

XXI. Ifjúsági Tudományos Fórum, 2015. május 21., Keszthely

Rövid távú T-2 toxin és deoxinivalenol terhelés hatásai brojler csirkék glutation redox paramétereire

Pelyhe Csilla¹ – Kovács Balázs¹ – Zándoki Erika² – Mézes Miklós¹ – Balogh Krisztián¹¹*Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, 2103 Gödöllő, Páter Károly utca 1.*²*MTA-Kaposvári Egyetem, Mikotoxinok az élelmiszerláncban kutatócsoport, 7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.*
Pelyhe.Csilla@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Kísérletünk célja rövid távú T-2 toxin és deoxinivalenol (DON) kezelés hatásainak felmérése a glutation redox rendszer egyes elemeinek változásaira brojler csirkék szervezetében. Az etetési kísérlet során mesterségesen szennyezett takarmányt ettünk 1 és 3 hetes brojler csirkékkel, 24 órán keresztül 5,77 mg T-2 toxin/kg takarmány és 4,86 mg DON/kg takarmány dózisban. Májmintákat vettünk az állatokból 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 és 24 órával az etetés megkezdése után. A májmintákból meghatároztuk a glutation peroxidáz aktivitást, a redukált glutation tartalmat, a lipidperoxidációs folyamatok kezdeti (CD, CT) és véső (MDA) szakaszát jelző markereket, valamint nyomon követtük a génexpressziós változásokat a foszfolipidhidroperoxid glutation peroxidáz (GPx4), a glutation reduktáz (GR) és a glutation szintetáz (GS) esetén. A GPx aktivitás és a GSH esetén emelkedett értékeket tapasztaltunk a kontrollal összehasonlítva a kísérlet első 8 órájában, valamint az idősebb korosztály esetén a glutation redox rendszerben újra aktiválódást tapasztaltunk 20 órát követően. A génexpressziós változások esetén csak kisebb eltéréseket tapasztaltunk, ami összefüggésben állhat azzal, hogy a glutation redox rendszer nem merült ki fehérje szinten. Ugyanakkor, a kontroll csoportokban mért paraméterek esetén változásokat tapasztaltunk a vizsgált 24 órás periódus alatt, ami az antioxidáns rendszer cirkadián ritmusához hasonló. A lipidperoxidációs folyamatok esetén csak kismértékű eltéréseket tapasztaltunk, ami azt jelzi, hogy bár a mikotoxin terhelés által generált oxidatív stressz aktiválta a glutation redox rendszert, a lipidperoxidációs folyamatok nem emelkedtek szignifikáns mértékben a vizsgált időszakban és alkalmazott mikotoxin terhelés hatására.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A trichotecénvázas mikotoxinok jellemzően *Fusarium* gombák másodlagos metabolizmus termékei, amelyek a takarmányokat szennyezve gazdasági állatoknál dóziszfüggően termelés kiesést, illetve toxikus válaszreakciót váltanak ki (Diaz, 2005). A *Fusarium* penészek általában hűvös és párás környezetben (Wood, 1992), a jelenlévő oxigén mennyiségétől, illetve a gabonában jelenlévő szubsztrátoktól függően (Kovács, 2010), számos, eltérő kémiai struktúrával rendelkező mikotoxint termelnek. Hazánkban gyakoriságuk és gazdasági károkozásuk alapján két trichotecénvázas mikotoxin, a deoxinivalenol (DON) és a T-2 toxin a legjelentősebbek. A T-2 toxint már 1968-ban leírták (Bamburg és mtsai, 1968), s az egyik leginkább toxikusnak ítélt trichotecénvázas mikotoxin. A T-2 toxin, valamint annak részben a tárolás során, illetve az állati szervezetben képződő metabolitja, a HT-2 toxin, valamint a DON az eukarióta sejtekben gátolják a fehérje- és a DNS szintézist (Holladay, 1995). Ezek a mikotoxinok sertés és baromfi faj esetén különösen nagy veszteséget okozhatnak, mivel csökkentik a takarmányfelvételt és a fehérjeszintézist, így

mind a hús-, mind pedig a tojástermelési paramétereket rontják (*Zomborszky*, 2002). Korábban megállapítást nyert, hogy a sejtekben zajló biokémiai változásokkal összefüggésben a trichotecénvázis mikotoxinok hosszú távú hatására fokozódik az állati szervezetben a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása, amely kihat a biológiai antioxidáns rendszer működésére is (*Mézes és mtsai*, 1998; *Surai és mtsai*, 2002).

A biológiai rendszerekben az evolúció során egy hatékonyan működő enzimatis és nem enzimatis antioxidáns védőrendszer alakult ki, annak érdekében, hogy megvédje a sejtalkotókat a (per)oxidációs károsodásoktól (*Chow*, 1988; *Davies*, 1995). Az oxigén szabad gyökök által kiváltott oxidációra főként a többszörösen telítetlen zsírsavak hajlamosak, azonban a peroxidáció kisebb-nagyobb mértékben károsíthatja a zsírsavak környezetében jelenlévő többi biomolekulát; így a fehérjéket, a nukleinsavakat és a szénhidrátokat is. A folyamat elsősorban a membránokat érinti, mind a sejt és sejtorganellumok esetén, melyek ennek révén elvesztik fluiditásukat, integritásukat, és megnő permeabilitásuk (*Gutteridge és Halliwell*, 1990), amely végeredményben a sejt pusztulásához, líziséhez vezethet (*Mézes és Matkovics*, 1986). Az oxigén szabad gyökök által elindított láncreakció lezárása ún. gyökfogó antioxidáns molekulák (pl. redukált glutation (GSH), E-vitamin) segítségével, valamint enzimatis úton történhet (*Chow*, 1988; *Davies*, 1995).

A lipidperoxidációs folyamatokat, valamint az antioxidáns rendszert is cirkadiális ritmus befolyásol a nap folyamán, amit a sötét-világos ciklus váltakozása határoz meg. A sötét órákban termelődő melatonin emlős sejtekben a sejtmagban akkumulálódik (*Menendez-Pelaer és Reiter*, 1993). A melatonin hatására nő a GPx aktivitás csirkék májában, veséjében, vörösvérsejtjeiben stb. (*Pablos és mtsai*, 1995). A GPx aktivitás maximumát csirkék agyában hajnali 5 körül mérték (*Pablos és mtsai*, 1997), míg patkányok szerveiben este fél 7 körül mérték a maximum értéket GPx és TBARS esetén, valamint GSH esetén a legalacsonyabb szintet (*Manikonda és Jagota*, 2012).

A fentiek alapján, célunk volt megállapítani, hogy rövidtávú *per os* T-2 toxin vagy DON terhelés milyen mértékű hatást gyakorol a lipidperoxidációs és antioxidáns védőrendszer változásaira 1 vagy 3 hetes brojlerszirkékben a toxin expozíció első 24 órájában. Valamint végigkövetni a glutation redox rendszer egyes tagjainak, a glutation reduktáz (GR), a glutation szintetáz (GS) valamint a glutation peroxidázok közül kiemelve a foszfolipidhidroperoxid glutation peroxidáz (GPx4) expressziójának változásait.

2. Anyag és módszer

A kísérlet során 1 és 3 hetes brojler szirkéket etettünk mikotoxinokkal mesterségesen szennyezett takarmányt 24 órán át, 5,77 mg T-2 toxin/kg takarmány és 4,86 mg DON/kg takarmány dózisban, folyamatos megvilágítás mellett. A kezelt csoportok által fogyasztott takarmány mikotoxinnal történő mesterséges szennyezése után annak pontos értéke HPLC módszerrel került visszamérésre.

A mintavételek során 6-6 állatból *post mortem* májmintákat vettünk 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 és 24 órával az etetés megkezdése után (1. táblázat). A mintákat a biokémiai vizsgálatok elvégzéséig -20 C-on tároltuk. A májmintákból mértük a redukált glutation (GSH) koncentrációt, glutation-peroxidáz (GPx) aktivitást, a fehérje- és malondialdehid (MDA) koncentrációt, valamint konjugált dién és -trién tartalmat.

1. táblázat: A mintavételi időpontok, s azoknak ideje

expozíció ideje (óra)	0	2	4	8	12	16	20	24
tényleges idő	08.00	10.00	12.00	16.00	20.00	24.00	04.00	08.00



A redukált glutation koncentrációt *Sedlak és Lindsay* (1968) módszere alapján mértük 5,5'-ditio-bisz-2-nitrobenzoésav reagenssel. A glutation-peroxidáz aktivitást *Matkovic és mtsai* (1988) módszer határoztuk meg egy végpontos direkt assay során, redukált glutation és kumul-hidroperoxid ko-szubsztrátok jelenlétében. A fehérjekoncentráció meghatározása a máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakciójában Folin-fenol módszerrel történt, szarvasmarha szérum albumin standard felhasználásával (*Lowry és mtsai*, 1952). A konjugált dién és -trién tartalom meghatározása a májminták lipid tartalmának 2,2,4-trimetilpentánban való kivonását követően 232 nm-en, illetve 268 nm-en mutatott abszorpció alapján történt (AOAC, 1984). A malondialdehid tartalom meghatározását *Placer és mtsai* (1964) módszere alapján végeztük savanyú közegben, magas hőmérsékleten való komplex képzés alapján, 2-tiobarbitursavval.

A génexpressziós vizsgálatokhoz vett máj mintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, kezelésként 5-5 egyedből, amit felhasználásig -80°C-on tároltunk. Az RNS extrakciót trizol-kloroform eljárással végeztük 5 mg májmintából egyedenként. Az RNS minőségét és integritását agaróz gélelektrofozézissel és NanoDrop spektrofotométer segítségével határoztuk meg, A260/A280>1,8 abszorbancia esetén fogadtuk el. Az RNS genomi DNS tartalmát DN-áz kezeléssel eltávolítottuk, majd cDNS-t készítettünk reverz transzkripció által, a gyártó leírása alapján. Fluoreszcens jelölt próbák segítségével, real-time PCR során határoztuk meg a relatív expressziót, két ismétlésben, amit GAPDH endogén kontrollal normalizáltunk (2. táblázat). A PCR hőmérsékleti profilja a következő volt: 95°C 10 perc, 95°C 15 másodperc, 58°C 30 másodperc, 72°C 30 másodperc 45 cikluson keresztül. A specifikus PCR termékeket elektroforézissel ellenőriztük.

2. táblázat: A PCR során felhasznált primerek és próbák

Gén neve	Forward primer 5'-3'	Reverz primer 5'-3'	Próba MGB 5'-3'
GAPDH	TGACCTGCCGTCTGGAGAAA	TGTGTATCCTAGGATGCCCTTCAG	CCAGCCAAGTATGATGAT
GPx4	AGTGCCATCAAGTGGAACTTCAC	TTCAAGGCAGGCCGTCAT	CAGCCCAATGGAG
GS	GTACTCACTGGATGTGGGTGAAGA	CGGCTCGATCTGTCCATCAG	AGGAGGGAACAACCTG
GR	CCACCAGAAAGGGGATCTACG	ACAGAGATGGCTTCATCTTCAGTG	CTGGCACTTCGGCTC

A kapott eredmények statisztikai értékelését STATISTICA for Windows 4.5 programmal (*StatSoft Inc.*, 1993) végeztük. A normalitás vizsgálatot, majd a kiugró értékek kizárását követően varianciaanalízis (ANOVA) során a Fisher-féle legkisebb szignifikáns különbség (LSD) tesztet alkalmaztuk a szignifikáns ($p < 0,05$) különbségek megállapítására.

A génexpressziós változások vizsgálatára a célgénnek és az endogén kontroll gén küszöb értékeinek (Ct) meghatározását követően kiszámítottuk a delta Ct értékeket (ΔCt). A delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) meghatározásához a 0. mintavétel egyedeiből készített kevert mintát alkalmaztunk, mint kalibrátor értéket. Az relatív génexpresszió ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) értékeket a *Livak és Schmittgen* (2001) által leírt képlet alapján számítottuk.

3. Eredmények és értékelésük

A 24 órás etetéses kísérlet során a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns mértékben emelkedett értékeket tapasztaltunk az egy hetes állatok májában GPx aktivitás esetén 8 órás, valamint a GSH tartalom esetén 2, 4 és 8 órás T-2 toxin kitétség hatására. A 3 hetes csirkék májmintáinak vizsgálata során szintén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk 4, 8 majd 20 órás T-2 toxin expozíciót követően. A glutation redox rendszer az eredmények alapján sikeresen aktiválódott a T-2 toxin terhelés hatására a kísérlet első 8 órájában, valamint az idősebb korosztály esetén egy újra aktivációt figyeltünk meg 20 órát követően, amit azonban a fiatalabb állatoknál nem tapasztaltunk. A DON terhelés hatására a vizsgált dózisban és időtartamban nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a kontrollhoz viszonyítva egyik csoportban sem.

A lipidperoxidációs folyamatok kezdeti szakaszát jelző konjugált diének és – triének tartalmában csak kismértékű változásokat tapasztaltunk a 24 óra során. A CD esetén az 1 hetes állatok esetén 20 óra, a 3 hetes állatok esetén 24 óra T-2 toxin kitétség hatására tapasztaltunk szignifikáns emelkedést, míg a DON kezelt csoportban 16 óra után emelkedést, majd 24 órát követően csökkenést tapasztaltunk. A CT értékek esetén az egy hetes állatok esetén 20 óra elteltével emelkedést tapasztaltunk a T-2 csoportban, a 3 hetes állatok esetén csökkenést tapasztaltunk a DON kezelt csoportban 8 és 24 órás toxin kitétséget követően. Az MDA értékek esetén a 3 hetes csirkék esetén a T-2 toxin kezelt csoportban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk 8 óra, csökkenést a DON kezelt csoportban 12 óra elteltével, amely változásokat trendben követik az 1 hetes állatok eredményei is. A CD és CT értékek esetén csak kismértékű eltéréseket tapasztaltunk a kísérlet második felében, míg a malondialdehid értékek esetén tapasztalt emelkedés a T-2 toxin esetén gyorsan lezajló peroxidatív folyamatokat jelez, aminek az elejét nem tudtuk nyomon követni, ami azonban a kísérlet második felére nem volt jellemző.

A kísérlet során a sűrű mintavételnek köszönhetően lehetőségünk nyílt megfigyelni a glutation redox rendszerben és a lipidperoxidációs folyamatokban a nap 24 órájában bekövetkező természetes változásokat is, a kontroll értékek megvizsgálásával.

A GPx aktivitás esetén a 3 hetes állatok vizsgálata során a kísérlet 4. órájában tapasztaltunk emelkedett szintet, ugyanakkor az egy hetes állatok esetén jellemzően alacsonyabb értékeket tapasztaltunk az idősebbekkel összehasonlítva, valamint nem tapasztaltunk nagyobb változásokat a 24 óra során. A GSH tartalom esetén ezzel ellentétben a kísérlet első 8 órájában magasabb értékeket tapasztaltunk az 1 hetes állatok esetén a 3 hetesekkel összehasonlítva. Mindkét korcsoport esetén a kísérlet 8-16 óra között tapasztaltunk magasabb értékeket a vizsgált órák alatt.

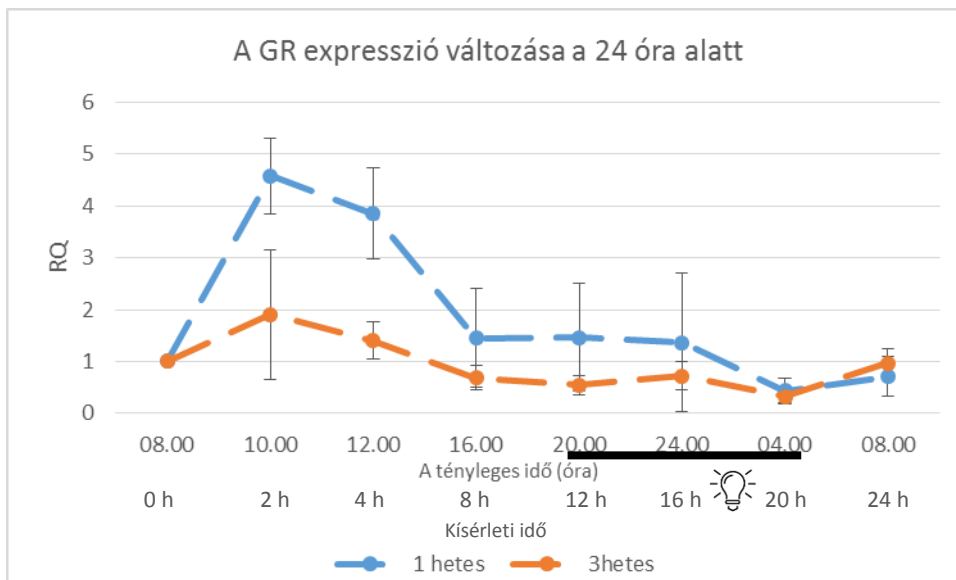
A CD és CT értékek esetén kismértékű változásokat tapasztaltunk a 24 órás megfigyelés során. A két érték napi változása egymáshoz hasonló, azonban a két korosztály között eltérő. Az egy hetes állatok esetén a görbe 2 majd 16 óra esetén emelkedett, míg a 3 hetes állatok esetén 2-4 óra között csökkenést, 16 óránál növekedést tapasztaltunk. Továbbá a két korcsoport közül a fiatalabb állatok mintáiban a CD és CT értékek esetén is magasabb értékeket tapasztaltunk, minden mintavétel esetén. Az MDA értékek esetén a vizsgálat 4. órájában mutatkozott különbség a két érték között, ahol az 1 hetes állatoknál emelkedést tapasztaltunk, eddig a vizsgálati pontig a két csoport között ugyancsak magasabb értékek tapasztaltunk az egy hetes állatoknál, a két görbe a későbbiekben hasonló változásokat mutat, hasonló értékekkel, emelkedett értékekkel 16 óránál.

A génexpresszós változások esetén csak kisebb eltéréseket tapasztaltunk a vizsgált mikotoxin dózisok hatására a 24 óra alatt.

A GPx4 esetén a megfigyelt 24 órás időszak alatt a 3 hetes állatoknál a kísérlet elején, 2-8. óra között tapasztaltunk emelkedett értékeket, ami később fokozatosan visszaért a 0. órákor mért szintre. Az egy hetes állatok esetén 2-4. óra között tapasztaltunk emelkedett expressziós értékeket, valamint a két korcsoport közül a fiatalabb állatok esetén általánosságban magasabb RQ értékeket tapasztaltunk a kísérlet második felében, 12-20 óra között.

A GR esetén is a kísérlet 2-4. órájában tapasztaltunk emelkedett RQ értékeket, valamint 20 óránál a 0. időpontnál kisebb expressziós értéket tapasztaltunk. A két korcsoport expressziós értékei hasonlóan változnak a vizsgált 24 óra alatt, azonban az 1 hetes állatok esetén magasabb RQ értékeket tapasztaltunk.

AGS esetén szintén a kísérlet elején tapasztaltunk magasabb értékeket, valamint a másik két génhez hasonlóan az 1 hetes állatoknál itt is magasabb RQ értékeket tapasztaltunk (1. ábra).



1. ábra: A glutation szintetáz expressziós változásai a kontroll csoportokban a vizsgált 24 óra alatt

4. Következtetések, javaslatok

A kísérlet során az glutation redox rendszer aktivitását/mennyiségét, valamint a tagjait közvetlenül kódoló gének kifejeződését vizsgáltuk 24 órán keresztül brojler csirkékben, két korcsoportban. A glutation redox rendszer aktiválódását figyeltük meg az első 8 órában, valamint az idősebb korcsoportban újra aktiválódást figyeltünk meg. A két korcsoport között mennyiségi különbségeket is tapasztaltunk. A lipidperoxidációs folyamatok esetén csak kismértékű eltéréseket tapasztaltunk. A vizsgálataink során további kísérleteket tervezünk, valamint a jelen adatok további bővítését, hogy a tapasztalt változásokat szélesebb körben és összefüggésekben ismerhessük meg, mind a korosztályok közötti illetve azokon belüli fiziológiás változásokat, mind a trichotecénvázis mikotoxinok által okozott változásokat.

A kutatásokat az OTKA PD 104823 pályázat támogatásával végeztük.

5. Felhasznált irodalom

- AOAC (1984): Official Methods of Analysis (28.054) 14th edition. Arlington, VA, USA
- Bamburg, J. R. – Riggs, N. V. – Strong, F. M. (1968): The structure of toxins from two strains of *Fusarium Trincitum*. *Tetrahedron Lett.* 24, 3329-3326.
- Chow, C.K. (Ed.), (1988): Cellular Antioxidant Defense Mechanisms, vol. I and II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Davies, K.J.A., (1995): Oxidative stress, the paradox of aerobic life. In: *Rice-Evans, C. - Halliwell, B. - Land, G.G.* (Eds.), *Free Radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*. London, Portland Press, pp. 1–31.
- Diaz, D. E. (ed.) (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham
- Gutteridge, J. M. - Halliwell, B. (1990): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15. 4. 129-135.
- Holladay, S. D. - Smith, B. J. - Luster, M. I. (1995): B-lymphocyte precursor cells represent sensitive targets of T2 mycotoxin exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131. 309-315.
- Kovács, M. (szerk:) (2010): *Aktualitások a mikotoxin kutatásban*. Agroinform Kiadó, Budapest, 156. p.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDcT method. *Methods* 25, 402–408.
- Lowry, O. H. - Rosenbrough, N. J. - Farr, A. L. - Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275.
- Manikonda, P., K.- Jagota, A (2012): Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology* 13:511–524.
- Matkovics, B. - Szabó, L. - Sz.Varga, I. (1988): Lipidperoxidáció és redukált glutation anyagcsere enzimek aktivitás meghatározása biológiai mintákban. *Lab. Diagn.* 15. 248-250.
- Menendez-Pelaer, A., Reiter, R. J. (1993): Distribution of melatonin in mammalian tissues. The importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15: 59-67.
- Mézes, M. – Matkovics, B. (1986): A lipidperoxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése. In: Csaba Gy. (ed.): *A Biológia Aktuális Problémái Medicina*, Budapest Vol. 34, pp. 61-105
- Mézes, M. - Barta, M. - Nagy, G. (1998): Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Res. Vet. Sci.* 66: 19–23.
- Pablos, M.I., Chuang, J.I., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Daniels, W.M. U., Sewerynek, E., Melchiorri, D., Poeggeler, B. (1995): Time course of melatonin-induced increase of glutathione peroxidase activity in chick tissues. *Biol. Signals* 4: 325-330.
- Pablos, M.I., Reiter, R.J., Ortiz, G.O., Guerrero, J.M., Agapito, M.T., Chuang, J.I., Sewerynek, E. (1998): Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32: 69-75.
- Placer, Z. A. - Cushman, L. L. - Johnson, B. C. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems *Anal. Biochem.* 16.359-364.
- Sedlak, J. - Lindsay, R. H. C. (1968): Estimation of total, protein bound and non-protein sulf-hyryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.* 25.192-205.
- Statsoft Inc., (1993): *Statistica for Windows*, Release 4.5. Statsoft Inc.
- Surai, P.F. - Dvorska, J.E. - Sparks, N.H.C. - Jaques, K.A. (2002): Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defence. In: Lyons T.P., K.A Jaques eds: *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 131-142.
- Wood, G. E. (1992): Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* 70.3941–3949.
- Zomborszky, K.M. (2002): A penészgombák toxinjainak állategészségügyi vonatkozásai. *Agro Napló* 6. 73-77.