



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**Nagy jelentőséggel bíró mikotoxinok DNS-re és a károsodást javító
enzimrendszer egyes génjeinek expressziójára gyakorolt hatásának
vizsgálata tyúk és ponty fajokban**

DOI: 10.54598/002170

Szabó Rubina Tünde

Gödöllő

2022

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztési tudományok

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezetők: Dr. Kovács-Weber Mária
egyetemi docens, Ph.D.
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Állattenyésztési Tudományok Intézet, Állattenyésztés-technológiai és Állatjóléti Tanszék

Dr. Kovács Balázs
tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Molekuláris Ökológia Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

	1
TARTALOMJEGYZÉK	3
JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	8
1.1. CÉLKITŰZÉSEK	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. Mikotoxinok jelentősége	10
2.1.1. T-2, HT-2 és DON mikotoxinok	10
2.1.2. Aflatoxin és szterigmatocisztin	14
2.2. DNS károsodás és annak összefüggései	20
2.3. DNS javító mechanizmusok	23
2.4. Vizsgálatban részt vevő DNS javító gének	26
2.4.1. OGG1	26
2.4.2. HSP70	27
2.4.3. p53	28
2.4.4. GADD45 α	29
2.4.5. BRCA2	30
2.4.6. MSH6	31
2.4.7. RAD51	32
2.4.8. REV1	33
2.4.9. XPA	34
2.5. DNS károsodás kimutatására alkalmas módszerek	34
2.5.1. A comet assay	36
2.5.2. A LORD-Q PCR technika	38
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	41
3.1. Az elvégzett vizsgálatok összefüggései	41
3.2. Tyúk fajban végzett kísérletek elrendezése a comet assay vizsgálat során	42
3.2.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése	42
3.2.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma	42
3.2.3. Kísérleti állatok és tartásuk	42
3.2.4. Mintavételezés	42
3.2.5. Comet-assay vizsgálat	43
3.2.5.1. A comet-assay elvégzéséhez szükséges oldatok elkészítése	43
3.2.5.2. Tárgylemezek elkészítése	43

3.2.5.3. Comet assay eredményeinek kiértékelése	43
3.3. Ponty fajban végzett kísérletek elrendezése a LORD-Q PCR vizsgálat során	44
3.3.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése	44
3.3.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma	44
3.3.3. Kísérleti állatok és tartásuk	44
3.3.4. Mintavételezés	45
3.4. Ponty fajban végzett kísérletek elrendezése a génexpressziós vizsgálat során	45
3.4.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése	45
3.4.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma	45
3.4.3. Kísérleti állatok és tartásuk	46
3.4.4. Mintavétel	46
3.5. Tyúk fajban végzett kísérletek elrendezése a LORD-Q PCR + génexpressziós vizsgálat során	46
3.5.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése	46
3.5.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma	47
3.5.3. Kísérleti állatok és tartásuk	47
3.5.4. Mintavételezés	47
3.6. Génexpressziós vizsgálatok	48
3.6.1. RNS tisztítás, cDNS írás	48
3.6.2. Kvantitatív real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálat és kiértékelés	48
3.7. LORD-Q PCR vizsgálatok	49
3.7.1. DNS izolálása	49
3.7.2. LORD-Q PCR	50
3.7.3. Kiértékelés	50
3.8. Tyúk fajban végzett vizsgálatok - szövettani metszetek elkészítése, értékelése	51
3.9. Statisztikai kiértékelés	51
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	52
4.1. Comet assay eredmények – tyúk fajban végzett kísérlet	52
4.2. Ponty LORD-Q PCR eredmények	54
4.3. Ponty génexpressziós eredmények	56
4.4. Tyúk fajban végzett vizsgálatok LORD-Q PCR eredményei	64
4.5. Tyúk fajban végzett génexpresszió eredmények	66
4.6. Tyúk faj szövettani eredményei	76
5. KÖVETKEZTETÉS ÉS JAVASLATOK	81
5.1. Comet assay vizsgálat – tyúk fajban végzett kísérlet	81
5.2. Ponty LORD-Q PCR vizsgálat	82
5.3. Ponty génexpressziós vizsgálat	83
5.3.1. OGG1	83
5.3.2. HSP70	83

5.3.3. p53	83
5.3.4. GADD45 α	84
5.4. Tyúk fajban végzett LORD-Q PCR vizsgálatok	84
5.5. Tyúk fajban végzett génexpressziós vizsgálatok	85
5.5.1. RAD51	85
5.5.2. REV1	85
5.5.3. BRCA2	85
5.5.4. MSH6	86
5.5.5. GADD45 α	86
5.5.6. XPA	86
5.6 Tyúk szövettani eredmények	86
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	88
7. ÖSSZEFOGLALÁS	89
8. SUMMARY	91
9. MELLÉKLETEK	93
9.1. M1: Irodalomjegyzék	93
10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	112

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5mC	5-hidroximetil-2-deoxicitozin
8-OH-Ade	8-hidroxiadenin
8-OH-Gua	8-hidroxi guanin
8-oxoG	8-oxoguanin
AFB1	aflatoxin B1
AIF	apoptózis indukáló faktor
AP	apurin-apirimidin
AST	aszpartát aminoszferáz
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BER	bázis-kivágó javítás
BRCA2	breast cancer susceptibility gene 2
Cyt gly	cisztein glicin
CAT	kataláz
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxiribonukleinsav
DOM-1	deepoxi-DON
DON	deoxinivalenol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EF1 α	elongation factor 1-alpha
FapyAde	4,6-diamino-5-formamidopirimidin
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidin
FOXO3A	forkhead transcription factor
GADD45 α	growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha
GADPH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
Gh	5-guanidinohidantoin
GPx	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	glutation
GST	glutation-S-transzferáz
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HSP70	heat-shock protein 70-hősokk fehérje 70
IARC	Nemzetközi Rákkutató Ügynökség/International Agency for Research on Cancer
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
ARE	antioxidant response element
LD50	letális dózis 50
LC50	letális koncentráció 50
LORD-Q PCR	long-run DNA-damage quantification polymerase chain reaction
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malondialdehyd
MMR	mismatch javítás, a nem megfelelően illeszkedő bázispárokat javítása
MSH6	mutS homolog 6
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NER	nukleotid kivágó javítás
NI	5-nitro-guanidinohidantoin
NO	nitrogén-oxidok
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OGG1	8-hidroxi guanin DNS glikoziláz
OTM	Olive tail moment
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
RNS	ribonukleinsav
RNS	reaktív nitrogén gyökök
ROS	reaktív oxigén gyökök
rtPCR	real time polymerase chain reaction-valós idejű polimeráz lánreakció
Sp	spiroiminodihidantoin
SOD	szuperoxid-dizmutáz
STE	szterigmatocisztin
TAS	totál antioxidáns státusz
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances-tiobarbitursav-reaktív-anyag
TM	tail moment, a comet csóva erőssége/intenzitása
UB	ubiquitin

1. BEVEZETÉS

A mikotoxinok, mint a mikroszkopikus penészgombák másodlagos anyagcseretermékei a mindennapi szántóföldi munka, takarmányozás és élelmezés színterén jelen vannak, ezzel adva számos feladatot a szakembereknek. Nagyszámú információ érhető el hatásaikról, melyek gazdasági állatok esetében a teljesítmény romlásával, különféle nem specifikus tünetek kialakításával hozható összefüggésbe. Emellett a legtöbb esetben a mikotoxinok rendelkeznek sejt és szövet szinten is specifikus károsító tulajdonsággal. Egyik gyakori hatás a lipidperoxidáció, az oxidatív stressz kialakítása és az antioxidáns védekező rendszer gátlása, mely igen jellemző a trichotecénaváz mikotoxinokra (DON, T-2), illetve az aflatoxinra egyaránt. A kialakuló oxidatív stressz egyik ártalmas hatását a DNS szintjén is tapasztalhatjuk, ám ezek kapcsoltságára, együttes vizsgálatára még igen kevés kísérlet irányult (Zhang et al. 2009, Awad et al. 2012). Ezért is lényeges a mikotoxinok hatásának vizsgálatát kiterjeszteni a DNS-re is.

A DNS az élet építő egysége, az élet fenntartásának alapja, a biológiai funkciók kialakításához nélkülözhetetlen. Bármilyen módosítása, módosulása az élet folytonosságának megakadásához, a genetikai információ megváltozásához vezethet. A DNS minden aegysége szenvedhet károsodást, képződhetnek többek között léziók, különböző típusú törések. Ennek következtében pedig számos negatív hatás mehet végbe, a DNS replikációjának megállításától a sejt haláláig vagy daganatos elváltozások elindításáig (Jena 2012). A DNS károsodását okozhatják belső elváltozások, mint az öregedés, illetve külső behatások, mint xenobiotikumok, kemoterápiás szerek vagy a takarmányból, élelmiszerekből felvehető mikotoxinok is (Dizdaroglu 2012). A káros hatások kimutatására, a károsodás mértékének megállapítására, a potenciálisan DNS károsító ágensek szűrésére, vizsgálatára mindezen okokból szükség van, amit a folyamatosan fejlődő vizsgálati módszerek támogatnak. Fontos szem előtt tartani, hogy a vizsgálati módszernek minél inkább objektívnek, hatékonynak és reprodukálhatónak kell lennie. Genotoxikus anyagok vizsgálata során általánosan elterjedt módszer a comet assay, mely alkalmazható szinte minden fajban, minden szövettípus esetében. Előnyei mellett jócskán sorakoznak hátrányai, limitáló tényezői, amikkel én is szembesültem vizsgálataim során (Klaude et al. 1996, Olive & Banáth 2006). Így a fent említett paramétereknek jobban megfelel egy viszonylag új technika, a LORD-Q PCR (Lehle et al. 2014). Ezt a módszert eredetileg humán sejtvonalak vizsgálatára fejlesztették ki. Céлом volt ezen eljárás adaptálása és felhasználása tyúk, illetve ponty fajok mikotoxin okozta DNS károsodásának vizsgálatára.

A szervezet mindennap küzd a DNS javításáért, mivel természetes körülmények között is naponta 10000 DNS sérülés következik be egy sejtben becslések szerint (Carusillo & Mussolino 2020). Ezen károsodások kijavításáért, kiküszöböléséért felelős a DNS javító rendszer, mely számos útvonalon keresztül végzi az adott károsodásra specifikus javítást. A különböző javítási mechanizmusok és útvonalak, illetve az azokat működtető fehérjék kapcsolatban állnak egymással, egyes fehérjék több javítási útvonalban is betöltenek szerepet (Sottile & Nadin 2018). Az általam vizsgált mikotoxinok (T-2, DON, aflatoxin B1, szterigmatocisztin) által okozott DNS károsodás és a DNS javítás egymásrautaltságának elemzéséhez különböző géneket választottam ki, mellyel eltérő javítási útvonalban vesznek részt.

A DNS károsodás és az azt javító mechanizmusok kapcsolatáról rendelkezésre álló ismereteink meglehetősen hiányosak, pedig ezen folyamatok együttes vizsgálata adhat pontos képet a molekuláris szinten lezajló változásokról. Így vizsgálataim alatt megfogalmazott célokra keresztül kiemelten foglalkoztam ezen összefüggések felderítésével. A kiválasztott két faj megfelelő kísérleti modell a kitűzött célokhoz, mivel a tyúk faj jellemzően, a ponty faj pedig növekvő tendencia által érintett a gabonafogyasztás révén a mikotoxinok kártételében.

1.1. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során céлом volt felmérni a DON, T-2, aflatoxin B1 és szterigmatocisztin mikotoxinok DNS károsító hatását ponty, illetve T-2, aflatoxin B1 és a szterigmatocisztin mikotoxinokét tyúk fajban.

A vizsgálatok elvégzéséhez egy, mind a négy toxin hatásának vizsgálatához igazodó, objektív, hatékony és időben is előnyös, PCR alapú módszer adaptálása és alkalmazása is céлом volt mindkét faj esetében, melynek részeként a kiválasztott módszer alkalmazhatóságát össze kívántam hasonlítani a leggyakrabban alkalmazott comet assay-vel, annak tyúk májra történő adaptációját követően.

Emellett céлом volt feltérképezni a DNS javító mechanizmusok változását, ezzel képet kapni a vizsgált mikotoxinok DNS javító génekre gyakorolt hatásáról. Ennek okán céлом volt a DNS javításban szerepet játszó gének kiválasztása ponty és tyúk fajok számára, majd a géneket vizsgáló rtPCR optimalizálása, illetve a legmegfelelőbb belső kontroll gén kiválasztása.

További céлом volt az irodalomban közölt aflatoxin B1 és szterigmatocisztin 10x-es hatáskülönbségének megerősítése vagy cáfolása.

A tyúk fajban ezen vizsgálatokat kiegészítve céлом volt szövettani vizsgálatokkal is alátámasztani az aflatoxin B1, illetve szterigmatocisztin májra gyakorolt káros hatásait.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Mikotoxinok jelentősége

2.1.1. T-2, HT-2 és DON mikotoxinok

A mikotoxinok trichotecén csoportját négy további részre lehet osztani, az A, B, C és D trichotecénekre, melyeket *Fusarium* penészgombák termelnek, ám kisebb volumenben *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonsporium* és *Trichothecium* fajok is képesek ezen mikotoxinok termelésére (Wu et al. 2010). Gyakran és nagy mennyiségben találhatóak meg kukorica és gabonafélék (rozs, zab, búza, árpa) magjában, majd azok feldolgozott termékeiben (Moss 2002, Schuhmacher-Wolz et al. 2010, Wu et al. 2010, Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011, Somoskői et al. 2012).

A T-2 toxin (4 β , 15 diacetoxi-8 α (3 metilbutiriloxi) 3 α hidroxil 12,13-epoxitrichitec-9-én) az A típusú trichotecénvázis vegyületek családjába tartozó mikotoxin (Shokri et al. 2000, Weber et al. 2005; Somoskői et al. 2012, Zhuang et al. 2013). A trichotecének döntően zsírolékony vegyületek, így könnyedén képesek bejutni a sejtbe, peptidil-transzferázhoz kötődnek. A T-2 toxin kimondottan nagy affinitást mutat a transzpeptidázokkal szemben, melyek a riboszóma egyik fontos alegységét alkotják. Így gátolja a fehérje-, közvetve pedig a DNS (deziribonukleinsav)- és az RNS (ribonukleinsav)-szintézist (Somoskői et al. 2012, Zhuang et al., 2013). A T-2 mikotoxin igen gyorsan metabolizálódik, ennek következtében jön létre a HT-2 toxin, akut toxicitásuk hasonlóan alakul. Mint A típusú trichotecénvázis vegyületekre jellemző, hogy a 12,13-epoxid gyűrű felelős a toxicitásért elsődlegesen (Varga & Tóth 2005, Li et al. 2011), illetve a C9-C10 atomok között kettős kötés található (Schuhmacher-Wolz et al. 2010).

Leggyakrabban a mérsékelt égövön fellelhető *Fusarium* nemzetségbe tartozó nektrotrof polifág fitopatogén penészgombák (elsősorban az *F. sporotrichoides*, *F. poae* és *F. graminearum*) termelik a T-2, HT-2 toxinokat (Schuhmacher-Wolz et al. 2010, Somoskői et al. 2012, Stoev 2015). Leginkább időjárási körülmények, a gabonaszem sérülései és a nedvességtartalom határozza meg a T-2 toxin és egyéb mikotoxinok termelődésének mértékét (Schuhmacher-Wolz et al. 2010). A toxintermeléshez ideális a magas páratartalom, illetve a 6-24 °C közötti hőmérséklet (Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011).

Ezek a penészgomba fajok a szántóföldön, de a tárolás során is szennyezhetik a gabonát. A toxinjaik többsége pedig ellenáll a hagyományos élelmiszer- és takarmány-előállítási folyamatok során alkalmazott kezeléseknél, így azok jelenléte kimutatható az állati takarmányokban és akár alapvető emberi élelmiszerekben is (Schuhmacher-Wolz et al. 2010, Somoskői et al. 2012). A T-2, HT-2 stabil marad semleges és savas körülmények között is. Általánosságban elmondható, hogy a toxin egy része érintetlenül áthalad a bélsövön, majd a bélsárral kiürül a szervezetből. A gyomorban nem hidrolizál. A felszívódás elsősorban a vékonybélből történik, majd a portális keringéssel a májba jut. Onnan részben metabolizálódva az epén át visszajuthat a bélsőbe vagy a vérkeringésbe jut. A vérkeringés által az izmokba, tejbe, tojásba kerülhet, illetve a vizeletbe a vesén keresztül. A T-2 metabolikus átalakulása történhet acetiláció, deacetiláció, hidroxiláció, de-epoxidáció, illetve konjugáció által, karboxilészteráz és citokróm P450 enzimek segítségével. A metabolikus útvonal függ a fajtól, illetve a nemtől egyaránt (Schuhmacher-Wolz et al. 2010, Wu et al. 2020). A HT-2 a T-2 C4 deacetilációjának következtében jön létre nem specifikus karboxilészteráz segítségével (Schuhmacher-Wolz et al. 2010). Tyúk faj esetében legalább 19 különböző metabolit képződhet a T-2 toxinból döntően hidrolízis, hidroxiláció, karboxiláció, illetve szulfát konjugáció által (Wu et al. 2020).

A T-2 toxin a legtoxikusabbnak ítélt trichotecénvázis mikotoxin, kiemelendő az akut toxikussága (Hafner et al. 2011, Osselaere et al. 2013). Európában a Biomin cég 2020-as felmérése szerint a minták 32%-ban volt kimutatható (http2). A Nemzetközi Rákkutató Ügynökég (IARC) 3-as kategóriába sorolta a T-2 mikotoxint, eszerint humán karcinogenitás szempontjából nem besorolható anyag (IARC 1993). Különböző állatfajokat tekintve (pl.: sertés, egér, patkány) az

egyed baromfi fajok (tyúkalkatúak) kevésbé érzékenyeknek mondhatóak a trichotecénekkal szemben (Frankič et al. 2006, Awad et al. 2011), ám a kialakuló tünetek tekintetében hasonlóság mutatkozik (Schuhmacher-Wolz et al. 2010).

A DON (deoxinivalenol), más néven vomitoxin a B típusú trichotecénvázis vegyületek közé tartozik. E csoportra igaz, hogy a C8-as pozícióban karbonil csoportot tartalmaz. E mikotoxint elsődlegesen a *F. graminearum* és a *F. culmorum* fajok állítják elő (Moss 2002).

A DON legfőbb metabolitja a DOM-1 (deepoxi-DON), mely a humán és az állati szervezetben is kimutatható. Az átalakítást a bélben élő mikroorganizmusok végzik, ám az alacsony pH szint gátolni képes a DON transzformációját. *In vitro* tyúk bélben vizsgálható volt a 3-a DON transzformációja DON-ra, illetve DOM-1-re, míg 15-a DON esetében deepoxi-15-a DON, DON, illetve DOM-1 tekinthető metabolitnak (Wu et al. 2010). Brojlercsirkék esetében az elfogyasztott DON mennyiség nagyobb része szinte teljesen abszorbeálódik a gyomorban és a vékonybélben. A vékonybél proximális szakaszában megy végbe a DON deepoxilálása, mely folyamat a végbél szakaszban nem mutatható (Awad et al. 2011).

A DON a leggyakrabban előforduló mikotoxin (Wu et al. 2010). Biomin 2020-ban végzett vizsgálatából kitűnik, hogy Európában a minták 60%-ában volt jelen, Észak-Amerikában 75%-ban, Ázsiában 71%-ban (http2). Az IARC szerinti besorolása szintén 3-as kategóriába került (IARC 1993). Pietsch 2020-ban végzett kutatásában a legnagyobb mikotoxin szintet DDGS-ből, kukoricából, búzakorpából és búzalisztből mutatta ki. A medián szcenáriót figyelembe véve a DON (57,7±4,8 µg/kg takarmány), fumonizin B1 (33,7±6,0 µg/kg takarmány) és a T-2 (26,3±2,7 µg/kg takarmány) mikotoxinok voltak a leggyakrabban kimutatottak a 97 haltakarmány mintából (Pietsch 2020). Szintén haltakarmányok esetében a minták 92,9%-ban volt kimutatható DON és 57,1 %-ban fumonizin B1 Észak-Afrikában (Marijani et al. 2017). 2004 és 2013 között végzett takarmányvizsgálatok során a minták 57%-ában detektáltak DON toxint, átlagosan 408 µg/kg mennyiségben, amit a fumonizin B1 követett 55%-kal (Murugesan et al. 2015). Hazánkban legjellemzőbben tömeg- és abraktakarmányokban a *Fusarium* gombák által termelt mikotoxinok közül a DON mellett a T-2 toxin jelent problémát (Szabó-Fodor et al. 2020). Ez más országokban is jellemző, Pakisztánban a vizsgált baromfi takarmány minták 34,65%-ában találtak T-2 mikotoxint 100-7500 µg/kg szennyezettségi tartományban (Hanif et al. 2006). Kínában a haltakarmányok 79,5%-ában találtak T-2 mikotoxint 10-735 µg/kg tartományban (Deng et al. 2019).

Halak esetében az Európai Unióban T-2 és HT-2 mikotoxinok megengedett maximális értéke 500 µg/kg gabonafélék és azokból készült termékek, kivétel zabkorpa esetében. DON-ra vonatkozó érték gabonafélék és azokból készült termékekben, kivétel kukorica melléktermékekben 8000 µg/kg, kukorica melléktermékekben 12000 µg/kg, kiegészítő és teljes takarmánykeverékekben pedig 5000 µg/kg (Pietsch 2020). DON határérték befejező baromfi takarmányban, illetve kiegészítő- és teljesértékű takarmányokban 5 mg/kg, gabonafélékben és gabona készítményekben 8 mg/kg (Murugesan et al. 2015).

A T-2 és DON mikotoxinok hatásai

A T-2, így a HT-2 mikotoxinok nem rendelkeznek specifikus tünetekkel, jellemző a testtömeg csökkenés, takarmányfelvétel csökkenése, bőrirritáció, nyálkahártya felmaródás, hányás, májkárosodás, szaporodásbiológiai toxicitás, immunotoxikuság, neurotoxikuság, apoptózis indukáló hatás (Schuhmacher-Wolz et al. 2010, Li et al. 2011, Patil et al. 2014, Yang et al. 2020, Wu et al. 2020). Ezekon kívül a membrán transzportot is negatívan befolyásolják, aminosavak, nukleotidok, glükóz transzportját gátolják, illetve a mitokondrium elektron transzportját is (Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011). A T-2 legfőbb célpontja a máj, mely szervben számos káros hatást képes kiváltani, mint például morfológiai, szövettani elváltozások, lipidperoxidációs folyamatok elindítása (Kalantari & Moosavi 2010). A DON mikotoxinhoz viszonyítva a T-2 toxin citotoxikusabb hatású humán és állati sejtekben egyaránt, illetve akut toxicitása is jelentősebb (Moss 2002, Fernández-Blanco et al. 2018, Faisal et al. 2020). A DON jellemzően takarmányvisszautasítást, hányást, emésztési zavarokat okoz, gátolja a sejt

proliferációját, RNS és DNS szintézist, apoptózist indukál, testtömeg csökkenést, szérumfehérje csökkenést eredményez, ám oxidatív stressz kialakulásáért is felelős (Wu et al. 2010, Fernández-Blanco et al. 2018). Negatívan befolyásolja az immunrendszert, az endokrin- és az idegrendszert egyaránt. A bél epithel sejtjeit nagymértékben képes károsítani, mivel egyrészt ezen sejtek nagyobb DON koncentrációnak vannak kitéve, másrészt a fehérjeszintézist károsítja, gátolja és növeli az epithel sejtek áteresztőképességét. Ennek következtében csökkent rezisztencia figyelhető meg a bélben fellépő fertőző ágensekkel szemben. 7 napos csirkék esetében csökkent a testtömeg 10 ppm DON szennyezettség hatására, illetve a testtömeggyarapodás szignifikánsan elmaradt a kontroll csoporttól 0-5. hétig tartó periódus alatt. A takarmány felvétel 5, illetve 10 ppm DON szennyezés eredményeképpen csökkent mértékű volt a kísérlet alatt (Awad et al. 2019). Szintén 5 hetes DON-nal (1 és 5 mg/ takarmány kg) szennyezett takarmányfogyasztás hatására nem volt kimutatható változás a takarmányfogyasztásban, -értékesítésben, testtömegben és testtömeg gyarapodásban. Ellenben a bélbolyhok hosszában szignifikáns csökkenés következett be, ami a bélbolyhok szignifikáns felületvesztését is eredményezte mindkét dózis esetében (Awad et al. 2011). Különböző sejt kultúrákat (ponty agysejt, lazac vesesejt) összehasonlítva a szivárványos pisztráng májsejtjei voltak a legérzékenyebbek DON kezelésre, csökkent sejt életképességet és metabolikus aktivitást mutattak ki 800 ng/ml koncentráció esetében (Pietsch et al. 2011).

Kakasok esetében a szignifikánsan csak az együttes T-2 (4 mg/kg) + DON (16 mg/kg) szennyezés esetében mutatkozott szignifikáns testtömeg gyarapodásban bekövetkezett elmaradás, illetve a csak T-2 mikotoxinnal szennyezett csoporthoz képest a T-2+DON csoportban gyakoribbak voltak az orális léziók, felmaródások (Kubena et al. 1989).

50 és 100 ppb T-2 toxin nem eredményezett szignifikáns eltérést testtömeg-gyarapodás, takarmányfelvétel, takarmányértékesítés tekintetében, illetve a vér biokémiai paramétereiben (szérum fehérje, koleszterin, hemoglobin, húgysav), ám 150 és 200 ppb dózis esetében már szignifikáns eltérés mutatkozott a kontroll csoporthoz viszonyítva (Singh et al. 2020). Ugyanez a trend mutatkozott meg a máj relatív tömege esetében is, csupán a 150 és 200 ppb dózisú csoportok tértek el a kontroll csoporttól. Megnövekedett a máj relatív tömege, valószínűsíthetően a T-2 által bekövetkezett fokozott lipid metabolizmus révén. E két csoportban szövettani vizsgálat során nekrotikus gócpontok, gyulladásos elváltozások voltak megfigyelhetőek (Singh 2020).

A trichotecénvázis mikotoxinok serkentik a lipidperoxidáció folyamatát, ezáltal károsodik a sejt membránja, majd a DNS-é is (Frankič *et al.*, 2006). Az ochratoxinhoz viszonyítva a T-2 toxin, illetve a zearalenon hatékonyabban képesek a ROS (reaktív oxigén gyökök) generálásra (Bouaziz *et al.*, 2008).

A T-2 toxin képes volt lecsökkenteni a totál antioxidáns státuszt (TAS) pecsenyecsirke vérplazmában, míg a DON nem tudott véghezvinni hasonló mértékű negatív hatást. Szignifikáns AST (aszpartát aminotranszferáz) aktivitás csökkenést is kimutattak T-2 hatására (Frankič *et al.*, 2006). Hím patkányokon végzett vizsgálatban szignifikáns csökkenés volt mérhető GSH (glutation), SOD (szuperoxid-dizmutáz), CAT (kataláz) paraméterekben T-2, illetve DON toxin kitétség esetében, viszont különböző antioxidáns kiegészítés mérsékelni tudta a lipidperoxidáció stimulációját (Rizzo *et al.* 1994).

Csirkék máját vizsgálva *in vivo*, a T-2 mikotoxin 7 napos expozíciót követően szignifikánsan növelte az MDA (malondialdehid) mennyiségét. Abban az esetben, amikor a T-2 adagoláshoz az állatok likopin kiegészítést kaptak, a toxinos csoporthoz viszonyítva MDA csökkenés következett be. A csak likopin kiegészített csoport MDA értékei a kontroll csoportéhoz voltak hasonlóak. A máj glutation szintje a T-2 toxinos csoportban szignifikáns csökkenést produkált a kísérlet egész ideje alatt. Az első 14 napon a likopin képes volt a T-2 negatív hatását mérsékelni, ám a 21. naptól a GSH szint mindkét csoportban hasonlóvá vált. A glutation-S-transzferáz esetében a növekedés szignifikánsnak bizonyult a 7.-től a 21. napig a T-2 toxinos csoportban. A csak likopin kiegészítés a kontrollhoz viszonyítva egy kisebb mértékű GST (glutation-S-transzferáz) növekedést eredményezett. A T-2 toxin és likopin kiegészített csoport a T-2 toxinos csoporthoz képest kisebb GST értékkel bírt. A γ -glutamiltranszferáz enzim a T-2 toxinos csoportban nagymértékű növekedést mutatott, majd a 14. npra erőteljesen visszaesett.

A tendencia hasonlóan alakult, ám a likopin képes volt mérsékelni az enzim növekedését a likopin+T-2 toxin csoportban. A glutation-peroxidáz esetében csak a T-2 toxinos csoport értéke növekedett szignifikáns módon a 7. napra (324%-kal), a 21. napon az aktivitás erősen csökkent (37%-ra). A likopin, illetve likopin+T-2 toxin csoportok értékei hasonlóak voltak a kontroll értékeihez viszonyítva (Leal et al. 1999). Tilápia esetében 20 napig tartó 24 mg/kg T-2 toxin terhelés oxidatív stresszt idézett elő a májban GST aktivitás szignifikáns emelkedése mellett (Bacou et al. 2021). Ponty fajban 28 napon keresztül T-2 toxinnal (5,3 mg/kg) való takarmányszennyezés szignifikáns módon növelte a máj és a vese kataláz, GST, TBARS (tiobarbutinsav-reaktív anyag) szintjét (Matejova et al. 2017). Két napig tartó 3,74/1,26 mg/kg T-2/HT-toxin, illetve 16,12 mg/kg DON szennyezés nem befolyásolta szignifikánsan a konjugált dién, a konjugált trién, illetve a TBARS szintjét 3 hetes kakasok májában. GSH és GPx (glutacion-peroxidáz) mennyisége megemelkedett a T-2/HT-2 csoportban 1 napos kezelést követően, a DON csoportban 2 napos kezelést követően a GPx paraméterben következett be aktivitás emelkedés. A glutation peroxidáz 4 gén expressziója szignifikánsan a DON csoportban csökkent a kontrollhoz viszonyítva a 12., 24. és 36. órában, míg a 48. órában expresszió emelkedés következett be. A glutation reduktáz génexpressziója szignifikáns mértékben csökkent a 12. órában mindkét kezelt csoportban, míg a további időpontokban csak a DON esetében volt eltérés a kontroll értékeitől (Nakade et al. 2018). DON esetében kisebb, 10 mg/kg kezelés szintén nem okozott változást a TBARS szintben peccenyecsirke limfociták esetében (Awad et al. 2012).

Humán sejtvonal esetében 1 órás 60 μM koncentrációs DON kezelés szignifikáns mértékben megnövelte a ROS mennyiségét. Ám ennél kevesebb (15 μM) koncentráció lipidperoxidációs folyamatokat volt képes elindítani, szignifikáns mértékben növekedett a TBARS szint, illetve hidroxideoxi-guanozin mennyisége is (Zhang et al. 2009b). Szintén humán sejtvonalon (HT-29) bizonyítást nyert az 1 μM DON szignifikáns ROS termelése, emellett pedig az antioxidáns rendszer elnyomása, a SOD, CAT, GSH, GPx expressziójának csökkenése, citotoxikus és apoptikus folyamatok elindítása (Wan et al. 2019). Szintén HT-29 sejtvonalban a DON dózisfüggő módon (2-50 μM) csökkentette a sejtek túlélését és ezzel párhuzamosan növelte a DNS fragmentációját 24 órás kitettséget követően (Bensassi et al. 2009).

A T-2 mikotoxin dózisfüggő módon képes volt csökkenteni a humán sejtvonal (HeLa) esetében a sejtek életképességét, alakját és méretét egyaránt. A toxin letális koncentráció (LC50) értéket 10 ng/ml mennyiségnél határozták meg. A ROS termelésének szignifikáns növekedése már 30 perc után kimutatható volt. Az intracelluláris glutation szintjének kimerülése a 4. órában kezdődött, a teljes kimerülés pedig a 8. órában következett be. A lipidperoxidációt jelző MDA szint a 8. órától szignifikáns mértékben kezdett növekedő tendenciát leírni (Chaudhari et al. 2009).

A T-2 mikotoxin DNS károsító hatásának pontos mechanizmusa még kevésbé ismert, de valószínűsíthetően DNS törések és egyéb mechanizmusok (pl.: bázis oxidálás, metilálás) által valósulhat meg (Frankič et al. 2006, Chaudhari et al. 2009). A T-2 toxin az enzimek szulfhidril (tiol) csoportjaikkal lépnek kapcsolatba, aminek következtében a fehérje, az RNS, illetve DNS szintézise gátolt, illetve az mRNS 60S riboszóma-alegységhez történő kötődés is gátolt. *In vivo* és *in vitro* körülmények között is kimutatták DNS károsító hatását humán sejtvonalak esetében, a DNS egy- és kétszálú törései által (Chaudhari et al. 2009).

Több vizsgálat során kimutatták a trichotecénvázas mikotoxinok DNS és RNS gátló hatásán kívül a sejtmembránra és a sejt proliferációjára kifejtett toxikus hatását is (Frankič et al. 2006, Königs et al. 2009).

Az expozíció során időfüggő módon mutatták ki a T-2 toxin DNS károsító hatását humán sejtvonal esetében comet assay-vel. 2 órát követően a sejtmag körül kis mértékű diffúziót mutattak ki, míg 4 óra elteltével szignifikáns mértékben megnövekedett a diffundált DNS töredékek mennyisége, míg a sejtmagi zóna csökkent. 8 órás expozíció után a sejtmag szinte teljesen eltűnt és a sejtek 66,7%-ában tapasztaltak DNS károsodást. A DNS fragmentációja viszont csak a 8. órától volt kimutatható (Chaudhari et al. 2009).

Humán hepatoma (HepG2) sejtvonalon alkalmazott DON koncentrációk (3,75–30 μM) dózis-függő módon növelték a DNS migrációját, azaz az üstökös (comet) farki szakaszának

hosszát, az abban található DNS %-át, illetve a TM (tail moment, a csóva erőssége/intenzitása) paramétert is (Zhang et al. 2009b). Csirke limfociták esetében az 5 hetes 10 mg/kg DON szennyezés hatására szignifikánsan megemelkedett 46,8%-kal a DNS az üstökös farki részében, ám Mycofix kiegészítés hatására e paraméter nem különbözött a DON+Mycofix csoportban (Awad et al. 2012). Szintén 5 hétig tartó 10 mg/kg DON szennyezés következtében szignifikánsan növekedett a limfociták DNS károsodása comet assay-vel vizsgálva, a nyirokszövetben mért TBARS szint pedig szignifikáns mértékben emelkedett, a lipidperoxidáció állapota ezáltal összefüggésben állhat a DNS károsodással (Awad et al. 2014).

In vivo pecsenyecsirke lép leukociták esetében a T-2, illetve a DON toxinok a kontrollhoz képest szignifikáns módon megnövelték az üstökös farki szakaszában található DNS töredékek %-os értékét. Ez az érték szignifikánsan csökkent, mikor az állatok nukleotid kiegészítést kaptak. Ugyancsak comet assay-vel vizsgálva egy másik paramétert, arra az eredményre jutottak, hogy a DON nem fejtett ki szignifikáns hatást, míg T-2 csoport esetében szignifikáns OTM (Olivél tail moment) érték növekedést mutattak ki. A nukleotid kiegészítés csökkentette a T-2 toxin DNS károsító hatását (Frankič et al. 2006).

Hasonló tendenciát mutattak ki pecsenyecsirke limfociták esetében, amikor egyszeri, 0,5 mg/testtömeg kg T-2 toxint kaptak *per os* az állatok. 24 órát követően szignifikáns mértékben növekedett az üstökösök farkok hossza, illetve az átlag TM paraméter is. A T-2 toxinnal kezelt csoportban nemcsak a mért paraméterek átlagai növekedtek meg, hanem a paraméterek maximális tartománya és szórása is megnövekedett a kontroll, illetve a DMSO (dimetil-szulfoxid) kezelésben részesített csoporthoz viszonyítva. A kontroll és a DMSO csoport a TM értékei nem érték el a 14,73 μm -t, tehát a DNS igen stabil állapotban volt jelen, míg a T-2 csoport esetében a maximális érték elérte a 45,03 μm -t, ami szignifikáns mennyiségű DNS töredéket jelenthet. Ebből következik, hogy a T-2 toxin képes 24 óra alatt kifejteni DNS károsító hatását a vér sejtsejtes elemekre brojlercsirkék esetében (Sokolovic et al. 2007).

A T-2 toxin apoptózist indukáló hatását kimutatták többek között egér sejtvonalakon (csontvelő, agy, bőr, vese, lép) és humán csecsemőmirigy, lép és csontvelő sejtvonalakon. A T-2 toxinnal kezelt sejtek esetében időfüggő módon növekedett a kaszpáz-8, -9, -3 és -7 enzimek mennyisége, így az apoptózis kaszpáz-függő útvonala bizonyított (Bouaziz *et al.*, 2008; Chaudhari *et al.*, 2009).

A p53 fehérje nélkülözhetetlen a külső negatív behatásokra kialakuló válaszreakciók során. Így például DNS károsodás következtében expresszálódik, elindítja az apoptózis folyamatát, mind az intrinsic, mind az extrinsic útvonal esetében. T-2 toxinnal való érintkezés a 4. órától szignifikáns módon megnövelte a p53 fehérje expresszálódást humán méhnyakrák sejtekben *in vitro*. A kaszpáz-függő folyamatokon kívül a mitokondrium az AIF (apoptózis indukáló faktor) transzlokációját is végzi, ami az apoptózis fellépésekor a mitokondriumból a sejtmaghoz áramlik a citoszolon keresztül, így e faktor útja a kaszpáz aktivitástól független. A T-2 toxin hatására a 4. órától kezdve a mitokondriumban található AIF mennyiség csökkent, míg a citoszolban kimutatható mennyisége folyamatosan növekedett (Chaudhari et al. 2009). A mikotoxinok p53 aktivitásának összevetésekor az ochratoxin A, illetve a zearalenon magasabb p53 szintet indukáltak a T-2 mikotoxinhoz képest humán hepatoma sejtek esetében (Bouaziz et al. 2008).

DON kitettség esetében HT-29 humán sejtvonal p53 fehérje mennyisége időfüggően változott, 12 órás kitettség esetében érte el a maximális értéket, majd a 24. órában a fehérje mennyisége a kontroll értékét közelítette meg. A kaszpáz 3 aktivitását vizsgálva a 12. és 16. órában emelkedett meg szignifikánsan az aktivitás mértéke, majd a 24. órában lecsökkent (Bensassi et al. 2009).

2.1.2. Aflatoxin és szterigmatocisztin

Az aflatoxinok difuranokumarin származékok, melyek fluoreszcencia segítségével csoportosíthatóak B1, B2, G1 és G2 aflatoxinokra. Aflatoxin termelésért raktári penészgombák, az *Aspergillus* fajok felelősek, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus niger*, ám legfőbbséppen az *Aspergillus flavus*, mely a B1 és B2 termeléséért tehető felelőssé, míg az *Aspergillus parasiticus*

B1, B2, G1 és G2 mikotoxint is termel. A B1 és B2 formák molekulá szerkezetét kumaringyűrű, bifurán és pentangyűrű jellemzi, míg a G1 és G2 formák kumaringyűrűje bifurán mellett hattagú laktangyűrűvel is kondenzál. A B1 és B2 formák biotranszformációja, oxidálása által keletkeznek az M1 és M2 aflatoxinok egyes állatok emésztőrendszerében, melyeket leginkább tejből lehet kimutatni, ám kimutatható vizeletből és ürülékből egyaránt (Verma 2004, Santacroce et al. 2008, Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011, Pietsch 2020).

A szterigmatocisztin (STE) az aflatoxin B1 bioszintézise során keletkező közbenső termék, az aflatoxin előanyagának (prekurzorának) is tekinthető. Termelésére nagyságrendileg 20 *Aspergillus* faj képes, leggyakrabban az *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus versicolor*, ám egyéb gombafajok is képesek termelésére: *Bipolaris spp.*, *Chaetomium spp.*, *Farrowia spp.*, *Monocillium spp.* (Nieto et al. 2018). Az IARC besorolása 2b, azaz lehetséges humán karcinogén (IARC 1993).

Az aflatoxin B1 és a szterigmatocisztin bioszintézise során a versicolor az első molekula, mely rendelkezik kettős kötéssel a difurán 2 és 3 pozíciójában. A citokróm P450 enzimek e kettős kötést célozzák, melynek következtében erősen reaktív epoxidok keletkeznek, melyek DNS- és fehérjeadduktok képződésére képesek. A versicolor molekulából alakul ki a szterigmatocisztin, amit az O-metilszterigmatocisztin követ, végső lépésként pedig az aflatoxin B1 jön létre. Az aflatoxin B2 szerkezete nem rendelkezik az említett kettős kötéssel, így annak karcinogenitása is csekélyebb (Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011, Nieto et al. 2018). Néhány gombafaj (*Aspergillus nidulans*, *Aspergillus versicolor*) nem képes a szterigmatocisztin O-metilszterigmatocisztinné alakítani, mivel nem rendelkeznek metiltranszferázt kódoló génnel, így ezen fajok által nagy mennyiségben termelődik szterigmatocisztin. A többi gombafaj esetében az átalakulás végbemegy, így azokból nagyobb mennyiségben mutatható ki aflatoxin, mint szterigmatocisztin (Zingales et al. 2020).

Az aflatoxinok felszívódását tekintve döntően a vékonybélben megy végbe passzív diffúzió által (Massey et al. 1995, Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011). Az aflatoxin plazmafehérjékhez kapcsolódik, leginkább albuminhoz, így képezve aflatoxin-albumin adduktot, így a szervezetben hosszabb ideig vérkeringésben maradhat (Verma 2004). Az aflatoxin B1 biotranszformációja több mechanizmus segítségével jöhet létre: (keto)redukcióval, hidrátokkal, epoxidációval, hidroxilációval, orto-demetilezéssel. A redukció több helyen is végbemehet, például bendőben vagy a NADPH-függő citoplazma enzimek által májban. Ekkor a B1-hez képest kisebb toxicitású aflatoxikol keletkezik, ám ez az átalakulás reverzibilis, illetve az aflatoxikol metabolizálódhat M1 toxinná. Hidroxiláció következtében jön létre aflatoxin M1 és Q1, melyek rendelkeznek hidroxil-csoporttal, vízben oldódó tulajdonságuk miatt glükoronsavval vagy glutationnal kialakuló konjugációt követően ürülni képesek a szervezetből epén, tejen és vizeleten keresztül (Massey et al. 1995, Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011). Az aflatoxin B1 biotranszformáció során az aflatoxin-8-9-epoxid lesz az a molekula, mely képes kifejteni mutagén és karcinogén hatását és kötődni egyéb makromolekulákhoz, mint a DNS. A citokróm P450 enzimek epoxid aktiválása során exo- és endo-epoxid is keletkezhet, közülük az exo forma lép reakcióba a DNS-sel. Ennek megfelelően az AFB1 DNS adduktokat is ki tud alakítani, leggyakoribb az AFB1-guanin (8-9-dihidro-8-N7-guanil-9-hidroxi-AFB1) (Massey et al. 1995, Bedard & Massey 2006, Santacroce et al. 2008, Gursoy-Yuzugullu et al. 2011, Engin & Engin 2019). Az imidazol gyűrű felnyílásával AFB1-guaninból igen stabil AFB1-formamidopirimidin keletkezhet, mely felelős a guanin-timin mutációért. Az AFB1-formamidopirimidin DNS javító mechanizmusokkal szemben igen ellenálló (Shen & Ong 1996, Gursoy-Yuzugullu et al. 2011). Depurinációval AP oldal (apurin-apirimidin) jöhet létre vagy vízzel reakcióba lépve AFB1 dihidrodiol alakulhat ki (Bedard & Massey 2006, Santacroce et al. 2008, Engin & Engin 2019). A DNS javító enzimek sikeresebben ismerik fel az AFB1-guanin adduktot az AFB1-formamidopirimidinhez képest, ebből adódóan az az AFB1-guanin kevésbé hatékonyan blokkolja a replikációt és humán májsejtes karcinóma sejtvonalban megközelítőleg 6-szor kevesebb guanin-timin mutációt eredményez (Engin & Engin 2019). Emlősökkel összevetve, halak esetében az AFB1-adduktok javítási kapacitása kisebb mértékű, ezáltal a genomi DNS-ben

hosszabb ideig jelen lehetnek, ami növeli a mutációk és a karcinogén folyamatok kialakulásának lehetőségét (Santacroce et al. 2008).

A szterigmatocisztin is képes reakcióba lépni a DNS-sel, leggyakoribb forma az 1,2-dihidro-2-N7-guanil-1-hidroxiszterigmatocisztin (Liu et al. 2014). E nagyon reaktív epoxy csoport képződésén kívül a szterigmatocisztin aromás gyűrűjének hidroxilációjával katekol képződhet, mely szintén kötődni képes a DNS-hez. Patkány és humán vizsgálatokban nagyobb arányban találtak katekolt, így feltételezhető, hogy a katekol útvonal jelentősebb, mint az epoxy útvonal (Nieto et al. 2018).

Az aflatoxin 1960-as felfedezését követően számos vizsgálatba vonták, hogy felderítsék hatását. Az aflatoxinok a legtoxikusabb és legkarcinogénebbek a mikotoxinok között (Massey et al. 1995, Heidtmann-Bemvenuti et al. 2011). Alapvetően a fiatal állatok érzékenyebbek a takarmányok aflatoxin szennyeződésére, a baromfifajok közül a pulyka, illetve a kacsák a leginkább veszélyeztetettek (Stoev 2015). Halak esetében általánosságban a hidegvízi halfajok nagyobb érzékenységet mutatnak az aflatoxin szennyezettséggel szemben, mint a melegvízi halfajok (Santacroce et al. 2008, Pietsch 2020). Az aflatoxin B1 (AFB1) IARC besorolása 1-es, azaz humán karcinogén kategóriába került (Stoev 2015).

A Biomin 2020-ban készített felmérésben a takarmányminták 8%-ában volt kimutatható aflatoxin Közép-Európában, míg Dél-Európában 16%-ban, Ázsiában pedig 25%-ban (http2). Kelet-Afrikában végzett befejező haltakarmányok mikotoxin szennyeztségének vizsgálata során az aflatoxint a minták 64%-ában mutatták ki. Kenyében mutatták ki a legmagasabb aflatoxin B1 szennyeztséget (806,9 mg/kg). Így elmondható, hogy a trichotecénvázis mikotoxinokat követően az aflatoxin nagy gyakorisága és szintje potenciális veszélyt és megoldandó problémát jelent a haltakarmányozásban is (Marijani et al. 2017). A klímaváltozás következtében Európában is egyre nagyobb gyakorisággal vannak jelen az *Aspergillus* fajok. Egy európai felmérésben a vizsgált többi mikotoxinhoz képest kisebb mértékű aflatoxin B1 szennyeződés volt kimutatható (1,2±0,1 µg/kg takarmány). Sem a hőkezelés, sem pedig az extrudálás folyamata nem képes csökkenteni a végső aflatoxin koncentrációt a takarmányban (Pietsch 2020). Szterigmatocisztint gabonafélék közül legnagyobb gyakorisággal rizsből (13,9 µg/kg), kukoricából (32,2 µg/kg), búzából (68,9 µg/kg), zabból (2,1 µg/kg) és árpából (1 µg/kg) mutattak ki, míg fűszerek esetében leggyakrabban feketebors és chili paprikából volt kimutatható (Nieto et al. 2018).

Hal, sertés, baromfi és egyéb gazdasági állatok aflatoxin B1 szennyeztségéről a takarmányok és takarmánykeverékek esetében a megengedett határérték 20 µg/kg, amit az Európai Unió is szabályoz (2002/32/EK) (Pietsch 2020). Szterigmatocisztin esetében nincsen szabályozott határérték, csupán néhány ország (Csehország és Szlovákia) vezetett be szabályt, meghatározva a maximális szterigmatocisztin szintet (5 µg/kg rizs, zöldségek, baromfi, liszt, tej és 20 µg/kg egyéb élelmiszerek esetében) (Nieto et al. 2018, Zingales et al. 2020).

Az aflatoxin és a szterigmatocisztin hatásai

Hatásaik szerteágazóak: májkárosítás, máj nekrozis, erős gyulladáshoz és nekrotikus elváltozások az emésztőrendszerben, idegrendszer károsítása, immunotoxikus, ATP-, fehérje-, RNS- és DNS-szintézis gátlása, mitózis gátlása, citotoxikus, genotoxikus, nefrotoxikus, teratogénus, embrió növekedés gátlása, lipidperoxidáció, oxidatív stressz. Termelési paraméterek tekintetében is súlyos negatív hatással bírnak. Az aflatoxin B1 (AFB1) krónikus hatásai között szerepel a cirrózis, tüdő ödéma, hasvízkór, intracelluláris kalcium akkumuláció belső szervekben, sárgaság kialakítása (Verma 2004, Santacroce et al. 2008, Stoev 2015, Nieto et al. 2018, Gacem et al. 2020). A szterigmatocisztin esetében a tumorképzés, véres vizelet kialakulása gyakori (Nieto et al. 2018).

Halak esetében szintén a májkárosítás, növekedésbeli elmaradás, csökkent takarmányfelvétel, vérparaméterek megváltoztatása, kopolyúdeformitás, immunszuppresszió megemlíthető, mint korai aflatoxikózis tünet. Ám az első káros jel a testösszetétel változása, illetve az oxidatív stressz állapotának kialakítása (Pietsch 2020). 2 µg/kg AFB1 pontyban nem okozott eltérést a testtömegben, a kondícióban, a fizikai állapotban, illetve nem volt kimutatható a

toxin az izomszövetből. Ennek ellenére 2 µg/kg AFB1 léziókat okozott a májon, 20, illetve 200 µg/kg AFB1 pedig súlyos hisztopatológiai elváltozásokat indukált (Svobodova & Piskac 1980). Szintén ponty esetében 100 µg/kg AFB1 már szignifikánsan csökkentette a növekedési teljesítményt (Pietsch 2020).

Abd-Allah és munkatársai (1999) az érzékenynek tekinthető szivárványos pisztráng, illetve rezisztensnek tekinthető törpeharcsa fajok esetében vizsgálták egyszeri 0,5 mg AFB1/testtömeg kg injektálását követően a DNS károsodásra gyakorolt hatását. Szivárványos pisztrángban comet assay TM paraméterét figyelembe véve a vérben és a vesében szignifikáns mértékű DNS károsodást mutattak ki, ám a májban nem következett be szignifikáns mértékű változás a kezelés utáni 4. órában. Teljesen ellentétes trend alakult ki 24 órát követően. A törpeharcsa fajban kimutatható eltérés nem volt az időpontok és szervek esetében sem (Abd-Allah et al. 1999).

Aflatoxin B1 (2,5 µg/g) és ochratoxin A (2 µg/g) együttes dózisa szignifikánsan csökkentette 3 hetes csirkék testtömegét a kontrollhoz és az egyes mikotoxinokhoz képest külön-külön (Huff et al. 1988b). Hasonló kísérleti elrendezésben az aflatoxin B1 (2,5 µg/g) csökkentette a csirkék testtömegét, szignifikánsan növelte a máj, vese, lép és szív relatív tömegét és befolyásolta a vérparamétereket. Az AFB1+ 4,0 µg/g T-2 adagolás esetében szinergista hatást jegyeztek fel a vizsgált szervek relatív tömege, a testtömeg, a vörösvértest térfogat, illetve a vér kálium szintje esetében (Huff et al. 1988a).

AFB1 (149,1 µg/kg takarmány), illetve két szterigmatocisztin (1590 µg természetes úton termeltetett/kg takarmány vagy 1570,5 µg mesterségesen előállított/kg takarmány) kezelés hatására csökkent a takarmány felvétele. Szignifikáns testtömeg csökkenés csak a természetes úton termeltetett szterigmatocisztin csoportban következett be a 7. napon. Az abszolút májtömeg a kezelés 2. napján a mesterségesen előállított szterigmatocisztin csoportban csökkent le szignifikánsan, a 7. napra már a természetes úton termeltetett STE csoport abszolút májtömege bizonyult szignifikánsan kisebbnek az AFB1 csoporthoz képest. Szignifikánsan nem volt kimutatható változás a 14 napos kísérlet során a csoportok között a konjugált dién, trién, illetve malondialdehid paraméterekben (Balogh et al. 2019).

A természetes úton termeltetett aflatoxin B1 mikotoxint tartalmazó kukorica mennyiségének emelkedésével a takarmányban, arányosan csökkent a brojlercsirkék testtömege, szignifikáns változás csak a 100% AFB1 szennyezett kukoricát fogyasztó csoportban mutatták ki. A 42. napra ezen különbségek megszűntek. A 21. napon mért relatív és abszolút májtömegek esetében nem volt eltérés a kontroll csoporttól, a 42. napon a 25%-ban szennyezett csoport relatív és abszolút májtömeg értékei szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a kontroll, az 50/75/100%-ban szennyezett csoportok értékeitől. A 21. napon az 50 és 100%-ban szennyezett csoportokban szignifikánsan csökkent a máj fehérjetartalma, az 50%-ban szennyezett csoportban az MDA mennyiség és a SOD aktivitás szignifikánsan megemelkedett. A szennyezett kukorica mennyiségének növekedésével szignifikáns módon csökkent a GSH-Px aktivitás, illetve szignifikánsan növekedett a GST és a glutation reduktáz aktivitása. A 42. napon mindegyik csoport máj fehérjetartalma szignifikáns csökkenést mutatott, a SOD aktivitást csak a 100%-os csoportban tudták kimutatni. A glutation reduktáz és a GST paraméterekben szignifikáns növekedését detektálták a 75 és 100%-ban szennyezett csoportok esetében. MDA mennyiségi növekedés pedig csak a 75%-os csoportban volt. A 21. napon a szennyezett kukorica arányának emelésével az epevezeték hám hiperpláziájának kialakulása egyre erőteljesebbé vált. A 75%-os csoportban a vizsgált májak 83,3%-ában gyenge, 16,7%-ában pedig súlyos mértékű léziók mutatkoztak. A 100%-ban szennyezett kukoricát fogyasztó állatok mája esetében az összes súlyos mértékű léziókkal rendelkezett. A 42. napra ezek a hisztopatológias léziók súlyossága csillapodott mindegyik kezelt csoport esetében, ám a 100%-os csoportban ultrastrukturális változásokat figyeltek meg, a májsejtek zsíros degenerációja kimutatható volt. A citoplazmában különböző méretű lipid cseppek voltak láthatóak. Az apoptotikus májsejtek aránya is szignifikánsan megemelkedett a 50/75/100%-os csoportokban a 21. napon, illetve a 75/100%-os csoportokban a 42. nap során (Yang et al. 2012).

Az AFB1 akár egy nap leforgása alatt is képes az antioxidáns rendszert aktiválni. Ponty vesében a 8. órában alakult ki a 7,5 µg AFB1 + 165µg DON, illetve a 10 µg AFB1 + 220µg DON kezelés hatására Keap1 gén esetében expresszió növekedés, míg lépben a 16. órában következett be expresszió csökkenés az 5 µg AFB1 + 110µg DON csoportban és expresszió növekedés 10 µg AFB1 + 220µg DON csoportban a kontrollhoz képest. Májban a Keap1 gén expressziója szignifikánsan eltért a kontrollétól a 8., 16. és 24. órákban is. NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) gén expressziója esetében csak a 8. órában mutattak a kezelt csoportok expresszió növekedést, a további időpontokban csökkenés volt kimutatható a kontroll értékéhez képest a vesében. A lépben a 16. órában expresszióbéli csökkenés volt kimutatható, míg a májban szintén a 16. órában következett be szignifikáns csökkenés, de csak a 5 µg AFB1 + 110µg DON csoportban (Kövesi et al. 2020).

Tilápia májában 2 hétig adagolt 16 µg/kg AFB1 mennyiség szignifikánsan megemelte az MDA szintjét, illetve patológiai elváltozások is megfigyelhetőek voltak, ám a SOD, a GPX és a CAT szint nem változott statisztikusan bizonyítható mértékben. 12 hétig tartó 100 µg/kg AFB1 adagolás viszont szignifikánsan megemelte a tilápia májban a GPx és a GST gének expresszióját. Ezzel összefüggésben kisebb növekedési erély és májkárosodás is társult (Bacou et al. 2021). 3000 µg/kg AFB1 hosszan tartó (84 nap) etetése a lipidperoxidáció mellett (szignifikáns SOD és CAT szint emelkedés) comet assay-vel mért TM paraméterben szignifikáns DNS károsodás volt megfigyelhető (Hassan et al. 2020). Tilápia vesében kromoszóma-aberrációt okozott a 4 hétig tartó 1,6 µg/kg szterigmatocisztin adagolása (Zingales et al. 2020).

Harminc napig tartó, patkányokon, szterigmatocisztinnel (0,2-0,3-0,4 mg/testtömeg kg) végzett etetési kísérlet során a SOD és a glutation peroxidáz mennyisége szignifikánsan megnőtt a kezelt csoportokban, míg a kataláz és a redukált glutation szintje szignifikánsan növekedett. A lipidperoxidációt jelző MDA, konjugált diének, illetve lipid-hidroperoxidáz paraméterek szintje is szignifikánsan emelkedett a szterigmatocisztin hatására. Már a legkisebb dózis esetében is a hepatociták súlyos elváltozást mutattak, nekrozist, illetve a Kupffer sejtek proliferációját detektálták a kutatók (Sivakumar et al. 2001).

Szívárványos pisztráng embriók 50 ppb AFB1 expozíciója esetében megnövelte a máj karcinogén elváltozások gyakoriságát (Tilton et al. 2005).

Indiai pontyok (*Catla catla*) esetében 9 hónapig tartó 2,5 mg/testtömeg kg AFB1 expozíciót követően számos szerv (máj, vese) léziók által károsodott, patológiás elváltozások voltak megfigyelhetők az agyban, szívben és az emésztőrendszerben. A máj felszínén sárga színű kinövések mutatkoztak. (Santacroce et al. 2008).

Abedi & Scott (1969) tizenhárom mikotoxint hasonlítottak össze zebradánió (*Danio rerio*) lárvákra gyakorolt toxikus hatásuk alapján. Legtoxikusabbak az AFB1, illetve a szterigmatocisztin mikotoxinok bizonyultak 0,44 és 0,24 µg/ml koncentrációban (LC50). Specifikus morfológiai elváltozásokat is okoztak a vizsgált stemfon mikotoxinnal egyetemben. Az AFB1 a láva farkában okoz deformitást, illetve az egész testre kiterjedő szabálytalan hajlított íves testforma alakul ki, míg a szterigmatocisztin laterális test orientációt hozott létre.

In vitro brojlercsirke limfocitákon végzett kísérletben 10, illetve 20 µg/ml AFB1 koncentrációban szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét a 72. órában. 24 órát követően mindhárom kezelt csoportban (1, 10, 20 µg/ml) szignifikánsan megnövekedett a detektálható kettős szálú DNS töredékek, illetve a ROS mennyisége is. Az 1 és 10% β-glükán adagolása a töredékek mennyiségét képes volt statisztikailag bizonyítottan csökkenteni. Comet assay-vel végzett vizsgálat során a TM paraméter esetében 20 µg/ml AFB1 koncentráció szignifikáns (100%-ot megközelítő) DNS károsodási szint emelkedést eredményezett (Zimmermann et al. 2015).

Williams és munkatársai (2011) összehasonlították a pulyka-, illetve a tyúktojásokban fejlődő embriók májában keletkező DNS károsodás mértékét egyszeri 0,062 és 6,2 µg AFB1 injektálását követően a 4. órában, majd a 4. napon. Az embriók túlélési aránya mindkét fajban, mindkét időpontban szignifikánsan csökkent a nagyobb dózisú csoportban. Comet assay fark hossz paraméter esetében a pulyka (35%) és a tyúk (37%) fajban is szignifikáns mértékben

növekedett a nagyobb dózisú csoportban. Ugyanez a trend rajzolódott ki az OTM paraméter esetében is. Szintén a nagyobb dózisú csoportban volt szignifikánsan magasabb az üstökös farok hossz értéke a pulyka (32%) és a tyúk (35%) fajokban a kontroll értékeihez viszonyítva. A két időpontot összehasonlítva, a pulyka faj esetében mindkét paraméterben csökkenést detektáltak az idő előrehaladtával, ám ez a tyúk faj esetében csak az üstökös farok hossz paraméterre igaz (Williams et al. 2011).

Brojlersirkéket 28 napig etettek naponta 54 µg/testtömeg kg AFB1-vel, a kísérlet során a mindegyik mintavételi napon (7., 14., 21., 28.) kisebb testtömeggel rendelkeztek a madarak a kontroll csoportok értékéhez képest. Két hetes AFB1 etetés hatására a májban intenzív patológiás elváltozások alakultak ki, mint a hidropikus degeneráció és a vérerek pangása. Az epevezeték hámsejtjeinek proliferációja és hepatociták nekrotikus elváltozása is látható volt. A 28. napon a hepatociták súlyos mikrovaszkuláris elzsírosodása (steatosis) alakult ki. A májsejtek immunhisztokémiai festése során az apoptózisban részt vevő fehérjék (p53, Bcl-2, COX-2) expressziója kimutatható volt (Solcan et al. 2013).

Humán (HepG2) sejtvonalon az AFB1 dózis-függő módon növelte a DNS fragmentációját comet assay-vel vizsgálva, amit a reaktív oxigén gyökök szintjének emelkedésével magyaráztak, emellett aflatoxin DNS adduktokat is képzett e sejtvonalon (Gacem et al. 2020). Szintén *in vitro* HepG2 humán sejtvonalon végzett comet assay-vel az AFB1 egy- és kétszálú DNS töredezettség kialakításának képessége is kimutatásra került. 3 és 5 µmol/l AFB1 72 órás expozícióját követően szignifikánsan növekedtek a comet TM paraméter értékei (Gursoy-Yuzugullu et al. 2011). Szintén e sejtvonalat vizsgálva, 1 órás 1,5, 3 és 6 µM koncentráció szignifikánsan megnövelte a 8-hidroxideoxi-guanozin mennyiségét, illetve a DNS fragmentáció mértékét. Ezen káros hatások hátterében a szignifikánsan magasabb ROS szint állhat (Gao et al. 2015).

Az aflatoxin B1 DNS-re gyakorolt káros hatásában, főként adduktok képzése esetében a NER (nukleotid-kivágó javítás) folyamatok lényegesek. Humán fibroblaszt sejtek esetében kimutatható volt az AFB1-guanin adukt mennyiségi csökkentésének gátlása, illetve az AFB1-formamidopirimidin intenzívebb akkumulációja XPA gén hiányában, normál sejtekhez viszonyítva (Leadon et al. 1981). Egerek esetében az XPA hiányban szenvedő alanyokban 2-6-szor nagyobb gyakorisággal fordult elő máj tumor, mint a heterozigóta vagy a vad típusú alanyokban (Bedard & Massey 2006).

Átfogó, csirkékkel végzett kísérletsorozatban a megállapított letális dózis 50 (LD50) érték 11,0, illetve 14,0 mg/kg egyszeri intraperitoneális adagolás esetén, mely értékek különbözősége mögött a szterigmatocisztin tisztaságának eltérése állhat. A szövettani elemzés során izomszövet nem volt érintett a szterigmatocisztin hatás által, kisebb elváltozások a tüdőben, a hasnyálmirigyben következtek be. Súlyos változások a vesében és a májban mutatkoztak: bevézések, kapillárisok sérülése, fibroblasztikus proliferáció, a centrális véna bővérősége (Sreemannarayana et al. 1987).

Patkányok hosszan tartó (52 hét) etetési kísérlete során 2,5 mg/kg szterigmatocisztint fogyasztó csoportból 8 patkány pusztult el az 5. és 18. hét között. A makroszkópos vizsgálat megállapította a patkányok máj degenerációját, illetve különböző méretű csomók megjelenését a máj felszínén. Szövettani vizsgálat az 5. héten elpusztult állatok esetében masszív máj nekrozist állapított meg a májsejtek szerkezetének megváltoztatása mellett. Vérbőség az egész májszövetet jellemezte. A 7. héten elpusztult állatok mája kisebb mértékű degeneratív elváltozásokat mutatott. A májsejtek különböző mértékű zsíros elváltozásokat produkáltak. Jellemző eltérés a hepatociták méretének változása, legtöbb esetben a sejtmag mérete duplájára növekedett. A 14. és 18. hét között elpusztult patkányok esetében a májak a 7. héten tapasztalt elváltozásokat mutatták, ám a májon kívül más szervben nem mutatkozott már eltérés. Az egész kísérletet túlélő patkányokban az összes csoportban (0,15-2,25 mg/kg szterigmatocisztin) nagy arányban találtak máj karcinómát, fibrózist, illetve hiperplasztikus májelváltozásokat (Purchase & van der Watt 1970).

CHO-K1 (kínai hörcsög petefészek) sejtvonalon az AFB1 dózis-függő módon növelte a DNS fragmentációját comet assay-vel vizsgálva, amit a reaktív oxigén gyökök szintjének emelkedésével magyaráztak, emellett aflatoxin DNS adduktokat is képzett e sejtvonalon (Gacem et al. 2020). Szintén *in vitro* CHO-K1 humán sejtvonalon végzett comet assay-vel az AFB1 egy- és kétszálú DNS töredezettség kialakításának képessége is kimutatásra került. 3 és 5 µmol/l AFB1 72 órás expozícióját követően szignifikánsan növekedtek a comet TM paraméter értékei (Gursoy-Yuzugullu et al. 2011). Szintén e sejtvonalat vizsgálva, 1 órás 1,5, 3 és 6 µM koncentráció szignifikánsan megnövelte a 8-hidroxideoxi-guanozin mennyiségét, illetve a DNS fragmentáció mértékét. Ezen káros hatások hátterében a szignifikánsan magasabb ROS szint állhat (Gao et al. 2015).

CHO-K1 (kínai hörcsög petefészek) sejtvonalon az AFB1 dózis-függő módon növelte a DNS fragmentációját comet assay-vel vizsgálva, amit a reaktív oxigén gyökök szintjének emelkedésével magyaráztak, emellett aflatoxin DNS adduktokat is képzett e sejtvonalon (Gacem et al. 2020). Szintén *in vitro* CHO-K1 humán sejtvonalon végzett comet assay-vel az AFB1 egy- és kétszálú DNS töredezettség kialakításának képessége is kimutatásra került. 3 és 5 µmol/l AFB1 72 órás expozícióját követően szignifikánsan növekedtek a comet TM paraméter értékei (Gursoy-Yuzugullu et al. 2011). Szintén e sejtvonalat vizsgálva, 1 órás 1,5, 3 és 6 µM koncentráció szignifikánsan megnövelte a 8-hidroxideoxi-guanozin mennyiségét, illetve a DNS fragmentáció mértékét. Ezen káros hatások hátterében a szignifikánsan magasabb ROS szint állhat (Gao et al. 2015).

citotoxikus hatás következett be szterigmatocisztin+patulin együttes kezelés esetében. Már kis koncentrációban (0,780 μ M + 0,049 μ M) megmutatkozott a szinergikus hatás, ami magyarázható a mindkét mikotoxinra jellemző oxidatív stresszt kiváltó hatással és az ebből kibontakozó toxikus mechanizmusokkal. Ugyanez állapítható meg szterigmatocisztin+beauvericin keverék esetében is az 1. és a 2. napon. A szterigmatocisztin+patulin+beauvericin keverék citotoxikus hatása pedig mindegyik mikotoxin egyedüli hatását felülmúlta nem meglepő módon (Zouaoui et al. 2016).

A mitokondrium nagyon fontos szereplője az apoptózisnak, a membrán permeabilitás növekedése, illetve a mitokondrium membrán potenciál csökkenése által az apoptózis folyamatára lehet következtetni. HepG2 sejtekben a 0,01 μ mol/L szterigmatocisztin koncentráció már szignifikánsan csökkentette a membrán potenciált, míg az AFB1 0,1 μ mol/L koncentrációban. A mikotoxinok együttes alkalmazásában minden koncentrációban csökkentették a membrán potenciált. Az apoptózisban részt vevő fehérjék (Bcl-2, Bax) expressziója azonos mértékben növekedett az AFB1, a szterigmatocisztin, illetve ezen mikotoxinok együttes adagolása esetében is (Liu et al. 2014).

2.2. DNS károsodás és annak összefüggései

Az antioxidáns rendszer hivatott szabályozni a szabadgyökök mennyiségét, a sejtben fennálló egyensúly (reaktív szabadgyökök keletkezésének és eliminálásának egyensúlya) megtartása révén. Fiziológiai körülmények között szabadgyökök, mint a sejt alapvető anyagcsere melléktermékeként keletkeznek. Többek között a mitokondrium oxidatív metabolizmusa, elektrontranszportja során, az endoplazmatikus retikulum fehérjék hajtogatása során, a citokróm P-450, illetve egyéb oxidatív enzim (pl.: xantin-oxidáz, NADPH-oxidáz, poliamin-oxidáz) működése során (Juránek et al. 2013, Zhang et al. 2016, Srinivas et al. 2019). Azonban az ellenőrizetlen szabadgyök termelés – például mikotoxinok, illetve egyéb xenobiotikumok hatásai által – megbontja az egyensúlyt a szabadgyök képződés és az elimináció között. Ezáltal alakul ki az oxidatív károsodás, az oxidatív stressz állapota. Az oxidatív stressz elsődlegesen a szabadgyökök (ROS és RNS - reaktív nitrogénygyökök) megnövekedett szintjének következménye. A szabadgyökök túlermelődése jóval inkább egy következmény, mint a szövet károsodásának oka (Hemnani & Parihar 1998, Juránek et al. 2013). A ROS képesek megváltoztatni egyes folyamatokat a károsodott szövetben, illetve markerként, hívívőként lehetnek jelen az intracelluláris jelzőrendszerben, kommunikációban, ezáltal a sejt homeosztázisában is közrejátszanak (Bouaziz et al. 2008; Juránek et al. 2013). A megnövekedett ROS következménye az abnormális mitokondrium autofágiájának elindítása, ezzel védelmezve a környező szomszédos mitokondriumokat és sejteket (Zorov et al. 2014). Az elektrontranszfer diszfunkciója megnövekedett ROS képződéshez vezethet. Az oxidatív stressznek szerepe van nemcsak az apoptózis indukálásban, hanem a sejt proliferációban, illetve a jelátadásban is (Juránek et al. 2013).

Az oxidatív stressz következtében számos negatív folyamat játszódik le, az egyik legintenzívebben kutatott terület a lipidperoxidáció, a DNS károsodása, a DNS javító mechanizmusok, az apoptózis, illetve ezen folyamatok összefüggései (Hemnani & Parihar 1998, García-Medina et al. 2013).

A szervezet különböző enzimek segítségével képes az oxidatív stresszt, illetve a normál anyagcsere során kialakuló károsodásokat csökkenteni, megszüntetni. Ezeket döntően három csoportba lehet osztani: speciális antioxidáns enzimek (pl.: szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz), kis molekulatömegű nem enzimikus antioxidánsok (pl.: glutation, E-vitamin, C-vitamin, szelén), illetve specifikus lebontó enzimek (pl.: proteázok, peptidázok, endo-, exonukleázok, ligázok) (Hemnani & Parihar 1998, Juránek et al. 2013). Egyéb ROS jelátviteli útvonal is előtérbe került az elmúlt időszakban, ilyen például MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskád, a PI3K (phosphoinositide-3-kinase)-Akt útvonal, illetve a Keap1-Nrf2-ARE (antioxidant response element) útvonal is. Fiziológiai körülmények között a Keap1 gátolja az Nrf2-t, ám ROS szintemelkedés esetében a két fehérje szétválék egymástól, kinázok sora aktiválódik (pl.: protein kináz C), Nrf2 foszforilációját követően kapcsolódik az ARE-hoz, így vesz részt a redox rendszer védelmét szolgáló enzimek létrejöttében (Zhang et al. 2016).

A SOD, illetve a CAT a legjelentősebb szabadgyök elimináló enzimek közé tartoznak, mennyiségük változása döntően a szövetben bioaktiválódó xenobiotikum hatására következik be. Ezáltal képezik az első védelmi vonalat a szabadgyökök ellen. A szuperoxid-dizmutáz katalizálja a szuperoxid gyök diszmutációját oxigén és hidrogén-peroxid vegyületekké. A megnövekvő SOD aktivitás jelzi a szuperoxid gyök mennyiségének emelkedését (Zhang et al. 2016, Gonzalez-Hunt et al. 2018). A SOD aktivitás csökkenése a fehérjeszerkezet közvetlen károsodása miatt következhet be, ami a hidrogén-peroxid mennyiségének növekedését hozza magával. A kataláz feladata a H_2O_2 (hidrogén peroxid) detoxikálása vízzé, így a kataláz aktivitás növekszik, amennyiben a SOD aktivitás által a szövetben jelenlévő H_2O_2 szintje megnő.

A glutation (GSH) a legfőbb tiol-diszulfid puffer, ami részt vesz a sejt redox rendszerének optimális fenntartásában. Az oxidatív stressz mértékével arányosan a redukált glutation állomány egyre nagyobb része oxidálódik, a stressztűrő képességgel arányosan pedig az oxidált forma visszaalakul redukált glutationná a glutation-reduktáz fokozott működése révén. A GSH kimerülés jelentkezésének számos oka lehet, például megnövekedett ROS szint, mitokondriális diszfunkció, apoptózis folyamat elindulása (Gonzalez-Hunt et al. 2018).

Az oxidatív károsodás ellen fennálló elsődleges vonalba tartozik a glutation-reduktáz (GR). A GR hatékonyan képes szabályozni a szabad gyökök képződését, ezáltal a SOD és CAT enzimekkel együttvéve a szabadgyökök akkumulációját képes megakadályozni (Chaudhari et al. 2009). A szeléntartalmú glutation-peroxidázok az antioxidáns védőrendszer enzimatis alkotói közé tartoznak, nagy affinitást mutatnak a H_2O_2 iránt, így feladatuk a hidrogén-peroxid eltávolítása. A glutation-S-transzferáz (GST) szerepe lényeges, mivel a xenobiotikumok, illetve az oxidatív stressz fellépése során keletkező káros anyagcsere termékek inaktivációjában vesz részt, ezáltal a stresszre adott sejtválaszban, a sejt proliferáció és az apoptózis irányításában is (Hemnani & Parihar 1998).

A ROS kapcsolatba lépnek makromolekulákkal, melyekben oxidatív változásokat idéznek elő, mely által elveszítik elsődleges funkciójukat. Ilyen makromolekulák a nukleinsavak, lipidek és fehérjék is (Zhang et al. 2016).

A normális metabolizmus során is létrejönnek különböző oxigént tartalmazó reaktív gyökök, mint a szuperoxid gyök (O_2^-), a hidroxil-gyök (OH \cdot), a peroxinitrit (ONOO $^-$), a hipoklórossav (HClO). A szabad gyökök közül a szuperoxidnak, illetve a hidrogén-peroxidnak alacsony a kémiai reaktivitása, ezáltal nem lépnek kapcsolatba biológiai molekulákkal, mint a DNS, fehérjék vagy lipidek. A szuperoxid gyökből hidrogén-peroxid (H_2O_2) keletkezik a szuperoxid-dizmutáz által, ám a sejtben egyéb enzimek, főként oxidázok is létrehozhatnak H_2O_2 -t. A hidrogén-peroxidból vízzé alakul a kataláz és a glutation-peroxidáz segítségével. Haber-Weiss reakció játszódik le, ha a H_2O_2 szuperoxid gyökkel lép reakcióba, mely következtében többek között hidroxil-gyök jön létre. Átmeneti fémek oxidációja során is létrejönnek hidroxilgyökök (Fenton reakció) (Dizdaroglu 2012, Jena 2012, Zorov et al. 2014). Halogének esetében a miel-peroxidáz képes katalizálni a H_2O_2 és a klór kation reakcióját, mely során szintén keletkezik hidroxil-gyök.

A DNS oxidatív károsodása során kapcsolatba kerül reaktív oxigén szabadgyökökkel, főként hidroxil-szabadgyökökkel, melyek károsítják a heterociklikus DNS bázispárokat és a cukormolekulákat is. A mitokondriális DNS érzékenyebb az oxidatív stressz által indukált károsodásra a genomi DNS-hez viszonyítva, illetve a kialakult károsodás hosszabb ideig áll fenn (Edwards 2009). Az ionizáló sugárzás során szabadgyökök mellett szabad hidrogén atom és elektron ion is generálódik, amely a bázispárok kettős kötéseire hatva módosításokat visz véghez. A hidroxil szabadgyök a DNS purin és pirimidin váz kettős kötéseivel lép reakcióba, elvonva a hidrogén atomot.

A purin bázisokhoz a hidroxil gyök különböző pozíciókban képes kapcsolódni. A guanin rendelkezik a legkisebb oxidációs potenciállal, ezért számos reaktív gyök képes befolyásolni. A guanin esetében C4-OH-, C5-OH- és C8-OH-, míg adenin esetében C4-OH- és C8-OH- adduktról beszélhetünk. Az adenin C5 atomjához történő szabadgyök kapcsolódás gyakorisága elhanyagolható mértékű (5% alatti). A létrejött OH-addukt gyök különböző redox

tulajdonságokkal bír. A C5-OH-, illetve a C8-OH-addukt gyökök redukálódnak, míg a C4-OH-addukt gyök oxidálódik. A C4-OH-addukt guanin gyök reakciói lassúak. A purin C8-OH-addukt oxidálódni és redukálódni is képes.

Egy elektron oxidálásával 8-hidroxiadenin (8-OH-Ade), illetve 8-hidroxi-guanin (8-OH-Gua) jön létre, melyek stabil köztestermékek mondhatóak. További oxidáció után alakul ki a 8-oxo-guanin (8-oxoG), amely nagy gyakorisággal élő sejtéből is kimutatható (Dizdaroglu 2012, Jena 2012). A 8-oxoG kialakulását számos szabadgyök is előidézheti a guanin oxidálásával, mint a hipoklórossav vagy a peroxinitrit (Jena 2012). Egy elektron és egy proton elvesztésével a guanin semleges gyökké alakul, mely további oxidált forma (imidazonon) kialakulásához vezet. Az imidazonon víz segítségével oxazolonná alakul (Jena & Mishra 2012).

Egy elektron redukálással az imidazol gyűrű felnyílik és kialakul a FapyAde (4,6-diamino-5-formamidopirimidin) vagy a FapyGua (2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidin). Mindkét forma (redukált és oxidált) oxigén hiányában, illetve jelenlétében formálódhat. Ám a formamidopirimidinek különböznek a pirimidinektől (pl.: citozin, timin), mivel a cukor egységhez a pirimidin gyűrű C6-os pozíciójában lévő amino-csoporttal kapcsolódnak. Az elmúlt két évtizedben a legtöbb figyelmet a 8-OH-Guanin kapta erős mutagenitási tulajdonsága miatt. Oxidáló anyagok, reagensek (pl.: szinglet oxigén, fém ionok) a guanint, illetve egyéb formáit (pl.: 8-OH-Gua) oxidálva hidantoin terméket hoznak létre, a spiroiminodihidantoint (Sp). A 8-OH-Gua további oxidálása az 5-guanidinohidantoin (Gh) kialakulásához vezet (Dizdaroglu 2012).

A bázisok áteshetnek nitrálásra és halogénezésre is. A nitrogén-oxidra (NO[•]) szükség van a makrofágoknak, hogy patogéneket képesek legyenek eliminálni, ám szuperoxid gyökkel kapcsolatba lépve peroxinitrit szabadgyök jön létre, ezáltal a reaktivitás is megnő. A nitrogén-oxid nem képes hatni a guaninra, ám a ONOO⁻ a guaninból igen letális terméket, a 8-nitroguanint (8-NO₂G), illetve a 5-nitro-guanidinohidantoint (NI) hozza létre. Abban az esetben, ha a szabadgyök centruma a C8 pozícióban található, az előbbi termék, míg a C5 központ esetében az utóbbi termék alakul ki (Jena 2012). A halogénezett összetevők (pl.: hipobrómosav (HOBr), hipoklórossav (HClO)) szintén képesek megváltoztatni a DNS szerkezetét és funkcióját. Nagyobb mennyiségben a hipoklórossav található meg a sejtben, mely a guaninnal reakcióba lépve 8-kloroguanint (8-ClG) képez.

A DNS áteshet alkilálásra többek között kemoterápiás szerek, alkil-szulfát, alkil-szulfonát, haloalkánok, diazo vegyületek, nitrózaminok, illetve nitrogén-mustár hatására (Jena 2012). A guanin alkilálása következtében 1-metilguanin, 3-metilguanin, O6-metilguanin, 7-metilguanin, 8-metilguanin, 1,2-etilguanin és 2,3-etilguanin is keletkezhet (Shrivastav et al. 2010.) Ám mind közül az N7 pozíció tekinthető legreaktívabbnak az alkilálás számára.

A pirimidin bázisok károsodása során a hidroxil gyök a citozin és a timin C5 és C6 atomjai között fennálló kettős kötést bontja fel, így létrehozva a C5-OH- és a C6-OH-adduktokat (Hemnani & Parihar 1998, Dizdaroglu 2012). A timin esetében a H-eltávolítás a metil-csoportból történik, ami által allil gyök jön létre. A hidroxil gyök 60%-ban a legnagyobb elektrondenzitású C5 atomot támadja, 30%-ban a C6 atomot, míg 10%-ban a metil-csoportot. A citozin esetében a szabadgyök a C5 pozíciójú atomot támadja 87%-ban a magas elektron denzitás miatt, míg csupán 13%-ban a C6 atomot. A pirimidinek kialakuló C5-OH-, illetve C6-OH-adduktjai redukáló és oxidáló tulajdonságokkal is bírnak. A timinallal gyök oxidációt követően 5-(hidroximetil)uracil, ismételt oxidáció után pedig 5-formiluracil keletkezik. Oxigén hiányában 5-hidroxi-6-hidropirimidin és 6-hidroxi-5-hidropirimidin keletkezik C5-OH- és a C6-OH-adduktok redukcióját követően. Oxigén jelenlétében több termék jöhet létre, melyek szabadgyökökkel reakcióban instabil és szétbomló peroxil gyökök képeznek. Például a hidroxihidroperoxidok bomlásakor 5-hidroxihidantoin, 5-6-dihidroxicitozin jön létre. A cisztein glicin (Cyt gly), illetve egyéb cisztein termék vizet von el és dezaminál, így hozva létre termékeket, mint az 5-hidroxiciszteint, uracil-glicint, 5-hidroxiuracilt, az 5-hidroxi-6-hidouracilt és az 5-6-dihidroxiuracilt.

A szabadgyökök a DNS cukor egységét is képesek módosítani, károsítani, mivel a cukor gyűrű mind az öt szénatomjáról elvonnak H-t, ezáltal számos termék jöhet létre (Dizdaroglu 2012, Srinivas et al. 2019). A szabad cukor léziók származhatnak a DNS-ből, mint töredékek, a károsodott cukor egységek maradhatnak a DNS részei, illetve alkotják az eltört DNS szál végpontját. A C4 gyök a DNS-en belül 2-deoxipentóz-4-ulózt hoz létre, szálszakadás jön létre 2,3-dideoxipentóz-4-ulóz kialakulásakor, illetve, ha a 2,3-dideoxipentóz-4-ulóz a 3' és 5' végben is elhelyezkedik. A 2,3-dideoxipentóz-4-ulóz és a 2,5-dideoxipentóz-4-ulóz kialakulását az oxigén jelenléte gátolja, viszont 2-deoxipentóz-4-ulóz oxigén hiányában és jelenlétében is létrejöhet. A törést szenvedő cukor gyűrű termékek eritrózt, illetve 2-deoxitetradialdózt is formálhatnak (Hemnani & Parihar 1998, Dizdaroglu 2012).

A bázisok sérülése tandem léziók kialakulásával is megvalósulhat, ha reakcióba lép egymással két módosult termék. Ezen bázisok lehetnek szomszédosak ugyanazon a szálon, kapcsolódhatnak keresztkötésekkel (cross-link) egy szálon belül, illetve két szál között is (Dizdaroglu 2012, Jena 2012). A keresztkötésekkel létrejövő termékek feltételezhetően mutagének, blokkolják a DNS megkettőződését és a transzkripciót. A kialakuló purin-purin, pirimidin-pirimidin, illetve purin-pirimidin keresztkötések torzítják a DNS szerkezetét. Kialakulhat keresztkötés egy guanin N2 és egy szemben elhelyezkedő guanin C2 atomjai között, mely termodinamikailag stabil marad. Timin gyök képes összekapcsolódni az azonos szálon elhelyezkedő szomszédos guanin és adenin C8 atomjával, így létrehozva a guanin-timin (G[C8-C5]T) és az adenin-timin (A[C8-C5]T) párokat. Megfigyelték, hogy ha a timin C6 pozíciójában található hidroxil-gyök, akkor szálon belüli keresztkötés jön létre timin és guanin között (T[C5-C8]G). Eltérő pozíciójú keresztkötések által kialakulhat citozin-guanin addukt is (C[C5-N2]G, G[C8-C5]C). Bázis-cukor keresztkötések is formálódhatnak a cukormolekulából történő hidrogén elvonás által. Letális azonos szálú keresztkötéssel jön létre a 8-5'-ciklodeoxiguanizin. (Jena 2012).

Speciális károsodásról beszélhetünk a cluster károsodás, illetve a DNS-fehérje kapcsolódások esetében. A cluster szakaszok, azaz olyan sérülések, ahol több károsodás egy adott szakaszon, egymás közelében helyezkedik el, a DNS esetében kettő vagy annál is több sérülés található ugyanazon vagy a szemközti szálon. Többszálú, illetve tandem clusterek ellenállóak a DNS javító mechanizmusnak, így jelentős ideig fennmaradhatnak a sejtben. Mindkét szálát érintő clusterek előidézhetik a DNS kétszálú törését.

A DNS-fehérje keresztkötések kialakulásának több oka is ismeretes. Okozhatják szabadgyökök (hidroxil-gyök) vagy kemoterápiás készítmények, melyek a DNS-re, illetve a fehérjékre is kihatnak, a DNS replikációja és rekombinációja, illetve a DNS károsodást javító bázis kivágó javító mechanizmus is. A DNS-fehérje komplexek negatívan kihatnak a DNS megkettőződésre és transzkripciójára (Dizdaroglu 2012, Jena 2012). A timin és tirozin kapcsolódását mind *in vivo*, mind *in vitro* kimutatták már emlősökön, illetve emlős sejtvonalakon. A kovalens kötés a timinallil gyöke és a tirozin gyűrű C3 pozíciója között alakul ki. *In vitro* emlős kromatinból kimutatható volt a timin-lizin, illetve citozin-tirozin kapcsolódása (Dizdaroglu 2012). Ha a guanin C5 pozíciója oxidálódik, akkor lizinnel összekapcsolódva formálhatják az 5-Lys-Sp komplexet, míg a guanin oxidációja a C8 pozícióra hat ki, 8-Lys-Guanin jön létre, mely további oxidációt követve 8-Lys-Sp-vé alakul.

A ROS fokozzák a mitokondrium membrán áteresztőképességét, ami által proapoptotikus molekulák (pl.: endonukleáz G) áramolhatnak a citoplazmába. Az AIF a citoszolba átjutva a sejtmaggal kerül kapcsolatba, ahol nagymértékű DNS fragmentációt, töredezettséget vált ki (Chaudhari et al. 2009).

A DNS fragmentek egy- és kétszálú DNS töredékekből származhatnak, illetve a kivágó mechanizmusok, az oxidált bázisok javításából is (Frankič et al. 2006).

2.3. DNS javító mechanizmusok

A DNS károsodás válasz útvonala (DDR, DNA damage response signaling pathway) a károsodásra bekövetkező reakciók sokaságát jelenti. Résztét képezi a DNS sérülés felismerése,

hírvívő, illetve DNS javítási mechanizmusok aktiválása, esetlegesen a sejtciklus megállítása, apoptózis előidézése (Sottile & Nadin 2018, Srinivas et al. 2019) illetve az autofágia aktiválása (Galati et al. 2019). Az ATM (ataxia telangiectasia mutated), illetve a DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) fehérjék felelősek a kettős szálú DNS károsodás jelzéséért, míg az ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) az egyszálú DNS, illetve a replikációs villa sérülésének észleléséért felel (Galati et al. 2019, Bordin et al. 2021, Kloeber & Zhenkun 2021).

A DNS-t folyamatosan érik támadások, például reaktív gyökök által, melyek szerkezetileg és funkciójában is képesek befolyásolni azt. A léziók mutációk kialakulásához vezethetnek, főleg javítási folyamatok nélkül. A szervezet ezért kialakított mechanizmusokat, melyek képesek megkülönböztetni, majd kijavítani a kritikus DNS károsodásokat. Az oxidatív úton történő DNS károsodás javítása az élő sejtben következik be, melyben fehérjék nagy száma vesz részt (Dizdaroglu 2012, Kloeber & Zhenkun 2021). Másrészt viszont a DNS javító (repair) mechanizmusok nem mindig képesek a teljes javításra, így néhány mutáció fennmaradhat. Azon mutációk, melyek ártalmatlanok, nem érintenek lényeges géneket, illetve nem érintik a sejt normál működését. Abban az esetben, ha a módosítások kiterjedtebbek, illetve nem következnek be javítás, a sejt apoptózis folyamatán esik át. A károsodott DNS szakaszok felismerésének, majd javításának hiánya káros folyamatok beindításáért lesz felelős, mint például a karcinogenezis (Jena 2012, Juránek et al. 2013).

A DNS javító rendszer felelős a DNS károsodások kiküszöböléséért, ám ha DNS javító gének szenvednek el mutációt, akkor a javító rendszer destabilizálódik. A DNS hibák kijavításának elmaradása vagy sikertelensége mutagén, citotoxikus folyamatokhoz, sejthalálhoz és karcinogenezishez vezethet. Ha a lézió nem kerül kijavításra a replikáció előtt, akkor a megkettőződésnek káros hatásai lehetnek. Ha a DNS szintézis gátlása következik be, akkor letális lézióról beszélhetünk, amely következtében beindul a programozott sejthalál. Ha tolerálható a károsodás, akkor a DNS polimeráz képes a lézióval (pl.: guanin lézió) szemben egy nem komplementer, de ép bázist kapcsolni (pl.: adenin).

A DNS polimeráz az új szálakat alkotja meg a szemben lévő szállal összevetve, ám létfontosságú a templát szál épsége. A DNS ligáz összekapcsolja a szintetizált vagy törött szálak végét (Jena 2012). A genetikai stabilitás fenntartása elengedhetetlen, így a helyreállító, javító mechanizmusoknak kiemelt szerep jut. Az oxidatív károsodást elszenvedő DNS léziók javítására szolgál a BER (bázis-kivágó javítás), illetve a NER. A mismatch javítás (MMR) a nem megfelelően illeszkedő bázispárokat javítja, illetve a DNS léziók és DNS bázisok kapcsolódását javítja, mely hibák a DNS replikáció során alakulnak ki döntően (Dizdaroglu 2012, Jena, 2012, Sottile & Nadin 2018, Srinivas et al. 2019). Ám mismatch-ek a bázis oxidációja, illetve alkilálódása során is kialakulhatnak (Sottile & Nadin 2018). A bázis reversal (BR) javítás az alkilálódott léziók javítását végzi (Jena, 2012).

A BER segítségével egyszerűbb, gyakori DNS léziók kerülnek kijavításra, mint a 8-oxoG, 8-OH-Guanin vagy a FapyG. A BER ezeken kívül a ROS által indukált egyszálú DNS töredezettséget is felismeri (Maiti et al. 2008, Sottile & Nadin 2018). A folyamat során a DNS glikoziláz hidrolizálja a N-glikozidos kötést, ezáltal eltávolításra kerülnek a sérült nukleotidok a cukor-foszfát szakaszból, létrehozva egy AP oldalt (apurin-apirimidin). Az AP-endonukleáz képes hidrolizálni a 3'-foszfodiészter kötést az AP oldalon, aminek következtében 3'- α,β telítetlen aldehid és 5'-foszfát termék jön létre, ezáltal alakulhatnak ki a láncszakadások, törések. A DNS polimeráz pótolja a hézagot egy új nukleotid szintetizálásával. Végül a DNS ligáz összeköti és stabilizálja a DNS szálak végeit (Carusillo & Mussolino 2020, Bordin et al. 2021).

A DNS glikozilázoknak 2 fő családja ismeretes: a Fpg/Nei, illetve a Nth szupercsalád. Az Fpg/Nei családba tartozik az Fpg (formamidopirimidin DNS glikoziláz), amely kivágja a FapyAde, FapyGua és 8-OH-Gua hibákat. Ebbe a családba tartozik a Nei (endonukleáz VIII) is, amely a pirimidin léziókat, illetve a FapyAde-t javítja. A NEIL1, NEIL2 és NEIL3 Nei-hez hasonló DNS glikozilázok. NEIL1 és NEIL3 számára a FapyAde, illetve a FapyGua tekinthető a legjelentősebb szubsztrátnak, ám a NEIL1 pirimidin léziók eliminálásában is szerepet játszik. A NEIL1 szintjének szignifikáns csökkenése megnövelte a spontán mutációk számát humán

sejtvonal mellett kínai hörcsög sejtvonalban is (Hemnani & Parihar 1998, Maiti et al. 2008). A NEIL3 kivágja az 5-OH-Uracil és az 5-OH-Citozin hibákat, ezen felül a NEIL1-hez viszonyítva hatékonyabban távolítja el a timin-glikol és az 5-OH-5-MeHyd (5-hidrodi-5-methylhidantoin) léziókat a DNS-ből. A NEIL1, illetve a NEIL3 nem mutat aktivitást 8-OH-Guanin esetében. A NEIL2 leginkább 5-OH-Uracil, 5-OH-Citozin és 5,6-dihidouracil léziókat képes javítani. Az Nth (endonukleáz III) az Nth szuperfamilia tagja, amely szintén FapyAde-t és pirimidin léziókat távolít el. Ehhez a családhoz tartozik az Fpg funkcionális homológja, mint az OGG1 (8-hidroxi-guanin DNS glikoziláz), mely FapyGua és OH-8-Gua léziókat képes specifikusan felismerni, ám nem vágja ki a Gh vagy Sp léziókat (Dizdaroglu 2012).

A NER felelős a kiterjedt DNS károsodás, illetve a DNS hélix szerkezetét torzító léziók javításáért, mint például a DNS keresztkötések. Ezen kívül timidin dimerek javításáért is felel (Sottile & Nadin 2018, Srinivas et al. 2019). Ezt két eltérő mechanizmussal végzi el, a globális genom javítás (GG-NER), illetve a transzkripció-kapcsolt javítás (TC-NER) által (Dizdaroglu 2012, Sottile & Nadin 2018, Carusillo & Mussolino 2020). Lényegében az egyszálú DNS egy hosszabb darabját vágja ki, mely tartalmazza a károsodott nukleotidot (Jena 2012). A NER javítja a timin-glikol és 8-OH-Guanin léziókat, de képes a 8,5'-ciklopurin-2'-deoxinukleozid javítására is, melyhez a 8,5' helyzetű kovalens kötés miatt a BER nem érhet el (Dizdaroglu 2012).

Az oxidatív károsodás következtében egyszálú és kétszálú károsodás is bekövetkezhet. Az egyszálú törések, illetve károsodások keletkezhetnek DNS replikáció, replikációs villa, illetve transzkripció folyamatok gátlása, meghibásodása esetében, oxidatív stressz, illetve külső behatások révén (pl.: sugárzás) (Carusillo & Mussolino 2020). Ezen károsodások egyszerűbb BER mechanizmusok által kerülnek javításra. A kétszálú törések helyrehozatala történhet homológ rekombinációval (HR), illetve nem homológ vég-vég illesztéssel (Sottile & Nadin 2018, Srinivas et al. 2019, Kloeber & Zhenkun 2021). A nem homológ vég-vég illesztés esetében H2AX hiszton aktiválja a DDR (DNA damage response) folyamatokat, majd a két DNS töredék véget a Ku70-Ku80 dimer köti meg, mely folyamat a homológ rekombináció antagonistája. További lépésként a DNS-PK (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) komplex formálódik, foszforilálódik, ami aktiválja az XRCC4 (X-Ray repair cross-complementing protein) fehérjét, ami a DNS ligáz IV-el együtt végzi az összeilleszthető végek javítását. Abban az esetben, amikor a végek közvetlenül nem összeilleszthetőek, módosítást kell elvégezni közti lépésként, amit döntően a PNK (polynucleotide kinase) végez. Ha a módosítás nem kivitelezhető, azaz a nem homológ vég-vég illesztés nem funkcionális az adott károsodás esetében, a Ku70-Ku80 dimer leválik és a homológ rekombinációhoz kapcsolható faktorok aktiválása indul be. A homológ rekombináció során egy testvér kromatid válik templáttá, majd a javításban részt vesz többek között az MRN (MRE11-RAD50-NBS1/C-terminal-binding protein interacting protein) komplex, RPA (Replication Protein A) komplex, RAD51, illetve BRCA2 fehérjék is (Carusillo & Mussolino 2020).

A DNS bázis léziók lehetnek letálisak vagy mutagének, a DNS polimeráztól függően. Guanin-timin transzverzális mutáció történik 8-OH-Guanin, illetve FapyGuanin esetében, mivel hibásan adeninnel képesek kapcsolódni. A guanin-timin mutáció az egyik leggyakoribb szomatikus mutáció humán rák esetében. Adenin-timin transzverzió alakul, ha FapyAdeninnel kapcsolódik. A 8-OH-Adenin mind adenin-guanin, mind adenin-citozin transzverzió indukálására képes. Az Sp és a Gh többnyire adeninnel és guaninnel lép kapcsolatba, ezáltal alakítva ki guanin-timin, illetve guanin-citozin mutációkat. Pirimidin típusú léziók csoportjába tartozik az uracilglikol és az 5-OH-Uracil, melyek citozin-timin mutációt alakítanak ki, mivel adeninnel kapcsolódnak hibásan. A citozin-timin kapcsolódás az egyik leggyakoribb mutációnak tekinthető az oxidatív DNS károsodás során. Az 5-OH-Citozin citozin-timin mutáció mellett citozin-guanin párt is létrehoz. A timin-glikol helyesen adeninnel alkot párt, mely következtében mutagenitása csekély, viszont a DNS polimeráz számára sok esetben blokként viselkedik, így *in vivo* körülmények között letális.

A ki nem javított DNS léziók akumulálnak a genomban, így mutációk, majd különböző betegségek (pl.: rák) kialakulásához vagy apoptózishoz vezethetnek. A legtöbb oxidatív módon

előidézett DNS bázis lézió mutagének tekinthető. Mutációk a DNS javító génekben is felléphetnek, ezáltal destabilizálják a DNS-t javító mechanizmusokat. Erős összefüggés merül fel a karcinogenezis, illetve a DNS javító defektusok között.

A szervezet, így a sejt homeosztázisának fenntartásában kiemelt szereppel bír az apoptózis, azaz a programozott sejthalál, mivel általa eltávolításra kerülnek a károsodott, kimerült, illetve helyzetükben megváltozott sejtek.

Az apoptózis egy genetikailag irányított sejthalál típus, amivel együtt jár az intracelluláris proteázok és endonukleázok szétterjedése. A kaszpázok cisztein proteázok, melyek alapvető szerepet játszanak az apoptotikus válaszreakcióban. Az iniciátor kaszpázok (kaspáz-2, -8, -9, -10, -12) az apoptózis beindításában, az effektor kaszpázok (kaspáz-1, -3, -6, -7) pedig az apoptózis véghezvitelében látnak el feladatot. Az iniciátor kaszpázok az effektor kaszpázok proformáit hasítják, azáltal aktiválják azokat, míg az effektor kaszpázok a sejtben található fehérje szubsztrátokat hasítják. Egyes kaszpázok a citokineket aktiválják, ezáltal gyulladásszerű folyamatok indulnak el.

Az apoptózis döntően két apoptotikus útvonal által idézhető elő: intrinsic (mitokondriális; belső faktorok által kialakuló) és extrinsic (külső faktorok és receptorok által kialakuló) útvonal révén (Bouaziz *et al.* 2008, Jia *et al.* 2014). Mindkét láncolat végén a kaszpázok aktiválása történik. Az extrinsic útvonal a plazma membrántól indul, az itt található receptorokhoz kapcsolódnak a „halál ligandumok”, mint a tumor nekrozis faktor receptorhoz (TNF-R1) a TNF- α ligandum. A ligandum-receptor kötődés indukálja az egyes adapter fehérjék és proenzimek jelenlétének növekedését, majd a kaszpázok (döntően a kaszpáz-8 és -3) aktiválódnak, ezt követően bekövetkezik az apoptózis, a sejt halála.

Az intrinsic útvonal beindulása a sejtben bekövetkező károsodások következménye. Különböző extracelluláris és intracelluláris jelzések által zajlik le, például kiváltói lehetnek az oxidatív stressz, a fertőzések, a citokinhiány, illetve a DNS károsodás is. A p53 fehérje aktivációját követően az iniciátor kaszpáz-9 aktiválódik, amely aktiválja a kaszpáz-3 enzimet, ezáltal becsatlakozás történik az extrinsic úthoz (Jia *et al.* 2014). A p53, illetve p53 rokon fehérjék a kaszpáz-2 fehérjét is aktiválják (Zhivotovsky & Orrenius 2005). A kaszpáz-3, mint az egyik leghatékonyabb effektor kaszpáz, a sejtben található szubsztrátok lebontásáért felelős. A kaszpáz-kaszád lezajlásának eredménye több olyan irreverzibilis változás, ami érinti a kromatint, illetve a citoplazmát. Az apoptózison átesett sejt a szövet integritásának megbontása nélkül tűnik el (Jia *et al.* 2014).

2.4. Vizsgálatban részt vevő DNS javító gének

2.4.1. OGG1

A normális sejt metabolizmusa, illetve a környezet miatt kialakuló oxidatív stressz hatására (pl.: ionizáló sugárzás, kémiai karcinogének) 8-hidroxi-guanin (8-OH-G), illetve 8-oxo-7,8-dihidroxi-guanin (8-oxo-G) jön létre (Chevallard *et al.* 1998, Boiteux & Radicella 2000, Bach *et al.* 2014, Mulder 2015). A 8-oxo-G DNS-ben való megjelenésének két iránya lehetséges: a guanin bázis oxidációja a DNS szerkezetében vagy pedig az oxidált dGTP (8-oxo-GTP) beépítése a DNS szintézis során. A szervezetben három védekezési mechanizmus áll rendelkezésre az oxidatív guanin léziók kivédésére: prevenció, azaz a lézió beépítésének gátlása hidrolízissel; javítás, azaz az OGG1 (8-oxoguanin DNS glikoziláz) gén által megindított BER; helyettesítés (proofreading), azaz a MUTYH gén BER segítségével a helytelenül jelen lévő adenint távolítja el, így a guanin lézió citozinnal alkot egy párt, ezt követően az OGG1 gén által vezényelt BER képes eltávolítani az oxidatív guanin formát (Paz-Elizur 2009). Az oxidatív károsodott guanin léziók mutagének, gátolják a DNS elongációját. Az OGG1 gén kódolja a DNS glikoziláz, mely felelős a 8-OH-G/8-oxo-G lézió eltávolításáért a károsodott DNS-ből. Ezáltal prokarióták és eukarióták esetében is lényeges az OGG1 fehérje bázis kivágó javítása a ROS elleni védekezésben, emellett rendelkezik AP ligáz aktivitással is. A gén működésének gátlása esetében az igen mutagén guanin léziók guanin-citozin (GC) helyett timin-adenin (TA) transzverziót eredményeznek, ám AT helyett

CG transzverzió is megtörténhet az ellentétes irányú templát esetében (Chevallard et al. 1998, Boiteux & Radicella 2000, Paz-Elizur 2009, Mulder 2015). Az oxidatív bázis léziók akkumulációja a mitokondriális DNS-ben háromszorosa a nukleáris DNS-ének (Hudson 1998). Souza-Pinto és munkatársai (2001) egerek esetében a mitokondriális DNS-ben majdnem kilencszer több 8-oxo-G-t detektáltak, mint a nukleáris DNS-ben. Az OGG1 gén mutációja számos daganatos elváltozást eredményezett humán sejtvonalakon, illetve egér fajban (Chevallard et al. 1998, Boiteux & Radicella 2000, Shinmur & Yokota 2001, Souza-Pinto et al. 2001, Paz-Elizur 2009, Bach et al. 2014, Mulder 2015). Az OGG1 gén nukleotid polimorfizmusának hatására megnövekedett a DNS károsodás intenzitása és a petefészekrák kockázata (Benitez-Buelga et al. 2016).

AFB1 (50mg/kg) hatására megnövekedett az egér tüdőben kimutatható BER aktivitás, azaz megnövekedett az OGG1 fehérje szintje a magasabb 8-OH-G lézió szint révén, ám a májban nem volt kimutatható változás (Guindon et al. 2007). Az OGG1 génkiütött egerek mortalitása szignifikánsan magasabb volt AFB1 kitettség esetén az ezen génnel rendelkező csoporthoz viszonyítva. Ez az eredmény megerősíti, hogy az OGG1 gén fontos szerepet tölt be a szövetek védelmében mikotoxinokkal szemben (Mulder 2015). Liu és munkatársai (2018) vizsgálataiban 24 órás *in vitro* humán máj sejtvonalon végzett AFB1 (0,01 μ M) kezelés hatására az OGG1 gén expressziója nem szignifikáns mértékben, de csökkent a kontroll csoport értékéhez képest. Az OGG1 gént ponty fajban már vizsgálták hipoxiás állapotot (oldott oxigén szint: $1,80 \pm 0,6$ mg/l) követő oxidatív stressz hatásának megállapítására, mely során a hipoxiás körülmények megszüntetése után is a gén megemelkedett expressziós szintje volt megfigyelhető (Mustafa et al. 2015).

2.4.2. HSP70

A heat-shock protein 70 (HSP70) egy stressz által indukálható saperon fehérje, amely összefüggést halak esetében is rögzítették már (Schmidt & Nielsen 2014). Azonban a HSP70 gén által kódolt fehérje nemcsak a stresszfolyamatok során tölt be lényeges szerepet: zebradánióban kimutatták angiogenezisben (véredényképzés), a szem fejlődésében, illetve különböző károsodások (pl.: idegi) utáni regenerációban betöltött szerepét (Nagashima et al. 2011, Schmidt & Nielsen 2014). A HSP70 gén a hőstresszen kívül számos környezeti ágens hatására (pl.: nehézfémek, aminosav analógok), illetve kémiai stresszor, oxidatív stressz jelenlétekor is indukálódik szövetspecifikusan, amit többek között fogaspontyon (*Gambusia affinis*) is bebizonyítottak (Ali 2003).

Hunt és munkatársai (2004) egér modellállaton bizonyították a HSP70 genom stabilitásában betöltött szerepét, mivel a HSP70 gén gátlása esetében radioaktív sugárzás hatására megnőtt az onkogén transzformáció, a sejtek elhalása, illetve a genom instabilitása. Aktív HSP70 gén esetében, annak túlexpresszált állapotában, a genomi stabilitás fennmaradt, valószínűsíthetően a DNS javító folyamatokban való közreműködése által. A HSP70 szerepet játszik az új szintetizált fehérjék transzportjában a sejten belül, illetve a denaturált fehérjéket eltávolítja a sejtől (Jee 2016). A sejt védekező mechanizmusaiban is részt vesz, csökkenti a mitokondriális sérüléseket, a nukleáris fragmentációt, illetve a stressz által kiváltott kaszpáz-kaszadádot (Kócsó et al. 2021). A humán epithel sejtvonal esetében bizonyítást nyert, hogy a HSP70 a citoplazmából a sejtmagba vándorol át oxidatív károsodás fellépése esetében. Hidrogén-peroxid, illetve doxorubicin (adriamycin, kemoterápiás szer) kezelése során a megnövekedett 8-hidroxi-2-deoxiguannin (8-OH-dG) szint emelkedésével párhuzamosan emelkedett a HSP70 fehérje jelenléte. Ez arra enged következtetni, hogy a HSP70 a DNS védelmében, javításában is részt vesz, illetve egyéb DNS javító fehérjék szállítását is végzi (Abe et al. 1995, Kciuk et al. 2020).

A HSP70 fehérjének szerepe van a BER folyamatokban, mivel kapcsolatban áll az uracil DNS glikoziláz, illetve az AP endonukleáz enzimekkel (Sottile & Nadin 2018). Ugyanerre az eredményre, illetve megállapításra jutottak Mendez és munkatársai (2000) HeLa sejtek vizsgálata során. A HSP70 jelentőségét BER folyamatban Kenny és munkatársai (2001) is bemutatták a

HSP70 és a APE1 (apurin/apirimidin 1 endonukleáz) interakcióján keresztül, a HSP70 10-100-szoros mértékben volt képes növelni az endonukleáz aktivitását. A DNS polimeráz β -t is stimulálja, így lényeges hatással bír a BER folyamatok során (Mendez et al. 2003). Humán légső hámsejteken végzett kísérlet során megemelkedett HSP70 génexpressziós szint mutatkozott a benzo[a]pirén-diol-epoxid (BPDE)-DNS adduktok eltávolítása céljából, a gén gátlása esetében a DNS javító mechanizmus károsodást szenvedett. Így Duan és munkatársai (2014) arra a következtetésre jutottak, hogy a HSP70 expressziójának hatása lehet, illetve részt vehet a NER DNS javító útvonalban is. Ugyanerre a megállapításra jutottak Yang és munkatársai (2009), szintén *in vitro* humán légső hámsejteken tesztelték a benzo[a]pirén DNS károsító hatását, melynek javítása a NER folyamatokon keresztül valósul meg. A kísérlet során a NER folyamatokban ismert XPA gén, illetve a HSP70 gént együttesen vizsgálták. Dózis-függő módon csökkent a sejtek életképessége, ám ezzel párhuzamosan szignifikáns korrelációban növekedett mindkét gén expressziója. A HSP70 transzlokációja a sejtmagba nagyobb MSH2, illetve MLH1 génexpressziós eredményekkel társult Nadin és munkatársai (2007) vizsgálatában, ezáltal a HSP70 az MMR DNS javító útvonalban is szerepet játszhat. Kotoglou és munkatársai (2009) rámutattak a HSP70 DNS egyszálú törésének javításában való részvételére. A HSP70 gént nem tartalmazó, hőstressznek kitett HeLa sejtek esetében szignifikánsan megnövekedett az egyszálú DNS töredékek aránya, illetve az apoptotikus sejtek mennyisége. A HSP70 génnel rendelkező sejtekben a HSP70 kötődik az XRCC1 és a PARP-1 fehérjékkel, mely két utóbbi fehérje bizonyítottan részese a DNS egyszálú törés javításának. A HSP70 az ATP-áz domain segítségével kapcsolódik a PARP-1-hez, ami dimerizálódik a HSP70 által és jelöli a hiszton és nem hiszton fehérjéket. Az XRCC1 pedig a törött szál 2 végét tartja össze a javító mechanizmus elvégzéséig. A HSP70 fehérjének feltehetően híd szerepe van az egyéb DNS javító komplexek kialakulása során és mozgásuk felgyorsításában.

2.4.3. p53

A p53 egy tumor szupresszor fehérje, transzkripció aktivátor, mely az egy-, illetve kétszálú DNS-hez is képes kötődni szekvenciától függően és attól függetlenül is (Smith et al. 1995, Zylitz et al. 2001, Williams & Schumacher 2016). A gén, illetve a fehérje aktiválása stressz szignálokön keresztül valósul meg, mint például sugárzás (ionizáló vagy nem ionizáló), hipoxia, hőstressz, alacsony pH, oxidatív stressz, DNS károsodás és akár a sejtciklus leállítását eredményezheti vagy apoptotikus sejthalált indíthat be (Helton & Chen 2007). Ám első lépésként transzkripciós faktorként szabályozza a sejtciklusban, az apoptózisban, illetve a DNS javításban részt vevő gének expresszióját, ebbe beletartozik a HSP70 gén is. A stresszállapot csökkenése esetében a p53 tetramer szétválk és gátlódik a transzkripciós aktivitása a HSP40 és HSP70 fehérjék magas szintje által (Zylitz et al. 2001). Az ATM (ataxia telangiectasia mutated) és az ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) két meghatározó fehérje a DNS károsodásra adott válaszban (DDR), melyek foszforilálják a CHK1 és CHK2 kinázokat (cell cycle checkpoint kinases), amik aktiválják a p53 fehérjét (Sottile & Nadin 2018). A DNS javításban közvetten is fontos a p53, mivel DNS károsodás jelenlétekor az S fázis előtti G1 fázisban részben megállítja a sejtciklust, amely idő alatt a DNS javító folyamatok lejátszódhatnak (Nikolai et al. 2015, Williams & Schumacher 2016).

A p53 fehérjének szerepe van a NER DNS javításban, a NER gének transzkripción keresztüli szabályozása, illetve a közvetlen fehérje-fehérje kapcsolódás által (Adimoolam & Ford 2003). *In vitro* kísérlet során, humán vastagbél sejtvonalon esetében, a p53 funkciójának gátlását követően csökkent az UV kezelés hatására keletkezett léziók javítása, illetve a sejtek DNS javító aktivitása (Smith et al. 1995). A p53 NER típusú javításban betöltött közvetlen szerepét Wang és munkatársai (1995) bizonyították a p53 és a NER folyamatokban ismert fehérjék (XPA, CSB, XPA) kapcsolódásán keresztül. A NER útvonalon a p53 közvetlen szerep mellett transzkripciós szabályozással is résztvesz a p48, az XPC (Adimoolam & Ford 2003, Ford 2005), illetve az XPA gének esetén. A p53 transzkripció független funkciói közé sorolható az XPB és XPD helikáz aktivitásának módosítása, döntően csökkentése, illetve a kromatin hozzáférhetőségének

módosítása (Williams & Schumacher 2016). Rubbi & Milner (2003) feltételezése szerint a léziók jelenlétekor a kromatin nyitott állapotba kerül az egész genomban, ami a genomi léziók detektálásának lehetőségét hozza maga után. Ez a jelenség a p53 függő p300 hiszton acetilázon keresztül valósul meg, ezáltal a p53 növelni képes a léziók detektálását a genomban, ami hozzájárul a genom stabilitásának fenntartásához. A p53 tehát hiszton hozzáférhetőségi faktorként viselkedik. Mulder és munkatársai (2014) a p53 NER szabályozásában betöltött szerepét AFB1 krónikus expozíciója során bizonyították. A p53 génnel rendelkező egerekben megnövekedett a NER aktivitás a genotoxikus AFB1 kezelés hatására, míg a p53 génnel nem rendelkező egerekben nem következett be ez a változás. A p53 a BER folyamatokban is jelen van (Barzilai & Yamamoto 2004). Kapcsolatban áll az AP endonukleázzal, az APE1/Ref-1 BER fehérjékkel, melyek végzik a p53 szabályozását, módosítani képesek a p53 transz-aktivációját, proapoptotikus funkcióját, DNS-hez kötődését, illetve elősegítik tetramerizációját is. A p53 pedig képes az APE1 (apurinic/apirimidinic endonuclease 1) gén gátlására, azaz DNS károsodás esetén DNS javító gént nyom el, ami a p53 tumor szuppresszor funkciójával magyarázható (Sengupta & Harris 2005, Williams & Schumacher 2016). A BER aktivitás növekedett, amennyiben magasabb p53 termelés volt megfigyelhető *in vitro* körülmények között (Offer et al. 1999). Offer és munkatársai (2002) rámutattak az összefüggésre, miszerint a DNS károsodás mennyiségétől függ, hogy a p53 DNS javító irányba vagy apoptózis irányába indítja el a folyamatokat. M1/2 sejtvonal kis mértékű γ -sugárzás (25-50 R) esetében a p53 függő BER aktivitás megemelkedett, nagyobb γ -sugárzás (150-200 R) hatására csökkent a BER aktivitás és megnövekedett a p53 által indukált apoptózis mértéke. A p53 befolyásolja az OGG1 működését is, e kapcsolat hátterében a p53 DNS-hez kötődése állhat az OGG1 és AP endonukleáz enzimekkel egyszerre, ezáltal a p53 stimulálni képes a másik két enzim aktivitását (Williams & Schumacher 2016). Ezen felül kapcsolat áll fel a p53, illetve a DNS polimeráz β között, p53 gén nélküli sejtek esetében ezen polimeráz mennyisége drasztikusan kisebb volt, mint a p53 génnel rendelkezőkben (Seo et al. 2002). Feltárták már a mismatch javításban (MMR) betöltött szerepét is, többek között az MSH2 és MSH6 komplex befolyásolja a p53 kötődését a DNS szubsztráthoz, illetve a még nem funkcionáló MSH2 fehérjével is összekapcsolódik (Williams & Schumacher 2016). A p53 transzkripció szabályozás által jelen van a kettős szálú DNS törések javításában is, mivel képes a RAD51 gén expressziójának növelésére, illetve közvetlen interakcióban is áll a RAD51 és a RAD54 fehérjékkel (Linke et al. 2003, Arias-Lopez et al. 2006).

A O^6 -metilguanin lézió helyreállításáért a O^6 -metilguanin-DNS-metiltranszferáz (MGMT) felelős. Ionizáló sugárzás hatására eger fibroblaszt és patkány hematoma sejtvonal esetében megnövekedett az MGMT aktivitás, amennyiben a p53 gén nem volt gátolt. A p53 gátlása esetében az MGMT mennyisége nem változott, ami arra enged következtetni, hogy a MGMT promóter aktiválásához a p53 génextpressziója szükséges (Grombacher et al. 1998, Mestier et al. 2020).

2.4.4. GADD45 α

A GADD45 α (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha) fehérjének számos feladata ismeretes, úgy mint a DNS javítása, a genom stabilizálása, a sejtnövekedés gátlása (G2/M sejtciklus), illetve szerepe van a DNS demetilálásában és az apoptózisban is. A GADD45 túlexpresszált állapota a DNS demetilálását segíti elő, míg GADD45 génkiütés esetében a DNS hipermetilálása figyelhető meg. Az aktív demetilálást DNS javítás keretein belül végzi a GADD45, mely során interakcióban áll a DNS javító endonukleáz XPG-vel (Barreto et al. 2007). Az acetiláció szükséges állomása a demetilálásnak, amihez elengedhetetlen a GADD45 α . Az oxidatív 5mC demetilálására 3 útvonal áll rendelkezésre: az oxidált vagy metilált bázis kicserélése BER segítségével; deamináció, amit BER követ; NER által történő eltávolítás (Niehrs & Schäfer 2012, Pietrasik et al. 2020).

Zebradánió esetében kimutatták, hogy a GADD45 α a BER specifikus timin DNS-glikozilázzal lép interakcióba, mely kapcsolaton keresztül történhet meg az 5mC deaminációja timinné, amit bázis kivágó javítás kísér (Niehrs & Schäfer 2012). A GADD45 α közvetlenül képes kapcsolódni a hisztonhoz, destabilizálni a hiszton-DNS komplexet és növelni a

DNáz hozzáférést a DNS-hez DNS károsodás esetén (Hildesheim & Fornace 2002, Zhan 2005, Salvador et al. 2013). BRCA1, illetve p53 tumor szupresszor fehérjék szabályozzák a GADD45 α gén expresszióját (Desjardins et al. 2008, Pietrasik et al. 2020), ám a GADD45 α p53-tól független módon is képes aktiválódni (Zhan 2005). Genotoxikus behatásra a p53 fehérje közvetlenül kapcsolódik a GADD45 α szekvenciájához, illetve közvetlen is aktiválja a GADD45 α transzkripcióját transzkripciós faktorok segítségével. Majd a DNS károsodás megszűnésével a BRCA1 gátolja a GADD45 α expresszióját a cink finger ZBRK1 fehérje által, mely a GADD45 α DNS kötő helyéhez kapcsolódik (Desjardins et al. 2008, Pietrasik et al. 2020). BRCA1 jelenléte képes megemelni, aktiválni az XPC, GADD45 és DDB2 gének expresszióját (Adimoolam & Ford 2003, Zhan 2005) transzkripciós faktorok segítségével (Desjardins et al. 2008). A BRCA1 túlexpresszált állapotával párhuzamosan a GADD45 α magasabb expressziós szintje volt megfigyelhető és a NER folyamat stimulálása következett be (Salvador et al. 2013). Azzal, hogy a GADD45 α meggátolja a sejt S fázisba lépését, lehetőséget nyújt és stimulálja a nukleotid kivágó javítást (Hildesheim & Fornace 2002). A GADD45 α -nak az egyik legkorábban felfedezett interakciója a PCNA volt, mely szintén a NER folyamatokban vesz részt (Zhan 2005). Oxidatív stressz esetében a FOXO3A közvetlenül kapcsolódik a GADD45 α promóterhez és indukálja transzkripcióját (Salvador et al. 2013). GADD45 α csökkenti a CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) expresszióját, ezáltal enged utat a NER folyamatoknak (Salvador et al. 2013). Az XPC a NER nélkülözhetetlen javító faktora, ám XPC mutáns sejtvonal esetében a GADD45 α szignifikáns expresszió növekedése volt detektálható 30 perces UVC behatás esetében, ám ez a változás nem volt megfigyelhető HeLa sejtek esetében. XPC hiány esetében a GADD45 α képes volt átvenni a NER erősítő, támogató szerepet, mivel képes az UV által károsodott kromatinhoz kötődni és hozzáférni a DNS károsodás régiójához (Chang et al. 2003). A GADD45 α génnel nem rendelkező egerek esetében csökkent a nukleotid kivágó javítás, ami megnövekedett tumorképződéshez, illetve mutációkhoz vezetett (Hollander et al. 2001). A GADD45 α apoptotikus hatással is bír, amit többek között a p38 befolyásol. Ám apoptózist gátló, késleltető hatását is detektálták, GADD45 α hiányában a DNS javítás mértéke kisebbnek bizonyult. A GADD45 α hiánya a BER folyamatok mértékének csökkenésével is összefüggésben van (Salvador et al. 2013). Kim és munkatársai (2017) UV kezelés hatására interakciót mutattak ki a GADD45 α , illetve az APE1 fehérjék között, mely utóbbi a bázis kivágó javítás ismert tagja. Számos rákos megbetegedés (pl.: prosztaták, mellrák, petefészekrák) kialakulásakor figyelték meg a GADD45 α szerepét. Wang és munkatársai (2018) rákos szövetekben nagy mértékű GADD45 α génexpressziót mértek, ami vélhetően az intenzív DNS javításnak köszönhető.

2.4.5. BRCA2

A BRCA2 (breast cancer susceptibility gene 2) tumor szupresszor gént döntően a mell-, illetve petefészekrák kialakulásával kapcsolatosan vizsgálták, mivel bárminemű mutációja, illetve a BRCA1 gén mutációja megnöveli az öröklődő mell-, illetve petefészekrák kialakulásának lehetőségét (Lee 2014). E génben bekövetkező delécio egerekben megnövelte az embrió letalitást, *in vitro* körülmények között BRCA2 génnel nem rendelkező sejtek képtelenek voltak a homológ rekombinációval zajló DNS javítására, ami apoptózishoz vezetett (Liu & West 2001). BRCA2 hiány esetében kromoszóma instabilitás, törések figyelhetők meg, illetve a kettős szálú DNS törések javítása kárt szenved (Gudmundsdottir & Ashworth 2006). Ám a BRCA2 számos funkciót lát el a sejt életében, közvetlenül képes kapcsolódni az egyszálú, illetve kétszálú DNS-hez is (Tutt & Ashworth 2002, Shamo 2003). Szerepe van a kettős szálú DNS javításában, a DNS replikációjában, mivel a RAD51 stabilizálását végzi a replikációs villa védelme érdekében (Lee 2014). Expressziója több szövetben, mitotikus és meiotikus sejtekben egyaránt kimutatható, legnagyobb mennyiségben az S fázis során, a DNS replikációja alatt van jelen (Venkitaraman 2001). DNS károsodás fellépése esetében Chk1 és Chk2 kinázok foszforilálják a BRCA2-t, majd szabályozzák interakcióját a RAD51 fehérjével (Lee 2014). Részt vesz a homológ rekombinációban, illetve a homológ-direkt javításban (homology-directed repair) (Saeki et al. 2006). Kezdeti elképzelés szerint a BRCA2, illetve a BRCA1 komplexet alkot és

direkt módon játszik szerepet a kettős szálú DNS javításában, ám erre kevés bizonyíték áll rendelkezésre. Az látszik valószínűnek, hogy e két BRCA fehérje képes az interakcióra, ám különböző fehérje komplexek részei és a kettős szálú DNS javításban más-más szerepet töltenek be. A BRCA1-gyel szemben a BRCA2 interakciói igen limitáltak, fő fókuszban a RAD51 fehérjével, mely nélkülözhetetlen a homológ rekombinációban, javításban (Liu & West 2001, Shamoo 2003). A homológ rekombinációs javítás során a BRCA2 interakcióban áll a PALB2 fehérjével (Zhang et al. 2009a). A BRCA1 és a BRCA2 interakcióban áll a PDS5B, illetve a DMC1 fehérjékkel is (Fradet-Turcotte et al. 2016). Amennyiben a BRCA2 fehérje szerkezete sérül (BRC repeats), a RAD51 nem képes kötődni a BRCA2 fehérjéhez, így elmarad a DNS javítása. A RAD51, illetve a BRCA2 interakciója, komplexe megakadályozza a RAD51 kapcsolódását az ép DNS szakaszhoz, így a RAD51 DNS-hez való kötődése a károsodás helyét tárja fel, amit a RAD51 és a BRCA2 DNS károsodásra végbemenő foszforilációi előznek meg. A DNS javítását követően a BRCA2 távolítja el a DNS-ről a RAD51-et (Liu & West 2001, Shamoo 2003). A RAD51 gén expresszióját befolyásolni képes a BRCA2, ám a fehérje termelődésének attól független útvonala is létezik. A rendelkezésre álló RAD51 fehérje 20%-a kötődik a BRCA2 fehérjéhez, mint immobilis frakció, a fennmaradó 80% pedig immobilis oligomerizált frakcióként lesz jelen vagy relatív mobilis frakcióként. BRCA2 funkciójának betöltéséhez elengedhetetlen a BRCA2-kötő fehérje (DSS1). A DSS1 csendesítést követően BRCA2 fehérje mennyisége nagy mértékben csökkent. Ám a DSS1 hatásának pontos mechanizmusa még nem ismert (Gudmundsdottir & Ashworth 2006). A BRCA2 felelős a RAD51 szállításáért a keletkezésének helyétől a DNS javítás helyszínéig. Így a BRCA2 hiányában a RAD51 fehérje nem éri el célját, a DNS javítás kárt szenved (Venkitaraman 2001). Yoshida és Miki (2004) összefoglalója szerint a BRCA2 gén túlexpresszált állapota esetében a p53 gén expressziójának csökkenése következik be, mely összefüggést még vizsgálni szükséges.

2.4.6. MSH6

Az MSH6 fehérje a mismatch javításban vesz részt, így őrzi a genom stabilitását, integritását, mivel eltávolítja a nem megfelelő, nem összeillő nukleotid párokat, melyek a DNS replikációja, illetve a DNS károsodása esetén keletkeznek (Tomé et al. 2013). Az MMR fehérjék expressziója aktív a sejtciklus összes fázisában (Edelbrock et al. 2013). Az MSH6 mellett az MSH2 fehérjének is jelentős szerepe van, mely fehérjék a bázis-bázis mismatch esetén is ellátják funkciójukat (Umar et al. 1998, Tomé et al. 2013). Az MSH2-MSH6 komplex egyetlen nukleotid, illetve kisebb deléciók, inzerciók mismatch-eket is képes felismerni, kijavítani (Edelmann et al. 2000, Yang et al. 2004).

Mismatch észlelése esetében a komplex kötődik a hibás párhoz, gyűrűt alkot a DNS körül, majd ATP kötés és hidrolízis után javítja a mismatch-et. A gyűrűt alkotó komplex pedig a DNS-en továbbmozdul a mismatch-től távolabb és egyéb javító fehérjékkel kommunikál, mint a PCNA (Anthony & Hingorani 2003, Yang et al. 2004). Gorman és munkatársai (2007) fluoreszcens mikroszkóp (TIRFM, total internal reflection fluorescence microscopy) segítségével megbizonyosodtak, hogy az MSH2-MSH6 komplex a DNS spirális tengelyén képes haladni diffúz állapotban, mely mozgáshoz csupán hőenergiára van szüksége. A komplex képes reverzibilis módon inaktíválni, immobilissá válni. MMR gének mutációja, károsodása, gátlása esetében különböző karcinómák kialakuláshoz, illetve neurodegeneratív elváltozáshoz vezet. Humán tumor sejtvonal esetében határozták meg, hogy MMR gének közül a második legnagyobb mértékben expresszáldó fehérje az MSH6 (az MSH2 fehérje után). A fehérjék stabilitása pedig az interakciók típusától, illetve a heterodimer képződéstől függ, ennek megfelelően az MSH2-MSH6 komplex stabilabb, mint a MSH2-MSH3 komplex. MMR gének expressziója szövetspecifikusságát is meghatározták egerekben. Legnagyobb expressziót a lépben és a herékben, közepes mértékűt detektáltak a májban, a vesékben, az agyban, a legkisebb expresszióval a szív és az izmok bírtak (Tomé et al. 2013).

A BRCA1 fehérje kulcsfontosságú része a BASC fehérje komplexnek (BRCA1-associated genome surveillance complex), melynek részesei tumor szuppresszorok, DNS károsodást észlelő

fehérjék, illetve mismatch javító fehérjék, mint az MLH1, MSH2 vagy az MSH6. Ám nem áll rendelkezésre információ, hogy miként függenek össze ezen fehérjék funkciói (Maresca et al. 2018). MSH6 tumor szuppresszor gén, MSH6, illetve MSH3 mutációban szenvedő egerek esetében nagymértékben megemelkedett az emésztőrendszeri daganatok száma (Edelmann et al. 2000). De Wind és munkatársai (1999) munkájában drasztikusan csökkent a túlélés az MSH6 hiányos egerek esetében, ami csak MSH3 és MSH6 együttes hiányában volt még kisebb. Kísérletük során az MSH6 hiányában különböző típusú tumorképződést találtak: emésztőrendszeri, tüdő, méh, bőr és nyirok szervekben és szövetekben. Szintén egerek esetében mutatták ki MSH6 hiányában a G-G, illetve a A-C mismatch-ek javításának elmaradását, így bebizonyosodott, hogy a bázis-bázis mismatch javításban nélkülözhetetlen szerepe van, ám ez nem mondható el inszerciós/deléciós mismatch-ek esetében (Edelmann et al. 1997).

2.4.7. RAD51

A RAD51 rekombináz meghatározó szerepet tölt be a genom stabilitás fenntartásában, mivel fontos katalizátora a homológ rekombinációnak, illetve egyike a kettős szálú DNS törések javításában részt vevő fehérjének. A homológ rekombináció során a törött DNS szakaszt egy homológ szekvencia helyettesíti templátként a DNS szintézis során. A RAD51 ezt a folyamatot képes katalizálni, mivel a sérült 3' egyszálú DNS vég invázióját segíti a homológ templátba (Wassing & Esashi 2021).

A homológ rekombináció első szakaszába ATP kötődik a RAD51 fehérjéhez, ezáltal a filamentum szerkezetének kialakulása kezdődik el (Laurini et al. 2020). Az invázió által a nem komplementer szál eltolásával D-loop-ot hoz létre, ami lehetőséget ad a DNS szintézisére a sérült szakaszok között. A RAD51 nukleoprotein filamentumot hoz létre az egyszálú, illetve a kétszálú DNS-en, a károsodás helyszínén (Thacker 2005, Li & Heyer 2008, Gildemeister et al. 2009.). Végül a RAD51 Ca^{2+} függő módon stimulálja a RAD54 DNS javító és rekombináns fehérje ATPáz aktivitását, mely által a kialakuló komplementer szál templátként szolgál a további DNS szintézis folyamatához (Laurini et al. 2020).

A RAD51 speciálisan fontos az egy-végű (one-ended) kétszálú DNS törések (DSB) javításában. Az egy-végű DSB javítás a sérült replikációs villánál nagy jelentőséggel bír a sejt túléléseért. Magánál a replikációs villa visszaállításánál is szerepe van a RAD51 fehérjének. Hipotézis szerint a replikációs villa leváló tagjához kapcsolódik, majd újra stabilizálja azt, így visszaállítja a normális villa struktúráját. A replikációs villa megfelelő szerkezetének visszaállítása az egyik lehetőség a kettős szálú DNS törések megelőzésére. A RAD51 kimerülése esetében megnőtt a replikációs villa töredezettsége, illetve növekedett a DSB is humán sejtekben *in vitro*. A villa védelméhez a BRCA2 fehérje is szükséges, mivel az stabilizálja a RAD51 filamentumot a DNS-en, ezáltal akadályozza meg a keletkező DNS szál nukleolitikus degradációját a replikációs villában. A RAD51 gátolni képes a villa mögött lévő egyszálú DNS szálaban a gap-ek felhalmozódását a homológ rekombináció révén vezérelt mechanizmus által. A RAD51 gén alapvető fontosságú a sejt életképességének fenntartásához, RAD51 null mutáció egerekben embrió letalitást eredményez (Wassing & Esashi 2021), míg csirke limfocita sejtvonal (DT40) esetében a G2/M fázisú sejtek aránya megnövekedett, nagymértékű kromoszóma törések alakultak ki majd pedig sejthalál (Thacker 2005, Wassing & Esashi 2021). Az embrió letalitás, mint hatás megegyezik a BRCA2 gén mutációjával rendelkező egerekben kapott eredményekkel (Wassing & Esashi 2021). Humán bőr fibroblaszt sejtvonalban ionizáló sugárzás hatására (200 rad, 400 rad) nem volt kimutatható különbség a kezelt és kezeletlen csoportok között a G0/G1, S, G2/M fázisokban lévő sejtek arányait tekintve. Legkisebb arányban a G0/G1 fázisban voltak jelen a sejtek, majd arányuk folyamatosan nőtt a S fázisban, a legmagasabb a G2/M fázisban volt. Hasonlóan a humán sejtvonalhoz, a kínai hörcsög petefészek sejtvonal esetében sem indukálta az ionizáló sugárzás a RAD51 fehérje expresszióját (Chen et al. 1997).

Ezzel az eredménnyel ellentétben Tarsounas és munkatársai (2004) immunofluoreszcens festéssel mérték fel a RAD51 fehérje jelenlétét humán sejtekben (HeLa) *in vitro*. Kezeletlen körülmények között a RAD51 fehérjét tartalmazó sejtek aránya 10-15% közé tehető, míg ionizáló

sugárzásnak (10 Gy) kitett sejtek esetében ez az arány több, mint 50%. A RAD51 fehérjék mennyiségének növekedése mellett a BRCA2, illetve egyéb homológ rekombinációban fontos fehérje (RAD54, RPA) mennyisége is növekedett. A RAD51 fehérje expressziója a sejtmagban is végbemegy, ám agresszív tumornövekedés esetében a citoplazmában lévő fehérje expresszió sokkal nagyobb mértékű (Gachechiladze et al. 2017).

2.4.8. REV1

A REV1 fehérje deoxicitidil (dCMP) transzferáz, a DNS polimerázok Y családjába tartozik, mely több lényeges funkciót is ellát az eukariótákban, mint a DNS hibatoleranciában (DNA damage tolerance) és a replikáció során végbemenő transzléziós DNS szintézisben való részvétel, illetve a kettős szálú DNS törések javítása homológ rekombináció segítségével. A ki nem javított károsodás esetében a REV1 fehérje blokkolni képes a replikációt. A transzléziós szintézis során betöltött szerepét döntően polimeráz ζ DNS polimerázzal együtt látja el, ám a REV1 fehérjéhez egyéb polimeráz is hozzákapcsolódhat másodlagosan (polimeráz κ , η , ι) (Lawrence 2004, Guo et al. 2006, Gabel et al. 2013).

A REV1 és a polimeráz ζ a kettős szálú DNS törés esetében a sérüléshez közel alkot csak komplexet, majd a komplex kapcsolódik a DNS károsodáshoz (Hirani & Sugimoto 2006). Maga a polimeráz ζ egy heterodimer komplex, mely REV3, illetve REV7 fehérjékből áll. A REV3 magában is képes a polimerizációra, ám REV7 fehérje stabilizálja, illetve szignifikánsan növeli polimerizációs aktivitását. A REV1 fehérje egyik domain-jén keresztül közvetlenül kapcsolódik a REV7 fehérjéhez, a másik domain a REV3 vagy más polimerázzal való kapcsolódást teszi lehetővé (Sharma & Canman 2012). A hibát meg nem engedő (error-free) útvonalon kívül más javítási útvonal is biztosítja a sejt túlélését, a REV1, a REV3 és a REV7 gének az SOS javító folyamat részei (Simpson & Sale 2003). A REV1 a kettős szál javításakor dCMP illesztését végzi egyes guanin adduktok, abázikus hellyel, illetve egyéb pl.: DNS szálak közötti keresztkötések (ICL) okozta léziókkal szemben (Budzowska et al. 2015).

ICL javításában is szerepe van a REV1 fehérjének. Humán rákos sejtek nagyobb érzékenységet mutattak REV1, REV3, REV7 hiányában ciszplatin vagy mitomicin C kezelés esetében, mely kezelések ICL előidézői (Sharma & Canman 2012). REV1 kimerülés esetében csökkent az ICL javítása *Xenopus laevis* tojásokban (Budzowska et al. 2015). Csirke sejt vonal (DT40) esetében a REV1 gén hiányában szignifikánsan lecsökkent az ICL károsodás javításának hatékonysága (Shen et al. 2006). Szintén DT40 sejtekben a REV1 gén inaktiválását követően a sejtek életképesek maradtak, ám megnövekedett apoptózis szint mellett. A sejtek nagyfokú érzékenységet (háromszoros) mutattak DNS károsító anyagokkal szemben (hidrogén-peroxid, UV megvilágítás, 4-nitroquinolin-1-oxid), ami arra enged következtetni, hogy a REV1 gén szükséges az oxidatív DNS károsodás leküzdéséhez. Megnövekedett a szabadgyök szintje a REV1 génnel rendelkező sejtekhez viszonyítva, illetve emelkedés mutatkozott a bázis károsodások szintjében is, döntően a timin-glikol, 8-oxo-guanin, illetve abázikus hely megjelenésével (Simpson & Sale 2003).

Okada és munkatársai (2005) REV1 génkiütött DT40 sejtek esetében növekedés elmaradást figyeltek meg, illetve a sejt elhalás szintje nagyobb mértékű volt, mint a REV1 génnel rendelkezőké. A REV1, REV3, REV7 génkiütött sejtek DNS károsító anyagokkal (metánszulfonát, ciszplatin, hidrogén-peroxid, UV sugárzás) szembeni túlélése drasztikusan lecsökkent, ugyanúgy a mindhárom génben hiányos sejtek esetében. A kísérletből levonható az a következtetés, hogy mindhárom REV gén lényeges szerepet tölt be a fellépő DNS károsodás javításában, ezáltal a genom stabilitásának fenntartásában, a sejtek életképességének megőrzésében. Csupán a REV1 génben hiányos sejtekben csökkent az Ig (immunglobulin) gén génkonverzió. A REV7 fehérje fontos a REV3 fehérjével történő kapcsolódás révén, a REV1 pedig nélkülözhetetlen a polimeráz ζ -val történő komplex képződésében, ám ettől függetlenül is meghatározó a homológ rekombinációban. HeLa sejtekben is bizonyítást nyert a REV1 gén fontossága a homológ rekombinációban. A REV1 gén kimerülésekor megnövekedett a kettős DNS

szál, illetve a kromoszómák károsodása infravörös sugárzás behatása esetében (Sharma et al. 2012).

2.4.9. XPA

Az XPA (Xeroderma pigmentosum group A complementing protein) meghatározó faktor a NER típusú DNS javításban (Orelli et al. 2010). Az XPA egy cink-ujj domain-el rendelkező DNS-t kötő, ellenőrző, javító fehérje, mely az ép, illetve a károsodott DNS-hez is kötődik. A DNS gerincén bekövetkező elváltozásokat hatékonyabban ismeri fel, mint a DNS léziókat, ami megerősíti az XPA DNS károsodás felismerésben betöltött szerepét (Pulzová et al. 2020). Nagy affinitást mutat a sérült kettős szálú DNS-szel szemben is (Li et al. 1994). Közvetlenül kapcsolódik a károsodott egyszálú DNS-hez, egyéb DNS javító komponensekkel együttműködve a NER komplex működését biztosítja (Donninger et al. 2015, Kopera et al. 2004).

In vitro körülmények között kimutatható HeLa sejtekben az XPA interakciója az ERCC1 fehérjével, ám egyik fehérje sem képez homodimert. Így az XPA egyik funkciója lehet a sérült DNS egyéb javító komplexek felé irányítása, ilyen például az ERCC1 is (Li et al. 1994). Humán fibroblaszt sejtekben az ERCC1-XPA interakciójának gátlása (ERCC1 domain által) következtében a sejtek ciszplatinnal, illetve mitomicin-C-vel szembeni érzékenysége nem növekedett. Így elmondható, hogy az ERCC1 fehérjének szükséges az XPA fehérjéhez kapcsolódnia a NER javítási rendszer működéséhez, míg az XPA fehérje képes önállóan is ellátni feladatát (Orelli et al. 2010). Az XPA egyéb fehérjékkel is interakcióba tud lépni, ilyen például az XPC (Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein), az XPE (Xeroderma pigmentosum group E-complementing protein), a TFIIH (transcription factor II Human), a PARP1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1) és a RPA (replication protein A) (Sugitari et al. 2016). Az RPA elengedhetetlen a DNS replikáció, rekombináció és javítás során (Mer et al. 2000).

Az XPA nagyobb affinitással kötődik a kettős szálú DNS-hez, mint az ugyanakkora hosszúságú egyszálú DNS-hez, illetve a DNS gerinc sérüléseit ismeri fel. Az RPA az egyszálú károsodást, illetve a bázispár torzulásokat ismeri fel, így a két fehérje összekapcsolódásával egy még hatékonyabb DNS károsodást érzékelő komplex jön létre (Missura et al. 2001, Pulzová et al. 2020). Az XPA önmagában egy kevésbé stabil fehérje komplexet képes kialakítani (Missura et al. 2001). Fan & Luo (2010) rámutattak az XPA, illetve a SIRT1 (sirtin-1) fehérje kapcsolatának fontosságára, mivel a SIRT1 végzi az XPA deacetilációját. E kölcsönhatásnak leginkább káros behatások esetén van nagy jelentősége. Kezeletlen sejtek esetében nem kimutatható a két fehérje kapcsolódása, de UV sugárzás utáni 1. órában megnövekedett az SIRT1 fehérje kötődése az XPA fehérjéhez. A kötődés hatékonysága a sugárzást követő 4, illetve 6 óra után érte el a maximum értékét. Ezen összefüggés szerint a SIRT1 felelős az XPA megfelelő acetilációs státuszáért, mely befolyásolja az XPA és a RPA interakcióját. Az XPA acetilációja csökkenti az RPA interakcióra való képességét, a deacetiláció ezzel szemben az optimális kapcsolatot teszi lehetővé. Az XPA acetilációs ciklusában a RASSF1A is szereppel bír, a SIRT1 aktivitását befolyásolja. A SIRT1 deacetiláz gátlása esetében a RASSF1 önmagában nem képes az XPA deacetilálására. Ez arra enged következtetni, hogy a deacetilálásra csak közvetetten képes hatni a SIRT1 fehérjén keresztül (Donninger et al. 2015). Húgyhólyag rákos szövetekben az XPA fehérje, illetve mRNS szintje is lecsökkent az egészséges szövetéhez viszonyítva. A rákos sejtekben megnövekedett a kromoszóma rendellenességek mértéke, illetve emelkedett a rákos sejtek életképessége az XPA hiányában, míg működő XPA fehérjék esetében a rákos sejtek életképessége csökkent (Zhi et al. 2017). XPA hiányos egerekben emelkedett a sejtek érzékenysége benzo(a)pirén kezelés esetében, illetve a tüdő adenóma kialakulásának gyakorisága 71%, míg XPA génnel rendelkező állatok esetében ez csupán 35% volt. Az XPA-n keresztüli NER útvonal gátlása karcinóma kialakulás valószínűségének növekedésével jár (Ide et al. 2000).

2.5. DNS károsodás kimutatására alkalmas módszerek

Számos módszer áll rendelkezésre a DNS károsodás meglétének igazolására és mennyiségi meghatározására. A *DNS szekvenálás* nagyon ritka DNS módosulásokat képes kimutatni, a

vizsgálatnak több változata ismeretes, ám használata most is számos korláttal rendelkezik, mint például a keresztkontamináció (Sloan et al. 2018).

A *HPLC* (high-performance liquid chromatography) és a *GC* (gas chromatography) módszerek jól kombinálhatóak egyéb detektálási eljárásokkal (pl.: tömegspektroszkóppal), specifikus és érzékeny technikák, kimutatható általuk például dimer, abázikus hely, léziók, mint a 8-oxo-guanin is. Hátrányuk a nagyobb mennyiségű DNS igény, illetve annak előkészítése során kialakuló esetleges DNS károsodás.

Az áramlási citometria (flow cytometry) szintén önmagában, illetve más módszerrel (γ H2AX fókusz vizsgálat) kombinálva is képes a DNS károsodás gyors kimutatására, illetve apoptózis detektálására nagy mennyiségű sejtet képes vizsgálni. Azonban nem tud különbséget tenni a károsodott, nekrotikus vagy apoptotikus sejtek között, így az utóbbiak negatívan képesek befolyásolni a DNS károsodás vizsgálatát (Milner et al. 1987, Kumari et al. 2008, Johanson et al. 2016).

Az *elektrokémiai módszerek* érzékenyek, szelektívek, alacsony költségvetésűek, kis mennyiségű DNS-t és kevés eszközt igényelnek. Kimutathatók például az 8-oxo-guanin, DNS törések, de léziók, mint a timin dimer nem, illetve alkalmazása ritkának mondható (Kumari et al. 2008, Li et al. 2019).

A *mikronukleusz teszt* egy igen elterjedt genotoxicitási teszt, *in vivo* és *in vitro* is alkalmazható. Több változata is ismert, mint például a citokináz blokkolt mikronukleusz teszt, ám ez is csak a nukleáris DNS vizsgálatához alkalmas (Fenech 1997).

Immuntesztek szintén alkalmasak léziók (pl.: 8-oxo-guanin, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimin) detektálására antitestek felhasználásával. Ebbe a csoportba tartoznak az *ELISA* (enzyme-linked immunoabsorbent assay), a *RIA* (radioimmunoassay) és az *immunohisztokémiai* vizsgálatok, melyek *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is alkalmazhatóak. Az immunohisztokémiai eljárás a *FISH* (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) módszerrel kombinálható, ami fontos, mivel az immuntesztek hátránya a specifikusságukban keresendő (Gonzalez-Hunt et al. 2018).

A *Southern Blot analízis* használható a DNS szál törések szemikvantitatív mérésére, ám nagy mennyiségű mintára van szükség az elvégzéséhez (Patenge 2017). Előnye a minta minimális előkészítése, ezáltal a DNS mesterségesen előidézett károsodása elenyésző mértékű, hátránya a specifikusságban és nagy DNS igényében található (Gonzalez-Hunt et al. 2018).

Az γ H2AX fehérje alapú immunofluoreszcencia vizsgálat esetén a DNS károsodás kimutatása a sejt válaszában alapul, mivel a hiszton 2AX fehérjék aktiválódnak, majd a DNS kettős szálú törései körül nagy szakaszokban foszforilálódnak vagy a replikációs villát blokkolják és jelenlétüket különálló gócpontként lehet detektálni a sejtmagban indirekt elsődleges vagy másodlagos antitesteket felhasználó immunofluoreszcencia által. A hiszton fehérjék foszforilációján alapuló technika nagyon érzékeny vizsgálat, mellyel egyetlen egy- vagy kétszálú töredék kimutatható a sejtmagban (Nikolova et al. 2017). Kiértékelése történhet fluoreszcens mikroszkóppal vagy áramlásos citométerrel. Mikroszkóppal történő vizuális kiértékelés esetében hátránya a nagyobb mértékű szubjektivitás, az időigényesség, illetve a kiértékelőnek tapasztaltnak kell lennie. Az automata általi kiértékeléshez viszont nagyobb mennyiségű felvétel szükséges, ami szintén időigényes (Rothkamm és Horn 2009, Durdik és munkatársai 2015).

A *Halo Assay* segítségével egyedülálló sejtekben, azok DNS szál törései vizsgálhatók. Korlátai között szerepel a túlérzékenység, illetve, hogy csak nukleáris DNS-en végezhető el (Kumari et al. 2008, Gonzalez-Hunt et al. 2018).

A *FISH* nem izotópos módszer, amely a vizsgált DNS szakasz jelenlétét, illetve relatív helyét képes meghatározni a kromoszómában (Murthy & Demetrick 2006). E technika használatával vizualizálhatóak és becsülhetőek a DNS/kromoszómák károsodásai. A comet assay-vel kombinálható, az egy sejtben megjelölt kromoszómák, kromoszóma szakaszok és specifikus gének is vizsgálhatók. Hátrányai között szerepel közepes automatizálhatósága, a vizsgálható gének limitáltsága, illetve szemikvantitatív tulajdonsága (Collins 2004, Gonzalez-Hunt et al. 2018).

A *Tunel Assay* által egy- és kétszálú DNS törések, illetve apoptózis is detektálható (Migheli et al. 1995). A módszer érzékenysége és specifikussága jelentik a korlátait (Kumari et al. 2008).

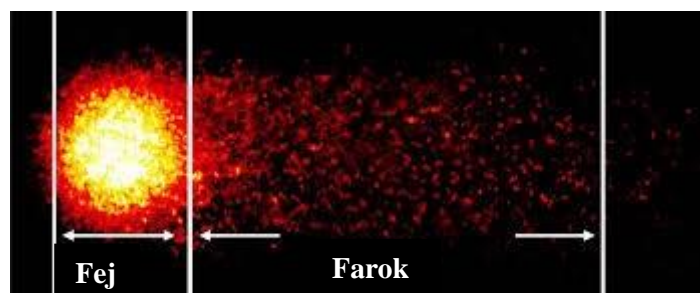
A DNS töredezése nem csak apoptózis, hanem autolízis és nekrozis hatására is kialakulhat, ámde a tunel módszer nem képes megkülönböztetni a sejthalál különböző típusait (Grasl Kraupp et al. 1995).

A *quantitative vagy real time PCR technika* az egyik legismertebb és igen elterjedt eljárás, mely során a templát amplifikációjának (felsokszorozódásának) aránya fordítottan arányos a léziók gyakoriságával. Szekvencia specifikusan, nagy teljesítményű, többek között genotoxikus anyagok kiszűrésére alkalmazható érzékeny, gyors, arányaiban kis laboreszköz és költségigényű eljárás (Kumari et al. 2008, Lehle et al. 2014). Befolyásoló tényező a templát kezdeti mennyisége (Kumari et al. 2008). Széles körben lelhető fel használatuk DNS és RNS mennyiségi meghatározásra vagy mutációk felderítésére a genetikai diagnosztikában. Számos módosítás, fejlesztés következtében különböző specifikációval rendelkező real time PCR technika áll rendelkezésre, mint például a hot TaqMan próba vagy a SYBR Green alapú PCR-ek (Sang et al 2015).

2.5.1. A comet assay

A comet assay (módszer), más néven egyetlen sejt gélelektroforézis (SCGE) módszere az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a DNS károsodás vizsgálatára. Segítségével az egy sejtben bekövetkező DNS károsodás ténye és mértéke határozható meg. Ennek segítségével becsülhető a károsodás eloszlása a sejtpopulációban (Kent et al. 1995, Augustyniak et al. 2014). Segítségével a környezetben jelen lévő, közvetlen DNS károsodásra képes genotoxikus anyagokat vizsgálhatunk, döntően egy- és kétszálú törések, illetve oxidatív DNS károsodás esetén. E módszer felhasználása széleskörű, mivel a genotoxikológiában, a molekuláris epidemiológiában, a takarmányozás-élettanban és az orvostudományban egyaránt alkalmazható. Felhasználják élőhelyek állapotának felmérésében, különböző környezeti szennyezések hatásának nyomon követésére. *In vitro* sejteken, illetve *in vivo* mintákon is elvégezhető vizsgálat (Olive 1989, Haines 2002, Collins 2004, Brendler-Schwaab 2005, Frankič et al. 2006, Azqueta et al. 2009, Dhawan et al. 2009, Horvatovich et al. 2013).

Ezt a módszert a nyolcvanas évek végén, 1988-ban fejlesztették ki (Kent et al. 1995). A comet, azaz az üstökös feje maga a sértetlen sejtmag, alakja gömb, a fark, azaz a csóva pedig a fejből származó sérült, töredezett DNS (Kent et al. 1995, Augustyniak et al. 2014), amit a 1. ábra szemléltet:



1. ábra: Egy károsodott sejt, az üstökös részei (Olive & Banáth 2006)

Az ép sejt esetében csupán az üstökös feji része látható, pontszerű, mivel a DNS sértetlen marad. Az egyre nagyobb károsodást szenvedett sejt DNS állománya üstököscsövát produkál, a fej része egyre kisebb, míg a csóva egyre nagyobb lesz, mivel a sérült, töredezett DNS mennyisége megnő.

A comet assay jól elkülöníthető lépésekre osztható, melynek első szakasza a sejtek agaróz gélbe ágyazása. Ezután a sejtek lizálása következik alkalikus vagy semleges kémhatás mellett (Wojewódzka et al. 2002), amit a kicsavarodási fázis követ. A gélbe ágyazott sejteket ezután elektroforézisnek vetik alá, Az elektroforézis alatt alakulnak ki az üstökösök. A száradt és tartósított tárgylemezek DNS-hez kötődő festékkel elvégzett festése után fluoreszcens mikroszkóp segítségével láthatóvá válnak az üstökösök. Az egyes fázisokban a várakozási idők betartása lényeges, melyek hosszát többek között a sejtek típusa is meghatározza (Olive 1989, Gedik et al.

1992, Tice et al. 2000). A festék megválasztása is lényeges. A leggyakrabban felhasznált interkaláló festék az etidium-bromid, amely hatékonyabban kapcsolódik kettős szálú DNS-hez mint az egyszálú DNS-hez. Ugyanez mondható el a 4,6-diaminido-2-fenilindolról is. Ezzel szemben az akridin narancs az egyszálú nuklein sav jelenlétében piros színt mutat, míg kétszálú DNS esetében sárgászöld színű lesz a fluoreszcens kép (Collins 2004).

Az üstökös képek kiértékelése történhet vizuálisan (szubjektív módon) vagy számítógépes program segítségével (objektíven).

A vizuális analízis gyorsnak mondható és nem igényel számítógépes, illetve szoftveres háttérrel, kivitelezése gyakorlatot kíván, ám könnyen elsajátítható (Kobayashi et al. 1995, Collins 2004). A vizuális kiértékelés során 4 vagy 5 kategória kialakítására van szükség, ahol a '0' kategória jelenti a sértetlen sejtet. A kiértékelés során figyelembe kell venni az elvándorlás hosszát, illetve a comet csóva részében lévő DNS relatív arányát (Collins 2004, Hafner et al. 2012, Horvatovich et al. 2013). Collins és munkatársai (1997) összevetették a vizuális kiértékelést és a szoftveres paramétert (DNA % a csóvában/farokban), az eredmények erős korrelációját mutatták ki.

Ha a kiértékelés szoftveres úton történik, akkor több paraméter mérésére van lehetőség, mint a csóva százalékos DNS tartalma. Mérhető az elvándorolt DNS százalékos hányada a sejtmagtól (DNA in tail), a csóva hossza (a fej és az utolsó fragment távolsága), a csóva erőssége/intenzitása (a csóva hossz x a csóva DNS %-ával, tail moment) (Collins 2004, Mozaffarieh et al. 2008, Kumaravel et al. 2009). A csóva hossza kevésbé informatív paraméter, mivel nagy károsodás esetében a csóva hossza nem nő arányosan, illetve a háttér és az egyéb szoftver beállítások befolyásolják a kiértékelését. A csóva intenzitása nem lineáris lefutású a károsodással, az üstökös alakja nem előrejelezhető. Ezzel szemben a csóva százalékos DNS tartalma lineáris kapcsolatban van a károsodás mértékével, általa előrejelezhető az üstökös képe. Szoftveres kiértékelés esetében minimum 50 sejt kiértékelése szükséges (Collins 2004).

Rendelkezésre állnak ingyenes, illetve licence díjas programok, amelyekbe beolvasható az adott üstökös képe, manuálisan kerülnek kijelölésre az üstökösök részei, majd a paraméterek számítását a program végzi el. Ilyen a NIH Image, Komet 5 Image, az OpenComet, a CapsLab, illetve CometScore program (TriTek) is (Helma & Ulm 2000, Chaubey 2005, Miskolczi 2007, Györi et al. 2014). Emellett automatizált kiértékelő módszer is felhasználható az üstökösök eredményének elemzéséhez (Böcker et al. 1999).

Számos előnnyel rendelkezik, mint az egyszerűség, érzékenység, rugalmasság, sokoldalúság, a sejtciklus bármelyik fázisában lévő sejtek vizsgálhatósága, relatív alacsony költségű, alacsony a szükséges sejtszám, hosszan tartósítható tárgylemezek (Collins 2004, Wang et al, 2005, Olive & Banáth 2006).

A módszernek több korlátja, hibázási lehetőség ismert: az agaróz réteg nem kötődik a tárgylemezhez (lecsúszik róla), a három egymásra helyezett réteg szakadása, elvizesedése (Klaude et al. 1996), a minimum 50 comet kiértékelése nem elegendő, amennyiben heterogenitás tapasztalható a sejtpopulációban (a kiértékelésre kerülő üstökösök számai vizsgálatonként eltérőek). Amennyiben a vizsgálandó minta tartalmaz nekrotikus/apoptotikus sejteket, a DNS károsodás mértékének meghatározása csorbát szenved, mivel a comet assay-vel mért DNS károsodás nem feltétlenül közvetlen genotoxicitás eredménye, hanem az apoptózis/nekrózis által végbemenő DNS fragmentáció következménye is lehet. A módszer kivitelezése alatt a DNS károsodhat; több oldalra van szükség meghatározott pH érték mellett, ezáltal nagyfokú precizitás szükséges. A comet assay érzékenységét befolyásolja a közeg kémhatása, lúgos kémhatás által a replikációs villa egyszálú töredékként viselkedik, így az S-fázisban lévő DNS migrációja gyorsabb. Semleges kémhatás alatt a DNS az S fázis alatt egy replikációs buborékot képez, ezáltal képes a migrációt visszatartani. A módszer validálása, a sejtkoncentráció helyes meghatározása elengedhetetlen, a túl magas koncentráció esetében az üstökösök elkülönítése akadályoztatott, a lizálás fázisa gátolt, a kiértékelés elvégezhetetlen (Olive & Banáth 2006). Legideálisabb, amennyiben a DNS károsodás és a sejtlizálás között kevés idő telik el, mivel a sejtben bekövetkező DNS javítás már csökkentheti a DNS töredezés mértékét, ezáltal egyes DNS léziók kimutatása

csökken. Ennek kiküszöbölésére a lízis kombinálható addukt specifikus enzimek használatával, ám kevés ilyen enzim (pl.: formamido-pirimidin DNS glikoziláz) ismeretes, illetve döntően *in vitro* körülmények között bizonyítottan (Wang et al. 2005). A lézió specifikus enzimekkel kiegészített comet assay használata elenyésző *in vivo* kísérletek során, csupán egerek és patkány esetében jelentek meg eddig publikációk (Collins et al. 2020). A comet assay-vel, a halo assay-hez hasonlóan, csak nukleáris DNS vizsgálható (Gonzalez-Hunt et al. 2018).

Látható, hogy a comet assay hatékonyságának és specifikusságának növelését célzó módosításokra van törekvés, összehasonlításban más DNS károsodást vizsgáló módszerrel így is alul tud maradni. Nikolova és munkatársai (2017) a semleges, illetve az alkalikus comet assay eredményeit hasonlították össze a γ H2AX fókusz vizsgálat eredményeivel négy ismert genotoxikus anyag (metil metanszulfonát (MMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG), mitomicin C és hidrogén peroxid (H₂O₂)) hatására. A γ H2AX fókusz vizsgálat lineáris dózis választ adott mindegyik vizsgált anyagra, megállapította genotoxicitásukat. A comet assay esetében a csóva intenzitását vizsgálták, mely paraméterben emelkedést tapasztaltak az egyre nagyobb dózis hatására három vizsgált anyagnál, ám a mitomicin C teljesen hatástalannak bizonyult e módszer alkalmazása során. A két módszer eredményei erős korrelációban álltak hidrogén-peroxid, illetve metil metanszulfonát esetében, MNNG vizsgálatokor gyenge korreláció volt kimutatható, mitomicin C esetében pedig semmilyen kapcsolat nem volt. Ennek ismeretében arra következtethetünk, hogy a γ H2AX fókusz vizsgálat megbízhatóbb és érzékenyebb, mint a comet assay genotoxicitás által generált DNS károsodás vizsgálata során.

Lehle és munkatársai (2014) a comet assay-t összevetették qPCR (Santos et al. 2006), illetve LORD-Q PCR technikákkal humán sejtvonalon (Jurkat - leukémiás T-sejt limfoblaszt) 20 perces bleomicin kezelés hatására bekövetkező DNS károsodás nyomonkövetésére. A qPCR technikával 1 μ M koncentrációjú bleomicin mennyiségnél volt kimutatható szignifikáns DNS lézió növekedés, ez a szignifikáns változás comet assay-nél 500 nM koncentráció esetén mutatkozott. A LORD-Q PCR technika a bleomicin 10 nM koncentrációjánál már szignifikáns DNS lézió szám emelkedést mutatott ki, így érzékenysége kimagaslónak bizonyult a másik két vizsgált módszerhez képest.

Ko (2016) szintén összehasonlítást végzett a comet assay, illetve a LORD-Q PCR technika között humán sejtvonalon *in vitro*. Tendenciálisan hasonló eredményeket produkált a két módszer, ám a szerző kihangsúlyozta a laborigény közötti különbséget: a LORD-Q PCR technikával történő vizsgálat 6 órát vett igénybe, ezen időintervallum töredékében volt szükség a jelenlétre a PCR készülék használata miatt. Ezzel szemben a comet assay elvégzésének ideje 10 órára tehető, mely során több reagenst kell összeállítani és rövid várakozási időket betartani, a reagensek miatt is több laborszakozat használatára van szükség a LORD-Q PCR módszerhez viszonyítva.

Evans és munkatársai (2016) markánsabb különbséget mutattak ki a comet assay és a LORD-Q PCR eredményei között PBMC (peripheral blood mononuclear cells) humán sejtvonalban UV hatásának vizsgálatokor. A comet assay OTM paraméterét figyelembe véve az alkalmazott két UV dózisú csoport (20, illetve 100 mJ/cm²) szignifikánsan eltért a kontroll csoporttól, ám a két kezelt csoport között nem volt kimutatható különbség. Ezzel szemben LORD-Q PCR-rel végzett nukleáris és mitokondriális DNS vizsgálata során a kezelt csoportok nemcsak a kontrolltól, hanem egymástól is eltértek szignifikánsan.

2.5.2. A LORD-Q PCR technika

A real-time (rt) PCR alapú módszerek egyik felhasználási korlátja a DNS próba hossza, melynek optimális tartománya néhány száz bázisra tehető. Emellett az interkalálódó fluoreszcens festékek, mint a SYBR Green, képesek a polimeráz enzimeket koncentráció függő módon gátolni, mivel beépülnek a DNS két szála közé. Ámbar, ha a léziók eloszlása a genomban egyenetlen, a hosszabb templát szekvencia statisztikailag több PCR-gátló DNS változást tartalmaz. Ezáltal csökken az ép templát szekvenciák száma, ami miatt kimutatható az amplifikáció exponenciális fázisának késése cp vagy ct érték meghatározásával. Következésképpen a próba hossza és a DNS

léziók előfordulása a próba szekvenciában lineárisan korrelál egymással, így a hosszabb DNS próba növeli a DNS károsodás meghatározásának érzékenységét.

A LORD-Q PCR technika elméleti alapja, lényege, hogy a templát DNS-ben jelenlévő károsodások csökkentik a PCR amplifikációs hatékonyságát. Ennek számszerűsítése érdekében egy hosszú, 3000-4000 bázispár körüli, illetve egy rövid, 100-200 bázispár körüli fragmentet sokszorozunk fel. A két szakasz ct értéke egyre inkább eltávolodik egymástól, minél több, illetve kiterjedtebb léziót tartalmaz a hosszú fragment, annál inkább nagyobb ct értékkel fog rendelkezni. A rövid próba ct értéke képezi a belső referencia értéket, mivel a rövid szakasz kis mérete miatt statisztikailag elenyésző mennyiségű léziót tartalmazhat. A rövid, illetve a hosszú szakasz ct értékeiből kalkulálható a DNS károsodás mennyisége.

A LORD-Q PCR technika előnyei a nagyfokú érzékenység, specifikusság, költséghatékonyság, kisebb laborigényű, gyorsan elvégezhető, kis mennyiségű mintát igényel, nukleáris, bakteriális, illetve mitokondriális DNS károsodás kimutatására is alkalmas. A DNS károsodásokat (pl.: timin dimerek, abázikus helyek, egy és kétszálú törések, 5-hidroximetil-citozin, DNS adduktok) kumulatív módon mutatja ki (Lehle et al. 2014, Ko 2016, Dannenmann et al. 2017, Patenge 2017, Zhu & Coffmann 2017).

Ko (2016) felvet egy sarkalatos pontot a LORD-Q PCR módszerrel kapcsolatban, az optimalizációt. Kísérlete során több esetben nagy eltérést detektált a technikai ismétlések során. Okként megjelöl három indokot: az alkalmazott DNS kinyerési módszer (fenol-kloroformos DNS kinyerés), ez mindenképpen logikus gondolat, mivel a DNS kinyerés során a kinyerést végző személy is képes a DNS-t mechanikai behatások (pl.: vortexelés, centrifugálás) által károsítani. Második megfogalmazott ok az *in vitro* sejtkultúrában felhasznált szelén jelenléte, mely gátolni képes a DNS polimeráz működését. Ennek valószínűsége minimálisra tehető az ismétlődő mosási lépések révén. Harmadik ok esetében a kiválasztott gén (p53) nem megfelelően reprezentálja a nukleáris DNS-ben bekövetkező károsodásokat. E probléma nem jelentkezik mitokondriális DNS vizsgálata során. Az optimalizáció során Ko (2016) megemlíti az „elkenődött háttér” (smear) megjelenését, amit a túl magas DNS koncentrációnak tud be. Ezen kívül megemlíti az átermékek, dimerek megjelenését a gélben, amit például magasabb annealing hőmérséklettel lehet megszüntetni. Tapasztalataim szerint a LORD-Q PCR egyetlen nehézsége az optimalizáció, ami igen időigényes is lehet, mivel a DNS kinyerési eljárás, az alkalmazott DNS polimeráz, a festék, a PCR mix koncentrációja, a bemért DNS koncentráció, illetve a PCR beállításának minden paramétere befolyásolni képes a technika specifikusságát és érzékenységét. A sikeres, mindenre kiterjedő és ellenőrzött PCR optimalizációt egyszer szükséges elvégezni egy adott faj esetében, majd azt követően bármilyen szöveten, bármilyen anyag hatása tesztelhetővé válik.

Ezidáig leginkább humán sejtvonalakon, *in vitro* mintákon alkalmazták a PCR technikát (Lehle et al. 2014, Evans et al. 2016, Ko 2016, Dannenmann et al. 2017, Patenge 2017), minimálisra tehető az *in vivo* kísérletekből származó minták vizsgálata. Zhu & Coffmann (2017) zebradánió *in vivo* mintákon végezte el a LORD-Q PCR-t, mely által szövetek (agy, máj, szív, izom) öregedését, ezáltal károsodását mérték.

Lehle és munkatársai (2014) fejlesztették ki a módszert és vizsgálták hatékonyságát és érzékenységét. *In vitro* humán Jurkat T limfocita sejtvonalon tesztek négy ismert genotoxikus ágens (ciszplatin, UVC, bleomicin, etopozid) és mindegyik esetében dózisfüggő módon mutatták ki a károsodást a mitokondriális, illetve a nukleáris DNS-ben egyaránt. Szubletális genotoxicitás ellenőrzésére pedig bleomicin 20 perces, illetve 6 órás expozícióját használták, majd megállapították, hogy mindkét időpont után kimutatható volt DNS károsodás, még a sejthalál beindulását megelőzően is. Ennek ismeretében a LORD-Q PCR képes a korai genotoxikus események kimutatására függetlenül az apoptotikus sejthalál bekövetkezésétől.

A LORD-Q PCR kidolgozása során Lehle és munkatársai (2014) igen drága DNS polimerázt és festéket alkalmaztak (KAPA2G Fast Hot Start ReadyMix (Peqlab), ResoLight festék (Roche)), Evans és munkatársai (2016) célul tűzték ki, hogy olcsóbb PCR összetevőkkel (Hot FIREPol[®] DNA polimeráz (Solis Biodyne), SYTO82 festék (Life Technologies) helyettesítsék ezen alkotókat ugyanolyan fokú specifikusság, érzékenység és megismételhetőség mellett.

Emellett céljuk volt az eredeti cikkhez képest más DNS izoláló kit (DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) helyett Quick-gDNA™ Miniprep (Zymo Research)) kipróbálása, illetve másik PCR készülék alkalmazása (Roche LightCycler 480 II készülék helyett Corbett Rotor-Gene 6000), ezáltal bebizonyítani a LORD-Q PCR technika rugalmasságát, széles körű használatát eltérő laborfelszereltség mellett. Zhu és Coffmann (2017) szintén módosította a PCR összetevőit (Platinum Pfx DNA polimeráz, ThermoFisher Scientific; Syto-9, ThermoFisher Scientific, illetve EvaGreen, Biotium festékek), illetve egyéb DNS izoláló kit-et (E.Z.N.A. DNS kit, OMEGA) alkalmazott. Edwards (2009) megerősítette, hogy az EvaGreen sokkal kevésbé gátolja a DNS amplifikációját, ezáltal hosszú szakaszok felsokszorozásához alkalmazható.

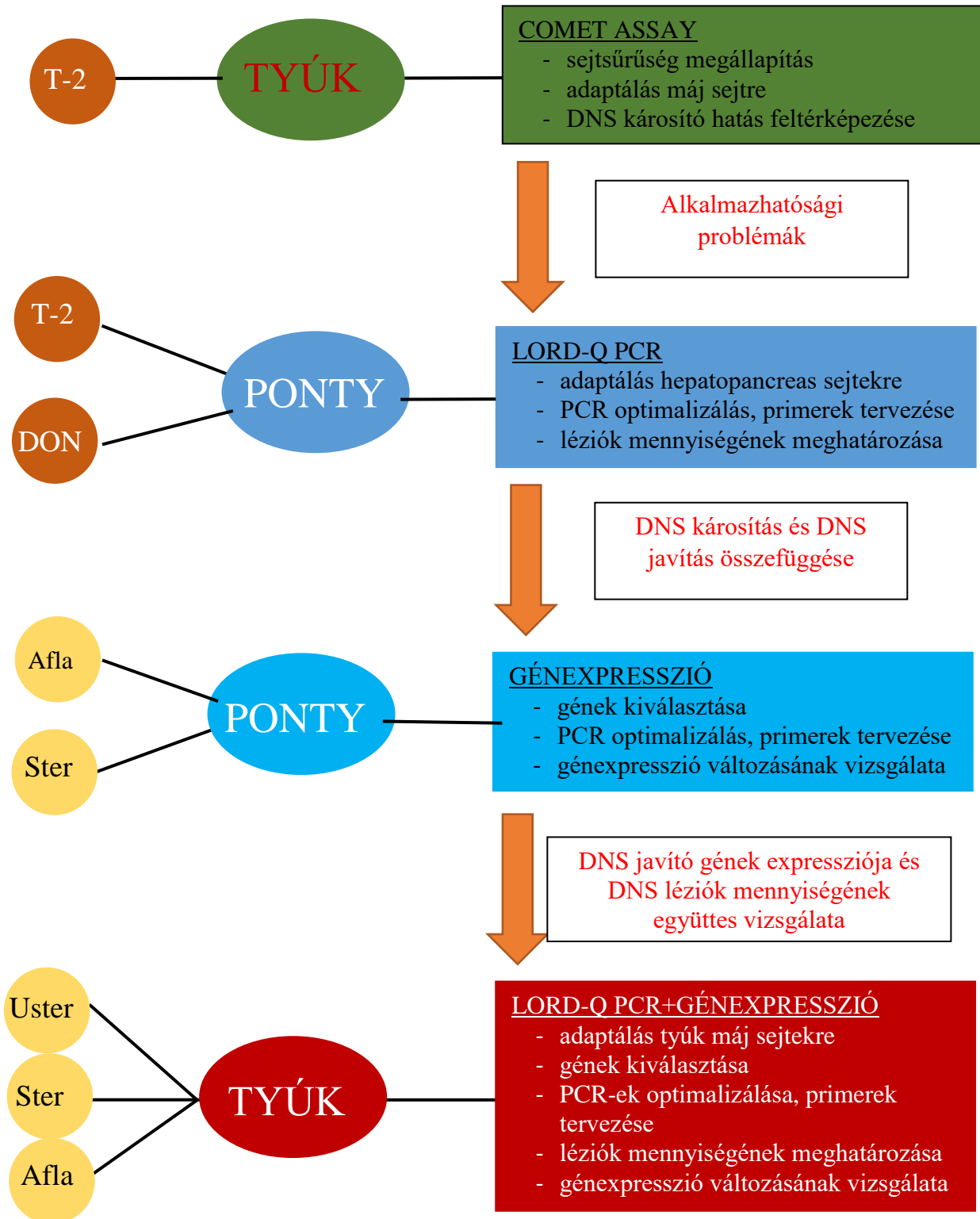
A LORD-Q PCR technika érzékenységét és specifikusságát Lehle és munkatársai (2014) összehasonlították a szemi-long (közepesen hosszú) PCR technikával a ROC (Receiver Operating Characteristic) analízis során. Az 1 érték jelenti a kezelt és kontroll csoport közötti teljes különbséget, míg 0,5 a véletlenszerű eredményeket. A bleomicin legkisebb koncentrációjában (100 nM) a ROC értéke LORD-Q PCR esetében 1,0, 10 nM koncentrációban pedig 0,934. Mindkét koncentrációban a szemi-long PCR ROC analízis során kapott értékei alacsonyabbak (0,901; 0,5). A LORD-Q PCR során alkalmazott hosszú próba ellenére e technika kedvezőbb érzékenységű és specifikusabb. Ez azzal is magyarázható, hogy a szemi-long PCR során alkalmazott DNS polimeráz kisebb hatékonyságú, illetve az real time PCR során gyakran használt SYBR Green festék jobban gátolja a reakciót az EvaGreen-nél (Lehle és munkatársai 2014). A PCR módszer specifikusságát a mindenkori használat során ellenőrizhető az olvadási görbével (melting curve), illetve elektroforézissel. Ko (2016) humán mellrák (BRCA1) sejtvonalon alkalmazta a LORD-Q PCR-t, minden kísérleti mintában egyetlen éles csúcsot detektált a folyamat végén, azaz a kívánt fragmens amplifikációja sikerrel járt.

Lehle és munkatársai (2014) LORD-Q PCR fejlesztésekor megvizsgálták, hogy a DNS károsodás mely típusait képes a módszer kimutatni. Egy bázis különbséget hordozó különböző oligonukleotidokat alkalmaztak templátként, majd meghatározták a relatív amplifikációjukat. Az abázikus hely (abasic site), a timin dimer, 5-hidroximetil-citozin (5-hm-dC) jelenléte esetében gátló hatás volt kimutatható a relatív amplifikációs rátán a bázis módosítást nem tartalmazó kontroll templáthoz viszonyítva. Egyéb bázis módosítások, adduktok (8-oxodeoxoadenozin, 8-oxo-deoxiguanin) jelentéktelen mértékben voltak képesek befolyásolni relatív amplifikációs rátán. A LORD-Q PCR precizitását és érzékenységét bizonyítja, hogy az abázikus hely, timin dimer, illetve 5-hm-dC jelenléte esetében is a léziók minimális számú ($\geq 0,3$ detektált lézió/10 kb) jelentését is detektálni képes.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Az elvégzett vizsgálatok összefüggései

A 2. ábra mutatja be a vizsgálatokban alkalmazott mikotoxinokat, a kísérletekben résztvevő állatfajok és a vizsgálatok során elvégzett feladatokat. A vizsgálatok közötti összefüggéseket és logikai kapcsolatokra is rámutat a 2. ábra.



2. ábra: Az alkalmazott mikotoxinok, a fajok és az elvégzett vizsgálatok összefüggései

3.2. Tyúk fajban végzett kísérletek elrendezése a comet assay vizsgálat során

3.2.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése

A T-2 toxin *Fusarium sporotrichoides* NRRL 3229 P törzs által kukoricadara szubsztráton került termeltetésre Fodor *et al.* (2006) módszere szerint. A mikotoxin (T-2, HT-2) tartalom visszamérése céljából mintavételezés történt, ami immunaffinitás előtisztítás után nagy felbontású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel valósult meg (Trebstein *et al.*, 2008). T-2 és HT-2 toxinok kimutatási határértéke 0,02 mg/kg takarmány volt.

3.2.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma

Az állatok közforgalomban kapható, a Vitafort Zrt. által gyártott intenzív brojler indító teljes értékű takarmánykeveréket fogyasztottak dercés formában. A vizsgálni kívánt mikotoxinokat meghatározott mennyiségben tartalmazó kukoricadara a takarmánnyal került összekeverésre por formájában. A keveréktakarmány eredetileg nem tartalmazott a kimutatható határértékeket meghaladó mértékben mikotoxinokat. A kísérleti csoportok takarmányainak mikotoxin szennyezettségének mértéke a következőképpen alakult (1. táblázat):

1. táblázat: Comet assay tyúk vizsgálatban kialakított csoportok és azok T-2 és HT-2 szennyezettségének visszamért értékei

Csoport megnevezése	T-2	HT-2
	mg/testttömeg kg	
kontroll	<0,02	<0,02
THT1	0,127	0,088
THT2	0,235	0,149
THT3	0,989	0,57

3.2.3. Kísérleti állatok és tartásuk

A kísérletben Ócsáról származó Cobb 540 brojler kakasok vettek részt. A kísérlet során négy csoport került kialakításra, csoportonként öt állattal. A kontroll csoportban lévő állatok átlag testtömege a kísérlet kezdetekor (14. életnap) $395,85 \pm 47,72$ g volt, a többi csoport átlag testtömege maximum $\pm 5\%$ -ban tért el. A toxinterhelés a 14. életnapon kezdődött, majd az állatok exterminálása a toxinterhelés 14. napján, a 28. életnapon történt a nyaki érkomplex átvágásával (http1).

A kísérlet helyszíne a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék Kísérleti tere volt. Az etetési kísérlet állatkísérleti engedéllyel történt (NÉBIH Pest Megyei Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, XIV-I-001/1880/2012).

3.2.4. Mintavételezés

A szövetminták *post mortem*, kórboncolás során kerültek begyűjtésre. A minták a máj bal oldali lebenyéből származtak. Minden minta Eppendorf csőbe került és azokat a felhasználás előtt maximálisan 20 percig jégen tároltuk.

3.2.5. Comet-assay vizsgálat

3.2.5.1. A comet-assay elvégzéséhez szükséges oldatok elkészítése

A foszfát puffer a Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS tableta csomagoláson látható előírás szerinti feloldásával állítottam össze.

A lízis oldat elkészítésekor (1 l mennyiség esetén) 146,2 g NaCl, 37,2 g EDTA, illetve 1,2 g Tris kimérését követően 800 ml desztillált vizet adtam ezen komponensekhez. A pH értékét 10-re szükséges beállítani szemcsés nátrium-hidroxid folyamatos adagolásával, majd a víz és a vegyszerek elegyét 1 liter mennyiségre állítottam be. Használat előtt 1,5 ml Triton X-100-at és 15 ml DMSO kerül 135 ml lízis oldathoz.

Az elektroforézis puffer esetében két oldatot készítettem el 1-1 liter űrtartalom mennyiséggel. 2000 ml desztillált vízbe mértem be 120 ml mennyiséget az 5 normális NaOH oldatból (NaOH 200 g/liter (5N)) és 10 ml mennyiséget az EDTA oldatból (EDTA 74,4 g/liter).

A semlegesítő puffer pH-értékét 7,5-re állítottam be tömény HCl segítségével (Tris 48,5 g/liter).

A festő oldatot használat előtt 1:9 arányban hígítottam PBS-sel (etidium bromid 10 mg/50 ml desztillált víz).

3.2.5.2. Tárgylemezek elkészítése

A májdarabokat 100-szoros arányban hígítottam foszfát pufferrel. A szuszpenzió elkészítéséhez ollót, spatulát, majd Vortex-keverőt használtam (2500 fordulat/perc, 30 sec.), ezek után a minták jégre kerültek. A továbbiakban a felülúszó került felhasználásra 75 μl mennyiségben. A pozitív kontroll minták kialakításához hidrogén-peroxidot (10 μl , 3% v/v) használtam fel.

Először 0,8 % (w/v) normál agarózt készítettem, majd ebbe az agarózba merítettem bele a tárgylemezeket. A lemez egyik oldaláról eltávolítottam a gélt, majd papírra helyezve dermedtek meg. Miután ez az agaróz réteg megszilárdult, 75 μl 1% (w/v) alacsony olvadáspontú agarózt juttattam a lemezekre, illetve azonos mennyiségű sejtsuszpenziót. Ezt követően fedőlemez került a tárgylemezekre és 5 percre jégakkura helyeztem azokat az újabb agaróz réteg megszilárdulásáig. A fedőlemez eltávolítását követően egy harmadik réteget vittem fel a tárgylemezre (90 μl 0,5% (w/v) alacsony olvadáspontú agaróz). Ismét fedőlemezzel borítottam az utolsó réteget is, majd 5 percen keresztül jégakkura kerültek a lemezek, ennek lejárta után eltávolítottam a fedőlemezeket.

Az ezt követő lépések elsötétített laborban folytak. A tárgylemezeket egymás mellé helyeztem egy üvegcádban és lízisoldatot öntöttem rájuk, mely oldatban minimum egy óráig voltak a tárgylemezek 4°C-on. A lízisoldatban eltöltött idő után a tárgylemezek lecsepegtetését követően elektroforézis kádba helyeztem, amit elektroforézis pufferrel töltöttük fel a lemezek elfedéséig. A 40 perc várakozási idő után az elektroforézis következett (20 V, 300 mA, 24 perc). Ezután a lemezek lecsepegtetése következett, majd semlegesítő pufferrel öntöttem le a lemezeket, amit 5 perc elteltével megismételtem. A sötét szakasz ekkor ért véget.

A lecsepegtetett lemezekre 50 μl etidium-bromidos festő oldatot juttattam, majd fedőlemezzel fedtem. Mikroszkóp alatt UV fényben vizsgáltam a keletkezett üstökösöket 20x nagyítás mellett. A fotókat Nikon Eclipse E600 típusú mikroszkópra szerelt QCapture MicroPublisher 3.3 RTV digitális fényképezőgéppel készítettem el. A vizsgálat során minimum 150 sejt került kiértékelésre minden csoportban.

3.2.5.3. Comet assay eredményeinek kiértékelése

Az üstökösök képeinek kiértékelését kétféle módszerrel végeztem el. A manuális kiértékelést CometScore (TriTek) programmal végeztem el és kapott nyers adatokból a % DNA in Tail, azaz a sejtmagtól elvándorolt DNS százalékos hányadát vettem figyelembe, mint a leggyakrabban vizsgált paramétert (Collins 2004). GraphPad QuickCalcs kalkulátor segítségével a szignifikánsan eltérő értékek kiválogatásra kerültek, mely értékek a CometScore program manuális üstökös kijelöléseinek tévedéseiből származnak. Ezt követően a %-os értékek arcsin gyök transzformáció segítségével egy mértékegység nélküli értékekre számítottam át a statisztikai

kiértékelés végett. Vizuális kiértékelést is elvégeztem (Singh et al. 1988, Collins et al. 1997, Horvatovich et al. 2013), mely során az üstökösöket egyesével minősítettem egy 0-4 közötti skálán a farok részben jelen lévő DNS fragmentumok mennyisége alapján. Minden csoportból legalább 100 sejtet vizsgáltam (Horvatovich et al. 2013).

3.3. Ponty fajban végzett kísérletek elrendezése a LORD-Q PCR vizsgálat során

3.3.1. Mikotoxin termelődése és annak ellenőrzése

A kísérletben használt T-2, illetve DON mikotoxinok termelését egy együttműködés keretében a KE-MTA „Mikotoxinok Az Élelmiszerláncban” kutatócsoport végezte kukoricadara szubsztráton. A T-2 toxint a *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 törzs, míg a deoxinivalenolt (DON) a *Fusarium graminearum* NRRL 5883 törzs segítségével állították elő (Fodor et al. 2006). A kontroll és a mesterségesen szennyezett takarmányok DON (Pussemier et al. 2006), illetve T-2 toxin (Trebstein et al. 2008) tartalmának ellenőrzése immunaffinitás előtisztítás után nagy felbontású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel történt.

3.3.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma

A pontyokkal végzett kísérletben kereskedelmi forgalomban lévő Aqua Garant Classic™ takarmány (extrudált, lassan süllyedő takarmány növedék pontyok számára) került felhasználásra. A megtermeltetett mikotoxinok feloldásra kerültek (T-2 toxin: 50ml etanolban; DON: 150ml desztillált vízben), majd külön-külön 3kg pellet takarmányra permeteztük rá. Egy éjszakán át 50°C-on tartottuk az így elkészített takarmányokat, hogy az etanol, illetve a víz elpárologhasson. A kontroll takarmányok elkészítésekor a pellet takarmányt 25 ml etanollal (T-2 toxin kontroll) vagy 75 ml desztillált vízzel (DON kontroll) kezeltük, a további előkészítés ugyanúgy zajlott. A kontroll takarmányból, valamint a kísérletes mikotoxinnal szennyezett takarmányokból mintavétel történt a mikotoxinok koncentrációjának visszamérése céljából. A takarmányok mikotoxin tartalma a következőképpen alakult (2. táblázat):

2. táblázat: A ponty LORD-Q PCR vizsgálatban kialakított csoportok és azok T-2, HT-2, DON és 15-acetil DON szennyezettségének visszamért értékei

Toxin Csoportok	T-2	HT-2	DON	15-acetil DON
	mg/testtömeg kg			
Kontroll	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
T-2 mikotoxin	4,11	0,49	-	-
DON	-	-	5,96	0,33

3.3.3. Kísérleti állatok és tartásuk

A vizsgálathoz egynyaras hibrid pontyokat (Szarvasi P34, n=144) használtam, amelyeket az ÖKO 2000 Kft.-től szereztem be. A kísérlet kezdetekor a pontyok testtömege 23,26±6,86 g volt. Akklimatizációs periódus után (1 hét) a pontyokat három különböző csoportba osztottuk véletlenszerűen. A tartás 6 db, azonos úrtartalmú (150 L) akváriumban valósult meg (n=24). A halakat fél-statikus rendszerben, klórtalanított vízben tartottuk (a víz legalább egy napig át volt szellőztetve a felhasználás előtt). A vízcseré mértéke kétnaponta elérte az 50%-ot, az oxigén szintjének maximalizálása érdekében az akvárium vizének folyamatos átlevégőztetése ment végbe. A víz hőmérséklete a kísérlet egésze alatt 18±1°C volt. A megvilágítási programot 12 óra sötét/12 óra világos szakaszokra osztottuk fel. Az állatok testtömege a kísérlet indításakor 35,92±2,82 g volt. A víz egyes paramétereit a kísérlet időtartama alatt monitoroztuk, így a hőmérsékletet (18±1°C, laboratóriumi termométer), az oldott oxigén koncentrációját (8±1,7mg/L,

HACH HQ30d hordozható Multi-paraméter mérőműszer), a pH szintjét (7,2-7,5, HACH HQ30d hordozható Multi-paraméter mérőműszer), illetve a teljes ammónia szintet ($0,2\pm 0,3$ mg/L, HANNA HI 83203 Multiparaméter fotóméter). A pontyok etetése napi kétszer történt (reggel 8 órakor és délután 16 órakor) teljesen megegyező adagban. A takarmány mennyisége a pontyok testtömegének 1%-ában lett meghatározva, melynek felülvizsgálata hetente történt a mintavételezett halak átlagos testtömege alapján.

A kísérlet helyszíne a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék volt. Az etetési kísérlet állatkísérleti engedéllyel történt (NÉBIH Pest Megyei Élélmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, XIV-I-001/2304-4/2012).

3.3.4. Mintavételezés

A folyamatos mikotoxin terhelés mellett az 1., 2. és 3. héten kezelésként, véletlenszerűen kiválasztott 6-6 egyedből történt a mintavétel. A pontyok szegfűszegolajjal (*Syzygium aromaticum*) történő túlaltatását, majd dekapitációját követően *post mortem* máj (*hepatopancreas*) mintát vettem a molekuláris biológiai vizsgálathoz. A májmintákat a mintavételt követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, majd a felhasználásig -80°C -on tároltuk.

3.4. Ponty fajban végzett kísérletek elrendezése a génexpressziós vizsgálat során

3.4.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése

Az aflatoxin B1 termeltetése Dobolyi és munkatársai (2013) által izolált *Aspergillus flavus* törzs (ZT80) által ment végbe kukoricaőrleményen. Az aflatoxinnal szennyezett takarmányok toxin tartalmának visszaellenőrzése immunaffinitás előtisztítás után nagy felbontású folyadékkromatográfiás (FAML-A-02:2016 AFLAPREP® HPLC) módszerrel történt. A magas ($99,0\pm 1,0\%$) tisztaságú szterigmatocisztint Romer Labs Diagnostic (Tulln, Austria) cégtől szereztük be.

3.4.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma

Az aflatoxin B1-et tartalmazó kultúrát belekevertük a kereskedelmi forgalomban lévő Aqua Garant Classic™ takarmányba (extrudált, növedék pontyok számára), majd közvetlenül felhasználás előtt 5 ml vízzel oldottuk fel. A szterigmatocisztin feloldása abszolút etanolban történt, majd összekevertük a takarmánnyal. A mikotoxinok dózisa Kövesi et al. (2018) eredményei alapján, illetve azon előrejelzések alapján kerültek meghatározásra, amelyek szerint az aflatoxin B1 toxicitása tízszerese a szterigmatocisztinnek. A takarmányok mikotoxin tartalma a következőképpen alakult (3. táblázat):

3. táblázat: A ponty génexpressziós vizsgálatban kialakított csoportok és azok aflatoxin B1 és szterigmatocisztin szennyezettsége

Csoportok	Aflatoxin B1	Szterigmatocisztin
	mg/takarmány kg	
Kontroll	-	-
Aflatoxin B1 (A)	0,4	-
Szterigmatocisztin 1 (Ster1)	-	1
Szterigmatocisztin 2 (Ster2)	-	2
Szterigmatocisztin 4 (Ster4)	-	4

3.4.3. Kísérleti állatok és tartásuk

A vizsgálatban egynyaras balatoni sudár pontyok vettek részt (n=96), melyeket a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt.-től (Buzsák-Ciframajor) szereztük be. A kísérlet kezdetekor a pontyok testtömege $27,09 \pm 5,38$ g volt. Egy hetes akklimatizációt követően a pontyokat öt különböző csoportba osztottuk véletlenszerűen (kontroll, aflatoxin B1, szterigmatocisztin 1, szterigmatocisztin 2, szterigmatocisztin 3). A halakat fél-statikus rendszerben, klórtalanított vízben tartottuk folyamatos átszellőztetés mellett. A víz hőmérséklete a kísérlet egésze alatt 19 ± 1 °C volt. A megvilágítási programot 12 óra sötét/12 óra világos szakaszokra osztottuk fel. Csoportonként 21 ponty egyszer, gyomorszondán közvetlenül kapta a csoportjához tartozó takarmányt. A szárazanyagra vonatkoztatott takarmány-táplálóanyagtartalom a következően alakult: 50,5% nitrogénmentes kivonható anyag, 30% nyersfehérje, 7,5% nyersshamu, 7% nyerszsír és 5% nyersrost.

A kísérlet helyszíne a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék volt. Az etetési kísérlet állatkísérleti engedéllyel történt (NÉBIH Pest Megyei Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, XIV-I-001/2304-4/2012).

3.4.4. Mintavétel

A pontyok túlaltatása szegfűszeg olajjal (*Syzygium aromaticum*) történt. Csoportonként 4 állatból gyűjtöttem *post mortem* májmintákat a takarmány bejuttatása utáni 8., 16. és 24. órákban. A májmintákat 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztem, majd pedig folyékony nitrogénbe. A minták további tárolása felhasználásig -80°C-os fagyaszóban történt.

3.5. Tyúk fajban végzett kísérletek elrendezése a LORD-Q PCR + génexpressziós vizsgálat során

3.5.1. Mikotoxin termeltetése és annak ellenőrzése

Az aflatoxin B1 termeltetése *Astergillus flavus* törzssel (ZT41), a szterigmatocisztin termeltetése pedig *Aspergillus creber* 2663 törzssel történt (Dobolyi et al. 2013). A tisztított szterigmatocisztint (99,0±1,0%) Romer Labs Diagnostic (Tulln, Austria) cégtől vásároltuk. A vizsgálatban felhasznált takarmányok aflatoxin B1, illetve szterigmatocisztin tartalmának visszaellenőrzésére nagy felbontású folyadékkromatográfiás (Shimadzu HPLC, Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) módszert alkalmaztuk, aflatoxin B1 esetében RF-20A fluoreszcens

detektorral, szterigmatocisztin esetében pedig SPD-10AVP UV-VIS detektor (254 nm) használata mellett (Balogh et al. 2019).

3.5.2. A takarmányok mesterséges szennyezése és mikotoxin tartalma

A mikotoxin tartalom visszamérése során a szterigmatocisztinnel szennyezett kukorica minták szterigmatocisztin tartalma 7,599 mg/kg, míg az aflatoxin B1 mennyisége 4,785 mg/kg volt az adott tételekben. A csoportok kívánt mikotoxin koncentrációra történő beállításához mikotoxinoktól mentes kukoricát használtunk fel. A tisztított szterigmatocisztin csoport esetében a szterigmatocisztin feloldása abszolút etanolban történt, majd rápermeteztük a takarmányra. A mikotoxinok dózisa Kövesi és munkatársai (2018) eredményei alapján, illetve azon előrejelzések alapján kerültek meghatározásra, amelyek szerint az aflatoxin B1 toxicitása tízszerese a szterigmatocisztinnek. A takarmányok mikotoxin tartalma a következőképpen alakult (4. táblázat).

4. táblázat: A tyúk fajban végzett vizsgálatban kialakított csoportok és azok aflatoxin B1 és szterigmatocisztin szennyezettségének visszamért értékei

Csoportok	Aflatoxin B1	Szterigmatocisztin
	µg/takarmány kg	
Kontroll	-	-
Aflatoxin B1 (AFLATOXIN)	149,1	-
Szterigmatocisztin (STER)	-	1590
Tisztított szterigmatocisztin (USTER)	-	1570,5

3.5.3. Kísérleti állatok és tartásuk

144 Cobb 540 hím naposcsibe került mélyalomra 26±1°C-os teremhőmérséklet alkalmazása mellett. A vizet, illetve a takarmányt *ad libitum* fogyaszthatták az állatok a kísérlet teljes időszaka alatt. 3 hetes akklimatizációs periódust követően, a 21. életnapon a madarak 4 csoportba kerültek szétosztásra (kontroll, aflatoxin B1-AFLATOXIN, szterigmatocisztin-STER, tisztított szterigmatocisztin-USTER), csoportonként két ismétlés kialakítása által (n=18/ismétlés). Az alaptakarmány nevelő takarmánykeverék volt (Vitafort Zrt., Dabas).

A kísérlet helyszíne a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék Kísérleti tere volt. Az etetési kísérlet állatkísérleti engedéllyel történt (NÉBIH Pest Megyei Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, XIV-I-001/1880/2012).

3.5.4. Mintavételezés

Post mortem gyűjtöttem májmintákat csoportonként 6 madártól azok exterminálását követően, a nyaki érkomplex átvágása után. Mintavétel öt alkalommal történt: 1, 2, 3, 7. és 14. napokon az összes csoportból. A májmintákat 1,5 ml-es Eppendorf csőben tároltam, majd folyékony nitrogénbe helyeztem a csöveket. A minták további tárolása felhasználásig -80°C-os fagyaszóban történt.

3.6. Génexpressziós vizsgálatok

3.6.1. RNS tisztítás, cDNS írás

A teljes-RNS izolálását Trizol reagenssel végeztem (Molecular Research Center, Cincinnati) 6 mg májszövetből, a gyártó leírása szerint. A kloroform-izopropanol kicsapás után 75% (v/v) etanollal mostam az RNS-t, majd RNáz-mentes vízben, melegítést (55°C, 10 perc) követően vettem fel. Az izolált RNS tisztaságát, koncentrációját nanofotométer (Implen GmbH, München, Németország), integritását pedig 1,5%-os agaróz gél segítségével ellenőriztem. Azon mintákat fogadtam el, melyek OD 260/280 értéke legalább 1,8 volt. A genomi DNS szennyeződések DNáz enzim (Thermo Fisher Scientific, San Jose) segítségével távolítottam el, a gyártó leírásának megfelelően. RevertAID reverz transzkriptáz enzim (Thermo Fisher Scientific, San Jose), illetve random hexamer primer felhasználásával hoztam létre cDNS-t (1000ng RNS/minta), a gyártó protokollját követve. A cDNS mintákat -80°C-on tároltam.

3.6.2. Kvantitatív real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálat és kiértékelés

Csoportonként 4 ponty májmintát vizsgáltam 3 technikai ismétléssel (Udvardi et al. 2008). 4 célgén (OGG1, GADD45AA, p53, HSP70), illetve 3 belső kontroll gén expresszióját vizsgáltam. A belső kontroll gének (EF1 α , β -aktin, 40S) (Hermesz & Ferencz 2009, Mráz 2012), illetve a célgének felsokszorozásához az OGG1 (Mustafa et al. 2015) és a HSP70 (Stolte et al. 2009) gének esetében az irodalomban található primereket alkalmaztam, míg a GADD45AA és a p53 génekhez terveztem primereket (Primer3Plus) (5. táblázat). Az alkalmazott PCR profilok a következők voltak: 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 55°C, 30mp 72°C a HSP70 gén esetében. 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 57°C, 30mp 72°C a GADD45AA és a p53 gének esetében, illetve 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 60°C, 30mp 72°C az OGG1, az EF1 α , a β -aktin és a 40S gének esetében.

Csoportonként 4 tyúk májmintát vizsgáltam 3 technikai ismétléssel (Udvardi et al. 2008). 6 célgén (RAD51, REV1, BRCA2, XPA, GADD45, MSH6) és 3 belső kontroll gént (GADPH, β -aktin, UB) vontam be a kísérletbe. A felhasznált célgénekhez primert terveztem, míg a belső kontroll gének esetében a szakirodalomban fellelhető primereket alkalmaztam (De Boever et al. 2008, Zhao et al. 2013, Jin et al. 2017) (6. táblázat). Az alkalmazott PCR profilok a következők voltak: 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 59°C, 30mp 72°C a RAD51, a REV1, a BRCA2, az XPA, a GADD45, az MSH6, a GADPH, a β -aktin esetében. 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 61°C, 30mp 72°C a az UB gén esetében.

Mindkét faj esetében a qRT-PCR reakciókat StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, San Jose) készülékben hajtottam végre. A PCR reakcióhoz 5x Hot FirePol® EvaGreen® qPCR Supermix-et (Solis BioDyne, Tartu, Észtország), 6,6 pM/ μ l primereket, illetve 40 ng templát cDNA használtam 10 μ l végtérfogatban. Minden mérés esetében használtam templátot nem tartalmazó (non-template) kontrollt is.

A kapott termék specifikusságát gélelektroforézissel és olvadási görbe analízissel (melting curve) ellenőriztem. A Ct értékeket a StepOne™/StepOnePlus™ szoftver (v 2.2) segítségével határoztam meg. A belső kontroll gének stabilitását BestKeeper Excel alapú szoftver segítségével hasonlítottam össze (Pfaffl et al. 2004). A relatív kvantifikációt a Pfaffl módszer által számítottam ki (Pfaffl 2001).

5. táblázat: Génexpressziós vizsgálatban szereplő ponty primerek szekvenciái

Gén	Forward szekvencia 5'-3'	Reverz szekvencia 5'-3'	Acc. Number /méret (bp)
40S	GCAGCCCACCATCTTCCA	CCTTGCCACTTCCTTCAACAG	AB012087
EF1 α	GGAGCCCAGCACAAACATG	TTACCCTCCTTGCGCTCAAT	AF485331.1
β -aktin	GCAAGAGAGGTATCCTGACC	CCCTCGTAGATGGGCACAGT	M24113
GADD45	TGCACTGCATTCTGGTCACT	TCGTTCTGGAAGGTTAATAATGG	118
OGG1	TCTCGGATTCAGGGCATGGTCG	AGGAAACGTGCGCGGTAGCC	167
p53	ACCCTCAACATCAGTCTGCT	AGCCGTATGCCAGGTGTA	145
HSP70	GGCAGAAGGTGACAAATGCA	TGGGCTCGTTGATGTTCTCA	AY120894

6. táblázat: Génexpressziós vizsgálatban szereplő tyúk primerek szekvenciái

Gén	Forward szekvencia 5'-3'	Reverz szekvencia 5'-3'	Méret (bp)
UB	GGGATGCAGATCTTCGTGAAA	CTTGCCAGCAAAGATCAACCTT	147
GADPH	AGAACATCATCCCAGCGT	AGCCTTCACTACCCTCTTG	184
β -aktin	CCGCTCTATGAAGGCTACGC	CTCTCGGCTGTGGTGGTGAA	128
GADD45	CTGATCTCCATTGCGTCTTG	GCACCCACTGATCCATATAGC	114
MSH6	CGTTTGATGGAACAGCGATA	AGGAGTGGTAATGCGTGGAG	178
XPA	AGGGAACCGGTGCTTAGATT	TTGCAAGGATTCCTCATTCC	132
BRCA2	TCTTATCAGCCACCATGTGC	GACTGCCACTGAAGGTTGCT	206
REV1	AACGCTGCTGAAAGAATGG	TTGTCAAGAATGAAGTCAAATGC	198
RAD51	TTTGGTGTGGCTGTTGTGAT	CAGGAAGGCAAGGAGAGTCA	190

3.7. LORD-Q PCR vizsgálatok

3.7.1. DNS izolálása

A májmintákból származó teljes DNS-t MagAttract[®] HMW DNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével nyertem ki a gyártói protokollt betartva. Az izolált DNS koncentrációját nanofotométerrel (Implen GmbH, München, Németország) ellenőriztem. Azon mintákat fogadtam el, melyek OD (optikai denzitás) 260/280 értéke legalább 1,8 volt. A DNS tisztaságát 1,5%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, mely során Fermentas GeneRuler DNA Ladder Mix-et használtam molekulásúly markerként. A mintákat etídium-bromid segítségével tettem láthatóvá UV-fényben. Az elkészült géleképeket GeneSnap programmal (Syngene) rögzítettem. A minőségében és mennyiségében megfelelő DNS mintákat további felhasználásig -20°C-on fagyasztoóban tároltam.

3.7.2. LORD-Q PCR

A LORD-Q PCR reakciókat StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) készülékben hajtottam végre. A különböző primerek, így a kapott termékek ellenőrzését gélelektroforézissel és olvadási görbe analízissel (StepOne™/StepOnePlus™ szoftver 2.2) végeztem. A PCR reakcióhoz 5x Hot FirePol® EvaGreen® qPCR Supermix-et (Solis BioDyne, Tartu, Észtország), 6,6 pM/μl primereket, illetve 10 ng templát cDNA használtam 10μl végtérfogóban. A primereket a Primer Premier 5 programmal terveztem, majd a kiválasztott primereket rendeltük meg (Integrated DNA Technologies). Minden mérést négy ismétléssel végeztem.

Ponty esetében a primereket a 7. táblázat mutatja be. Az alkalmazott PCR profilok a következők voltak: 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 59°C, 30mp 72°C a rövid fragment esetében, illetve 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 59°C, 4perc 72°C a hosszú fragmenthez.

7. táblázat: Ponty LORD-Q PCR vizsgálatban felhasznált primerek és paramétereik

Primer	Szekvencia 5'-3'	Méret (bp)	Templát genom szakasz	PCR hatékonyság %
F2-R4.R	AAGCACGGATCAGACGAACA	156	5887-6042	94
F2-R4.F	CACGCAGGAGCATCAGTAGA			
F3-R2.R	TAGGCTGGATAATAGGGTTGC	3436	647-4082	86
F3-R2.F	CCGTTCAACCTCACCCTTCT			

Tyúk faj esetében a primereket a 8. táblázat mutatja be. Az alkalmazott PCR profilok a következők voltak: 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 59°C, 30mp 72°C a rövid fragment esetében, illetve 12 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 40 cikluson keresztül 10mp 94°C, 20mp 60°C, 3perc 40mp 72°C a hosszú fragmenthez.

8. táblázat: Tyúk fajban végzett LORD-Q PCR vizsgálatban felhasznált primerek és paramétereik

Primer	Szekvencia 5'-3'	Méret (bp)	Templát genom szakasz	PCR hatékonyság %
Rövid2.R	TACTGGTTGGCTTCCGATTC	186	15779-15924	93
Rövid2.F	CAGCCTCAGTCCTCATCCTC			
Hosszú6.R	TTTGGGAAACAGTCGGGTC	3423	16584-3214	90
Hosszú6.F	CCACATCCTATCACAGACGCTA			

3.7.3. Kiértékelés

A DNS károsodás mértékét a léziók számában határoztam meg. Ehhez leolvastam a kapott Ct értékeket (StepOne™/StepOnePlus™ szoftver 2.2), majd kiszámítottam a ΔCt értékeket a rövid, illetve a hosszú fragmenteknél. A következő képletet használtam a 10 kb DNS szakaszra vetített léziók számításához (Rothfuss et al. 2010):

$$\Delta C_t = (1 - 2^{-(A_{\text{hosszú}} - A_{\text{rövid}})}) \times \frac{10000 \text{ (bp)}}{\text{hosszú fragment hossza (bp)}}$$

3.8. Tyúk fajban végzett vizsgálatok - szövettani metszetek elkészítése, értékelése

Szövettani vizsgálat alá csoportonként három, azonos anatómiai helyről származó májmintát vetettünk, a metszetek az Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszékén készültek el. A 10%-os pufferolt formalinban fixált anyagból (24 óra) 4-5 mm vastag minták kerültek kivágásra kórszövettani vizsgálat céljából. A kivágás után a blokkok víztelenítéses szövet-előkészítése felszálló alkoholsor alkalmazásával történt (Thermo Excelsior víztelenítő automata). A felhasznált köztes oldószer a xilol, majd a paraffinos beágyazás következett (beágyazó automata, Kunz Instruments). A paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszetek készültek (Reichert típusú szánkás mikrotóm), majd tárgylemezre kerültek hideg, majd meleg (65°C) vízfürdő után. A metszetek elsődleges elbírálása céljából hematoxylin-eosin (HE) festést követően (Thermo Varistain 24-4 festőautomata) konvencionális fénymikroszkóp segítségével került sor a szövettani elemzésre. Ezt követően specifikus festési eljárást (PAS reakciót) alkalmaztak a máj glikogén tartalmának és ezáltal indirekt módon a zsíros elfajulásának megállapítására. A felsorolt paramétereken kívül kiértékelési szempont volt: regresszív elváltozások, súlyos degeneratív folyamat (vacuolás elfajulás), lymphocytás-plazmasejtes gyulladáshoz társuló góc, vérkeringési zavarokra utaló elváltozások, bővérűség (pangás) és vérzés jelenléte. A vizsgáló patológus (Dr. Mándoki Mira) a minták jelölését nem ismerte, a csoportok beosztása tekintetében nem volt tájékoztatva. A metszetek scannelése a Panoramic MIDI II (3DHitech) scannerrel történt, a CaseViewer szoftver (3DHitech) segítségével, ami lehetőséget ad további nagyításokra, képrögzítésekre.

3.9. Statisztikai kiértékelés

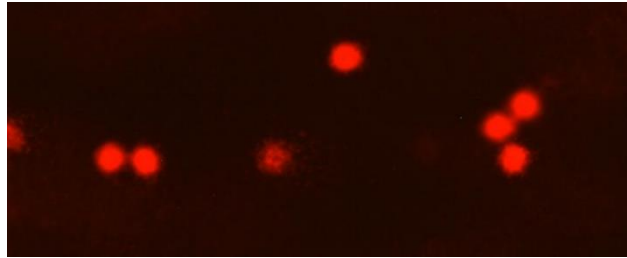
Minden esetben a kapott eredményeket Windows Office Excel táblázatban rögzítettem.

A statisztikai elemzést az R 3.6.2. szoftverrel végeztem el (R Core Team, 2013). A LORDQ, illetve a génexpressziós vizsgálatok eredményei esetében egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam, hogy feltárásra kerüljenek a csoportok, illetve időpontok közötti szignifikáns eltérések. Az ANOVA feltételeinek (homogén eloszlás, azonos szórás) teljesülésének megerősítésére ellenőriztem a szórás-becsült érték ábrát, a Q-Q ábrát, illetve a standardizált reziduumok ábrát. A varianciaanalízist követően Tukey-féle utótesztet (páronkénti összehasonlítást) végeztem. Mivel nem teljesültek az előfeltételek a comet assay-vel kapott eredmények esetében, így a comet assay eredmények kiértékelésére nonparametrikus Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztam Tukey és Kramer (Neményi) utóteszttel. A szignifikancia-szint minden esetben $p \leq 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Comet assay eredmények – tyúk fajban végzett kísérlet

Az elővizsgálataim során tapasztalati úton eljutottam ahhoz a sejtsűrűséghez, ami a leginkább megfelelt a comet assay szakszerű kiértékelésének is. Ez azért volt fontos, mert ilyen irányú tapasztalattal még nem rendelkeztek eddig tyúk májjal kapcsolatban. Emellett a lízis folyamatát és a kiértékelést akadályozhatja egy esetlegesen nagy sejtsűrűség. Nagy sejtsűrűség esetén az üstökösök feji vagy farki részén összeérhetnek, ezt szemlélteti a 3. ábra.



3. ábra: Nagy sejtsűrűséget szemléltető üstökös felvétel (saját felvétel)

A kialakított öt csoport üstökös csóvjában található DNS %-os (%DNS in tail) értékeit a 9. táblázat mutatja be.

A CometScore[®] programmal végzett kiértékelés során szignifikáns különbséget állapítottam meg a kontroll és a pozitív kontroll csoportok között, továbbá a kontroll (K) és a THT1, illetve a THT2 kezelt csoportokhoz viszonyítva. A pozitív kontrollhoz képest a THT1 és a THT3 mikotoxinnal kezelt csoportok különböznek szignifikánsan. A THT1 csoport rendelkezett a legnagyobb DNS % értékkel és szignifikánsan eltért a két kontroll, illetve a további két kezelt csoporthoz viszonyítva. Csoportok közti szignifikáns különbség még a THT2, illetve a THT3 csoportok között volt felfedezhető.

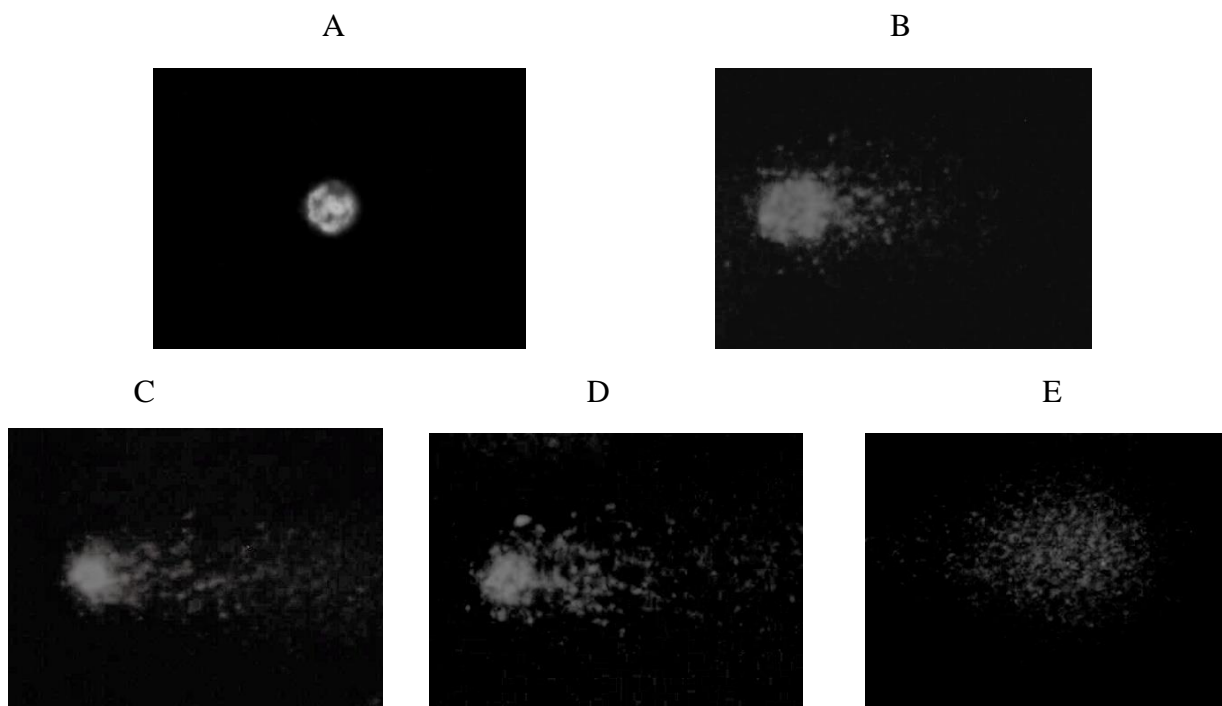
A vizuális kiértékelés során a kontroll csoport statisztikailag különbözött a pozitív kontrolltól, illetve mindhárom kezelt csoporttól. A legkisebb pontszámmal a kezelt csoportok közül a THT2 csoport rendelkezett, mely szignifikáns mértékű eltérésnek bizonyult a THT1 és THT3 csoportokhoz képest.

Az egyes csoportot szemléltető reprezentatív fotó a 4. ábrán látható

9. táblázat: A CometScore[®], illetve a vizuális kiértékelés során kapott eredmények (DNS töredék az üstökös farkában, %)

Csoportok	DNS % a farkban (%)		Vizuális kiértékelés (pontszám)	
	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás
Kontroll	0,11 ^a	0,0002	0,13 ^a	0,3
Pozitív kontroll	0,946 ^b	1,591	3,67 ^c	0,7
THT1	4,319 ^c	5,396	3,50 ^c	0,8
THT2	1,142 ^b	1,194	3,10 ^b	0,9
THT3	0,445 ^a	1,709	3,60 ^c	0,8

a, b, c: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között



4. ábra: A csoportokat jellemző üstökös felvétel (Festés etidium bromiddal; 20x nagyítás)
A: kontroll csoport – csak az üstökös feje látható; B: pozitív kontroll csoport – az üstökös feji és farki része elkülöníthető; C: THT1 csoport - az üstökös feji és farki része elkülöníthető; D: THT2 csoport - az üstökös feji és farki része elkülöníthető; E: THT3 csoport - az üstökös feji és farki része nem különíthető el

Rezar és munkatársai (2007) a kísérletben szereplő THT3 csoporthoz hasonló dózis (1,5 mg T-2/ takarmány kg) mellett nem mutattak ki szignifikáns DNS fragmentációt csirke lépből származó leukocitákban. Ám nagyobb DNS % értéket mértek a farokban (16,75), mint a THT3 csoport értéke CometScore kiértékelés mellett. Ezzel ellentétben a THT1 (0,215 mg T2+HT-2/ takarmány kg), illetve a THT2 (0,384 mg T-2+HT-2 toxin/ takarmány) csoportok között szignifikánsan különböző DNS fragmentációt figyeltem meg kísérletben, míg Rezar és munkatársai (2007) munkájában szereplő 0,5 mg T-2/ takarmány kg dózisú csoportban nem következett be statisztikailag bizonyítható különbség a kontroll csoport értékeihez viszonyítva. Tendenciálisan ugyanez mutatkozott meg Rezar és munkatársai (2007) eredményeiben OTM paraméterek kiértékelése esetében is. Szignifikáns DNS fragmentációt Rezar és munkatársai (2007) csupán a 13,5 mg T-2/ takarmány kg dózisú csoportban találtak, ám a lipidperoxidációra utaló MDA szintje vérplazmában és májban egyik kezelt csoportban sem változott érdemi módon.

Frankič és munkatársai (2006) szintén lép leukocitákban vizsgálva 10 mg/ takarmány kg T-2 szennyezettség eredményezett szignifikáns különbséget a farokban mért DNS %-ában, illetve OTM érték emelkedést detektáltak. Emellett Rezar és munkatársai (2007) eredményeihez hasonlóan sem a vérplazmában, sem a májban nem detektáltak statisztikailag bizonyítható MDA szint változást. Vérplazmában a GPx értékében nem történt változás a kontrollhoz viszonyítva, ám a TAS érték szignifikáns csökkenést mutatott a T-2 kezelt csoportban.

Míg a csirke lép nem mutatott nagyfokú érzékenységet T-2 kitettségek esetén, az általam vizsgált májszövet igen, illetve Sokolovic és munkatársai (2007) által vizsgált tyúk vér szintén. Tyúk fajtól származó vérsejtek (limfociták) esetében 0,5 mg T-2/testtömeg kg mellett szignifikáns mértékű növekedés volt megfigyelhető a comet assay két paraméterében is (farok hossz és TM), míg az általam vizsgált májszövetben kisebb dózis is kifejtett szignifikáns hatást. A májban a T-2 és HT-2 mikotoxinok nagyobb mértékű károsodást tudnak véghezvinni, valószínűsíthetőleg a máj metabolikus funkciója révén.

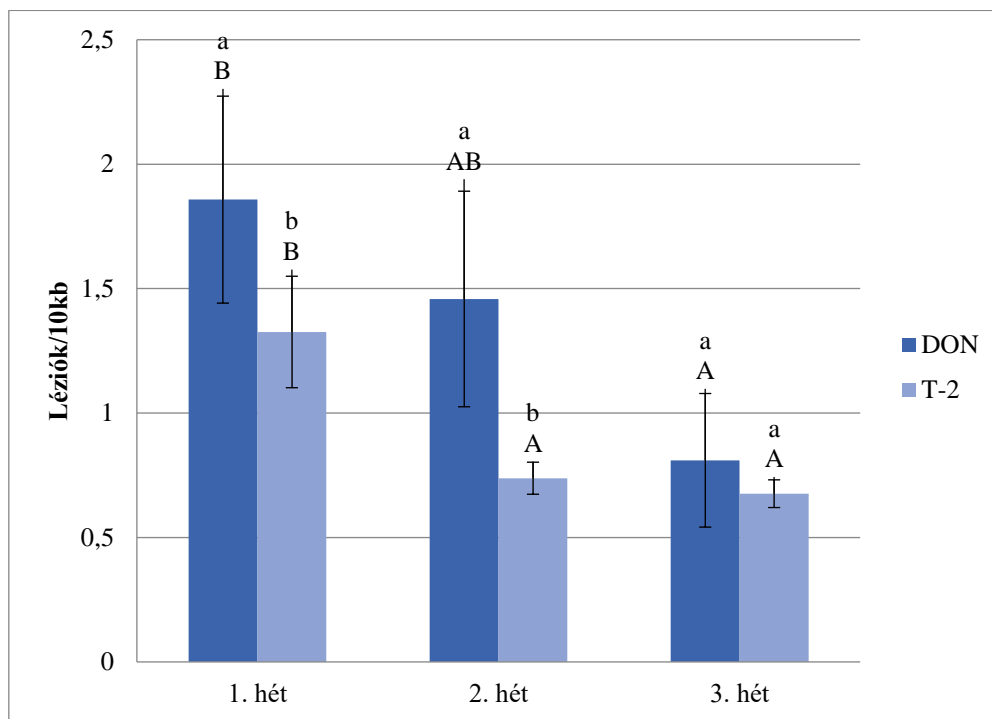
Hah és munkatársai (2006) dózis-függő hatást mutattak ki tyúk vérsejtekben 4-8-16 µg T-2/g takarmány dózis mellett farok hossz és TM comet paraméterek figyelembevétele mellett. Eredményeim nem mutattak ilyen összefüggést a vizuális kiértékelés mellett sem (9. táblázat).

4.2. Ponty LORD-Q PCR eredmények

Az optimalizálási folyamat során feladat volt a primerek tervezése, a PCR reakció komponenseinek összeállítása, illetve a PCR profilok összeállítása. A hosszú szakasz esetében hét primerpárt terveztem és kezdtem optimalizálni ponty fajra, melyek esetében az ampikon hosszúság 3401-6876 bázispár között volt. A rövid szakasz esetében öt primerpárt terveztem és kezdtem optimalizálni, az ampikonok hosszúsága 88 és 242 bázispár között alakult. A primerek hatékonyságának és specifikusságának ellenőrzésében, majd a primerpár kiválasztásában gélelektroforézis és olvadási görbe analízis segített, nem volt cél egy specifikus genomi régió kiválasztása. Négy előzetes PCR mix került kipróbálásra, melyek komponensei voltak különböző DNS polimerázok, mint a RANGER DNS polimeráz (Bioline, London, Anglia) vagy a DreamTaq, Fermentase (Waltham, MA, USA). Komponensek között szerepeltek különböző DNS interkaláló festékek, mint az EvaGreen, Biotium (Fremont, CA, USA), a SYBR Green, Roche Molecular Biochemicals (Basel, Switzerland), illetve egyéb összetevők is (DMSO, ROX, Sigma, Burlington, MA, USA). A templát koncentráció optimalizálása is megtörtént 0,5–50 ng közötti tartományból. A PCR beállítás során 3 lépéses módszert alkalmaztam, a primerek optimális feltapadási hőmérsékletének meghatározása kritikus pont volt, így 55 és 62°C közötti hőmérséklet került letesztelésre.

Az első mintavétel alkalmával szignifikánsan megnövekedett a léziók száma mindkét kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,001$). A DON és a T-2 mikotoxinnal kezelt csoport szignifikáns mértékben eltért egymástól, ugyanez a trend rajzolódott ki a 2. héten a kezelt csoportok között, illetve a kontroll értékéhez képest. A 3. hét alkalmával a léziók mennyiségében nem volt kimutatható szignifikáns különbség a kezelt csoportok és a kezelt-kezeletlen csoportok

között ($p=0,164$). Az időbeni változások nyomán követésekor az 1. héten mért lézió mértéke szignifikáns módon csökkent a 2. hétre, mely már nem különbözött statisztikailag a 3. hét lézió mennyiségétől T-2 mikotoxinnal szennyezett csoport esetében. A DON mikotoxinos csoport esetében az 1., illetve a 3. hét lézióinak értékei tértek el egymástól statisztikailag, a léziók értékei lépcsőzetes csökkenést írtak le az idő előrehaladtával (5. ábra).



5. ábra: A kezelt csoportok DNS lézió eredményei a három mintavételi időpontban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Frankič és munkatársai (2006) munkájában összehasonlításra került a T-2 és a DON mikotoxinok DNS fragmentációra gyakorolt hatása pecsenyecsirkék lépében. 17 napos etetési periódust követően mindkét mikotoxin szignifikánsan nagyobb DNS % értéket produkált a farokban a kontrollhoz képest, ám a DON szignifikánsan kisebb értékkel bírt a T-2 toxinhoz viszonyítva. Kapott eredményeim ponty fajban ezzel ellentétesek, mivel az 1. és a 2. héten is a DON alakított ki szignifikánsan több léziót a T-2 mikotoxinhoz viszonyítva. A 3. héten kapott eredményeim közül a DON esetében található hasonlóság Frankič és munkatársai (2006) eredményei között OTM paraméter figyelembevételével, miszerint a DON csoport nem tért el szignifikánsan a kontroll csoport értékétől. Frankič és munkatársai (2006) munkájában a T-2 mikotoxin statisztikailag nagyobb OTM értéket produkált, míg saját eredményeim szerint a T-2 a 3. héten már nem okozott szignifikáns mértékű DNS lézió mennyiségbeli növekedést pontyban. Awad és munkatársai (2012) 10 mg DON/ takarmány kg 5 hetes etetését követően kapott csirke limfocita eredményei szintén ellentétesek saját eredményeimmel. Vizsgálatukban a DON szignifikáns DNS % a farokban paraméter emelkedést produkált 5 hét után is, míg saját eredményeimben a DON csupán az 1. és 2. héten alakított ki szignifikáns hatást.

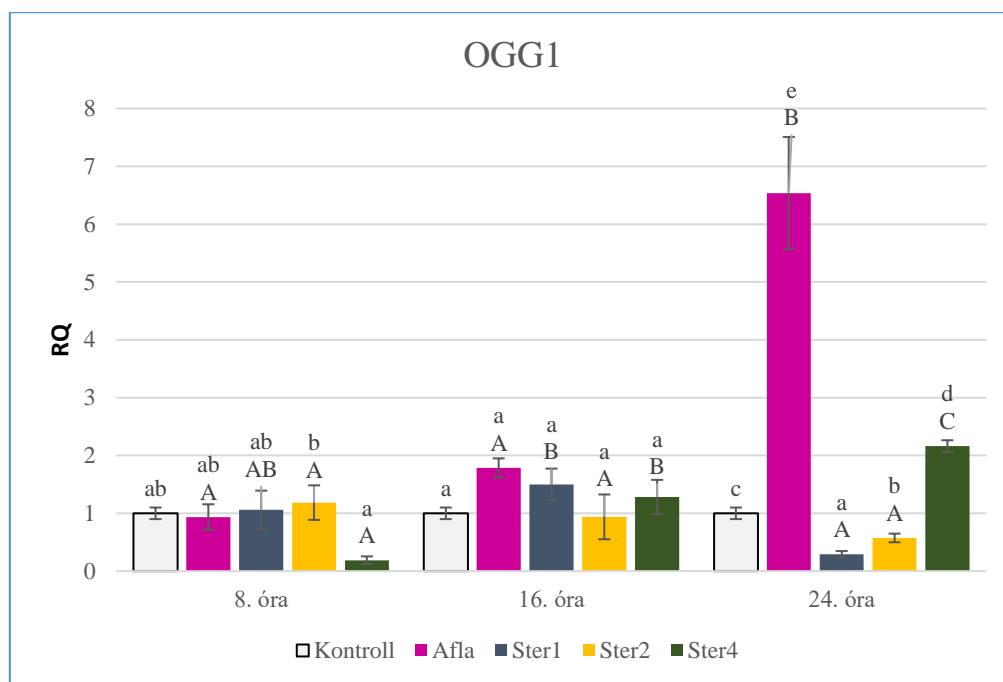
4.3. Ponty génexpressziós eredmények

Az optimalizálás során feladatom volt a primerek tervezése a GADD45AA és a p53 génekre, illetve a PCR profilok összeállítása. A primerek hatékonyságának és specifikusságának ellenőrzésében, majd a primerpárok kiválasztásában gélelektroforézist és olvadási görbe analízist használtam fel. A PCR beállítása során 3 lépéses módszert alkalmaztam, a primerek optimális feltapadási hőmérséklete alacsonyabb volt az alkalmazott enzim optimális működési hőmérsékleténél, nem volt egységes (60°C).

Legstabilabb referencia génnek a 40S bizonyult.

Az **OGG1** gén esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva egyik vizsgált csoport génexpressziós értéke sem tért el szignifikánsan a 8. órában. A Ster4 csoport szignifikáns génexpresszió csökkenést mutatott a Ster2 csoporthoz képest. A 16. órában legnagyobb génexpressziós értékkel az Afla csoport bírt, ám szignifikáns eltérés nem volt kimutatható a csoportok között. A 24. órában mind a négy kísérleti csoport génexpresszió értéke szignifikánsan eltért a kontrollétól, illetve egymáshoz viszonyítva is. A legnagyobb mértékű génexpresszió növekedés az Afla csoportban volt látható, ezt követte tendenciálisan a Ster4 csoport. A Ster1 és Ster2 csoportokban alulexpresszált állapot rajzolódott ki.

Az Afla csoport 8. és 16. órában mért génexpressziója szignifikánsan kisebb volt a 24. órában mért értékkel szemben. A Ster1 csoport esetében szignifikáns eltérés csak a 16. és a 24. óra között volt kimutatható. Egyik időpont között sem mutatott szignifikáns eltérést a Ster2 csoport. Ezzel szemben a Ster4 csoportnál mindegyik időpont génexpressziós értéke szignifikánsan eltért a másik 2 időpont értékéhez képest (6. ábra).



6. ábra: Az OGG1 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

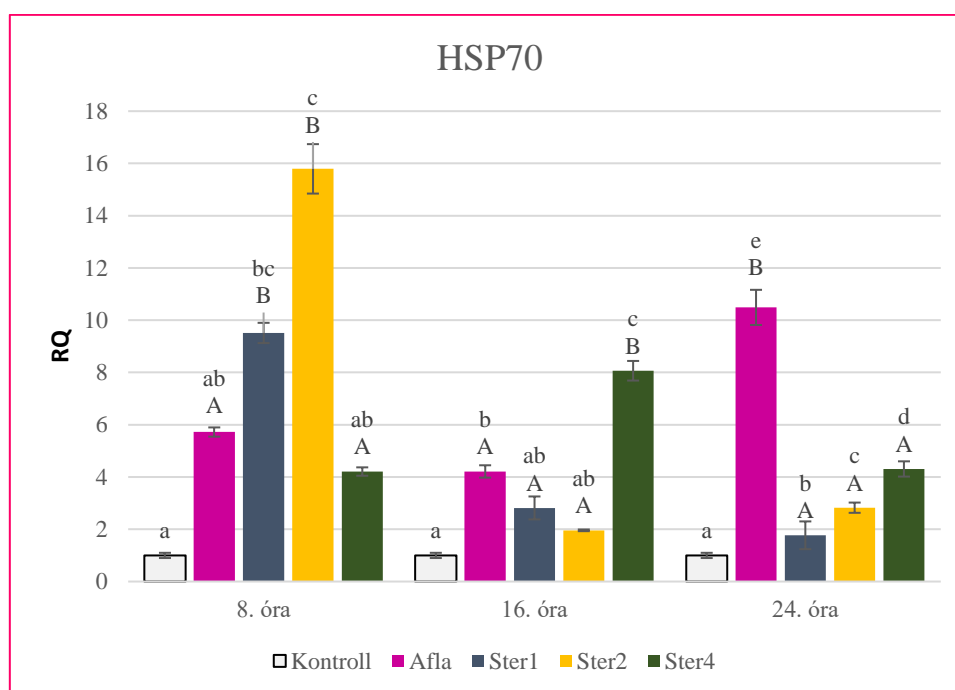
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Vizsgálatomban sem a 8., sem a 16. órában nem alakult ki szignifikáns OGG1 expressziós változás aflatoxin B1 vagy szterigmatocisztin kezelés hatására. Liu és munkatársai (2018) szintén ezt az eredményt mutatták be 0,01 μM AFB1 koncentráció mellett humán máj sejtvonalban. Majd a 24. órában eredményeim szignifikáns expressziós növekedést mutattak az Afla és a Ster4 csoportokban. Mustafa és munkatársai (2015) OGG1 szignifikáns expresszió emelkedést hipoxiás

állapotot kialakítva tudtak előidézni, ami a hipoxiás állapotot követő rehabilitációs időszakban is szignifikánsan magasabb volt. Guindon-Kezis és munkatársai (2014) szintén szignifikáns emelkedést mutattak ki a relatív OGG1 fehérje szintben 50 mg/kg AFB1 adagolás hatására eger tüdő és májszövetben egyaránt.

A **HSP70 gén** vizsgálatakor a 8. órában expresszió növekedést mutattam ki az összes kezelt csoportban, ami szignifikánsnak bizonyult a Ster1 és Ster2 csoportokban a kontroll csoport értékéhez viszonyítva, illetve a Ster2 és Afla, illetve Ster4 csoportok között. A 16. órában az Afla és Ster4 csoportok tértek el szignifikánsan a kontrolltól, a Ster4 csoport túlexpresszált állapota szignifikánsan felülmúlta a többi kezelt csoportot. A 24. órában mind a négy kísérleti csoport génexpresszió értéke szignifikánsan eltért a kontrolltól, illetve egymáshoz viszonyítva is különbséget detektáltunk.

Az Afla csoportban a 24. órában génexpresszió növekedés volt megfigyelhető, ami szignifikáns mértékű volt a 8. és a 16. órai eredményekhez képest. Ezzel ellentétesen a Ster1 és Ster2 csoportokban a 8. órában volt látható nagymértékű génkifejeződésbeli növekedés, ami szignifikánsan csökkent a további két megfigyelési időpontban. A Ster4 csoport esetében a 16. óra eredménye szignifikánsan különbözött a 8. és a 24. órai értékekhez viszonyítva (7. ábra).



7. ábra: A HSP70 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

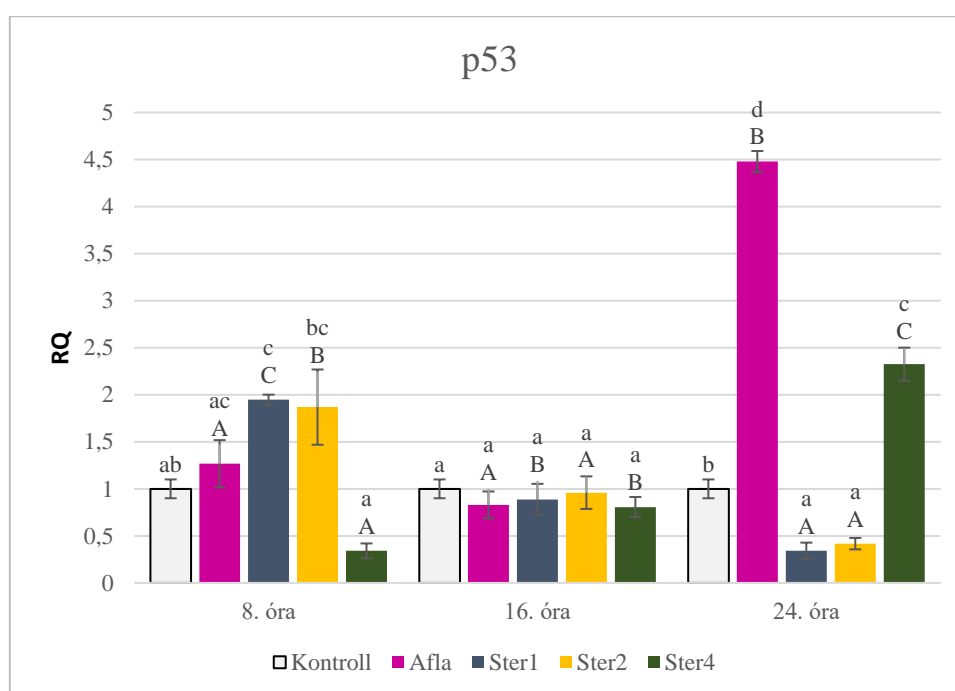
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

HSP70 génexpressziós növekedést mutattam ki 8. órában a Ster1 és a Ster2 csoportokban, majd a 16. órában az Afla, illetve a Ster4 csoportokban. Szintén e gén kifejeződésében találtak emelkedést El Gendy és munkatársai (2020) textilipari területről származó *Trachyderma hispida* példányokban. 24. órában mért génexpressziós eredményeim mindegyik csoport esetében szignifikáns emelkedést mutattak. Kócsó és munkatársai (2021) 150 $\mu\text{g}/\text{patkány}/\text{nap}$ zearalenon, 150 $\mu\text{g}/\text{patkány}/\text{nap}$ fumonizin B1, illetve 30 $\mu\text{g}/\text{patkány}/\text{nap}$ DON egyedüli és együttes kezelés esetében is szignifikáns növekedés mutattak ki 24 órát követően a HSP70 fehérje mennyiségében májszövetben. Mackei és munkatársai (2020) szintén a 24. órában a HSP70 koncentrációjában szignifikáns emelkedést detektáltak 100, illetve 1000 nmol/L T-2 mikotoxin hatására *in vitro* csirke májszövetben eredményeimmel hasonlatosan. Ám Wan és munkatársai (2015) T-2

mikotoxin esetében ellenkező trendet találtak, miszerint a 24 órás 40 nM expozíció hatására *in vitro* patkány GH3 sejtvonalban csökkent a HSP70 expressziója. Szignifikáns, illetve nem szignifikáns HSP70 génextpressziós csökkenést egy csoportban, egy időpontban sem mértem.

p53 gén kifejeződésének vizsgálatakor a 8. órában csak a Ster1 csoport mutatott szignifikáns expresszió növekedést a kontroll csoporthoz viszonyítva. Nem volt kimutatható szignifikáns különbség a 16. órában. Majd a 24. órában az Afla, illetve a Ster4 csoportokban génextpresszió növekedés, a Ster1 és a Ster2 csoportokban szignifikáns csökkenés volt detektálható szignifikáns módon a kontrollhoz képest.

Az Afla csoportban génextpressziós növekedés volt megfigyelhető a 24. órában, ami szignifikáns mértékű volt a 8. és a 16. órai eredményekhez képest. A Ster1 csoport értékeiben lépcsőszerű csökkenés mutatkozott, melyek minden esetben statisztikailag is eltértek egymástól. A Ster2 csoportban a legnagyobb expressziós növekedés a 8. órában mutatkozott, amely szignifikánsan eltért a másik két időponthoz viszonyítva. A Ster4 csoportban folyamatos lépcsőszerű szignifikáns génextpresszió növekedés volt megfigyelhető (8. ábra).



8. ábra: A p53 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

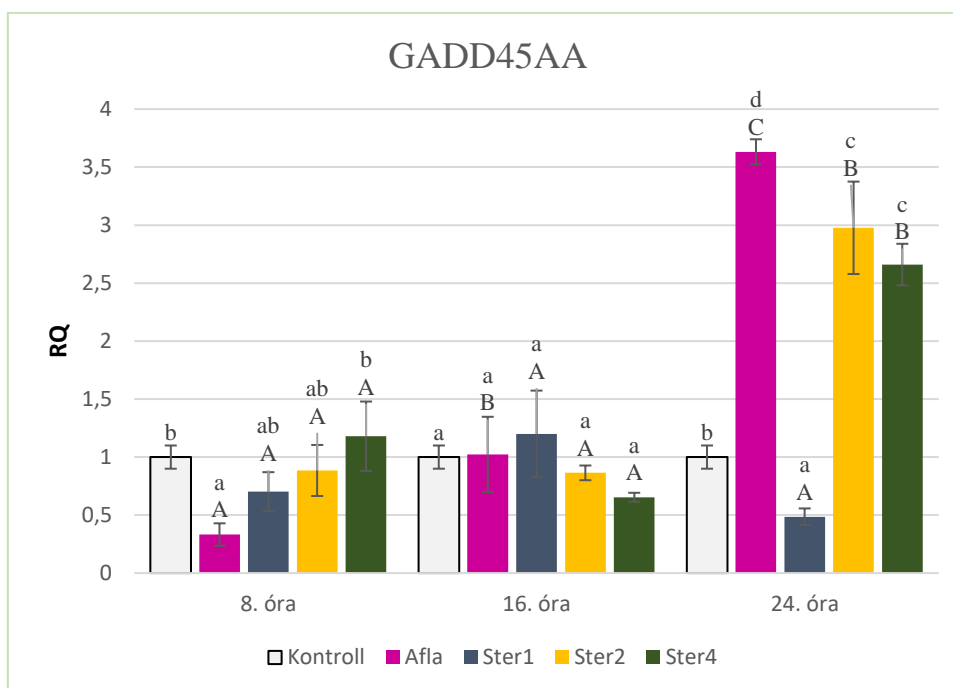
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

A HSP70 és a p53 génextpressziója hasonlóan alakult eredményeim alapján a 8., illetve a 24. órában, ami megerősíti Yang és munkatársai (2009) megfigyelését, miszerint a HSP70 részese a p53 DNS javító útvonalának. Bensassi és munkatársai (2009) p53 fehérjével kapcsolatos eredményeihez képest eltérő tendenciát kaptam, mivel munkájuk során DON (10 μ M) *in vitro* HT 29 humán sejtvonalban a 8. és a 16. órában magasabb p53 fehérje mennyiséget mértek a 24. órai értékekhez képest. Saját eredményeimben a p53 génextpresszió a 8. órában csak a Ster2 csoportban emelkedett meg szignifikánsan, ám a 24. órában az Afla és a Ster4 csoportokban is. Mulder és munkatársai (2015) májban található 8-OH-Gua mennyiségét elemezve azt találták, hogy a BER aktivitás az AFB1 1 ppm dózisban 26 héten át egerekben 65%-ban kisebb volt, mint 20 ppm dózis esetében, amennyiben az állat rendelkezett a p53 génnel. Az Afla csoportban kapott legnagyobb mértékű génextpressziós eredményem is rámutat, hogy e génnek nemcsak hosszú, de rövid (24 óra alatt) távon is fontos szerepe van a DNS károsodás javításában. Ayed-Boussema és munkatársai

(2008) szintén expresszió emelkedést tapasztaltak 24 órát követően humán hepatocita sejtvonalban zearalenon (120 μM) hatására p53 gén, illetve párhuzamosan a GADD45 gén esetében is.

A **GADD45AA** gén kifejeződésének elemzésekor az volt tapasztalható, hogy csupán az Afla csoportban következett be szignifikáns csökkenés, mely statisztikailag bizonyíthatóan a kontroll, illetve a Ster4 csoportoktól tért el a 8. órában. A 16. órában nem történt szignifikáns változás, míg a 24. órában a kontrolltól mindegyik kezelt csoport szignifikánsan különbözött. Az Afla és a Ster1 csoport egymástól, illetve a Ster2 és a Ster4 csoportoktól is eltért.

Az időbeni változások nyomán követésekor megfigyelhető, hogy az Afla csoportban folyamatos szignifikáns mértékű expresszió emelkedés detektálható. A Ster1 csoport értékei időben szignifikánsan nem különböztek egymástól. A Ster2, illetve a Ster4 csoportok esetében a 24. óra értéke tért el statisztikailag is a 8. és a 16. óra eredményeihez képest (9. ábra).



9. ábra: A GADD45 α gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

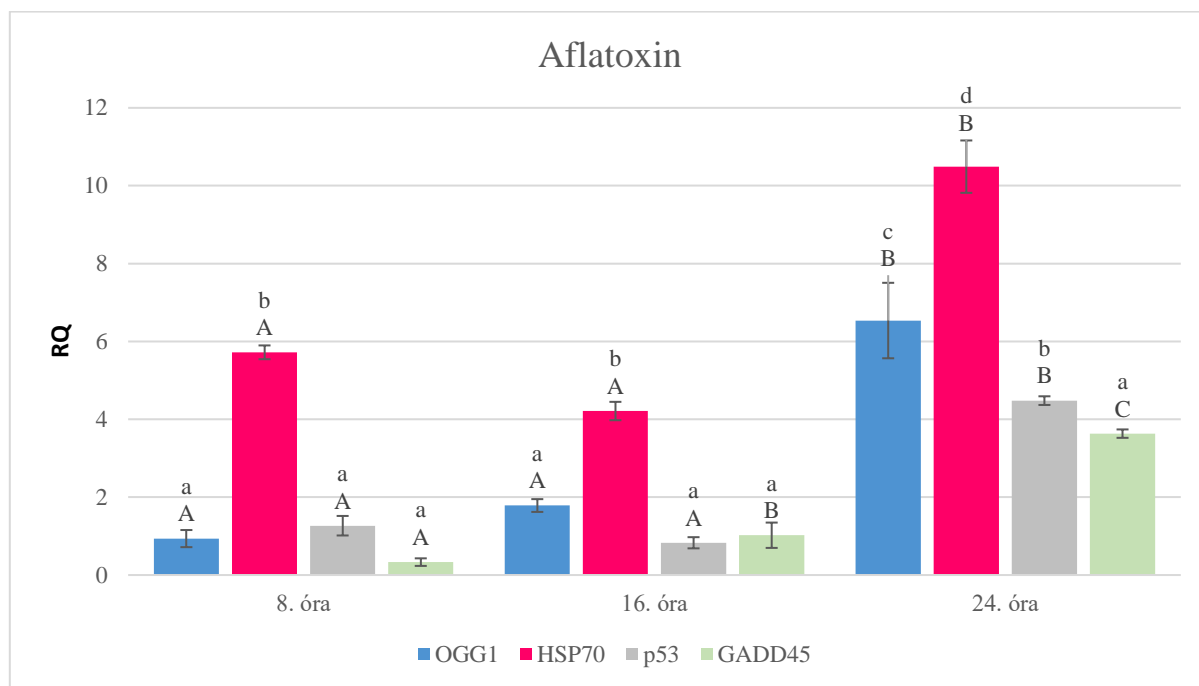
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Yang és munkatársai (2018) 8 órát követően expressziónövekedést tapasztaltak GES-1 humán sejtvonalban DON kezelés (1,25-10 μM) hatására. Pontyok esetében a 8. órában a Ster4 csoportban figyeltem meg expresszió növekedést, de ez sem bizonyult statisztikailag igazolható mértékűnek. Génexpressziós emelkedést a 24. órában mértem a STER1 csoport kivételével. Li és munkatársai (2013) szintén GADD45 α expressziós növekedését mutatták ki 1000 ng/ml DON koncentráció esetében egér pajzsmirigy sejtekben. A 12. órában 13-szoros, míg a 24. órában 15-szörös mértékben, míg saját vizsgálatomban a legnagyobb expresszió növekedés az Afla csoportban csupán 3,5-szörösnek bizonyult. Brennan és munkatársai (2017) GADD45 α esetében mutattak ki génexpresszió növekedést citrinin (52,75 μM), illetve ochratoxin A (8,91 μM) mikotoxinok esetében szarvasmarha makrofágokban. A növekedés 1,96-szoros volt a kontrollhoz képest, vizsgálatomban az Afla, a Ster2 és a Ster4 csoportokban ennél nagyobb expressziós emelkedést mértem. Yang és munkatársai (2019) 72 órát követően tapasztaltak T-2 mikotoxin (0,01 $\mu\text{g/ml}$) esetében 2,05-szörös, míg DON (1,0 $\mu\text{g/ml}$) esetében 3,1-szeres GADD45 α expressziós növekedését. Hasonló volumenű változás aflatoxin B1 és szterigmatocisztin esetében már a 24. órában kimutatható volt vizsgálatom során.

A kiválasztott gének expressziójának összehasonlítását is elvégeztem egy adott kezelt csoportban.

Az aflatoxinnal kezelt csoport esetében a legnagyobb génexpresszióval a HSP70 gén rendelkezett mindhárom vizsgált időpontban, ami minden esetben szignifikáns mértékű volt. Az OGG1, a p53, illetve a GADD45 gének esetében, pedig lépcsőszerű génexpresszió növekedés volt megfigyelhető az idő előrehaladtával, ami szignifikáns mértékű volt a 24. órában az OGG1 és a p53 géneknél, így a GADD45 génnél már a 16. órában (10. ábra).

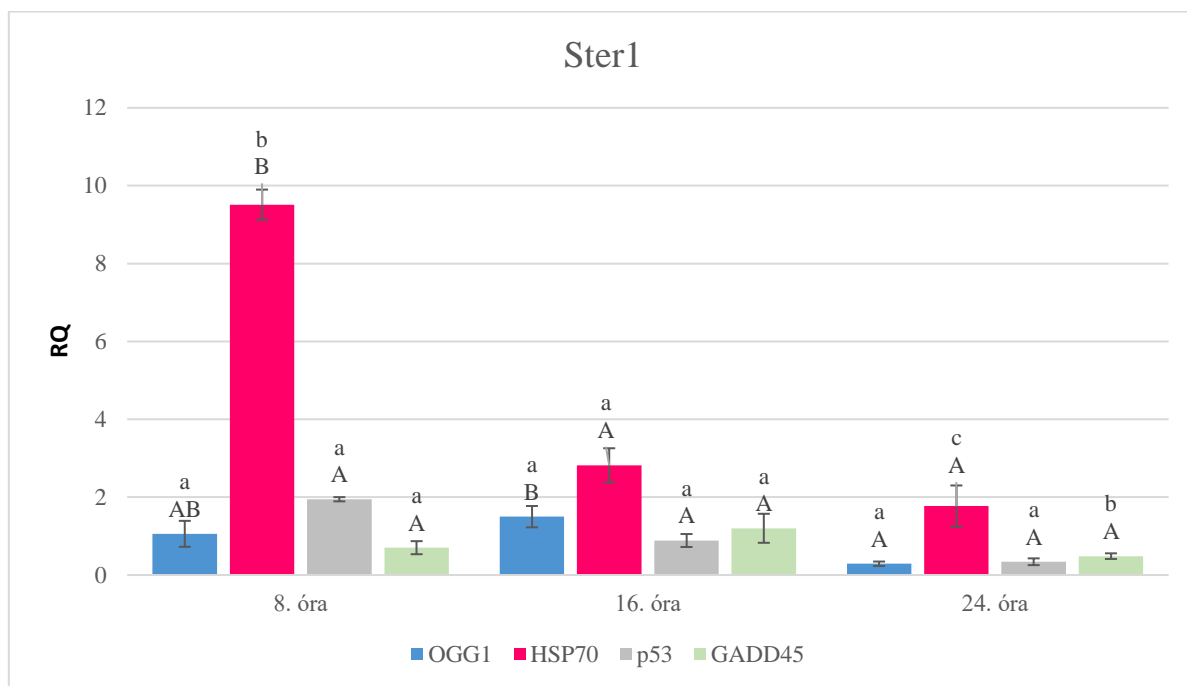


10. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban az aflatoxinnal kezelt csoportban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a gének között

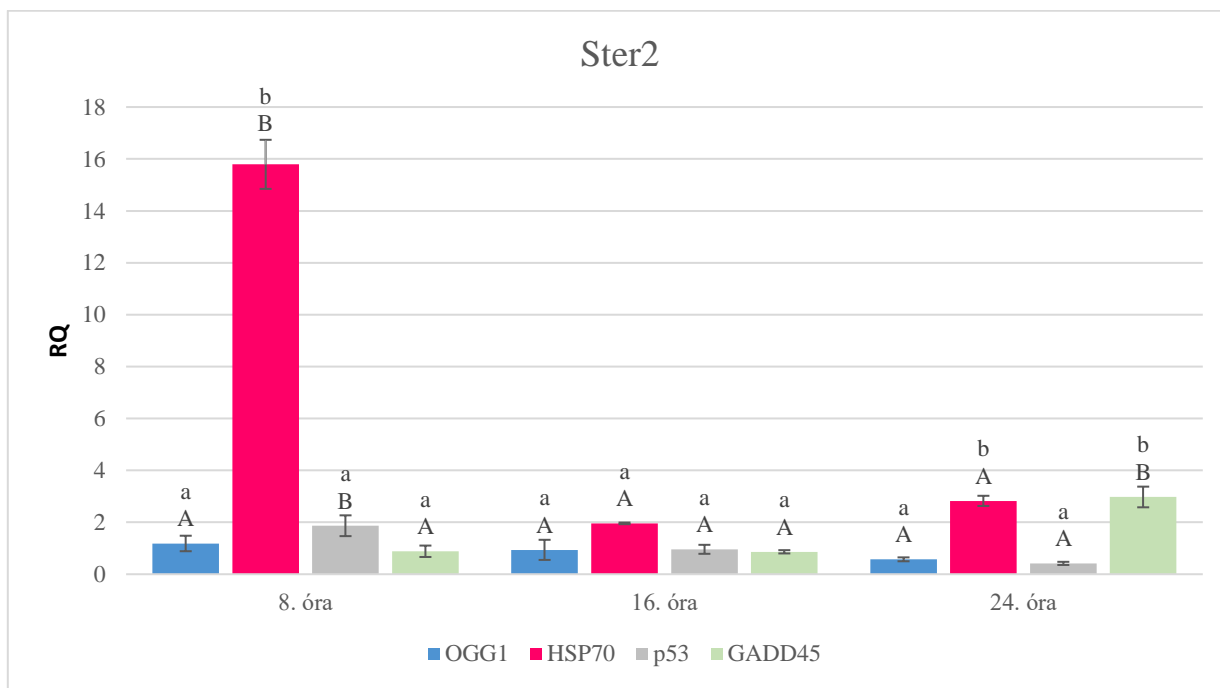
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott gén esetében az időpontok között

A Ster1 csoportban a 16. órai időponton kívül a HSP70 szignifikánsan magasabb expressziós szintet mutatott. A 24. órában a GADD45 gén kifejeződése szintén eltért a többi génétől. Az időbeli eltérések figyelembevételkor az Afla csoporttal ellentétes trendet tapasztaltam, miszerint szignifikánsan csökkent a génkifejeződés a HSP70 génben a 16., illetve a 24. órában a 8. órához képest. Az OGG1 génnél csupán a 16. és a 24. órai eredmények tértek el szignifikáns módon, a p53 és a GADD45 géneknél nem volt szignifikáns mértékben kimutatható az eltérés (11. ábra).



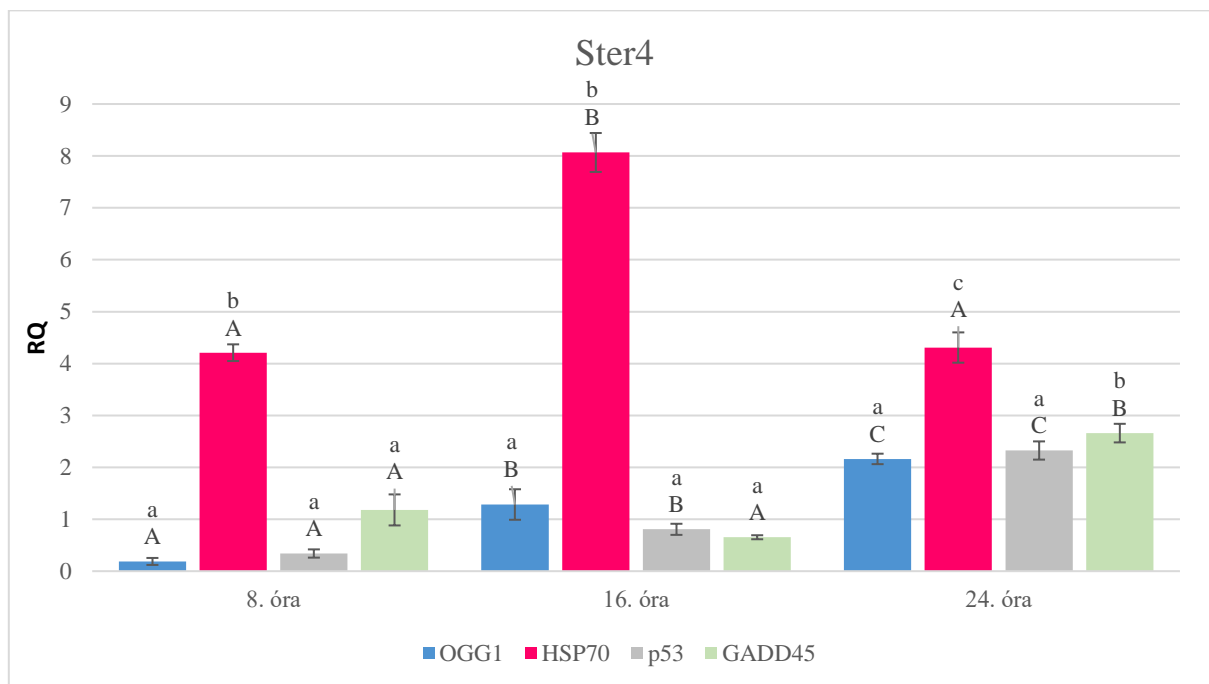
11. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban a Ster1 csoportban
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a gének között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott gén esetében az időpontok között

A Ster2 csoport megfigyelésekor a 8. és a 16. óra tekintetében azonos eredményekre jutottam a Ster1 időpontjaihoz viszonyítva. A 24. órában a HSP70, illetve a GADD45 gének eredményei eltértek a másik gén értékeitől, egymástól szignifikánsan nem. Az OGG1 gén esetében nem volt kimutatható időbeli expresszió változás. A HSP70 és a p53 géneknél a génextpresszió mértéke már a 16. órában szignifikánsan csökkent a 8. órához képest, ezzel ellentétesen a GADD45 expressziója a 24. órában növekedett az előző két időponthoz képest (12. ábra).



12. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban a Ster2 csoportban
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a gének között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott gén esetében az időpontok között

A Ster4 csoport 8. és 16. órájában a gének expressziója tendenciája megegyezett az aflatoxinnal kezelt csoport eredményeivel. A gének 24. órai összehasonlításai a Ster1 csoport azonos időpontban látható értékeivel mutattak hasonlóságot, a HSP70 és a GADD45 gének szignifikánsan megnövekedett génexpresszót mutattak. Az OGG1 és a p53 gének expressziója lépcsőzetesen, szignifikáns módon növekedett az idő előrehaladtával, míg a GADD45 génben csak a 24. óra eredményezett szignifikáns expresszió növekedést az előző időpontokhoz képest. A HSP70 16. órai túlexpresszált állapota szignifikánsan eltért a 8. és a 24. órai eredményektől is (13. ábra).



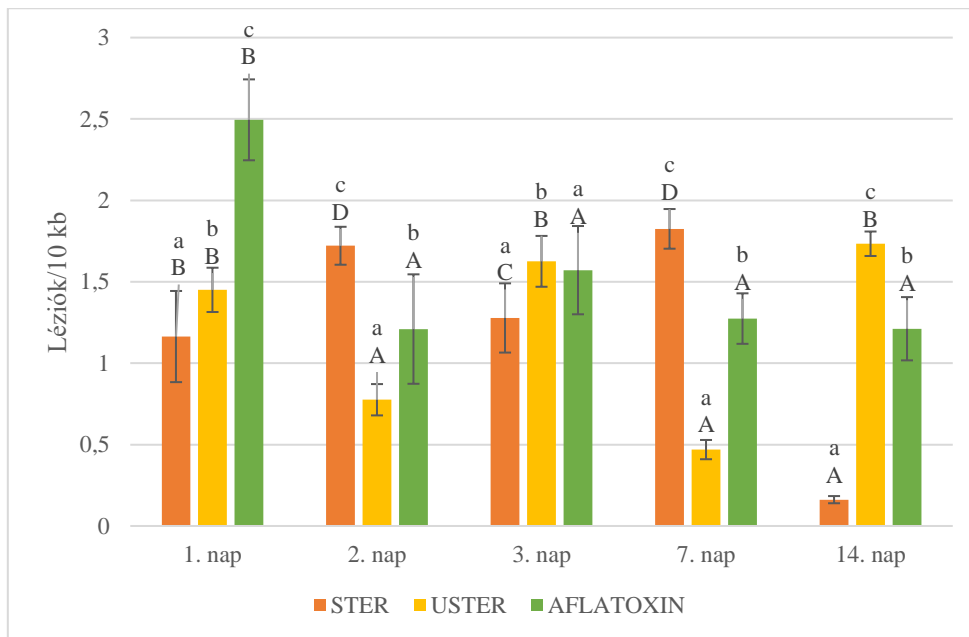
13. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban a Ster4 csoportban
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a gének között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott gén esetében az időpontok között

4.4. Tyúk fajban végzett vizsgálatok LORD-Q PCR eredményei

Az optimalizálás során feladatomban volt a primerek tervezése az összes kiválasztott célgenre és a PCR profilok összeállítása. A primerek hatékonyságának és specifikusságának ellenőrzésében, majd a primerpárok kiválasztásában gélelektroforézis és olvadási görbe analízis segített. A PCR beállítása során 3 lépéses módszert alkalmaztam, a primerek optimális feltapadási hőmérséklete alacsonyabb volt az alkalmazott enzim optimális működési hőmérsékleténél, nem volt egységes (60°C).

Az optimalizálási folyamat során feladatomban volt a primerek tervezése, a PCR reakció, illetve a PCR profilok összeállítása. A hosszú szakasz esetében tizennégy primerpárt terveztem és kezdtem optimalizálni tyúk fajra, melyek esetében az amplikon hosszúság 2801-6052 bázispár között volt. A rövid szakasz esetében két primerpárt terveztem és kezdtem optimalizálni, az amplikonok hosszúsága 152 és 182 bázispár volt. A primerek hatékonyságának és specifikusságának ellenőrzésében, majd a primerpár kiválasztásában gélelektroforézis és olvadási görbe analízist végeztem, nem volt cél egy specifikus genomi régió kiválasztása. A templát koncentráció optimalizálása is megtörtént 0,5–50 ng közötti tartományból. A PCR beállítása során 3 lépéses módszert alkalmaztam, a primerek optimális feltapadási hőmérsékletének meghatározása kritikus pont volt, így 56 és 61 °C közötti hőmérséklet került letesztelésre.

Az 1., a 2., illetve a 7. nap során mindhárom kezelt csoport szignifikánsan eltért a kontrolltól ($p < 0,0001$), illetve egymástól is. Az 1. nap az aflatoxin B1-gyel, míg a 2. és 7. nap a szterigmatocisztinnel kezelt csoport rendelkezett a legtöbb lézióval. A 3. nap esetében az USTER csoport szignifikánsan tért el a kontroll, illetve a STER és az AFLATOXIN csoportokhoz képest. A kontroll statisztikailag különbözött a STER és az AFLATOXIN csoportoktól, melyek egymástól nem tértek el szignifikánsan. A 14. napi mintavételkor a kontroll csoport szignifikánsan nem tért el a STER csoporttól ($p < 0,166$), ám statisztikai mértékben különbözött az USTER és az AFLATOXIN csoportoktól ($p < 0,001$). A kezelt csoportok egymástól szignifikánsan eltértek, legkevesebb lézió a STER csoportban, míg a legtöbb az USTER csoportban volt fellelhető. Az AFLATOXIN csoportban az időbeni változás csupán az 1. nap értéke szignifikánsan nagyobb volt a további napokhoz képest. A STER csoport esetében hullámzó trend volt megfigyelhető: az 1. naphoz képest a 2. napon szignifikáns növekedés, majd csökkenés, a 7. napon ismét szignifikáns növekedés volt megfigyelhető, az utolsó mintavételi időpontban pedig szignifikáns csökkenés volt tapasztalható. Hasonló váltakozó trend rajzolódott ki az USTER csoportban: az 1. napi lézió értéke szignifikáns módon csökkent, majd ahhoz képest szignifikánsan nőtt az érték, a 7. napon statisztikailag kimutatható csökkenés volt detektálható a 3. naphoz viszonyítva, majd a 14. napon szignifikánsan megnőtt a léziók mennyisége (14. ábra).



14. ábra: A kezelt csoportok csirke DNS lézió eredményei a három mintavételi időpontban
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Az aflatoxin B1 és a szterigmatocisztin toxicitásának összehasonlítása során az 1. napon az AFLATOXIN csoportban mértem a legnagyobb léziószámot. Ehhez hasonló eredményt kaptak Abd-Allah és munkatársai (1999), akik szignifikáns DNS károsodást találtak comet assay-vel aflatoxin B1 (0,5 mg/ testtömeg kg) hatására a 24. órában szívárványos pizstráng májában. Az 1. napon kapott eredményeim mindhárom kezelt csoportban szintén szignifikáns mértékű DNS károsodást mutatnak be. Humán HepG2 sejtvonalban 24 órát követően az AFB1 (0,5-10 μ M) hatására nagyobb mértékben csökkent az ép kétszálú DNS mennyisége, szterigmatocisztin által ez a hatás a koncentráció növelésével (0,5-7 μ M) sem változott szignifikánsan (Liu et al. 2014), míg Abedi & Scott (1969) zebradánió lárvák esetében a szterigmatocisztint találták toxikusabbnak, illetve gyorsabb negatív hatását, reakciókészségét írták le.

Williams és munkatársai (2011) a 4. órában, majd a 4. napon vizsgálták az AFB1 DNS károsító hatását comet assay-vel. Mindkét időpontban szignifikánsan megnőtt a DNS károsodás, ám időben a 4. napon kisebb OTM, illetve farokhossz értékeket mértek a 4. órában kapott eredményekhez képest. Vizsgálatomban szignifikáns csökkenést e mikotoxin hatására az 1. és a 2. nap között mértem. A természetes úton előállított szterigmatocisztin esetében csökkenés a 2. és a 3., majd a 7. és a 14. napok között volt detektálható, míg az ultratiszta szterigmatocisztin csoportban az 1. és a 2., majd a 3. és a 7. napok között.

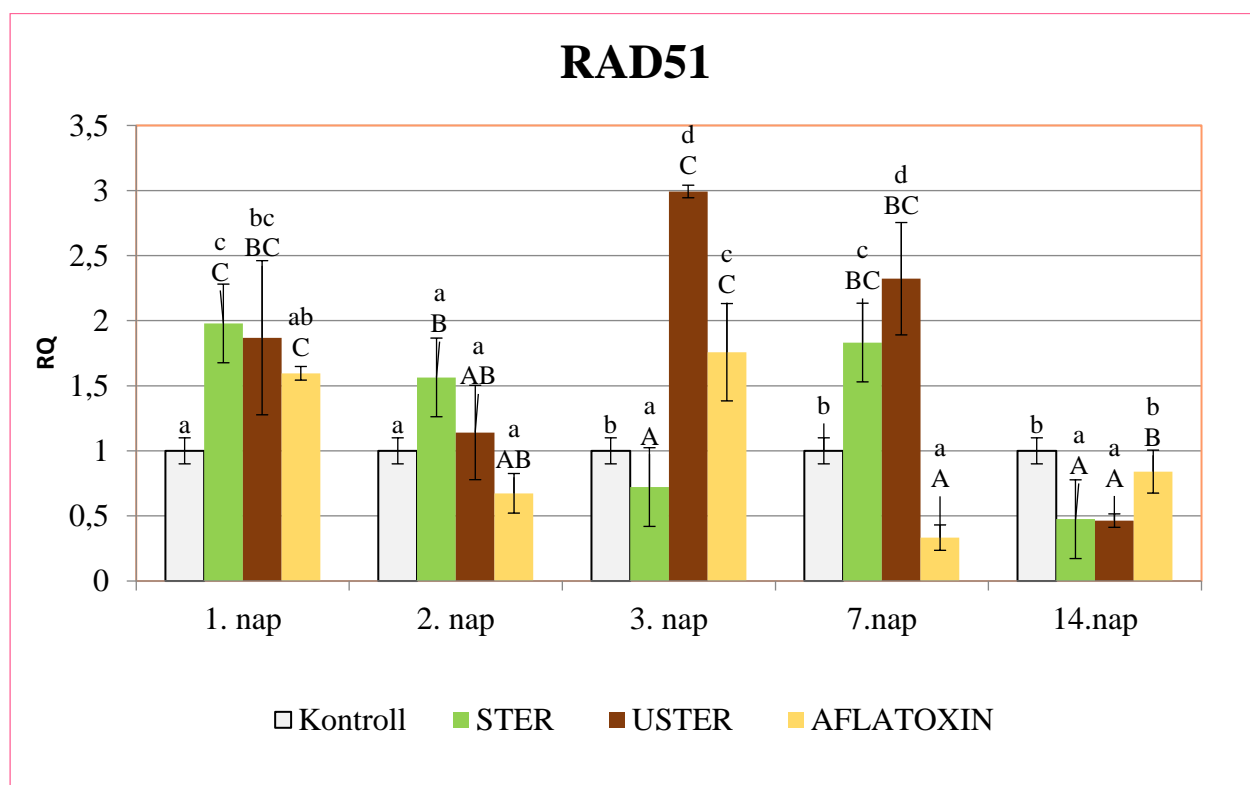
Zimmermann és munkatársai (2015) 3 napos aflatoxin B1-gyel (20 μ g/ml) végzett inkubáció után szignifikáns TM emelkedést mértek *in vitro* csirke limfocitákban. Eredményeim a 3. napon hasonlatosak ehhez, mivel az AFLATOXIN és STER csoportok szignifikánsan több lézióval bírtak, mint a kontroll csoport.

4.5. Tyúk fajban végzett génexpresszió eredmények

A legstabilabb referencia génnek az UB bizonyult.

A **RAD51** gén esetében a kontroll csoporthoz képest a STER és USTER csoportok tértek el szignifikánsan, illetve a STER csoport szignifikánsan nagyobb génexpressziós értékkel bírt az aflatoxin B1-gyel szennyezett csoporthoz viszonyítva az 1. napon. A 2. nap alkalmával nem detektáltam statisztikai különbséget a csoportok között. A 3. napon a kontroll csoport értékéhez képest a STER csoport szignifikánsan kisebb, míg az USTER és AFLATOXIN csoportok szignifikánsan nagyobb értékkel rendelkeztek, a kezelt csoportok egymástól is különböztek statisztikailag bizonyíthatóan. A kontrolltól való eltérés, illetve a kezelt csoportok különbözősége a 7. napon kimutatható volt, ám a kontrollhoz képest az USTER és STER csoportok szignifikáns expresszió növekedést, míg az AFLATOXIN csoport szignifikáns csökkenést produkált. A 14. napra mindegyik kezelt csoport génkifejeződésbeli csökkenést mutatott, ami szignifikáns volt a STER és USTER csoportok esetében.

A STER csoportok RAD51 gén kifejeződése során lépcsőzetes csökkenés volt kimutatható, ami az 1.-2., illetve a 2.-3. napok között szignifikáns mértékű volt, majd a 7. napra szignifikáns emelkedést tapasztaltam a 3. és 14. naphoz viszonyítva. Az USTER csoport esetében szignifikáns génexpresszió emelkedés a 2. és a 3., szignifikáns csökkenés a 7. és a 14. napok között volt megfigyelhető. Az AFLATOXIN csoport RAD51 gén expressziója esetében fluktuáló változás volt mérhető: szignifikáns csökkenést, szignifikáns emelkedés követett a 14. napig (15. ábra).



15. ábra: A RAD51 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

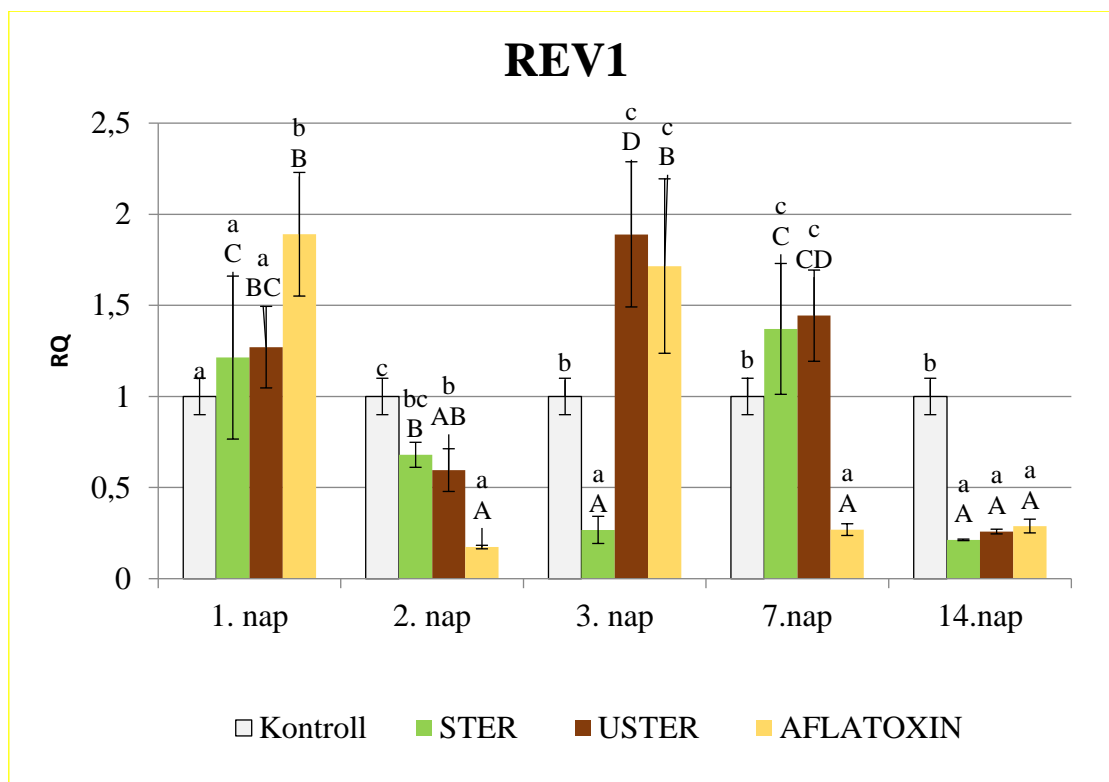
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Munkám során az 1. napon a kontrollhoz képest szignifikáns expresszió növekedést detektáltam mindkét szterigmatocisztin csoportban. Az AFLATOXIN csoportban expresszió növekedés volt megfigyelhető, ám nem szignifikáns mértékben. E trenddel ellentétesen Huang és munkatársai (2020) egér IMR-32 sejtekben a RAD51 gén alulexpresszált állapotát figyelték meg

24 órát követően 2 és 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB1 expozíció hatására. Huang és munkatársai (2020) eredményei a vizsgált DNS javító gén transzkripciójának gátlására utalnak, míg vizsgálatomban az alkalmazott dózisok valószínűsíthetően lehetővé tették a DNS javítását a javító gén expressziójának növekedése által. További expresszió emelkedés a 3. napon az USTER és az AFLATOXIN csoportokban, illetve a 7. napon a két szterigmatocisztin csoportban volt megfigyelhető, ami a kezelés hatására kiváltott homológ rekombináció stimulálására enged következtetni, illetve összefüggésben állhat a DNS kétszálú töréseinek javításával (Klein 2008). Ezen összefüggést Lian és munkatársai (2014) erősítették meg, kísérletükben ochratoxin A (5, 10, 20 μM) dózis-, illetve időfüggő (6, 12, 24 óra) módon csökkentette a RAD51 gén expresszióját. Az expresszió csökkenésével párhuzamosan emelkedett a $\gamma\text{-H2AX}$ fehérje expressziója, mely a kétszálú DNS töredezettség markere.

A **REV1** gén kifejeződése tekintetében elmondható, hogy az AFLATOXIN csoport szignifikánsan különbözött a másik két kezelt csoporttól, illetve a kontroll csoporttól az 1. napon. A 2. napon expresszió csökkenés volt detektálható a kezelt csoportokban, ami szignifikánsnak bizonyult az USTER és az AFLATOXIN csoportok esetében. Ezzel ellentétben a 3. napon már statisztikailag bizonyíthatóan expresszió növekedés volt tapasztalható az USTER és az AFLATOXIN csoportban a kontroll, illetve a STER csoportokhoz képest. A STER csoport értéke szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz, illetve a másik két kezelt csoporthoz képest. A 7. napon az USTER csoportban a gének expresszós értékei hasonló tendenciát mutattak az előző napi értékhez, ám a STER értéke szignifikáns növekedést, míg az AFLATOXIN csoport génextpressziója szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva. A kontroll csoport értékéhez képest az összes kezelt csoport szignifikáns génextpresszió csökkenést produkált.

A REV1 gén kifejeződése, időbeni összehasonlítás során, erősen hasonló trendet mutatott a RAD51 génhöz képest a STER csoportban. Az AFLATOXIN csoport esetében is fennáll a hasonló trend képe azzal a különbséggel, hogy az 1., illetve a 7. napok között minden esetben szignifikáns volt az eltérés (16. ábra).



16. ábra: A REV1 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

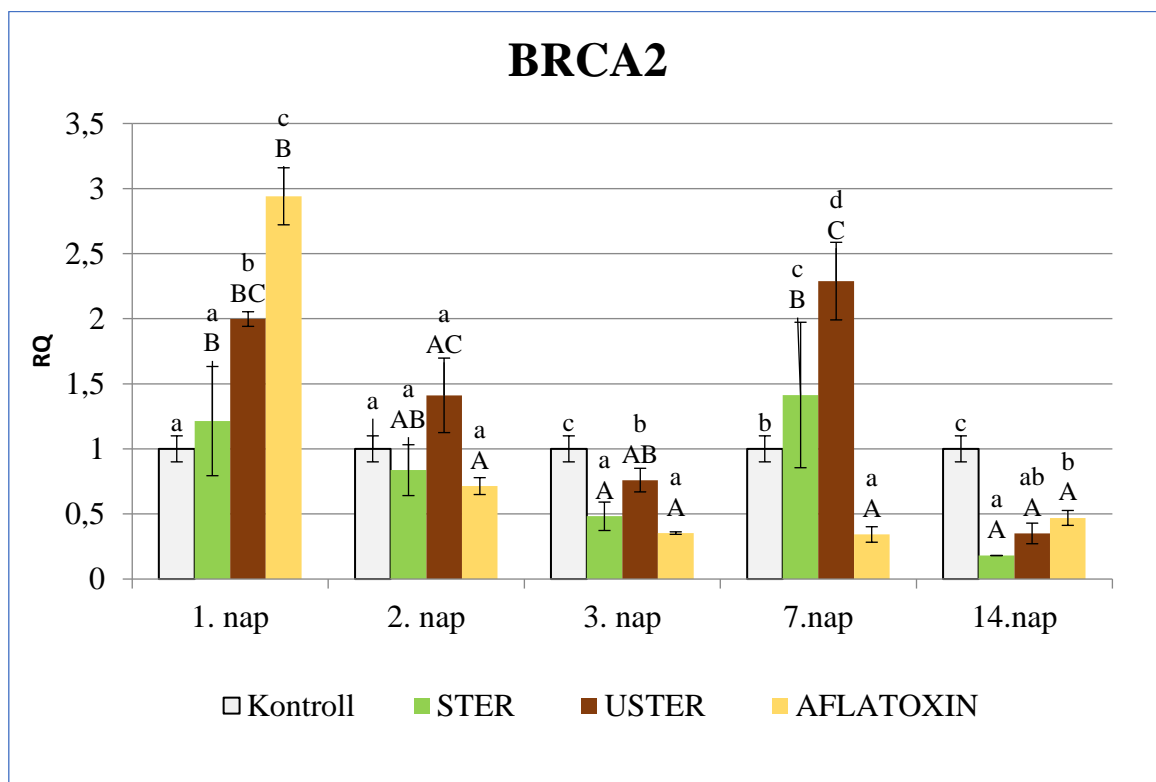
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Az 1. napon csak az AFLATOXIN csoportban tapasztaltam szignifikáns expresszió növekedést, a 2. napon mindhárom kezelt csoportban lecsökkent a génkifejeződés. Dumstorf és munkatársai (2009) 48 óra után szintén REV1 génexpresszió csökkenést detektáltak egér fibroblaszt sejtekben benz(a)pirin (0,150 $\mu\text{mol/L}$) kezelés hatására. Vizsgálatomban a 3. naptól a REV1 gén expressziója a RAD51 gén adataihoz volt igen hasonló, ami közös funkciójukra, a homológ rekombináción keresztüli kettős szálú DNS javításra vezethető vissza.

A **BRCA** gén expressziója az USTER és az AFLATOXIN csoportokban szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz, illetve a STER csoportokhoz képest az 1. napon. A 2. napon nem volt statisztikailag detektálható különbség a csoportok között. A kezelt csoportok génexpressziós értékei szignifikáns csökkenést mutattak a kontrollhoz képest, az USTER csoport esetében a BRCA gén expressziója szignifikánsan különbözött a másik két kezelt csoport értékéhez viszonyítva. A 7. napon a STER és az USTER csoportok értékei szignifikáns emelkedést, míg az AFLATOXIN csoport expressziós értéke szignifikáns csökkenést mutatott, a kezelt csoportok statisztikailag is eltértek egymástól. A 14. napon az összes kezelt csoport szignifikáns génexpressziós csökkenése volt látható a kontrollhoz képest.

A BRCA gén expressziójában, annak időbeni vizsgálatokor kimutatható volt nem szignifikáns, csökkenő trend a 3. napig, majd szignifikáns növekedés a 7. napra, végül pedig szignifikáns csökkenés a 14. napon a STER csoportban. Ehhez hasonló tendencia volt megfigyelhető az USTER csoportban. Az AFLATOXIN csoportban ezzel szemben az 1. naphoz képest szignifikánsan kisebb expressziós érték tartozott a további napokhoz képest (17. ábra).



17. ábra: A BRCA2 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

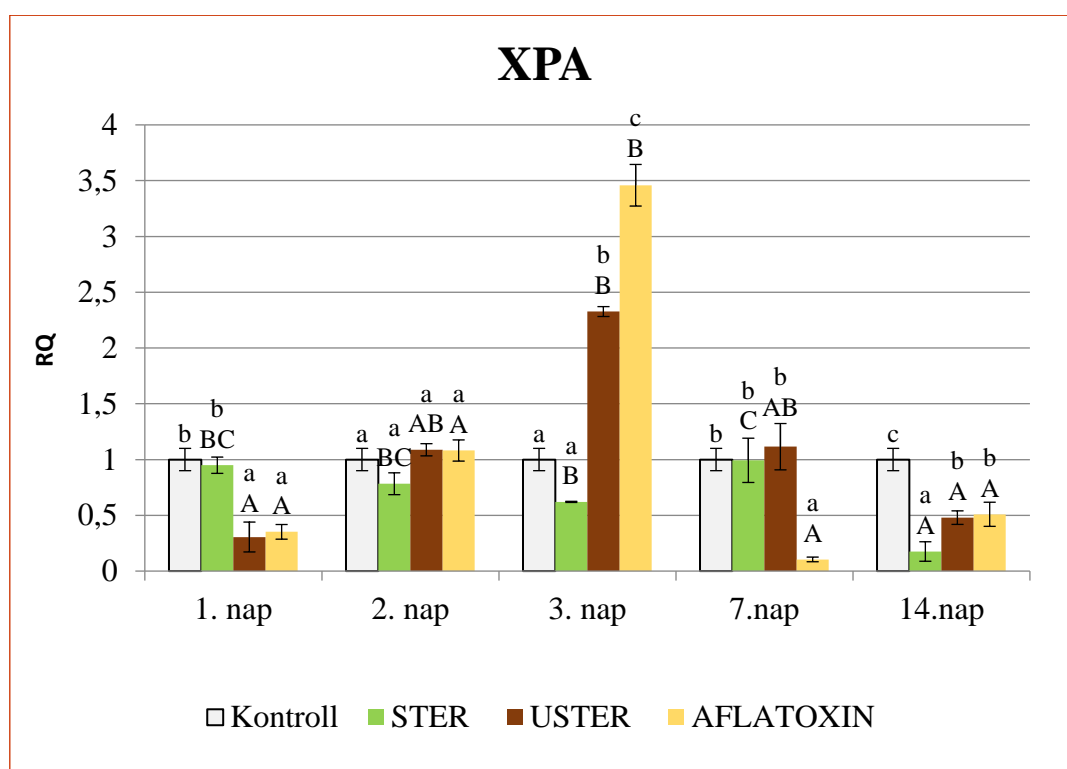
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Huang és munkatársai (2020) egér IMR-32 sejtekben a RAD51 gén mellett a BRCA2 gén alulexpresszált állapotát is detektálták 24 órát követően aflatoxin 2 és 6 $\mu\text{g/mL}$ expozíció hatására.

Vizsgálataim során ahogyan a RAD51 esetében is, a BRCA2 gén expressziójában emelkedést tapasztaltam a kezelt csoportokban, ami szignifikáns az USTER és az AFLATOXIN csoportokban volt. A BRCA2 gén expressziójának csökkenése Huang és munkatársai (2020) meglátása szerint transzkripció gátlásra utal, míg eredményeim a gén sikeres aktiválását mutatják be. Moradi és munkatársai (2015) adataikban eredményeimmel szemben expresszió csökkenést prezentáltak human sejtvonalban (HMEC) 24 órás AFB1 (15, 25, 35 μ l) kezelés hatására. Emellett a sejtek életképességének nagymértékű csökkenése révén valószínűsítik, hogy a folyamatok nem a DNS javítás, hanem az apoptózis felé tolódhattak el.

Az **XPA gén** expressziója szignifikánsan csökkent az USTER és az AFLATOXIN csoportokban a kontroll, illetve a STER csoportokhoz viszonyítva. A 2. napon nem volt fellelhető különbség a csoportok között a RAD51 és BRCA gének eredményeihez hasonlóan. A 3. napon az összes kezelt csoport szignifikánsan eltért egymástól, ám a kontrollhoz képest csak az USTER, illetve az AFLATOXIN csoportok. A 7. napon az AFLATOXIN csoport génkifejeződése statisztikailag bizonyítottan csökkent a másik két kezelt, illetve a kontroll csoportokhoz képest. Az eddig bemutatott gének kifejeződéséhez hasonlóan az XPA expressziója is csökkent minden kezelt csoport esetében a kontrollhoz viszonyítva a 14. napon.

A STER csoport értékeinek időbeli változásai nem mutattak szignifikáns eltérést a 3. napig, ezt követően a 7. napon szignifikáns emelkedést, majd a 14. napra szignifikáns csökkenést detektáltam. Az USTER és az AFLATOXIN csoportokban hasonló tendencia alakult ki az időpontok között: a 3. napig folyamatos expresszió növekedést mértem, ami a 2. és 3. napok között szignifikánsnak bizonyult az AFLATOXIN csoportban. A 3. napot követően pedig drasztikusan csökkent a génkifejeződés mértéke mindkét csoportban, szignifikánsan a 3. és a 7. nap között az AFLATOXIN csoportban (18. ábra).



18. ábra: Az XPA gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

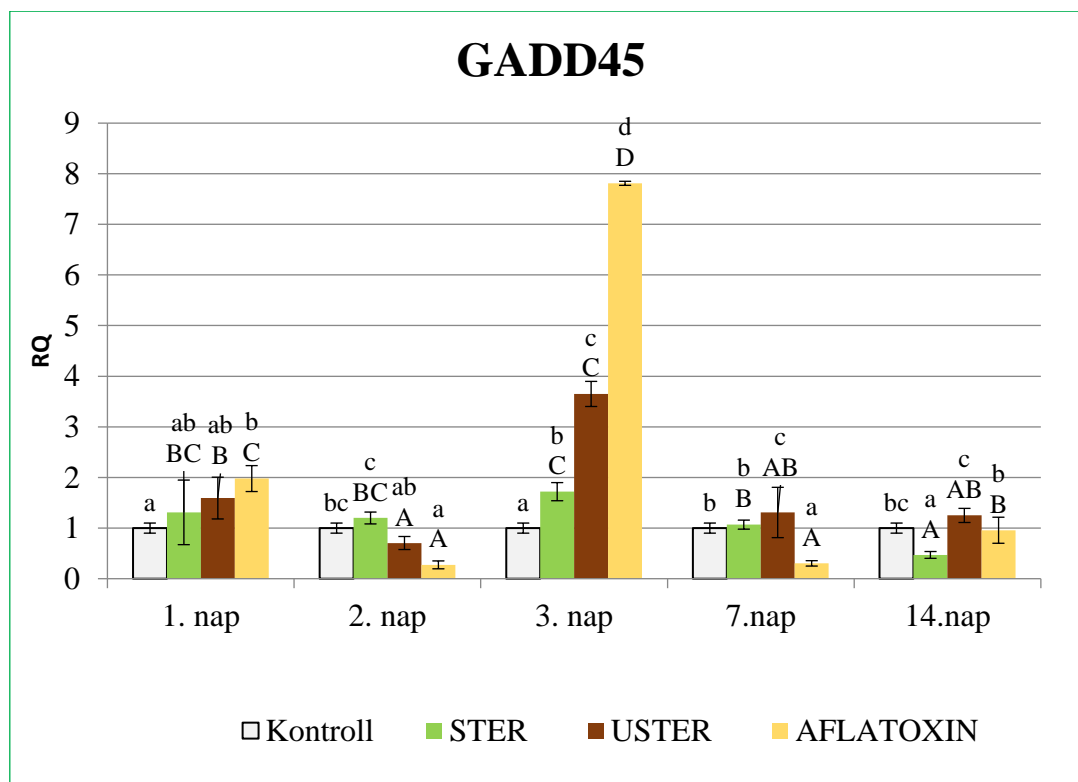
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Az XPA gén expressziója igen hasonlóan alakult a GADD45 α , illetve MSH6 génekéhez. Expressziója az USTER és az AFLATOXIN csoportokban a 3. napon aktiválódott, majd az USTER csoportban a 14. napra csökkent szignifikánsan a génkifejeződés, míg az AFLATOXIN csoportban már a 7. napon alulexpresszált állapot alakult ki. Bedard & Massey (2006) mutatták be, hogy az aflatoxin B1 adduktok javításában nagyobb részben a NER folyamatok felelősek. Vizsgálatom során csak a 3. napon tapasztaltam expresszió növekedést az említett két csoportban. A 3. napot követő génextpresszió nagymértékű csökkenésének hátterében a DNS károsodás csökkenése állhat, ám az aflatoxin B1 esetében lehetséges a DNS javító mechanizmusok gátlása (Shen & Ong 1996).

A **GADD45** gén expressziója csak az AFLATOXIN csoportban emelkedett meg szignifikáns módon a másik két kezelt, illetve a kontroll csoporthoz képest. A 2. napon a kontrollhoz viszonyítva csak az AFLATOXIN csoport tért el szignifikánsan, a STER csoport rendelkezett a legnagyobb expressziós értékkel a másik két kezelt csoporthoz képest. A kezelt csoportokban szignifikánsan megnövekedett a GADD45 gén expressziója a kontroll értékéhez képest, mindhárom kezelt csoport értéke eltért egymástól. A 7. napra mérséklődött a génkifejeződés mértéke, a kontrolltól az USTER és az AFLATOXIN csoport értékei tértek el statisztikailag. A többi vizsgált géntől eltérően, a 14. napon csak a STER csoportban mértem szignifikáns expresszió csökkenést.

A csoportok értékeinek időpontok közötti összevetésekor a STER csoportban az XPA STER csoportjához megközelítő tendencia volt felfedezhető, a GADD45 gén esetében a 3. naptól folyamatos szignifikáns génextpressziós csökkenést mutattam ki. A RAD51 gén AFLATOXIN csoportjához hasonlóan fluktuáló változás volt tapasztalható az egyes időpontok között, melyek minden esetben szignifikáns mértékűek voltak. Az USTER csoport értékei is mutatták a már említett csökkenő, majd növekvő trendek váltakozását a 7. napig, a 7. és 14. nap között nem volt statisztikailag különbség (19. ábra).



19. ábra: A GADD45 α gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

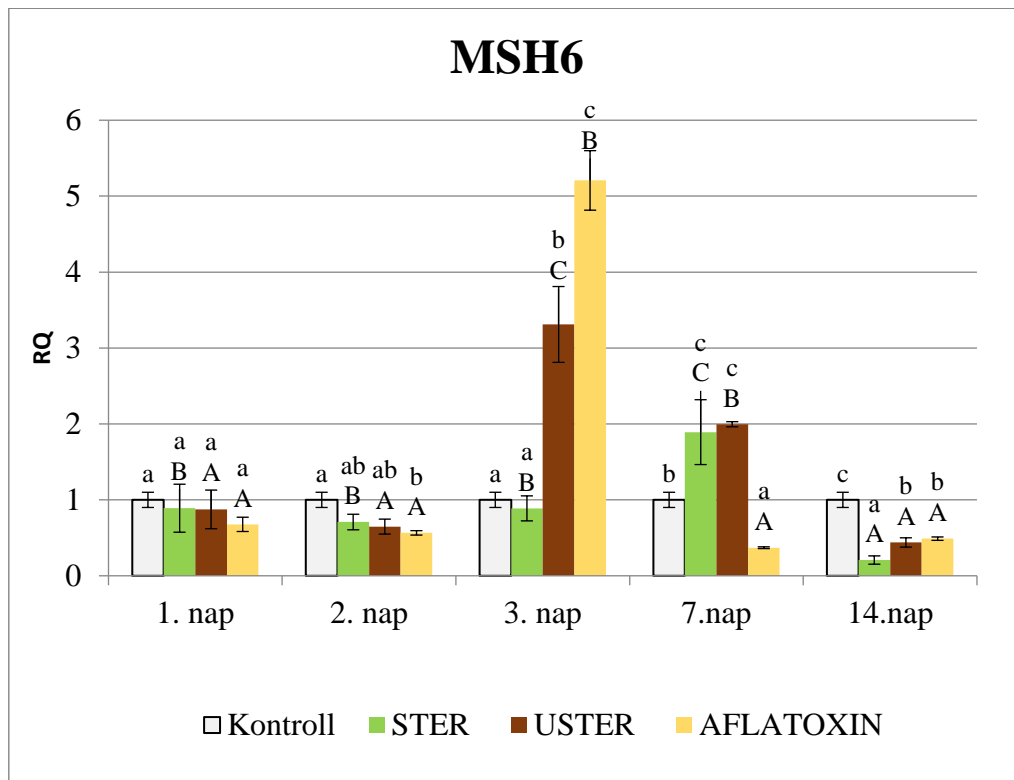
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Az 1. napon GADD45 α expressziós növekedést csak az alkalmazott aflatoxin B1 szennyezés hatására mértem, hasonlóan Ayed-Boussema és munkatársai (2008) eredményéhez, mely során humán hepatocita sejtvonalban zearalenon (80 μ M) hatására expresszió emelkedés következett be a gén esetében 24 órát követően. Brennan és munkatársai (2017) citrinin (52,75 μ M), illetve ochratoxin A (8,91 μ M) 6 órás expozíciója után 1,96-szoros GADD45 α génkifejeződésbeli emelkedést tapasztaltak szarvasmarha makrofágokban. Yang és munkatársai (2018) 8 órát követően expresszió emelkedést mértek GES-1 humán sejtvonalban DON kezelés (1,25-10 μ M) hatására. Vizsgálatomban az 1. napon kívül még a 3. napon mértem expresszió növekedést mindegyik kezelt csoportban, illetve az USTER csoportban a 7. napon. Li és munkatársai (2013) szintén GADD45 α expressziós növekedését mutatták ki 1000 ng/ml DON koncentráció esetében egér pajzsmirigy sejtekben. Vizsgálatukban a 12. órában 13-szoros, míg a 24. órában 15-szörös mértékben nőtt a génexpresszió. Vizsgálatomban a legnagyobb mértékben az AFLATOXIN csoport értéke növekedett a 3. napon. A kezelt csoportjaimban mért 3. napi expresszió növekedéshez hasonlóan Yang és munkatársai (2019) humán sejtvonalban T-2 mikotoxin (0,01 μ g/ml), illetve DON (1,0 μ g/ml) hatására detektáltak 72 órát követően 2,05-szoros, illetve 3,1-szeres GADD45 α expressziós növekedést. Vizsgálatomban az USTER csoport közelítette meg Yang és munkatársai (2019) DON értékeit, míg az AFLATOXIN csoportom majdnem 8-szoros expressziós emelkedést produkált.

Az **MSH gén** kifejeződése esetében a többi vizsgált génhez képest nem volt detektálható eltérés a kontroll csoporthoz képest az 1. napon. A 2. napon csupán az AFLATOXIN csoport értéke tért el szignifikánsan a kontrollhoz viszonyítva. A 3. napon az USTER és az AFLATOXIN csoportokban szignifikánsan megemelkedett az MSH gén expressziója a kontrollhoz képest. A három kezelt csoport statisztikailag is különbözött egymástól. Az AFLATOXIN csoportban csökkenés, a STER és USTER csoportokban növekedés volt detektálható statisztikailag bizonyítottan. A GADD45 gén kivételével a többi vizsgált génhez hasonlóan mindhárom kezelt csoport expressziós értéke szignifikánsan kisebbnek bizonyult a kontrollhoz képest.

A csoportok időbeli változásának struktúrája során a 3. és 7. nap között volt kimutatható szignifikáns expresszió növekedés, majd pedig szignifikáns csökkenés a STER csoportban. Az USTER, illetve az AFLATOXIN csoportokban szignifikáns expresszió növekedés már a 2. és 3. napok között detektálható volt, majd az USTER csoportban folyamatos szignifikáns csökkenés volt látható, míg statisztikai eltérés az AFLATOXIN csoportban csak a 3. és 7. napok között volt felfedezhető (20. ábra).



20. ábra: Az MSH6 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

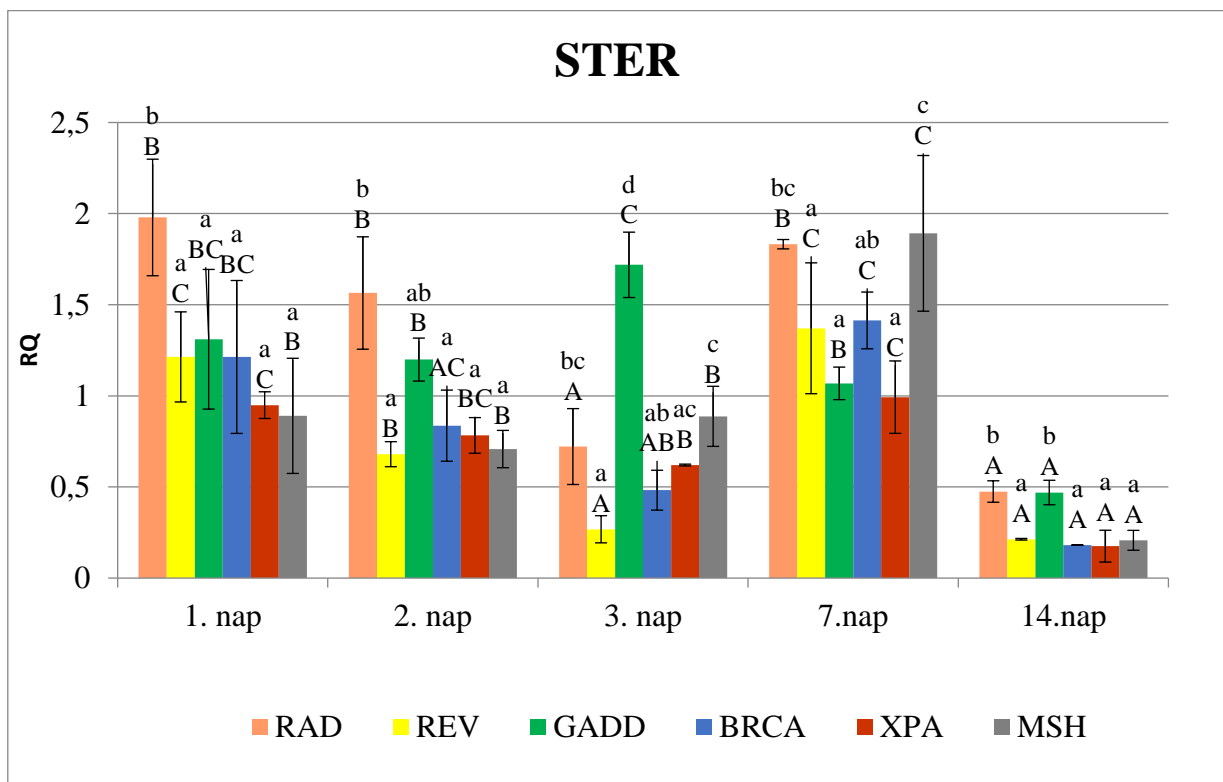
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Hsu és munkatársai (2010) 4 és 9 órát követően kadmium ($0,5-3 \mu\text{M}$) hatására az MSH6 gén alulműködését mutatták ki. Vizsgálatomban ehhez hasonló változás csak az AFLATOXIN csoportban történt a 2. napon. Az 1., illetve a 2. napokon a további csoportokban nem következett be szignifikáns változás. A 3. naptól a RAD51 és a REV1 gének expressziójához igen hasonlóan változott az MSH6 gén expressziója (20. ábra).

A kiválasztott gének expressziójának összehasonlítását is elvégeztem egy adott kezelt csoportban.

A STER csoporton belül a RAD51 gén szignifikánsan nagyobb génexpressziós értékkel rendelkezett a többi vizsgált génhez viszonyítva az 1. napon, illetve a 2. napon a GADD45 gén kivételével. A 3. napon a GADD45 gén expressziója volt szignifikánsan a legnagyobb a többi génhez képest, míg a REV gén szignifikánsan eltért a GADD45 géntől a RAD51, illetve az MSH génektől. A 7. napon szignifikáns különbség volt tapasztalható a RAD51 és a REV, a GADD45, az XPA, illetve az MSH és az MSH, BRCA, GADD45 és a REV gének között. A 14. napon a RAD51 és a GADD45 gének egymástól nem, de a további négy vizsgált géntől statisztikailag eltértek.

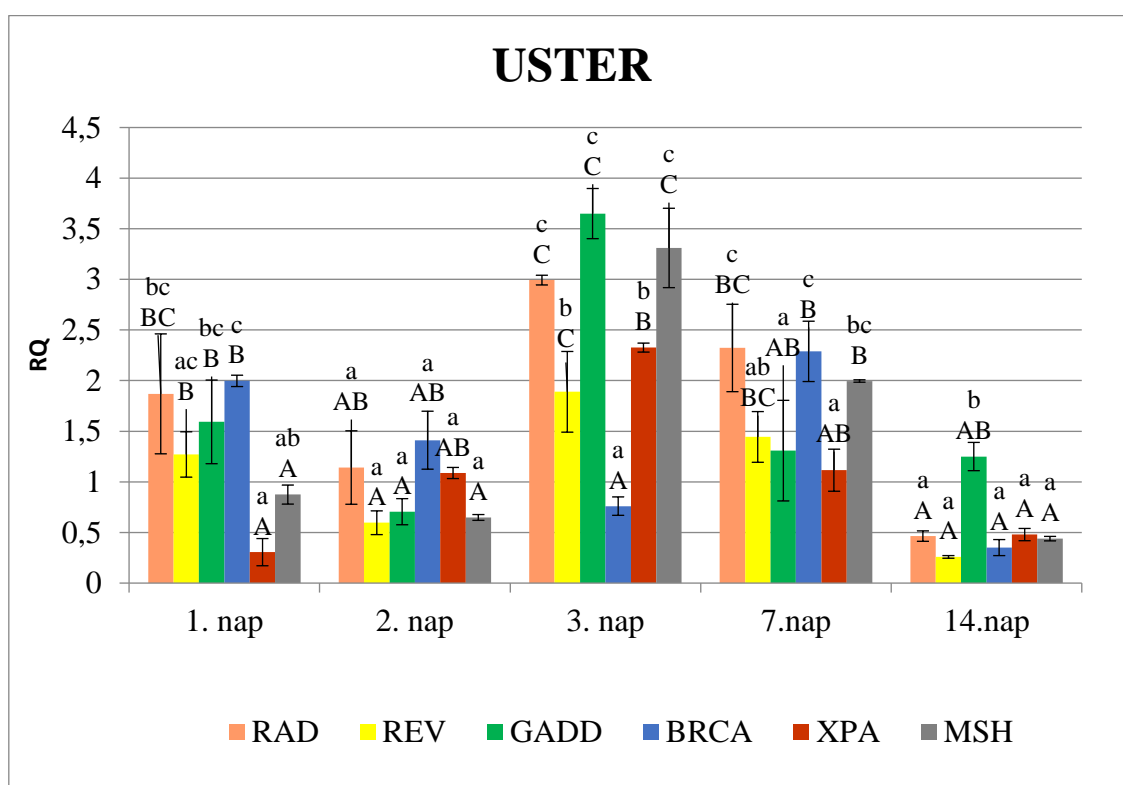
A gének expressziójának időbeli változásakor megállapítható, hogy a RAD51 gén esetében ismétlődő, szignifikáns expresszió csökkenés, majd növekedés volt detektálható a 2. és a 14. napok között. A REV génnél szignifikáns expresszió csökkenés volt látható, majd szignifikáns növekedés a 7. napon, a 14. napon pedig statisztikailag bizonyított csökkenés. A BRCA és XPA gének esetében nem szignifikáns csökkenést tapasztaltam. Szignifikáns emelkedés történt mindkét gén esetében a 7. napon, a 14. napra pedig szignifikáns csökkenés. A GADD45 gén esetében statisztikai különbség a 2.-3., 3.-7., illetve 7. és 14. napok között volt. Az MSH gén kifejeződése szignifikánsan a 7. napon növekedett, a 14. napra szignifikánsan csökkent (21. ábra).



21. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban a STER csoportban
a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Az USTER csoport esetében a legkisebb génexpresszióval az XPA gén rendelkezett, mely különbség szignifikáns volt a BRCA, GADD45, illetve a RAD51 génektől. A 2. napon a vizsgált gének nem tértek el egymástól statisztikailag. A 3. napon a legkisebb értékkel a BRCA gén rendelkezett, mely az összes vizsgált géntől statisztikailag is eltért. A 7. napon a legnagyobb expressziós értékkel a RAD51, illetve a BRCA gének rendelkeztek, melyek szignifikánsan az XPA, REV, illetve GADD45 génektől különböztek. A 14. napon a GADD45 gén rendelkezett szignifikánsan a legnagyobb génkifejeződéssel.

A RAD51 és az MSH gének kifejeződésének időbeli változásáról elmondható, hogy szignifikánsan a 2. és 3. nap között történt expressziós emelkedés, az RD51 esetében szignifikáns csökkenés a 7. és a 14. nap között volt detektálható, míg az MSH génnél szignifikáns csökkenés a 3. naptól folyamatosan észlelhető volt a 4. napig. A REV és GADD45 gének esetében az 1. naphoz képest szignifikáns csökkenés történt a 2. napon, majd szignifikáns emelkedés a 3. napon. A REV génnél további szignifikáns csökkenés a 7. és a 14. napok között volt mérhető, a GADD45 génnél a 3. és a 7. napok között. A BRCA gén kifejeződésében nem történt szignifikáns változás a 3. napig, majd szignifikáns expresszió növekedés, ezt követően csökkenés volt mérhető a 14. napra. Az XPA gén esetében az egymás után következő napok összehasonlításakor nem tapasztaltam szignifikáns eltérést, a legnagyobb expresszió a 3. napon volt detektálható, mely szignifikánsan eltért az 1., illetve a 14. napi értékektől (22. ábra).

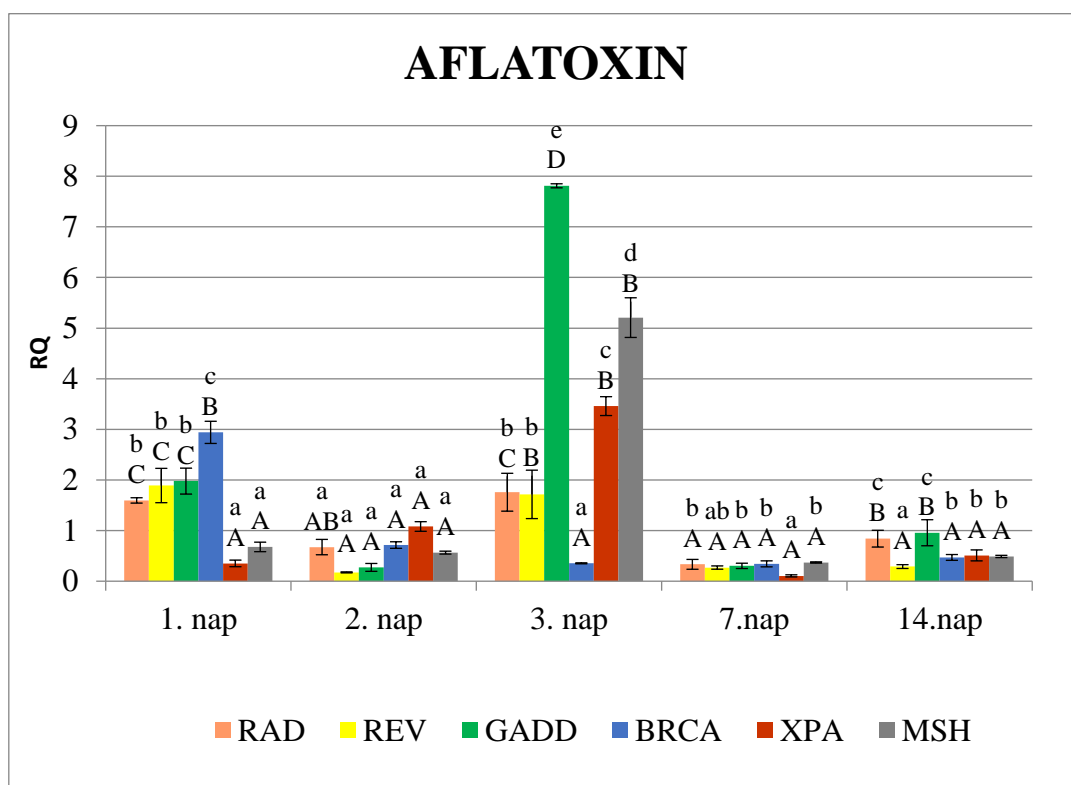


22. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban az USTER csoportban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

Az AFLATOXIN csoport időbeli változásának elemzésekor a legnagyobb expressziós értékkel a BRCA gén rendelkezett, mely szignifikánsan különbözött a többi gén eredményétől. Az MSH és XPA gének szignifikánsan eltértek a BRCA génen kívül a RAD51, a REV és a GADD45 génektől is. A 2. napon, az USTER csoport eredményeihez hasonlóan nem volt detektálható statisztikai különbség a gének értékei között. A 3. napon a vizsgált gének egymástól szignifikánsan különböztek, kivétel RAD51 és REV gének. A 7. napon az XPA rendelkezett a legkisebb expressziós értékkel, mely a REV gén kivételével szignifikánsan különbözött a vizsgált génektől. A 14. napon a RAD51 és GADD45 gének tértek el statisztikailag a további gének eredményeitől, szignifikánsan a legkisebb értékkel a REV gén rendelkezett.

A RAD51 és GADD45 gének időbeli változására ismétlődő, egymást követő szignifikáns csökkenés, majd szignifikáns expresszió növekedés volt jellemző. A REV gén expressziója is az előbb említett trendet mutatta, azzal a kivétellel, hogy a 7. és a 14. napok között nem volt szignifikáns eltérés. A BRCA gén expressziója szignifikáns módon csökkent az 1. napról a 2. napra, további eltérés nem volt kimutatható az egymást követő napok között. Az XPA és az MSH gének esetében nem volt különbség az egymást követő napok génexpressziós értékei között, ám a 3. napon tapasztalt szignifikáns mértékű expresszió növekedés miatt, statisztikailag is bizonyítottan eltérés mutatkozott a 2. és 3., illetve a 3. és 7. napok között (23. ábra).



23. ábra: A vizsgált gének expressziója az egyes mintavételi időpontokban az AFLATOXIN csoportban

a, b: kisbetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott időpontban a csoportok között

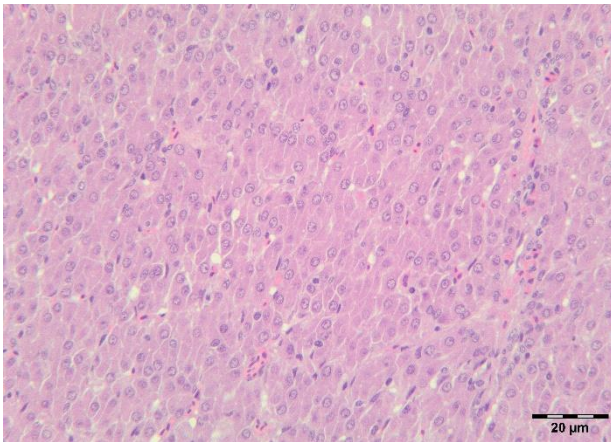
A, B: nagybetűk szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbséget jelölnek egy adott kezelt csoportban az időpontok között

4.6. Tyúk faj szövettani eredményei

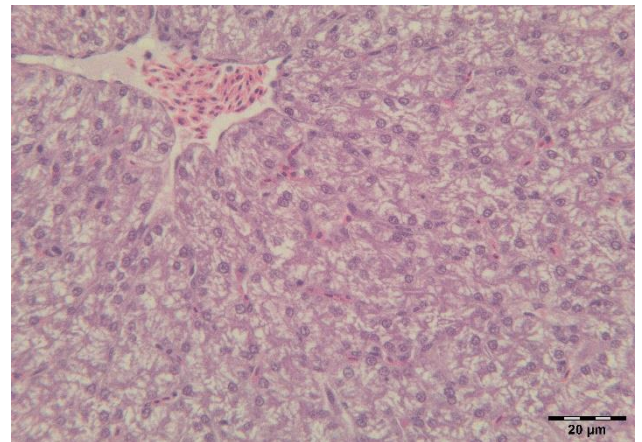
A vizsgált májszövetek nem tartalmaztak megnövekedett mennyiségű glikogént. A különböző csoportokban eltérő mértékű májsejtkárosodás volt megfigyelhető.

Az 1. napon vett májminták esetében a kontroll csoportban az ép parenchimájú hepatociták elkülönültek, a sejthatárok épek. Elvértve lymphocytás-plazmasejtes gyulladással góccok láthatóak (24. ábra 'a' panel). A STER csoportban súlyos regresszív májelfajulás mutatkozott, lymphocytás-plazmasejtes gyulladással góccok jelenléte mellett (24. ábra 'b' panel). Az USTER csoport szövettani eredményei megegyeztek a STER csoporttal, ám bővérűség jelei is mutatkoztak (kitágult vérerek) (24. ábra 'c' panel). Az AFLATOXIN csoportban szintén súlyos diffúz májsejtkárosodás, illetve bővérűség lehetséges. Gyulladásos góccok jelenléte jellemezte még az AFLATOXIN csoportot (24. ábra 'd' panel).

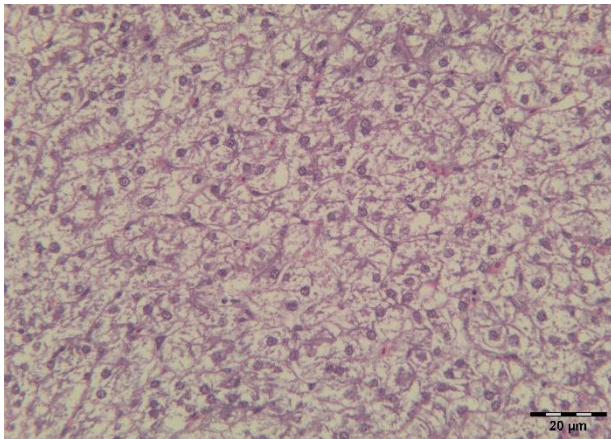
a



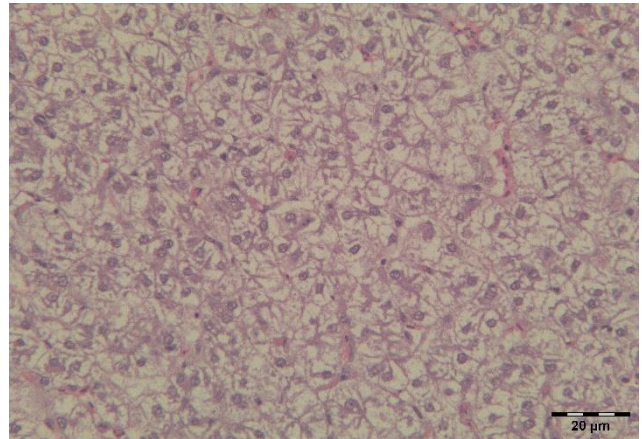
b



c



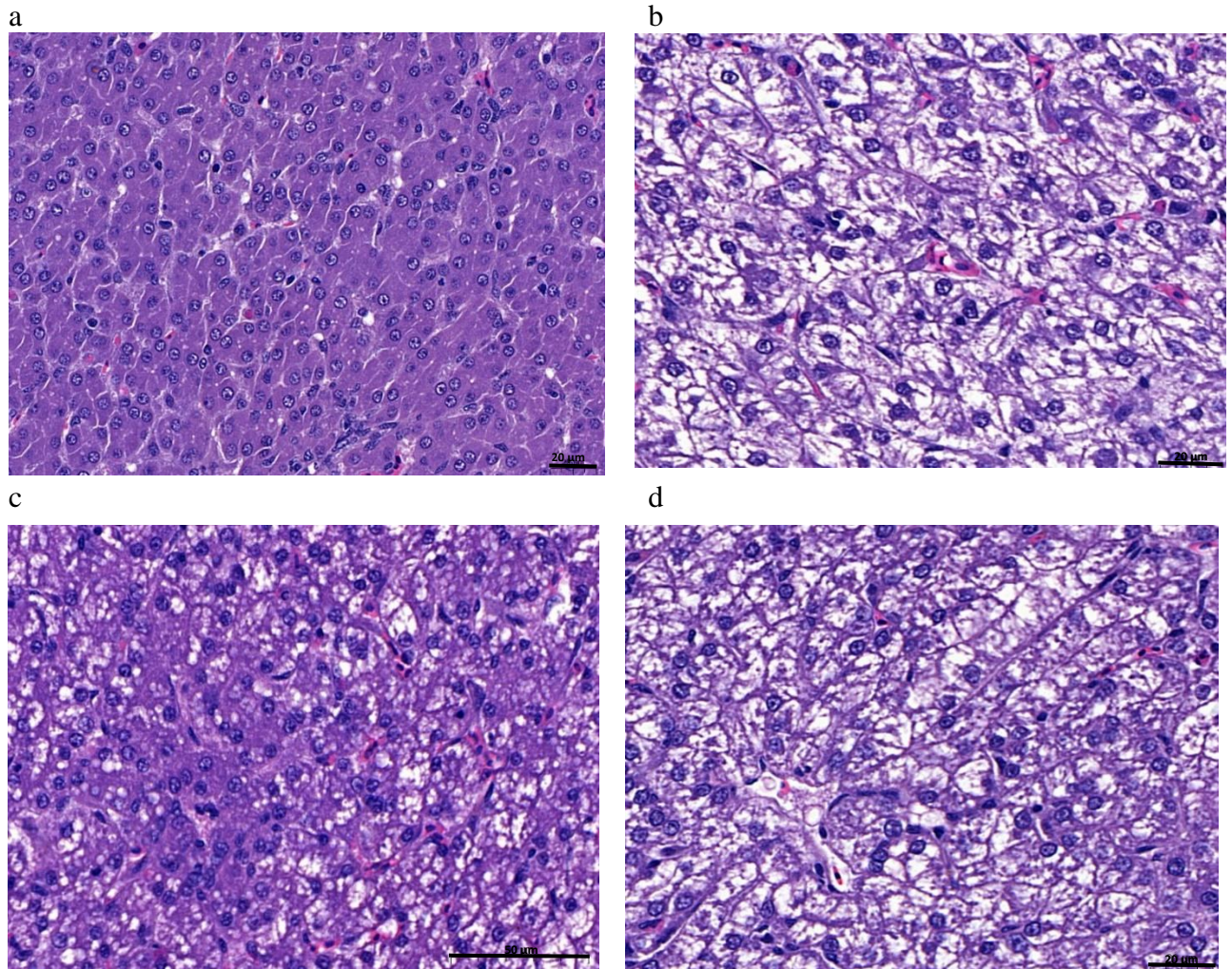
d



24. ábra: Csirke májminták 1. napi szövettani eredményei

a: kontroll csoport – ép májsertsorok; b: STER csoport – súlyos májsejtkárosodás kitágult vérérel; c: USTER csoport – súlyos diffúz májsejtkárosodás; d: AFLATOXIN csoport - súlyos diffúz májsejtkárosodás.

A 2. napi májminták rendezett májsejtsorokat és ép sejteket mutattak a kontroll csoportban, elenyésző lymphocytás-plazmasejtes infiltráció mellett (25. ábra 'a' panel). A STER csoport mintáira közepes mértékű zsíros infiltráció, gyenge, illetve közepes mértékű regresszív májelfajulás volt jellemző, lymphocytás-plazmasejtes góccok mellett (25. ábra 'b' panel). Az USTER csoport szövettani eredményei megegyeztek a STER csoportéval, de a regresszív májelfajulás mértéke közepes mértékű volt (25. ábra 'c' panel). Közepes mértékű zsíros infiltráció, súlyos regresszív májsejtelváltozás, lymphocytás-plazmasejtes gyulladásos infiltráció, illetve bővérűség volt megtalálható az AFLATOXIN csoport májmintáiban (25. ábra 'd' panel).

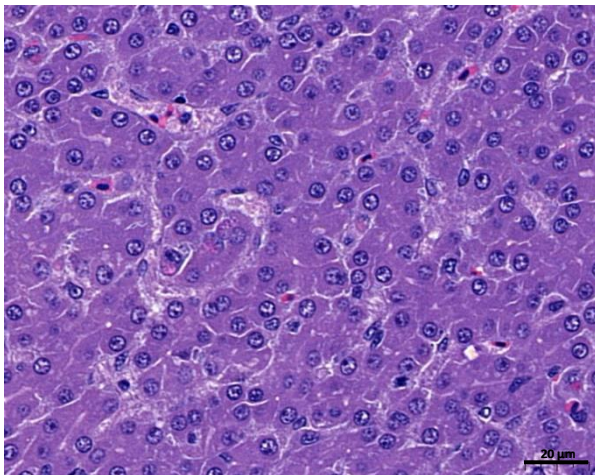


25. ábra: Csirke májminták 2. napi szövettani eredményei

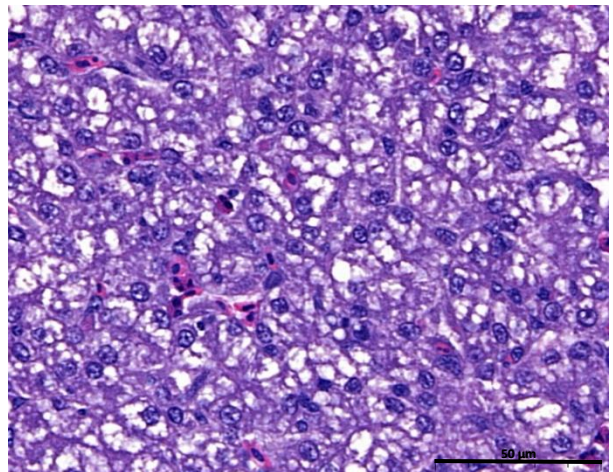
a: kontroll csoport – ép májsejtsorok; b: STER csoport – gyenge, közepes májsejtkárosodás közepes zsíros infiltrációval; c: USTER csoport – közepes májsejtkárosodás közepes zsíros infiltrációval; d: AFLATOXIN csoport - súlyos diffúz májsejtkárosodás közepes zsíros infiltrációval.

A 3. napon a kontroll csoport májmintái nem mutattak elváltozásokat, csupán néhány lymphocytás-plazmasejtes góc volt látható (26. ábra 'a' panel). A STER csoportra enyhe mértékű zsír és vacuolás elfajulás is jellemző volt a gyenge, illetve közepes diffúz májsejtkárosodás mellett, illetve a lymphocytás-plazmasejtes gyulladásozó góccal (26. ábra 'b' panel). Az USTER csoportban közepes fokú diffúz májsejtkárosodás, illetve lymphocytás infiltráció volt megfigyelhető (26. ábra 'c' panel). Gyenge fokú zsíros infiltráció, lymphocytás-plazmasejtes góccal, illetve közepes és súlyos diffúz májsejtkárosodás jellemezte az AFLATOXIN csoport májmintáit (26. ábra 'd' panel).

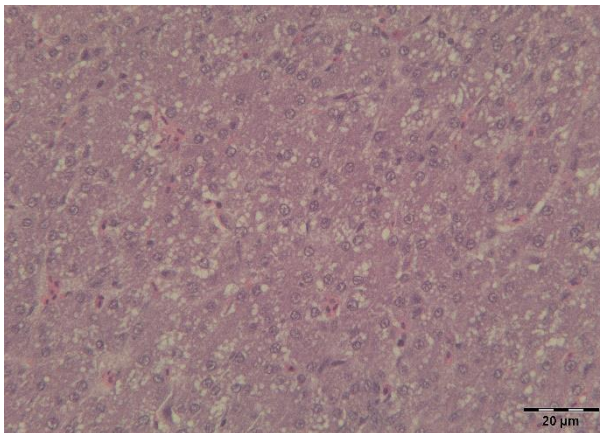
a



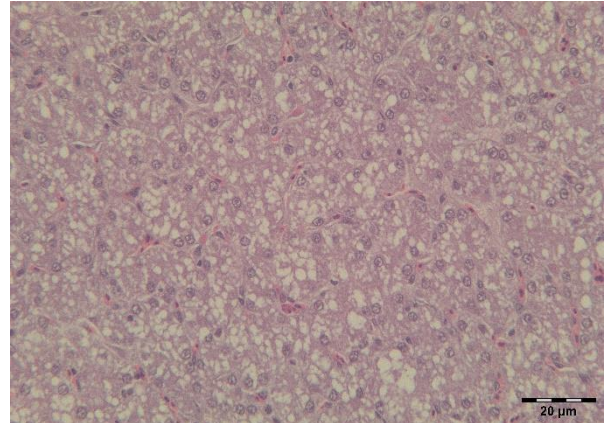
b



c



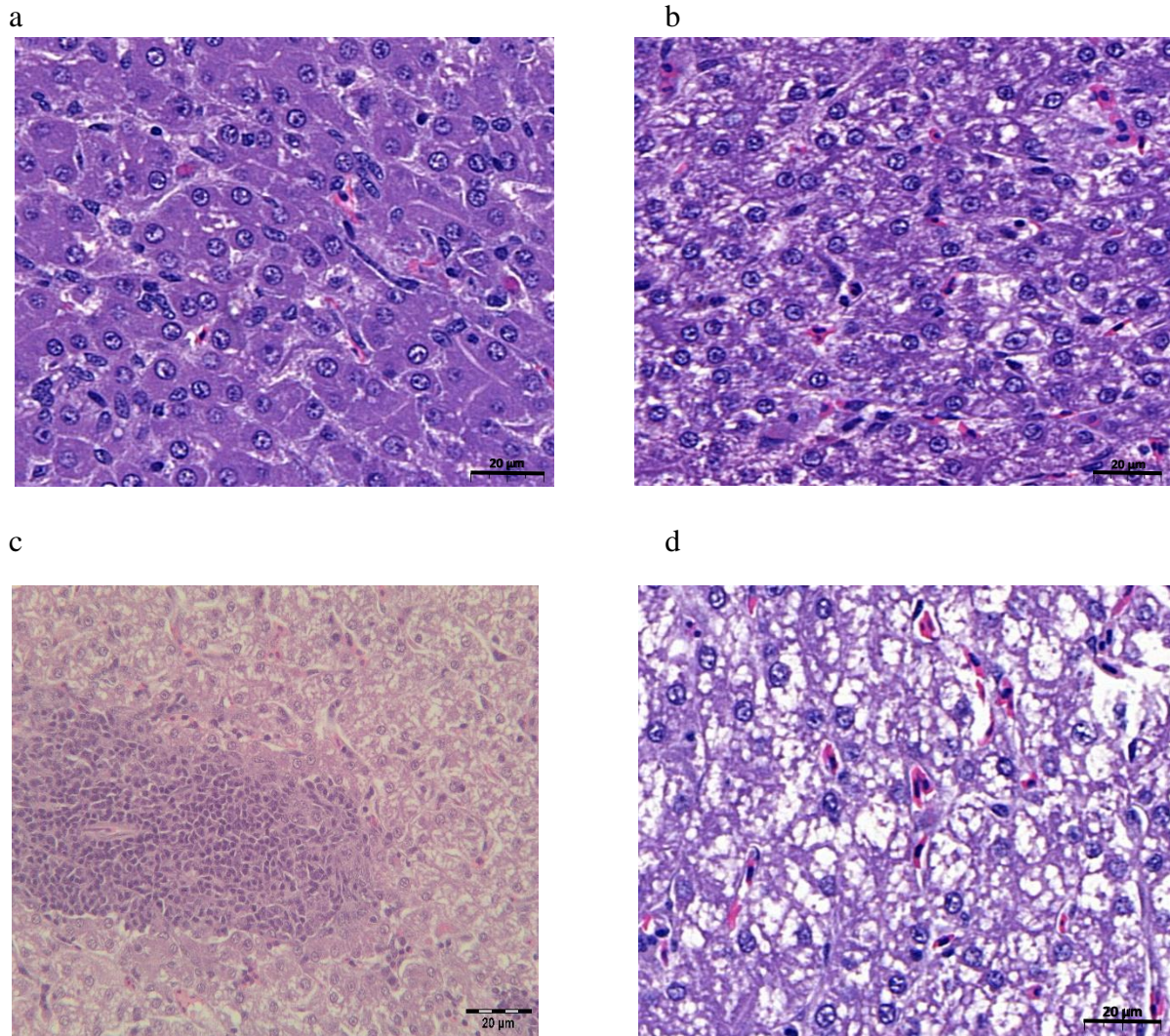
d



26. ábra: Csirke májminták 3. napi szövettani eredményei

a: kontroll csoport – ép májsertsorok; b: AFLATOXIN csoport – közepes májsejtkárosodás gyenge fokú zsíros infiltrációval; c: STER csoport – enyhe diffúz májsejtkárosodás, enyhe zsíros infiltrációval; d: USTER csoport – közepes fokú diffúz májsejtkárosodás.

A 7. napon a kontroll csoportban a májminták rendezett, ép sejsorokat mutattak, lymphocitás góccok jelenléte mellett (27. ábra 'a' panel). A STER csoportban gyenge, illetve közepes regresszív májelfajulás és lymphocytás-plazmasejtes gyulladáson infiltráció jellemezte a májmintákat (27. ábra 'b' panel) Az USTER csoportban az összes májminta közepes fokú regresszív májelfajulást mutatott, lymphocytás-plazmasejtes infiltráció jelenléte mellett (27. ábra 'c' panel). Az AFLATOXIN csoport szövettani eredménye a STER csoportéval egyezett meg, viszont közepes mértékű zsíros infiltrációt is mutatott (27. ábra 'd' panel).

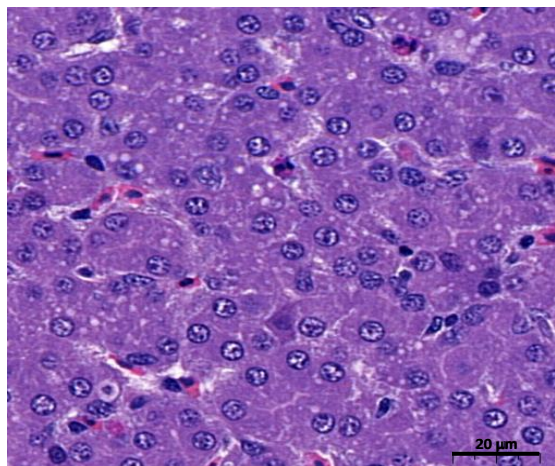


27. ábra: Csirke májminták 7. napi szövettani eredményei

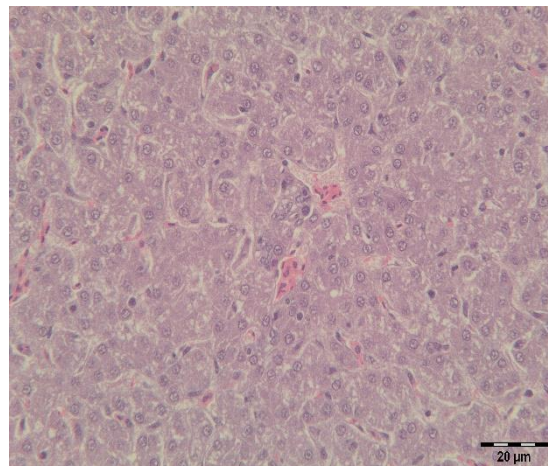
a: kontroll csoport – ép májsertsorok; b: STER csoport – gyenge, közepes májsejtkárosodás; c: USTER csoport – közepes májsejtkárosodás, gyulladáson gócc; d: AFLATOXIN csoport - enyhe diffúz májsejtkárosodás közepes zsíros infiltrációval.

A 14. nap során a kontroll csoport májmintái nem mutattak elváltozásokat, néhány lymphocytás-plazmasejtes góc volt látható (28. ábra 'a' panel). A STER és az USTER csoportokban egyhe fokú elváltozás volt látható a májsejteken, kiterjedt lymphocytás infiltrációval (28. ábra 'b' és 'c' panel). Az AFLATOXIN csoport májmintái közepes, illetve súlyos regresszív májfajulást mutattak lymphocytás-plazmasejtes gócok jelenléte mellett (28. ábra 'd' panel).

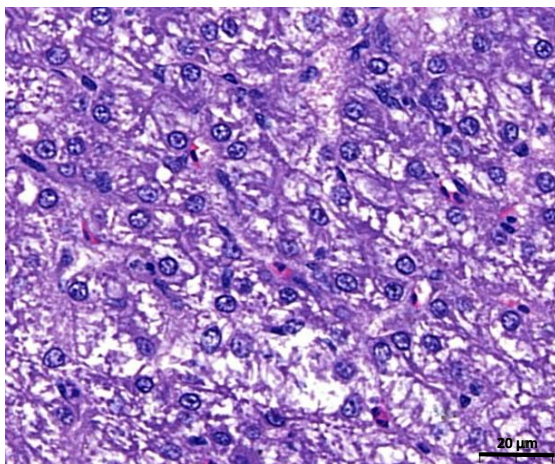
a



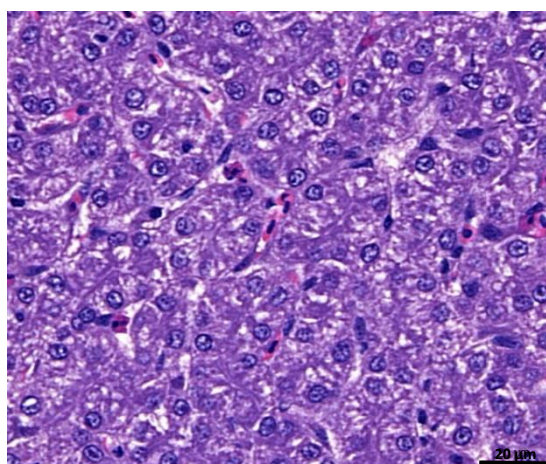
b



c



d



28. ábra: Csirke májminták 14. napi szövettani eredményei

a: kontroll csoport – ép májsejtsorok; b: STER csoport – enyhefokú elfajulás a májsejteken; c: USTER csoport – enyhefokú elfajulás a májsejteken; d: AFLATOXIN csoport – közepes, súlyos diffúz májsejtkárosodás.

5. KÖVETKEZTETÉS ÉS JAVASLATOK

5.1. Comet assay vizsgálat – tyúk fajban végzett kísérlet

A comet assay standard protokolljában a vizsgálandó sejtek 1:1 vagy 1:10 arányú hígítása ajánlott (Devaux et al. 1997). Sokolovic és munkatársai (2007) csirke vérminták esetében az 1:200 arányú hígítást állapították meg a legoptimálisabb sejtsűrűség eléréséhez. Ezek ellenére előkísérleteim során az 1:100 arányú hígítást véltem megfelelőnek csirkemáj minták esetében.

A kísérletben alkalmazott legkisebb dózis (0,215 mg T2+HT-2/ takarmány kg) megközelítette a maximális ajánlott mennyiséget az Európai Unióban (2013/165/EU) és egyben fele az Eriksen & Pettersson (2004) által javasolt tolerálható limitnek baromfi (tyúk faj) számára. E dózis esetében több, mint 4% töredezett DNS volt található az üstökös farki szakaszában pecsenyecsirke májában nagy szórásértékek mellett. THT2 csoportban (0,384 mg T-2+HT-2 toxin/takarmány kg) a DNS töredezettségben megmutatkozó káros hatás szignifikánsan jelentkezett. Ám a legmagasabb dózisú THT3 csoport (1,559 mg T-2+HT-2 toxin/takarmány kg) nem várt módon DNS töredezettség szempontjából nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól a CometScore szoftverrel végzett kiértékelés alkalmával. A vizuális kiértékelés a választott szoftveres kiértékeléssel szemben egyöntetűbb eredményekkel szolgált kisebb szórásértékek mellett, mindhárom kezelt csoport szignifikánsan eltért a kontroll csoport pontszámától (9. táblázat).

A comet assay egy gyakran alkalmazott vizsgálat DNS károsodás meghatározására humán sejtekben, labor-, illetve nem labor állatokon egyaránt. Alkalmazása baromfi fajok szempontjából sem ismeretlen, fűj hús, tyúk (pecsenyecsirke) vér, tyúk (pecsenyecsirke) embrió máj, lép- és vérmintákon is alkalmazták már (Erel et al. 2009, Sokolovic et al. 2007, Williams et al. 2011). DNS károsodást egér, illetve patkány májakban is vizsgáltak (Atroshi et al. 1997; Rizzo et al. 1998), ám kevés információ áll rendelkezésre baromfi, e csoporton belül is tyúk májában végbemenő DNS fragmentációról. Tudomásom szerint pecsenyecsirke májon még nem vizsgálták mikotoxinok DNS károsodásra gyakorolt hatását comet assay-vel.

Az általam meghatározott 1:100 arányú sejhígítás megfelelőnek bizonyult, mivel segítségével elkerülhettem a nagy sűrűség miatt az üstökösök átfedését, ami a vizuális kiértékelést is gátolná. Az optimális sejtsűrűség beállítása által a módszer csirkemájon is alkalmazhatóvá vált.

A comet assay egy technikailag egyszerű módszer, ám kivitelezése során számos gyakorlati lépést kell pontosan végrehajtani, nagy odafigyelést igényel. Collins (2014) több kritikus pontot is azonosított a comet assay elvégzése során: többek között az alkalmazott agarózok koncentrációit, az üstökösök sűrűségét, az inkubációs időt, az elektroforézis alkalmazott paramétereit. Mindezek mellett a kiértékelés módjának megválasztása elengedhetetlen a helyes következtetések megfogalmazásához. A szoftveres, manuális kiértékelés alkalmával a kiértékelőnek jelölnie, elkülönítenie szükséges a comet részeit (fej, illetve fark). A legnagyobb dózisú csoport (THT3) esetében az üstökös részeinek elválasztása, megkülönböztetése nem volt kivitelezhető, mivel a legtöbb sejt esetében csupán az üstökös farki része volt látható. Ennek következtében a CometScore szoftverrel végzett kiértékelés nem lehetett teljes mértékben megfelelő ebben a csoportban. Ennek ismeretében egy másik kiértékelési módot kellett választanom ahhoz, hogy helyesen tudjam megítélni a kapott eredményeket. Az automatikus kiértékelés lehetett volna megoldás, ám extrém nagy károsodás esetén az üstökös felismerése szintén problémákba ütközik, pontossága csökken (Györi et al. 2014). A vizuális kiértékelést választottam, mivel ennek során nem állnak fenn a fentebb említett limitáló tényezők (Horvatovich et al. 2013). Mindkét módszer által bebizonyosodott, hogy a T-2/HT-2 mikotoxin rendelkezik DNS károsító hatással, ami már 0,215 mg T2+HT-2/ takarmány kg dózis esetén is kimutatható. Eredményeim rávilágítanak, hogy egyes esetekben előnyös és szükséges a különböző kiértékelési módszerek ötvözése a precíz elemzéshez comet assay alkalmazása során. Ez lényeges, mivel objektíven szükséges megítélni egy adott anyag károsító, genotoxikus voltát. A comet assay esetében a fellépő DNS fragmentáció mögött az apoptotikus folyamatok korai szakasza is állhat.

Ekkor sün (hedgehog) alakot vesz fel az üstökös, azaz kis fej után nagy legyező alakú fark rész következik. Ezt az állapotot kizárhattam a kettős kiértékelés segítségével. Másik eshetőség pedig, hogy a DNS károsodást javító mechanizmusok állnak a háttérben. A vizsgált szövet típusa is lényeges a reális, pontos genotoxikusság megítéléséhez, mivel irodalmi adatokból is kitűnik, hogy a máj kitétsége, a metabolizmusban betöltött központi szerepe által nagyobb károsodásokon mehet végig, mint például a vér vagy a lép sejtjei (Frankic et al. 2006, Sokolovic et al. 2007).

5.2. Ponty LORD-Q PCR vizsgálat

Sikeresen adaptáltam a LORD-Q PCR technikát ponty fajra, mely módszerrel objektíven ellenőrizhető az egyes xenobiotikumok DNS károsító hatása.

Az oxidatív stressz fennállásának indikátora számos paraméter, mint például a GST, a GPx, a GR, a kataláz vagy a TBARS szint, melyek megnövekedett szintje utal az oxidatív stressz állapotára, melynek egyik következménye lehet a DNS károsodása. Deng és munkatársai (2019) tilápiában statisztikailag bizonyított mértékű megnövekedett GST mennyiséget mutattak ki a 16. és a 20. napon T-2 mikotoxin (10,8 mg/kg) etetése során. Matejova és munkatársai (2017) a 28. napon kaptak szignifikánsan emelkedett TBARS, kataláz, illetve GST értékeket ponty májban, illetve vesében egyaránt. Ezen eredményekhez képest saját, pontyban végzett kísérleteim során a T-2-vel kezelt csoport lézió értékei a 7. és a 14. napon emelkedtek szignifikánsan, majd a 21. napon kisebb mértékű, nem szignifikáns eltérés volt megfigyelhető a kontroll csoporttól (5. ábra).

A ROS mennyiségének nagymértékű, illetve hosszan tartó emelkedése szintén az oxidatív stressz fennállására utal. Pietsch és munkatársai (2011) *in vitro* sejtvonalakon vizsgálták a DON hatását több paraméterre, többek között a ROS mennyiségét is vizsgálva. Vizsgálatomhoz képest nem időfüggő módon, hanem koncentráció-függő kialakításban ellenőrizték kapott értékeiket. A legtöbb sejtvonal (szivárványos pisztráng máj, ponty agy, szivárványos pisztráng kopoltyú) esetében a DON 25-3000 ng/ml mennyisége koncentráció-függő módon szignifikánsan csökkentette a ROS szintjét, csupán lazac vese sejtekben mutatkozott ROS emelkedés. Pietsch és munkatársai (2011) eredményeivel ellentétben Zhang és munkatársai (2009b) 60 μ M koncentrációban a ROS szignifikáns növekedését bizonyították HepG2 humán sejtvonalban, ezzel összhangban a 8-OH-Gua szintje szintén szignifikánsan emelkedett. 15 és 30 μ M koncentrációban mindkét paraméter emelkedése bekövetkezett, ám nem volt szignifikáns, viszont a lipidperoxidációt jelző TBARS mennyisége 15 μ M DON mellett statisztikailag bizonyítottan magasabb volt.

A ponttyal végzett kísérletem rámutatott arra, hogy mindkét vizsgált trichotecénvázas mikotoxin DNS léziókat alakít ki hosszabb távú (1-2 hetes) expozíció során, ám e terhelés a 3. héten már nem képes szignifikáns mértékben hatni a DNS-re. Ennek hatterében a DNS károsodás hatására működésbe lépő DNS javító mechanizmusok állhatnak, melyek esetlegesen gátlást szenvednek az első 2 hét során vagy nem képesek a károsodás mértékével lépést tartani, majd a 3. héten már hatékonyabban képesek dolgozni. Ennek bebizonyításához szükséges lenne további DNS javító gének vagy fehérjék vizsgálata.

E folyamatok előtt az antioxidáns védelmi rendszer aktivizálása is lehetővé teszi, hogy a ROS képző és elimináló folyamatok egyensúlyba kerüljenek, ezzel pedig a DNS nem esik át oxidatív károsodáson. Ezt a védelmi útvonal érintettséget azonos kísérleti elrendezés mellett Pelyhe és munkatársai (2016) vizsgálták, mely során a GST aktivizálása mutatkozott a 2. és a 3. héten, ami a mikotoxinok transzformálására enged következtetni. Emellett a gpx4a expressziója a DON kezelés hatására a 7., a 14. és a 21. napon növekedett, míg a T-2 csoportokban csak a 21. napon mutatkozott expresszió növekedés. A gpx4b gén esetében mindhárom időpontban, mindkét mikotoxin etetés hatására expresszió növekedés volt látható. Ezen összefüggések segítségével levonható a következtetés, hogy az Nrf2—ARE útvonalra képesek hatni a DON és a T-2 mikotoxinok, mely útvonal aktivizálja az antioxidáns rendszer védelmét szolgáló géneket, mint a gpx4a vagy b. Ennek bekövetkeztével az oxidatív stressz állapota eliminálható, ami miatt a DNS károsodás mértéke drasztikusan csökkenni képes, ami eredményeimben is megmutatkozott.

5.3. Ponty génexpressziós vizsgálat

5.3.1. OGG1

Az AFB1 képes szignifikánsan megemelni a 8-OH-Gua és 8-hidroxi-citozin mennyiségét (Guidon-Kezis et al. 2014), ami által a BER javító folyamatok bekapcsolnak, aminek része az OGG1 is. Ezen összefüggés állhat eredményeim mögött is, aminek bizonyításához szükséges a jövőben a 8-OH-Gua, illetve a 8-oxoG mennyiségének mérése is a vizsgált szövetmintából. Szignifikáns expresszió növekedés a 24. órában volt látható (6. ábra), így az említett léziók kialakulása ponty faj esetében csak 1 napot követően éri el azt kritikus szintet, mely mellett az OGG1 gén expressziója megemelkedik a kialakult DNS károsodás javítására. Az AFB1 hatáskülönbsége megmutatkozott, szignifikáns emelkedés az Afla, illetve a Ster4 csoportokban volt megfigyelhető a kontroll és a STER1 és a STER2 csoportokhoz képest. A két további szterigmatocisztin dózis szignifikáns csökkenést eredményezett az OGG1 expresszióban, így feltételezhetően nem volt képes kialakítani lényeges mennyiségű léziót, ezáltal DNS károsodást. Bravard és munkatársai (2006) megközelítése révén a ROS mennyiségének mérését is indokolt a jövőre nézve elvégezni, mivel a ROS képesek gátolni a BER folyamatát, ezzel együtt az OGG1 gént, illetve fehérjét is. Az Afla csoport expressziójának aktiválása a 24. órában következett be, míg a Ster4 csoportban időben folyamatos expresszió emelkedést tapasztaltam. A génexpressziós növekedés a megemelkedett léziók mennyiségével lehet összefüggésben, aminek mennyisége a 24. órában lett kritikusabb mértékű. A Ster1 csoportban a 24. órában szignifikáns expresszió gátlás mutatkozott, míg a Ster2 csoportban nem következett be változás, feltételezhetően az alkalmazott dózisok nem fejtettek ki a javító mechanizmushoz szükséges mennyiségű károsodást.

5.3.2. HSP70

Minden időpontban, minden kezelt csoportban expresszió növekedést mértem, ami néhány kivétel mellett szignifikáns mértékű volt (7. ábra). Tendenciálisan az Afla és a Ster4 csoportok expressziója megegyezett, így e gén esetében az AFB1 tízszeres hatáskülönbsége nem mutatkozott meg egyértelműen a szterigmatocisztinnel szemben. Az AFB1, illetve a szterigmatocisztin már 8 órát követően is kifejti DNS károsító hatását, amire a HSP70 gén expressziójának növekedéséből is következtethetünk. Az összefüggés mértékének pontosításához a jövőben szükséges egyszerre vizsgálni a léziók mennyiségét és a javító gének expresszióját. A HSP70 génnek számos szerepe van, többek között részt vesz a BER, a NER folyamatokban, illetve az egyszálú DNS törések javításában is. Ahhoz, hogy pontos képet kapjunk a HSP70-ről, szükséges lenne egyes javító folyamatokra jellemző génekkel együtt vizsgálni expresszióját. Ilyen gén lehet az XPA vagy az XPG gén is, melyek a NER folyamatokban vesznek részt. Vizsgálataimban az idő előrehaladtával az Afla csoportban a 24. órára emelkedett meg szignifikánsan a HSP70 gén expressziója, míg a Ster4 csoportban gén aktiválás csak a 16. órában történt. Ennek folyamán az AFB1 elnyújtottabb, időben is tovább fennálló károsodást tud kialakítani, amire reagálva a gén expressziója időben is elnyújtott emelkedést mutat. A Ster1 és a Ster2 csoportok szignifikáns génkifejeződésbeli csökkenése már a 16. órában megmutatkozott, így feltételezhetően az alkalmazott dózisok már nem fejtettek ki a HSP70 DNS javításához szükséges mennyiségű léziót.

5.3.3. p53

A p53 kritikus szereppel bír a sejtet érő stresszválasz kialakításában (sejtciklus szabályozás, DNS javítás, apoptózis), ezáltal több génnel áll kapcsolatban. Ilyen az OGG1, melynek szabályozza transzkripció szintjét. Ezt az interakciót eredményeim is alátámasztják. A HSP70 is részese a p53 DNS javításának, amit eredményeim is bizonyítanak, a jövőben szükséges ezen gének együttes vizsgálata. A p53 egyik szabályozója a GADD45 α génnek, amit eredményeim (8. ábra), illetve Ayed-Boussema és munkatársai (2008) adatai is alátámasztanak, így ezt a továbbiakban is szükséges vizsgálni. Az AFB1-epoxid képes mutációt létrehozni a p53 génszakaszban, amit zebadánióban már bizonyítottak (Santacrose et al. 2008), ennek nyomán követésére érdemes lehet a p53 negatív szabályozóját, az mdm2 gént vizsgálni. A mismatch

javításban a p53, illetve az MSH2 interakcióját bizonyították (Williams & Schumacher 2006), ennek megfelelően fontos lenne kibővíteni vizsgálataimat az MSH2 génre is a jövőben, hogy pontosabban lehessen következtetni az egyes xenobiotikumok DNS károsító hatására.

A kísérleteimben az aflatoxin B1 hatáskülönbsége a 24. órában mutatkozott meg tízszeres mértéket meghaladóan, ám a 8. és a 16. órában az aflatoxin B1 és szterigmatocisztin tízszeres hatáskülönbsége mutatkozott meg. Időbeli változást nyomonkövetve az Afla és a Ster4 csoportok mozogtak hasonlóan, az előbbi esetében szignifikáns emelkedés a 24. órára következett be, az utóbbi esetében folyamatos expresszió növekedés volt megfigyelhető idővel. A vizsgált dózisban így kialakulhattak léziók, melyek javításához bekapcsolódott a p53 gén is. Kisebb dózisu szterigmatocisztinnel terhelt csoportokban expresszió csökkenés volt kimutatható, így feltételezhetően a DNS javításra már nem volt szükség az idő előrehaladtával.

5.3.4. GADD45 α

A GADD45 α szabályozásában részt vesz a p53, mely összefüggést a kapott eredményeim is alátámasztanak. Másik szabályozója a BRCA1, így fontos lenne a jövőben ennek a génnek a vizsgálata is, mely aktiválni és gátolni is képes a GADD45 α -t. Szignifikáns expresszió változás a 8. órában csupán az Afla csoportban következett be negatív irányban, ám a 24. órában már a Ster2 csoport kivételével expresszió növekedést detektáltam (9. ábra). Feltételezhetően ezen csoportokban megnövekedett DNS károsodás már elérte azt a szintet, amely által a GADD45 α aktiválása már szükséges volt. Li és munkatársai (2013) kapcsolatot találtak a GADD45 α , illetve az mdm2 között, így nem csak a p53 oldaláról, de a GADD45 α révén is előremutató lenne az mdm2 gén bevonása vizsgálataimba a jövőben. Az időbeli változásokat figyelembe véve az aflatoxin B1 az idő előrehaladtával folyamatosan aktiválta, növelte a GADD45 α kifejeződését, feltételezhetően egyre nagyobb mértékű DNS károsodást alakított ki, míg a STER1 csoportban nem történt változás az expresszió mértékében. A Ster2 és a Ster4 csoportokban a génexpresszió indukálása a 24. órában növekedett szignifikáns mértékben, így a GADD45 α általi DNS javításra csak ebben az időszakban lett szükség.

5.4. Tyúk fajban végzett LORD-Q PCR vizsgálatok

Sikeresen adaptáltam a LORD-Q PCR technikát tyúk fajra, mely módszerrel objektíven ellenőrizhető az egyes xenobiotikumok DNS károsító hatása.

Balogh és munkatársai (2019) azonos mikotoxinok és dózisok mellett brojlerekben a glutation redox rendszer aktiválódását találták, legfőképpen az AFB1 hatására. A vizsgált gének esetében (GSS, GPx4, GSR) AFB1 az 1. napon alulexpresszáldott, majd idővel expresszió növekedés, a 14. napra pedig ismét csökkenés volt megfigyelhető. Ezzel szemben az általam mért léziók mennyisége az 1. napon volt a legmagasabb (14. ábra), ami az oxidatív stressz állapotára utal, majd pedig a 2. napon csökkenés egyfelől az antioxidáns védelmi rendszer hatékonyságának is köszönhető lehet. Ám a további napok esetében a léziók mennyisége szignifikánsan nem változott. A szterigmatocisztin két formája eltérő trendet rajzoltak GPx4 gén expressziója esetében. Az ultratisztaságú szterigmatocisztin a 2. és a 7. napon okozott expresszió növekedést az GPx4 esetében, ezen időpontokban mértem a legalacsonyabb lézió mennyiséget. A természetesen termeltetett szterigmatocisztin pedig a 14. napon eredményezte a GPx4 túlexpresszált állapotát, ebben a csoportban mértem a legalacsonyabb lézió mennyiséget. Ennek megfelelően a glutation-peroxidáz 4 fontos szerepet tölt be a madarak antioxidáns védelmében, az oxidatív stressz eliminálásában nélkülözhetetlen, ennek fényében a DNS károsodás kialakulásának esélye is csökken.

A 14. napon az USTER csoport mellett az AFLATOXIN csoport mutatott szignifikáns lézió emelkedést. Hosszabb távú (12 hetes) AFB1 (100 μ g/kg) etetés hatására tilápiában megemelkedett a GST és a GPx gének expressziója, ami oxidatív stressz állapotára utal (Bacou et al. 2021). A 14. napon kapott eredményeim szintén az oxidatív DNS károsodás kialakulására utalnak mind az USTER, mind az AFLATOXIN kezelés hatására. A jövőben ennek

megerősítésére az antioxidáns védelmi rendszer egyes tagjainak együttes vizsgálata szükséges. Az AFB1 DNS károsító hatását magyarázhatják Deng és munkatársai (2010) eredményei, miszerint a májban található CYP1A fehérje aktivitása csökken, aminek következtében az AFB1 AFB1-8-9-epoxiddá alakítása, a detoxifikálás szenved gátlást. Ennek következtében hosszabb ideig fenn tudja tartani a toxin az oxidatív stressz állapotát.

Eredményeim alapján az aflatoxin B1 tízszeres hatáskülönbsége valószínűsíthető a szterigmatocisztinnel szemben csirkében. Schroeder és Kelton (1975) ezzel szemben csirke embriókban tizenhatszoros különbséget talált toxicitásban az aflatoxin B1 javára.

A 14. napon STER csoport kivételével a további csoportok a léziók tekintetében szignifikánsan több lézióval rendelkeztek a mitokondriális DNS vizsgálata során, ami rámutat a mitokondriális DNS sérülékenységre egy hosszabb távú mikotoxin terhelés során. Ahhoz, hogy összevethető legyen a nukleáris és a mitokondriális DNS-ben kialakuló DNS károsodás, a léziók mennyisége, a jövőben szükséges együttesen vizsgálni e két DNS-t. Niranján és munkatársai (1982) patkány májszövetben mutatták ki ezt az összefüggést, miszerint a mitokondriális DNS sérülékenyebb és javítása időigényesebb. 24 órát követően az AFB1-adduktok mennyisége nem változott a mitokondriális DNS-ben, míg a nukleáris DNS-ben már a 4. órában csökkenés volt látható az adduktok számában.

5.5. Tyúk fajban végzett génexpressziós vizsgálatok

5.5.1. RAD51

Vizsgálataim eredményeiből látható, hogy a génexpresszió követi a DNS károsodás mértékét. Kivételt ez alól a STER csoportban az 1-2. nap képez (15. ábra), amikor a génexpresszió csökkent, míg a léziók mennyisége nőtt, illetve az USTER csoportban a 7-14. napok, amely időszakban szintén az expresszió csökkenését mutattam ki a léziók emelkedése mellett. Ennek függvényében a RAD51 gén hatékonyan részt tudott venni a léziók eliminálásában.

Annak megerősítésére, hogy tyúk fajban is végbemegy a kétszálú DNS javítás RAD51 által, a jövőben érdemes kiegészíteni a vizsgálatokat kétszálú DNS töredezettség markerekre, például a γ -H2AX fehérjére.

5.5.2. REV1

A STER csoportban a gén expressziója és a léziók mennyiségének változása döntően együtt mozogtak, majd a 14. napon szignifikánsan csökkent a génkifejeződés és a léziók száma is (16. ábra), amiből arra lehet következtetni, hogy a gén elvégezte feladatát. Ezzel szemben az USTER csoportban is együtt mozgott e két paraméter, viszont a 14. napon a génkifejeződés alulműködést, míg a léziók száma szignifikáns emelkedést mutatott, ennek hátterében a gén kimerülése állhat. Az AFLATOXIN csoportban a léziók száma szignifikánsan csökkent a 2. napra, szintje szignifikánsan nem különbözött időfüggő módon a további napok során, viszont mindvégig szignifikánsan nagyobb értékkel rendelkezett a kontrollhoz viszonyítva. A REV1 gén ezzel szemben túlexpresszált állapotban volt a 3. és a 7. napok során, a 14. napon szignifikáns mértékű génkifejeződés csökkenése a gén kimerülésére enged következtetni.

5.5.3. BRCA2

A BRCA2 képes a RAD51 expresszióját befolyásolni, ám a RAD51-nek a BRCA2-től független útvonala is ismeretes. Vizsgálataim során e két gén expressziója nem függött össze az 1-3. napok esetében, ám expressziójuk teljes egyezést mutatott a 7. és a 14. napokon (15. ábra, 17. ábra). A 7. napon ez megerősíti a STER és az USTER csoportokban valószínűsíthető a kétszálú DNS törések javítását, a homológ rekombinációt. Az AFLATOXIN csoportban expresszió csökkenés volt tapasztalható, illetve ez a trend volt megfigyelhető mindhárom csoport esetében a 14. napon, amiből a gén kimerülésére vagy gátlására következtethetünk. Az apoptózis folyamatát érdemes lenne a jövőben tesztelni, hogy tényleges gátlás történik vagy a sikertelen DNS javítás

eredményezi a sejt halálát. A léziók mennyiségének összevetése során látható, hogy az AFLATOXIN csoportban a BRCA2 gén expressziója minden időpontban követi a léziók mennyiségi változását. A STER csoportban ez csak a 3-7. és a 7-14. napok között realizálódott, míg az USTER csoportban e két paraméter ellentétes trendet írt le.

5.5.4. MSH6

Az STER csoportban az MSH6 gén aktiválódása a 7. napon következett be, majd a 14. napra már szignifikánsan csökkentette a kialakult léziók számát, ezáltal az expresszió is szignifikánsan lecsökkent. Az USTER csoportban már a 3. napon bekövetkezett a gén aktiválása, majd hatékonyan csökkentette a 7. napra a léziók számát, ám a 14. napra a gén kimerülését tapasztaltam, mivel a léziók száma megnövekedett az alulexpresszált állapotnak köszönhetően. Az AFLATOXIN csoportban e kimerülés sokkal gyorsabban bekövetkezett, nagymértékű expresszió emelkedés a 3. napon következett be, ám ez nem volt hatással a léziók mennyiségére.

5.5.5. GADD45 α

Az 1. napon szignifikánsan megemelkedett a GADD45 α expressziója az AFLATOXIN csoportban (19. ábra), ami magyarázható a léziók szignifikáns emelkedésével, majd a 2. napon az expresszió mértéke és a léziók száma is szignifikáns csökkenést mutatott. A 3. napon a gén expressziója nagymértékben emelkedett, ám a léziók számában nem szignifikáns növekedés volt detektálható. A 7. és a 14. napokon a léziók számában nem következett be változás, míg az expresszió a 7. napra a kontroll szintje alá süllyedt, ami a folyamat kimerülésére utal, a 14. napon a kontroll szintjét érte el. Az USTER csoportban a gén időbeli expressziós változásai összhangban voltak a kialakult léziók mennyiségi változásaival, míg ez nem mondható el a STER csoport tendenciáiról. Ayed-Boussema és munkatársai (2008) eredményei is rámutatnak a p53 és a GADD45 gén kapcsoltságára, így a jövőben a p53 gén vizsgálata is szükséges tyúk faj esetében is. Li és munkatársai (2013) kapcsolódási hálót mutattak be bizonyos gének között, aminek része a GADD45 α kapcsolódása az mdm2, illetve tp53 génekkel. A további vizsgálatokban szükséges kibővíteni ezen génekre is az expresszió mérését, hogy tyúk faj esetében is képet kaphassunk a GADD45 α és azzal együtt működő génekről.

5.5.6. XPA

A STER csoportban az XPA expressziója és a léziók száma csak a 7-14. napok között követte egymást. Az USTER csoportban az XPA okozta hatékony léziószám csökkenés a 7. napra valósult meg, ám a 14. napon génkimerülés következhetett be, mivel a 14. napra szignifikánsan növekedett a léziók száma. Az AFLATOXIN csoportban a 2. napra csökkent a léziók mennyisége nem szignifikáns expresszió növekedés hatására, ám a 3. napi túlexpresszált állapot nem eredményezett további lézió csökkenést. A 7. és a 14. napokon pedig az XPA gén kimerülése vagy esetleges gátlása nyilvánult meg vizsgálatomban.

5.6 Tyúk szövettani eredmények

A 7. napon a STER csoportban gyenge, illetve közepes, az USTER csoportban közepes fokú regresszív májelfajulás mutatkozott a májmintákon lymphocytás-plazmasejtes gyulladással infiltáció mellett. A 14. napon pedig a szterigmatocisztin mindkét formája esetében enyhe fokú elváltozás volt látható a májsejteken, kiterjedt lymphocytás infiltációval. Purchase & Watt (1970) 5 hétig tartó 100 ppm szterigmatocisztin etetés hatására masszív májnekrózist tapasztaltak patkányok májában, a májsejtek szerkezetének megváltoztatása mellett. A 7. héten kisebb degeneratív elváltozást figyeltek meg, ám gócpontokban található volt nekrotikus elváltozás, zsíros elváltozás, illetve a májsejtek méretei igen differenciáltakká váltak, egyesek nagy sejtmagot tartalmaztak, más sejtekben pedig nem volt sejtmag. Solcan és munkatársai (2013) csirkemáj patológiás vizsgálata során 54 μ g aflatoxin B1/testtömeg kg etetés hatására a 14. napon diffúz vízkóros degeneratív elváltozásokat figyeltek meg, vérpangásos érszakaszokat, új epevezeték szakaszok kezdeti formálódását. A máj több területén nekrotikus elváltozások alakultak ki.

Intenzívebb változások, mint a súlyos mértékű mikrovaszkuláris steatosis a kezelés 28. napján volt detektálható. Szintén brojlerek esetében Yang és munkatársai (2012) a vizsgált májak 83,3%-ban fedeztek fel enyhe szintű léziókat 16,6%-ban pedig súlyosabb léziós részeket 21 napig tartó 75%-ban aflatoxinnal szennyezett takarmányetetés során. A 100%-ban AFB1-gyel történt szennyezés hatására az összes máj súlyos nekrotikus elváltozást mutatott, zsíros elfajulást, a citoplazmában különböző méretű lipidcseppek jelentek meg. Ezen eredményekhez hasonlóan vizsgálatomban a 7. napon az AFLATOXIN csoportban gyenge, illetve közepes regresszív májelfajulást, közepes mértékű zsíros és lymphocytás-plazmasejtes gyulladásos infiltrációt figyeltem meg a májmintákon. A 14. napon az általam vizsgált májak közepes, illetve súlyos regresszív májelfajulást mutattak lymphocytás-plazmasejtes góccok jelenléte mellett.

A szövettani eredményeim, illetve az irodalomban található adatok megerősítik, hogy mind a szterigmatocisztin, mint az aflatoxin B1 döntően léziók kialakítását eredményezi több hetes mikotoxin terhelés hatására, mely károsodás egyéb elváltozásokkal (zsíros elfajulás, gyulladásos infiltráció) is együtt járhat. Az általam vizsgált léziók mennyisége is szignifikánsan magasabb volt a 14. napon az USTER és az AFLATOXIN csoportokban, tehát a sejtszintű károsodás nem szűnt meg, amit a szövettani eredmények is mutatnak.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Sikeresen adaptáltam a comet assay-t tyúk faj májsejtjeire és meghatároztam az optimális 1:100 arányú sejtsűrűséget. Kimutattam comet assay-vel a T-2 mikotoxin DNS károsító hatását.
2. Sikeresen adaptáltam, és elsőként alkalmaztam a LORD-Q PCR technikát ponty és tyúk fajokra. Optimalizáltam a hosszú, illetve a rövid DNS szakasz esetében is a PCR reakciókat.
3. Kimutattam, hogy DON és T-2 mikotoxinok hatására léziók alakultak ki a ponty genomjában, ám az idő előrehaladtával csökkenő tendencia volt megfigyelhető a léziók számában mindkét mikotoxin esetében.
4. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam kimutatási eljárást OGG1, HSP70, p53, GADD45 α gének vizsgálatához ponty fajban, amelyeket sikeresen alkalmaztam az aflatoxin B1 és szterigmatocisztin hatásvizsgálata során.
5. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam kimutatási eljárást RAD51, GADD45 α , REV1, BRCA2, MSH6, XPA gének vizsgálatához tyúk fajban, amelyeket sikeresen alkalmaztam az aflatoxin B1, a szterigmatocisztin és a tisztított szterigmatocisztin hatásvizsgálata során.
6. Az aflatoxin B1 mindkét faj esetében néhány kivétel mellett döntően expresszió csökkenést eredményezett a vizsgált génekben, tyúk fajban pedig szignifikáns mértékű léziószám növekedést.
7. Megfigyeltem, hogy ponty fajban a szterigmatocisztin változóan befolyásolja a vizsgált gének expresszióját, ám dóziszfüggő összefüggést nem mutattak. Tyúk fajban a természetesen termeltetett és a tisztított szterigmatocisztin is képes volt léziók kialakítására, illetve befolyásolta a vizsgált gének expresszióját.
8. A szövettani vizsgálatok során megállapítottam, hogy az aflatoxin B1 nagyobb mértékű elváltozásokat okozott a szterigmatocisztinhez képest. A természetes és a mesterséges szterigmatocisztin hasonló mértékű elváltozásokat okozott.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Mikotoxinok, mint a mikroszkopikus penészgombák másodlagos anyagseretermékei a mindennapi szántóföldi munka, takarmányozás és élelmezés színterén jelen vannak, ezzel adva számos feladatot a szakembernek. Nagyszámú információ elérhető hatásaikról, melyek gazdasági állatok esetében a teljesítmény romlásával, különféle általános tünetek kialakításával hozható összefüggésbe.

A mikotoxinok ismert hatása az oxidatív stressz kialakítása, ám ennek DNS károsodás irányába bekövetkező folyamataik bemutatása, kutatása igen szegényes. A DNS károsodások javításáért, kiküszöböléséért felelős a DNS javító rendszer, mely számos útvonalon keresztül végzi az adott károsodásra specifikus javítást. A DNS károsodás és az azt javító mechanizmusok kapcsolatáról igen kevés információ érhető el, ezen folyamatok együttes vizsgálata adhat pontosabb képet a molekuláris szinten végigvonuló, lezajló változásokról.

Doktori munkám során célom volt felmérni a DON, a T-2, az aflatoxin B1 és a szterigmatocisztin mikotoxinok DNS károsító hatását ponty, illetve T-2, aflatoxin B1 és a szterigmatocisztin mikotoxinok DNS károsító hatását tyúk fajban. A vizsgálatok elvégzéséhez egy objektív, PCR alapú módszer adaptálása és alkalmazása is célom volt mindkét faj esetében. Melynek részeként a kiválasztott módszer alkalmazhatóságát össze kívántam hasonlítani a leggyakrabban alkalmazott comet assay-vel, annak tyúk májra történő adaptációját követően. Emellett célom volt feltérképezni a DNS javító mechanizmusok változását, ezzel képet kapni a vizsgált mikotoxinok DNS javító génekre gyakorolt hatásáról. Ennek okán célom volt DNS javításban szerepet játszó gének kiválasztása ponty és tyúk fajok számára, majd a géneket vizsgáló rtPCR optimalizálása, illetve a legmegfelelőbb belső kontroll gén kiválasztása. A tyúk fajban célom volt szövettani vizsgálatokkal feltérképezni az aflatoxin B1, illetve szterigmatocisztin májra gyakorolt káros hatásait.

A comet assay-t sikeresen adaptáltam tyúk fajban májsejtekre és 1:100 arányú optimális sejtsűrűséget határoztam meg. Szoftveres és vizuális kiértékelés által is bebizonyosodott, hogy a T-2/HT-2 mikotoxin rendelkezik DNS károsító hatással, ami már 0,215 mg T2+HT-2/ takarmány kg dózis esetén is kimutatható tyúk fajban. Eredményeim rávilágítanak, hogy egyes esetekben előnyös és szükséges a különböző kiértékelési módszerek ötvözése a precíz elemzéshez comet assay alkalmazása során.

Elsőként adaptáltam és optimalizáltam a LORD-Q PCR technikát ponty, illetve tyúk fajra. Segítségével kimutattam, hogy Ponty fajban DON és T-2 mikotoxin esetében is szignifikánsan emelkedett a DNS léziók száma, ám időben csökkenő tendenciát mutattak. Csirke fajban az aflatoxin B1, a szterigmatocisztin és a tisztított szterigmatocisztin szintén megnövelte a DNS léziók mennyiségét, ám időbeni összefüggés nem mutatkozott.

Ponty fajban az OGG1 gén esetében az aflatoxin B1 (0,4 mg/testtömeg kg) expressziójának aktiválása a 24. órában következett be, míg a Ster4 (4 mg/testtömeg kg) csoportban időben folyamatos expresszió emelkedést tapasztaltam. Az 1 mg/testtömeg kg szterigmatocisztin csoportban a 24. órában expresszió gátlást okozott, míg a 2 mg/testtömeg kg szterigmatocisztin hatására nem következett be OGG1 génkifejeződésbeli változás. A HSP70 expressziójának az aktiválása az aflatoxin B1 hatására a 24. órában következett be, míg a Ster4 csoportban a 16. órában. Az utóbbi csoport expresszió csökkenését a 24. órában figyeltem meg, a másik két szterigmatocisztin (1, illetve 2 mg/testtömeg kg) csoportban már a 16. órában. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam kimutatási módszert a p53 génexpressziójának vizsgálatához. A p53 gén aktiválása folyamatosan emelkedett a legnagyobb dózisu szterigmatocisztin (4 mg/testtömeg kg) csoportban, ám a másik két szterigmatocisztin csoportban ellenkező hatást tapasztaltam. Az aflatoxin B1 a 24. órában aktiválta a p53 gén expresszióját. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t a GADD45 α vizsgálatához. A GADD45 α génexpressziója aflatoxin B1 (0,4 mg/testtömeg kg) hatására az idő előrehaladtával lépcsőzetes aktiválása következett be, további indukáló hatás szterigmatocisztin (2, illetve 4 mg/testtömeg kg) esetében történt a 24. órában.

Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t tyúk RAD51 gén vizsgálatához. Mindegyik kezelt csoportban a gén expressziója döntően a léziók mennyiségére reagált. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t tyúk REV1 gén vizsgálatához. 14 napos takarmányszennyezés hatására a STER csoportban a gén el tudta végezni javító hatását, ami a léziók számának és a génkifejeződés csökkenésében mutatkozott meg, míg az USTER és az AFLATOXIN csoportokban a gén kimerülését detektáltam. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t csirke BRCA2 gén vizsgálatához. A STER és az AFLATOXIN csoportban a gén expressziója a léziók mennyiségére reagált. Az USTER csoportban ez nem volt megfigyelhető. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t csirke MSH6 gén vizsgálatához. A STER csoportban a 7. napon következett be a gén aktiválódása, majd a 14. napra a léziók mennyiségét képes volt eliminálni. Az USTER és az AFLATOXIN csoportokban a 3. napon következett be az aktiválódás, ám ezt követően a gén kimerülését tapasztaltam. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t tyúk GADD45 α vizsgálatához. Az USTER és az AFLATOXIN csoportban a gén expressziója döntően a léziók mennyiségére reagált, a STER csoportban ez nem volt megfigyelhető. Sikeresen terveztem, majd optimalizáltam rtPCR-t tyúk XPA gén vizsgálatához. Az USTER és az AFLATOXIN csoportokban a 3. napon következett be az aktiválódás, ám ezt követően a gén kimerülését tapasztaltam. A STER csoportban nem következett be a gén aktiválása.

A szövettani vizsgálatok során az általam alkalmazott kezelés hatására az aflatoxin B1 nagyobb mértékű elváltozásokat okozott a szterigmatocisztinhez képest. A természetesen termeltetett és a mesterségesen előállított szterigmatocisztin hasonló mértékű elváltozásokat okozott.

Eredményeim alapján elmondható, hogy a comet assay kivitelezése, illetve kiértékelése számos esetben akadályba ütközik, míg az általam adaptált LORD-Q PCR eljárás gyors, objektívebb és kiértékelése egységes. A pontyon LORQ-PCR módszerrel végzett vizsgálataim rámutatott arra, hogy a DON és a T-2 mikotoxinok DNS léziókat alakítanak ki 1-2 hetes expozíció alatt, ám e terhelés a 3. héten már nem képes szignifikáns mértékben hatni a DNS-re. Ennek hatterében a DNS károsodás hatására működésbe lépő DNS javító mechanizmusok állhatnak, ennek bizonyításához szükséges további DNS javító gének vagy fehérjék vizsgálata.

Az aflatoxin B1, illetve a szterigmatocisztin 10-szeres hatáskülönbsége valószínűsíthető a pontyban kapott eredményeim alapján. E két mikotoxin rövid távon is képes hatni a DNS javító génekre, döntően a 24. órát követően következett be az általam vizsgált gének aktiválódása (OGG1, HSP70, p53, GADD45AA). OGG1, p53 és GADD45AA gének esetében interakció volt megfigyelhető.

Az aflatoxin B1, illetve a szterigmatocisztin 10-szeres hatáskülönbsége valószínűsíthető a csirkében kapott eredményeim alapján is. Mindkét mikotoxin megnöveli a DNS léziók mennyiségét, hatása időben elnyújtottnak mondható, a 14 napos időintervallum végén a DNS javító gének kimerülése jellemző. A DNS károsodás mértékét az általam vizsgált DNS javító gének (RAD51, REV1, BRCA2, MSH6, GADD45AA) expressziója döntően követte. Egyes gének között kapcsoltság is mutatkozott (RAD51, REV1, MSH6, BRCA2).

8. SUMMARY

Mycotoxins, are secondary metabolites of microscopic fungi, can be found in the area of agricultural fields, nutrition and feeding. The literature about their effects are widespread like degradation of performance and other non-specific symptoms in farm animals. The well-known effect of mycotoxins (T-2, DON, aflatoxin and sterigmatocystin) is oxidative stress but little is known about its connection with DNA damage. The DNA repair mechanisms are responsible for the specific repair of DNA damages with several pathways. Little information is available about the relationship between DNA damage and DNA repair mechanisms, therefore these processes should be investigated together to get accurate information in the molecular level.

The purpose of my doctoral research was to estimate the DNA damaging effect of DON, T-2, aflatoxin B1 and sterigmatocystin mycotoxins in common carp and of T-2, aflatoxin B1 and sterigmatocystin mycotoxins in chicken. Therefore, my further aim was to adapt and apply an objective, rapid PCR based method for both species and compare the application of it with comet assay in chicken species after the adaptation. Moreover, my purpose was to evaluate the change of the DNA repair mechanisms in the case of mycotoxin contamination. For this reason, I selected DNA repair genes for common carp and chicken species, the real-time PCR reactions were optimized and the most perfect housekeeping gene was identified. In chicken species, my further goal was to detect the liver pathology changes by aflatoxin B1 and sterigmatocystin.

I successfully adapted the comet assay for chicken liver cells and determined the optimal 1:100 cell density. It was found that the T-2/HT-2 mycotoxins have DNA damaging effect in the level of 0.215 mg T2+HT-2/ feed kg by software or visual evaluation. The utilisation of different evaluation methods can be beneficial to get accurate results in the case of comet assay.

I optimized and adapted the LORD-Q PCR technique for common carp and chicken species. In common carp, the number of lesions increased by DON and T-2 mycotoxins, however decreasing trend was found in time. In chicken, the aflatoxin B1, the sterigmatocystin and the pure sterigmatocystin could increase the number of DNA lesions, but the results did not show an obvious trend in time.

In common carp, in the aflatoxin B1 group (0.4 mg/body kg) the OGG1 gene was activated, inhibition was found in the Ster1 (1 mg/body kg) group after 24 hours. In Ster2 (2 mg/body kg) group, there was no change in gene expression, however in Ster4 (4 mg/body kg) the expression of OGG1 gene showed increasing trend over time. The activation of HSP70 gene was detected at hour 24 in the aflatoxin B1 group. In the Ster4 group, the HSP70 gene activated at hour 16, then a significant expression decrease was found at hour 24. The expression of HSP70 gene was decreased in the other two sterigmatocystin groups (Ster1 and Ster2) at hour 16. I successfully designed and optimized rtPCR method to detect p53 gene expression. In the aflatoxin B1 group the activation of p53 gene expression was determined at hour 24. In the Ster4 group, increasing trend was found in the case of p53 gene expression in time, however an opposite trend was detected in Ster1 and Ster2 groups. I successfully designed and optimized rtPCR method to measure GADD45 α gene expression. In the aflatoxin B1 group, the GADD45 α gene expression increased in time, gene activation was found in the Ster2 and Ster4 groups just at hour 24.

I successfully designed and optimized rtPCR methods to measure chicken RAD51, REV1, BRCA2, MSH6, GADD45 α and XPA genes expression. The RAD51 gene expression in each group responded to the amount of DNA lesions. After the 14-day-long exposure, the DNA repair effect of REV1 gene was detected, because the lesion numbers and expression decreased. However, in the USTER and AFLATOXIN groups the depletion of REV1 gene was detected. The expression of BRCA2 gene responded to the number of DNA lesions in the STER and AFLATOXIN groups, in the USTER group this connection was not found. In the STER group, the activation of MSH6 gene expression was determined on day 7, then it could eliminate the number of lesions on day 14. In the case of XPA expression, there was no activation in STER group. In the USTER and AFLATOXIN groups, the activation of MSH6 and XPA genes was detected on day 3, then the depletion of the gene was found. The expression of GADD45 α gene

mostly responded to the amount of DNA lesions in the USTER and AFLATOXIN groups, in the STER group this relationship was not detected.

Major liver pathology changes were observed as an effect of aflatoxin B1 compare with sterigmatocystin. The natural sterigmatocystin and pure sterigmatocystin caused similar changes and lesions.

Based on my results, the usage and the evaluation of comet assay have several disadvantages, whereas the adapted LORD-Q PCR is a quick technique with objective evaluation. DON and T-2 mycotoxins can form DNA lesions during 1 or 2-week-long exposition, but can not affect to the DNS after 3 weeks in common carp. It seems to be because of the DNA repair mechanisms, so DNA repair genes or proteins should be measured in the future.

The ten times lower toxicity of sterigmatocystin compare to aflatoxin B1 was detected in common carp. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin can affect DNA repair genes. Activations of OGG1, HSP70, p53, and GADD45AA genes were detected mainly after 24 hours. Interaction were detected among the OGG1, p53 and GADD45AA genes.

The ten times lower toxicity of sterigmatocystin compared to aflatoxin B1 is probable based on my results in chicken. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin can increase the amount of DNA lesions, this effect is prolonged in time, after 14-day-long experiment the depletion of DNS repair genes was found. There was connection between the level of DNA damage and the expression of DNA repair genes (RAD51, REV1, BRCA2, MSH6, GADD45AA). RAD51, REV1, MSH6, BRCA2 genes showed interactions.

9. MELLÉKLETEK

9.1. M1: Irodalomjegyzék

1. Abd-Allah G. A., El-Fayoumi R. I., Smith J. M., Heckmann R. A., O'Neill K. L. (1999): A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 446(2): 181-188. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00181-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00181-3)
2. Abe T., Konishi T., Hirano T., Kasai H., Shimizu K., Kashimura M., Higashi K. (1995): Possible correlation between DNA damage induced by hydrogen peroxide and translocation of heat shock 70 protein into the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 206(2):548–555. doi: 10.1006/bbrc.1995.1078.
3. Abedi Z. H., Scott P. M. (1969): Detection of toxicity of aflatoxins, sterigmatocystin, and Other fungal toxins by lethal action on zebra fish larvae. *Journal of AOAC International*, 52(5): 963–969. doi:10.1093/jaoac/52.5.963
4. Adimoolam S., Ford J. M. (2003): p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair*, 2(9): 947–954. doi:10.1016/s1568-7864(03)00087-9.
5. Ali K. S. (2003): Stressválasz halakban: HSP70 és metallothionein gének azonosítása és expressziójuk vizsgálata pontyban (*Cyprinus carpio*). Doktori értekezés. Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biokémiai Tanszék.
6. Anthony E., Hinhorani M. (2003): Mismatch recognition-coupled stabilization of Msh2-Msh6 in an ATP-bound state at the initiation of DNA repair. *Biochemistry* 42(25): 682-7693. doi:10.1021/bi034602h.
7. Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Iravani M, Ashworth A, Silva A. (2006): p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep* 7: 219–224.
8. Atroshi F., Rizzo A., Biese I., Veijalainen P., Antila E., Westermarck T. (1997): T-2 toxin-induced DNA damage in mouse livers: the effect of pretreatment with coenzyme Q10 and [alpha]-tocopherol. *Mol. Aspects Med.* 18(Supplement 1), 255–258.
9. Augustyniak M., Orzechowska H., Kędziorski A., Sawczyn T., Doleżych B. (2014): DNA damage in grasshoppers' larvae – Comet assay in environmental approach *Chemosphere* 96, 180–187.
10. Awad W.A., Ghareeb K., Dadak A., Gille L., Staniek K., Hess M., Böhm J. (2012): Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. *Poultry Science* 91(3): 550-555. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01742>
11. Awad W.A., Ghareeb K., Dadak A., Hess M., Böhm J. (2014): Single and combined effects of deoxynivalenol mycotoxin and a microbial feed additive on lymphocyte dna damage and oxidative stress in broiler chickens. *Plos One* 9(6): e100907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088028>
12. Awad W.A., Hess M., Twaruzek M., Grajewski J, Kosicki R., Böhm J., Zentek. (2011): The impact of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on the health and performance of broiler chickens. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7996-8012. doi:10.3390/ijms12117996
13. Awad W.A., Ruhnau D., Hess C., Doupovec B., Schatzmayr D., Hess M. (2019): Feeding of deoxynivalenol increases the intestinal paracellular permeability of broiler chickens. *Arch Toxicol* 93: 2057–2064. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02460-3>

14. Ayed-Boussema I., Bouaziz C., Rjiba K., Valenti K., Laporte F., Bacha H., Hassen W. (2008): The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology in Vitro* 22 1671–1680. doi:10.1016/j.tiv.2008.06.016
15. Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A. R. (2009): DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research* 674, 101–108.
16. Bach J., Sampayo-Reyes A., Marcos R., Hernández A. (2014): Ogg1 genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposures. *Arch Toxicol* 88: 585–596. doi: 10.1007/s00204-013-1151-0
17. Bacou E., Walk C., Rider S., Litta G., Perez-Calvo E. (2021): Dietary oxidative distress: a review of nutritional challenges as models for poultry, swine and fish. *Antioxidants* 10(4): 525. <https://doi.org/10.3390/antiox10040525>
18. Balogh K., Kövesi B., Zándoki E., Kulcsár S., Ancsin Z., Erdélyi M., Dobolyi C., Bata-Vidács I., Inotai K., Szekeres A., Mézes M., Kukolya J. (2019): Effect of sterigmatocystin or aflatoxin contaminated feed on lipid peroxidation and glutathione redox system and expression of glutathione redox system regulatory genes in broiler chicken. *Antioxidants* 8(7): 201. <https://doi.org/10.3390/antiox8070201>
19. Barreto G., Schäfer A., Marhold J., Stach D., Swaminathan S. K., Handa V., Döderlein G., Maltry N., Wu W., Lyko F., Niehrs C. (2007): Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445(7128):671-5. doi: 10.1038/nature05515.
20. Barzilai A., Yamamoto K-I. (2004): DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 3(8–9): 1109-1115. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002>
21. Bedard L. L., Massey T. E. (2006): Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters* 241: 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.11.018>
22. Benitez-Buelga C., Vaclová T., Ferreira S., Urioste M., Inglada-Perez L., Soberón N., Blasco M. A., Osoria A., Benitez J. (2016): Molecular insights into the OGG1 gene, a cancer risk modifier in BRCA1 and BRCA2 mutations carriers. *Oncotarget*. 7(18): 25815–25825. doi: 10.18632/oncotarget.8272
23. Bensassi F., Golli-Bennour E. E., Abid-Essefi S., Bouaziz C., Hajlaoui M. R., Bacha H. (2009): Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Toxicology* 264(1-2): 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.020>
24. Boiteux S., Radicella J. P. (2000): The Human OGG1 Gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 377(1): 1–8. doi:10.1006/abbi.2000.1773
25. Bordin D. L., Lirussi L., Nielsen H. (2021): Cellular response to endogenous DNA damage: DNA base modifications in gene expression regulation. *DNA Repair* 99: 103051. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103051>
26. Bouaziz C., Sharaf el Dein O., Golli E. E., Abid-Essefi S., Brenner C., Lemaire C., Bacha H. (2008): Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*, 254: 19-28.
27. Böcker W., Rolf W., Bauch T., Müller W., Streffer C. (1999): Automated comet assay analysis. *Cytometry* 35: 134-14. in Miskolczi E. (2007): A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain. Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
28. Bravard A., Vacher M., Gouget B., Coutant A, de Boisferon F.H., Marsin S., Chevillard S., Radicella J.P. (2006): Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress, *Mol. Cell Biol.* 26(20): 7430–7436.

29. Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhrer S., Speit G. (2005): The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20 (4) 245-254.
30. Brennan K. M., Oh S-Y., Yiannikouris A., Graugnard D. E., Karrow N. A. (2017): Differential gene expression analysis of bovine macrophages after exposure to the *Penicillium* mycotoxins citrinin and/or ochratoxin A. *Toxins* 9: 366. doi:10.3390/toxins9110366
31. Budzowska M., Graham T. G.W., Sobock A., Waga S., Walter J. C. (2015): Regulation of the Rev1-pol ζ complex during bypass of a DNA interstrand cross-link. *EMBO J* 34: 1971-1985. <https://doi.org/10.15252/embj.201490878>.
32. Carusillo A., Mussolino C. (2020): DNA Damage: from threat to treatment. *Cells* 2020, 9(7): 1665. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>
33. Chang H-C., Tsai J-H., Guo Y. L., Huang Y-H., Tsai H-N., Tsai P-C., Huang W. (2003): Differential UVC-induced gadd45 gene expression in xeroderma pigmentosum cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305: 1109–1115.
34. Chaubey R.C. (2005) Computerized Image Analysis Software for the Comet Assay. In: Keohavong P., Grant S.G. (eds) *Molecular Toxicology Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 291. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-840-4:097>
35. Chaudhari M., Jayaraj R., Bhaskar A. S. B., Rao P. V. L. (2009): Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. *Toxicology* 262: 153–161.
36. Chen F., Nastasi A., Shen Z., Brenneman M., Crissman H., Chen D. J. (1997): Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutation Research/DNA Repair* 384(3): 205-211. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(97\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(97)00020-7).
37. Chevillard S., Radicella J. P., Levalois C., Lebeau J., Poupon M-F., Oudard S., Dutrillaux B., Boiteux S. (1998) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16: 3083-3086
38. Collins, A. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 26: 249-261.
39. Collins, A., Dusinská, M., Franklin, M., et al. (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Env. Mol. Mutagen.* 30, 139–146.
40. Collins A., Vettorazzi A., Azqueta A. (2020): The role of the enzyme-modified comet assay in in vivo studies. *Toxicology Letters*. 347: 58-68.
41. Dannenmann B., Lehle S., Lorscheid S., Huber S. M., Essmann F, Schulze-Osthoff K. (2017) Simultaneous quantification of DNA damage and mitochondrial copy number by long-run DNA-damage quantification (LORD-Q). *Oncotarget*, 8 (68): 112417-112425
42. Deng S.-X., Tian L.-X., Liu F.-J., Jin S.-J., Liang G.-Y., Yang, H.-J., Du Z.-Y., Liu Y.-J. (2010): Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* O. aureus) during long-term dietary exposure. *Aquaculture* 307: 233–240.
43. Deng Y., Qiu M., Wang Y., Wang R., Lu P., Sun L., Li X., Gooneratne R. (2019): Protective effect of antioxidant-enriched diets on T-2-toxin-induced damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 506: 341–349.
44. Desjardins S., Ouellette G., Labrie Y., Simard J., Durocher F. (2008): Analysis of GADD45A sequence variations in French Canadian families with high risk of breast cancer. *Journal of Human Genetics*, 53(6): 490–498. doi:10.1007/s10038-008-0276-0.
45. de Wind N., Dekker M., Claij N., Jansen L., van Klink Y., Radman M., Riggins G., van der Valk M., van't Wout K., te Riele H. (1999): HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. *Nature Genetics* 23: 359-362. doi:10.1038/15544.
46. Dizdaroglu M. (2012): Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327: 26-47.

47. Dobolyi Cs.; Sebők F., Varga J., Kocsubé S., Szigeti G., Baranyi N., Szécsi Á., Tóth B., Varga M., Kriszt B., Szoboszlai S., Krifaton Cs. Kukolya, J. (2013): Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Aliment.* 42: 451–459.
48. Donniger H., Clark J., Rinaldo F., Nelson N., Barnoud T., Schmidt M. L., Hobbing K. R., Vos M. D., Sils B., Clark G. J. (2015): The RASSF1A tumor suppressor regulates XPA-mediated DNA repair. *Mol Cell Biol* 35(1): 277–287. doi:10.1128/MCB.00202-14
49. Duan Y., Huang, S., Yang, J., Niu P., Gong Z., Liu X., Xin L., Currie R. W., Wu T. (2014): HspA1A facilitates DNA repair in human bronchial epithelial cells exposed to Benzo[a]pyrene and interacts with casein kinase 2. *Cell Stress and Chaperones* 19: 271–27. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0454-7>
50. Dumstorf C. A., Mukhopadhyay S., Krishnan E., Haribabu B., McGregor W. G. (2009): REV1 is implicated in the development of carcinogen-induced lung cancer. *Mol Cancer Res* 7(2): 247-254. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0399
51. Durdik M, Kosik P, Gursky J, Vokalova L, Markova E, Belyaev I. (2015) Imaging flow cytometry as a sensitive tool to detect low-dose-induced DNA damage by analyzing 53BP1 and gammaH2AX foci in human lymphocytes. *Cytometry A*, 87:1070–8.
52. Edelmann W., Umar A., Yang K., Heyer J., Kucherlapati M., Lia M., Kneitz B., Avdievich E., Fan K., Wong E., Crouse G., Kunkel T., Lipkin M., Kolodner R. D., Kucherlapati R. (2000): The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Research* 60(4): 803-807.
53. Edelbroch M. A., Kaliyaperumal S., Williams K. J. (2013): Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNS mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 743-744: 53-66. doi:10.1016/j.mrfmmm.2012.12.008.
54. Edelmann W., Yang K., Umar A., Heyer J., Lau K., Fan K., Liedtke W., Cohen P. E., Kane M. F., Lipford J. R., Yu N., Crouse G. F., Pollard J. W., Kunkel T., Lipkin M., Kolodner R., Kucherlapati R. (1997): Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* 91(4): 467-477. doi:10.1016/S0092-8674(00)80433-X.
55. Edwards J. G. (2009): Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) damage and error rates by real-time QPCR. *Mitochondrion* 9:31–35.
56. El-Gendy A. H., Augustyniak M., Toto N. A., Al Farraj S., El-Samad L. M. (2020): Oxidative stress parameters, DNA damage and expression of HSP70 and MT in midgut of *Trachyderma hispida* (Forskål, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae) from a textile industry area. *Environmental Pollution* 267: 115661. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115661>
57. Engin A. B., Engin A. (2019): DNA damage checkpoint response to aflatoxin B1. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 65: 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.12.006>
58. Erel Y., Yazici N., Özvata S., Erçin, D., Çetinkaya N. (2009): Detection of irradiated quail meat by using DNA comet assay and evaluation of comets by image analysis. *Radiation Physics and Chemistry* 78: 776-781.
59. Eriksen G, Pettersson, H. (2004): Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114: 205–239.
60. Evans S. O., Jameson M. B., Curson R. T. M., Peters L. M., Bird S., Jacobson G. M. (2016): Development of a qPCR method to measure mitochondrial and genomic DNA damage with application to chemotherapy-induced DNA damage and Cryopreserved cells. *Biology* 5(4) 39. doi:10.3390/biology5040039
61. Faisal Z., Vörös V., Fliszár-Nyúl E., Lemli B., Kunsági-Máté S., Csepregi R., Kőszegi T., Zsila F., Poór M. (2020): Probing the interactions of ochratoxin B, ochratoxin C, patulin, deoxynivalenol, and T-2 toxin with human serum albumin. *Toxins* 12(6): 392. <https://doi.org/10.3390/toxins12060392>

62. Fan W., Luo J. (2010): SIRT1 Regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Molecular Cell* 39(2): 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.006>.
63. Fenech M. (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 392(1–2) 11-18. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00041-4)
64. Fernández-Blanco C., Elmo L., Waldner T., Ruiz M-J. (2018): Cytotoxic effects induced by patulin, deoxynivalenol and toxin T2 individually and in combination in hepatic cells (HepG2). *Food and Chemical Toxicology* 120: 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.019>
65. Fodor J., Németh M., Kametler L., Pósa R., Kovács M., Horn P. (2006): Novel methods of Fusarium toxins' production for toxicological experiments. *Acta Agr. Kaposvár.* 10: 277-285.
66. Ford J. M. (2005): Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 577(1-2): 195–202. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.04.005
67. Fradet-Turcotte A., Sitz J., Grapton D., Orthwein A. (2016): BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization. *Endocrine-Related Cancer* 23, T1–T17.
68. Frankič T., Pajk T., Rezar V., Levart A., Salobir J. (2006): The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1838-1844.
69. Gabel S. A., DeRose E. F., London R. E. (2013): XRCC1 interaction with the REV1 C-terminal domain suggests a role in post replication repair. *DNA Repair* 12(12): 1105-1113. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.08.015>.
70. Gacem M. A., Gacem H., Telli A., Ould El Hadj Khelil A. (2020): Mycotoxin-induced toxicities and diseases. *Nanomycotoxicology, Synthesis, toxicity and management* 117–154. doi:10.1016/b978-0-12-817998-7.00006-9.
71. Gachechiladze M., Škarda J., Soltermann A., Joerger M. (2017): RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies. *International Journal of Cancer* 141: 1286-1294. <https://doi.org/10.1002/ijc.30764>.
72. Galati S., Boni C., Gerra M. C., Lazzaretti M., Buschini A. (2019): Autophagy: a player in response to oxidative stress and DNA damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 5692958, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2019/5692958>
73. Gao W., Jiang L., Ge L., Chen M., Geng C., Yang G., Li Q., Ji F., Yan Q., Zuo Y, Zhong L., Liu X. (2015): Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicology in Vitro*, 29(1): 1-7.
74. García-Medina S., Núñez-Betancourt J. A., García-Medina A.L., Galar-Martínez M., Neri-Cruz N., Islas-Flores H., Gómez-Oliván L. M. (2013): The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminium levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96: 191-197.
75. Gedik C. M., Ewen S. W. B., Collins A. R. (1992): Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells *International Journal of Radiation Biology* 62, 313-320.
76. Gildemeister O. S., Sage J. M., Knight K. L. (2009): Cellular Redistribution of Rad51 in Response to DNA Damage NOVEL ROLE FOR Rad51C. *Journal of Biological Chemistry* 284(46): 31945-31952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024646>.
77. Gonzalez-Hunt C. P., Wadhwa M., Sanders Laurie H. (2018): DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology* 7:87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.001>
78. Gorman J., Chowdhury A., Surtees J. A., Shimada J., Reichman D. R., Alani E., Greene E. C. (2007): Dynamic basis for one dimensional DNS scanning by the mismatch repair complex Msh2-Msh6. *Molecular Cell* 28(9): 359-370. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.008.

79. Grasl-Kraupp B., Ruttkey-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W., Schulte-Hermann R. (1995): In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21 (5): 1465-8.
80. Grombacher T., Eichhorn U., Kaina B. (1998): p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene* 17: 845–851.
81. Gudmundsdottir K., Ashworth A. (2006): The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 25: 5864–5874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209874>.
82. Guindon K. A., Bedard L. L., Massey T. E. (2007a). Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from Isolated Mouse Lung Cells following In Vivo Treatment with aflatoxin B1. *Toxicol. Sci* 98(1): 57-62.
83. Guindon-Kezis, K. A., Mulder J. E., Massey T. E. (2014): In vivo treatment with aflatoxin B1 increases DNA oxidation, base excision repair activity and 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 levels in mouse lung. *Toxicology* 321: 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.004>
84. Guo C., Tang T-S., Bienko M., Parker J. L., Bielen A. B., Sonoda E., Takeda S., Ulrich H. D., Dikic I., Friedberg E. C. (2006): Ubiquitin-binding motifs in rev1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* 26(23): 8892–8900. doi:10.1128/MCB.01118-06.
85. Gursoy-Yuzugullu, O., Yuzugullu, H., Yilmaz, M., & Ozturk, M. (2011). Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation. *Liver International*, 31(4), 561–571. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02474.x
86. Gyóri B. M., Venkatachala G., Thiagarajan P.S., Hsu D., Clement M-V. (2014) OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>
87. Hafner D., Bodnár Zs., Horvatovich K., Berta G., Kovács M. (2012): Preliminary investigations into the effect of feeding mannan oligosaccharide (MOS) on the genotoxic effect of T-2 toxin in rabbits measured by comet assay *Acta agriculturae Slovenica*, 3, 351–355.
88. Hah D. S., Heo J. H., Lee K. C., Cho M. H., Kim K. H., Kim C. H., Leu J. D., Lee S. H., Kim G. S., Kim E. G., Kim J. S. (2006): Assessment of DNS damage using an alkaline single cell electrophoresis (SCGE) comet assay and toxic effects in chickens by T-2 toxin treatment. *J. Toxicol. Pub. Health* 22(2): 75-85.
89. Haines G. A., Hendry J. H., Daniel C. P., Morris I. A. (2002) Germ Cell and Dose-Dependent DNA Damage Measured by the Comet Assay in Murine Spermatozoa after Testicular X-Irradiation. *Biology of Reproduction* 67: 854–861 DOI 10.1095/biolreprod.102.004382
90. Hanif N. Q., Naseem M., Khatoon S., Malik N. (2006): Prevalence of mycotoxins in poultry rations. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 2006 49(2): 120-124.
91. Hassaan M. S., Nssar K. M., Mohammady E. Y, Amin A., Tayel S. I., El-Haroun E. R: (2020): Nano-zeolite efficiency to mitigate the aflatoxin B1 (AFB1) toxicity: Effects on growth, digestive enzymes, antioxidant, DNA damage and bioaccumulation of AFB1 residues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 523: 735123.
92. Heidtmann-Bemvenuti R., Mendes G. L., Scaglioni P.T., Badiale-Furlong E., Souza-Soares L. A. (2011): Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. *African Journal of Food Science* 5(16): 861-869. DOI: 10.5897/AJFSX11.009
93. Helma C., Uhl M. (2000) A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis comet/ assay. *Mutation Research* 466: 9–15.

94. Helton E. S., Chen, X. (2007): p53 modulation of the DNA damage response. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100(4): 883–896. doi:10.1002/jcb.21091.
95. Hemnani T., Parihar M. S. (1998): Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol* 42(4): 440-452.
96. Hermes E., Ferencz, Á. (2009): Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (gpx4) genes in common carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(1): 101–106. doi:10.1016/j.cbpc.2009.03.007
97. Hildesheim J., Fornace A. J. (2002): Gadd45a: an elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* (8):2475-9.
98. Hirano Y., Sugimoto K. (2006): ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase ζ -Rev1 Complex with regions near a Double-Strand Break. *Current Biology* 16(6): 586-590. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.063>.
99. Hollander M. C., Kovalsky O., Salvador J. M., Kim K. E., Patterson A. D., Haines D. C., Fornace A. J. (2001): Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased dna repair and increased mutation frequency. *Cancer Research* 61: 2487–249.
100. Horvatovich K., Hafner D., Bodnár Zs, Berta G., Hancz Cs., Dutton M., Kovács M. (2013): Dose-related genotoxic effect of T-2 toxin measured by comet assay using peripheral blood mononuclear cells of healthy pigs *Acta Veterinaria Hungarica* 61 (2), 175–186.
101. Hsu T., Tsai H-T., Huang K-M., Luan M-C., Hsieh C-R. (2010): Sublethal levels of cadmium down-regulate the gene expression of DNA mismatch recognition protein MutS homolog 6 (MSH6) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere* 81(6): 748-754. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.014>
102. Huang B., Chen Q., Wang L., Gao X., Zhu W., Mu P., Deng Y. (2020): Aflatoxin B1 induces neurotoxicity through reactive oxygen species generation, DNA damage, apoptosis, and s-phase cell cycle arrest. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 6517. doi:10.3390/ijms21186517
103. Hudson E. K., Hogue B., Souza-Pinto N., Croteau D. L., Anson R. M., Bohr V. A., Hansford, R. G. (1998) Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic. Res.* 29: 573–579.
104. Huff W. E., Harvey R. B., Kubena L. F., Rottinghaus G. E. (1988a): Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science* 67(10): 1418-1423. <https://doi.org/10.3382/ps.0671418>
105. Huff W. E., Kubena L. F., Harvey R. B., Doerr J. A. (1988b): Mycotoxin Interactions in Poultry and Swine. *Journal of Animal Science* 66(9): 2351. doi:10.2527/jas1988.6692351x
106. Hunt C. R., Dix D. J., Sharma G. G., Pandita R. K., Gupta A., Funk M., Pandita T. K. (2004): Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2):899–911. DOI: 10.1128/MCB.24.2.899–911.2004.
107. Ide F., Iida N., Nakatsuru Y., Oda H., Tanaka K., Ishikawa T. (2000): Mice deficient in the nucleotide excision repair gene XPA have elevated sensitivity to benzo[a]pyrene induction of lung tumors. *Carcinogenesis* 21(6): 1263–1265. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.5.263>
108. Jee H. (2016): Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *Journal of Exercise Rehabilitation* 12(4): 255-259. <http://dx.doi.org/10.12965/jer.1632642.321>
109. Jena N. R. (2012): DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37 (3): 503-517.
110. Jena N. R., Mishra P. C. (2012): Formation of ring-opened and rearrange products of guanine: mechanisms and biological significance. *Free Radical Biol. Med.* 53: 81-94.
111. Jia R., Cao L-P., Du J-L., Liu Y-J., Wang J-H., Jeney G., Yin G-J. (2014): Grass carp reovirus induces apoptosis and oxidative stress in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) kidney cell line. *Virus Research* 185 77–81.

112. Johansson, P., Fath, A., Ek, T., Hammarsten, O. (2016) Validation of a flow cytometry-based detection of γ -H2AX, to measure DNA damage for clinical applications. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 92(6), 534–540. doi:10.1002/cyto.b.21374
113. Juránek I., Nikitovic D., Kouretas D., Hayes A. W., Tsatsakis A. M. (2013): Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 61: 240–247.
114. Kalantari H., Moosavi M. (2010): Review of T-2 toxin. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 5(1): 26-38
115. Kciuk, M., Bukowski, K., Marciniak, B., Kontek, R. (2020): Advances in DNA repair—emerging players in the arena of eukaryotic DNA repair. *Int. J. Mol. Sci.* 21(11): 3934. <https://doi.org/10.3390/ijms21113934>
116. Kenny M. K., Mendez F., Sandigursky M., Kureekattil R. P., Goldman J. D., Franklin W. A., Bases R. (2001): Heat Shock Protein 70 binds to human apurinic/aprimidinendonuclease and stimulates endonuclease activity at abasic sites. *The Journal of Biological Chemistry* 272(2): 9532-9536. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009297200>.
117. Kent C. R., Eady J. J., Ross G. M., Steel G. G. (1995): The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay *International Journal of Radiation Biology* 67(6):655-60.
118. Kim Y. J., Kim H-J., Kim H. L., Kim H. J., Kim H. S., Lee T. R., Shin D. W., Seo Y. R. (2017): A protective mechanism of visible red light in normal human dermal fibroblasts: enhancement of GADD45A-mediated DNA repair activity. *Journal of Investigative Dermatology* 13: 466e474. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.041>.
119. Klaude M., Erikson S., Nygren J. and Ahnström G. (1996): The comet assay: mechanism and technical consideration *Mutation Research* 363, 89-96.
120. Klein H. L. (2008): The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA REPAIR* 7: 686–693. doi:10.1016/j.dnarep.2007.12.008
121. Kloeber J. A., Zhenkun L. (2021): Critical DNA damaging pathways in tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology* Available online, In Press, Corrected Proof. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.04.012>
122. Ko Y. A. (2016): Differential effects of organic versus inorganic selenium species on BRCA1-mutated and non-mutated breast cancer cell lines (Thesis, Master of Science (Research) (MSc(Research))). University of Waikato, Hamilton, New Zealand. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10289/11475>
123. Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Sofuni T. (1995): A comparison between manual microscopic analysis and the computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay *MMS Commun* 3: 103-115. in Miskolczi E. (2007): *A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.*
124. Kopera E., Schwerdtle T., Hartwig A., Bal W. (2004): Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 17(11): 1452-1458. <https://doi.org/10.1021/tx049842s>
125. Kotoglou P., Kalaitzakis, A., Vezyraki, P., Tzavaras T., Michalis L. K., Dantzer F., Jung J. U., Angelidis C. (2009): Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress and Chaperones* 14: 391–406. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0093-6>.
126. Kócsó D. J., Ali O., Kovács M., Mézes M., Balogh K., Kachlek M. L., Bóta B., Zeebone Y. Y., Szabó A. (2021): A preliminary study on changes in heat shock protein 70 levels induced by *Fusarium* mycotoxins in rats: in vivo study. *Mycotoxin Research* Published online 04 March 2021. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00425-z>

127. Königs M., Mulac D., Schwerdt G., Gekle M., Humpf H-U. (2009): Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology*, 258: 106-115.
128. Kövesi B., Pelyhe Cs, Zándoki E., Mézes M., Balogh K (2018): Changes of lipid peroxidation and glutathione redox system, and expression of glutathione peroxidase regulatory genes as effect of short-term aflatoxin B1 exposure in common carp. *Toxicon* 144: 103-108.
129. Kövesi B., Pelyhe Cs., Zándoki E., Mézes M., Balogh K. (2020): Combined effects of aflatoxin B1 and deoxynivalenol on the expression of glutathione redox system regulatory genes in common carp. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 104: 1531-1539. DOI: 10.1111/jpn.13343
130. Kubena L. F., Huff W. E., Harvey R. B., Phillips T. D., Rottinghaus G. E. (1989): Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Science* 68(5): 622-626. <https://doi.org/10.3382/ps.0680622>
131. Kumaravel T. S., Vilhar B., Faux S. P., Jha A. N. (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* (2009) 25:53–64
132. Kumari S., Rastogi R. P., Singh K. L., Singh S. P., Sinha R. P. (2008): DNS damage: detection strategies *EXCLI Journal* 7, 44-62.
133. Laurini E., Marson D., Fermeglia A., Aulic S., Fermeglia M., Prici S. (2020): Role of Rad51 and DNA repair in cancer: A molecular perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 208: 107492. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107492>.
134. Lawrence C. W. (2004): Cellular Functions of DNA Polymerase ζ and Rev1 Protein. *Advances in Protein Chemistry* 69: 167-203. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)69006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)69006-1).
135. Leadon S.A., Tyrrell R. M., Cerutti P.A. (1981): Excision repair of aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. *American Association for Cancer Research* 41(12): 5125-5129.
136. Leal M., Shimada A., Ruíz F., González de Mejía E. (1999): Effect of lycopene on lipidperoxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicology Letters*, 109: 1-10.
137. Lee H. (2014): Cycling with BRCA2 from DNA repair to mitosis. *Experimental Cell Research*. 329(1): 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.10.008>.
138. Lehle S., Hildebrand D. G., Merz B., Malak P. N., Becker M. S., Schmezer P., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Rothfuss O. (2014): LORD-Q: a long-run real-time PCR-based DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis. *Nucleic Acids Research*. 42(6): e41 doi:10.1093/nar/gkt1349
139. Li D., Ye Y., Deng L., Ma H., Fan X, Zhang Y., Yan H., Deng X., Li Y., Ma Y. (2013): Gene expression profiling analysis of deoxynivalenol-induced inhibition of mouse thymic epithelial cell proliferation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 557–566. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.002>
140. Li L., Elledge S. J., Peterson C. A., Bales E. S., Legerski R. J. (1994): Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(11): 5012-5016. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.5012>.
141. Li X., Heyer W-D. (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18: 99–113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>.
142. Li Y., Wang Z., Beier R. C., Shen J., Smet D. D., De Saeger S., Zhang S. (2011): T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical

- Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(8): 3441–3453. doi:10.1021/jf200767q
143. Li Z., Zilberman Y., Lu Q.-B., Tang X. (2019): Electrochemical methods for probing DNA damage mechanisms and designing cisplatin-based combination chemotherapy. *Biotechniques* 66(3): 135-142.
 144. Lian H., Cui J., Wang Y., Liu J., Wang J., Shen H., Xing L., Wang J., Yan X., Zhang X. (2014): Downregulation of Rad51 participates in OTA-induced DNA double-strand breaks in GES-1 cells in vitro. *Toxicology Letters* 226(2): 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.002>
 145. Linke S. P., Sengupta S., Khabie N., Jeffries B. A., Buchhop S., Miska S., Henning W., Pedoux R., Wang X. W., Hofseth L. J., Yang Q., Garfield S. H., Stürzbecher H-W., Harris C. C. (2003): p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* 63: 2596–2605.
 146. Liu W., Wang L., Zheng C., Liu L., Wang J., Li D., Tan Y., Zhao X., He L., Shu W. (2018): Microcystin-LR increases genotoxicity induced by aflatoxin B1 through oxidative stress and DNA base excision repair genes in human hepatic cell lines. *Environmental Pollution*, 233: 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.067>.
 147. Liu Y., Du M., Zhang G. (2014): Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicology Reports* 1: 1076–1086. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.016>
 148. Liu Y., West S. C. (2001): Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res* 4, 9. <https://doi.org/10.1186/bcr417>.
 149. Mackei M., Orbán K., Molnár A., Pál L., Dublicz K., Husvéth F., Neogrády Zs., Mátis G. (2020): Cellular effects of T-2 toxin on primary hepatic cell culture models of chickens. *Toxins* 12(46): 1-14. doi:10.3390/toxins12010046
 150. Maiti A K., Boldogh I., Spratt H., Mitra S., Hazra T. K. (2008): Mutator phenotype of mammalian cells due to deficiency of NEIL1 DNA glycosylase, an oxidized base-specific repair enzyme. *DNA Repair (Amst)* 7:1213-1220.
 151. Maresca L., Lodovichi S., Lorenzoni A., Cervelli T., Monaco R., Spugnesi L., Tancredi M., Falaschi E., Zavaglia K., Landucci E., Roncella M., Congregati C., Gadducci A., Naccarato A. G., Caligo M. A., Galli A. (2018): Functional interaction between BRCA1 and DNA repair in yeast may uncover a role of RAD50, RAD51, MRE11A, and MSH6 somatic variants in cancer development. *Frontiers in Genetics* 9:397. doi:10.3389/fgene.2018.00397.
 152. Marijani E., Wainaina J. M., Charo-Karisa H., Nzayisenga L., Munguti J., Gnonlonfin G. J. B., Kigadye E., Okoth S. (2017): Mycoflora and mycotoxins in finished fish feed and feed ingredients from smallholder farms in East Africa. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 43(2): 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.07.001>
 153. Massey T. E., Stewart R. K., Daniels J. M., Liu L. (1995): Biochemical and Molecular Aspects of Mammalian Susceptibility to Aflatoxin B1 Carcinogenicity. *Experimental Biology and Medicine* 208(3): 213–227. doi:10.3181/00379727-208-43852a
 154. Matejova I., Faldyna M., Modra H., Blahova J., Palikova M., Markova Z., Franc A., Vicenova M., Vojtek L., Bartonkova J., Sehonova P., Hostovsky M., Svobodova Z. (2017): Effect of T-2 toxin-contaminated diet on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish. Shellfish Immunol.* 60: 458–465.
 155. Matés J. M., Sánchez-Jiménez F. M. (2000): Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32: 157-170.

156. Mendez F., Kozin E., Bases R. (2003): Heat shock protein 70 stimulation of the deoxyribonucleic acid base excision repair enzyme polymerase beta. *Cell Stress and Chaperones* 8(2):153-61. DOI: 10.1379/1466-1268(2003)008<0153:HSPSOT>2.0.CO;2.
157. Mendez F., Sandigursky M., Franklin W. A., Kenny M. K., Kureekattil E., Bases R. (2000): Heat-shock proteins associated with base excision repair enzymes in HeLa cells. *Radiat Res* 153(2): 186–195. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0186:HSPAWB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0186:HSPAWB]2.0.CO;2).
158. Mer G., Bochkarev A., Gupta R., Bochkareva E., Frappier L., Ingles C. J., Edwards A. M., Chazin W. J. (2000): Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA. *Cell* 103(3): 449-456. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00136-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00136-7).
159. Mestier L., Couvelard A., Blazevic A., Hentic O., de Herder W. W., Rebours V., Paradis V., Ruszniewski P., Hofland L. J., Cros J. (2020): Critical appraisal of MGMT in digestive NET treated with alkylating agents. *Endocrine-Related Cancer* 27: R391–R405. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0227>.
160. Migheli A., Attanasio A., Schiffer D. (1997): Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neuronal cells by in situ end-labelling techniques *The Journal of Pathology*, Volume 176, Issue 1, 27-35.
161. Milner, A. E., Vaughan, A. T. M., & Clark, I. P. (1987) Measurement of DNA Damage in Mammalian Cells Using Flow Cytometry. *Radiation Research*, 110(1): 108-117. doi:10.2307/3576888
162. Miskolczi E. (2007): A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
163. Missura M., Buterin T., Hindges R., Hübscher U., Kaspárková J., Brabec V., Naegeli H. (2001): Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA–RPA: an architectural function in DNA repair. *EMBO J* 20: 3554-3564. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.13.3554>
164. Moradi S., Azari H., Anarkooli I. J., Qasemi-Panahi B., Elhami S., Forouharmehr A. (2015): Effect of aflatoxin B1 on BRCA1 and BRCA2 genes expression under in vitro cultured cell line of normal Human Mammary Epithelial Cells (HMEC). *Journal of Police Medicine* 3(4): 211-220.
165. Moss M. O. (2002): Mycotoxin review – 2. Fusarium. *Mycologist*, 16(04): 158-161. doi:10.1017/s0269915x02004135
166. Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgül, S., Golubnitschaja, O., Flammer J. (2008) Comet assay analysis of single–stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Molecular Vision* 2008; 14:1584-1588.
167. Mráz J. (2012): Lipids in common carp (*Cyprinus Carpio*) and effects on human health. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science, Uppsala.
168. Mulder J. E., Bondy G. S., Mehta R., Massey T. E. (2014): Up-regulation of nucleotide excision repair in mouse lung and liver following chronic exposure to aflatoxin B1 and its dependence on p53 genotype. *Toxicol Appl Pharmacol* 275: 96–103.
169. Mulder J. E., Turner P. V., Massey T. E. (2015) Effect of 8-oxoguanine glycosylase deficiency on aflatoxin B1 tumourigenicity in mice. *Mutagenesis*, 30(3) 401–409. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu087>
170. Murthy S. K., Demetrick D. J. (2006): New approaches to fluorescence in situ hybridization *Methods Mol Biol* 319, 237-59.

171. Murugesan G. R., Ledoux D. R., Naehrer K., Berthiller F., Applegate T. J., Grenier B., Phillips T. D., Schatzmayr G. (2015): Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry Science* 94(6): 1298-1315. <https://doi.org/10.3382/ps/pev075>
172. Mustafa S. A., Karieb S. S., Davies S. J., Jha A. N. (2015) Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. *Mutagenesis*, 30: 107–116. doi:10.1093/mutage/geu048
173. Nadin S. B., Vargas-Roig L. M., Drago G., Ibarra J., Ciocca D. R. (2007): Hsp27, Hsp70 and mismatch repair proteins hMLH1 and hMSH2 expression in peripheral blood lymphocytes from healthy subjects and cancer patients. *Cancer Letters*, 252(1): 131-146. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.028>.
174. Nagashima M., Fujikawa C., Mawatari K., Mori Y., Kato S. (2011): HSP70, the earliest-induced gene in the zebrafish retina during optic nerve regeneration: Its role in cell survival. *Neurochem. Int.* 58, 888–895.
175. Nakade M., Pelyhe Cs., Kövesi B., Balogh K., Kovács B., Szabó-Fodor J., Zándoki E., Mézes M., Erdélyi M. (2018): Short-term effects of T-2 toxin or deoxynivalenol on glutathione status and expression of its regulatory genes in chicken. *Acta Veterinaria Hungarica* 66(1): 28-39. <https://doi.org/10.1556/004.2018.004>
176. Niehrs C., Schäfer A. (2012): Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends in Cell Biology*, 22(4): 220–227. doi:10.1016/j.tcb.2012.01.002.
177. Nieto C. H. D., Granero A. M., Zon, M. A., Fernández H. (2018): Sterigmatocystin: a mycotoxin to be seriously considered. *Food Chem. Toxicol.* 118: 460–470. doi: 10.1016/J.FCT.2018.05.057
178. Nikolai S., Rossi A., Di Daniele N., Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M., Rachellá G. (2015): DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging (Albany NY)*. 7(12): 1050–1065. doi: 10.18632/aging.100858.
179. Nikolova T., Marini F., Kaina B. (2017) Genotoxicity testing: Comparison of the H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.07.004>
180. Niranjana B. G., Bhat N. K., Avadhani N. G. (1982): Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. *Science* 215(4528): 73-75. doi:10.1126/science.6797067
181. Offer H., Erez N., Zurer I., Tang X., Milyavsky M., Goldfinger N., Rotter V. (2002): The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*, 23(6):1025–1032, <https://doi.org/10.1093/carcin/23.6.1025>.
182. Offer H., Wolkowicz R., Matas D., Blumenstein S., Livneh Z., Rotter V. (1999): Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* 450: 197–204.
183. Okada T., Sonoda E., Yoshimura M., Kawano Y., Saya H., Kohzaki M., Takeda S. (2005): Multiple roles of vertebrate REV genes in DNA repair and recombination. *Molecular and Cellular Biology* 25(14): 6103–6111. DOI: 10.1128/MCB.25.14.6103-6111.2005
184. Olive P. L. (1989): Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids *Radiation Research* 117. 79-92.
185. Olive P. L., Banáth J. P. (2006): The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1(1): 23-29. doi:10.1038/nprot.2006.5

186. Orelli B., McClendon T. B., Tsodikov O. V., Ellenberger T., Niedernhofer L. J., Schäfer O. D. (2010): The XPA-binding domain of ERCC1 is required for nucleotide excision repair but not other DNA repair pathways. *Journal of Biological Chemistry* 285(6): 3705-3712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067538>
187. Osselaere A., Li S. J., De Bock L., Devreese M., Goossens J., Vandenbroucke V., Van Bocxlaer J., Boussery K., Pasmans F., Martel A., De Backer P., Croubels S. (2013): Toxic effects of dietary exposure to T-2 toxin on intestinal and hepatic biotransformation enzymes and drug transporter systems in broiler chickens *Food and Chemical Toxicology* 55: 150–155.
188. Patenge N. (2017): Quantification of DNA Damage and Repair in Mitochondrial, Nuclear, and Bacterial Genomes by Real-Time PCR. In: Didenko V. (eds) *Fast Detection of DNA Damage*. *Methods in Molecular Biology*, vol 1644. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7187-9_14
189. Patil R. D., Sharma R., Asrani R. K. (2014): Mycotoxicosis and its control in poultry: A review. *Journal of Poultry Science and Technology* 2(1): 1-10.
190. Paz-Elizur T., Sevilya Z., Leitner-Dagan Y., Elinger D., Roisman L., Livneh Z. (2009): DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: Potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett.* 266(1): 60–72. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.032.
191. Pelyhe Cs., Kövesi B., Zándoki E., Kovács B., Szabó-Fodor J., Mézesd M., Balogh K. (2016): Effect of 4-week feeding of deoxynivalenol- or T-2-toxin-contaminated diet on lipid peroxidation and glutathione redox system in the hepatopancreas of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Mycotoxin Res* 32: 77–83. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0242-1>
192. Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
193. Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509–515.
194. Pietrasik S., Zajac G., Morawiec J., Soszynski M., Fila M., Blasiak J. (2020): Interplay between BRCA1 and GADD45A and its potential for nucleotide excision repair in breast cancer pathogenesis. *J. Mol. Sci.* 21(3): 870. <https://doi.org/10.3390/ijms21030870>
195. Pietsch C. (2020): Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. *Mycotoxin Res* 36: 41–62. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00368-6>
196. Pietsch C., Bucheli T. D., Wettstein W. E., Burkhart-Holm P. (2011): Frequent biphasic cellular responses of permanent fish cell cultures to deoxynivalenol (DON). *Toxicology and Applied Pharmacology* 256(1): 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.07.004>
197. Pulzová L. B., Ward T. A., Chovanec M. (2020): XPA: DNA repair protein of significant clinical importance. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(6): 2182. <https://doi.org/10.3390/ijms21062182>
198. Purchase I. F. H., van der Watt J. J. (1970): Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Fd Cosmet. Toxicol.* 8: 289-295.
199. Pussemier L., Piérard J. Y., Anselme M., Tangni E. K., Motte J. C., Larondelle Y. (2006): Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Addit. Contam.* 23: 1208-1218.

200. Rezar V., Frankic T., Narat M., Levart A., Salobir J. (2007): Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86: 1155–1160.
201. Rizzo A. F., Atroshi F., Ahotupa M., Sankari S., Elovaara E. (1994): Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipidperoxidation induced by DON or T-2 toxin. *Zentralbl Veterinarmed A.* 41 (2): 81-90.
202. Rizzo A. F., Biese I., Veijalainen P., Antila E., Westermarck T., Atroshi F. (1998): Mycotoxins induced DNA oxidativedamage in rat liver cell. *Pathophysiol.* 5(Suppl.1), 81.
203. Rothfuss O., Gasser T., Patenge N. (2010): Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. *Nucleic Acids Research* 38(4):e24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1082>
204. Rothkamm K., Horn S. (2009) gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita,* 45:265–71.
205. Rubbi C. P., Milner J. (2003): p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 22: 975–986.
206. Salvador J. M., Brown-Clay J. D., Fornace A. J. (2013): Gadd45 in Stress Signaling, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Gadd45 Stress Sensor Genes, Adv Exp Med Biol* 793: 1–19. doi:10.1007/978-1-4614-8289-5_1
207. Saeki H., Siaud N., Christ N., Wiegant W. W., van Buul P. W., Han M., Zdzienicka M. Z., Stark J. M., Jasin M. (2006): Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *PNAS* 103(23): 8768-8773. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600298103>.
208. Sang F., Yang Y., Yuan L., Ren J., Zhang Z. (2015): Development of a high-throughput real time PCR based on a hot-start alternative for Pfu mediated by quantum dots. *Nanoscale* 38. DOI: 10.1039/c5nr03596a
209. Santacroce M. P., Conversano M. C., Casalino E, Lai O., Zizzadoro C., Centoducati G., Crescenzo G. (2008): Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Rev Fish Biol Fisheries* 18: 99–130. DOI 10.1007/s11160-007-9064-8
210. Santos J.H., Meyer J.N., Mandavilli B.S., Van Houten B. (2006) Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* 314: 183–199.
211. Schmidt J. G., Nielsen M. E. (2014): Expression of immune system-related genes during ontogeny in experimentally wounded common carp (*Cyprinus carpio*) larvae and juveniles. *Developmental and Comparative Immunology* 42: 186–196.
212. Schroeder H. W., Kelton W. H. (1975): Production of sterigmatocystin by some species of the genus *aspergillus* and its toxicity to chicken embryos. *Applied Microbiology* 30(4): 589-591.
213. Sengupta S., Harris C. C. (2005): p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 44–55.
214. Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR, Smith ML. (2002): Implication of p53 in base excision DNA repair: In vivo evidence. *Oncogene* 21: 731–737.
215. Shamoo Y. (2003): Structural insights into BRCA2 function. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(2): 206–211. doi:10.1016/s0959-440x(03)00033-2.
216. Sharma S., Canman C. E. (2012): REV1 and DNA polymerase zeta in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53(9): 725-740. <https://doi.org/10.1002/em.21736>.

217. Sharma S., Hicks J. K., Chute C. L., Brennan J. R., Ahn J-Y., Glover T. W., Canman C. E. (2012): REV1 and polymerase ζ facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Research* 40(2): 682–691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr769>.
218. Shen H-M., Ong C-N. (1996): Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutation Research* 366: 23-44.
219. Shen X., Jun S., O’Neal L. E., Sonoda E., Bemark M., Sale S. E., Li L. (2006): REV3 and REV1 play major roles in recombination-independent repair of DNA interstrand cross-links mediated by monoubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Journal of Biological Chemistry* 281(20): 13869-13872. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600071200>.
220. Shinmura K., Yokota J. (2001): The OGG1 Gene Encodes a Repair Enzyme for Oxidatively Damaged DNA and Is Involved in Human Carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(4): 597–609. doi:10.1089/15230860152542952
221. Shivastav N., Li D., Essigmann J. M. (2010): Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* 31: 59-70.
222. Shokri F., Heidari M., Gharagozloo S., Ghazi-Khansari M. (2000): In vitro inhibitory effects of antioxidants on cytotoxicity of T-2 toxin *Toxicology* 146: 171–176.
223. Simpson L. J., Sale J. E. (2003): Rev1 is essential for DNA damage tolerance and non-templated immunoglobulin gene mutation in a vertebrate cell line. *EMBO J* 22(7): 1654-1664. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg161>.
224. Singh R. (2020): Effect of dietary t-2 toxin on liveability, organ weights, immunity and histopathology of organs in broiler chickens. *Veterinary Research International* 8(3): 285-290.
225. Singh R., Park S., Koo J. S., Kim I. H., Balasubramanian B. (2020): Significance of varying concentrations of T-2 toxin on growth performance, serum biochemical and hematological parameters in broiler chickens. *J Anim Sci Technol* 62(4):468-474. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.4.468>
226. Sivakumar V., Thanislass J., Niranjali S., Deravaj H. (2001): Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. *Hum Exp Toxicol* 20(8): 398-403. doi: 10.1191/096032701682692955.
227. Sloan D. B., Broz A. K., Sharbrough J., Wu Z. (2018) Detecting rare mutations and DNA damage with sequencing-based methods. *Trends in Biotechnology*, 36(7):729-740. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.009>
228. Smith M. L., Chen I. T., Zhan Q., O’Connor P. M., Fornace A. J. Jr. (1995): Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*, 10(6):1053-1059.
229. Sokolovic M., Garaj-Vrhovac V., Ramic S., Simpraga B. (2007): Chicken nucleated blood cells as a cellular model for genotoxicity testing using the comet assay. *Food and Chemical Toxicology* 45: 2165-2170.
230. Solcan C., Gogu M., Floristean V., Oprisan B., Solcan G. (2013): The hepatoprotective effect of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries on induced aflatoxin B1 poisoning in chickens. *Poultry Science* 92(4): 966-974. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02572>
231. Somoskői B., Keresztes Zs., Solti L., Kovács M., Cseh S. (2012): A T-2 mikotoxin hatása egérembriók korai fejlődésére. *Magyar Állatorvosok Lapja* 134: 614-619.
232. Sottile M. L., Nadin S. B. (2018): Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. *Cell Stress Chaperones*. 23(3): 303–315. doi: 10.1007/s12192-017-0843-4
233. Souza-Pinto N. C., Eide L., Hogue B. A., Thybo T., Stevnsner T., Seeberg E., Klungland A., Bohr V. A. (2001): Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA

- depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Research* 61: 5378–5381
234. Sreemannarayana O., Frohlich A. A., Marquardt R. R. (1987): Acute toxicity of sterigmatocystin to chicks. *Mycopathologia* 97(1): 51–59. doi:10.1007/bf00437331
 235. Srinivas U. S., Tan B. W. Q., Vellayappan B. A., Jeyasekharan A. D. (2019): ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* 25: 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
 236. Szabó-Fodor J., Bóta B., Mihucz G., Sulyok M., Tenke J., Kovács M. (2020): Hazai sertéstakarmányok multi-mikotoxin szennyezettségének vizsgálata és az eredmények összehasonlítása 2016, 2017 és 2018-ban= Monitoring of multi-mycotoxin contamination of pig feeds and comparison of results in years 2016, 2017 and 2018. *Magyar Állatorvosok Lapja* 142(11): 689-701.
 237. Stoev S. D. (2015): Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39(2): 794–809. doi:10.1016/j.etap.2015.01.022
 238. Stolte E.H., Chadzinska M., Przybylska D., Flik G., Savelkoul H.F.J., Verburg-van Kemenade B.M.L. (2009): The immune response differentially regulates Hsp70 and glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 27: 9–16.
 239. Sugitari N., Sivley R. M., Perry K. E., Capra J.A., Chazin W. J. (2016): XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair. *DNA Repair* 44: 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.018>
 240. Svobodova Z., Piskac A. (1980): Effect of feeds with a low content of aflatoxin B1 on the health of carp (*Cyprinus carpio*). *Zivocisna Vyroba–UVTIZ* 25(11): 809–814.
 241. Tarsounas M., Davies A. A., West S. C. (2004): RAD51 localization and activation following DNA damage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1441): 87–93. doi:10.1098/rstb.2003.1368.
 242. Thacker J. (2005): The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Letters* 219(2): 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.018>.
 243. Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Mamee Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
 244. Tilton S. C., Gerwick L. G, Hendricks J. D., Rosato C. S., Corley-Smith G., Givan S. A., Bailey G. S., Bayne C. J., Williams B. E. (2005): Use of a rainbow trout oligonucleotide microarray to determine transcriptional patterns in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma compared to adjacent liver. *Toxicological Sciences* 88: 319–330.
 245. Tomé S., Simard J. P., Slean M. M., Holt I., Morris G. E., Wojciechowicz K., te Riele H., Pearson C. E. (2013): Tissue-specific mismatch repair protein expression: MSH3 is higher than MSH6 in multiple mouse tissues. *DNA Repair* 12(1): 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.10.006>.
 246. Trebstein A., Seefelder W., Lauber U., Humpf H. U. (2008): Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4968–4975.
 247. Tutt A., Ashworth A. (2002): The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends in Molecular Medicine*, 8(12):571–576. doi:10.1016/s1471-4914(02)02434-6.

248. Udvardi M., Czechowski T., Scheible W-R. (2008): Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20: 1736–1737.
249. Umar A., Risinger J. I., Glaab W. E., Tindall K. R., Barrett J. C., Kunkel J. A. (1998): Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. *Genetics* 148(4): 1637-1646.
250. Varga, J. and Tóth, B. (2005): Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review. *Acta Vet. Hung.* 53, 189–203.
251. Venkitaraman A. R. (2001): Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *Journal of Cell Science* 114: 3591-3598.
252. Verma R. J. (2004): Aflatoxin cause DNA damage. *International Journal of Human Genetics* 4(4): 231-236. doi:10.1080/09723757.2004.11885899
253. Wan D., Wang X., Wu Q., Lin P., Pan Y., Sattar A., Huang L., Ahmad I., Zhang Y., Yuan Z. (2015): Integrated transcriptional and proteomic analysis of growth hormone suppression mediated by trichothecene T-2 toxin in rat GH3 cells. *Toxicological Sciences* Volume 147(2): 326–338. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv131>
254. Wan M. L. Y., Turner P. C., Co V., Wang M. F., Amiri K. M. A., El-Nezami H. (2019): Schisandrin A protects intestinal epithelial cells from deoxynivalenol-induced cytotoxicity, oxidative damage and inflammation. *Sci Rep* 9: 19173. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55821-4>
255. Wang A. S. S., Ramanathan B., Chien Y-H., Goparaju C.M.V., Jan K-Y. (2005) Comet assay with nuclear extract incubation. *Analytical Biochemistry* 337: 70–75.
256. Wang X. W., Yeh H., Schaeffer L., Roy R., Moncollin V., Egly J. M., Wang Z., Freidberg E. C., Evans M. K., Taffe B. G. (1995) p53 modulation of TFIID-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10: 188–195.
257. Wang J. Wang Y., Long F., Yan F., Wang N., Wang Y. (2018): The expression and clinical significance of GADD45A in breast cancer patients. *PeerJ*. 6: e5344. doi: 10.7717/peerj.5344
258. Wassing I. E., Esashi F. (2021): RAD51: Beyond the break. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 113: 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.08.010>.
259. Weber M., Kovács B., Mézes Miklós (2005): Mikotoxinok által okozott DNS-károsodások. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 54(4): 353-364.
260. Williams A. B., Schumacher B. (2016): p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6:a026070. doi: 10.1101/cshperspect.a026070.
261. Williams J. G., Deschl U., Williams G. M. (2011): DNA damage in fetal liver cells of turkey and chicken eggs dosed with aflatoxin B1. *Arch Toxicol* 85: 1167–1172. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0653-x>
262. WHO & IARC (World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer) (1993): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 56. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France 397–444.
263. Wojewódzka M., Grądzka I., Buraczewska I. (2020): Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika* 47(1):1–5
264. Wu Q., Dohnal V., Huang L, Kuca K., Yuan Z. (2010): Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metabolism Reviews* 42(2): 250–267. doi:10.3109/03602530903125807

265. Wu Q., Qin Z., Kuca K., You L., Zhao Y., Liu A., Musilek K., Chrienova Z., Nepovimova E., Oleksak P., Wu W., Wang X. (2020): An update on T-2 toxin and its modified forms: metabolism, immunotoxicity mechanism, and human exposure assessment. *Arch Toxicol* 94: 3645–3669. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02899-9>
266. Yang G., Scherer S. J., Shell S. S., Yang K., Kim M., Lipkin M., Kucherlapati R., Kolodner R. D., Edelman W. (2004): Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell* 6(2): 139-150. doi:10.1015/j.ccr2004.06.024.
267. Yang J., Bai F., Zhang K., Bai S., Peng X., Ding X., Li Y., Zhang J., Zhao L. (2012): Effects of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin B1 and B2 on hepatic functions of broilers. *Poultry Science* 91(11): 2792-2801. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02544>
268. Yang J., Liu X., Niu P., Zou Y., Duan Y. (2009): Correlations and co-localizations of Hsp70 with XPA, XPG in human bronchial epithelia cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicology* 265: 10–14. doi:10.1016/j.tox.2009.09.001.
269. Yang L., Yu Z., Hou J., Deng Y., Zhou Z., Zhao Z., Cui J. (2016): Toxicity and oxidative stress induced by T-2 toxin and HT-2 toxin in broilers and broiler hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 87: 128–137.
270. Yang L., Zhang J., Li X., Xu C., Wang X., Guo X. (2019): Expression profiles of selenium-related genes in human chondrocytes exposed to T-2 toxin and deoxynivalenol. *Biological Trace Element Research* 190: 295–302. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1560-2>.
271. Yang X., Liu P., Cui Y., Xiao B., Liu M., Song M., Huang W., Li Y. (2020): Review of the reproductive toxicity of T-2 toxin. *J. Agric. Food Chem.* 68(3): 727–734. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07880>
272. Yang Y., Yu S., Liu N., Xu H., Gong Y., Wu Y., Wang P., Su X., Liao Y., De Saeger S., Humpf H-U., Wu A. (2018): Transcription factor FOXO3a is a negative regulator of cytotoxicity of Fusarium mycotoxin in GES-1 cells. *Toxicological Sciences*, 166(2): 370–381. doi: 10.1093/toxsci/kfy216
273. Yoshida K., Miki Y. (2004): Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 95(11): 866-871.
274. Zhan Q. (2005): Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1-2): 133–143. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.055.
275. Zhang F., Ma J., Wu J., Ye L., Cai H., Xia B., Yu, X. (2009a): PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current Biology*, 19(6): 524–529. doi:10.1016/j.cub.2009.02.018.
276. Zhang X., Jiang L., Geng C., Cao J., Zhong L. (2009b): The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol* 54(4): 513-518. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.05.021>
277. Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y., Dong W. (2016): ROS and ROS-mediated cellular signalling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 4350965, 1-18 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
278. Zhi Y., Ji H., Pan J., He P., Zhou X., Zhang H., Zhou Z., Chen Z. (2017): Downregulated XPA promotes carcinogenesis of bladder cancer via impairment of DNA repair. *Tumor Biology*. 1-9. <https://doi.org/10.1177/1010428317691679>
279. Zhivotovsky B., Orrenius S. (2005): Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331: 859-867.

280. Zhu S., Coffman J.A. (2017) Simple and fast quantification of DNA damage by real-time PCR, and its application to nuclear and mitochondrial DNA from multiple tissues of aging zebrafish. *BMC Res Notes* 10: 269. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2593-x>
281. Zhuang Z., Yang D., Huang Y., Wang S. (2013): Study on the apoptosis mechanism induced by T-2 toxin. *PLoS One*. 8(12): e83105. doi: 10.1371/journal.pone.0083105
282. Zimmermann C.E.P., Cruz B.M., Cadoná F.C., Machado A.K., Assmann C., Schlemmer K.B., Zanette R.A., Leal D.B.R., Santurio J.M. (2015): Cytoprotective and genoprotective effects of β -glucans against aflatoxin B1-induced DNA damage in broiler chicken lymphocytes. *Toxicology in Vitro* 29(3): 538-543. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.01.005>
283. Zingales V., Fernández-Franzón M., Ruiz M-J. (2020): Sterigmatocystin: Occurrence, toxicity and molecular mechanisms of action – A review. *Food and Chemical Toxicology* 146: 111802. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111802>
284. Zorov D. .B, Juhaszova M., Sollott S. J. (2014): Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94: 909-950, doi:10.1152/physrev.00026.2013.
285. Zouaoui N., Mallebrera B., Berrada H., Abid-Essefi S., Bacha H., Ruiz M-J. (2016): Cytotoxic effects induced by patulin, sterigmatocystin and beauvericin on CHO–K1 cells. *Food and Chemical Toxicology* 89: 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.010>
286. Zylicz M., King F. W., Wawrzynow A. (2001): Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* 20:4634-4638. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4634>.

Internetes hivatkozások:

Schuhmacher-Wolz U., Heine K., Schneider K. (2010): SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins CT/EFSA/CONTAM/2010/03.

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2010.EN-65> Letöltés ideje: 2021-06-02.

http1: Állatvédelmi útmutató az állatok kábításához és leöléséhez. <https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/458753/%C3%81llatv%C3%A9delmi+%C3%BA%20mutat%C3%B3+az+%C3%A1llatok+k%C3%A1b%C3%ADt%C3%A1s+%C3%A9s+le%C3%B6l%C3%A9s%C3%A9z.pdf/e4f085c2-4fbc-4cf2-92c5-6c817789957e> Letöltés ideje: 2021. 06. 17.

http2: BIOMIN World Mycotoxin Survey 2020 Annual report 17. https://f.hubspotusercontent20.net/hubfs/7252579/Downloads/MAG_MTX-Survey-Report_2020_EN.pdf?utm_campaign=World%20Mycotoxin%20Report%20-%20Impact%202021&utm_medium=email&_hsmi=112972448&_hsenc=p2ANqtz-_zK9LJyC3rBXhBrYxSBl0SH_l4S2kSvPrPghG_sBjRwyQV5Agjz46tNhS-BiNyoWW8LhruEC1u6Q__ZoWU2WjmWblOql-VGpwwOzV_C8Da27hiKw&utm_content=112972448&utm_source=hs_email Letöltés ideje: 2021. 06. 21.

10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki a doktori munkám során segítséget nyújtott:

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőimnek **Dr. Kovács-Weber Máriának** és **Dr. Kovács Balázs**nak, akik idejüket és energiáukat nem kímélve segítettek a munkám elvégzésében és a felmerülő problémák megoldásában.

Köszönettel tartozom **Dr. Mézes Miklósnak**, **Dr. Balogh Krisztián Milánnak** és **Balláné Dr. Erdélyi Mártának** a vizsgálataikból származó mintákért.

Köszönettel tartozom **Dr. Horváth Ákosnak**, **Dr. Kovács Róbertnek** és **Dr. Bencsik Dórának** a comet assay-ben nyújtott segítségéért és támogatásért.

Baráti köszönettel tartozom **Dr. Kerekes Andreának** és **Dr. Major Péternek**, akik bevezettek a primertervezésbe és szakmai eszmecserék által új megvilágításba helyeztek egy-egy felmerülő kérdést.

Köszönettel tartozom **Dr. Urbányi Bélának**, a **Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet intézetigazgatójának** és a **Regionális Tudásközpont munkatársainak**, hogy lehetőséget biztosítottak munkám elvégzéséhez és segítséget nyújtottak a laborvizsgálatok kivitelezésében.

Köszönetet szeretnék mondani **Vlaskality Sára Dórának**, volt szakdolgozatos hallgatónak, aki az egyes mérések elvégzésében nyújtott segítséget.

Kiemelten szeretném megköszönni a **Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Állattenyésztés Tudományok Intézet** intézetigazgatójának **Dr. Mezőszentgyörgyi Dávidnak**, **Dr. Póti Péternek**, tudományos intézetigazgató-helyettesnek, illetve az **Állattenyésztés-technológiai és Állatjóléti Tanszék munkatársainak**, hogy lehetőséget biztosítottak munkám elvégzéséhez és köszönöm azt a rengeteg buzdítást, biztató szót és baráti, szakmai segítséget, amit tőlük kaptam az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom az **Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskolának** és vezetőjének **Dr. Mézes Miklós** professzor úrnak, hogy témámat és munkámat befogadták és mindvégig támogatták.

Végül szeretném megköszönni Családomnak és Barátaimnak, hogy megoszthattam velük örömeimet és nehézségeimet. Kiemelten férjemnek, **Dr. Drobnyák Árpádnak**, aki folyamatosan támogatta munkámat, önfeláldozó módon segítette a dolgozat megírását és fiaimnak **Drobnyák Tas Árpádnak** és **Drobnyák Töhötöm Árpádnak**, akik alvásaikkal járultak hozzá dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom továbbá a következő pályázatoknak, amelyek anyagi támogatásával kísérleteimet végeztem és publikálhattam eredményeimet:

- Felsőoktatási hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatása (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008)
- SZIE MKK Kutató Kari Kiválósági Támogatás (11476-3/2016/FEKUT)