

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM  
GYÓGYSZERTANI ÉS MÉREGTANI TANSZÉK



**A rozmaringsav kedvező hatásának vizsgálata deoxinivalenol és  
T-2 mikotoxin mérgezés esetében IPEC-J2 sejteken**

**Készítette:** Szóládi Áron

**Témavezető:**

Dr. Pásztiné dr. Gere Erzsébet  
Tudományos főmunkatárs

Budapest

2020

# Tartalomjegyzék

|   |    |
|---|----|
| <b>Tartalomjegyzék</b>  | 1  |
| <b>1. Rövidítésjegyzék</b>  | 2  |
| <b>2. Bevezetés</b>   | 3  |
| <b>3. Irodalmi áttekintés</b>   | 5  |
| 3.1 A rozmaringsav hatásainak jellemzése  | 5  |
| 3.2 Fuzariotoxinok hatásának jellemzése sertésben DON és T2 esetében                                    | 7  |
| 3.3 Az IPEC-J2 sejtvonal jellemzése, alkalmazási lehetőségei  | 9  |
| 3.4 Gyulladáscsökkentő citokinek szintjének változása fuzariotoxinokkal való expozíciót követően        | 9  |
| 3.5 DON és T-2 toxin kezelés hatásai bélhámsejtek redox állapotára                                      | 10 |
| 3.6 DON és T-2 toxin káros hatása a bélhámsejtréteg integritására                                       | 10 |
| 3.7 A kutatás célkitűzései  | 11 |
| <b>4. Anyag és módszer</b>  | 11 |
| 4.1 Az IPEC-J2 sejttenyészetek készítése  | 11 |
| 4.2 IPEC-J2 sejtek kezelése mikotoxin kombinációkkal és RA-val  | 12 |
| 4.3 Citotoxicitás kiértékelése Neutral red módszerrel   | 13 |
| 4.4 IPEC-J2 sejtek integritásának meghatározása TER segítségével  | 13 |
| 4.5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés mérése   | 13 |
| 4.6 Gyulladáskeltő citokinek mennyiségi meghatározása   | 14 |
| 4.7 Okkludin és klaudin-1 eloszlásának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel                           | 15 |
| 4.8 Statisztikai analízis   | 16 |
| <b>5. Eredmények</b>  | 16 |
| 5.1 A citotoxicitás mértéke DON, T-2 toxin, DT2 és RA esetében  | 16 |
| 5.2 A sejtmembrán integritás változása a mikotoxin és RA kezelést követően                              | 17 |
| 5.3 A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésben bekövetkező változások mikotoxin és RA kezelés hatására | 18 |
| 5.4 Az IL-6 és IL-8 szint változása DT2 és RA kezelést követően   | 19 |
| 5.5 A klaudin-1 és okkludin eloszlásának vizsgálata IPEC-J2 sejtekben                                   | 20 |
| <b>6. Megbeszélés</b>   | 21 |
| <b>7. Összefoglalás</b>   | 27 |
| <b>8. Summary</b>   | 28 |
| <b>9. Irodalomjegyzék</b>   | 32 |
| <b>10. Köszönetnyilvánítás</b>  | 35 |

# 1. Rövidítésjegyzék

A2780 - humán tumoros petefészek sejtvonala  
A549 - humán tumoros tüdőhám sejtvonala  
B16 - humán melanóma sejtvonala  
BSA - szarvasmarha szérumból albumin  
Caco-2 - humán adenokarcinóma sejtvonala  
CHO-K1 - kínai hörcsög petefészek sejtek  
CNE2 - humán tumoros nazofaringeális sejtvonala  
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol  
DMEM - Dulbecco-féle módosított Eagle tápközeg  
DMSO - dimetil-szulfoxid  
DNS - deoxiribonukleinsav  
DON - deoxinivalenol, vomitoxin  
DT2 - deoxinivalenol + T2 toxin  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
EGF - epidermális növekedési faktor  
FAO - Élelmezési és Mezőgazdasági Világszervezet  
FBS - főtális borjúsavó  
GM-CFU - granulocita/monocita kolónia formáló egység  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - hidrogén-peroxid  
HEPES - 4-(2-hidroxi-1-piperazin-etánszulfonsav  
HepG2 - humán hepatóma sejtvonala  
HRP - tormaperoxidáz  
HT-29 - humán tumoros vastagbél sejtek  
IC<sub>50</sub> – fél maximális gátlás koncentráció  
IL-6 - interleukin-6  
IL-8 - interleukin-8  
IPEC-J2 - sertés jejunális bélhámsejtvonala  
JAK/STAT – Janus kináz/ szignál transzducerek és transzkripció aktivátorok  
Ls174-T - humán tumoros vastagbél sejtvonala

MAPK - mitogén aktivált protein kináz  
MCF7 - humán mellrák sejtvonal  
mRNS - messenger ribonukleinsav  
NF- $\kappa$ B - nukleáris faktor -kappa B  
PBS - foszfáttal pufferolt sóoldat  
PPM - part per million  
RA - rozmaringsav  
RNS - ribonukleinsav  
ROS - reaktív oxigén fajták  
TER - transzepitheliális elektromos ellenállás  
TMB - tetrametil-benzidin  
TJ - szoros sejtkapcsoló struktúra  
U937 - humán leukémia sejtvonal  
WGA – búzacsíra agglutinin  
WHO - Egészségügyi Világszervezet  
ZO-1 - zona occludens-1

## 2. Bevezetés

A mikotoxinokkal szennyezett takarmány etetéséből adódó egészségügyi ártalom veszélye azóta fennáll, mióta az emberiség földműveléssel élelmiszert állít elő. Azonban ennek jelentősége egyre inkább hangsúlyosabbá vált az elmúlt évtizedekben. Ennek oka többek között az országok eltérő gazdasági és földrajzi különbözősége, valamint nem utolsósorban a globális felmelegedés okozta időjárási szélsőségek. A különböző nemzetközi szervezetek (FAO, WHO) becslései alapján a világ szántóföldi növényeinek 25%-a fertőzött penészgombákkal, így azok szekunder anyagcsere-termékeivel, a mikotoxinokkal (Pandya és Arade 2016). A szegényebb országok lakossága által elfogyasztott gabonaalapú termékek szennyezettek leginkább mikotoxinokkal (Wild és Gong 2010).

A mikotoxinok az emberi és az állati szervezetre kifejtett hatását, a mérgezési tünetek megjelenését mikotoxikózisnak nevezzük. A mérgezés kialakulása általában a gasztrointesztinális rendszeren keresztül történik, azonban előfordulhat bőrön át (kontakt) és inhalációs formájában is (Omotayo és mtsai. 2019). Ennek a kedvezőtlen mikotoxin hatásnak

a mértéke függ attól, hogy milyen gyakran és mekkora dózisban érintkezik az emberi vagy állati szervezet a mikotoxin szennyeződéssel, továbbá a mikotoxin típusától, valamint az élőlények fizikai, ivari, faj/fajta állapotától. Nem elhanyagolható az egyéb mikotoxinok és egyéb vegyszerek szinergista hatása sem (Gajecka és mtsai. 2013).

A haszonállat tartásban is komoly veszteségeket okozhatnak a takarmányok emelkedett mikotoxin koncentrációi. A kérődzők a bendő mikroflórájának barrier szerepe miatt kevésbé érintettek egyes mikotoxin fertőzésekben, azonban az állat ehető szöveteiben (hús, tej) itt is megjelenhetnek ezek a másodlagos anyagcseretermékek, és kifejthetik a növekedésre gyakorolt negatív hatásaikat (pl. növekedésben való elmaradás, satnyaság, gyapjú hozam) (Iheshiulor és mtsai. 2011). A monogasztrikus állatok közül a baromfi és a sertés különösen érzékenyek az egyes mikotoxinok által okozott megbetegedésekre. A mikotoxinok rontják a takarmányok beltartalmi értékeit, kellemetlen ízt okoznak, ezáltal csökken a takarmány felvétel és a növekedési erély, következésképp a haszonállatok teljesítménye.

Éghajlatunkon a globális felmelegedés miatt az aflatoxin terhelés is várhatóan növekedni fog a többi jelentősebb mikotoxin mint az ochratoxin, a deoxinivalenol (DON), a T-2 toxin és a zearalenon mellett (FAO 1998). A sertés ágazatban a legártalmasabb trichotecének közé a DON és a T-2 toxin tartozik (Iheshiulor és mtsai. 2011).

A T-2 toxin és más trichotecén A vázas vegyületek jelentősen csökkentik a szaporasági mutatókat a sertéstelepen akár 1-2 ppm koncentráció mellett. A toxinnak kitett kocákban infertilitás fordul elő és a petefészek, méh nyálkahártyáján léziók figyelhetők meg. A DON csökkent takarmány felvételt indukál, ami szintén a fiaztató egységben lévő laktáló és fialó kocákat érinti leginkább (Cortyl és mtsai. 2008). Ez a telepi menedzsment szempontjából a csökkenő termékenyítési rátán, a visszaivarzó kocák számán, a csökkent választási súlyban figyelhető meg. Feltűnhet még nagy DON terhelésnél a malacok akut hasmenése is, ami akár elhulláshoz is vezethet.

Ebből is láthatjuk, hogy a toxin terhelés csökkentése gazdasági és társadalmi érdek is. A gyengébb állatok megnövekedett antibiotikum felhasználást tesznek szükségessé, ami a haszonállatok és közvetetten az emberekre is kifejezetten veszélyes az antibiotikum rezisztencia terjedése miatt (Kumar és mtsai. 2014). A toxin terhelés csökkentésére használják a szervesetlen toxinkötő vegyületeket, mint a bentonit vagy annak ásványi

alkotórésze, a montmorillonit. A működési elvük azon alapul, hogy relatív nagy megkötő felületként vannak jelen a takarmánykeverékben (Chaytor és mtsai. 2011). Viszont a szervesen toxinkötőknek önmagukban nem sikerült a mikotoxikózis problémáját megoldani, mivel limitált az a mennyiség, amelyet a takarmányba keverhetnek, így annak megkötő felülete is korlátolt.

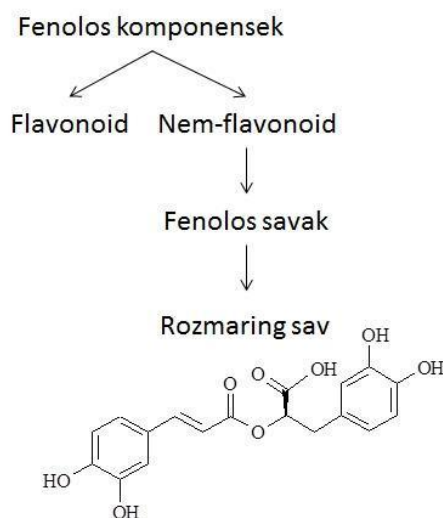
Az antibiotikumok szigorúbb szabályokhoz kötött felhasználása miatt fordult az élelmiszer- és takarmányipar az alternatív takarmánykiegészítők kutatása felé. Ilyen természetes takarmány kiegészítő a polifenolok közé sorolható rozmaringsav is. A rozmaringsavnak többek között erős antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatása van, ami nagyon hasznos a bélfal (kifejezetten a vékonybél) integritásának megőrzésében. A mikotoxinok oxidatív stressz hatást gyakorolnak a bélhámsejtekre. A fokozatosan kialakuló gyulladás negatívan hat a bélfal integritásra, így csökkentve annak felszívó-képességét és a bélben a helyi immunitást. Azzal, hogy a rozmaringsav mérsékli a mikotoxinok negatív hatásait, segít megőrizni az optimális mikrobióta összetételét. Így a bélre káros mikroorganizmusok, mint például *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. és a *Streptococcus* spp. nehezebben tud megtapadni a bélhám felszínén (Kumar és mtsai. 2014).

Munkánk célja egy poliészter membrán inzerten tenyésztett, újszülött sertés jejunum eredetű IPEC-J2 sejtmodell létrehozása volt, amelyen vizsgálhattuk két mikotoxin, a DON és a T-2 toxin hatását a bélhámsejtek életképességére, a bélbarrier integritásra, a redox és gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokra, valamint tanulmányozhattuk a rozmaringsav hatását a mikotoxinok által előidézett káros hatások kivédésében. Kutatásunk során arra kerestünk választ, hogy a rozmaringsav képes-e mérsékelni a DON és T-2 toxin, illetve ezek kombinációinak negatív hatásait és *in vitro* vizsgálatok adatai alapján alkalmas-e arra, hogy egy alternatív takarmánykiegészítő lehessen a mikotoxikózis kedvezőtlen hatásainak megelőzése céljából.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 A rozmaringsav hatásainak jellemzése

A polifenolokat két csoportra lehet bontani: flavonoidok, illetve nem-flavonoidok. A nem-flavonoid csoporthoz tartoznak a fenolos savak. A fahéjsav fenolgyűrűjéhez kapcsolódó hidroxilcsoportokkal alakulnak ki a hidroxifahéjsavak, ahová tartozik a kávéssav, a ferulsav és a p-kumársav is. Ritkán fordulnak elő aglikonként, viszont gyakran észterek képződhetnek belőlük. A kávéssav észterei közé sorolható a rozmaringsav (RA) is (1. ábra).



**1. ábra** A polifenolok csoportosítása és a rozmaringsav szerkezeti képlete (a kémiai szerkezetet Sepródi Júlia készítette).

A természetben a RA a *Lamiaceae* család sok fajában nagy koncentrációban fordul elő. A RA antivirális, antibakteriális, gyulladáscsökkentő és nem utolsósorban antioxidáns hatással is bír (Petersen 2003). A sokszínű felhasználhatóságának köszönhetően az utóbbi időben a tudományos érdeklődés középpontjába került.

Hossan és mtsai (2014) bizonyították, hogy a rozmaringsav kifejezett antioxidáns tulajdonságának következményeként *in vitro* tumorellenes hatású különböző sejtvonalakon (HT-29, Ls174-T, CNE2, B16, A549, U937, HepG2, MCF7, A2780). Bittner és mtsai (2019) meghatározták az RA antimikrobiális, antivirális, antifungális koncentrációit az általuk vizsgált sejtvonalakon. A kísérletben 300  $\mu\text{M}$  koncentrációjú RA 50%-kal csökkentette a sejtek életképességét 48 óra inkubálás után, ezt az RA a COX-2 enzim gátlásával érte el, ami

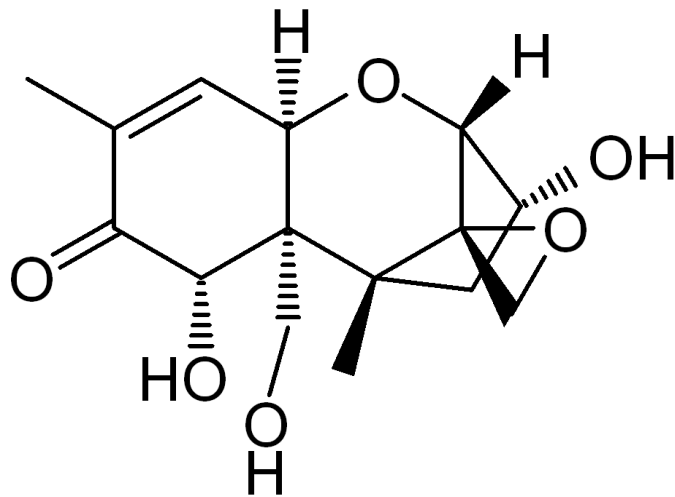
a RA gyulladáscsökkentő és tumorelles hatását határozza meg. Gombaellenes tulajdonsága abból adódik, hogy az RA képes gátolni az izocitrát-liáz enzimet a glioxilát cikluson belül.

IPEC-J2 sejtvonal vonatkozásában azt találták, hogy a RA jelentősen megnövelte a sejtek életképességét azzal, hogy csökkentette az oxidatív stressz mértékét és a gyulladáscsökkentő citokinek expresszióját (Pomothy és mtsai. 2020a). *In vivo* kifejtett hatásai a már említett tulajdonságaiból következnek. Lin és mtsai (2019) bizonyították a RA antivirális hatását humán enterovírusokkal szemben. A kísérletben azt találták, hogy a RA nem csak a humán rhabdomyosarkóma sejtek citopatogén elváltozását gátolta meg, hanem az enterovírus által indukált apoptózis mértékét is csökkentette. Az állatkísérletek során mesterségesen fertőzött egerek a fertőzést követő harmadik napon már a paralízis jeleit mutatták, majd a hatodik napra az összes fertőzött állat elpusztult. Ezzel ellentétben azon egerek esetében, akiket megfertőztek, majd kezeltek 20 mg/kg RA-val, a túlélési arány 80%-ra módosult. A csak RA kezelést kapott egerek csoportjában nem volt elhullás a kísérlet időtartama alatt.

### **3.2 Fuzariotoxinok hatásának jellemzése sertésben DON és T2 esetében**

A sertés monogasztrikus állat, szervezetébe a DON gabonafélékkel kerülhet be, amire a sertés kifejezetten érzékeny. A DON (2. ábra) a *Fusarium graminearum* anyagcsereterméke és általános klinikai hatásai között tartjuk számon a takarmány felvétel csökkenését (és az ebből adódó súlyvesztést) és a hányást (Diekman és Green 1992; Pomothy és mtsai. 2020b). A DON egyéb gasztrointesztinális elváltozásokat is okozhat, mint a hasmenést, végbélelőesést, gyomorfekély képződést. A DON emetikus hatását potenciózza a fuzárium-sav, ekkor már 0.14 ppm- nél jelentkezhet a hányás (Smith és mtsai. 1997). A *F. graminearum* nedves és relatív meleg környezetet igényel. A takarmányban 1 ppm alatti DON toxinterhelés nem jár jelentős hatással, 1–3 ppm közötti koncentrációban már csökken a sertések takarmányfelvétele, 3–10 ppm koncentrációk esetében immunszuppresszió és száj/bőr irritáció jelentkezhet, 10–20 ppm-nél már a takarmány teljes visszautasítása is megtörténhet (Osweiler 2006).





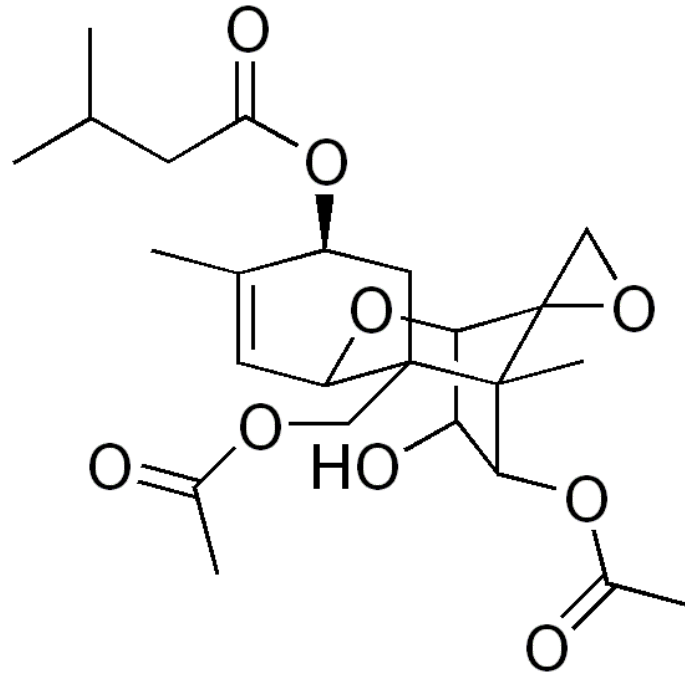
2. ábra A deoxinivalenol szerkezeti képlete

A fuzáriotoxinok befolyásolják a máj anyagcsere folyamatait a nukleinsav- és a fehérjeszintézis gátlásával (Smith és Az-Llano 2009). Mikotoxinnal való kontamináció mérlegelési szempont a vakcinázások során és fontos tényező a fertőzésekkel szembeni ellenálló-képességnél is. Hatással van a szaporodásbiológia mutatókra is, csökkenti a fejlődő petesejtek számát, így az alomszámot (Tiemann és Danicke 2007). Az előhasi kocák sokkal érzékenyebbek, mint a vemhes kocák, ez azonban nem a DON közvetlen hatásának az oka, hanem indirekt módon a csökkent takarmányfelvételnek és a máj anyagcsere zavarainak tulajdonítható.

*Per os* felvételnél a DON gyorsan és majdnem teljesen felszívódik a gyomorból és a vékonybél proximális részéből (Danicke és Matthes 2003). A DON- nak jó a megoszlási képessége a szervezetben, viszont a szövetekben nem halmozódik fel (Prelusky és Trenholm 1991). A vese választja ki legnagyobb részben, azonban ürül epével és bélsárral is glükuronsavas konjugáció után. Összességében semmilyen állati szövetben nem mutatható ki maradékanyag, mivel nagyon gyorsan eliminálódik. Ha a szennyezett takarmányt megvonjuk, a prognózis kifejezetten kedvező (Prelusky és mtsai. 1994).

A nedvesebb hűvösebb klímát kedvelő *Fusarium sporotrichioides* és a *Fusarium poae* T2 toxint (3. ábra) termel. A T2 toxin nagy dózisban (> 10 ppm) közvetlen kontaktus útján irritációt és nekrotikus elhalást is indukálhat a bőrben. Bár a takarmányban általában alacsony koncentrációban fordul elő, a felvétele súlyos következményekkel járhat. Annak ellenére, hogy kifejezett önlimitáló tulajdonsággal bír, már nagyon alacsony koncentrációnál is (< 3

ppm), teljes takarmány visszautasítást okoz, emellett jelentős élettani, kórbonctani és kórszövettani hatásokat figyeltek meg. Ilyen az immunszuppresszió, gasztroenteritis, hasmenés, sokk, kardiovaszkuláris elégtelenség és halál (Zimmerman és mtsai. 2012).



3. ábra A T2 toxin szerkezeti képlete

### 3.3 Az IPEC-J2 sejtvonala jellemzése, alkalmazási lehetőségei

Az IPEC-J2 sejteket újszülött sertések jejunumából izolálják még a kolosztrum felvétele előtt. Ezek a sejtek gyors sejtproliferációs és kolonizációs képességgel rendelkeznek, így már 1-2 hét elteltével kialakul az *in vivo* sejtekre jellemző polarizált hámsejtréteg (Geens és Niewold 2011; Vergauwen 2016; Lea 2015). A nem daganatos sejtvonalon végzett kutatás eredménye jobban reprezentálja a vizsgált anyag *in vivo* kifejtett hatásait. A nyert sejt kultúra alkalmas az epiteliális transzportfolyamatok, a sejt differenciálódás, valamint a patogén és nem patogén baktérium- enterocita interakciók vizsgálatára, használható a jótékony és kártékony anyagok bélhámsejtre kifejtett hatásainak tanulmányozására (Pászt-Gere és mtsai. 2012; Pászt-Gere és mtsai. 2014), valamint lehetőség nyújthat krónikus megbetegedések, mint a Crohn-betegség és a fekélyes vastagbélgyulladás modellezésére is (Geens és Niewold 2011)

A sejtek apikális felületén mikrovillusok találhatóak és a szomszédos sejtek a szoros sejtkapcsoló struktúrákkal (tight junction-nel, TJ-vel) kapcsolódnak. A szoros sejtkapcsoló struktúra fontos szerepet tölt be a sejtek közötti kommunikációban és a sejtréteg permeabilitásának kialakításában. Ebben a kladin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -12, a tricellulin, az okkludin, E-kadherin és a zonula okkludens-1 fehérjék kulcsszerephez jutnak (Vergauwen 2016). Ezen fehérjék lokalizációjának meghatározásával és immunfluoreszcenciás vizsgálatával következtetni tudunk a sejtréteg permeabilitásának és barrier integritásának tulajdonságaira. A vékonybélből izolált sejtek kehelysejtekben szegények, így a citoprotektív hatású mucin termelés elhanyagolható.

### **3.4 Gyulladáscsökkentő citokinek szintjének változása fuzariotoxinokkal való expozíciót követően**

A DON-nak a citokintermelés modulációjára gyakorolt hatásáról elsősorban az mRNS- szintek változásának mérésével számoltak be. Kang és mtsai (2019) megfigyelték, hogy a gyulladást elősegítő citokinek, az interleukin (IL) -6 gén expressziója szignifikánsan növekedett az IPEC-J2 sejtekben, amelyeket DON- nal kezeltek 0.5 -2  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban 4 órán keresztül. Ennek megfelelően Liu és mtsai (2019) arról számoltak be, hogy az IPEC-J2 sejtek IL-6 mRNS- tartalma növekedést mutatott, miután a sejteket 8 óráig 4  $\mu\text{mol/L}$  DON-nal inkubálták. Guo és mtsai (2019) azt is megállapították, hogy az IPEC-J2 sejtek 24 óráig 1  $\mu\text{mol/L}$  DON-nal történő kezelése az IL-6 szint emelkedéséhez vezetett. Vannak azonban ellentmondásos adatok a DON- által indukált IL-8 mRNS szintjével összefüggésben az IPEC-J2 sejtekben. Liu és mtsai (2019) úgy találták, hogy a DON 4  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban 8 órán keresztül nem vált ki jelentős változásokat az IL-8 gén expressziójában, de alacsonyabb koncentrációknál, például 0.25  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációnál az IL-8 szintek alulszabályozását okozhatja. Azt is megállapították, hogy a DON magasabb koncentrációja (6.7  $\mu\text{mol/L}$ ) nem változtatta meg az IL-8 mRNS expresszióját az IPEC-J2 sejtekben (Kluess és mtsai. 2015). Ezen eredményekkel ellentétben Cano és mtsai (2013) bebizonyították, hogy a DON 10  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban 8 órán keresztül szignifikánsan emelte meg az IL-8 mRNS szintjét. Az IL-8 termelését Guo és mtsai (2019) is vizsgálták, és

arról számoltak be, hogy 1  $\mu\text{mol/L}$  DON szignifikánsan megnöveli az IPEC-J2 IL-8 tartalmát 24 és 48 órás inkubációs idővel.

### **3.5 DON és T-2 toxin kezelés hatásai bélhámsejtek redox állapotára**

Széles körben elfogadott tény, hogy a trichotecén mikotoxinok toxicitását döntően a ribotoxikus stressz válasz alapján kialakuló oxidatív stressz okozza (Zhou és mtsai. 2005). A sejteken belül a DON és a T-2 aktiválja a mitogén aktivált protein kinázokat (MAPK-t) (Lucioli és mtsai. 2013), a Janus kináz / szignál transzducer és transzkripció aktivátorokat (JAK/STAT-ot) (Wang és mtsai. 2012) és nukleáris faktor -kappa B-t (NF- $\kappa$ B-t) (Van De Walle és mtsai. 2008; Liu és mtsai. 2017), amelyek apoptózishoz vezethetnek. A riboszómák mellett a mitokondriumokat tekintik a trichotecén mikotoxin szennyeződések célpontjának (Bin-Umer és mtsai. 2014; Liu és mtsai. 2014). Kang és mtsai (2019) arról számoltak be, hogy a 6.7  $\mu\text{mol/L}$  DON az IPEC-J2 sejtekben 24 órás mikotoxin expozíció után szignifikáns emelkedést okozhat az intracelluláris ROS szintekben.

### **3.6 DON és T-2 toxin káros hatása a bélhámsejtréteg integritására**

Több kutatócsoport beszámolt arról, hogy a DON alkalmazás a TER értékek szignifikáns csökkenését eredményezi a dózistól és az alkalmazás módjától függően (Diesing és mtsai. 2011; Goossens és mtsai. 2012; Kang és mtsai. 2019). A 210 nmol/L koncentrációban 72 órán át alkalmazott T-2 szintén csökkentheti az IPEC-J2 sejtréteg integritását (Goossens és mtsai. 2012).

Vizsgálták továbbá, hogy alacsony vagy magas koncentrációjú DON-nal kezelt IPEC-J2 sejtekben a zonula okkludens (ZO) -1 expressziója hogyan változik. A ZO-1 szétesését csak akkor figyelték meg, ha a DON-t 6.74  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban alkalmazták, szemben a 0.674  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációval (Diesing és mtsai. 2011). A klaudin-3 folyamatos réteggént detektálódott minden kezeletlen IPEC-J2 sejt körül, szemben a DON- nal szennyezett sejtekkel (6.74  $\mu\text{mol/L}$ ), amelyekben a klaudin-3 csökkent expressziója volt látható (Diesing és mtsai. 2011). Számos tanulmány a DON alkalmazás és a klaudin-3 és klaudin-4 fehérje expressziójának csökkenése közötti összefüggés feltárását vizsgálta

bélgámsejtekben (Pinton és mtsai. 2009; Gu és mtsai. 2016), amely kutatások során bizonyítást nyert, hogy a DON megnövekedett 20  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációnál befolyásolja csak a klaudin-1 expressziót (Springler és mtsai. 2016). Az okkludin lokalizációjának a DON-nal való kezelést követő változásait még nem sikerült teljes mértékben tisztázni.

### **3.7 A kutatás célkitűzései**

Vizsgálatunk célja (i) a DON, T-2 toxin, DT2 és RA citotoxicitásának meghatározása (ii) a DT2 és RA hatásának vizsgálata a sejtréteg integritására vonatkozóan (iii) valamint a gyulladáshos citokinek közül az IL-6 és IL-8- szint változására és a redox állapot befolyásolására IPEC-J2 sejtek esetében. Ezen túlmenően immunfluoreszcens vizsgálatot is végeztünk két szoros sejtkapcsoló fehérje, az okkludin és a klaudin-1 lokalizációs mintázatának változásainak nyomon követésére DT2-vel terhelt IPEC-J2 sejtekben RA hiányában és jelenlétében.

## **4. Anyag és módszer**

### **4.1 Az IPEC-J2 sejttenyészetek készítése**

A kísérlethez sertés bélgámsejtvonalat használtunk (IPEC-J2 ACC 701). Az IPEC-J2 sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) és Ham's F12 Nutrient tápfolyadék 1:1 arányú oldatában tenyésztettük (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). Az oldatot kiegészítettük 1.5 mmol/l 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsavval (HEPES), 5% főtális borjúsavóval (FBS, Biocenter, Budapest, Magyarország), 1% inzulin/transzferrin /nátrium-szelenit médium kiegészítővel, 5 ng/mL epidermális növekedés faktórral (EGF), 1% penicillin/sztreptomocinnel. A komponenseket a Thermo Fisher Scientific-től szereztük be (Waltham, MA, USA). A felhasznált sejtek 40 és 42 közötti passzázsszámmal rendelkeztek. A kísérlet első lépéseként kivettük a fagyasztott IPEC-J2 sejteket a folyékony nitrogénből. Az így tárolt sejteket melegítés után műanyag sejttenyésztő flaskába helyeztük (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) és 10 ml DMEM/F12 tápfolyadékot adtunk hozzájuk, majd párásított környezetben, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett 37

°C-on inkubáltuk őket. Az egy hét alatt kialakult, konfluens tenyészetet passzáltuk és membrán inzertekre ültettük ki a sejteket. Az átültetés során először pipetta segítségével leszívtuk a feleslegessé vált tápoldatot, majd 5 ml foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) átmostuk a tenyészetet. Ezután megkezdtük a sejtek kezelését 2 ml tripszin-etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) (0.05% tripszin, 0.6 mM EDTA) oldattal, majd 10 percre az inkubátorba helyeztük őket. Ezután a sejteket poliészter membrán inzertet tartalmazó tenyésztőedényekre ültettük ki  $2 \times 10^5$  sejt/ml sűrűségben. Ezután a 6 lyukú sejtenyésztő edény apikális (inzert feletti) részére 1.5 ml tápfolyadékot, a bazolaterális (inzert alatti) részre pedig 2.6 ml DMEM folyadékot pipettáztunk. A sejteket továbbra is 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett inkubáltuk. A tápfolyadékot kétnaponta cseréltük, minden csere alkalmával transzepiteliális elektromos ellenállás (TER) méréssel ellenőriztük a sejtek differenciálódását.

#### **4.2 IPEC-J2 sejtek kezelése mikotoxin kombinációkkal és RA-val**

A DON (molekuláris tömeg 296.319 g/mol) és T-2 toxin (466.527 g/mol) valamint a rozmaringsav (RA) (360.31 g/mol) a Mercktől (Darmstadt, Németország), a dimetil-szulfoxid (DMSO) és az acetonitril a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA, USA) került beszerzésre. A végső koncentráció a sejt kultúrában a DMSO vagy acetonitril esetében <0.5%(v/v) volt.

Először a DON és T-2 mikotoxint teszteltük külön-külön a sejteken, amelyeket apikálisan és bazolaterálisan adtunk az IPEC-J2 sejtekhez. A DON koncentráció tartománya 0 –50 µmol/L, míg a T-2 toxin esetében ez 0 -50 nmol/L volt. A kezelés időtartamát 48 és 72 órában határoztuk meg. A mikotoxin kombinációk *in vitro* hatásának feltérképezéséhez a következő DON és T-2 (DT2) tartalmú oldatokat készítettük el, amelyeket apikálisan és bazolaterálisan is hozzáadtunk a sejtekhez: 1 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2; 5 µmol/L DON + 10 nmol/L T-2; 10 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2 and 10 µmol/L DON + 10 nmol/ L T-2.

A kísérlet további részében az IPEC-J2 sejteket 24 óráig előkezeltük 50, 100, 500 and 1000 µmol/L koncentrációjú RA-val. Magát a RA-t DMSO-ban oldottuk fel. A kezelőoldatokat egy fecskendőre felerősített 0.2 µm pórus átmérőjű steril szűrőn keresztül szűrtük meg (Millex-GV, Merck, Darmstadt, Németország).

### **4.3 Citotoxicitás kiértékelése Neutral red módszerrel**

Az IPEC-J2 sejtek életképességét a 48 és 72 órás DON, T-2, DT2 és RA kezelés után mértük Neutral red próbával (Merck, Darmstadt, Németország). A próba az életképes sejtek eurhidin festék felvételének képességével függ össze. Az IPEC-J2 sejteket inkubáltuk mikotoxinokkal és RA-val 48 és 72 óráig, a kontroll sejteket csak fenolvörös mentes DMEM-mel kezeltük. A közeg eltávolítása és PBS-el történő mosást követően az IPEC-J2 sejtekhez hozzáadtuk a Neutral red oldatot 45 mg/L koncentrációban (Repetto és mtsai. 2008) fenolvörös mentes médiumban 2 óráig. Az IPEC-J2 sejtek mosása után festék kioldó oldatot (etanol/ ioncserélt víz/ jégcet, 7.5/7.4/0.15, v/v/v) használtunk 10 percig. A sejtek életképességét 540 nm-en ELISA leolvasó műszerrel mértük (EZ Read Biochrom 400, Cambridge, UK).

### **4.4 IPEC-J2 sejtek integritásának meghatározása TER segítségével**

Az IPEC-J2 sejteket 6 lyukú Transwell membrán inzertre (poliészter, 0.4  $\mu\text{m}$  pórus átmérő, Corning, Merck, Darmstadt, Németország) ültettük ki  $3 \times 10^6$  sejt/lyuk koncentrációban. A mért TER érték alapján a sejtek polarizáltságának mértékére lehet következtetni. A barrier integritás mértékét EVOM Epithelial Tissue Volt Ohmmeter-rel (World Precision Instruments, Berlin, Németország) mértük. Az eredményt úgy kaptuk meg, hogy a mért TER értéket megszoroztuk a membrán inzert felületével (4.67  $\text{cm}^2$ ).

### **4.5 $\text{H}_2\text{O}_2$ termelés mérése**

Az IPEC-J2 sejtek  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésének nyomon követésére Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay kitet használtuk (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tormaperoxidáz (HRP) jelenlétében az Amplex Red reagens reakcióba lép a képződő peroxiddal (1:1 sztöchiometrikus arányban) és fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező rezorufin képződik. A sejtmentes felülúszóból, a bazolaterális oldalról 48 és 72 óra elteltével

mintákat gyűjtöttünk a további vizsgálatokra. A sejtmentes felülúszóból 50  $\mu\text{L}$ -t összekevertünk 50  $\mu\text{L}$  Amplex Red munka oldattal (4. ábra). A fluoreszcencia intenzitását fluoriméterrel mértük (excitációs hullám 530 nm, emissziós hullámhossz 590 nm, Victor X2 2030, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). 0-15  $\mu\text{M}$  koncentrációban lineáris összefüggést találtunk a fluoreszcencia intenzitás és a  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációk között.

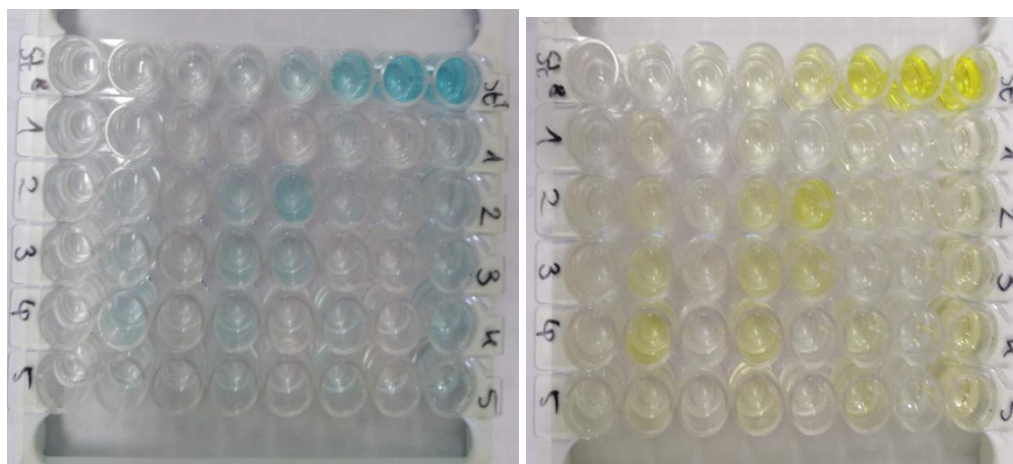


**4. ábra** Extracelluláris  $\text{H}_2\text{O}_2$  mérése 96-os tenyésztőlemezen Amplex red módszerrel.

#### **4.6 Gyulladás-keltő citokinek mennyiségi meghatározása**

IPEC-J2 sejtmentes felülúszójában az IL-6 és az IL-8 meghatározása sertés IL-6 (Aviva System Biology, San Diego, USA) és sertés IL-8 szendvics ELISA kittel (Merck, Darmstadt, Németország) történt (5. ábra). Ahhoz, hogy meghatározni tudjuk a citokin szinteket a 48 és 72 órás kezelés után, a felülúszót a gyártó utasításainak megfelelően használtuk fel és a minták abszorbanciáit 450 nm-en mértük (Victor X2 2030, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A kalibrációs egyenes adatai alapján, az IL-6- 78–5000 pg/mL közötti tartományban, az IL-8 8.19 -2000 pg/mL tartományban volt kvantitatívan mérhető.





5. ábra IL-6 és IL-8 koncentráció mérések ELISA módszerrel. IL-6 és IL-8 tartalmú minták esetében a minta kék színű, mely STOP oldat hozzáadására sárga színűvé változik.

#### 4.7 Okkludin és klaudin-1 eloszlásának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel

Az occludin és klaudin-1 lokalizációját konfokális mikroszkóppal végeztük. Az IPEC-J2 sejteket 72 óráig inkubáltuk, majd apikálisan és bazolaterális DT2-t, vagy DT2 + RA-t adtunk hozzájuk. A sejteket metanollal fixáltuk (Merck, Darmstadt, Németország). Az IPEC-J2 sejteket 20 percig kezeltük 5%-os szarvasmarha szérum albumint (BSA, Merck, Darmstadt, Németország) tartalmazó PBS-el szobahőmérsékleten. A lemezeket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk nyúl anti-klaudin 1 poliklonális elsődleges antitesttel (1:200, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), vagy nyúl anti-okkludin poliklonális elsődleges antitesttel (1:200, Merck, Darmstadt, Németország). Ezt követően az inzereteket Alexa-Fluor 546 konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitestekkel (1:200, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) inkubáltuk, melyet korábban PBS-el hígítottunk. A szialinsav maradékot az IPEC-J2 sejtmembránban búzacsíra agglutininnal konjugált Alexa-Fluor 488-al festettük (1:200 PBS-ben oldva, WGA Alexa Fluor 488, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 percig, és a sejtmagokat további 10 percig festettük 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) (1:500 arányban PBS-ben oldva, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Az inkubációk között az inzereteket 3 x 5 percig PBS oldattal mostuk. Fluoreszcens rögzítő anyagot használva az üveg lemezekhez ragasztottuk az inzereteket (Dako, Agilent

Technologies, Glostrup, Dánia). A mintákat Leica konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Leica SP2 Confocal Microscope, Wetzlar, Németország).

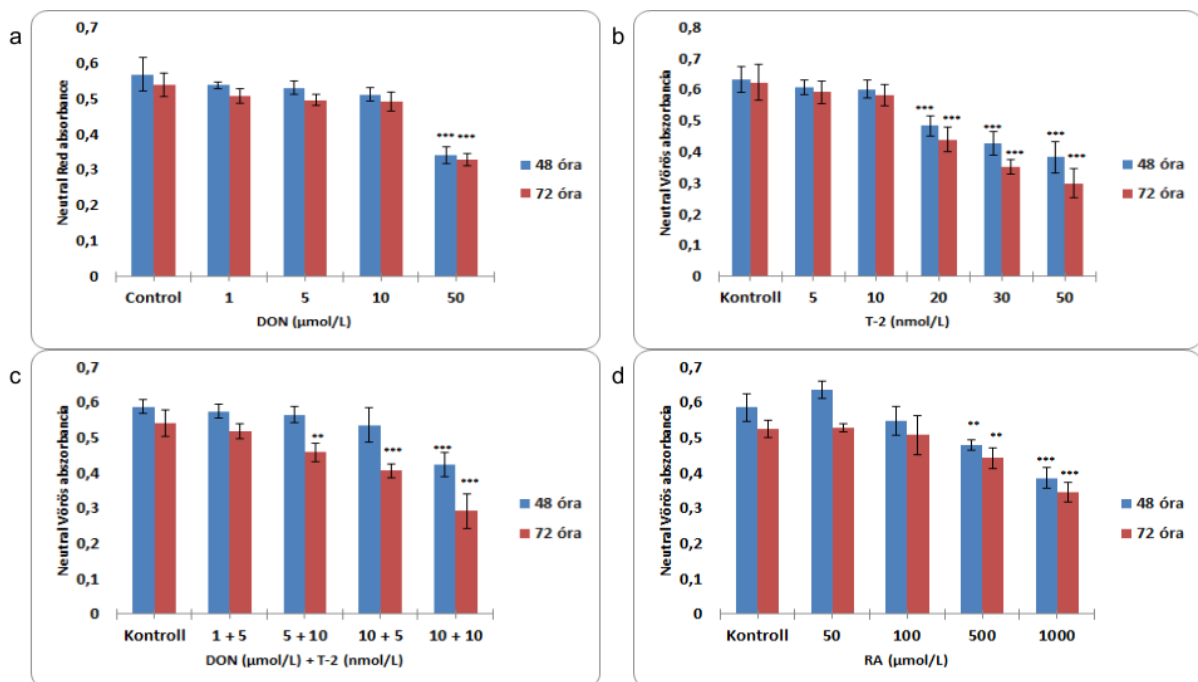
## 4.8 Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analízistét az R Core Team (2016) segítségével végeztük (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A csoportok közötti különbségek meghatározására egytényezős variancia analízist, egy utas ANOVA modellt és post-hoc Tukey tesztet használtunk. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  és \*\*\* $p < 0.001$  statisztikailag szignifikáns különbségnek értelmeztük.

## 5. Eredmények

### 5.1 A citotoxicitás mértéke DON, T-2 toxin, DT2 és RA esetében

A citotoxikus hatás mértéke DON, T-2 toxin, DT2 és RA kezelés hatására 48 és 72 óra után történt kiértékelésre (6. ábra). A DON-t 0  $\mu\text{mol/L}$  és 50  $\mu\text{mol/L}$  közötti, míg a T-2 mikotoxint 0  $\text{nmol/L}$  és 50  $\text{nmol/L}$  közötti koncentrációban alkalmaztuk. A 48 és 72 óra inkubációs idő letelte után DON 50  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációjánál szignifikáns sejtpusztulás volt megfigyelhető 48 és 72 óra kezeléseket követően egyaránt ( $p < 0.001$ ) (6a ábra).

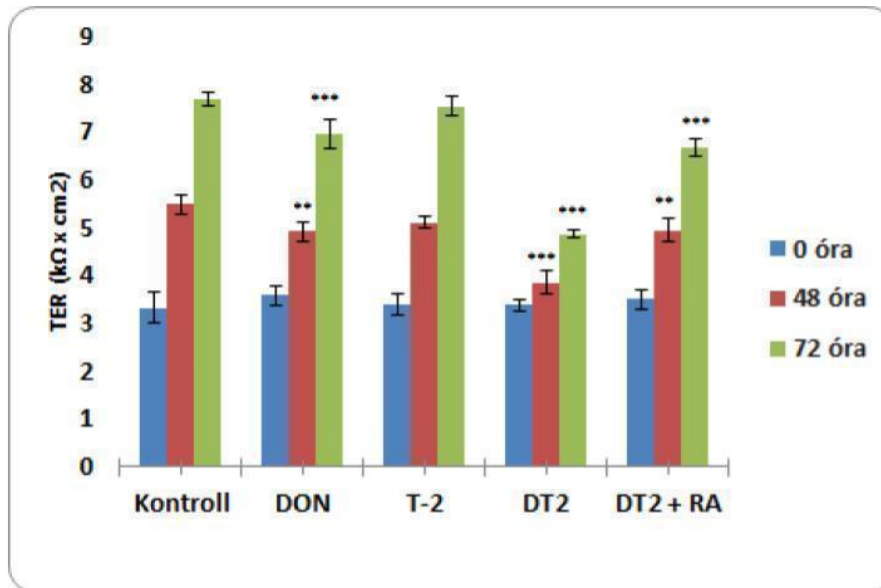


**6. ábra** Differenciált IPEC-J2 sejtekre kifejtett citotoxikus hatás DON (a), T-2 (b), DT2 (c) és RA (d) kezelések esetében. A kezelések 48 és 72 óráig történtek. Szignifikáns csökkenés volt a sejtek életképességében a kontroll, illetve az 50 µmol/L DON-nal vagy 20 nmol/L T-2-vel kezelt sejtek között. Nem volt szignifikáns citotoxikus hatással a 48 és 72 órás DT2 kezelés (1 µmol/L DON és 5 nmol/L T-2). RA csak magasabb koncentrációban (500 és 1000 µmol/L koncentrációnál) károsította jelentős mértékben az IPEC-J2 sejteket. A mérési eredmények átlag abszorbancia ± SD értékek alapján kerültek ábrázolásra (n=8).

T-2 esetében 48 és 72 óra után 20 nmol/L, vagy annál magasabb koncentrációban volt megállapítható a kifejezett citotoxicitás ( $p < 0.001$ ) (6b ábra). A mikotoxinok kombinációban (DT2) történő alkalmazása esetén 72 óra után 5 µmol/L DON + 10 nmol/L T-2, valamint a 10 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2 és 48 illetve 72 órát követően a 10 µmol/L DON + 10 nmol/L T-2 esetén szignifikánsan kimutatható volt a citotoxikus hatás (6c ábra,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ). Ahhoz, hogy meghatározhassuk az RA bélhámsejtek életképességére kifejtett hatását 50 µmol/L, 100 µmol/L, 500 µmol/L és 1000 µmol/L koncentrációkat teszteltünk. Azt állapítottuk meg, hogy 48 óra 500 és 1000 µmol/L töménységű RA kezelés számottevően csökkentette a sejtek életképességét ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ), azonban alacsonyabb koncentrációban (50 és 100 µmol/L) az RA nem befolyásolta a sejtek életképességét (6d ábra). A további kísérletekhez nem citotoxikus 1 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2 mikotoxin kombinációt illetve 50 µmol/L koncentrációjú RA oldatokat alkalmaztunk.

## **5.2 A sejtmembrán integritás változása a mikotoxin és RA kezelést követően**

Ahhoz, hogy meghatározhassuk a DON, T-2 és DT2 sejtréteg integritást destabilizáló hatását, valamint az RA sejtréteg integritást erősítő tulajdonságát, TER mérést alkalmaztunk 48 és 72 óráig (7. ábra).

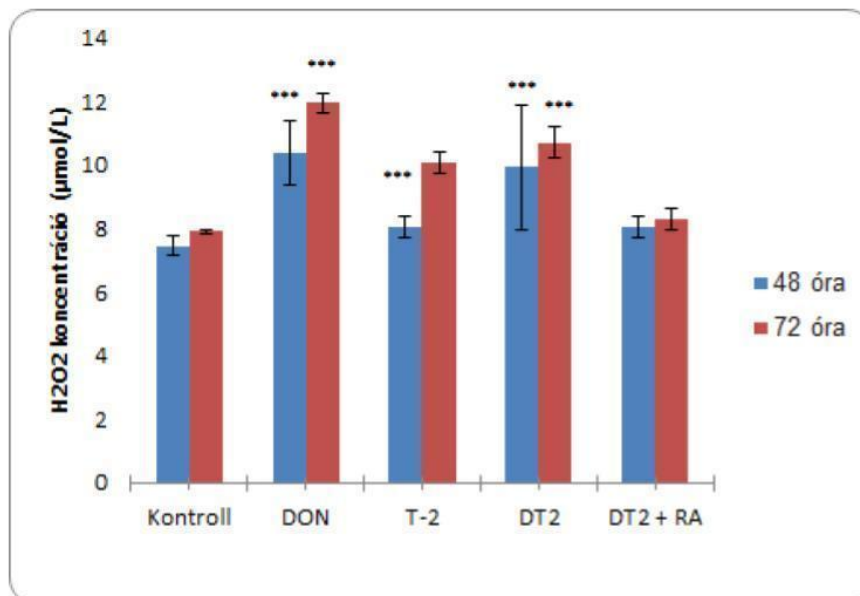


**7. ábra** Az IPEC-J2 sejtréteg transzepiteliális elektromos ellenállásának (TER) mérési eredményei. A sejteket 1  $\mu\text{mol/L}$  DON, 5  $\text{nmol/L}$  T-2-vel, DT2-vel (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5  $\text{nmol/L}$  T-2) és DT2 + RA-val (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5  $\text{nmol/L}$  T-2 + 50  $\mu\text{mol/L}$  RA-val (24 óra elő inkubáció) kezeltük 48 és 72 órán keresztül. A TER értékeket  $\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$ -ben fejeztük ki. \*\* $p < 0,01$  és \*\*\* $p < 0.001$  esetében a kontroll csoporthoz hasonlítottuk. A kapott TER adatokat átlagokban fejeztük ki  $\pm$  SD értékek ( $n=9$ ).

Nem változtatott a TER értékeken, ha 5  $\text{nmol/L}$  T-2-vel inkubáltuk a sejteket, azonban a 48 óráig tartó DON és DT2 kezelés jelentős TER csökkenéshez vezetett ( $p = 0.003$  és  $p < 0.001$ ). Azok az IPEC-J2 sejtek, amelyeket DT2 + 50  $\mu\text{mol/L}$  RA kombinációval kezeltünk, alacsonyabb TER értéket mutattak, mint a kontroll sejtek ( $p = 0.006$ ). A DT2 kezelést kapott sejtréteg TER értékeihez képest a DT2 + RA -val kezelt sejtréteg szignifikánsan magasabb TER értékkel rendelkezett ( $p < 0.001$ ).

### 5.3 A $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésben bekövetkező változások mikotoxin és RA kezelés hatására

Meghatározásra került az IPEC-J2 sejtek extracelluláris  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelése DON, T-2 toxin, DT2 és RA kezelést követően (8. ábra).



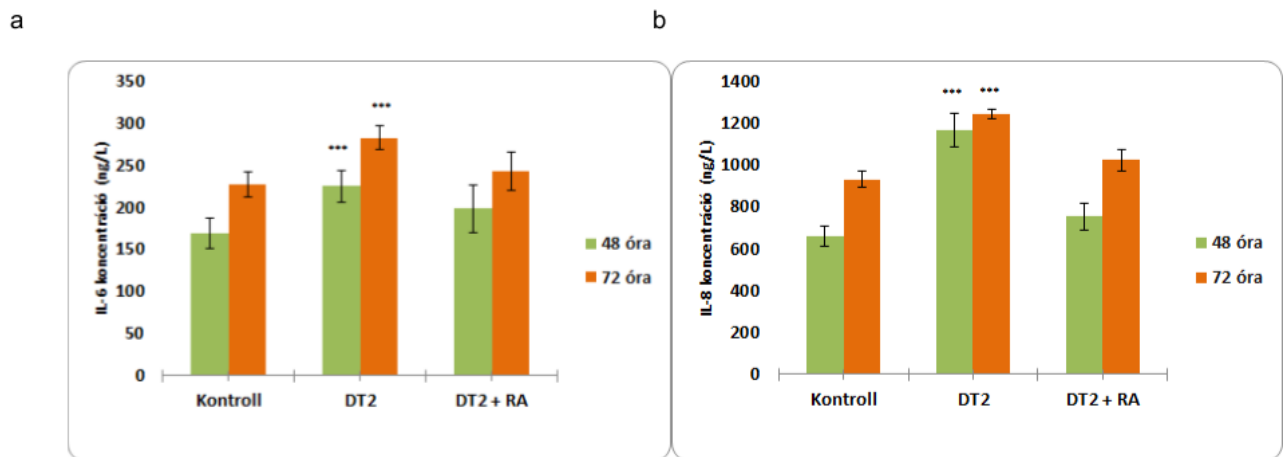
**8. ábra** Az IPEC-J2 sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésének változása 1 µmol/L DON-nal, 5 nmol/L T-2-vel, DT2-vel (1 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2) és DT2 + RA-val (1 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2 + 50 µmol/L RA (24 óra előkezelés) történő inkubálás után (48 és 72 óra). \*\*\*p < 0.001 a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az adatok átlagként ± SD értékek (n=8) lettek feltüntetve.

A sejtmentes felülúszókból mintát vettünk 48 és 72 órát követően. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy 48 óra inkubálást követően az 1 µmol/L DON és a DT2 kezelés szignifikánsan megemelte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést (p < 0.001). Szignifikáns változást mértünk abban az esetben is, amikor összehasonlítottuk a DT2 és a DT2 + RA kombináció által kiváltott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációkat (p < 0.001). A 24 órás előkezelés 50 µmol/L RA-val, jelentősen mérsékelte a DT2 által kiváltott oxidatív stresszt a sejteken (p < 0.001). A DT2 + RA kezelés által IPEC-J2 sejteken kiváltott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szint nem tért el számottevően a kontroll sejtekhez képest.

#### 5.4 Az IL-6 és IL-8 szint változása DT2 és RA kezelést követően

Az IL-6 koncentráció (9a ábra) megemelkedett a DT2 (p < 0.001) kezelést követően, amelyet a DT2 + RA jelentős mértékben gátolt 48 és 72 óra kezelési időknél. A kontroll csoport sejtei, valamint a DT2 + RA oldattal kezelt sejtek között nem volt szignifikáns eltérés az IL-6 szintekben (48 óra, p = 0.145 és 72 óra p = 0.711). Szintén számottevő emelkedést

mutatott az IL-8 szint (9b ábra) DT2 kombinációval kezelt IPEC-J2 sejteknél 48 és 72 óra inkubációs időt követően (mindkét esetben  $p < 0.001$ ).



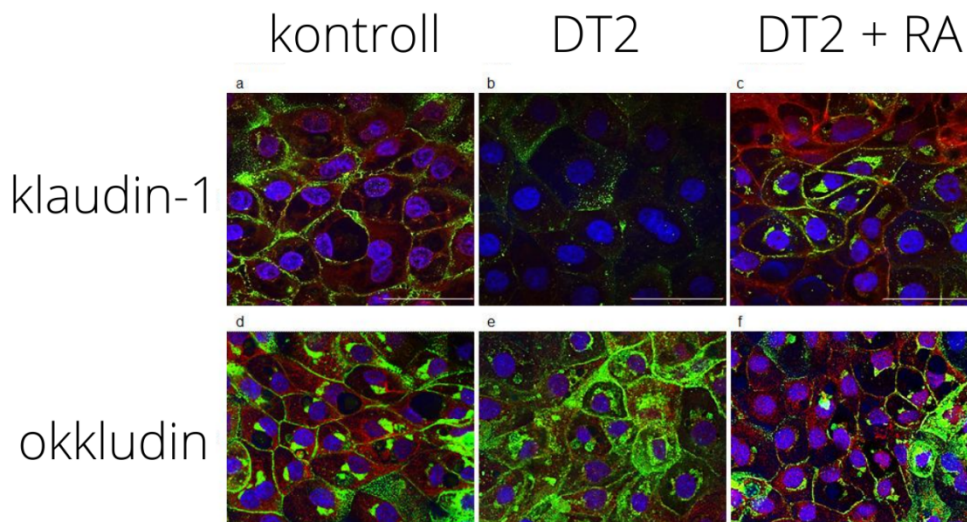
**9. ábra** Az IL-6 (a) és IL-8 (b) koncentrációinak változásainak mérése IPEC-J2 sejtekben. A citokin koncentráció (ng/L) speciális szendvics ELISA segítségével került megállapításra a sejtmentes felülűszóból. A sejteket DT2-vel (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5 nmol/L T-2) és DT2 + RA-val (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5 nmol/L T-2 + 50  $\mu\text{mol/L}$  RA (24 óra elő inkubáció) kezeltük 48 és 72 óra időtartamig. \*\*\* $p < 0,001$  kontroll csoporttal került összehasonlításra. Az adatok átlagként  $\pm$  SD (n=10) kerültek bemutatásra.

A DT2 mikotoxin kombináció mellett adott 50  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációjú RA normalizálni tudta a DT2 által indukált citokin koncentráció növekedését mind 48 és 72 órát követően ( $p < 0.001$ ). Azonban szignifikáns különbség nem mutatkozott a kontroll sejtek és az RA-val védett DT2-vel kezelt sejtek között az IL-8 koncentrációkban (48 óra  $p = 0.256$ , 72 óra  $p = 0.368$ ).

## 5.5 A klaudin-1 és okkludin eloszlásának vizsgálata IPEC-J2 sejtekben

A kontroll és a DT2-vel kezelt IPEC-J2 sejtekben immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk a klaudin-1 (10a-c ábra) és az okkludin (10d-f ábra) lokalizációját 72 óra kezelési elteltével. A kontroll sejtek esetében az okkludint a polarizált IPEC-J2 sejtek membránjában lokalizáltuk, majd a DT2 kezelés után az okkludin a sejtmembránban maradt (10d,e ábra). A klaudin-1 megoszlásában azonban számottevő eltérést állapítottunk meg abban az esetben,

amikor DT2-vel folyamatosan kezeltük a sejteket (10b ábra) a kontroll sejtekhez viszonyítva. Ez a változás magyarázhatja a megfigyelt TER érték csökkenését azoknál a sejteknél, amelyeket DT2-vel kezeltünk 72 órán keresztül. Azonban ha RA-t adtunk az IPEC-J2 sejtekhez a DT2 kezelés előtt már 24 órával is, akkor az okkludin és kladin-1 folytonos sejtmembránbeli expressziója fennmaradt a 72 órás kezelés végéig (10c, f ábra). A DT2 + RA kezelés (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5  $\text{nmol/L}$  T-2 + 50  $\mu\text{mol/L}$  RA) hatására nem változott a folyamatos okkludin és kladin-1 sejtmembránbeli mintázat hasonlóan a nem kezelt sejtekben való eloszlásukhoz.



**10. ábra** A DT2 és DT2 + RA (RA 24 óra előinkubálással) hatásai az okkludin és kladin-1 lokalizációjára. Differenciálódott IPEC-J2 sejteket apikálisan és bazolaterálisan is DT2-vel (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5  $\text{nmol/L}$  T-2) vagy DT2 + RA kombinációval (1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5  $\text{nmol/L}$  T-2 + 50  $\mu\text{mol/L}$  RA) kezeltük 72 óráig. A sejtekben megjelöltük az okkludint és a kladin-1-et (Alexa Fluor 546, vörös). A sejtmagok DAPI-val kerültek megfestésre (kék), illetve a sejtmembránt búzacsíra agglutininnal jelöltük (Alexa Fluor 488, zöld). A kontroll, valamint a DT2 + RA-val kezelt minták esetében az okkludin és a kladin-1 a sejtmembránban maradtak a búzacsíra agglutininhoz hasonlóan. A fehér mérték 50  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

## 6. Megbeszélés

Egy-egy mikotoxin nem önmagában található meg, hanem több különböző mikotoxin együttesen fordul elő gabona alapú élelmiszerekben és a takarmányban. A mikotoxinok hatását a bélhámsejtek integritására kombinációkban célszerű vizsgálni annak ellenére, hogy az eddigi tanulmányok többsége csak egy-egy kiválasztott mikotoxin hatására helyezi a hangsúlyt. *In vitro* kutatások bizonyították, hogy a különböző mikotoxinok kölcsönhatásba léphetnek egymással, amely jelenség különböző mértékben befolyásolhatja a sejtek életképességét (Smith és mtsai. 2016).

Kísérletekben a DON és T-2 toxin kombinációját teszteltük nem karcinogén IPEC-J2 sejteken azért, hogy meghatározzuk a mikotoxinok és azok kombinációinak a membrán integritásra kifejtett hatását. Eddig nagyon kevés *in vitro* tanulmány mérte fel két mikotoxin együttes hatását az élő bélhámsejtekre. Lei és mtsai (2017) szerint a DON és T-2 toxin kombináció oxidatív stresszt és apoptózist okozott a kondrociták, a hepatociták és a vesehám-sejttenyészetek esetében. Egy másik tanulmányban (Ruiz és mtsai. 2011), amelyben a DON és T-2 toxin hatását vizsgálták, azt állapították meg, hogy ezek a mikotoxinok egymás antagonistái kínai hörcsög petefészek sejtek (CHO-K1) és emlős vese hámsejtek esetében 24, 48 és 72 órás kezelést követően. DON és T-2 kombinációs kezelés, amelyet 14 napon keresztül végeztek fehérvérsejt progenitor és granulocita/monocita kolónia formáló sejteken (GM-CFU), erősebb sejt pusztulást váltott ki, mint a külön-külön alkalmazott mikotoxinok (Ficheux és mtsai. 2012). Additív tulajdonságot állapítottak meg a vérlemezke aggregáció gátlásában is, amikor sertés vérlemezke szuszpenziót kezeltek mikotoxin kombinációval (Gentry és mtsai. 1988).

A DON és a T-2 toxin *in vitro* toxikológiai hatásának feltérképezése sejt életképesség vizsgálattal végezhető el. Áramlási citometria módszerrel meghatározásra került az IPEC-J2 sejtek esetében a DON és a T-2 apoptikus és nekrotikus koncentrációja 72 óra inkubálást követően. Ezek alapján a sejtéletképesség 50%-os csökkenését, az IC50 értéket DON-nál 23.5  $\mu\text{mol/L}$ , T-2-nél pedig 20.4  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációnál állapították meg (Goossens és mtsai. 2012). A felbomlott lizoszómális aktivitáson alapuló Neutrál red és laktát-dehidrogenáz próba segítségével megállapították, hogy a DON 50  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban szignifikánsan csökkentette a differenciálódott IPEC-J2 sejtek életképességét 24 óra kezelést követően, míg ugyanezekkel a próbákkal 48 órás kezelést követően 33%-os mértékű



sejthalált határozták meg (Springler és mtsai. 2016). Egy korábbi tanulmány kitért arra is, hogy különbség van a differenciált és differenciálatlan sejtek DON érzékenysége között. A nem polarizált IPEC-J2 sejtek esetében a DON már alacsony 0.8-33.7  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban is szignifikánsan csökkenést eredményezett a sejtek életképességében 24 óra kezelést követően. Ezzel ellentétben, ebben a koncentráció tartományban a differenciált IPEC-J2 sejtek életben maradtak, azonban a TER értékük jelentősen csökkent (Vandenbroucke és mtsai. 2011). A T-2 mikotoxin esetében az IC50 értéket differenciálatlan IPEC-J2 sejtek esetében 12.2 nmol/L-ben, differenciált IPEC-J2 sejteknél 395.9 nmol/L-ben határozták meg (Verbrughe és mtsai. 2012). Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a DT2 1  $\mu\text{mol/L}$  DON + 5 nmol/L T-2 kombináció 72 óra kezelést követően nem volt szignifikáns hatással a differenciált IPEC-J2 sejtek életképességére. Ezzel ellentétben szignifikáns sejtpusztulást mértünk a DT2 kombinációs kezelést követően akkor, ha a DON koncentrációját 5  $\mu\text{mol/L}$ -re növeltük, vagy ha a T-2 koncentrációját 10 nmol/L-re emeltük meg.

Korábban már megfigyelték, hogy 72 óráig alkalmazott 3.4  $\mu\text{mol/L}$  DON és 21.4 nmol/L T-2 csökkentette a TER értékeket, illetve megnövelte a sejtrétegen át a doxiciklin és paromomicin átjárhatóságát (Goossens és mtsai. 2012). Szignifikáns TER csökkenést mértek IPEC-J2 sejtek esetében, ha DON-t 24 óráig 6.74  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban bazolaterálisan alkalmaztak (Diesing és mtsai. 2011). Ezt alátámasztja egy másik tanulmány (Springler és mtsai. 2016), amelyben szignifikáns mértékű TER érték csökkenéséről számoltak be 24 órás DON (5 - 20  $\mu\text{mol/L}$ ) kezelés után.

Ismert tény, hogy a T-2 mikotoxin szennyeződés kimaródásokat okoz a bélhámron, azonban az ennek háttérében lévő molekuláris mechanizmusokról kevés adat áll rendelkezésre. A T-2 toxin hatására a *Salmonella typhimurium* képes jelentős mértékben átjutni a bélbarrieren. Ezzel szemben nem csökkent a TER érték 24 óra inkubációt követően alacsony T-2 toxin koncentrációk mellett (1.6 - 10.5 nmol/L) (Akbari és mtsai. 2017).

Elsőként állapítottuk meg, hogy a DT2 mikotoxin kombináció 48 és 72 óra kezelési idő után az IPEC-J2 sejtrétegen a jelentős TER csökkenést eredményezett, amely csak részben volt mérsékelhető 50  $\mu\text{mol/L}$  RA hozzáadásával. Korábban megállapításra került, hogyha a sejteket a mikotoxinos kezelést megelőzően 200, 400 és 600  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációjú RA-val előkezelték 18 óra időtartamig, akkor az RA erősíteni tudja az IPEC-J2 sejtek

integritását a peroxid terhelés után (Vergauwen és mtsai. 2016). Ez összhangban van az általunk kapott adatokkal, amelyekből az a következtetés vonható le, hogy az RA kulcsszerepet játszhat az IPEC-J2 sejtek integritásának fenntartásában a DT2 mikotoxin kombinációs kezelés során.

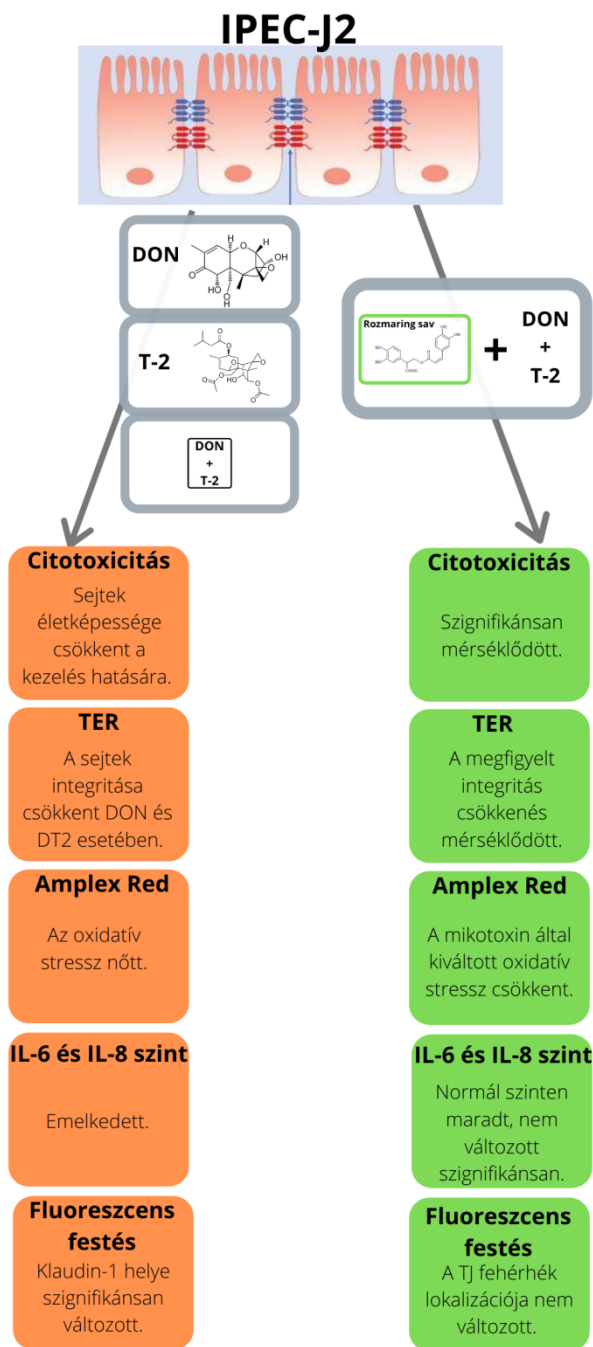
A hámsejtek részt vesznek a káros hatásokkal szembeni citokin túltermelés szabályozásában (Kishimoto és mtsai. 1992; Sallusto és Baggiolini 2008). DON esetében 48 óráig tartó, 0.5 és 2  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációjú kezelést követően megállapították, hogy az megnövelte az IL-6 és IL-8 szintet a kezelt IPEC-J2 sejtek esetében (Wan és mtsai. 2013). Jelenleg kevésbé adat áll rendelkezésre még a T-2 toxin citokin szintekre kifejtett hatásáról. Szakirodalmi adatok szerint 20 órás kezelési időt követően, a 4.3 -275  $\text{nmol/L}$  koncentrációban alkalmazott T-2 toxin megnöveli az IL-8 szintet Caco-2 sejtvonal esetében (Kruber és mtsai. 2011). Kísérleti eredményeink szerint bizonyítást nyert, hogy a DT2-vel 48 és 72 óráig inkubált IPEC-J2 sejtek esetében IL-6 és IL-8 mennyiség jelentős mértékben megemelkedett. Ezt a növekedés mérséklődött, ha az IPEC-J2 sejteket 24 óra 50  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációjú RA oldattal történő előkezelésnek vetettük alá.

A DON és T-2 toxin hatása az oxidatív stressz terhelés növelésén alapul, így a növényi eredetű antioxidáns RA használata csökkentheti fuzariotoxikózis által kiváltott káros hatásokat. A RA antioxidáns hatását *in vitro* és *in situ* tanulmányok már bizonyították. Különböző koncentrációjú RA-val (200, 400 és 600  $\mu\text{mol/L}$ ) való kísérletek során az került megállapításra, hogy RA magasabb koncentrációkban képes szignifikánsan csökkenteni az intracelluláris ROS-t. Kísérleteink során bizonyítani tudtuk, hogy a DT2 kezelést megelőző 50  $\mu\text{mol/L}$  RA-val való preinkubálás szignifikánsan mérsékelte az DT2 által kiváltott extracelluláris  $\text{H}_2\text{O}_2$  túltermelődést IPEC-J2 sejtek esetén.

Korábbi tanulmányok során felmérték a fuzárium toxinok TJ struktúrák fehérje elemeinek expressziójára és lokalizációjára kifejtett hatását. A kontroll IPEC-J2 sejtek homogén és intenzív okkludin és klaudin-1 membránfehérje pozitivitást mutattak. 72 óra időtartamú 20  $\mu\text{mol/L}$  DON kezelést követően az okkludin és klaudin-4 fehérjék esetében nem volt szignifikáns eltérés a kontroll IPEC-J2 sejtekhez viszonyítva, ezzel szemben a klaudin-1 és klaudin-3 esetében szignifikáns csökkenés volt mérhető. Ezzel ellentétben egy másik tanulmány (Gu és mtsai. 2016) szerint már 48 óra elteltével és alacsonyabb DON koncentráció mellett is (6.7  $\mu\text{mol/L}$ ) csökkent az okkludin expressziója. Azonban eddig nem

állt rendelkezésre olyan tanulmány, amely a DT2 kombináció által kifejtett hatásokat vizsgálta volna az IPEC-J2 sejtekben az okkludin és klaudin-1 megoszlási mintázatára. Az immunfluoreszcens vizsgálatok után azt láttuk, hogy a 72 órás DT2 kezelést követően az okkludin lokalizációja nem változott, azonban a klaudin-1 fehérje jelenléte mérséklődött sejtmembránban. A rétegintegritás kialakításában az okkludin főszerepet játszik, azonban más fehérjék is szerepet kaphatnak a sejtkapcsoló struktúrák megfelelő kialakításban (Suzuki 2013). Így azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a DT2 kezelést követő TER érték csökkenése összefüggésben lehet a klaudin-1 relokalizációjának mértékével, mivel a változás nem magyarázható az okkludin újrendeződésével. Megállapítottuk továbbá, hogy az RA kezelés elősegítette a klaudin-1 jelenlétét a sejtmembránban IPEC-J2 sejtekben a DT2 kezelést követően.

Összefoglalásként kijelenthetjük, hogy a DT2 mikotoxin kombináció nem citotoxikus koncentrációban jelentős mértékben csökkenteni tudta az IPEC-J2 sejtréteg integritását, valamint megnövelte az IL-6 és IL-8 gyulladáscitokin szinteket. Ezeket a káros hatásokat, mint a DT2 által kiváltott oxidatív stresszt mérsékelni lehetett, ha a sejteket 24 óráig RA-val előkezeltük. Mindemellett bizonyítást nyert, hogy a DT2 mikotoxinnal előidézett szoros sejtkapcsoló struktúra változása, a klaudin-1 relokalizációja RA-val visszafordítható. Végezetül az *in vitro* kísérletekből kiindulva megerősítést nyert, hogy a RA gyulladásgátló, antioxidáns, valamint barrier erősítő szereppel bír, ami segíthet a DT2 mikotoxinok által előidézett bélhámkárosító hatások mérséklésében (11. ábra).



**11. ábra** Az RA jótékony hatásainak sematikus ábrája a DON, T-2 és a kombinatív kezelés által okozott *in vitro* bélhámkárosodásra. Az RA sikeresen csökkentette az IPEC-J2 sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> túltermelődését, mérsékelte a gyulladásos citokinek expresszióját és megakadályozta a klaudin-1 fehérje átrendeződését.

## 7. Összefoglalás

A globális éghajlatváltozás miatt a gabona betakarítása nem megfelelő időben történik, így megnő az esélye a szántóföldi és raktár penészgombák megtelepedésének. A *Fusarium* penészgombákkal fertőzött gabona alapú takarmánnyal etetett sertések fejlődése, súlygyarapodása visszaesik, szaporodásbiológiai és állategészségügyi paramétereik jelentősen romlanak. A fuzárium toxinok másodlagos anyagcsere termékek, amelyek többek között gyomor- bélrendszeri károsodásokat idézhetnek elő.

Tanulmányunkban a fuzárium toxinok közül a deoxinivalenol (DON), a T-2 és ezek kombinációjának sejtszintű hatásait vizsgáltuk, mivel ezek a toxinok kifejezett gazdasági károkat okoznak, többek közt a gazdasági állatokban takarmány visszautasítást idéznek elő, így csökkentve az állatok növekedési erélyét, termelését.

Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy hogyan befolyásolja a sertés vékonybél eredetű IPEC-J2 sejtek életképességét, a gyulladásos citokinek szintjét, a sejtek redox állapotát és a bélbarrier épségét a fuzárium toxinokkal való kezelés és hogyan tudja a káros hatásokat mérsékelni az antioxidáns tulajdonsággal rendelkező rozmaringsav (RA). A sejtleletképességben bekövetkező változások nyomon követésére Neutral red mérési módszert alkalmaztunk. A sejtréteg-integritás meghatározásához TER mérést használtunk, valamint a szoros sejtkapcsoló struktúra fehérjéi közül a klaudin-1 és okkludin lokalizációját vizsgáltuk a kezelést megelőzően és a kezelés után immunfluoreszcens festéssel. Az extracelluláris H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szintet Amplex Red eljárással mértük. Az IL-6 és IL-8 gyulladásos citokin koncentrációit ELISA eljárással állapítottuk meg.

Megállapítást nyert, hogy a DON és T-2 kombinatív kezelés (DT2: 1 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2) 48 és 72 órán át csökkentette a sejtréteg TER értékét, és ezt a káros hatást 50 µmol/L RA alkalmazásával mérsékelni lehetett. Eredményeink szerint a DT2 48 és 72 órás kezelés az oxidatív stressz mértékét növelte és emelte az IL-6 és IL-8 szinteket, amely változásokat 50 µmol/L RA szignifikáns mértékben csökkentett. DT2 alkalmazás a klaudin-1 átrendeződését okozta, azonban az okkludin membránon belüli megoszlása nem változott meg a kombinált mikotoxin kezelés hatására.

*In vitro* eredményeink alapján előjelezhető, hogy a takarmány RA-val való kiegészítése a sertésállomány mikotoxinnal szennyezett kukorica alapú etetése során várható

bélrendszeri károsító hatásokat hatékonyan képes mérsékelni a bélbarrier integritás megtartásának köszönhetően.

## 8. Summary

Large-scale, intensive animal husbandry has a significant demand for grain. Due to global climate change, cereals cannot be harvested at the right time, increasing the chances of field and warehouse mold settling. Fusariotoxins are products of secondary metabolism in *Fusarium* species that have a detrimental effect on the gastrointestinal tract of the swine on contaminated corn-based feed leading to the development of retarded growth, weight loss, fertility problems and lowered productivity.

In our study, we investigated the cellular effects of deoxynivalenol (DON), T-2 and their combination among the fusarium toxins, as these toxins cause pronounced economic damage, as they cause feed rejection in farm animals, thus reducing the productivity of the animals. These mycotoxins generate excessive oxidative stress, which weakens the intestinal barrier integrity in swine.

In our experiments, we sought to answer how treatment with fusariotoxins affects the viability of porcine small intestinal IPEC-J2 cells, and which changes in the levels of inflammatory cytokines, in cell redox status and in intestinal barrier integrity can be detected, and how rosmarinic acid (RA) with antioxidant properties can alleviate these harmful effects.

The Neutral red measurement method was used to monitor changes in cell viability. Transepithelial resistance (TER) measurement was used to determine cell layer integrity, and the localization of claudin-1 and occludin in the tight junction was examined before and after treatment. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were measured by the Amplex Red method. Inflammatory cytokine concentrations of interleukin (IL) -6 and IL-8 were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

It was ascertained that simultaneous treatment of DON and T-2 (DT2: 1 µmol/L DON + 5 nmol/L T-2) for 48 h and 72 h reduced TER of the cell monolayer, which was restored by 50 µmol/L RA application. It was also found that DT2 for 48 and 72 h could induce oxidative stress and elevate IL-8 levels significantly, which was alleviated by administration of RA. DT2 administration contributed to redistribution of claudin-1 and triggered its loss from cell

membrane; however, occludin membranous localization was not altered by combined mycotoxin treatment.

Based on our results, it can be predicted that in the case of confirmatory data from *in vivo* future experiments, supplementing the feed with RA can effectively reduce and compensate for the toxic intestinal effects in swine during the feeding of mycotoxin-contaminated grain.

## 9. Irodalomjegyzék

Akbari P, Braber S, Varasteh S, Alizadeh A, Garssen J, Fink-Gremmels J (2017) The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch. Toxicol.* 91(3): 1007–1029.

Bin-Umer M A, McLaughlin J E, Butterly M S, McCormick S, Tumer N E (2014) Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(32): 11798–11803.

Bittner Fialová S, Kello M, Čoma M, Slobodníková L, Drobná E, Holková I, Lukáč M (2019) Derivatization of rosmarinic acid enhances its *in vitro* antitumor, antimicrobial and antiprotozoal properties. *Molecules* 24(6): 1078.

Cano P M, Seeboth J, Meurens F, Cognie J, Abrami R, Oswald I P, Guzylack-Piriou L (2013) Deoxynivalenol as a new factor in the persistence of intestinal inflammatory diseases: An emerging hypothesis through possible modulation of Th17-mediated response. *PLoS ONE* 8(1): e53647.

Chaytor A C, Hansen J A, van Heugten E, See M T, Kim S W (2011) Occurrence and decontamination of mycotoxins in swine feed. *Asian Austral. J. Anim.* 24: 723–738.

Cortyl M (2008) Mycotoxins in animal nutrition-problems and solutions. <http://www.aquafeed.com/docs/fiaap2008/Cortyl.pdf>.

Dänicke S, Matthes S (2003) Effects of graded levels of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters. *Br. Poult. Sci.* 44: 113–126.

Diekman M A, Green M L (1992) Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1615–1627.

Diesing A K, Nossol C, Dänicke S, Walk N, Post A, Kahlert S, Rothkötter H J, Kluess J (2011) Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. PLoS ONE 6(2): e17472.

FAO (1998) Animal feeding and food safety: FAO food and nutrition paper 69. Rome Italy

Ficheux A S, Sibiril Y, Parent-Massin D (2012) Co-exposure of *Fusarium* mycotoxins: *in vitro* myelotoxicity assessment on human hematopoietic progenitors. Toxicon 60: 1171–1179.

Gajecka M, Stopa E, Tarasiuk M, Zielonka Ł, Gajecki M (2013) The expression of type-1 and type-2 nitric oxide synthase in selected tissues of the gastrointestinal tract during mixed mycotoxicosis. Toxins 5: 2281–2292.

Geens M M, Niewold T A (2011) Optimizing culture conditions of a porcine epithelial cell line IPEC-J2 through a histological and physiological characterization. Cytotechnology 63(4): 415–423.

Gentry P A, Bondy G S, Ross M L (1988) Comparison of the inhibition of deoxynivalenol and T-2 toxin on bovine and porcine platelet function. Mycotoxin Res. 4(1): 25–32.

Goosens J, Pasmans F, Verbrugghe E, Vandenbroucke V, De Baere S, Meyer E, Haesebrouck F, De Backer P, Croubels S (2012) Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin. BMC Vet. Res. 8: 245.

Gu M J, Song S K, Lee I K, Ko S, Han S E, Bae S, Ji S Y, Park B C, Song K D, Lee H K, Han S H, Yun C H (2016) Barrier protection via Toll-like receptor 2 signaling in porcine intestinal epithelial cells damaged by deoxynivalenol. Vet. Res. 47: 25.

Guo W, Gu X, Tong Y, Wang X, Wu J, Chang C (2019) Protective effects of mannan/β-glucans from yeast cell wall on the deoxynivalenol-induced oxidative stress and autophagy in IPEC-J2 cells. Int. J. Biol. Macromol. 135: 619-629.

Hossan M S, Rahman S, Bashar A B M A, Jahan R, Al-Nahai A, Rahmatullah M (2014) Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. World J. Pharm. Pharm. Sci. 3: 57–70.

Iheshiulor O M M, Esonu B O, Chuwuka O K, Omede A A, Okoli I C, Ogbuewu I P (2011) Effects of mycotoxins in animal nutrition: A review. Asian J. Anim. Sci. 5: 19-33.

Kang R, Li R, Dai P, Li Z, Li Y, Li C (2019) Deoxynivalenol induced apoptosis and inflammation of IPEC-J2 cells by promoting ROS production. Environ. Pollut. 251: 689–698.



Kishimoto T, Akira S, Taga T (1992) Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258(5082): 593–597.

Kluess J W, Kahlert S, Kröber A, Diesing A K, Rothkötter H J, Wimmers K, Dänicke S (2015) Deoxynivalenol, but not *E. coli* lipopolysaccharide, changes the response pattern of intestinal porcine epithelial cells (IPEC-J2) according to its route of application. *Toxicol. Lett.* 239(3): 161–171.

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 (1-3): 34–41.

Kumar M, Kumar V, Roy D, Kushwaha R, Vaswani S, (2014) Application of herbal feed additives in animal nutrition - A review. *Int. J. . Lives. Res.* 4(9): 1-8.

Lammi M J (2017) Cellular responses to T-2 toxin and/or deoxynivalenol that induce cartilage damage are not specific to chondrocytes. *Sci. Rep.* 2231.

Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H (2015) The impact of food bioactives on health. Cham, Springer International Publishing 103–111.

Lei Y, Guanghui Z, Xi W, Yingting W, Xialu L, Fangfang Y, Goldring M B, Xiong G, Lin W Y, Yu Y J, Jinn T R (2019) Evaluation of the virucidal effects of rosmarinic acid against enterovirus 71 infection via *in vitro* and *in vivo* study. *Virology* 16(1).

Liu J, Wang L, Guo X, Pang Q, Wu S, Wu C, Bai Y (2014) The role of mitochondria in T-2 toxin-induced human chondrocytes apoptosis. *PLoS ONE*, 9(9): e108394.

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S C (2017) NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Sig. Transduct. Target Ther.* 2: 17023

Liu Y, Chang J, Wang P, Yin Q Q, Huang W W, Liu C Q, Bai X X, Zhu Q, Gao T Z, Zhou P (2019) Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on alleviating cytotoxicity of porcine jejunal epithelia cells induced by deoxynivalenol. *AMB Expr.* 9: 137

Lucioli J, Pinton P, Callu P, Laffitte J, Grosjean F, Kolf-Clauw M, Bracarense A P F R L (2013) The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: Interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. *Toxicol.* 66: 31–36.

Omotayo O P, Omotayo A O, Mwanza M, Babalola O O (2019) Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicol. Res.* 35(1): 1–7.

Osweiler G D (2006) Occurrence of mycotoxins in grains and feeds. In: Straw B, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor D Diseases of Swine. 9th ed. Blackwell Publishing. Iowa 915–929.

Pandya J P, Arade P C (2016) Mycotoxin: a devil of human, animal and crop health. *Adv. Lif. Sci.* 5: 3937–3941.

Pásztí-Gere E, Csibrik-Németh E, Szeker K, Csizinszky R, Jakab C, Gálfi P (2012) Acute oxidative stress affects IL-8 and TNF- $\alpha$  expression in IPEC-J2 porcine epithelial cells *Inflammation* 35(3): 994-1004.

Pásztí-Gere E, Matis G, Farkas O, Kulcsar A, Palocz O, Csiko Gy, Neogrady Zs, Galfi P (2014) The effects of intestinal LPS exposure on inflammatory responses in a porcine enterohepatic co-culture system *Inflammation* 37(1): 247-260.

Petersen M (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62(2): 121–125.

Pinton P, Nougayrède J P, Del Rio J C, Moreno C, Marin D E, Ferrier L, Bracarense A P, Kolf-Clauw M, Oswald I P (2009) The food contaminant deoxynivalenol decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237(1): 41–48.

Pomothy J M, Barna R F, Szóládi Á, Pásztiné G E (2020a) The beneficial effects of rosmarinic acid on a non-tumorigenic epithelial cell line GRADUS 7(1): 79-83.

Pomothy J M, Barna R F, Czimmermann Á, Szóládi Á, Pásztiné G E (2020b) A deoxynivalenol mikotoxin toxikus hatásai a gazdasági haszonállatokra *Magy. Allatorvosok Lapja* 142: 117-127.

Prelusky D B, Rotter B A, Rotter R G (1994) Toxicology of mycotoxins. In: Miller J D, Trenholm H L *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*. Eagan Press. St. Paul 359–403.

Repetto G, del Peso A, Zurita J L (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3(7): 1125–1131.

Ruiz M J, Franzova P, Juan-García A, Font G (2011) Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells *in vitro*. *Toxicon* 58: 315–326.

Sallusto F, Baggiolini M (2008) Chemokines and leukocyte traffic. *Nat. Immunol.* 9(9): 949–952.

Smith T K, McMillan E G, Castillo J B (1997) Effect of feeding blends of fusarium mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *J. Anim. Sci.* 75: 2184–2191.

Smith, T K, Az-Llano G (2009) A review of the effect of feed-borne mycotoxins on pig health and reproduction. In: Aland A, Madec F, Sustainable animal production – the challenges and potential developments for professional farming. Wageningen academic Publishers. Wageningen 261–272.

Smith M C, Madec S, Coton E, Hymery N (2016) Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects. *Toxins (Basel)* 8(4): 94.

Springler A, Vrabel G J, Mayer E, Schatzmayr G, Novak B (2016) Effect of *Fusarium*-derived metabolites on the barrier integrity of differentiated intestinal porcine epithelial cells (IPEC-J2). *Toxins (Basel)* 8(11): E345.

Suzuki T (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70(4): 631–659.

Tiemann U, Dänicke S (2007) *In vivo* and *in vitro* effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit. Contam. A.* 24: 306–314.

Van De Walle J, Romier B, Larondelle Y, Schneider Y J (2008) Influence of deoxynivalenol on NF- $\kappa$ B activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* 177(3): 205–214.

Vandenbroucke V, Croubels S, Martel A, Verbrugghe E, Goossens J, Van Deun K, Boyen F, Thompson A, Shearer N, De Backer P, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) The mycotoxin deoxynivalenol potentiates intestinal inflammation by *Salmonella typhimurium* in porcine ileal loops. *PLoS ONE* 6(8): e23871.

Verbrugghe E, Vandenbroucke V, Dhaenens M, Shearer N, Goossens J, De Saeger S, Eeckhout M, D'Herde K, Thompson A, Deforce D, Boyen F, Leyman B, Van Parys A, De Backer P, Haesebrouck F, Croubels S, Pasmans F (2012) T-2 toxin induced *Salmonella typhimurium* intoxication results in decreased *Salmonella* numbers in the cecum contents of pigs despite marked effects on *Salmonella*-host cell interactions. *Vet. Res.* 43: 22.

- Vergauwen H, Prims S, Degroote J, Wang W, Casteleyn C, van Cruchten S, de Smet S, Michiels J, van Ginneken C (2016) *In vitro* investigation of six antioxidants for pig diets. *Antioxidants (Basel)* 5(4): E41.
- Wan L Y, Turner P C, El-Nezami H (2013) Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* 57: 276–283.
- Wang X, Liu Q, Ihsan A, Huang L, Dai M, Hao H, Yuan Z (2012) JAK/STAT pathway plays a critical role in the proinflammatory gene expression and apoptosis of RAW264.7 Cells induced by trichothecenes as DON and T-2 toxin. *Toxicol. Sci.* 127(2): 412–424.
- Wild C P, Gong Y Y (2010) Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31: 71–82.
- Zhou H R, Jia Q, Pestka J J (2005) Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the src family kinase Hck. *Toxicol. Sci.* 85(2): 916–926.
- Zimmerman J J, Karriker L A, Ramirez A, Schwartz K J, Stevenson G W *Diseases of swine* 10th edition Section VI. 69. Mycotoxins in grains and Feeds 2012. by John Wiley & Sons Inc. 938-953.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Pásztiné Gere Erzsébetnek, aki irányt mutatott a legnehezebb időszakokban is, türelemmel, kitartással és rengeteg motivációval segítette szakmai munkámat. Köszönöm Pomothy Juditnak, hogy segített abban, hogy megismerkedjek a kutató élet minden részletével. Köszönöm Dr. Barna Réka Fanninak a labormunkában való segítségét. Köszönöm Tóth Adrienn Grétának, hogy hasznos tanácsokkal látott el. Továbbá köszönöm Dr. Jerzsele Ákos Tanszékvezető Úrnak, hogy támogatta az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken végzett kísérleteket.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg: A támogatási szerződés száma: EFOP-3.6.1-16-2016-00024 (projekt címe: Intelligens szakosodást szolgáló fejlesztések az Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer tudományi Karának együttműködésében), valamint az EFOP-3.6.2-16-2017-00012 (projekt címe: Funkcionális, egészséges és biztonságos élelmiszer termékpálya modell kidolgozása a szántóföldtől az asztalig elv alapján, tematikus kutatási hálózatban) illetve az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 (projekt címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával).

A kutatási témát a 115685 és a 124522 számú OTKA pályázat támogatta és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj keretében készült.

A TDK munka az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



## Témavezetői hozzájárulás

Alulírott, Pásztiné Dr. Gere Erzsébet hozzájárulok, hogy Szóládi Áron „A rozmaringsav kedvező hatásának vizsgálata deoxinivalenol és T-2 mikotoxin mérgezés esetében IPEC-J2 sejteken” című TDK munkáját benyújthassa és azt a TDK konferencián bemutathassa.

Pásztiné Dr. Gere Erzsébet

Budapest, 2020. 09. 29.

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: Szoladi Áron  
Elérhetőség (e-mail cím): szoladi.aron@gmail.com  
A feltöltendő mű címe: A rozmaringosav baktério hatásának vizsgálata clostridiaknál és T-2 mikotoksin mérgezés esetében IPEC-72 esetében  
A mű megjelenési adatai: 2020  
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 másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, 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 anyagrészt 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 címekre) 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 visszaélné.

Budapest, 2010 év ...11.....hó ...16.....nap

aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A HuVetAMagyar 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, szolgálta, 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.*