USA).

## **LABORATÓRIUMI MÉRÉSEK**

A méréshez használt Pierce™ BCA Protein Assay Kit „A” komponenséhez (mely a bicinkoninsavat tartalmazta), 50:1 arányban adtuk hozzá a 4%-os réz-szulfátot tartalmazó „B” komponenst. A 96-lyukú lemez lyukaiba először 25  $\mu\text{l}$  standard oldatot vagy mintát, majd 200  $\mu\text{l}$

reagenst mértünk. A mintákat rázogatást követően 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Az abszorbanciát 562 nm-en mértük Multiskan GO 3.2 leolvasó segítségével.

A sejtek metabolikus aktivitását Cell counting kit-8 (CCK-8) teszt segítségével vizsgáltuk (Dojindo, USA), ami az anyagcserét végző sejtek által termelt redukált koenzimekről származó hidrogén kimutatásán alapszik. Ennek során a reagensben található WST-8 elnevezésű színeképző anyag narancssárga WST-8 formazánná redukálódik. A keletkező WST-8 formazán mennyisége egyenesen arányos a sejtek metabolikus aktivitásával (életképességével) és az eközben bekövetkező abszorbancia-változás pedig detektálható. A vizsgálat során a 96 lyukú lemez lyukaiba 100 µl friss tápfolyadékot mértünk, amelyhez 10 µl CCK-8 reagenst adtunk, és 2 óra 37°C-on történő inkubációt követően az abszorbanciát 450 nm hullámhosszon detektáltuk Multiskan GO 3.2 reader segítségével.

Azért, hogy a sejtenyészetek ROS termeléséről pontosabb képet kapjunk a tápfolyadék H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációját Amplex Red módszerrel (Thermo Fisher Scientific, USA) határoztuk meg. Az Amplex Red módszer során a tormaperoxidáz enzim jelenlétében a termelődött H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációjával arányos mennyiségű vörös rezorufin képződik, melynek fluoreszcencia-intenzitása mérhető. A vizsgálat során az Amplex Red reagenshez (A komponens) 60 µl DMSO-t (B komponens) mértünk, majd 4 ml C komponenszt adtunk 16 ml desztillált vízhez. Az egyes komponensekből elkészített oldatból 50 µl-t mértünk a 96-lyukú lemez lyukaiba, amihez 50 µl vizsgálandó tápfolyadékot adtunk és a lemezt 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően 560 nm gerjesztési és 590 nm kibocsátási hullámhosszon a minták fluoreszcencia intenzitását mértük Victor X2 2030 fluorometer segítségével.

A T-2 toxin immunmoduláló hatásáról az IL-6 és IL-8 tápfolyadékból történő meghatározása révén nyertünk információkat. Ebből a célból csirke specifikus ELISA tesztek (MyBioSource, USA) kerültek alkalmazásra, melyek a szendvics ELISA tesztek közé tartoznak. A szendvics ELISA tesztek esetében kétféle ellenanyag vesz részt a reakcióban, melyek közül az egyik ellenanyag a lemezhez kötődik (ehhez kapcsolódik a kimutatni kívánt antigén), míg a másik ellenanyag a már rögzült, kimutatni kívánt antigénhez kapcsolódik, ami enzimmel jelölt. Az utolsó lépésben ennek az enzimnek a szubsztrátját adjuk a rendszerhez, melynek eredményeként abszorbancia-változás következik be, amit spektrofotométerrel tudunk detektálni. A létrejött abszorbancia-változás mértéke egyenesen arányos az antigén mennyiségével. Az IL-8 és IL-6 kimutatást 96-lyukú lemezen végeztük el, melynek minden lyukába 100 µl tápfolyadékot mértünk be, illetve ezenkívül elkészítettük az IL-8 és az IL-6 standard sort is. A bemérések után a lemezt

lefedtük és 37 °C-on 120 percen (IL-6 esetén 90 percen) keresztül inkubáltuk. Ezt követően a tápfolyadékot leszívtuk és a lyukakba átmosás nélkül (IL-6 esetén kétszeri átmosás után) bemértük az IL-8, illetve IL-6 ellenanyagot 100 µl/lyuk mennyiségben. Ezután egy 60 perces 37 °C-on történő inkubáció következett, melyet követően a lemezt szobahőmérsékletre hűtöttük utána pedig az oldatok leszívása és a lyukak háromszoros átmosása következett. Ezt követően az enzim-konjugátumból lyukanként 100 µl-t mértünk be és 60 (IL-6 esetén 30) percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt ötszöri mosás követte, majd hozzáadtuk a szubsztrátot és 37 °C-on 10-20 percen át (IL-6 esetén ameddig a standard sötétté nem vált) inkubáltuk a lemezt, majd a reakciót leállító oldatot-t is hozzáadtuk. Az abszorbancia-változást a CCK teszthez hasonlóan Multiskan GO 3.2 reader segítségével 450 nm hullámhosszon detektáltuk és az IL koncentrációt a mért abszorbancia értékek alapján a standard sor segítségével határoztuk meg.

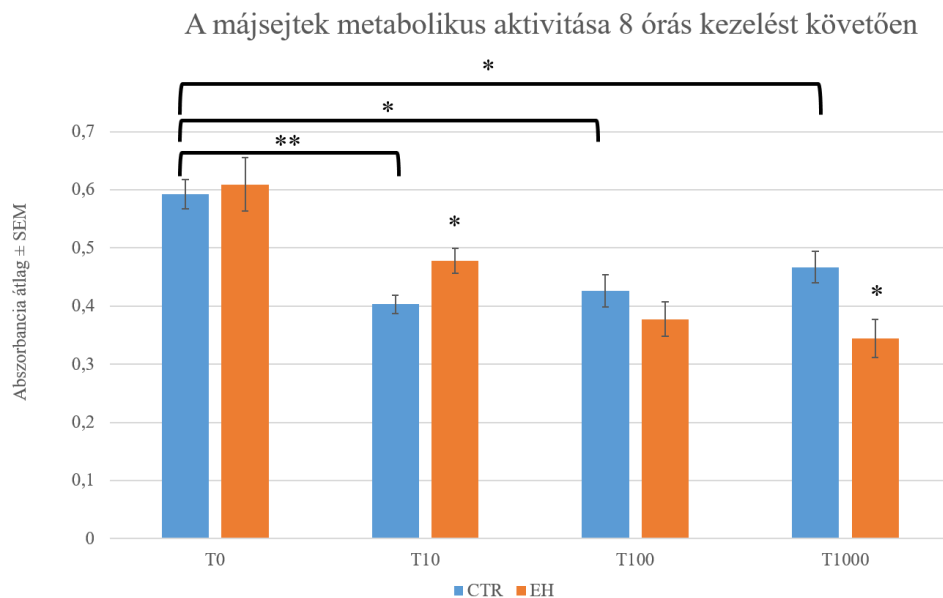
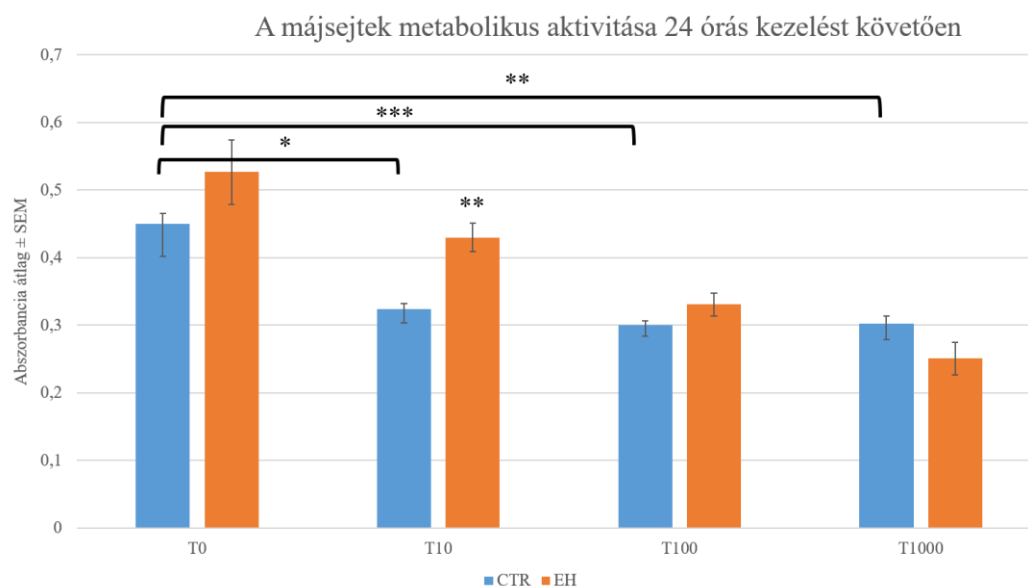
## **STATISZTIKA**

A mérési eredmények kiértékelését az R 2.14.0 statisztikai szoftver segítségével hajtottuk végre. A kapott eredményeket minden esetben a sejtenyészetek összfehérje-koncentrációira standardizáltuk. Az átlagok közti különbségek megbecsüléséhez egyutas ANOVA tesztet, a kontroll és a kezelt csoportok összehasonlításához pedig Dunett post-hoc tesztet használtunk. Szignifikáns különbséget állapítottunk meg, amennyiben  $P < 0,05$ ; valamint minden eredményt átlag  $\pm$  standard hiba alakban fejeztünk ki.

## Eredmények

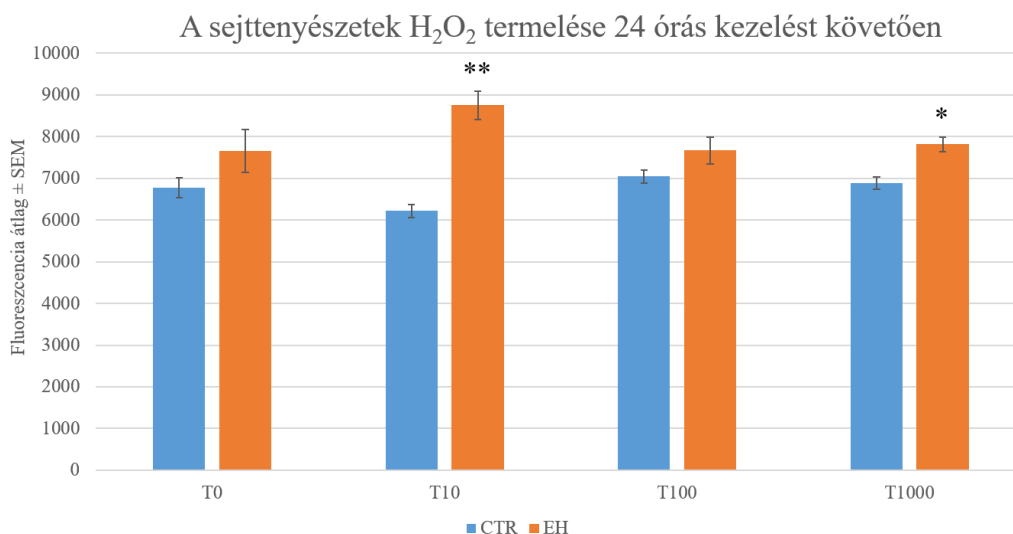
A 8 és 24 órán keresztül tartó 10, 100 és 1000 nmol/l koncentrációjú T-2 toxinnal végzett kezelés szignifikánsan csökkentette (8 órás kezelések: 10 nmol/l:  $P=0,00299$ ; 100 nmol/l:  $P=0,011$ ; 1000 nmol/l:  $P=0,0272$ ; 24 órás kezelések: 10 nmol/l:  $P=0,00204$ ; 100 nmol/l:  $P=0,000867$ ; 1000 nmol/l:  $P=0,00154$ ) a májsejtek metabolikus aktivitását, míg az epoxid-hidrolázzal történő kezelés a 10 nmol/l koncentrációjú T-2 toxin alkalmazása esetén szignifikánsan emelte (8 órás kezelés:  $P=0,0481$ ; 24 órás kezelés:  $P=0,00934$ ) ezt a paramétert, 1000 nmol/l koncentrációjú T-2 toxinnál pedig szignifikánsan csökkentette ( $P=0,0449$ ) (**3. ábra**).



**A****B**

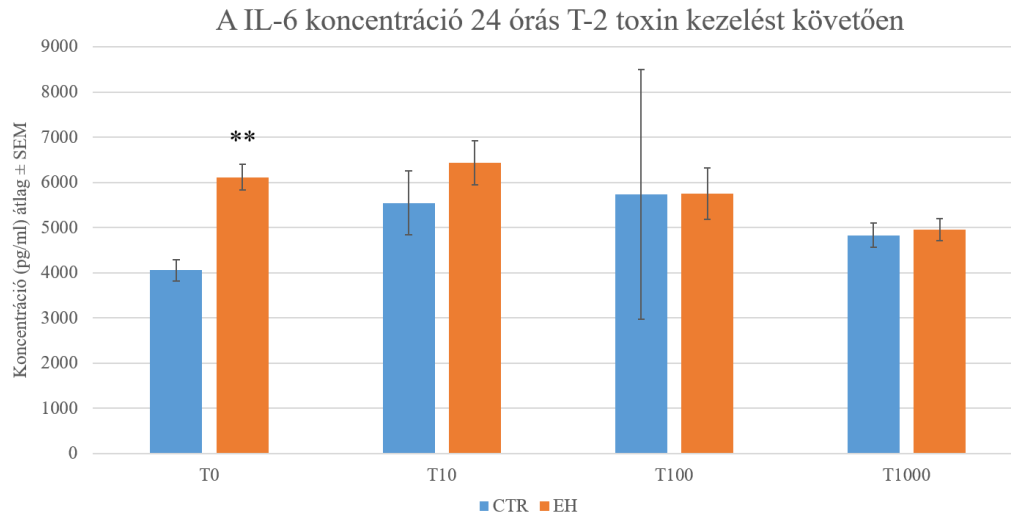
**3. ábra:** A májsejtek metabolikus aktivitása 8 órás (**A**) és 24 órás (**B**) kezelést követően (CTR = kontroll, EH= epoxid-hidrolázt is tartalmazó csoport, T0 = 0 nmol/l T-2 toxin T10 = 10 nmol/l T-2 toxin, T100 = 100 nmol/l T-2 toxin, T1000 = 1000 nmol/l T-2 toxin, \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001)

A sejtek  $H_2O_2$  termelését a T-2 toxinnal történő kezelés nem befolyásolta. Ezzel szemben az EH (epoxid-hidroláz) a vele együtt alkalmazott 10 és 1000 nmol/l toxinkoncentráció esetén szignifikánsan (10 nmol/l:  $P=0,00253$ ; 1000 nmol/l:  $P=0,0146$ ) fokozta a  $H_2O_2$  termelődését (**4. ábra**).

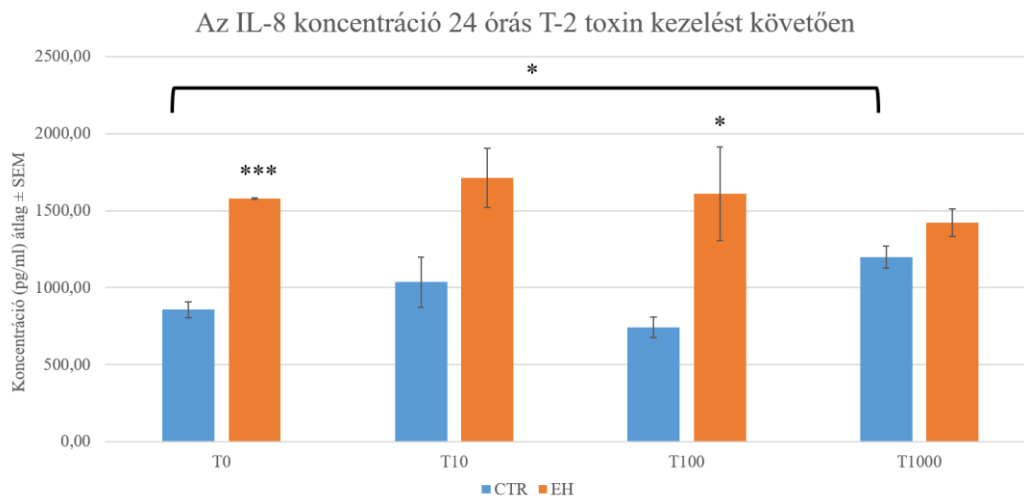


**4. ábra:** A sejtenyészetek  $H_2O_2$  termelése 24 órás kezelést követően (CTR = kontroll, EH= epoxid-hidrolázt is tartalmazó csoport, T10 = 10 nmol/l T-2, T100 = 100 nmol/l T-2, T1000 = 1000 nmol/l T-2, \*  $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ )

Az EH a kontroll esetében szignifikánsan emelte a tápfolyadék IL-6- ( $P=0,00491$ ) és IL-8 ( $P=0,000154$ ) koncentrációját, illetve a 100 nmol/l T-2 toxinnal kezelt sejtek esetében az IL-8 ( $P=0,0495$ ) koncentrációt (**5-6. ábra**). Szignifikánsan emelkedett továbbá az IL-8 ( $P=0,018$ ) koncentrációja az 1000 nmol/l-es koncentrációban alkalmazott T-2 toxin hatására (**6. ábra**).



**5. ábra:** A tápfolyadék IL-6 koncentrációja 24 órás T-2 toxin kezelést követően (CTR = kontroll, EH= epoxid-hidrolázt is tartalmazó csoport, T10 = 10 nmol/l T-2, T100 = 100 nmol/l T-2, T1000 = 1000 nmol/l T-2, \*\*P < 0,01)



**6. ábra:** A tápfolyadék IL-8 koncentrációja 24 órás T-2 toxin kezelést követően (CTR = kontroll, EH= epoxid-hidrolázt is tartalmazó csoport, T10 = 10 nmol/l T-2, T100 = 100 nmol/l T-2, T1000 = 1000 nmol/l T-2, \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001)

## Megbeszélés

Számos tanulmány bizonyítja a T-2 toxin sejtkárosító hatását (Rocha et al., 2005), az azonban még máig sem teljesen tisztázott, hogy pontosan milyen sejtszintű hatásmechanizmusok állhatnak a folyamatok hátterében, és az sem, hogy az adott körülmények között milyen irányú sejtkárosító folyamatok zajlanak le, illetve dominálnak (Wu et al., 2014).

Vizsgálataink során azt az eredményt kaptuk, hogy a T-2 toxin mindegyik általunk alkalmazott koncentrációban (10; 100; 1000 nmol/l tápfolyadék) szignifikánsan csökkentette a májsejtek metabolikus aktivitását, ami sejtkárosító hatásra utalhat. Hasonló eredményekre jutottak Königs és munkatársai is (2009), akik vese proximális tubulusaiból származó epitélsejteken és tüdő fibroblaszt sejteken vizsgálták többek között a T-2 toxin sejtkárosító hatásait.

Ezzel szemben az általunk alkalmazott sejtenyészetek  $H_2O_2$  termelését a T-2 toxinnal történő inkubáció ebben a koncentrációban és inkubációs idővel alkalmazva érdemben nem befolyásolta. A  $H_2O_2$  a reaktív oxigén gyökök közé tartozik, mely koncentrációjának növekedése oxidatív stresszre utal, amelyet a T-2 toxin által előidézett sejtkárosító folyamatok közül *in vitro* és *in vivo* körülmények közt is többször leírtak (Nakade et al., 2018). Vizsgálataink során tehát a sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan csökkent, a  $H_2O_2$  koncentráció viszont ezzel egyidejűleg nem változott szignifikánsan. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a sejtkárosító hatásért vagy nem kizárólag a toxin által előidézett oxidatív stressz felel, vagy az általunk alkalmazott májsejtmodell, inkubációs idő és dózis esetén az oxidatív stressz bevezető szakasza, amelyben a  $H_2O_2$  koncentrációja intenzíven megemelkedik, már befejeződött, és már a későbbi, az oxidatív stressz terminális szakaszára jellemző hatások, így például a lipidperoxidációs folyamatok kerültek előtérbe (Rezar et al., 2007). A T-2 toxin továbbá a ROS képződésének a fokozása mellett gátolja a makromolekulák (így DNS, RNS és fehérjék) szintézisét, illetve fehérjék szulfhidril csoportjához kapcsolódva számos, az anyagcsere-folyamatokban kulcsszerepet játszó enzimet is gátol, amely változások szintén nagy jelentőséggel bírhatnak az intenzív sejtkárosító hatások kialakulásában (Rocha et al., 2005).

Az epoxid-hidrolázok az állati szervezetben egyes xenobiotikumok, így az epoxidok lebontásáért felelősek, míg a környezetben ezt a feladatot egyes talajlakó baktériumok látják el (Morisseau, 2013). A T-2 toxin toxicitásáért elsősorban annak epoxid csoportja felelős (Yanshen et al., 2011). A *Rhodococcus rhodochrous* epoxid-hidrolázt termelő talajlakó baktériumok közé tartozik. Kutatásunk során az e baktérium által termelt epoxid-hidroláz májsejtekre gyakorolt

hatásait kívántuk vizsgálni, illetve arra kerestünk választ, hogy alkalmas lenne-e az enzim a T-2 toxin káros hatásai ellen történő védekezésre (Shields-Menard et al., 2014; van Loo et al., 2006). A trichotecének efféle semlegesítésére már voltak törekvések, mely során különféle élesztő gombákat és tejsav baktériumokat alkalmaztak (Wu et al., 2014). Az epoxid-hidroláz a toxinnal kombinációban történő 8 órás kezelését követően a sejtek metabolikus aktivitását 10 nmol/l koncentrációban növelte, míg azt 1000 nmol/l koncentrációban csökkentette a kontroll csoporthoz képest, továbbá ezen koncentrációk esetén a  $H_2O_2$  koncentráció is szignifikánsan nőtt. Azt már több kutatásban is leírták, hogy T-2 toxinból, a lebontó anyagcserefolyamatok során a májban számos különböző metabolit keletkezhet, valamint azt is tudjuk, hogy a T-2 toxin és a belőle keletkező metabolitok koncentrációtól és típustól függően különböző mértékben sejtkárosító és immunmoduláló hatásúak is lehetnek (Mackei et al., 2018; Wu et al., 2014). Ennek megfelelően elképzelhető, hogy az epoxid-hidroláz enzimmel történő kezelés hatására T-2 toxin egy része lebomlott, de a keletkező metabolitok továbbra is toxikus hatással voltak a sejtenyészetekre, így összességében nem történt kedvező változás a sejtkárosító hatások mérséklésének tekintetében sem vagy az enzim ne bontotta el megfelelő hatékonysággal, hiszen rendkívül specifikusak. Erről pontosabb képet az enzimmel történő kezelés és a májsejtek metabolikus aktivitásának hatására keletkező köztitermékek pontos mennyiségi és minőségi meghatározása révén kapnánk, mely mérések azonban nem képezték a dolgozat témáját.

Az EH az IL-6 koncentrációt a tápfolyadékban csak toxin nélkül növelte szignifikánsan, míg az IL-8 koncentrációt toxin nélkül és 100 nmol/l T-2 koncentráció esetén, ezenkívül az IL-8 koncentrációt a toxin EH nélkül 1000 nmol/l koncentrációban szignifikánsan növelte. Az emelkedett interleukin koncentráció a tápfolyadékban utal a nagy dózisu T-2 toxin sejtkárosító hatására, és szintén igazolja, hogy az EH a gyulladásos válasz mérséklésének tekintetében sem bizonyult kellő hatékonyságúnak. A T-2 toxin humán bélhámsejtekkel végzett kísérlet esetén is növelte az IL-8 koncentrációt a tápfolyadékban (Kruber et al., 2011), viszont a mi kísérletünk során a májsejteken ilyen növelő hatást enzim nélkül csak a legmagasabb T-2 koncentráció esetén tapasztaltunk.

Összességében elmondható, hogy az epoxid-hidroláz enzim, a T-2 toxin károsító hatásainak mérséklése céljából az alkalmazott dózisban és inkubációs idővel csirke hepatocita sejtenyészeteken nem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak.

# Összefoglalás

A mikotoxinok mikroszkópikus gombafajok biológiai hatással rendelkező másodlagos anyagcseretermékei. Közülük számos toxin súlyos köz- és állategészségügyi kockázatot jelent. A T-2 toxin a trichotecénvázak mikotoxinok közé tartozik, melyet a szántóföldi penészgombákhoz sorolható *Fusarium*-fajok termelnek. A toxin hatással van az anyagcsere-folyamatokban központi szerepet betöltő májra, a molekuláris szinten történő változások azonban nem teljesen tisztázottak. Sejtkárosító hatását főképp az általa generált oxidatív stressz és immunmoduláló hatása révén fejti ki. A T-2 toxin lebontásában fontos szerepet játszanak a bakteriális epoxid-hidrolázok (EH). Kísérletünk során a toxin hatásainak vizsgálatán kívül arra kerestük a választ, hogy milyen módon befolyásolja ezen enzim exogén módon történő alkalmazása az általunk kialakított csirke eredetű primer májsejtmodellt, így alkalmazható alternatívát jelenthet-e a T-2 toxin elleni védekezés területén.

Kísérletünkben a kutatócsoportunk által kidolgozott sejtizolálási módszer alapján primer hepatocita tenyészeteket hoztunk létre Ross-308 fajtájú brojlercsirkékből, melyeken a T-2 toxin és a *Rhodococcus rhodochrous* baktérium által termelt EH sejtszintű hatásait kívántuk vizsgálni. Ennek érdekében a sejttenyészeteket 0, 10, 100 és 1000 nmol/l koncentrációjú T-2 toxint tartalmazó tápfolyadékkal kezeltük 24 órás inkubációs időt alkalmazva, mely elrendezésen belül az enzim hatásainak vizsgálata céljából EH-zal kezelt (2 mg/ml tápfolyadék) és nem kezelt csoportokat alakítottunk ki. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszt segítségével követtük nyomon, illetve Amplex Red módszerrel határoztuk meg a tenyészetek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését. Csirke specifikus ELISA tesztekkel vizsgáltuk továbbá a sejtek által termelt interleukin-6 (IL-6) és IL-8 koncentrációját.

A T-2 toxin minden alkalmazott koncentrációban szignifikánsan csökkentette a sejttenyészetek metabolikus aktivitását, míg az epoxid-hidrolázzal történő kezelés a 10 nmol/l koncentrációjú T-2 toxin alkalmazása esetén szignifikánsan emelte ezt a paramétert. A sejttenyészetek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését az általunk alkalmazott T-2 toxinnal történő kezelés érdemben nem befolyásolta. Az EH a vele együtt alkalmazott 10 és 1000 nmol/l toxinkoncentráció esetén szignifikánsan fokozta modellünkön a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődését. Az EH a kontroll és a 100 nmol/l T-2 toxinnal kezelt sejtek esetében szignifikánsan emelte a tápfolyadék IL-6- és IL-8 koncentrációját. Szignifikánsan emelkedett továbbá az IL-8 koncentrációja az 1000 nmol/l-es koncentrációban alkalmazott toxinnal történő kezelést követően. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az

általunk alkalmazott primer csirke eredetű hepatocita tenyészeteken a T-2 toxin egyaránt hatással volt a sejtek metabolikus aktivitására és interleukin-termelésére. Továbbá, a toxin károsító hatásainak mérséklése céljából alkalmazott epoxid-hidroláz enzim vizsgálataink során nem bizonyult hatékonynak.

## Summary

Mycotoxins are secondary metabolites produced by various microscopic fungi. Many of these toxins provide risk both for human and veterinary medicine. T-2 toxin is a trichotecene mycotoxin, which is produced by various *Fusarium* species. The toxin has significant effects on the liver, but the molecular mechanism of its action is not well known yet. Recent studies highlighted the cytotoxic effects of the toxin caused by oxidative stress and immunomodulation. Bacterial epoxide hydrolase enzymes play an important role in the degradation of T-2 toxin. In our study, beyond the direct cellular effects of the T-2 toxin we investigated the effects of exogenously applied epoxide hydrolase (EH) enzyme on a primary hepatic cell culture model of chicken origin, to assess if this enzyme may serve as an alternative tool to protect the cells against T-2 toxin.

In order to investigate the cellular effects caused by T-2 toxin and EH enzyme of *Rhodococcus rhodochrous* origin, a primary hepatocyte culture of chicken origin was used. Cells were incubated for 24 hours with culture medium containing 0, 10, 100 and 1000 nmol/l T-2 toxin with or without EH supplementation (2 mg/ml culture medium). In order to monitor cellular metabolic activity, CCK-8 assay was used. Further, Amplex Red method was applied to measure H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of the cultures. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 production was determined by chicken specific ELISA tests.

T-2 toxin significantly reduced cellular metabolic activity in every applied concentration, whereas EH in combination with 10 nmol/l T-2 toxin treatment significantly increased this parameter. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of cell cultures was not significantly affected by T-2 toxin exposure. Further, EH treatment in combination with 10 and 1000 nmol/l T-2 toxin significantly increased the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interleukine (IL-6 and IL-8) levels were significantly increased by EH treatment combined with 100 nmol/l T-2 toxin or with no toxin exposure. IL-8 concentration was also significantly increased by the T-2 toxin in the concentration of 1000 nmol/l. Based on our results, T-2 toxin treatment affected both cellular metabolic activity and interleukin production of the applied chicken derived primary hepatocyte cell culture model. Furthermore, EH was not effective in order to reduce the cellular damage caused by T-2 toxin.



## Irodalom

- Adhikari M., Negi B., Kaushik N., Adhikari A., Al-Khedhairy A. A., Kaushik N. K., Choi E. H., 2017: T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8. 20. p. 33933-33952
- Alshannaq A., Yu J.-H., 2017: Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14. 6. p. 632
- Antonissen G., Martel A., Pasmans F., Ducatelle R., Verbrugghe E., Vandenbroucke V., Li S., Haesebrouck F., Immerseel F. V., Croubels S., 2014: The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. *Toxins*, 6. 2. p. 430-452
- Balendres M. A. O., Karlovsky P., Cumagun C. J. R., 2019: Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Agricultural Crop Commodities in the Philippines. *Foods*, 8. 7. p. 249
- Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., De Saeger S., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I. P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J., 2013: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57. p. 165-186
- Blount W. P., 1961: Turkey "X" disease. *Turkeys*, 9. p. 52-55.
- Chaffey N., Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2003: Molecular biology of the cell. 4th edn. *Annals of Botany*, 91. 3. p. 401
- da Silva E. O., Bracarense A. P. F. L., Oswald I. P., 2017: Mycotoxins and oxidative stress: where are we?. *World Mycotoxin Journal*, 11. 1. p. 113-133
- Gallo A., Giuberti G., Frisvad J. C., Bertuzzi T., Nielsen K. F., 2015: Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. *Toxins*, 7. 8. p. 3057-3111.
- Huff WE., Harvey RB., Kubena LF., Rottinghaus GE., 1988: Toxic Synergism Between Aflatoxin and T-2 Toxin in Broiler Chickens. *Poult. Sci.*, 67. 10. p. 1418-1423
- Kamalavenkatesh P., Viaramuthu S., Balachandran C., Murali Manohar B., Dhinakar raj G., 2005: Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. *Mycopathologia*, 159. 2. p. 273-279
- Kaur G., Dufour J. M., 2012: Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2. 1. p. 1-5
- Königs M., Mulac D., Schwerdt G., Gekle M., Humpf H.-U., 2009: Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology*, 258. p. 106-115
- Kruber P., Trump S., Behrens J., Lehmann I., 2011: T-2 toxin is a cytochrome P450 1A1 inducer and leads to MAPK/p38- but not aryl hydrocarbon receptor-dependent interleukin-8 secretion in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Toxicology*, 284. p. 34-41
- Li Y., Wang Z., Beier RC., Shen J., De Smet D., De Saeger S., Zhang S., 2011: T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59. 8. p. 3441-3453
- MacGowan A., Rogers C., Bowker K., 2001: In vitro models, in vivo models, and pharmacokinetics: what can we learn from in vitro models?. *Clinical infectious diseases*, 33. Suppl. 3: S214-S220.
- Mackei M., Mátis G., Neogrady Zs., 2018: A T-2 toxin hatásai az állati szervezetre, különös tekintettel a baromfira. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 140. 8. p. 475-483.

Mátis G., Kulcsár A., Petrilla J., Talapka P., Neogrády Zs., 2017: Porcine hepatocyte–Kupffer cell co-culture as an in vitro model for testing the efficacy of anti-inflammatory substances. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101. 2. p. 201-207

Morisseau C., 2013: Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism. *Biochimie*, 95. 1. p. 91-95

Murthy MR., Radouco-Thomas S., Bharucha AD., Levesque G., Pandian S., Radouco-Thomas C., 1985: Effects of trichothecenes (T-2 toxin) on protein synthesis *in vitro* by brain polysomes and messenger RNA. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 9. 3. p. 251-258

mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22. 4. p. 369-378

Nakade M., Pelyhe Cs., Kövesi B., Balogh K., Kovács B., Szabó-Fodor J., Zándoki E., Mézes M., Erdélyi M., 2018: Shortterm effects of T-2 toxin or deoxynivalenol on glutathione status and expression of its regulatory genes in chicken. *Acta Vet. Hung.*, 66. p. 28–39

Quiroga M. A., Risso M. A., Perfumo C. J., 2009: T-2 mycotoxin intoxication in piglets: a systematic pathological approach and apoptotic immunohistochemical studies. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2. 1. p. 16-22

Rafai P., 2003: A takarmányozás higiénája. In: Rafai P.: *Állathigiénia*. Budapest, Agroiinform Kiadó. p. 186-253

Rezar V., Frankič T., Narat M., Levart A., Salobir J., 2007: Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 86. 6. p. 1155–1160

Rocha O., Ansari K., Doohan F. M., 2005: Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: review. *Food Additives and Contaminants*, 22. 4. p. 369-378

Rosenstein Y., Lafarge-Frayssinet C., Lespinats G., Loisiller F., Lafont P., Frayssinet C., 1979: Immunosuppressive activity of Fusarium toxins. Effects on antibody synthesis and skin grafts of crude extracts, T2-toxin and diacetoxyscirpenol. *Immunology*, 36. p. 111-117

Seeboth J., Solinhac R., Oswald I. P., Guzylack-Piriou L., 2012: The fungal T-2 toxin alters the activation of primary macrophages induced by TLR-agonists resulting in a decrease of the inflammatory response in the pig. *Veterinary research*, 43. 1. 35.

Shank R. A., Foroud N. A., Hazendonk P., Eudes F., Blackwell B. A., 2011: Current and Future Experimental Strategies for Structural Analysis of Trichotecene Mycotoxins - A Prospectus. *Toxins*, 3.12. p. 1518-1553

Shields-Menard S. A., Brown S. D., Klingeman D. M., Indest K., Hancock D., Wewalwela J. J., French W. T., Donaldson J. R. , 2014: Draft Genome Sequence of Rhodococcus rhodochrous Strain ATCC 21198. *Genome Announcements*, 2. 1.

Sklan D., Shelly M., Makovsky B., Geyra A., Klipper E., Friedman A., 2003: The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol and T-2 toxin on performance, health, small intestinal physiology and antibody production in turkey poults. *British poultry science*, 44. 1. p. 46-52.

Sokolović M., Garaj-Vrhovac V., Šimpraga B., 2008: T-2 toxin: incidence and toxicity in poultry. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 59. 1. p. 43-52.

Thomas RJ., Bhandari R., Barrett DA., Bennett AJ., Fry JR., Powe D., Thomson BJ., Shakesheff KM., 2005: The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs*, 181. 2. p. 67-79

Tiwari R. M., Sinha M., 2010: Veterinary Toxicology. Herbicides, Fungicides and Rodenticides Jaipur, Oxford Book Company. p. 39-74

van Loo B., Kingma J., M. Arand, Wubbolts M. G., Janssen D. B., 2006: Diversity and Biocatalytic Potential of Epoxide Hydrolases Identified by Genome Analysis Applied and Environmental Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 72. 4. p. 2905-2917

- Voyksner R. D., Hagler WM. Jr., Swanson SP., 1987: Analysis of some metabolites of t-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol by thermospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 394. 1. p. 183-199
- Whitlow L. W., Hagler W. M., 2005: Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, prevention and treatment. *Proc. Southwest Nutr. Conf.*.
- Wu Q., Dohnal V., Huang L., Kuca K., Yuan Z., 2010: Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug. Metab. Rev.*, 42. 2. p. 250–267
- Wu QH., Wang X., Yang W., Nüssler AK., Xiong LY., Kuča K., Dohnal V., Zhang XJ., Yuan ZH., 2014: Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Arch. Toxicol.*, 88. p. 1309–1326.
- Wyatt R. D., Hamilton P. B., Burmeister H. R., 1973: The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 52. p. 1853- 1859
- Zhuang Z., Yang D., Huang Y., Wang S., 2013: Study on the Apoptosis Mechanism Induced by T-2 Toxin. *PLOS ONE*, 8. 12.
- Ziprin R. L., Elissalde M. H., 1990: Effect of T-2 toxin on resistance to systemic *Salmonella typhimurium* infection of newly hatched chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 51. p. 1869-1872

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Mackei Máténak és Dr. Barna Réka Fanninak illetve Dr. Mátis Gábornak és Dr. Neogrády Zsuzsannának azért, hogy lehetővé tették számomra a diplomamunkám elkészítését, akik példaértékű türelemről tettek tanú bizonytságot, akikhez mindig bizalommal fordulhattam és segítségükre mindig számíthattam, és akiknek töretlen lekesedésükből mindig erőt meríthettem. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Kulcsár Annának, Dr. Orbán Katának a laboratóriumi munka során nyújtott segítségüket, valamint a tanszék többi munkatársának is, akik a kísérletekhez és az egyéb munkáinkhoz megfelelő körülményeket teremtettek.

Hálával tartozom a családomnak és a barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és állnak, ami nélkül e munka nem jöhetett volna létre.

Kutatómunkánk a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFIH 124586. sz. pályázata segítségével valósult meg.

#### 4. melléklet

Alulírott Dr. Machai Máté és Dr. Banna Réka Fanni igazolom, hogy

Varga Benedek Tibor (a hallgató neve)

A T-2 toxin sejthámasító hatásának befolyásolása  
epacit-hidroláz enzim segítségével szinte májsejtenyelesen  
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 21.

Machi M. Banna R. F.

a témavezető neve és aláírása

Élettani és Biokémiai  
Tanszék

tanszék

## HuVetA

## ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: Varga Bence Tibor  
 Elérhetőség (e-mail cím): ECCERVBIPULA@GMAIL.COM  
 A feltöltendő mű címe: It T-2 toxin sejt há maslő hotel sa-  
 nak helye a salasa epukel hialmaldz enrim segitse-  
 A mű megjelenési adatai: gyel amsz. helyresteren Budapest 2019  
 Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédelem PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- ☒ engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- ☐ az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év ..... hó ..... nap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltsa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*