

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Potenciálisan védő hatású anyagok
alkalmazhatósága mikotoxinok által
károsított bélbarrier épségének
fenntartására *in vitro* modellben**

Bús-Pomothy Judit Mercédesz

Témavezető: Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2022.

Témavezető:

.....

Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet, PhD
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék
Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
Témavezető

.....

Bús-Pomothy Judit Mercédesz

Bevezetés

A növényi takarmányban jelen lehetnek a haszonnövényeket megfertőző penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, a mikotoxinok. A *Fusarium* fajok által termelt trichotecén-vázis mikotoxinok közé tartozik a deoxinivalenol (DON) és a T-2 toxin, amelyek gasztrointesztinális zavarokat okozhatnak, nekrotikus és gyulladós folyamatokat indukálhatnak. Az Európai Unió megállapította az élelmiszerekben és a takarmányokban megengedett mikotoxin tartalom felső határértékeit, amelyekben a mikotoxinok glikozilált formái nem szerepelnek annak ellenére, hogy azok a bélben hidrolizálva jelentős citotoxikus hatással rendelkeznek. A takarmányok esetében fizikai és kémiai módszerek egyaránt elérhetőek a toxinok mennyiségi csökkentésére. Az utóbbi évtizedekben előtérbe került a növényi eredetű takarmánykiegészítők, a fitobiotikumok használata, melyek összetett polifenol mintázattal rendelkezhetnek és antimikrobiális, antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásúak.

A polifenolok növényi eredetű táplálékkal juthatnak be az emberi és állati szervezetbe. A polifenol aglikonok biokémiai tulajdonságai közé tartozik az antioxidáns hatás a fenolos gyűrű és a hidroxilcsoportok jelenlétének köszönhetően, így ezek a vegyületek képesek lehetnek semlegesíteni a szabadgyököket. A növényi antioxidánsok *in vitro* vizsgálatával lehetőség nyílik a bélrendszerben zajló folyamatok modellezésére, a vegyületek egyedi hatásának megismerésére mikotoxin terhelés mellett.

Kutatásainkban két nem-daganatos eredetű vékonybélhám sejtvonalon, a humán HIEC-6 és a sertés IPEC-J2 sejteken vizsgáltuk a DON és a T-2 toxin, valamint a kettő keverékének a hatását a sejtek életképességére és a bélbarrier épségére nézve. Vizsgálataink hozzájárulhatnak annak a jobb megértéséhez, hogy a mikotoxinok együttes előfordulása hogyan módosítja a mikotoxinok már megismert, de csak önállóan kifejtett hatását. A takarmány kiegészítők széleskörű tesztelése segíti a fitobiotikumok jótékony tulajdonságaiért felelős molekulák beazonosítását. Célunk volt aglikon formában tesztelni a két antioxidáns tulajdonságú vegyületet, mint a kvercetin és a rozmaringsavat valamint a több hatóanyagot tartalmazó fermentált búzacsíra kivonatot a mikotoxinokkal kombinációban adva, több kísérleti elrendezést elemezve, hogy az antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásukat és alkalmazhatóságukat *in vitro* körülmények között megismerhessük.

Célkitűzés

A kutatásunk során több kísérleti elrendezésben szeretnénk vizsgálni a DON, a T-2 toxin, valamint a kvercetin, a rozmaringsav és a fermentált búzacsíra kivonat hatását önmagában és kombinációban adva.

1. A vizsgálat során célul tűztem ki a DON és a T-2 toxin és a kombinációjukból álló DT2 legmagasabb nem-citotoxikus koncentrációinak meghatározását, valamint a DT2 sejtek életképességére, oxidatív állapotára, a gyulladáscsökkentő citokin termelésére továbbá a kladudin-1 és okkludin fehérjék megoszlására gyakorolt hatásának vizsgálatát. Kísérletünkhöz HIEC-6 és IPEC-J2 nem-daganatos eredetű bélhám sejteket alkalmaztunk.

2. A kvercetin hatásának vizsgálatánál arra kerestük a választ, hogy milyen koncentrációkban célszerű alkalmazni a kvercetint a védő hatás eléréséhez a 24 órás előkezelés során, valamint képes-e a kvercetinnel történő 24 órás elő- vagy 1 órás együttkezelés a DON TEER-t mérséklő és oxidatív stressz növelő hatását csökkenteni. A redox státuszban bekövetkező változásokat az extracelluláris H_2O_2 koncentrációjának és a ROS intracelluláris mennyiségének mérésével kívántam meghatározni.

3. A rozmaringsavval történő vizsgálatban szintén meghatároztuk a védő hatás eléréséhez szükséges koncentrációt a 24 órás előkezelés során. Célunk annak a meghatározása volt, hogy hogyan befolyásolja-e a 24 órás rozmaringsav előkezelés a DON, a T-2 toxin és a DT2 potenciálisan sejtréteg integritást csökkentő, extracelluláris H_2O_2 és interleukin-6, illetve interleukin-8 citokinek koncentráció növelő hatását. Továbbá a rozmaringsav módosítja-e a kladudin-1 és az okkludin fehérjék jelenlétének esetleges megváltozását a sejtmembránban.

4. A kutatásaim során arra kerestük a választ, hogy befolyásolja-e az 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat a DON és T-2 toxin által feltételezhetően kiváltott sejtréteg integritást csökkentő és az oxidatív stresszt növelő hatását az együttkezelés során, valamint az, hogy a 24 órás utánkövetéses (regenerációt alkalmazó) kísérleti elrendezésben megfigyelhető-e a fermentált búzacsíra kivonat jótékony hatása.

Anyag és módszer

A HIEC-6 sejtek mikotoxinokkal történő inkubációja

A kísérlet során DON, T-2 toxin és a kettő kombinációjából álló DT2 hatását tanulmányoztuk 24 óra inkubációs idővel. Vizsgáltuk, hogyan hatnak a vizsgált mikotoxinok a humán, nem-daganatos eredetű HIEC-6 sejtek életképességére (MTS) (n =9), az extracelluláris hidrogén-peroxid termelésükre (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit) (n =8), illetve gyulladáscsökkentő citokinek (interleukin-6 és interleukin-8) koncentrációira (szendvics ELISA Kit) (IL-6 n =8; IL-8 n =6). Vizsgálatunkban meghatároztuk a sejtek felhasználásával az intracelluláris ROS-ok mennyiségét (DCFH-DA) (n =10), immunfluoreszcens festéssel láthatóvá tettük a klaudin-1 és okkludin fehérjéket, illetve a sejtek centrifugálással történő feltárását követően meghatároztuk a két fehérje koncentrációját (szendvics ELISA Kit) (mindkét esetben n =4). A sejtek életképességének nyomon követéséhez a sejteket 96-lyukú tenyésztőlemezre, a mintagyűjtéshez és az immunfluoreszcens festéshez 24-lyukú inzeret tartalmazó tenyésztőedényre ültettük. A vizsgálatokat legalább 3 párhuzamos méréssel végeztük. 1 μ M DON, 5 nM T-2 toxin és 1 μ M DON + 5 nM T-2 toxin (DT2) koncentrációkat alkalmaztuk a kísérletekben.

Az IPEC-J2 sejtek elő- és együttkezelése kvercetinrel DON-expozíció mellett

Az IPEC-J2 sejteken vizsgáltam a kvercetin és a DON hatását két kísérleti elrendezésben: (I) 24 óra kvercetin előkezelést követően 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket DON-nal vagy (II) 24 órás kontroll kezelés után együtt adtuk a sejtekhez a kvercetin és a DON kezelőoldatot 1 órán keresztül. Megállapítottam a DON és kvercetin citotoxikus koncentrációit Neutrál Vörös festéssel 24 óra kezelést követően (DON n =8; kvercetin n =5). A további vizsgálatokban 20 μ M kvercetin és 1 μ M DON kezelésekkel végeztük minden kísérletben 6-lyukú inzeret tenyésztve. Vizsgáltuk a sejtréteg integritást a kezelőoldatok hozzáadása előtt, 24 órát követően és a további egy órás DON-nal történő inkubálás után (n =6). A 25 óra időintervallumnál mintavétel történt a sejtmentes felülúszóból a további extracelluláris H₂O₂ koncentráció (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit) (n =8) változásának megállapításához. Az IPEC-J2 sejtek feltárását követően megmértük az intracelluláris ROS-ok mennyiségét (DCFH-DA) (n =8).

A 48 és 72 órás mikotoxin kezelést megelőző 24 órás rozmaringsav előkezelés hatásának vizsgálata IPEC-J2 sejteknél

Vizsgáltuk a rozmaringsav 24 órás védő hatását a 48 és a 72 óráig tartó DON, a T-2 toxin és a kettő kombinációjából álló DT2 toxin által indukált negatív hatásokkal szemben. A sejtenyésztést 6-lyukú sejtenyésztő edényen végeztünk. A

sejtéletképességet Neutral Red festékkel elemeztük és az eredmények alapján 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin, 1 μM DON és 5 nM T-2 keverékét (DT2) és az előkezeléshez 50 μM rozmaringsav koncentrációt választottunk ki a további vizsgálatokhoz (mindegyiknél $n=8$). A kísérleti elrendezésben 24 óráig adtuk az egyik, később DT2 csoportnak a rozmaringsavat, ezt követően hozzáadtuk az IPEC-J2 sejtekhez a különböző mikotoxin kezelőoldatokat. A 24 óráig tartó rozmaringsav előkezelés megelőzte a kísérleti eredményekben feltüntetett kísérleti kezdőpontot jelölő 0. órát. Megmértük a sejtréteg integritás változását 48 és 72 órával a mikotoxin kezelőoldatok rárakása után ($n=9$). Mind a két kezelési időt követően mintát vettünk a sejtmentes felülúszóból a későbbi extracelluláris H_2O_2 (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit) ($n=8$), valamint az interleukin-6 és interleukin-8 (szendvics ELISA Kit) (minkettő esetében $n=10$) koncentrációk meghatározásához. A sejtek klaudin-1 és okkludin fehérjéit immunfluoreszcens festéssel tettük láthatóvá a membránban a kezeléseket követő 72 órában.

A fermentált búzacsíra kivonat védő hatásának vizsgálata DON és T-2 toxinnal történő együttkezeléskor

A fermentált búzacsíra kivonat hatásának vizsgálatát IPEC-J2 sejteken végeztem, kombinációban DON és T-2 toxinnal. A kísérleti elrendezésben 24 óráig inkubáltuk a sejteket a kezelőoldatokkal és kombinációjukkal, majd ezt követően további 24 óráig kontroll kezelést kapott minden kezelési csoport. A sejtek éleképességét MTS módszerrel határoztuk meg, melyet 96-lyukú edényben végeztünk ($n=8$). A kísérletben 8 μM DON, 5 nM T-2 toxin hatását vizsgáltuk 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonattal kombinációban, 6-lyukú tenyésztőedényben. A TEER értékeket megmértük a kísérlet megkezdése előtt, 24 óra kezelést követően és a regeneráció, 48 óra után ($n=9$). Mindkét időintervallumnál mintát vettünk az extracelluláris térből, hogy megállapítsuk a H_2O_2 koncentrációt (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit) ($n=8$), majd ezt követően a sejteket és DCFH-DA festék hozzáadásával a sejten belüli ROS-ok mennyiségét határoztuk meg ($n=6$).

Statisztika

A normál eloszlású minták esetén a vizsgált csoportok közötti különbségek megállapítására egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) és post-hoc Tukey tesztet végeztünk el. A kísérletek során mért adatok ábrázolása átlag \pm szórásként (SD) történt. A kontroll és a kezelt csoportok között mért szignifikáns eltéréseket csillagokkal (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), míg a csoportok egymáshoz viszonyított szignifikáns különbségeit p értékkel jelöltük.

Eredmények és diszkusszió

A DON, a T-2 és a DT2 vizsgálata HIEC-6 sejteken

A *Fusarium* fajok által termelt trichotecén-vázás mikotoxinok jelen vannak az élelmiszerekben. Több fajnál bizonyították, hogy képesek több mikotoxint termelni, így nem zárható ki a toxinok egymásra gyakorolt hatása. A multitoxikózis vizsgálatok kezdenek egyre inkább előtérbe kerülni, de még kevés szakirodalmi adat áll a rendelkezésre, hogy mely toxinok képesek egymás hatását felerősítve, szinergista módon hatni. Humán bélhámsejteken alapuló vizsgálatokban többször alkalmaztak eddig daganatos eredetű, vastagbélhám sejtvonalakat (Caco-2, HT-29). Ezzel szemben a HIEC-6 sejtvonal használatával pontosabban modellezhetőek az *in vivo* körülmények. A nem-daganatos eredetű sejtvonalak vizsgálatával összetettebb képet kaphatunk, hogy a mikotoxin terhelés hogyan befolyásolhatja a bélben még növekedésben lévő sejteket.

Jelen kutatásban az 1 μM DON, az 5 nM T-2 toxin, 1 μM DON és 5 nM T-2 keverékének hatását vizsgáltuk önmagukban és kombinációban adva, 24 órás inkubációs időt alkalmazva. Azt tapasztaltuk, hogy hatásukra szignifikánsan megemelkedett az extracelluláris térben a hidrogén-peroxid koncentrációja, valamint a sejten belüli ROS-ok szintje, továbbá mindegyik kezelés megemelte a gyulladásos citokinek közül az IL-6 és az IL-8 koncentrációját. A klaudin-1 jelenléte és mennyisége szignifikánsan csökkent a membránban, míg az okkludin szintje nem változott.

Az eredmények alapján, a két fuzáriotoxin negatív hatást gyakorol a sejtekre már nem-citotoxikus koncentrációkban adva. Bizonyítottuk továbbá azt is, hogy a HIEC-6 sejtvonal megfelelő sejtmódel az élelmiszerben előforduló egyes xenobiotikumok gyulladáskeltő, bélhámkárosító hatásának *in vitro* tesztelésére.

Az IPEC-J2 sejteken végzett DON és T-2 toxin kombináció hatása

Kevés információ áll rendelkezésre a mikotoxinok kombinációban adott hatásáról. Míg a DON önmagában kiváltott negatív hatásáról sok szakirodalmi adat, addig a T-2 toxinnal kevesebb kísérleti eredmény áll rendelkezésre. A kutatómunka keretében vizsgáltuk a sertés eredetű IPEC-J2 sejtvonalon a DON és a T-2 toxin kombinációjának (DT2) a hatását a sejtleletképessegre, sejtréteg integritás változására, oxidatív stressz növelésére, gyulladásos citokinek termelésére, valamint az immunfluorezscens festéssel láthatóvá tett klaudin-1 és okkludin fehérjék jelenlétére nézve.

A DT2 kezelést (1 μM DON + 5 nM T-2) követő TEER mérés eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az 1 μM DON, az 5 nM T-2 toxin és a DT2 kezelési csoportok

között mind 48, mind 72 óra után szignifikáns volt a különbség, vagyis a mikotoxinok sejtréteg-integritás csökkentő hatásai érvényesültek. A DT2 kezelés mind 48, mind 72 óra után szignifikánsan megemelkedett az IL-6 és IL-8 koncentrációja a sejtmentes felülúszóban. Eredményeink alapján a 72 órán át alkalmazott DT2 hatással volt a klaudin-1 membránban való kifejeződésére, azonban nem változtatta meg az okkludin lokalizációs mintázatát. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a DT2 kezelés által kiváltott TEER csökkenés legalább részben korrelálhat a klaudin-1 megváltozott mennyiségével.

A védő hatású anyagok alkalmazhatósága a DON, a T-2 toxin és a DT2 által kiváltott negatív hatásokkal szemben

Az *in vivo* vizsgálatokban kimutatták, hogy egyes flavonoidok a sertések takarmányában csökkenthetik az oxidatív stresszt, a gyulladást és ez által javíthatják a sertések általános jóllétét. Ugyanakkor még nem áll rendelkezésre elég adat arra vonatkozóan, hogy milyen mennyiségben, milyen időtávon és mely gazdasági haszonállat esetén alkalmazhatóak a fenolos vegyületek takarmánykiegészítőként. Azonban az *in vitro* kísérletek alapján látható, hogy a polifenolos vegyületek jótékony hatással bírhatnak a mikotoxinok által kiváltott negatív hatások megelőzésében az antioxidáns hatásuk miatt.

Eredményeink alapján a 20 μM kvercetinrel 24 óráig inkubált IPEC-J2 sejtek TEER értékei szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll kezeléshez viszonyítva. A 20 μM kvercetin előkezelés nem volt alkalmas arra, hogy megakadályozza a 1 μM DON TEER csökkentő hatását. Az 1 óráig együtt adott kvercetin és DON szintén nem bizonyult alkalmasnak, hogy mérsékelje a TEER változását a kontrollhoz képest, de a két vizsgált csoport eredményeit összehasonlítva azt kapjuk, hogy az előkezelést kapott sejtek sejtréteg integritása magasabb maradt az egy órás együtt adott vegyületeknél mérthez képest, vagyis a 20 μM kvercetin előkezelés segítette a DON által kiváltott bélhám integritásának sérülésének helyreállításában. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az együttkezelés 20 μM kvercetinrel és 1 μM DON-nal 1 órán át jelentősen növelte az extracelluláris H_2O_2 koncentrációt, míg a 24 órás előkezelés megakadályozta a DON-indukálta extracelluláris H_2O_2 termelést. A 20 μM kvercetinrel előkezelt, majd DON-nak kitett sejtek jelentősen magasabb intracelluláris ROS növekedést mutattak a kontroll sejtek értékeivel összehasonlítva, mégis szignifikánsan alacsonyabb a ROS mennyiség, mint az együtt kezelést kapott sejteknél.

A rozmaringsavval végzett kísérleteinkben azt kaptuk, hogy a 24 órás, 50 μM rozmaringsav előkezelés hatékonyan bizonyult a DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelés TEER csökkentő hatásának kivédésében. Az előkezelés és az önálló DT2 kezelés hatásait összehasonlítva megállapítottuk, hogy a rozmaringsav képes volt mérsékelni a DT2 által indukált extracelluláris H_2O_2 koncentráció növekedést az IPEC-J2 sejteknél,

vagyis az 50 μM rozmaringsav 72 órával az inkubálást követően is hatással volt a sejtek oxidációs állapotára. Kevés adat található a szakirodalomban a rozmaringsav gyulladáscsökkentő hatásáról *in vitro* körülmények között, saját eredményeink alapján az IPEC-J2 sejtekben a DT2 kezelés jelentős mértékben megemelte mind az IL-6, mind az IL-8 citokin koncentrációját, amit a 24 órás 50 μM rozmaringsav előkezelés csökkentett 48 és 72 órával az inkubáció után. A kontroll kezelést kapott IPEC-J2 sejtek okkludin és klaudin-1 eloszlása homogénnek mutatkozott az immunfluoreszcens festés után. A klaudin-1 fehérje lokalizációja megváltozott a DT2 kezelés hatására, míg a rozmaringsavat 24 órán keresztül 50 μM koncentrációban adva az IPEC-J2 sejtekhez elősegítette a klaudin-1 membránban való jelenlétét 48 és 72 óra DT2-vel történő inkubációt követően.

A fermentált búzacsíra kivonat több potenciálisan védő hatású hatóanyagot tartalmaz, ezért hatékony lehet a két leggyakoribb mikotoxin által okozott oxidatív stressz csökkentésében. Kísérleteinkben mind az 1%, mind a 2% fermentált búzacsíra kivonat növelte az IPEC-J2 sejtek életképességét, viszont a kivonat nem tudta mérsékelni a sejthalál mértékét, ha azt 8 μM DON-nal kombinációban adtuk a sejtekhez. Ezzel szemben 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat fokozta a T-2 toxinnal egyidejűleg kezelt IPEC-J2 sejtek túlélését a csak 5 nM T-2 toxinnal kezelt sejtekhez képest. A szakirodalmi adatok alapján a fermentált búzacsíra kivonat hatását még nem vizsgálták a sejtréteg-integritás változására nézve. Adataink alapján az 1% fermentált búzacsíra kivonat mikotoxinokkal kombinációban adva nem emelte meg az IPEC-J2 sejtek TEER értékeit. Ezzel szemben a 2% fermentált búzacsíra kivonat, mely 5 nM T-2 toxinnal került hozzáadásra, segített a bélbarrier integritás fenntartásában. A 2% fermentált búzacsíra kivonat csökkentette a ROS-t 24 órás kezelés után, mind DON-nal, mind T-2 toxinnal együtt kezelve. Egyidejű 24 órás kezelés esetén mind az 1%, mind a 2% fermentált búzacsíra kivonat szignifikánsan csökkentette a DON és T-2 toxin által kiváltott ROS szintjének emelkedését. A fermentált búzacsíra kivonat jótékony hatást gyakorolt az IPEC-J2 sejtek életképességére, valamint az alkalmazott DON és a T-2 toxinok által kiváltott oxidatív stresszt képes volt csökkenteni.

Konklúzió

Összefoglalásként megállapítható, hogy a nem daganatos humán (HIEC-6) és sertés bélhámsejtek (IPEC-J2) alkalmasak a *Fusarium* toxinok mint a DON és T-2 által előidézett bélbarrier károsodás modellezésére. Kísérleti munkánkban növényi vegyületeket (kvercetin és rozmaringsavat) és a fermentált búzacsíra kivonatot teszteltünk, és bizonyítást nyert, hogy ezek az anyagok részt vettek a károsodott bélhámsejtréteg integritásának helyreállításában és az alkalmazott xenobiotikumok által okozott oxidatív stressz mérséklésében. A polifenol vegyületek közé tartozó kvercetinnel és rozmaringsavval végzett 24 óráig tartó előkezelések minden esetben növelték az IPEC-J2 sejtek között az integritást. Kísérleti adataink szerint a penészgomba fajokkal fertőzött gabonaféléken együttesen előforduló mikotoxinok közül a DON és a T-2 toxin kombinációjának alkalmazásakor egyes gyulladáscsökkentő citokinek (IL-6 és IL-8) szintje megemelkedett, és a sejtréteg ellenállása jelentős mértékben csökkent, amely káros elváltozásokat a rozmaringsavval való előkezelés hatékonyan állította helyre IPEC-J2 sejtekben. Az új *in vitro* eredmények megalapozhatják több antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatású természetes vegyület étrend- és takarmánykiegészítőként való későbbi gyakorlati alkalmazását.

Új tudományos eredmények

Ad 1,

A HIEC-6 nem-daganatos eredetű, humán bélhámsejtekre negatív hatással van az 1 μM DON, az 5 nM T-2 és a DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelés. 24 óra inkubáció után szignifikánsan nőtt az extra- és intracellulárisan mérhető oxidatív stressz, a gyulladáscitokinek koncentrációja és csökkent a klaudin-1 mennyisége a sejtmembránban.

Ad 2,

Elsőként vizsgáltuk a DON és a T-2 toxin kombinációban adott (DT2) hatását sertés, nem-daganatos eredetű, IPEC-J2 sejtvonalon. A DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) szignifikánsan megemelte az oxidatív stressz mértékét és a gyulladáscitokinek koncentrációját. Immunfluoreszcens festéssel bizonyítottuk, hogy a klaudin-1 lokalizációs mintázata a kezelést követően jelentősen csökkent a sejtmembránban.

Ad 3,

Összehasonlítottam a 24 órás előkezelés és az 1 óras 20 μM kvercetinrel történő együttkezelés hatását 1 óra 1 μM DON által indukált sejtréteg integritás károsodására és az oxidatív stressz növekedésére az IPEC-J2 sejteknél. A 20 μM kvercetin előkezelés képes mérsékelni a TEER csökkenést, illetve a DON által kiváltott H_2O_2 és ROS emelkedést, összehasonlítva az egy órás együttkezeléssel.

Ad 4,

A 24 órás, 50 μM rozmaringsav előkezelés hatására a 48 és 72 óráig tartó DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelést követően a TEER érték magasabb volt a csak DT2 kezelést kapott sejteknél mérthez képest. A rozmaringsav előkezelés szignifikáns mértékben csökkentette a DT2 által indukálta extracelluláris H_2O_2 és gyulladáscitokinek koncentrációinak emelkedését a csak DT2 expozíciónak kitett sejtekkel szemben, továbbá sejtek membránjában nem változott meg a klaudin-1 fehérje lokalizációs mintázata a rozmaringsav hatására.

Ad 5,

A fermentált búzacsíra kivonatot először alkalmaztam fuzáriotoxinokkal történő együttkezelésben. Először sikerült bizonyítani, hogy a fermentált búzacsíra kivonat hatására nőtt az IPEC-J2 sejtek sejtrétegintegritása 24 órás kezelést követően. Eredményeink szerint a T-2 toxin hatását a 2% fermentált búzacsíra kivonat jelentősen ellensúlyozta a kezelési idő alatt. A mikotoxinok által előidézett oxidatív stresszt a 24 óra 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat együttkezelés képes volt csökkenteni. A további 24 óra regeneráció után az 1% fermentált búzacsíra kivonattal történő együttkezelés mind DON, mind T-2 toxin által kiváltott intracelluláris ROS mennyiségi növekedését képes volt

ellensúlyozni, míg a 2% fermentált búzacsíra kivonat a T-2 toxinnal való együtt inkubálás után csökkentette az intracelluláris ROS termelődését.

Saját tudományos közlemények

Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

Pomothy J.M., Szabó O., Czimmermann Á.E., Babiczky Á., Jerzsele Á., Pászti-Gere E.: **Investigation of the inflammatory and oxidative stress-inducing effects of deoxynivalenol and T-2 toxin exposure in non-tumorigenic human intestinal cell model**, Toxicon, 200. 78–86, 2021. **Impact factor: 2,725**

Pomothy J.M., Gatt K., Jerzsele Á., Gere E.P.: **The impact of quercetin on a porcine intestinal epithelial cell line exposed to deoxynivalenol**, Acta Veterinaria Hungarica., 68. 380–386, 2021. **Impact factor: 0,912**

Pomothy J.M., Pászti-Gere E., Barna R.F., Prokoly D., Jerzsele Á.: **The impact of fermented wheat germ extract on porcine epithelial cell line exposed to deoxynivalenol and T-2 mycotoxins**, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020. 3854247, 2020. **Impact factor: 5,604**

Pomothy J.M., Barna R.F., Pászti E.A., Babiczky Á., Szóládi Á., Jerzsele Á., Gere E.P.: **Beneficial effects of rosmarinic acid on IPEC-J2 cells exposed to the combination of deoxynivalenol and T-2 toxin**, Mediators of Inflammation, 2020. 8880651, 2020. **Impact factor: 4,064**

Pomothy Judit, Barna Réka Fanni, Czimmermann Ágnes, Szóládi Áron, Pásztiné Gere Erzsébet: **A deoxinivalenol mikotoxin toxikus hatásai a gazdasági haszonállatokra**, Magyar Állatorvosok Lapja, 142. 117–127, 2020. **Impact factor: 0,12**

Pomothy Judit, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet: **A rozmaringsav hatásai a haszonállatokban**, Magyar Állatorvosok Lapja, 142. 567–576, 2020. **Impact factor: 0,12**

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Szóládi Áron, Pásztiné Gere Erzsébet: **The beneficial effects of rosmarinic acid on a non-tumorigenic epithelial cell line**, Gradus, 7. 79–83, 2020. **Impact factor: N/A**

Magyarországi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter)

Pomothy Judit, Barna Réka Fanni, Prokoly Dorottya, Pásztiné Gere Erzsébet: **Fermentált búzacsíra védő hatásának tesztelése trichotecén vázas mikotoxinok által károsított sertés bélhámsejteken**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2020.

Pomothy Judit, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **Matriptáz enzim aktivátor és inhibitor tesztelése humán és patkány primer májsejt modelleken**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2020.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **Polifenol vegyületek antioxidáns hatásának vizsgálata mikotoxin indukálta oxidatív stresszválaszban**. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa, Szeged, Magyarország, 2019.

Barna Réka Fanni, Pomothy Judit Mercédesz, Pásztiné Gere Erzsébet. **Matriptáz modulátorok hatásának vizsgálata az extracelluláris hidrogén-peroxid-szintre primer májsejtmodelleken.** Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa, Szeged, Magyarország, 2019.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **A rozmaringsav hatásának vizsgálata IPEC-J2 sejteken.** Környezettudományi és Analitikai Műhelykonferencia, Kecskemét, Magyarország, 2019.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **A rozmarinsav védő hatásának vizsgálata mikotoxin expozíciónak kitett IPEC-J2 sejtvonalon.** 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2019.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **Matriptáz enzim aktivátor és inhibitor tesztelése patkány és humán primer májsejt modelleken.** 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2019.

Barna Réka Fanni, Pomothy Judit Mercédesz, Pásztiné Gere Erzsébet. **Matriptáz inhibitor tesztelése primer májsejteken és bélhámsejtvonalon.** 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2019.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **A DON és T-2 toxin hatásának vizsgálata sertés és humán nem daganatos sejtvonalakon.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2019.

Barna Réka Fanni, Pomothy Judit, Pásztiné Gere Erzsébet. **Bélhámsejteken tesztelt új matriptáz inhibitorok jellemzése.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2019.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet. **A quercetin védő hatásának vizsgálata rövidtávú don kezelést követően IPEC-J2 sejtvonalon.** Magyar Toxikológusok Társasága, TOX'2018 Tudományos Konferencia, Lillafüred, Magyarország, 2018.

Barna Réka Fanni, Pomothy Judit Mercédesz, Pásztiné Gere Erzsébet. **Szelektív matriptáz inhibitorok biztonságos alkalmazásának vizsgálata IPEC-J2 bélhámsejteken.** Magyar Toxikológusok Társasága, TOX'2018 Tudományos Konferencia, Lillafüred, Magyarország, 2018.

Pomothy Judit Mercédesz, Barna Réka Fanni, Kiss Zsófia, Pásztiné Gere Erzsébet. **A zearalenon és a Lactobacillus plantarum 2142 együttes hatása IPEC-J2 sejtvonalon.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2018.

Barna Réka Fanni, Pomothy Judit Mercédesz, Rokonál Patrik, Szombath Gergely, Pásztiné Gere Erzsébet. **Matriptáz modulátorok vizsgálata in vitro primer májsejteken.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2018.

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Pásztiné Gere E., Pomothy J., Jerzsele Á., Pilgram O., Steinmetzer T.: **Exposure of human intestinal epithelial cells and primary human hepatocytes to trypsin-like serine protease**

inhibitors with potential antiviral effect, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 36. 659–668, 2021. **Impact factor: 4,774**

Barna R.F., Pomothy J.M., Paréj Z., Pásztiné Gere E.: **Investigation of sphingosin-1-phosphate-triggered matriptase activation using a rat primary hepatocyte model**, Acta Veterinaria Hungarica, 67. 578–587, 2019. **Impact factor: 0,912**

Bérces Z., Pomothy J., Horváth Á.C., Kőhidi T., Benyei É., Fekete Z., Madarász E., Pongrácz A.: **Effect of nanostructures on anchoring stem cell-derived neural tissue to artificial surfaces**, Journal of Neural Engineering, 15. 056030, 2018. **Impact factor: 5,060**

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébetnek a kutatási koncepciók megalapozásáért, a kísérleti eredmények interpretálásában, a szakmai ötletek kidolgozásában és megvalósításában nyújtott útmutatásáért, valamint a kéziratok publikálásához szükséges ismeretek elsajátításának lehetőségéért, a sok-sok szakmai tanácsért a kutatómunkám során. Külön köszönöm a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék munkatársainak a támogató és barátságos munkakörnyezetet. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Gálfi Péternek és Dr. Jerzsele Ákosnak, hogy lehetővé tették a tanszéki kutatásaim elvégzését.

Köszönettel tartozom Dr. Neogrady Zsuzsannának és az Élettani és Biokémiai Tanszék munkatársainak a kísérleteim során mutatott folyamatos és összetett szakmai támogatásukért. Hálásan köszönöm Dr. Barna Réka Fanninak a segítséget a laboratóriumi munkában és konferenciákra való közös felkészülésben.

Külön köszönettel tartozom Dr. Rácz Bencének és Dr. Mátyás Ferencnek, hogy biztosították a hozzáférést a konfokális mikroszkópokhoz és szakmai ismereteikkel hozzájárultak a PhD munka megvalósításához. Továbbá köszönet illeti Babiczky Ákost és Magyar Alettát, hogy segítettek elkészíteni és értelmezni a konfokális mikroszkóp felvételeket. Köszönettel tartozom Dr. Varga Tamás Róbertnek és Seprődi Júliának, hogy megrajzolták a kémiai szerkezeteit a vizsgált vegyületeknek, melyeket így felhasználhattam a publikációkhoz és a PhD dolgozathoz. Köszönöm a Hutýra Ferenc Könyvtár munkatársainak, akik segítettek, hogy a cikkekhez hozzáférhessek, akár távoli eléréssel, akár személyesen elküldve a cikket.

Szeretném megköszönni a tudományos diákköri- és szakdolgozó hallgatóimnak a munkájukat és a részvételüket a kísérletekben. A témarészükön felül is segítettek a kísérletek lebonyolításában és aktívan részt vettek a publikációkhoz tartozó irodalomgyűjtésben.

Hálásan köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak a támogatást és az építő kritikákat, amellyel segítettek a publikálást és a türelmüket, mellyel viseltetek irántam.