

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

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

PhD értekezés

Bús-Pomothy Judit Mercédesz

2022

Témavezető:

.....

Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet

Állatorvostudományi Egyetem,

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Készült 8 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....

Bús-Pomothy Judit Mercédesz

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	6
1. Összefoglalás	9
2. Bevezetés	12
3. Irodalmi áttekintés	14
3.1. Bélbarrier, mint védelmi vonal	14
3.1.1. Általános jellemzés	14
3.1.2. Reaktív oxigén fajták és az oxidatív stressz	14
3.1.3. Gyulladásos citokinek jelenléte a bélhamban.....	16
3.1.4. Szoros sejtkapcsoló struktúrák a bélhamban	17
3.2. <i>In vitro</i> nem-daganatos bélhámsejt modellek.....	18
3.2.1. HIEC és HIEC-6 sejtek bemutatása	19
3.2.2. IPEC-J2 sejtvonal tulajdonságai	20
3.3. <i>Fusarium</i> gombák és mikotoxinjaik	21
3.3.1. Trichotecén-vázás DON és T-2 toxin bélrendszerre gyakorolt hatásai	22
3.3.2. A DON és a T-2 toxin sejtszintű mechanizmusai	25
3.3.3. Oxidatív stressz kialakulása DON és T-2 toxin terhelést követően	26
3.3.4. DON és T-2 toxin által előidézett gyulladásos folyamatok	26
3.3.5. DON és T-2 toxin határérték szabályozás	27
3.3.6. A mikotoxinokkal, illetve az általuk kiváltott egészségkárosodással szembeni védekezés lehetőségei	28
3.4. Növényi polifenol vegyületek általános jellemzése.....	29
3.4.1. Kvercetin antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásának jellemzése	32
3.4.2. Egy kávésav származék, a rozmaringsav <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> hatásának vizsgálata	34
3.4.3. A fermentált búzacsíra kivonat és biológiai hatása	36
4. A kísérleti munka célja	39
5. Anyag és módszer.....	43
5.1. A HIEC-6 és az IPEC-J2 sejtvonal tenyésztése.....	43
5.2. Sejtéletképesség-vizsgálatok	43
5.2.1. Tripánkék oldattal való detektálás	43
5.2.2. MTS módszerrel történő sejtéletképesség vizsgálat.....	43
5.2.3. Neutrálvörös sejthalál mérés.....	44
5.3. Reagensek	44

5.4.	Sejtek kiültetése	45
5.5.	Sejtréteg integritás vizsgálata TEER méréssel	46
5.6.	Oxidatív állapot változásának nyomon követése	46
5.6.1.	H ₂ O ₂ mennyiségi mérése extracellulárisan Amplex Red reagenssel	46
5.6.2.	Intracelluláris ROS detektálása DCFH-DA módszer segítségével	46
5.7.	Az IL-6 és IL-8 gyulladáscitokinek vizsgálata	47
5.8.	Klaudin-1 és okkludin lokalizációjának és koncentrációjának meghatározása	47
5.9.	Statisztikai elemzés	48
6.	Eredmények	49
6.1.	HIEC-6 sejtekkel végzett kísérletek	49
6.1.1.	HIEC-6 sejtek mikotoxinokkal történő inkubációja	49
6.2.	IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérletek	55
6.2.1.	IPEC-J2 sejtek elő- és együttkezelése kvercetinrel DON-expozíció mellett	55
6.2.2.	A rozmaringsav előkezelés hatásának vizsgálata 48 és 72 órás mikotoxin kezelés után	58
6.2.3.	A fermentált búzacsíra kivonat védőhatásának vizsgálata DON és T-2 toxin terheléskor és az azt követő 24 órában	63
7.	Diszkusszió	70
7.1.	HIEC-6 sejtek válaszkészségének vizsgálata a DON, a T-2 toxin és a DT2 kezelésekre	70
7.2.	A két fuzáriotoxin IPEC-J2 sejtekre gyakorolt hatásának feltérképezése	72
7.3.	A növényi polifenol vegyületek alkalmazhatósága	75
7.3.1.	A kvercetin előkezelés és együttkezelés védő hatásának meghatározása DON által indukált oxidatív stresszel szemben	75
7.3.2.	A rozmaringsav előkezelés eredményei a mikotoxinokkal kezelt IPEC-J2 sejteken	76
7.3.3.	A fermentált búzacsíra kivonattal történő kezelés hatása önmagában és mikotoxinokkal kombinációban IPEC-J2 sejteken	78
8.	Következtetés	80
9.	Új tudományos eredmények	81
10.	Irodalom	84
11.	A doktori kutatás eredményeinek közlései	116
	Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk	116
	Lektorált, impakt faktorral nem bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk	116

Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények listája	116
Konferencia prezentációk	117
Szakdolgozat és TDK munka irányítása	118
12. Köszönetnyilvánítás	119

Rövidítésjegyzék

A549:	Humán tüdő adenokarcinóma
ADG:	Átlagos napi növekedés (average daily gain)
ANOVA:	Varianciaanalízis (analysis of variance)
ATA:	Alimentary toxic aleukia (toxikus leukopénia)
BSA:	Szarvasmarha szérumalbumin (bovine serum albumin)
Caco-2:	Emberi kolorektális adenokarcinóma sejtvonal
CCK:	Kolecisztokinin
CCK8:	Nem radioaktív, érzékeny kolorimetriás vizsgálat, élő sejtek számolására (Cell Counting Kit 8)
CFU-GM:	Kolóniaképző granulocita – makrofág progenitor
CHO-K1:	Immortalizált hörcsög petefészek sejtek
COX-2:	Ciklooxygenáz-2
CYP:	Citokróm P450 enzim család tagjai
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAS:	Diacetoxiszcirpenol
DCFH-DA:	Dikloro-dihidrofluoreszcein-diacetát
DMEM/F12:	Dulbecco-féle módosított Eagle tápközeg és Ham's F-12 keverék
DMSO:	Dimetil-szulfoxid
DNS:	Dezoxiribonukleinsav
DOM-1:	Deepoxi-deoxinivalenol
DON:	Deoxinivalenol
DT2:	DON és T-2 toxin kombinációja
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGF:	Epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
ELISA:	Enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
FBCSK:	Fermentált búzacsíra kivonat
FBS:	Fötális borjú szérum
Foxp3:	Scurfin (Forkhead box protein P3)
F-X:	Fuzarenon-X
GES-1:	Humán nem-daganatos eredetű gyomorhámsejtek
GSH:	Glutation
GSSG:	Glutation-diszulfid

H ₂ O ₂ :	Hidrogén-peroxid
HEI-OC1:	Egér hallójárat sejtvonala (House Ear Institute-Organ of Corti 1)
HeLa:	Humán endocervikális adenokarcinóma sejtvonala
HIEC-6:	Fötális humán jejunális eredetű bélhámsejtvonala (human intestinal epithelial crypt cell-6)
HT-29:	Humán colorectalis adenokarcinóma sejtvonala
IARC:	Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (International Agency for Research on Cancer)
IBD:	Gyulladásos bélbetegség
IC ₅₀ :	50% gátló hatást okozó koncentráció (half maximal inhibitory concentration)
IFN-γ(+) CD4(+):	Interferon gamma és CD4 pozitív Thelper sejtek
IFN-γ:	Interferon-gamma
IgA:	Immunoglobulin-A
IgG:	Immunoglobulin-G
IgM:	Immunoglobulin-M
IL:	Interleukin
IPEC-1:	Sertés vékonybélhám sejtvonala
IPEC-J2:	Újszülött sertés jejunális eredetű bélhámsejtvonala
Keap1:	Kelch-féle ECH-asszociált fehérje 1
LDH:	Laktát-dehidrogenáz
LPS:	Lipopoliszacharid
MDA:	Malondialdehid
MDA-MB-231:	Humán epiteliális mellrák sejtvonala
MTS:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfopenil)-2H-tetrazólium
NCI-N87:	Humán gyomor tubuláris adenokarcinóma sejtvonala
NF-κB:	Nukleáris faktor-kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NIV:	Nivalenol
NK sejtek:	Természetes ölősejtek
NOS:	Nitrogén-monoxid szintáz
NOX:	Nikotinamid-dinukleotid-foszfát-oxidázok (NADPH-oxidáz)
NR:	Neutrál Vörös festék (neutral red)
Nrf-2:	Nukleáris faktor eritroid 2-vel kapcsolatos faktor 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

NSAID:	Nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer (non-steroidal anti-inflammatory drug)
$O_2^{\cdot-}$:	Szuperoxid anion
OH^{\cdot} :	Hidroxilgyök
p:	Valószínűségi érték (probability value)
PBS:	Foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PC3:	Humán prosztatata karcinóma
PRRSV:	Sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus (porcine reproductive and respiratory syndrome virus)
PTEN:	Foszfatáz tenzin
PUFA:	Többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acids)
PYY:	YY peptid
RA:	Rozmaringsav (rosmarinic acid)
REF-1:	Redox effektor faktor-1
RNS:	Reaktív nitrogénfajták (reactive nitrogen species)
ROS:	Reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
SGLT-1:	Na^+ -függő glükóz/galaktóz transzporter
T sejt:	T-limfocita sejtek
T-2:	T-2 toxin
TDI:	Megengedhető napi beviteli (tolerable daily intake)
TEER:	Transzepiteliális elektromos ellenállás
TGF- β :	Transzformáló növekedési faktor-béta (transforming growth factor β)
Thelper:	Helper T-limfocita sejtek
THP1:	Humán monocita sejtvonal, akut monocita leukémiás betegből izolálva
TJ:	Szoros sejtkepcsoló struktúra (tight junction)
TLR:	Toll-like receptor
TNF- α :	Tumor nekrosis faktor-alfa
TPC:	Összes fenoltartalom (total phenolic content)
Treg:	Reguláló T-limfocita sejtek
VEGF:	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
Vero:	<i>Cercopithecus aethiops</i> vese hámsejt
WST-1:	Vízoldható tetrazólium só (water-soluble tetrazolium salt – 1)
ZEA:	Zearalenon
ZO-1:	Zonula occludens-1

1. Összefoglalás

A mikotoxinok, mint a penészgombák másodlagos anyagcseretermékei szennyezhetik a szántóföldi növényállományokat és a gabonaféléket a vegetatív időszakban vagy a tárolás során. Ezek a növényi részek bekerülhetnek alapanyagként az emberi fogyasztásra szánt gabonaalapú élelmiszerekbe és a haszonállatoknak szánt takarmányba is. A gabonaszemeket több penészgomba is megfertőzheti, így fennáll az esélye annak, hogy többféle mikotoxint is tartalmazhat ugyanaz a növényi rész. A Magyarországon is előforduló *Fusarium* fajok a termőföldeken okozhatnak károkat a gabonanövényeken a betakarítás előtt. Ezek a gombák különböző kémia szerkezettel rendelkező mikotoxin termelésére képesek. A trichotecén-vázis mikotoxinok a gasztrointesztinális traktusban változtathatják meg a bélhám működését szövet- és sejtszinten is, mind az emberben, mind a haszonállatokban egyaránt.

A növényi eredetű, polifenolokat és kinonokat tartalmazó kivonatok az *in vitro* és állatmodell kísérletekben is jótékonyan befolyásolták a bélhámot és a szervezetben felszívódva segítették a bél mikrobiota egyensúlyának fenntartását. Az összetevők legfontosabb tulajdonsága az antioxidáns hatás, melyet a kémiai szerkezetüktől függően más-más módon érnek el ezek a vegyületek. A polifenolok feloszthatók a kémiai szerkezetük alapján flavonoid és nem-flavonoid típusú vegyületekre, míg a kinonok a polifenolokból is keletkezhetnek bioszintetikus úton. A polifenolok és a kinon vegyületek ritkán fordulnak elő aglikon formájában, legtöbbször cukorkomponensekkel konjugálva találhatóak meg a növényekben és csak az emésztőrendszerben válhatnak önálló molekulává az enzimatis lebontás után.

A PhD munkám célja volt a két leggyakrabban előforduló, *Fusarium* fajok által termelt mikotoxin, a deoxinivalenol (DON) és a T-2 toxin hatásának *in vitro* rendszerben történő nyomkövetése. Ezt a két mikotoxint önállóan és kombinációban (DT2) is vizsgáltuk nem-daganatos eredetű főtális humán jejunális eredetű bélhám sejtvonalon (HIEC-6) és az újszülött sertés jejunális eredetű bélhám sejteken (IPEC-J2). További kérdéseim arra irányultak, hogy a DON, T-2 és DT2 kezelés hogyan befolyásolja a HIEC-6 és IPEC-J2 sejtek életképességét, az oxidatív stressz és a gyulladási folyamatok mértékét, valamint a sejtkapcsoló struktúrák felépítését. Célul tűztem ki továbbá annak megállapítását, hogy a kiválasztott antioxidáns tulajdonsággal rendelkező polifenolok közül, a flavonoidok közé tartozó kvercetin, a nem-flavonoid típusba tartozó rozmaringsav, valamint a kinonokat és flavonoidokat is nagy számban tartalmazó fermentált búzacsíra kivonat képes-e a mikotoxinok károsító hatásait semlegesíteni vagy csökkenteni *in vitro* körülmények között az IPEC-J2 sejtvonalon.

A kísérleteket megelőzően mindkét sejtvonalat (a HIEC-6 és az IPEC-J2 sejteket) poliészter membránt tartalmazó inzertre ültettük ki. A tápfolyadékcserejére kétnaponta került sor a sejtek apikális és bazolaterális kompartmentjében. Az alkalmazott kezelőoldatokat pH mérés és steril szűrést követően adtam a sejtekhez. A 24 óránál tovább tartó kísérletek esetében a kezelőoldatokat naponta cseréltem a sejteken. A sejtleletképeség vizsgálatokkal megállapítottam az adott sejtvonalon alkalmazható, legmagasabb nem-citotoxikus mikotoxin koncentrációt. A kombinációs kezeléshez a DON-t és a T-2 toxint különböző koncentrációpárosításban vizsgáltam mind a két sejtvonalon. Az antioxidáns és védő hatású anyagok (kvercetin, rozmaringsav, fermentált búzacsíra kivonat) sejtleletképeségre gyakorolt hatása is meghatározásra került az IPEC-J2 sejtek esetében és azt a koncentrációt alkalmaztuk a továbbiakban, melynél nem csökkent a sejtleletképeség. A kísérletekben a kezelési idők lejárta után a TEER értékeket megmértem, valamint megtörtént a mintavétel a sejtmentes felülúszókból. Ebből az oldatból határoztuk meg mind a HIEC-6, mind az IPEC-J2 sejtek által termelt extracelluláris hidrogén-peroxid (H_2O_2) és az interleukin-6 (IL-6), valamint az interleukin-8 (IL-8) koncentrációját. Az intracellulárisan megtalálható reaktív oxigén fajták (ROS) mennyiségi változásának megállapításához a sejtek lizálással kerültek feltárára. A szoros sejtkapcsoló struktúrákat (TJ) alkotó klaudin-1 és okkludin fehérjéket immunfluoreszcens módon festettük meg a HIEC-6 és IPEC-J2 sejtekben a membráninzertek felületén. Az inzertmembránról leválasztva, centrifugálással történt a HIEC-6 sejtekből a TJ fehérjék kinyerése, hogy szendvics ELISA módszerrel meghatározható legyen a klaudin-1 és az okkludin koncentrációja a DT2 kezelést követően.

Elsőként megállapítottam, hogy a HIEC-6 sejtvonal megfelelő vizsgálati modell az élelmiszerekben előforduló mikotoxin szennyezések gyulladáskeltő és oxidatív stresszt előidéző tulajdonságainak meghatározására. Az eredményeim alapján az is kijelenthető, hogy mind a két sejtvonalnál (HIEC-6 és IPEC-J2), a nem-citotoxikus koncentrációban adott mikotoxin kezelések növelték az extra- és intracelluláris oxidatív hatásokat, illetve a gyulladást előidéző IL-6 és IL-8 citokinek termelődését. A DON, a T-2 toxin, illetve a DT2 szignifikánsan csökkentette a TJ fehérjék közül a klaudin-1 expresszióját, míg az okkludin koncentrációja nem változott szignifikánsan, HIEC-6 sejtek esetében 24 órás, míg IPEC-J2 sejtek esetében 72 órás kezelést követően. IPEC-J2 sejtvonalnál a DT2 kezelést követően alacsonyabb TEER értékeket mértünk, továbbá szignifikánsan csökkent a klaudin-1 fehérje koncentrációja, míg az okkludin koncentrációja nem mutatott szignifikáns eltérést. A TJ fehérjék mennyiségi változása összefüggésbe hozható a meggyengült sejtréteg integritással, melyet a TEER vizsgálatok is alátámasztanak IPEC-J2 sejtek esetében.

A 20 μ M koncentrációjú kvercetinnel végzett kísérletekben azt találtuk, hogy a 24 órás előkezelés mérsékelte az 1 μ M DON által kiváltott oxidatív stressz választ az IPEC-J2 sejteknél. Ezzel szemben az egy óráig tartó együttkezelés nem volt elegendő az

1 μM DON hatásának csökkentésére. Az 50 μM rozmaringsav 24 óráig tartó előkezelés hatására mérséklődött a DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) által indukált oxidatív stressz és a gyulladáscsökkentő citokin termelés az IPEC-J2 sejteknél. Az immunfluoreszcens festés alapján, a rozmaringsav előkezelés hatására a TJ fehérjék közül a kladin-1 kontrollhoz hasonló megoszlási mintázatát figyeltük a kombinációs kezelést követően, ezzel ellentétben a csak DT2 kezelést kapott sejtek kladin-1 festődésének intenzitása alacsonyabb volt a sejtmembránban. Szintén IPEC-J2 sejtekkel végzett vizsgálatunkban azt találtam, hogy az 1% és a 2% fermentált búzacsíra kivonat szignifikánsan megemelte a sejtek életképességét és először sikerült bizonyítanom, hogy a TEER értékek nőttek a fermentált búzacsíra kivonat hozzáadása után. Továbbá megállapítást nyert, hogy a 2% fermentált búzacsíra kivonat hatékonyan csökkentette az intracelluláris ROS mennyiségét, amikor együtt kezeltük 24 órán keresztül 8 μM DON-nal és 5 nM T-2 toxinnal.

Az IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérleteinkből kiderült, hogy a 24 órás előkezelés 20 μM kvercetinrel alkalmas volt arra, hogy csökkentse az 1 μM DON által indukált oxidatív stresszt. A 24 óráig tartó előkezelés 50 μM rozmaringsavval szignifikánsan mérsékelte a DT2 redox egyensúlyt befolyásoló és gyulladást indukáló hatását. Továbbá bizonyítottuk, hogy az 50 μM rozmaringsavval kezelt sejtek membránjában a kladin-1 fehérje jelenléte állandó maradt. Az 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonatot először vizsgáltuk mikotoxinok által előidézett oxidatív státusz helyreállításában az IPEC-J2 sejtekben. A kísérletünk alapján kijelenthető, hogy a 2%-ban alkalmazott oldat hatékony a 8 μM DON és az 5 nM T-2 toxin hatására kialakuló oxidatív stressz redukálásában.

Ezen kísérletek *in vitro* eredményei hozzájárulhatnak az antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkező természetes vegyületek előszűréséhez. A sejteken végzett kutatások során jótékony hatásúnak bizonyult bioaktív vegyületek a jövőben étrend- és takarmány kiegészítőként kerülhetnek felhasználásra, amennyiben további *in vivo* vizsgálatokkal megerősítést nyer, hogy a kiválasztott védő anyagok biztonságosan és hatékonyan alkalmazhatóak kísérleti állatokban, haszonállatokban is.

2. Bevezetés

Napjaink egyik nagy problémája a Föld népességének ugrásszerű növekedése mellett a globális klímaváltozás, ami jelentős hatást gyakorol gazdasági haszonállat tenyésztési körülményeire, ezáltal a megfelelő mezőgazdasági termékek előállítására, ami mellett is biztosítani szükséges az élelmiszerbiztonsági és az állatjóléti előírások teljes mértékű betartását. Ennek köszönhetően napjainkban kiemelt hangsúlyt fektetnek a takarmány összetételének, eredetének és minőségének fokozott ellenőrzésére. A növényi takarmányban megtalálhatók a haszonnövényeket megfertőző, penészgombák által termelt másodlagos anyagcsere melléktermékek, a mikotoxinok. Giorni és munkatársai (2020) 4 rizsfajtából gyűjtöttek mintát, 3 különböző növényfenológiai szakaszban. Megmérték az összes fenol tartalmat (TPC) és összefüggést találtak a penészgombák (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. és *Penicillium* spp.) előfordulása és a TPC között. Azt találták, hogy a ferulinsav és a protokatekuinsav a növekedési időszakban eltérő mennyiséget mutatott a gombák előfordulásának függvényében és a vegyületek pozitívan korrelálnak a *p*-kumársav mennyiségével, ezek szerepet játszhatnak a szántóföldi penészgomba fertőződés visszatartásban. A gombafertőzés során romlik a termés minősége és takarmány- és élelmiszerbiztonsági kockázatot hordozhat annak fogyasztása. Így nem csak a csökkenő előállított mennyiségi fog problémát okozni az élelmiszer- és takarmányellátásban, hanem a minőségi romlás, a fertőzött gabona fogyasztása is további sokrétű egészségügyi gondokat okozhat, mind az emberekre, mind a haszonállatokra egyaránt.

A *Fusarium* fonalas penészgomba fajok a szántóföldön fertőzik a gabonaféléket és képesek a trichotecén-vázzal rendelkező mikotoxinok előállítására (Kimura et al., 2007, Merhej et al., 2011). Főként a *Fusarium graminearum* és a *Fusarium sporotrichioides* fajok felelősek a fuzáriotoxinok termeléséért, amelyek Magyarországon is előfordulnak (Tima et al., 2016b, Bánáti et al., 2017). Ezek a fajok szimultán fertőzhetik a növényeket (Nagaraja et al., 2016), a mikotoxinjaik pedig szinergista módon fokozhatják egymás élő szervezetre kifejtett negatív hatásait (Sobral et al., 2018). A DON és a T-2 toxin a két legjelentősebb trichotecén-vázis mikotoxin, melyek táplálékban és takarmányban előfordulva mérgezést okozhat emberekben és állatokban egyaránt (Kaukoranta et al., 2019). Jelen lehetnek búzában, rozsban, árpában, zabban és egyéb gabonafélékben, valamint alacsony koncentrációban felfedezhetők olyan kész termékekben, mint a sör (Arrúa et al., 2019), a reggeli müzli pehely (Martins és Martins, 2001, Kuchenbuch et al., 2018) és a kenyér (Ámbrus et al., 2011).

A növényekben termelődő másodlagos anyagcsere melléktermékek közül a polifenolok bizonyítottan jótékonyan járulnak hozzá a szervezet védekező képességéhez (McDougall, 2017; Williamson, 2017; Hashem et al., 2020). Szerkezeti eltérésük miatt

különböző és változatos módon járulnak hozzá az egészségmegőrzéshez. A polifenolokat feloszthatjuk kémiai szerkezetük alapján flavonoid és nem-flavonoid típusú vegyületekre. A flavonoidok közül a kvercetin a gyümölcsök húsában és héjában található meg, a nem-flavonoid típusú polifenolok közé tartozik a rozmaringsav, mely a *Lamiaceae* családba tartozó fűszernövényekben (rozmaring (*Rosmarinus officinalis* L.), kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) található meg a legnagyobb mennyiségben. A búzacsírában megtalálható vegyületeket, vizes közegben, fermentálással aktív vegyületekké lehet tenni, így keletkezik a fermentált búzacsíra kivonat. Ebben az esetben nem egy vegyület hatásáról van szó, hanem egy keverékről, amelyben a 2,6-dimetoxi-benzokinon (DMBQ), 2-metoxi-benzokinon, flavonoidok és más antioxidáns hatással rendelkező vegyület is megtalálható. A növényi antioxidánsok *in vitro* kutatása elősegítheti a mikotoxinok által okozott bélrendszer eredetű megbetegedések kivédését, illetve hatékony kezelését ezen védő hatású bioaktív vegyületek takarmány-kiegészítőként való felhasználásának köszönhetően.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Bélbarrier, mint védelmi vonal

3.1.1. Általános jellemzés

A bélhám felülete a humán vékonybélben, legújabb mérések alapján körülbelül 32 m², ezen keresztül érintkezik a külső környezettel (Helander és Fändriks, 2014). A bélhámon keresztül valósul meg a tápanyagok, a víz és az ionok felvétele. A bélhámsejtek a szelektív abszorpción kívül egy barriert formálnak a lumen és a lamina propria között, amely nem engedi át a toxinokat és a fertőző ágenseket. Ez a védelmi vonal az epitél sejtekből, immunsejtekből és a bélben élő mikrobiótából áll, amelyek hatással vannak egymásra és befolyásolják a bélhám integritását, valamint annak védekezését bizonyos xenobiotikumokkal és patogén mikrobákkal szemben (Takiishi et al., 2017). A bélben élő mikroorganizmusok metabolizálhatják a bélbe került gyógyszermolekulákat (Zimmermann et al., 2019) és toxinokat (Kohl et al., 2014), továbbá szabályozhatják a szervezet immunrendszerét a lumenbe szekretált anyagcsere melléktermékeik segítségével (Schluter et al., 2020, Shin et al., 2019). A bélhám az alatta elhelyezkedő lamina propriához rögzül a bazális membrán révén. A bélhámot több sejttípus alkotja, amelyek a kripta-bélboholy tengelyen helyezkednek el. A bélboholy területén helyezkednek el a kehelysejtek és az enterociták. A Lieberkühn kriptában találhatóak az enteroendokrin sejtek, a Paneth sejtek és az osztódó őssejtek. A bélhám embernél 4-5 nap (Darwich et al., 2014), sertések esetében 2-3 nap (Verdile et al., 2019) alatt újul meg teljesen. Az őssejtek aszimmetrikus osztódása után a progenitor sejt érett sejtté differenciálódik és aktívan migrál a bélboholy felé (Kopf és Sixt, 2019). A kriptában olyan niche található, ahol a növekedési faktorok és hormonok hatására különböző sejtvonalakat tud létrehozni, leggyakrabban epitél sejteket (Spit et al., 2018).

3.1.2. Reaktív oxigén fajták és az oxidatív stressz

Az állat- és növényvilágban, valamint a gomba taxonokban az oxidatív (vagy redox) állapot központi szerepet játszik a biológiai folyamatokban. Az állati sejtekben lévő redox rendszer erősen konzervált, viszont a taxonok között jelentős különbségek lehetnek a prooxidáns és az antioxidáns vegyületek mennyiségében (Costantini, 2019). A redoxreakciók és a szabadgyökök képződése fontos jelátviteli szerepet töltenek be a sejttanyagcserében. A szabad gyökök olyan molekulák, amelyek egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak a legkülső elektronhéjon és melyeket szerkezetük és eredetük alapján több csoportra osztottak fel: reaktív oxigénfajtákra (ROS) és reaktív nitrogénfajtákra (RNS). Ezeket a szakirodalomban kulcsszereplőként határozták meg az oxidatív stressz sejtés és

biokémiai folyamatainak elindításában, közvetítésében és szabályozásában (Zarkovic, 2020).

A ROS molekulák csoportjába tartozik a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) és a hidroxilgyök (OH \cdot), melyek párosítatlan elektronokkal rendelkeznek, ezért erősen reaktív jellegűek és képesek reakcióba lépni a sejt fehérjéivel, lipidjeivel és a sejt DNS-ével is. A hidrogén-peroxid (H_2O_2) az oxigén nem-gyökös kételektronos redukciós terméke, egy aerob metabolit, amely szignálmolekulaként funkcionálhat (Stone és Yang, 2006). A metabolikus úton keletkezett H_2O_2 szerepet játszik redox jelátviteli utak modulálásában (Sies, 2014). A ROS több jelátviteli út módosításában is szerepet játszik (Ray et al., 2012; Schieber és Chandel, 2014). Modulálhatják az osztódás és életképességhez köthető útvonalakat, úgy, mint a MAPK (Son et al., 2013) és a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) útvonalakat. Az utóbbit Matsuda és munkatársai (2018) összefoglaló munkájukban írták le, mint egy tumor szupresszor gént, amely az oxidatív stresszre válaszul módosítja egyes antioxidáns gének expresszióját.

A ROS fajták fiziológias körülmények között termelődnek a mitokondriumokban (Murphy, 2009), illetve a NADPH-oxidáz (NOX) enzimcsalád révén (Lassègue et al., 2012), mely nem tekinthető kóros folyamatnak. Viszont sejtkárosító ágensek hatására gyorsan megnőhet intracellulárisan a szabad gyökök termelődése és oxidatív stresszt okozhatnak (Winterbourn, 2008). Akkor alakul ki oxidatív stressz, ha a ROS koncentrációja meghaladja a sejt antioxidáns kapacitását. A szabad gyökök közül a OH \cdot reakcióba tud lépni a sejtmembránokban nagy koncentrációban jelen lévő többszörösen telítetlen zsírsavakkal (polyunsaturated fatty acids – PUFA), amelynek következménye a lipidperoxidáció. A lipiddoménben a lipidperoxidáció növelni fogja a membrán kettős rétegének rendezettségét, csökkenteni fogja az elektromos rezisztenciát a sejtrétegben és elő fogja segíteni a foszfolipid cserét a két egyrétegű membrán között. Lipidperoxidáció hatására a membránfehérjék térhálós szerkezetet vesznek fel, mellyel a rotációs és a laterális mobilitásuk csökken (Richter, 1987). Továbbá növekedni fog a malondialdehid (MDA) koncentrációja, végső soron pedig károsodik a membrán integritása. Fiziológias körülmények között az MDA elsősorban a fehérje-lizin-maradékok ϵ -amino-csoportjaival lép reakcióba és fehérje keresztkötéseket okoz (Bartsch és Nair, 2004). A lipidperoxidáció során létrejövő metastabil végtermék, az MDA fehérje- és DNS-adduktokat képezhet (Zimmerman et al., 2017).

A prooxidáns vegyületek ellensúlyozására a sejtek intracellulárisan enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsokat tartalmaznak. Az antioxidánsok, melyek alacsonyabb koncentrációban vannak jelen a sejtben, olyan vegyületek, melyek megvédik a sejt lipidjeit, fehérjeit és nukleinsavait a peroxidatív károsodástól. Az egyik ilyen vegyületcsoport a tiol származékok, mivel képesek reagálni a szabad gyökökkel és erős a redukáló képességük

(Baba és Bhatnagar, 2018). Az antioxidáns védelmi rendszer enzimatis tagjai közé sorolják a glutation-peroxidázt, a szuperoxid-dizmutázt (Valko et al., 2007, Circu és Aw, 2012, Bhattacharyya et al., 2014) és a katalázt is. A GSH egy mindenütt jelenlévő tioltartalmú tripeptid, amely a ROS eltávolításával segíthet megakadályozni az oxidatív stresszt (Kwon et al., 2019). A sejten belüli GSH vagy szabadon, vagy fehérjékhez kötve található meg. A glutation-reduktáz enzim visszaállítja az elérhető redukált GSH-t oxidált formájából (glutation-diszulfid, GSSG). A sejten belüli redukált és oxidált GSH aránya jól használható marker a sejt oxidatív állapotának megállapításában (Zhao et al., 2009). A szakirodalomban található adat arra nézve, hogy a ROS modulálhatja az antioxidáns gének kifejeződését befolyásoló útvonalakat (Nrf-2 (Ma, 2013), Ref-1 (Pines et al., 2005)).

Az oxidatív stressz negatívan befolyásolja a bél integritását, hiszen ha megváltozik a sejt oxidatív állapota, akkor sérülhetnek a sejten található lipid- és fehérjemolekulák, valamint a DNS szerkezete (Serreli et al., 2017). A bélben megnövekedett oxidatív stressz a humán bélbetegségek közül például a gyulladós bélbetegség (IBD) kialakulásához vezethet (Blázovics et al., 2004; Dudzińska et al., 2018).

3.1.3. Gyulladásos citokinek jelenléte a bélhámban

A bélben a gyulladás egy összetett biológiai folyamat, amelyben a bélhámsejteken kívül az immunrendszer alakos elemei és mediátor molekulák vesznek részt (van Wijk és Cheroutre, 2010; Vereecke et al., 2011; Arranz et al., 2013; Dickson et al., 2020). A citokinek fontos közvetítő fehérjék és nélkülözhetetlenek az immunrendszer kommunikációjában. A kemotaktikus aktivitással rendelkező citokineket kemokineknek nevezik. A gyulladást elősegítő citokinek (IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 és IL-18) és a gyulladásgátló citokinek (IL-10, IL-4, TGF- β) közötti egyensúly fontos az immunválasz homeosztázisában (Boshtam et al., 2017). A gyulladásos citokinek közül a TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 és IL-18 felelősek a gyulladás kialakulásáért és fenntartásáért a vékonybélben, ahol az enterociták is képesek ezeket a citokineket termelni (Kucharzik et al., 2005; Kaplanski, 2018; Xue és Falcon, 2019). Gyulladás esetén ezeknek a citokineknek a megnövekedett génexpressziója vagy fehérjeszintű megjelenése figyelhető meg (Sanchez-Munoz et al., 2008). A ciklooxygenázok és a lipoxigenázok fontos gyulladásos mediátorok, amelyek a többszörösen telítetlen zsírsav, az arachidonsav lebontásában vesznek részt (Çolakoğlu et al., 2018). Az arachidonsav kaszkád révén olyan vazoaktív vegyületek jönnek létre, melyek módosíthatják az ér tágasságát, így az átfolyó vér mennyiségét is (Chawengsub et al., 2009).

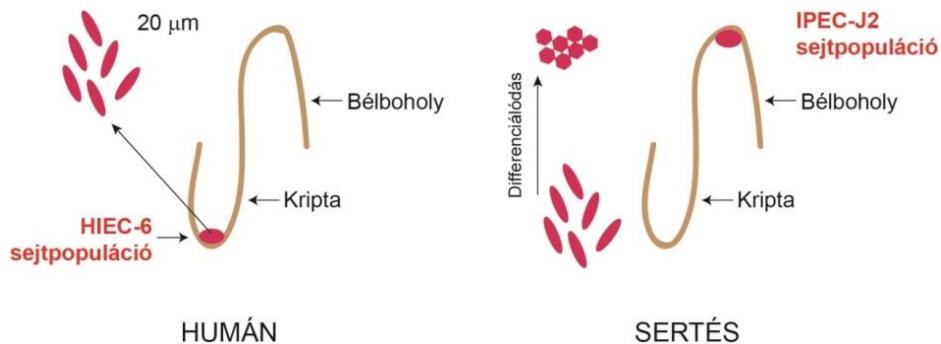
3.1.4. Szoros sejtkapcsoló struktúrák a bélhamban

Az enterociták polarizált sejtek, amelyeknél elkülöníthető a két plazma membrán területe. Az apikálisan elhelyezkedő részük a lumen felé orientált és mikrovillusokkal tagolt, míg a bazális membránhoz közel a bazolaterális felük található. Az enterocita sejtek között az integritást a szoros sejtkapcsoló struktúrák (TJ) biztosítják (Cao et al., 2012), több protein komplex jelenléte két epitél sejt között képes kialakítani a szelektív átjárhatóságot, vagy lezárni a transzportot a paracelluláris téren keresztül. Ezek a sejtkapcsoló struktúrák a membránhoz kötötten fordulnak elő, övszerűen veszik körül az adott sejtet és kötik össze a két szomszédos enterocitát (Pearce et al., 2018). Ez lehetővé teszi, hogy a bélhám barrier integritását a TEER méréssel és a TJ fehérjék mennyiségi és elosztásbeli változásával vizsgáljuk (Pageot et al., 2000). A TEER értékek meghatározásával kvantitatívvá válik a sejtek közötti kapcsolatok szorossága, míg a TJ felépítésében részt vevő fehérjék lezárják a bélhámsejtek között a paracelluláris teret, ezáltal csökkentve a molekulák átjárhatóságát (Garcia-Hernandez et al., 2017). A bélhámnál a paracelluláris térhez való hozzáférést a klaudin családba tartozó klaudin-1, -3, -4, -5, és -8 szabályozza, továbbá megtalálhatóak még itt az okkludin és zonula okkludenst felépítő fehérjék. Az okkludin kapcsolatban van a klaudin fehérjékkel és szabályozza az intermembrán és a paracelluláris terek átjárhatóságát (Al-Sadi et al., 2011; Romero et al., 2016). Emiatt a klaudin fehérjék génexpressziójának megváltozása hatással lesz az epitél sejtek közötti szoros sejtkapcsolatra. A klaudin-1 főleg a membránban fordul elő és a bélhám barrier felépítésében vesz részt, ellentétben a klaudin 10, klaudin-15 és klaudin-17 fehérjékkel, melyek a kationos és anionos pórusok létrehozásában fontosak (Günzel és Yu, 2013). Több kutatás alátámasztja, hogy egyes táplálékokban előforduló anyagok erősítik a bélhám TJ fehérjéinek expresszióját, ezzel növelve a sejtek közötti integritást (Suzuki és Hara, 2009, Song et al., 2011, Ji et al., 2016, Zhao et al., 2019). Élelmiszerekből származó toxinok megbonthatják ezt a TJ gátat, amelyen keresztül patogén baktériumok juthatnak be szervezetbe (Goossens et al., 2012; Ling et al., 2016). A membránban elhelyezkedő fehérjék internalizációja az endocitózis útvonalának első lépése, melyben több útvonal is részt vesz. Az általános felosztás szerint lehet klathrin-függő és klathrin-független endocitózis. A klathrin-függő internalizációt a plazmamembrán doméneiben, az úgynevezett klathrin-bevonatú mélyedésekben kialakuló kis klathrin-bevonatú vezikulák közvetítik. Epitélsejtekben a klathrin-mediált endocitózis kritikus fontosságú a transzmembrán TJ (klaudinok és okkludin) fehérjék eltávolításában a plazmamembránból, mely végül a TJ komplex disszociációjához vezethet (Stamatovic et al., 2017).

3.2. *In vitro* nem-daganatos bélhámsejt modellek

Az *in vitro* bélhám modellek alkalmasak a toxicitási folyamatok modellezésére. Attól függően, hogy daganatos vagy normál sejtvonalat alkalmazunk a kísérletekben eltérő eredmények jöhetnek ki, mivel a daganatos sejtek eltérő metabolizmusa van (Romero-Garcia et al., 2011). A nem-daganatos sejtek alkalmazása pontosabb eredményeket ad arról, hogy a szervezetben milyen módon lépnek kapcsolatba a vizsgált xenobiotikumok a bélhámsejtekkel. Humán bélhámsejteket alkalmazó kísérleteknél azonban mégis a széles körben elérhető emberi kolorektális adenokarcinóma sejtvonalat (Caco-2) alkalmazzák. A Caco-2 használata elterjedt a xenobiotikumok felszívódásának modellezésére is annak ellenére hogy az abszorpció elsődleges helye a vékonybélben van. Sertés sejtvonalak esetében több nem-daganatos eredetű áll rendelkezésre. Sertés vékonybélhám sejtvonalból a két leggyakrabban használt az IPEC-1 és az IPEC-J2. Az IPEC-1 sejtek metabolizmusa alacsonyabb és mérsékelt az oxigén- és a glükóz felhasználásuk. Morfológiailag és funkcionálisan kevésbé polarizáltak az IPEC-J2 sejtekben megfigyelthez képest (Nossol et al., 2015).

A humán eredetű HIEC-6 és a sertésből nyert IPEC-J2 sejtvonalak a vékonybél területéről származnak és nem-daganatos eredetűek. A különbség a két sejtvonal között, hogy a humán intesztinális kripta sejtek (human intestinal epithelial crypt cell-6, HIEC-6) nem képesek differenciálódni, míg a sertés intesztinális hámsejtek (intestinal porcine enterocytes–jejunum-2, IPEC-J2) spontán differenciálódnak, 8-10 nappal a kiültetés után (1. ábra).



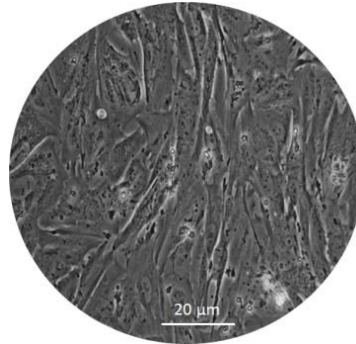
1. ábra: A munkám során használt két sejtvonal elhelyezkedése a bélben. A HIEC-6 sejtek a kripta körül helyezkednek el. Morfológiájukat tekintve orsó alakúak és összefüggő hálózatot alkotnak. Az IPEC-J2 sejtek a bélboholy tengelyén a kripta felől felfelé haladva differenciálódnak érett enterocitákká. A polarizáció során elveszítik az orsó formát és egyrétegű hengerhámot fognak alkotni, melyet szoros sejtkapcsoló struktúrák kötnek össze.

3.2.1. HIEC és HIEC-6 sejtek bemutatása

A HIEC-6 egy nem-daganatos, főtális humán vékonybélhám eredetű sejtvonal, amelyek a kriptákban találhatóak, képesek proliferációra, de nem differenciálódnak bélhámsejteké a tenyésztés során (Benoit et al., 2010) (2. ábra). Takenaka és munkatársai (2014) humán felnőtt bél őssejtekből differenciáltattak humán vékonybélhám, HIEC sejteket. A morfológiailag már differenciálódott HIEC sejtek egyrétegű polarizált oszlopos hámot alkottak, az apikális felszínükön mikrovillusok helyezkedtek el, valamint TJ fehérjékkel és dezmoszómmakkal kapcsolódtak egymáshoz, 8 nappal a kiültetés után. Kísérleteikben összehasonlították a HIEC sejteket a Caco-2 sejtvonallal a gyógyszerhatóanyag felszívódása szempontjából. A differenciáltatással létrehozott HIEC sejtek hatóanyag-metabolizáló enzim és transzporter génexpressziós mintázatában nem találtak szignifikáns különbségeket a Caco-2 sejtekkel összehasonlítva. A paracellulárisan szállított vegyületek (fluorescein-izotiocianát-dextrán 4000, atenolol és terbutalin) és a nukleozidszállító szubsztrátok (didanozin, ribavirin és doxifluridin) látszólagos permeabilitási értékei a HIEC sejtrétegnél szignifikánsan magasabbak voltak, mint a Caco-2 sejteknél. Ezzel szemben a transzcellulárisan szállított gyógyszerek (pindolol és midazolám) egyformán jól áthatoltak mindkét sejtvonalnál. Egy későbbi vizsgálatukban Takenaka és munkatársai (2016) bizonyították effúzió-alapú elemzéssel, 194-898 molekulatömegű polietilén-glikol-oligomereket használva, hogy a HIEC és a Caco-2 sejtréteg paracelluláris pórusai 2 különböző sugárral (~5 és 9-14 Å) rendelkeznek, a nagy pórusok porozitása szignifikánsan magasabb volt a HIEC egyrétegben (44×10^{-8}), mint a Caco-2 sejtekben (4×10^{-8}). Az összehasonlításukban arra jutottak, hogy a HIEC sejtréteg előnyösebb a vegyületek emberben történő felszívódásának rangsorolásában és előrejelzésében, mint a Caco-2 sejtek (Takenaka et al., 2016). Schwartz és munkatársai (2005) vizsgálták, hogy a HIEC sejtekre hogyan hat a T-sejtek által termelt IL-17 citokin. Az eredményeik alapján az IL-17 hatására lebomlott a NF- κ B, így az általa szabályozott IL-6 és IL-8 gének indukálódtak. A NF- κ B transzkripció faktor kulcsszerepet játszik a DNS transzkripciójában, a citokin termelésében és a sejtek túlélésében, ezáltal irányítva a sejt immunitását, gyulladást, stressz választ, valamint a proliferációját és az apoptotikus választ (Al-Ashy et al., 2006).

Zhu és munkatársai (2019) vizsgálták egy fenolos sav, a galluszsav hatását, IL-1 β -val indukált HIEC-6 sejteken. Az eredményeik azt mutatták, hogy a galluszsav beadása szignifikánsan növelte az IL-4 és az IL-10 expresszióját, míg alul szabályozta az IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, TGF- β és TNF- α expresszióját a kontroll csoporthoz képest. Ez a kísérlet bizonyította, hogy a polifenolok képesek a HIEC-6 sejtekben csökkenteni a gyulladást citokinek mennyiségét. Szintén táplálkozás útján juthat be az emberi béltraktusba a cilindrospermopszin, egy cianobaktériumok által termelt toxin. Chichova és munkatársai

(2021) azt találták, hogy a toxin dóziszfüggő módon csökkentette a HIEC-6 sejtek életképességét. Arra a következtetésre jutottak, hogy a cilindrospermopszin mérsékelten mérgező az emberi bélhámsejtekre, továbbá gátolhatja a hámréteg regenerálódását is.



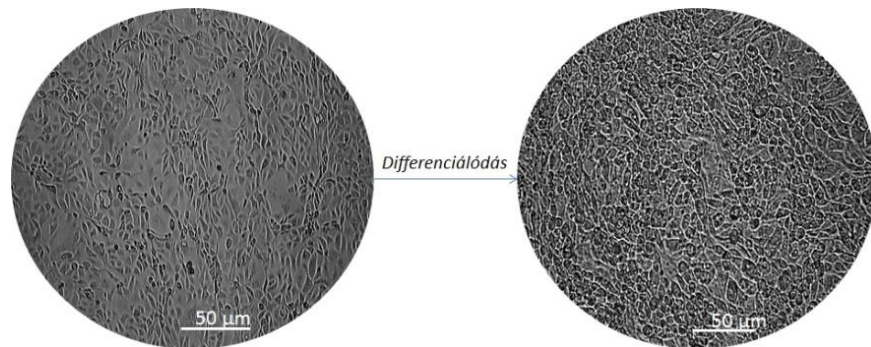
2 ábra: A HIEC-6 sejtek morfológiája 500x nagyításban. A fehér vonal 20 μm méretet jelöl. A kép 48 órával a kiültetés után készült, a kísérletek megkezdése előtt (saját felvétel).

3.2.2. IPEC-J2 sejtvonaltulajdonságai

Az IPEC-J2 sejtvonaltulajdonságai egy nem tumoros, neonatális sertés vékonybélhám eredetű sejtvonaltulajdonságai, amelyet újszülött sertés jejunumból izoláltak, még a kolosztrális anyatej felvétele előtt. Epiteliális morfológiát mutatnak, gyors proliferációs és kolonizációs képesség jellemzi a sejteket, emiatt már 1-2 hét alatt kialakulhat az *in vivo* sejtekre jellemző egyrétegű, polarizált (differenciálódott) sejtréteg (Geens és Niewold, 2011; Vergauwen, 2015) (3. ábra). A differenciálódás során a sejtek között TJ alakul ki a kladin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -12, a tricellulin, az okkludin, E-kadherin és a zonula okkludens-1 sejtkapcsoló fehérjék segítségével (Brosnahan és Brown, 2012; Vergauwen, 2015), valamint mikrovillusok is megfigyelhetők (Schierack et al., 2006). A mukóza termelésük, *in vitro* körülmények között függ a tápfolyadékba adott szérumtól, sertés szérum esetén megnő a termelés (Schierack et al., 2006; Zakrzewski et al., 2013). Képesek citokineket és kemokineket expresszálni. A mRNS-ek esetében a Toll-like receptorok (TLR) közül kimutatták a TLR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -10-t (Arce et al., 2010), az interleukinok (IL) közül az IL-1 α , -1 β , -6, -7, -8, -10, -12A, -12B, -15, -18-t (Mariani et al., 2009). Fehérjeszinten kimutatták az IPEC-J2 sejtek IL-6 és IL-8 termelődését a sejteknél (Arce et al., 2010; Razzuoli et al., 2013).

Az IPEC-J2 sejteket széleskörűen alkalmazzák *in vitro* vizsgálatokban, mert megfelelő körülmények között képes fennmaradni és differenciálódni, annak ellenére, hogy a sejtvonaltulajdonságai nem daganatos eredetű. A sejtvonaltulajdonságai jól modellezi a humán *in vivo* körülményeket is, mivel a majomféléken kívül a sertés bélrendszere áll legközelebb az emberéhez (Zhang et al., 2013; Gonzalez et al., 2015; Nossol et al., 2015). Az IPEC-J2 sejtvonallal jól vizsgálhatók a kölcsönhatások a bélhám és baktériumok (Liu et al., 2010; Spitzer et al., 2016), vírusok (Jung et al., 2018), valamint különféle molekulák között, ha az enterocitákra

kifejtett hatásaikat kívánják vizsgálni (Farkas et al., 2015; Palócz et al., 2016; Pászti-Gere et al., 2016; Karancsi et al., 2020; Kovács et al., 2020).



3. ábra: Az IPEC-J2 sejtek fénymikroszkópos képe 100x nagyításban. A bal oldali felvételen a kiültetést követő napon, a jobb oldali fotó 10 nappal a kiültetés után készült. Látható, hogy a sejtek és az egyrétegű bélhám morfológiája változik a differenciáció során. A vonal 50 µm méretet jelöl (saját felvétel).

3.3. *Fusarium* gombák és mikotoxinjaik

A penészgomba megnevezés egy megjelenési formát jelöl, nem egy rendszertani kategóriát. Az ide sorolt járomspórás gombák (*Zygomycota*), tömlősgombák (*Ascomycota*) és imperfekt gombák (*Deuteromycota*) egy laza telepszerkezetet hoznak létre, de nem fejlesztenek makroszkopikus termőtestet (Zukiewicz-Sobczak, 2013). A penészgombák főleg aerob, heterotróf élőlények, melyeknél ritkán fordul elő az ivaros szaporodás (Nieuwenhuis és James, 2016). Jelenlétük gazdasági és egészségügyi problémát jelenthet a növénytermesztésben, az állattenyésztésben és az élelmiszeriparban, mivel az általuk termelt másodlagos anyagcsere-termékek toxikusak lehetnek az azt fogyasztó szervezet számára. Ilyen másodlagos anyagcsere melléktermék csoport a mikotoxinok, melyek szerkezete és hatásmechanizmusa jelentősen eltérhet. Lehetnek karcinogén (aflatoxin, Kumar et al., 2017, szterigmatocisztin, Díaz Nieto et al., 2018), immunszuppresszív (trichotecén-vázis mikotoxinok, Wu et al., 2017a), mutagén (zearalenon, Othmen et al., 2008), teratogén (aflatoxin, Supriya és Reddy, 2015), emetikus hatásúak (trichotecén-vázis mikotoxinok (deoxinivalenol (DON), a nivalenol (NIV) és a fuzarenon-X (F-X), Wu W et al., 2013). Egy mikotoxin több toxikus hatással bírhat, több mikotoxin egyidejű jelenléte pedig szinergista multitoxikózist okozhat a szervezetben (Creppy et al., 2004). Az egyes mikotoxinok okozta toxikózis súlyossága összefüggésben van a bevitt mikotoxin mennyiségével, az adagolás időtartamával, továbbá függ az élőlény fajtától, nemétől, egészségi és tápláltsági állapotától is (Zain, 2011).

Az *Ascomycota* taxonba tartozó *Fusarium* fajok (Sharma és Marques, 2018) is állítanak elő mikotoxinokat, ezek termelődését serkentik a gombát ért stressz faktorok. A mikotoxin termelésre hatással van a hőmérséklet, a relatív páratartalom, az elérhető

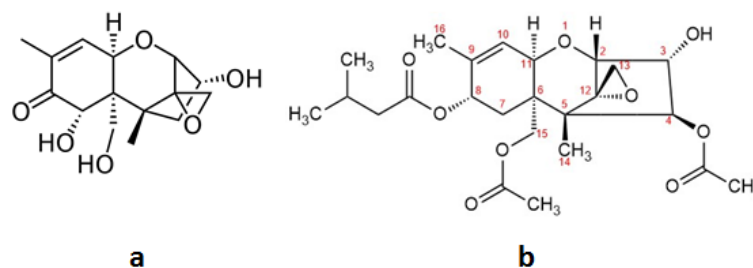
szubsztrátok mennyisége, a rovarok kártétele, a rovar- és gombairtó szerek és a gazdanövény faja (Nesic et al., 2014). Az, hogy milyen mikotoxinokat fog előállítani a gomba, függ a penészgomba fajától és fajtájától is (Jennings et al., 2004). A fuzáriotoxinokat több csoportba sorolhatjuk, kémiai szerkezet alapján megkülönböztetjük a trichotecén-vázás mikotoxinokat, a fumonizineket és a zearalenont (ZEA), valamint ezeknek a metabolitjait (Perincherry et al., 2019). Európában a domináns fajok közé tartozik a *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* és *Fusarium sporotrichioides* (Pasquali et al., 2016, Hellin et al., 2018), Magyarországon ezek közül a *F. graminearum* és a *F. culmorum* fordul elő, ezek elsősorban a trichotecén-vázás mikotoxinokat és a ZEA-t állítják elő (Tima et al., 2016b, György et al., 2020).

3.3.1. Trichotecén-vázás DON és T-2 toxin bélrendszerre gyakorolt hatásai

A trichotecén-vázás mikotoxinok kémiaailag tetraciklusos spiro-epoxi-szeszkviterpén vegyületek. A toxicitásának fő kémiai alapja a 12,13-epoxid gyűrű és a 9. és a 10. szénatom közötti kettős kötés, amelyek hatását tovább erősíti a 3. szénatomnál található hidroxil csoport (Wu Q et al., 2013).

A trichotecén-vázás mikotoxinokat többféleképpen lehet felosztani, de az egyik leggyakoribb a kémiai szerkezet alapján történő négy csoportba sorolás. A funkcionális csoportok jelenléte vagy hiánya alapján „A”, „B”, „C” és „D” típust különböztetnek meg (McCormick et al., 2011). A trichotecén-vázás mikotoxinokat több gomba nemzetség is képes előállítani, ezek közé közé tartoznak a *Fusarium* fajok (Proctor et al., 2018), amelyek az „A” és a „B” típusba tartozó, míg a „C” és „D” típusú trichotecén-vázás mikotoxinokat a *Myrothecium* és a *Cephalosporium* fajok termelik (McCormick et al., 2011; Ye et al., 2016). A „B” típusú trichotecének abban térnek el az „A” típusútól, hogy a 8. szénatomjukon karbonil csoport található. Ide tartozik a DON, a NIV és a F-X. Az „A” csoportba tartozik a T-2 toxin és a diacetoxiszcirpenol (DAS). A DON-nal, NIV-vel és ZEA-val végzett hőstabilitás vizsgálatok alapján, egy 30 perces hőkezelési intervallum alatt 240 °C-on a három toxin több mint 90%-a bomlott le (Yumbe-Guevara et al., 2003). A takarmányok előállítása során alkalmazott előkészítő fizikai aprítás és kémiai dekontamináció során sem csökken a koncentrációjuk (Karlovsy et al., 2016, Čolović et al., 2019). A DON és a T-2 toxin a két legjelentősebb trichotecén-vázás mikotoxin (4. ábra), melyek táplálékban és takarmányban előfordulva mérgezést okozhat emberekben és állatokban egyaránt (Liew és Mohd-Redzwan 2018). Ezen mikotoxinok által előidézett káros hatások közé sorolhatóak az anorexia, gastroenteritisz, hányás és különböző hematológiai betegségek (Adhikari et al., 2017; Wu et al., 2020). Tima és munkatársai (2016a) vizsgálták a DON, ZEA és T-2 toxin koncentrációját 116 gabona mintában, amelyeket a Dunántúl északi és déli megyéiből szereztek be. Mindegyik mintában kimutathatóak voltak a mikotoxinok alacsony mennyiségben, mindössze

egy búza mintában a DON koncentrációja magasabb volt a maximálisan megengedett mennyiségnél (1880 µg/kg). Az árpa és a zab esetében a DON és ZEA tartalom a határértéken belül maradt, míg a T-2 toxin vizsgálata során a legalacsonyabb átlagokat mérték. Ugyanabban az évben Tima és munkatársai (2016b) egy tanulmányban foglalták azt össze, hogy a három különböző magyar sertéstakarmány gyártó cég 45 mintájában milyen mértékben van jelen a DON, ZEA és T-2 toxin. Eredményeik alapján legnagyobb koncentrációban a DON (átlagosan 192,6 µg/kg kocáknak, 175 µg/kg malacoknak szánt takarmányban), majd a T-2 toxin (kocáknak átlagosan 40,6 µg/kg, míg 34 µg/kg a malacoknak szánt takarmányban), végül a ZEA (kocák részére átlagosan 21,6 µg/kg, a malacoknak szánt takarmányban 24,6 µg/kg) fordult elő a mintákban.



4. ábra: A deoxinivalenol (DON) (a) és a T-2 toxin (b) kémiai képlete.

A toxikózis mértéke függ az állat fajtától, ugyanis a monogasztrikus állatok, mint a sertés és a szárnyasok, érzékenyebbek a mikotoxinok többségére (Pierron et al., 2016). Ezt rumen hiányára vezetik vissza, ahol a mikrobióta nem degradálja a mikotoxinokat, emiatt sokkal súlyosabb formában léphetnek fel gasztrointesztinális zavarok és dermatotoxikus tünetek, nekrotikus és gyulladásszerű folyamatok, illetve idegrendszeri elváltozások (Forsyth et al., 1977; Hoerr et al., 1981; Pollmann et al., 1985; Nayakwadi et al., 2020). Ezzel ellentétben vannak olyan mikotoxinok, amelyek a rumenben válnak toxikusabbá. Erre lehet példa a ZEA, amelynek a metabolitjai, az α -zearalenol és a β -zearalenol mérgezőbbek az eredeti vegyületnél (Dänicke et al., 2005; Gruber-Dorninger et al., 2021). 1974-ben Schoental és Joffe beszámoltak Oroszországban kitört az alimentary toxic aleukia (toxikus leukopénia) (ATA) betegségről. A fogyasztott gabonából kivont vegyületek rágcsálókban hasonló tüneteket okoztak, mint emberekben. A betegség tünetei közé tartozott a bőrön megjelenő foltok, a nekrotikus angina, az extrém leukopénia, a többszörös bevérzések és a csontvelő állomány csökkenése. A *F. sporotrichioides* és *F. poae* gombákból vett későbbi mintavétel során kiderült, hogy azok T-2 toxint és más trichotecén-vázis mikotoxinokat termelnek (Joffe és Yagen, 1978). Napjainkban az emberi tápláléknak szánt zabban, az aratás és feldolgozás után 82-88%-kal csökken a T-2 toxin és deacetilált formájának, a HT-2 toxinnak a mennyisége, míg a termelődő melléktermékekben, melyeket takarmányként

értékesíthetnek, közel háromszorosára nőhet a mikotoxinok koncentrációja (Pettersson et al., 2011). A gabonaszemek maghéja, mint a korpa fő alkotórésze, magasabb koncentrációban tartalmaz mikotoxinokat (Kushiro, 2008).

A *Fusarium* fajok a DON két acetilált formáját is képesek előállítani, a 3-acetil-DON-t és a 15-acetil-DON-t, amelyek a DON prekursorai (De Boevre et al., 2012; Kadota et al., 2013; Alizadeh et al., 2016), illetve a T-2 toxin deacetilált formáját a HT-2 toxint (Edwards et al., 2009). Ezek együttesen megtalálhatók a gabonafélékben és az abból készült termékekben (Ok et al., 2013). A növények egy vagy több cukor molekulával konjugálják a szabad DON és T-2 toxin molekulákat (Lattanzio et al., 2012, Vidal et al., 2015), így a legtöbbször kimutatható konjugátum a DON-3- β -d-glükozid (Berthiller et al., 2005) és a T-2-3-O- α -glükozid (McCormick et al., 2012). Rasmussen és munkatársai (2012) vizsgálatukban azt találták, hogy a természetes körülmények között megfertőződött gabonában a magas DON tartalom pozitívan korrelál a DON-3- β -d-glükozid koncentrációjával. *Per os* felvételnél a DON gyorsan és majdnem teljesen felszívódik a gyomorból és a vékonybél proximális részéből (Dänicke et al., 2004). Ezzel szemben a cukorral konjugált mikotoxinok nem bomlanak le a vékonybélben és képesek elérni a vastagbél területét. Gratz és munkatársai (2017) leírták, hogy a mikotoxinok növényi eredetű metabolitjai kevésbé toxikusak a mikotoxin aglikon formájához képest, egészen addig, amíg a szervezetben a mikrobiota tagjai nem hidrolizálják a vegyületet, melynek révén hozzáférhetővé válik az aktív molekula a bélrendszerben és felszívódhat a bélhámsejteken keresztül.

Pestka és munkatársai (1987) sertésekkel végzett vizsgálatából kiderül, hogy a 75 $\mu\text{g}/\text{testtömeg kg}$ koncentrációjú 15-acetil-DON már emetikus tüneteket okoz, míg ugyanezt a hatást a DON 50 $\mu\text{g}/\text{testtömeg kg}$ koncentrációban váltja ki. Mishra és munkatársai (2014) vizsgálták a DON degradációját vizes közegben, különböző hőmérsékleten és pH szinteken. A vizsgálataik bizonyították, hogy az erősen savas közeg, mint amilyen a gyomorban lehetséges, elősegíti a DON deapoxi-deoxinivalenol (DOM-1) vegyületté történő átalakulását. A DOM-1 a DON-hoz képest kevésbé toxikus (Sundstøl Eriksen et al., 2004). A transzformációt képesek bélbaktériumok is elindítani enzimatikusan. A poligasztrikus állatoknál és a madaraknál a gyomor-bél traktus kezdete felé helyezkednek el azok a baktériumok, melyek képesek elvégezni a DON legalább részleges átalakítását DOM-1 molekulává, mielőtt elérné a vékonybelet, ahol a mikotoxin felszívódása megtörténhet. Ezzel szemben a monogasztrikus állatok esetében a vékonybél területe előtt nem történik meg ez az átalakulás (Springler et al., 2017). Zhang és munkatársai (2018) tanulmányában a T-2 toxin és a HT-2 toxin toxicitása megegyezett *per os* és intraperitoneális adást követően egerekben.

Sertéseknél kimutatták, hogy a takarmányban 1 mg/kg alatti DON terhelés nincs hatással, míg az 1 mg/kg-nél több DON-t tartalmazó takarmánynak kitett sertések növekedési teljesítménye visszaesett 77 napig tartó etetés alatt. Azt találták, hogy alig vagy egyáltalán nem volt hatással ez a mikotoxin a sertések nitrogén felhasználásra, amiből azt a következtetést vonták le, hogy a DON negatív hatásai nagyrészt a lecsökkent takarmányfelvételnek tudhatók be (Wellington et al., 2021). A takarmányfelvétel csökkenés hátterében a központi idegrendszer zavara is állhat. Flannery és munkatársai (2012) kimutatták egérkísérletekben, hogy intravénásan adva 1 és 5 mg/testtömeg kg DON-t 2,5-szeresére nőtt az YY peptid hormon (PYY) szintje, mialatt az állatok nem vettek magukhoz élelmet. Egészséges szervezetben magát a hormont a vékony és a vastagbél választja ki abból a célból, hogy csökkenjen a táplálék felvétele, a kóros megemelkedése vezethet problémákhoz. A másik vizsgált hormon, melynek szintje a DON hatására szintén megnőtt a kolecisztokinin (CCK) volt. Wu és munkatársai (2014) által mért plazmakoncentrációk alapján a *per os* DON fogyasztás esetében a CCK fontosabb szerepet játszik a táplálék visszautasításban, mint az PYY hormon. Egy másik vizsgálat szerint, a szájon át felvett toxin a gyulladásoos citokinek termelődésének serkentése révén vált ki takarmány-visszautasítást, úgy, hogy gátolja a nyelésben részt vevő izmokat (Abyssique et al., 2015).

3.3.2. A DON és a T-2 toxin sejtszintű mechanizmusai

A bélrendszerbe került mikotoxinok először, a legmagasabb koncentrációban a bélhámsejtekkel lépnek kapcsolatba. A krónikus toxin felvétel hatására megváltozhat az emésztőrendszer működése, amely megnyilvánulhat abban, hogy csökken a tápanyagok felszívódása és metabolizmusa (Sergent et al., 2006). Li és munkatársai (2018) megfigyelték, hogy a DON-nal kezelt csoportokban a jejunum hisztomorfológiai változásokon ment keresztül 5 hetes malacokban. Az eredményeik alapján a mikrovillusok ellaposodtak és összeforrtak, valamint a bélbolyhok apikális része nekrotizált. Ezek azt mutatták, hogy a DON rövidtávon elnyomhatja a malacok növekedési teljesítményét és megváltoztathatja a bélhormonok kiválasztódását. Továbbá a DON gátol egy nátrium-glükóz (SGLT-1) kotranszportert, ami felelős a bélben a víz abszorpciójáért (Maresca et al., 2002), ez lehet a magyarázata a DON felvételhez kapcsolódó hasmenésnek. A DON gátolja a cukrok bélből történő felszívódását, valamint egyes monokarboxilátok felvételét is (Dietrich et al., 2012). Molekuláris szinten a DON és a T-2 toxin az eukarióta sejtek 60S riboszóma alegységéhez kötődnek (Katika et al., 2015). A riboszómával való kölcsönhatás gátolja a fehérjeszintézis elongációs szakaszát, fehérjeszintézis gátláshoz vezetve (Bae és Pestka, 2008; Pestka, 2010, Bensassi et al., 2012). Akbari és munkatársai (2014) kimutatták, hogy a 1 órás, 1,39 μ M DON kezelés hatására megromlik a Caco-2 sejtréteg integritása. A DON

dózisfüggő módon csökkentette a klaudin-1, klaudin-3 és klaudin-4 fehérjék szintjét. T-2 toxin szintén koncentrációfüggő módon csökkentette a klaudin-3, klaudin-4 és okkludin fehérjék expressziós szintjét (Romero et al., 2016).

3.3.3. Oxidatív stressz kialakulása DON és T-2 toxin terhelést követően

A DON által indukált oxidatív stressz kárt okoz a mitokondriumban azzal, hogy lecsökkenti a mitokondriális membránpotenciált (Bin-Umer et al., 2011) és indukálja a kaszpáz -8, -9 apoptotikus faktorok termelődését (Zhang et al., 2009; Li et al., 2014). A folyamat végül sejthalálhoz, apoptózishoz vezethet (Pestka, 2008; Redza-Dutordoir és Averill-Bates, 2016; Chen et al., 2018; Habrowska-Górczyńska et al., 2019). A T-2 toxin oxigén szabadgyökök képzésével vált ki oxidatív stresszt (Yang et al., 2016) és lipidperoxidációs folyamatokat indukálva (Schuster et al., 1987) megváltoztatja a membránok szerkezetét, így károsítva a sejtmembrán foszfolipidjeit és lipoproteinjeit, ezáltal zavart okozva a sejtek közötti kommunikációban (Chance et al., 1979; Barrera, 2012; Su et al., 2019). Továbbá a T-2 toxin gátolhatja közvetlenül vagy a ROS közvetítette útvonalon is az antioxidáns rendszert (Wu et al., 2017b) és hatással van az antioxidáns enzimek kifejeződésére, aktivitására (Chaudhari et al., 2009).

3.3.4. DON és T-2 toxin által előidézett gyulladásoz folyamatok

A DON bélben való jelenléte gyulladásoz választ indukál a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α), IL-1 α , IL-1 β és IL-8 expressziójának szignifikáns növekedésével. Mindegyik gyulladásoz citokin szerepet játszik a gyulladásoz válasz indításában és amplifikálásában a bélhámsejtekben (Bamias és Cominelli, 2016). A DON károsítja a humorális és sejtközvetített válaszokat, megváltoztatja a szérumban az immunoglobulin-A (IgA) szintet és az IgA-hoz társuló nefropátiát okozhat egerekben (Greene et al., 1994). Sertésekben ezzel ellentétben az IgA nem változik, viszont az immunoglobulin-G (IgG) és immunoglobulin-M (IgM) szint megnő (Goyarts et al., 2006). Berek és munkatársai (2001) teszteltek nyolc fuzáriotoxint és ezek közül a T-2, F-X, NIV és DON mutatta a legerősebb immunszuppresszív hatást perifériás vér mononukleáris sejteiben. Kísérletükben csökkent a T- és a B-limfociták, valamint a természetes ölósejtek (NK sejtek) aktivitása. Savard és munkatársai (2015) sertéseknél mutatták ki, hogy a DON-nal szennyezett takarmány csökkent a sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus (PRRSV) elleni oltást követő antitestképződést. BALB/c egereken végzett kísérletekben a T-2 toxint 4 héten keresztül adták 0,5 mg/testsúly kg mennyiségben és megállapították, hogy a toxin növelte az IL-1 β , IL-6 és TNF- α gyulladásoz citokinek expresszióját (Lin et al., 2019). Caco-2 sejteken végzett kísérletek során a DON szignifikánsan növelte meg az IL-8 szintjét koncentráció-függő módon 0–16,85 μ M alkalmazott koncentráció tartományban 48 órás inkubációs idő után (Van de

Walle et al., 2008). Egy későbbi vizsgálatukban Van de Walle és munkatársai (2010) 24 órás DON-nak kitett Caco-2 sejtekben körülbelül 25-szeresére nőtt az IL-8, míg a COX-2 transzkripció szintje körülbelül 40-szeresére emelkedett. Kadota és munkatársai (2013) szintén dóziszfüggő IL-8 szintemelkedést tapasztaltak Caco-2 sejteken DON hatására 0,337–3,37 µM koncentráció tartományban.

3.3.5. DON és T-2 toxin határérték szabályozás

A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) 1993-as közleménye szerint a DON és a T-2 toxin a 3-as csoportba került, mely szerint a két toxin humán vonatkozásban nem karcinogén (IARC Monograph, 56, 1993).

2006-ban az Európai Unió megállapította a mikotoxin tartalom felső határértékét a humán fogyasztásra szánt élelmiszer-alapanyagokban és élelmiszerekben, továbbá javaslati értékeket határozott meg a gazdasági állatfajoknak szánt takarmány-alapanyagok és takarmányok esetében. Az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerekben a mikotoxin felső határértékeit a 1881/2006/EK rendelet szabályozza. A DON esetében 1 µg/testsúly kg megengedhető napi beviteli szintet (TDI), T-2 toxinnál 0,06 µg/testsúly kg ideiglenesen megengedhető napi beviteli szintet állapítottak meg. A DON mennyisége a közvetlen emberei fogyasztásra szánt gabonafélék, gabonalisztek, száraz tészta, korpá és csíra esetében 750 µg/kg. Továbbá a kenyér, pékáru, gabonapehely, keksz és gabonaszeleteknél ez az érték 500 µg/kg. Ezzel szemben a csecsemők és kisgyermekek számára készült gabonalapú élelmiszerekben 200 µg/kg a megengedett felső határérték. A feldolgozatlan gabonafélékben (a durumbúza, zab és kukorica kivételével) 1250 µg/kg, a durumbúzában, zabban és kukoricában 1750 µg/kg. A T-2 toxinnál nincs megadva felső határérték a termékekre vonatkozóan.

Az Európai Bizottság kibocsátotta a 2006/576/EK ajánlását a takarmányok mikotoxin szennyezettségére vonatkozóan. Kiegészítő és teljes értékű takarmányok esetében az ajánlás 5 mg/kg, kivéve a sertéseknek szánt takarmányoknál, ahol ez 0,9 mg/kg. A DON maximális tolerálható mennyisége malacoknál 200–500 µg/kg takarmány, sertéseknél 250–1000 µg/kg takarmány. 2016-ban elfogadták, hogy a 2006/576/EK ajánlás mellékletének helyébe a 2016/1319 ajánlás melléklete lép, mely a kedvtelésből tartott állatok takarmányában előforduló DON, ZEA és ochratoxin-A tekintetében való módosításáról szól. Összetett takarmányokban a DON-ra vonatkozó ajánlás 5 mg/kg 12% nedvességtartalmú takarmány. Viszont sertéseknél külön kiemelésre került, hogy 0,9 mg/kg takarmány az irányérték. A T-2 toxin és a HT-2 toxin együttes mennyiségére vonatkozóan egyedül a macskáknak szánt összetett takarmányok esetében található irányérték, mely 50 µg/kg, 12% nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan.

Mivel kevés *in vivo* adat áll rendelkezésre, ezért a glikozilált mikotoxin vegyületek koncentrációja nincs szabályozva az Európai Unióban, pedig az emésztőrendszerbe kerülve lebomlanak és megemelik a DON koncentrációját helyileg is, így fokozva a toxikus tüneteket (Nagl et al., 2014).

3.3.6. A mikotoxinokkal, illetve az általuk kiváltott egészségkárosodással szembeni védekezés lehetőségei

A takarmányokban előforduló mikotoxinok negatív hatásainak kivédésére számos fizikai és kémiai módszer áll rendelkezésre. A mikotoxinok fizikai módszerekkel történő mennyiségi csökkentése elsősorban a válogatás, a mosás, az oldószeres extrakció, a hőkezelés és az adszorpció révén valósulhat meg (Karlovsky et al., 2016; Liu et al., 2022). Az ideális mikotoxin adszorbens nagy megkötő kapacitással rendelkezik a mikotoxinokkal szemben, alacsony és nem specifikus kötődést mutat a tápanyagokhoz, valamint nagyfokú megbízhatóság, stabilitás és megfelelő íz jellemzi (Kabak et al., 2006). Az adszorpciós kötőanyagok komplexet képezhetnek a mikotoxinokkal, így megakadályozzák azok átjutását a gyomor-bélrendszerből az állatok keringésébe, szerveibe (Liu et al., 2022), így az adszorbeált mikotoxin a bélsárral ürülhet. Az aktív szén, mint általános adszorbens, nagy felülettel és kiváló adszorpciós képességgel rendelkezik vizes környezetben. Több tanulmány igazolta, hogy porózus szerkezetének köszönhetően képes csökkenteni a DON mennyiségét *in vitro* és *in vivo* sertésekkel végzett vizsgálatokban is (Devreese et al., 2014; Ying et al., 2021). Ahn és munkatársai (2022) alumínium-szilikátok DON-hoz való kötődését vizsgálták, és megállapították, hogy az adszorpció mértéke nem megfelelő a mikotoxin hatékony eltávolítása céljából. A szerves eredetű adszorbensek a mikroorganizmusok sejtfalának összetevőjéből származnak. A módosított glükomannán hozzáadása a T-2 toxinnal szennyezett takarmányhoz ellensúlyozta a sertések T-2 toxin által okozott csökkent súlygyarapodását és csökkentette a *Salmonella typhimurium* mennyiségét a vakbélben (Verbrugghe et al., 2012).

A DON kémiai technikákkal történő dekontaminálásánál a lúgos körülmények és az ózonos kezelések hatékonynak bizonyultak. A nátrium-karbonáttal végzett kezelések hatására szignifikánsan csökkent a DON mennyisége a kanadai árpatakarmányokban (Abramson et al., 2005). A búzákorpában a DON mennyisége 32%-kal csökkenthető 1 óráig tartó ózonos kezeléssel (Santos Alexandre et al., 2018).

A fizikai és a kémiai stratégiák egyike sem képes a takarmányban lévő mikotoxinok teljes eliminálására. Fontos irányvonal a táplálkozással kapcsolatos stratégiák kidolgozása. Az oxidatív stressz a mikotoxinok által okozott citotoxicitás egyik fontos összetevője, ezért az antioxidánsok hozzáadása a mikotoxinnal szennyezett takarmányhoz javíthatja a szervezet antioxidáns kapacitását és növelheti az állatállomány mikotoxinokkal szembeni ellenálló

képességét. Ezeket az immunrendszer működésének és a bélrendszer egészségének fokozására használhatják, mivel feltételezhető, hogy így az állat kevésbé lesz érzékeny a mikotoxinok toxikus hatásaira. A védő hatású anyagok közé tartoznak a prebiotikumok, a probiotikumok és a fitobiotikumok (Ferrer et al., 2015; Liao és Nyachoti, 2017). A fitobiotikumok a növényi eredetű anyagok széles skáláját foglalják magukban, mint például az illóolajokat és a gyógynövényeket. A fitogén takarmány-adalékanyagok használata a baromfi- és sertés takarmányozásban az utóbbi időben egyre nagyobb érdeklődésre tart számot. A nem-antibiotikus növekedésserkentőkkel, például a szerves savakkal és probiotikumokkal összehasonlítva, a fitobiotikumok viszonylag új takarmány-adalékanyagok. Többnyire a fitobiotikumok az antimikrobiális, az antioxidáns és a gyulladáscsökkentő hatásaiknak köszönhetően javíthatják a növekedési erélyt és csökkenthetik a mikrobiális fertőzés előfordulását (Gheisar és Kim, 2018; Holanda et al., 2021). Feltételezhető, hogy a növényekben megtalálható polifenolos vegyületek egyedi vagy kombinált antioxidáns tulajdonságai felelősek a jótékony hatásokért, azonban a hatásmechanizmusuk és az állati takarmányokban javasolt adagolásuk még nem teljes mértékben tisztázott (Mahfuz et al., 2021).

3.4. Növényi polifenol vegyületek általános jellemzése

Számos tanulmány vizsgálja a polifenolokban gazdag élelmiszerek fogyasztásának pozitív hatásait, mind a humán (D'Archivio et al., 2007, Marranzano et al., 2018), mind a gazdasági állatokban (Silva-Guillen et al., 2020, Hashem et al., 2020).

A polifenolok kémiaiilag változatos másodlagos anyagcsere melléktermékek. Legalább egy fenolos (aromás) gyűrűt tartalmaznak, amelyhez különböző funkciócsoportok, elsősorban hidroxil csoportok, kapcsolódhatnak (Kroymann, 2011, Ramakrishna és Ravishankar, 2011). A polifenolok bioszintézisének alapja a fenilalanin vagy tirozin aminosav, deaminálásuk során fahéjsavhoz jut a növény (Pereira et al., 2009). Ehhez a fenolos gyűrűhöz kapcsolódhatnak cukorkomponensek, karbonsavak, hidroxil-, metil- és szulfát csoportok kialakítva ezzel az adott polifenol származékokat (Tsao, 2010). Ha egy cukorkomponens adódik az aglikon alapvázhhoz, akkor glikozidnak hívjuk a keletkező vegyületet. Leggyakrabban glükóz kapcsolódik a flavonoidokhoz, de lehet arabinóz, galaktóz, glükoronsav, ramnóz és xilóz is (Kim et al., 2015). Ezzel az additív lépéssel megváltozik a molekula tulajdonsága az alapvegyülethez képest. Például jelentősen megnőhet a molekulatömege, megváltozhat a hidrofil jellege, ezáltal módosul a biológiai hatás és hasznosulás is az emlősök szervezetében (Morand et al., 2000, Felgines et al., 2000). A glikoziláció polárosabbá teszi a flavonoidokat, így megnőhet az oldhatóságuk és a stabilitásuk vizes közegben (Slámová et al., 2018).

Funkciójuk alapján főleg a növények leveleiben, rügyeiben, a gyümölcsökben halmozódnak fel, de a növényi szárban is kimutathatók (Lavola et al., 2012, Das et al., 2014). A növényt ért stresszhatásokra képződnek ezen vegyületek aglikon formában, elsődleges szerepük megvédeni a növényt a különböző stresszhatásoktól színanyagokként, antioxidánsokként vagy szubsztrátokként (Berini et al., 2018, Mazid et al., 2011). Selmar és Kleinwächter (2013) kimutatta, hogy a vízhiány okozta stressz hatására megemelkedik a növényekben a fenolos vegyületek, alkaloidok és izoprenoidok szintézise. Hasonlóan a vízhiányhoz, a megemelkedett UV-B sugárzás (Nascimento et al., 2015) és a kártevők jelenléte (Kovalikova et al., 2019) is képes indukálni a fenolos vegyületek mennyiségi növekedését a növényben. A flavonoidok és fenolos savak lehetnek szignál molekulák a mikorrhizák felé vagy részt vehetnek a patogén gombák elleni védekezésben (Ndakidemi és Dakora, 2003, Mandal et al., 2010). Összességében a növény polifenolos összetételét a külső stressz faktorok és az adott növény genetikája fogja meghatározni.

Az emberi és az állati szervezet nem képes előállítani polifenolokat, így ezek a vegyületek csak növényi eredetű táplálékkal juthatnak a testbe. Az elfogyasztott polifenolok biológiai hasznosulása függ a bélben történő felszívódástól, ezt az adott vegyület kémiai felépítése befolyásolja. Ez lehet a glikoziláltság-, illetve az észterezettség mértéke és a polimerizáltság foka. Az elfogyasztott ételmiszerben vagy takarmányban a polifenol molekulákat körbeveszik az élelmi rostok. Komplex felépítésű hálózatban található meg konjugálva más polifenolokkal módosítva az emésztőenzimek hozzáférhetőségét a vegyületekhez. A felszívódást továbbá befolyásolja még a bélben élő mikrobiota (Marín et al., 2015, Catalkaya et al., 2020). A mikroflórát jelentő mikroorganizmusok biológiailag aktív molekulákat juttatnak a bél lumenébe, melyek kölcsönhatásba léphetnek a polifenolokkal. Az aglikonok biológiai elérhetőségét tovább módosíthatja a bélben és a májban történő konjugáció (Manach et al., 2004, Bohn, 2014).

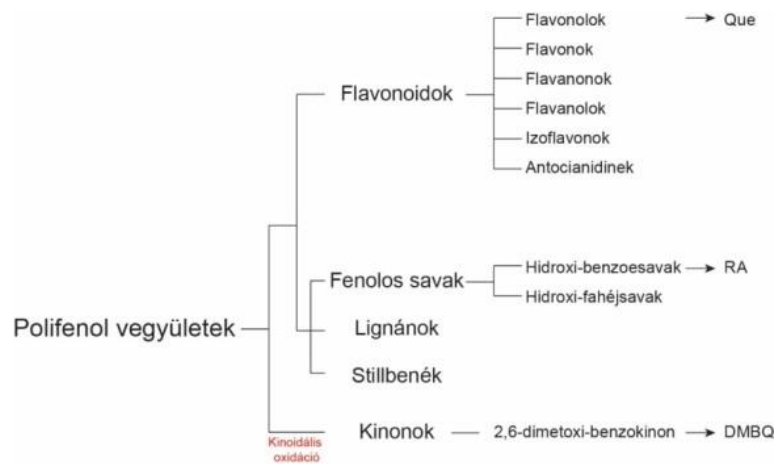
A polifenol aglikonok biokémiai tulajdonságai közé tartozik az antioxidáns hatás, melyet a kémiai szerkezet határoz meg. A fenolos gyűrű és a hidroxilcsoportok jelenléte jó elektron- és hidrogéndonorra teszi, így képes semlegesíteni a szabadgyököket és más reaktív oxigén fajtákat. Képesek továbbá direkt csökkenteni a ROS mennyiségét (Samoylenko et al., 2013), illetve gátolhatják a ROS termeléséért felelős enzimek működését, úgy, mint a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) (Morales et al., 2006, Calabro et al., 2018) és a xantin-oxidáz aktivitását (Mohos et al., 2019). A fémionokkal kelátokat képezhetnek (Leopoldini et al., 2006), ezáltal képes megkötni a fémionokat, megakadályozva ezzel a Fenton-reakció kialakulását és a lipidperoxidációt (Cheng és Breen, 2000). Zha és munkatársai (2020a) bebizonyították, hogy a flavonok közé tartozó baicalin rézzel együtt történő beadása segít fenntartani az optimális növekedést és növelheti az antioxidáns kapacitást a DON-nal szennyezett takarmányt fogyasztó malacoknál. A baicalin-cink

kiegészítés visszaállíthatja a DON által kiváltott tápanyag felszívódási zavart, és antioxidáns védelmet nyújthat a túlzott oxidatív stressz ellen (Zha et al., 2020b).

A polifenolok immunmoduláló hatását különböző vizsgálatok támasztják alá. Az egyes polifenolok hatással vannak az immunsejtek populációira, szabályozzák a citokinek termelődését és a gyulladást elősegítő gének expresszióját. Továbbá képesek specifikusan az immunsejtek számát és differenciálódását közvetlen módon megváltoztatni. Karasawa és munkatársai (2011) vizsgálták a datolyapálma (*Phoenix dactylifera* L.) érlelt terméseinek forróvizes kivonatában a különböző, hatásukban azonosított polifenolok (klorogénsav, koffeinsav, pelargonin és ferulinsav) hatását. Eredményeik alapján a datolyakivonat jelentősen stimulálta az IFN- γ mRNS expressziót egér Peyer-plakk limfoid sejtenyészetekben. A klorogénsav és a koffeinsav is szignifikánsan növelte az IFN- γ (+)CD4(+) sejtek számát. Yang és munkatársai (2012) kimutatták, hogy a baicalin indukálta a Foxp3 fehérje expresszióját tenyésztett T-sejtekben, valamint elősegítette a Treg sejtek differenciálódását és szabályozó aktivitását. További eredményeikben bizonyították a baicalin helyreállító képességét a Foxp3 expressziós szintjében a kezdeti IL-6 által közvetített gátlás után, és *in vitro* indukálta a Foxp3 expressziót. A baicalin továbbá képes szabályozni a Thelper-17 sejtek differenciálódását, és alkalmasnak tűnik a Thelper-17 sejtek által közvetített gyulladással kapcsolatos betegségek kezelésére is (Yang et al., 2011). Drummond és munkatársai (2013) három a gyulladással kapcsolatos kezelésére alkalmas európai gyógynövényt vizsgáltak, a kamillát (*Matricaria chamomilla* L.-*Matricariae flos*), réti legyezőfüvet (*Filipendula ulmaria* L.-*Spiraeae ulmariae herba*) és a fűzfa kérgét (*Salix alba* L.-*Salicis cortex*). A vizes gyógynövény-kivonatokban izolálták a polifenol vegyületeket (apigenin, kvercetin és szalicilsav, 0–100 μ M) és inkubálták THP1 makrofágokkal. 10 μ M koncentrációnál mind az apigenin, mind a kvercetin szignifikánsan csökkentette az IL-6-ot. Az apigenin 10 μ M-nál és a kvercetin 25 μ M-nál szignifikánsan csökkentette a TNF- α mennyiségét. Vagyis bizonyították a gyógynövény-kivonat polifenol vegyületeinek a gyulladáscsökkentő hatását, az aglikon forma képes szabályozni a makrofág sejtek egy csoportját.

Cushnie és Lamb (2011) összefoglaló munkájukban leírták, hogy a flavonoidoknak lehet közvetlen és közvetett antibakteriális hatásuk. Megemlítik még az antibiotikumokkal való szinergista hatásukat. A flavonoidok gátolhatják a biofilmek képződését és megakadályozhatják a baktériumok gazdaszervezeti célpontokhoz való kötődését *in vitro* kísérletekben. Továbbá elnyomhatják a bakteriális virulenciát, melyet a *Helicobacter pylori* (González et al., 2021) és a *Staphylococcus aureus* (Lopes et al., 2017) baktériumokon vizsgáltak. Xu és Lee (2001) által végzett kutatás célja az volt, hogy a vizsgált 38 flavonoid molekula közül felmérjék, hogy melyik hatékony az antibiotikum rezisztens baktériumok ellen. Eredményeik alapján négy flavonol (miricetin, datiszcetin, kempferol és kvercetin) és

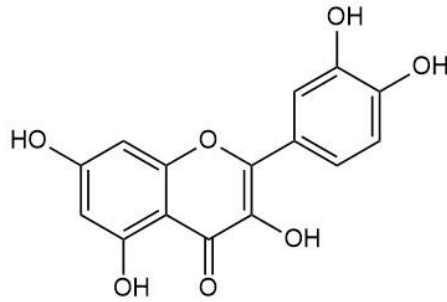
két flavon (flavon és luteolin) mutatott gátló hatást a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* ellen. A fenolos komponenseket két csoportra lehet bontani: flavonoidok illetve nem-flavonoidok (Singla et al., 2019) (5. ábra).



5. ábra: A polifenol vegyületek feloszthatók flavonoid és nem-flavonoid vegyületekre, a kínok képződhetnek a polifenolokból kinoidális oxidáció révén. Que: kvercetin, RA: rozmaringsav, DMBQ: 2,6-dimetoxi-benzokinon

3.4.1. Kvercetin antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásának jellemzése

A flavonoidok szerkezete a szénatomok száma alapján C6-C3-C6 képlettel írható fel (Santos-Buelga és Feliciano, 2017), mely 15 szénatomot tartalmaz három gyűrűben, ezeket „A”, „B” és „C” betűkkel jelölnék (Kumar és Pandey, 2013). A középső, „C” gyűrű szaturációjától és szubsztituenseinek számától függően megkülönböztetünk több csoportot: flavonolok, flavonok, flavanonok, flavanolok, izoflavonok és antocianidinek (Tsimogiannis et al., 2007). Ezek közül a flavonoloknak szerepe van a növény UV elleni védekezésében és a szabadgyökök semlegesítésében (Zoratti et al., 2014). Ide tartozik a kvercetin (Li Yao et al., 2016) (6. ábra). Aglikon formában sárga színű, forró vízben rosszul, alkoholban és lipidekben jól oldódik, hideg vízben pedig oldhatatlan. A növényekben a kvercetin glikozilált formája található meg, leggyakrabban a rutin (3-ramnozil-glukozil kvercetin) és a kvercitrin (kvercetin 3-O-ramnozid) (Zhang et al., 2014). A cukor komponenseknek köszönhetően a kvercetin vízdékönyebbé válik. Főleg a zöldségek és gyümölcsök héjában és húzában vannak jelen (Zhai et al., 2019). Dabeek és Marra (2019) vizsgálatai alapján a gyümölcsök közül az alma kvercetin tartalma 4,01 mg/100 g, a vörösfenyőé 25,0 mg/100 g friss tömeg. A káposzta 14,7 mg, míg a hagyma 45,0 mg kvercetint tartalmazott 100 g friss tömeghez viszonyítva. A vizsgált mintákból a legtöbb kvercetint a kapor tartalmazta 79 mg/100 g friss tömegben.



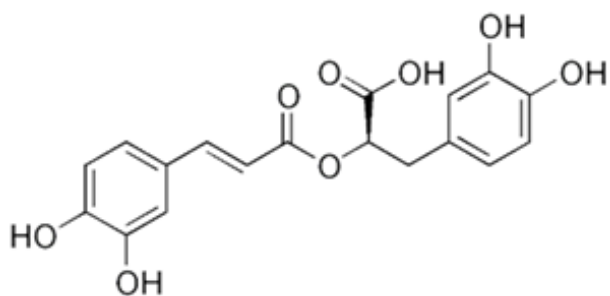
6. ábra: A kvercetin kémiai képlete.

A kvercetin rendelkezik antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal (Anand David et al., 2016). A következőkben leírt kutatásokban a haszonállatok a kvercetint *per os* vették magukhoz a takarmányokkal együtt. Liu és munkatársai (2014) vizsgálták a kvercetin hatását a tojtyúk teljesítményére, tojásminőségére, ürülék mikroflóra populációira és antioxidáns állapotára. A madarak nyolc héten keresztül fogyasztottak kvercetint 0; 0,2; 0,4 és 0,6 g kvercetin/takarmány kg koncentrációban. Az eredményeik arra utalnak, hogy a 0,367–0,369 g kvercetin/takarmány kg kiegészítés után javul a tojásrakás és a takarmány-hasznosulás. Továbbá bizonyították, hogy a kvercetin takarmány kiegészítése jótékonyan modulálta a bélkörnyezet és a máj szuperoxid-dizmutáz aktivitását a tojtyúkoknál. Egy másik vizsgálatban brojlercsirkénél vizsgálták a 0,5 és 1 g kvercetin/kg takarmány kiegészítést a növekedési teljesítmény, a belső szervek súlya, a hús minősége és a hús oxidatív stabilitása alapján (Goliomytis et al., 2014). Eredményeik alapján a 1 g kvercetin/takarmány kg kiegészítés csökkenti a lipidek oxidációját és növeli a relatív szívtömeget. Sertéseknél Zou és munkatársai (2016) vizsgálták, hogy 4 héten keresztül 25 mg kvercetin/takarmány kg kiegészítést követő 5 órás szállítási stressz hatására hogyan változik a bél épsége, a bélben keletkező ROS szintje és kialakul-e bélgyulladás a sertésekben. Eredményeik alapján a kvercetinrel kiegészített takarmányt fogyasztó állatokban alacsonyabb volt a bél ROS és MDA szintje, csökkent az endotoxin szérumszintje, valamint megnövekedett a jejunum területén a mikrobolyhok magassága és az okkludin és a zonula occudens-1 (ZO-1) mRNS expressziója. Park és munkatársai (2020) szintén sertéseken vizsgálta a kvercetin hatását az immunparaméterekre, a növekedési teljesítményre és a tápanyagok emészthetőségére úgy, hogy *Escherichia coli* lipopoliszacharid (LPS) (100 µg / testtömeg kg) injekciót kaptak. A flavonoid-kiegészítés szignifikánsan növelte az átlagos napi testtömeg-gyarapodást (ADG) a 0–21. napig. Növekedett a szerves anyagok és a nyersfehérje emészthetősége, szignifikánsan csökkent az IL-6, nőtt az IgG és a fehérvérsejtek koncentrációja, valamint a limfociták százalékos aránya az LPS terheléstől függetlenül.

Yang és munkatársai (2020) tanulmányozták a kvercetin és a DON hatását az emberi, nem daganatos eredetű gyomorhámsejteken (GES-1). Megállapították, hogy a GES-1 sejtek esetében jobb sejttéltépkésségi értékeket kaptak, ha a sejteket 2 órán keresztül, 6,25 μM kvercetinnel előkezelték, majd 5 μM DON-nal inkubálták a csak DON kezelést kapott sejtekéhez képest. Több tanulmány született arról, hogy milyen hatást gyakorol a kvercetin alacsony koncentrációban a Caco-2 sejtek TEER értékeire. Suzuki és Hara (2009) azt találták, hogy a Caco-2 sejtvonalon a kvercetin 10 μM és 100 μM közötti koncentrációtartományban szignifikánsan növelte a TEER értékeket 24 és 48 óras inkubációs idő után. Továbbá növelte a klaudin-4 fehérje expresszióját és csökkentette a luciferin sárga festék átjutását a sejtrétegen. Carrasco-Pozo és munkatársai (2013) hasonló megfigyeléseket tettek, eredményeikben a 33 μM kvercetin kezelés emelte meg szignifikánsan a TEER értékeket a Caco-2 sejtekben, amikor a nem-szteroid gyulladásgátló gyógyszert (NSAID-ot), az indometacint 250 μM koncentrációban adták be. Amasheh és munkatársai (2008) eredményei szerint a 200 μM kvercetin hatékonyan javította a TEER-t Caco-2 sejtekben esetében 24 óra elteltével. Suzuki és Hara (2009) eredményei szerint a kvercetin kezelés fokozta a klaudin-4 promóter aktivitását, illetve a ZO-2, okkludin és klaudin-1 citoskeletális megjelenését.

3.4.2. Egy kávésav származék, a rozmaringsav *in vivo* és *in vitro* hatásának vizsgálata

A nem flavonoidok csoportja tartalmazza az egyszerű fenolokat, fenolos savakat, kumarinokat, xantonokat, kalkonokat, sztilbéneket, lignineket és lignánokat. A fenolos savak tovább oszthatóak benzoésav-származékokra, illetve fahéjsav-származékokra (Kumar és Goel, 2019). A fahéjsav fenol gyűrűjéhez kapcsolódó hidroxil csoportokkal alakulnak ki a hidroxifahéjsavak, ide tartozik a kávésav, ferulsav és p-kumársav is. Ritkán fordulnak elő aglikonként, viszont gyakran észterek képződhetnek belőlük. A kávésav szerepet játszik a növényi stressz tolerancia mechanizmusában, így a lignin szintézisnél is, aminek eredményeként végül megvastagodnak a sejtfalak ezáltal a növény ellenállóvá válik a nátrium- és nehézfém-stressznek. A nagy energiájú sugárzást elnyeli a mezofil sejtekben aszályos stressz alatt egy mechanizmus során, melyet a kávésav O-metiltranszferáz enzim katalizál (Riaz et al., 2018). A kávésav észterei közé sorolható a rozmaringsav is (7. ábra), melyet megtalálhatunk nagyobb mennyiségben az ajakosok családjának (*Lamiaceae*) több nemzetségében (Janicsák et al., 1999, Regnault-Roger et al., 2004, Koşar et al., 2005, Shekarchi et al., 2012). A rozmaringsav a természetben glikozilált formában fordul elő, úgy, mint rozmaringsav-3-O-glikozid (Borrás-Linares et al., 2014), rozmaringsav-3-O- β -glikozid (Vogelsang et al., 2006) és a rozmaringsav-4-O- β -D-glikozid (Liu et al., 2017).



7. ábra: A rozmaringsav kémiai képlete.

Általánosságban a haszonállatokon végzett kísérletek esetében nem a rozmaringsavat, hanem az azt tartalmazó növényi részekkel vagy növényi készítménnyel kiegészített takarmányt, ivóvizet adtak az állatoknak. Egy nyulakkal végzett kísérlet során a vakbél pH szintje csökkent, ugyanis mérséklődött az ammónia mennyisége és megnövekedett összillózsírsav koncentrációja (Kandeil et al., 2019). Szintén nyulaknál állapították meg, hogy a duodenum transzepiteliális ellenállása nőtt, a bél MDA szintje csökkent, valamint a bélben található bélfóra össz mennyisége kismértékben csökkent a kontroll csoporthoz képest (Placha et al., 2013). Brojlersirkéknél a kezelés hatására hosszabb villusok keletkeztek a duodénumban (Hong et al., 2012), de nem tapasztaltak változást sem a bélbaktérium-flóra alkotóinak arányában, sem az össz mennyiségben (Cross et al., 2007, Hong et al., 2012). A rozmaring (*Rosmarinus officinalis* L.) képes volt a vérszérum szuperoxid-dizmutáz aktivitását is emelni tojó tyúkoknál, így antioxidánsként viselkedni (Alagawany és El-Hack, 2015). Egyes kísérletekben 1-6 hetes japán fűrjek takarmányát kerti katicavirág (*Nigella sativa* L.), szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* L.) és rozmaring hidegen préselt olajának 1:1:1 arányú keverékével egészítették ki. A vizsgált idő alatt nőtt a takarmányfelvétel, a súlygyarapodás mértéke, továbbá az ileum és a vakbél területén csökkent az öszbaktériumok szám és a koliform és *E. coli* baktériumok mennyisége (El-Hack et al., 2015). Csuka és munkatársai (2005) tojástermelés időszakában lévő japán fűrjeknél tesztelték a takarmányba kevert rozmaringnövény örleményét. Eredményeik azt bizonyítják, hogy az ezt fogyasztó állatoknál volt a legkisebb a hasúri zsírpárna, a máj és a tojássárgájának a tömege. A szerzők feltételezik, hogy ennek az is lehet az oka, hogy a rozmaringporral kiegészített takarmányból keveset fogyasztottak annak valamely étvágycsökkentő összetevője miatt.

A fenolos savak antioxidáns aktivitása függ a hidroxil csoportok számától (Kurek-Górecka et al., 2013, Kumar és Goel, 2019). Bacanlı és munkatársai (2016) leírták, hogy patkányokban a rozmaringsav csökkentette a szepszis kiváltotta oxidatív stresszt. A rozmaringsav alkalmas a lipidperoxidáció megakadályozására a membránokon történő átjutásával (Fadel et al., 2011), növeli kísérleti egerekben a szuperoxid-dizmutáz, a kataláz

és a glutation-peroxidáz enzimek aktivitását, amely végső soron megakadályozza az oxidatív stressz kialakulását (Zhang Y. et al., 2015). Továbbá képes növelni a GSH mennyiségét és a glutation-S-transzferáz enzim aktivitását a májsejtekben (Hasanein és Sharifi, 2017). Scheckel és munkatársai (2008) humán daganatos eredetű vastagbélhám, HT-29 sejteken bizonyították, hogy 1 órás 5, 10 és 20 μM rozmaringsavval végzett előinkubáció megakadályozta a ciklooxygenáz-2 (COX-2) aktiválódását.

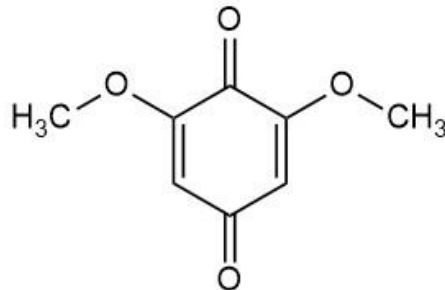
A rozmaringsav gyulladáscsökkentő hatásáról számoltak be Kim és munkatársai (2013), ugyanis a rozmaringsav gátolta az IL-6 és IL-1 β termelődését patkányokban. A gyulladáscsökkentő hatást azzal magyarázzák, hogy gátlódott a TNF- α , valamint az 5-lipoxigenáz (Geller et al., 2010) és a COX-2 (Scheckel et al., 2008) enzimek aktivitása, valamint csökkent a gyulladáskeltő citokinek expressziója (Sanbongi et al., 2003).

3.4.3. A fermentált búzacsíra kivonat és biológiai hatása

A kinonok konjugált, telítetlen gyűrűt és oxocsoportokat tartalmazó aromás vegyületek, diketonok (Bolton és Dunlap, 2017). Kinonok elnevezésében az előtag az eredeti vegyület neve, amelyhez kapcsolódik a kinon toldalék, míg a karbonil csoportok helyzetét a vegyületnevet megelőző számok adják meg (Moss et al., 1995). Ezek a vegyületek főként a katekolok oxidációja révén keletkeznek. Zhang és munkatársai (2007) vizsgálták és megállapították, hogy a CYP1A1, CYP1B1 és CYP3A4 képesek a katekol-ösztrogéneket oxidálni a megfelelő kinonokká, így képesek tovább reagálni a GSH-val, a fehérjével és a DNS-sel. A polifenolok kinonokká történő oxidációja antioxidáns mechanizmusként szolgál, de az így létrejövő kinonok károsodást okozhatnak a fehérjékben, mivel Michael-addíción keresztül nukleofil csoportokkal, például tiolokkal és aminokkal reagálva adnak fehérje-adduktokat (Bolton et al., 2000, Li Yuting et al., 2016). A kinonok erősen redox-aktív molekulák, így különböző ROS csoportok kialakulását okozhatják (Bolton és Dunlap, 2017). Ide tartoznak a benzokinonok, melyek megtalálhatók a magasabb rendű növényekben, gombákban, baktériumokban és az állatokban is. Több fontos biológiai funkciót látnak el, úgy, mint a bioenergetikai transzport, részét képezik az elektrontranszport láncnak. Az utóbbi években több tanulmány is született arról, hogy a benzokinonok közül egyes vegyületek rendelkeznek antioxidáns, gyulladáscsökkentő és tumorelles hatással is (Dandawate et al., 2010).

A fermentált búzacsíra kivonat benzokinonokat, élelmi rostokat, lignineket és oligoszacharidokat, valamint flavonoidokat és vitaminokat tartalmaz (Fardet, 2010). Más kutatások alátámasztották, hogy a búzacsíra kivonat fő hatóanyagai közé tartozik a 2,6-dimetoxi-p-benzokinon (DMBQ), a hidroxibenzoésavak, a hidroxifahéjsavak és az apigenin (Hidvégi et al., 1999, Hernández et al., 2011). Ezek a vegyületek glikoziláltak és fiziológiailag inaktívak (Rizzello et al., 2013). Ahhoz, hogy a DMBQ és más vegyületek

biológiailag aktívak lehessenek, β -glükózidáz enzim szükséges (Yoo et al., 2011). A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba fajokkal (Telekes et al., 2009) és a *Lactobacillus plantarum* dy-1 baktériumokkal (Zhang J.Y. et al., 2015) fermentálva a búzacsíra kivonatot csökkenthető a vegyületek glikoziláltsága. Az így keletkező fermentált búzacsíra kivonatot pozitív hatásaiért a DMBQ is felelős lesz (8. ábra).



8. ábra: A fermentált búzacsíra kivonatot egyik fő vegyülete, a 2,6-dimetoxi-benzokinon kémiai képlete.

A fermentált búzacsíra kivonatot humán (Avemar®) és állatgyógyászati gyógyszerekben egyaránt elérhető. Ezek a termékek vizes, multiszubsztrátos extrakciók, melyeket *Saccharomyces cerevisiae* segítségével fermentáltak és több biológiailag aktív molekulát tartalmaznak (Otto et al., 2016; Telekes et al., 2009). Az Avemar-t kemoterápiás kezelések mellett adjuvánsként alkalmazzák, mert bizonyítást nyert, hogy a benzokinonok antimetasztatikus (Hidvégi et al., 1999), antimetabolikus (Otto et al., 2016), antiangiogén (Imir et al., 2018), antiproliferatív hatásuk révén képesek apoptózist kiváltani (Mueller és Voigt, 2011; Zhang J.Y. et al., 2015). Az Immunovet® forgalmaz különböző állatfajok számára fermentált búzacsíra kivonatot granulátum formájában. Egészséges lovak esetében az adagolás naponta 10 g, orvosi kezelés mellett kiegészítésként 500 kg alatti lovaknak 15 g/nap, 500 kg feletti állatoknak 20 g/nap, csikóknak 10 g/nap. Egészséges macskáknak és kutyáknak 10 testtömeg kilogrammonként 1 g granulátum adását javasolja a gyártó naponta a nedves táphoz adva.

A fermentált búzacsíra kivonatot pozitív hatásait számos, haszonállatok kezelését magában foglaló tanulmányban is vizsgálták. A 3 hetes csirkék klinikailag egészségesek maradtak, *Mycoplasma gallisepticum*-mal való fertőzést követően, ha mellette fermentált búzacsíra kivonatot kaptak 3,0 g/kg takarmány koncentrációban 9 napig. Előzetes vizsgálatok alapján a fermentált búzacsíra kivonatot optimális szintje 0,3 és 3,0 g/kg takarmány között volt (Stipkovits et al., 2004). Egy másik kutatásban a fermentált búzacsíra kivonatot jótékony hatásának bizonyult az általános egészségi állapot fenntartásában, beleértve a biokémiai és élettani paramétereket, a súlygyarapodás növelését és a vakcinázásra adott immunválasz javulását (Ellakany et al., 2017). Növendék sertésekben az 1 és 2 g/kg takarmány koncentrációban alkalmazott fermentált búzacsíra kivonatot fokozta a

súlygyarapodást és védő hatású volt a sejtes immunitásra. Ez a tulajdonság fontos szerepet játszik a fakultatív kórokozók elleni rezisztencia elősegítésében (Rafai et al., 2011). Szakács és munkatársai (2009) megállapították, hogy az fermentált búzacsíra kivonat fokozta az immunválaszt a T-2 toxinnal kezelt választott malacokhoz képest. Jerzsele és munkatársai (2020) beszámoltak, a takarmány 2% fermentált búzacsíra kivonat tal való kiegészítése segítette a brojlercsirkéknek a kontroll csoportnál nagyobb testsúly elérésében. Azt is megállapították, hogy ellenőrzött körülmények között *Salmonella typhimurium*-mal fertőzött és fermentált búzacsíra kivonattal történő kezelésben részesített állatok nem terjesztették tovább a kórokozókat más csirkékre. A szakirodalmi adatok alapján, a fermentált búzacsíra kivonat esetében még nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű adat arra nézve, hogy a haszonállattartásban mekkora mennyiségben érdemes ezzel a takarmányt kiegészíteni.

Ezen kívül a fermentált búzacsíra kivonat fokozhatja a sejtek immunválaszát (Telekes et al., 2009, Rafai et al., 2011), és antioxidáns hatással bír (Hidvégi et al., 1999). Mackei és munkatársai (2020) megállapították, hogy a fermentált búzacsíra kivonat koncentrációfüggő módon lehet antioxidáns és prooxidáns is. Kísérletükben 10 µg/ml *Salmonella enterica* serovar. *typhimurium* LPS-sel kezelt hepatocitákon bizonyították, hogy a 0,1% és 1% fermentált búzacsíra kivonat hatékonyan csökkentette a celluláris ROS termelést és a lipidperoxidációs folyamatok sebességét LPS által kiváltott gyulladáshoz vezető válasz esetén. Azonban LPS kezelés nélkül, a magasabb koncentrációjú fermentált búzacsíra kivonat növelte mind a ROS, mind a MDA szintézis sebességét. Imir és munkatársai (2018) vizsgálták az Avemar hatását emberi daganatos sejtvonalakon, gyomor tubuláris adenokarcinóma (NCI-N87), prosztatata karcinóma (PC3), endocervikális adenokarcinóma (HeLa) és tüdő adenokarcinóma (A549) sejteken. A különböző dózisu (400, 800, 1600 és 3200 µg/ml) Avemarral kezelt sejtekben szignifikánsan csökkent a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és a Cox-2 mRNS- és fehérjeszintje. Következtetésük szerint a fermentált búzacsíra kivonat antiangiogén hatást fejthet ki a rákos sejteken.

4. A kísérleti munka célja

A gabonanövényeket *Fusarium* gombafajok fertőzhetik meg a szántóföldeken, ami a tárolás során más mikotoxin termelő gombáknak köszönhetően emeli a gabonaszemek mikotoxin szennyezettségét. Ez a koncentrálódás elősegítheti a szinergista hatások kialakulását. A PhD munkám fő célja annak tanulmányozása volt, hogy a trichotecén-vázis DON és T-2 toxin milyen hatást gyakorol önállóan és kombinációban adva HIEC-6 és IPEC-J2 sejtekre. A növényekben előforduló polifenolok közül számos vegyület önállóan alkalmazva bizonyítottan rendelkezik antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal. Kutatási terveim között szerepelt a flavonoidok közül a kvercetin, fenolos savak közül a rozmaringsav és a fermentált búzacsíra kivonat bélhámsejt regenerációjára gyakorolt hatásának *in vitro* tanulmányozása. A kísérletek során annak megállapításra törekedtem, hogy a három, önállóan antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással bíró vegyület és keverék alkalmas-e a két fuzáriotoxin által indukált oxidatív stresszt, gyulladást és bélhám integritás csökkenést mérsékelni. A kísérleti munkám során célul tűztem ki:

1. A DON és a T-2 toxin és a kombinációjukból álló DT2 legmagasabb nem-citotoxikus koncentrációinak meghatározását, valamint a DT2 sejtek életképességére, oxidatív állapotára, a gyulladáscsökkentő citokin termelésére és TJ fehérje elrendezésére gyakorolt hatásainak vizsgálatát HIEC-6 és IPEC-J2 sejtekben.
2. A kvercetin, rozmaringsav és fermentált búzacsíra kivonat hatásának tanulmányozását a DON-nal, T-2 toxinnal vagy DT2-vel kiváltott károsító folyamatokkal szemben. Kutatásaim során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:
 - 2.1. Milyen koncentrációkban célszerű alkalmazni a kvercetint és a rozmaringsavat a védő hatás eléréséhez a 24 órás előkezelés során.
 - 2.2. Képes-e a kvercetinnel történő 24 órás elő- vagy 1 órás együttkezelés a DON TEER-t mérséklő és oxidatív stressz növelő hatását csökkenteni. A redox egyensúlyváltozást a H₂O₂ extracelluláris koncentrációjának és a ROS intracelluláris mennyiségének mérésével kívántam meghatározni.
 - 2.3. Módosítja-e a 24 órás rozmaringsav előkezelés a DON, a T-2 toxin és a DT2 potenciálisan sejtréteg integritást csökkentő, extracelluláris H₂O₂ koncentrációt növelő hatását. Továbbá alkalmas-e arra, hogy megakadályozza a DT2 által indukált IL-6 és IL-8 koncentrációinak a növekedést, illetve a klaudin-1 és az okkludin fehérjék jelenlétének esetleges megváltozását a sejtmembránban.
 - 2.4. Befolyásolja-e a fermentált búzacsíra kivonat a DON és T-2 toxin által feltételezhetően kiváltott TEER- és az oxidatív stresszre gyakorolt hatását az együttkezelés során. Valamint megfigyelhető-e a fermentált búzacsíra kivonat jótékony hatása 24 órás regenerációs fázist követően.

A doktori munkám során az alábbi kísérleteket végeztem el a két sejtvonalon. Minden vizsgálatnál törekedtünk legalább 3 párhuzamos mérés kivitelezésére (1. táblázat).

1. táblázat: A doktori munkához felhasznált kísérletek elrendezései. DON: deoxinivalenol, DT2: DON és T-2 toxin keveréke, Que: kvercetin, RA: rozmaringsav, FBCSK: fermentált búzacsíra kivonat, TEER: transzepiteliális elektromos ellenállás, H₂O₂: hidrogén-peroxid, ROS: reaktív oxigén gyökök, IL-6/IL-8: interleukin-6/interleukin-8, n: minta elemszám

Sejtvonal	HIEC-6	IPEC-J2		
Kísérleti elrendezés	24 óra inkubáció	előkezelés: 24 óra Que + 1 óra DON együttkezelés: 1 óra Que + DON	24 óra RA + 48 és 72 óra DON, T-2, DT2	24 óra kezelés + 24 óra regeneráció
Kezelési idő és a használt mikotoxin koncentrációja	24 óra 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin DT2: 1 μM DON + 5 nM T-2 toxin	1 óra 1 μM DON - -	48 és 72 óra 1 μM DON, 5 nM T-2, DT2: 1 μM DON + 5 nM T-2 toxin	24 óra 8 μM DON, 5 nM T-2, -
Kezelési idő és a használt védő hatású anyag koncentrációja	-	előkezelés: 24 óra 20 μM Que együttkezelés: 1 óra 20 μM Que	24 óra 50 μM RA	24 óra 1% és 2% FBCSK
Sejtéletképesség: MTS	96-lyukú edény (n=9)	-	-	96-lyukú edény (n=8)
Sejtéletképesség: Neutrál Vörös festés	-	96-lyukú edény (DON n=8) (Que n=5)	96-lyukú edény (n=8)	-
Sejtréteg integritás: (TEER)	-	6-lyukú inzertet tartalmazó edény (n=6)	6-lyukú inzertet tartalmazó edény (n=9)	6-lyukú inzertet tartalmazó edény (n=9)
Extracelluláris H₂O₂: (Amplex Red)	96-lyukú edény (n=8)	96-lyukú edény (n=8)	96-lyukú edény (n=8)	96-lyukú edény (n=8)
Intracelluláris ROS: (DCFH-DA)	24-lyukú inzertet tartalmazó edény (n=10)	6-lyukú inzertet tartalmazó edény (n=8)	-	6-lyukú inzertet tartalmazó edény (n=6)
IL-6 és IL-8 (ELISA Kit)	96-lyukú edény IL-6 (n=8) IL-8 (n=6)	-	96-lyukú edény (IL-6 n=10) (IL-8 n=10)	-
Klaudin-1 és okkludin (Immunfluoreszcens festés)	24-lyukú inzertet tartalmazó edény inzertjén	-	6-lyukú inzertet tartalmazó edény inzertjén	-
Klaudin-1 és okkludin (ELISA Kit)	96-lyukú edény Klaudin-1 (n=4) Okkludin (n=4)	-	-	-

A HIEC-6 és IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérletekben a sejtelképesség vizsgálatot megelőzően megállapítottuk a fagyasztásból felvett sejtek életképességét tripánkék oldattal való festéssel. HIEC-6 sejteket ezt követően 96-lyukú edényre ültettük ki a sejteket 2×10^4 sejt/ml mennyiségben és 48 óra tenyésztést követően hozzáadtuk a vizsgált mikotoxin koncentrációkat 24 órás inkubációs időt alkalmazva ($n = 9$). Az eredmények alapján a további kísérletekben az $1 \mu\text{M}$ DON, az 5 nM T-2 toxin és a $1 \mu\text{M}$ DON + 5 nM T-2 toxin (DT2) koncentrációkat alkalmaztuk. A HIEC-6 sejteken ezt követően 24-lyukú inzertekre ültettük ki 2×10^4 sejt/ml, majd 48 óra letapadást követően a sejtekhez adtuk a kezelőoldatokat és 24 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. A kezelési idő letelte után mintát vettünk a sejtek sejtmentes felülúszójából, hogy később azokat felhasználhassuk az extracelluláris H_2O_2 és a gyulladásos citokinek (IL-6 és IL-8) koncentrációinak meghatározásához. A sejtmentes felülúszóban lévő H_2O_2 meghatározásához 96-lyukú edényt és az Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit-et ($n = 8$), az IL-6 és IL-8 koncentrációk meghatározásához specifikus szendvics ELISA Kit-eket (IL-6: $n = 8$, IL-8 $n = 6$) használtunk. A sejteket ezt követően PBS-sel mostuk és DCFH-DA festéket adtunk a sejtekhez, hogy megállapíthassuk a sejten belüli ROS-ok mennyiségét ($n = 10$), valamint immunfluoreszcens festést kezdtünk a sejteken a szoros sejtkapcsoló struktúrákban található kladin-1 és okkludin detektálhatóvá tételére. Tripszin segítségével eltávolítottuk a HIEC-6 sejteket az inzert felületéről és a centrifugálással történő feltárást követően specifikus ELISA Kit segítségével meghatároztuk a kladin-1 és okkludin koncentrációját (mindkét fehérje esetében $n = 4$).

Az IPEC-J2 sejtek életképességét tripánkék oldattal történő festéssel állapítottam meg, majd vizsgáltam a kvercetin és a DON hatását. A DON ($n = 8$) és kvercetin ($n = 5$) citotoxikus koncentrációit Neutrál Vörös festéssel állapítottuk meg 24 óra kezelést követően. A további vizsgálatokat $20 \mu\text{M}$ kvercetin és $1 \mu\text{M}$ DON kezelésekkel végeztük, két elrendezésben, minden kísérletben 6-lyukú inzerten tenyésztve, melynek $4,67 \text{ cm}^2$ területére 1×10^6 sejt/ml mennyiségben ültettük ki a sejteket, (I) 24 óra kvercetin előkezelést követően 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket DON-nal vagy (II) 24 órás kontroll kezelés után együtt adtuk a sejtekhez a kvercetin és a DON kezelőoldatot 1 órán keresztül. Vizsgáltuk a sejtréteg integritást TEER módszerrel a kezelőoldatok hozzáadása előtt (0 h), 24 órát követően (24 h) és a további egy órás DON-nal történő inkubálás után (25 h) ($n = 6$). A 25 óra időintervallumnál történt mintavétel a sejtmentes felülúszóból a további extracelluláris H_2O_2 koncentráció (Amplex Red) ($n = 8$) változásának megállapításához. Ezt követően mostuk a sejteket és hozzáadtuk a DCFH-DA oldatot, hogy a feltárást követően megmérhessük az intracelluláris ROS-ok mennyiségét ($n = 8$).

Szintén IPEC-J2 sejteken vizsgáltuk a rozmaringsav védő hatását a DON, a T-2 toxin és a kettő kombinációjából álló DT2 toxin által indukált negatív hatásokkal szemben. Minden

kísérletet 6-lyukú sejtenyésztő edényen végeztünk. A sejtelképességet Neutral Red festékekkel elemeztük (n =8) és az eredmények alapján 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin, 1 μM DON és 5 nM T-2 keverékét (DT2) és az előkezeléshez 50 μM rozmaringsav koncentrációt választottunk ki a további vizsgálatokhoz. A kísérleti elrendezésben 24 óráig adtuk az egyik, később DT2 csoportnak a rozmaringsavat, ezt követően hozzáadtuk az IPEC-J2 sejtekhez a különböző mikotoxin kezelőoldatokat. A TEER értékek alapján indítottuk el a kezeléseket, a 24 óráig tartó rozmaringsav előkezelés megelőzte a kísérleti eredményekben feltüntetett kísérleti kezdőpontot jelölő 0. órát. Megmértük a sejtréteg integritás változását 48 és 72 órával a mikotoxin kezelőoldatok rárakása után (n =9). Mind a két kezelési időt követően mintát vettünk a sejtmentes felülűszóból a későbbi extracelluláris H_2O_2 (n =8), valamint az IL-6 és IL-8 ELISA Kitekkel történő (n =10) koncentrációk meghatározásához. A sejteket mosás után fixáltuk a membránon, majd immunfluoreszcens festéssel kívántuk láthatóvá tenni a kladin-1 és okkludin membránban történő elhelyezkedését a kezeléseket követő 72 óra után.

A fermentált búzacsíra kivonat hatását kombinációban vizsgáltam DON és T-2 toxinnal. Az IPEC-J2 sejtek éleképességét MTS módszerrel határoztam meg, melyet 96-lyukú edényben végeztünk (n =8). A kísérletben 8 μM DON, 5 nM T-2 toxin, valamint 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat kezelőoldatok hatását állapítottuk meg 6-lyukú tenyésztőedényben. A kísérleti elrendezésben 24 óráig inkubáltuk a sejteket a kezelőoldatokkal, majd ezt követően további 24 óráig kontroll kezelést kapott minden kezelési csoport. A TEER értékeket megmértük a kísérlet megkezdése előtt (0 h), a 24 óra kezelést követően (24 h) és a regeneráció végén (48 h) (n =9). Mindkét időintervallum után mintát vettünk az extracelluláris térből, hogy megállapítsuk benne a H_2O_2 koncentrációt (n =8), majd ezt követően mostuk a sejteket és DCFH-DA festék hozzáadásával az IPEC-J2 sejtek intracelluláris ROS-ok szintjét határoztuk meg (n =6).

5. Anyag és módszer

5.1. A HIEC-6 és az IPEC-J2 sejtvonaltenyésztése

A HIEC-6 sejteket kereskedelmi forgalomból szereztük be (CLR-3266, American Type Culture Collection, ATCC®, Manassas, VA, USA), míg az IPEC-J2 sejtvonalt a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék ajándékba kapta Dr. Jody Gookintól (College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA). Mind a két sejtvonalt sejtjeit Dulbecco's Modified Eagle's Medium és Ham's F-12 Nutrient Mixture 1:1 keverékében (DMEM/F12) (Merck, Darmstadt, Németország), 75 cm²-es, szűrőt tartalmazó csavaros kupakkal zárható sejttenyésztő flakákban (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) növesztettük és tartottuk fent. A tápközegét kiegészítettük 5% főtális borjú szérummal (FBS), 5 µg/mL inzulin, 5 µg/mL transferrin, 5 ng/mL szelén keverékével (ITS), 5 ng/mL egér epidermális növekedési faktorról (EGF) és 1% penicillin-sztreptomycin oldattal (utóbbiak Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A HIEC-6 sejteket azonnal felhasználtuk a kísérletekben a fagyasztásból történő felvétel után, míg az IPEC-J2 sejtek esetében 42-48 passzázs szám közötti sejtekkel dolgoztunk.

A két sejtvonaltnál megegyeztek a fenntartási körülmények, vagyis a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban (Heracell 150i) tartottuk és kétnaponta cseréltük a tápfolyadékot a sejteken.

5.2. Sejtéletképesség-vizsgálatok

5.2.1. Tripánkék oldattal való detektálás

A tripánkék festékkel az életképes sejtek nem festődnek meg, azonban kék színűvé válnak a károsodott vagy elhalt sejtek sejtmagjai és a citoplazmájuk is.

A HIEC-6 és IPEC-J2 sejtek életképességét, fagyasztásból felvétel után, illetve kísérleteket megelőzően a sejtkiültetéskor, tripánkék festéssel ellenőriztük. A festéket 10-szeresére hígítottuk DMEM/F12 hozzáadásával, majd ebből az oldatból 200 µl-t hozzáadtunk 200 µl sejtszuszpenzióhoz. Ezután egy Bürker kamra segítségével megvizsgáltuk a sejtek morfológiáját és elvégeztük a sejtszámlálást is inverz fázis kontraszt mikroszkóp alatt (Olympus CKX41). A sejteket felhasználtuk a kísérleteinkben, ha az élő sejtek aránya az összes sejthez viszonyítva 90% vagy magasabb volt. Az itt leírt módon végeztük el a sejtkiültetések előtt a sejtszámlálást is.

5.2.2. MTS módszerrel történő sejtéletképesség vizsgálat

Az MTS módszer egy kolorimetrikus vizsgálat, melyben a festék az MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboxi-metoxifenil)-2-(4-szulfo-fenil)-2H-tetrazólium) (Berridge et al., 2005). A sejtek életképességét az alapján határozza meg, hogy az életképes sejtek

redukálják a tetrazolium festéket (itt MTS) a celluláris NADPH-függő oxidoreduktáz enzim hatására. A formazán képződése fenazin-metoszulfát jelenlétében történik, amely egy közbenső elektron akceptor, ez elektronokat továbbít a NADH-ból a tetrazoliumfesték redukciójához, és így oldott formájú formazántermék képződik. A keletkező formazán mennyisége arányos lesz az élő sejtek számával.

A kísérletek során alkalmazott különböző kezelőoldatokat eltávolítottuk, majd a sejteket háromszor mostuk PBS-sel. Ezt követően a 96-os plate lyukaiba 100 µl DMEM/F12 és 20 µl CellTiter96 vizes oldat (Promega, Bioscience, Magyarország) keverékét mértünk a sejtekre sötétben a festék fényérzékenysége miatt. A festékekkel együtt egy órán át inkubáltuk a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében. A sejtek által átalakított formazán abszorbanciáját 490 nm hullámhosszon mértük EZ Read Biochrom 400 microplate olvasóval (Biochrom Ltd, Egyesült Királyság).

5.2.3. Neutrálvörös sejthalál mérés

A neutrálvörös (Neutral Red, NR) egy indikátorfesték, amely a savas kémhatású lizoszómákban halmozódik fel (Repetto et al., 2008).

A különböző kezelések tápfolyadékait eltávolítottuk, majd átmostuk a sejteket háromszor PBS-el. Ezután a sejteket 50 mg/ml neutrálvörös festéket tartalmazó DMEM/F12 médiummal inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett, 2 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után PBS-el mostuk a sejteket, majd feltártuk őket 96% etanol, ionizált víz és jégecet oldattal (50:49:1 arányban). Ezt követően az abszorbanciát 540 nm hosszón mértük meg, ELISA Plate Reader (EZ Read Biochrom 400, Cambridge, Egyesült Királyság) segítségével.

5.3. Reagensek

A vizsgálatokhoz használt két mikotoxint, a DON-t (D0156) és a T-2 toxint (T4887) a Merck-től szereztük be (Darmstadt, Németország). A DON-t először acetonitrilben, a T-2 toxint PBS-ben oldottuk fel 1 mM koncentrációban, majd ezekből a törzsoldatokból a munkaoldatokat fenolvörös indikátort nem tartalmazó DMEM/F12 tápközegbe (Merck, Darmstadt, Németország) készítettük el.

A kvercetin és a rozmaringsavat (Merck, Darmstadt, Németország) porból oldottuk be DMSO és fenolvörös-mentes DMEM/F12 segítségével, úgy, hogy a DMSO koncentrációja a munkaoldatokban kevesebb volt, mint 0,5% (v/v).

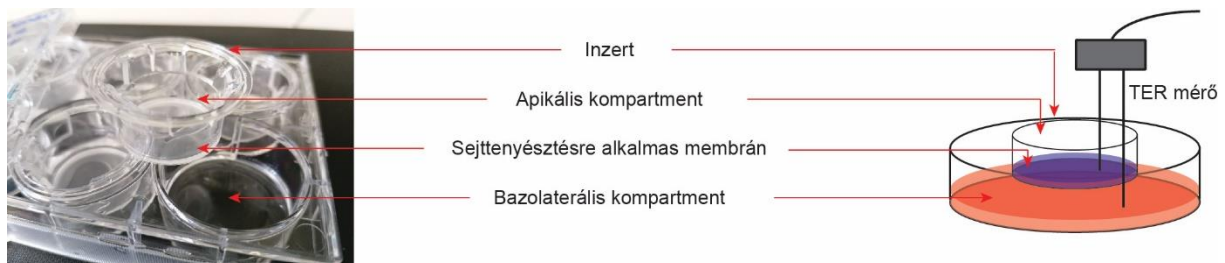
A fermentált búzacsírából (Immunovet®, Magyarország) először törzsoldatot készítettünk 1 g szilárd halmazállapotú terméket oldottunk fel 10 ml desztillált vízben, melyet kétszer négybe hajtott gézlapon szűrtünk le kétszer. Ezt követően 0,22 µm átmérőjű steril szűrőn sterilizáltuk az oldatot, majd ebből a 10% kivonatból készítettük el az 1% és 2%

munkaoldatokat, amikhez fenolvörös-mentes DMEM/F12 tápközeget használtunk. A kísérletekben 1% és 2% koncentrációjú fermentált búzacsíra kivonat munkaoldatokat alkalmaztunk, amelyeket korábbi tanszéki eredmények alapján alkalmaztunk a kísérletben (Karancsi et al., 2020). A kísérletekben az ismételt oldatbeoldást ugyanabból a sarzsból származó termék felhasználásával végeztük.

Az elkészült oldatok pH értékét beállítottuk 7,2 értékre mikroprocesszorral ellátott pH mérővel (pH 3000 WRW, Weilheim, Németország). Mielőtt a sejtekhez adtuk volna, az oldatokat 0,22 mm pórusátmérőjű, steril szűrőn keresztül átnyomva sterilizáltuk (Millipore, Merck, Darmstadt, Németország).

5.4. Sejtek kiültetése

A sejteket a kísérleti elrendezéstől függően vagy 96 lyukat tartalmazó tenyésztőedényre (plate-re) (Corning®, Merck, Darmstadt, Németország) vagy 6-lyukú, illetve 24-lyukú inzertes plate-re ültettük ki (Corning® Costar® Transwell® Merck, Darmstadt, Németország). Az inzertek alkalmazása lehetőséget biztosít a sejtek apikális és bazolaterális kezelésére, kivitelezhető a TEER mérések és lehetőséget ad az elkülönített mintavételekre (9. ábra). Az inzert egy membrán, melyen pórusok találhatóak, így a membrán felett és alatt folyadékter keveredhet, ha a tenyészet nem konfluens. A TEER mérő az inzerten kialakított réseken tud a bazolaterális kompartmentbe merülni, míg a rövidebb szára a TEER mérőnek nem ér hozzá a membránon lévő sejtekhez.



9. ábra: A képen egy 6-lyukú tenyésztőedény látható az inzerttel és a TEER mérő sematikus ábrája.

Az MTS sejtelétképesség vizsgálatokban 96-os tenyésztőedényt használtunk, amely lyukanként $0,32 \text{ cm}^2$ területtel rendelkezik és melyre a sejteket 2×10^4 sejt/ml denzitásban ültettük ki. A 12 db inzertet tartalmazó 24-lyukú tenyésztőedény (CLS3470, Corning® Costar® Transwell®, Merck, Németország) sejtek letapadását segítő területe $0,33 \text{ cm}^2$, inzertenként 2×10^4 sejt/ml ültettünk ki. Ezt a tenyésztőedényt egyedül a HIEC-6 sejtekkel végzett kísérletben alkalmaztuk. Az IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérletekben 6-lyukú inzertet tartalmazó edényt (CLS3450 Corning® Costar® Transwell®, Merck, Németország) alkalmaztunk, melynek a sejtenyésztésre alkalmas területe $4,67 \text{ cm}^2$, ahová lyukanként 1×10^6 sejt/ml ültettünk ki a kísérleteket megelőzően. A kísérletek megkezdése előtt a

HIEC-6 és IPEC-J2 sejteket 48 óráig inkubáltuk, hogy letapadhasanak az inzertek felületére.

IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérletek esetében, további 5 vagy 10 napig tenyésztettük az inzerteken, attól függően, hogy melyik védő hatású anyag hatását vizsgáltam. A fermentált búzacsíra kivonat esetében a 2 napig tartó letapadást követően 5 nappal kezdtem meg a kísérletet, míg a kvercetinrel és rozmaringsavval történő előkezeléseknél 10 napig tenyésztettük a sejteket az inzert membránján.

5.5. Sejtréteg integritás vizsgálata TEER méréssel

Az IPEC-J2 az inzertre történő kiültetéstől számított 10. napon elérték a $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ körüli értéket. Az inzertek használatával három mérést lehet végrehajtani egy kezeléshez tartozó well-ben (9. ábra). Annak érdekében, hogy a TEER mérések összehasonlíthatóak legyenek a különböző kísérleti beállítások között, az elektromos ellenállást a területre normalizáljuk, megszorozva az ellenállást a membrán területével ($\Omega \times \text{cm}^2$). A méréseket EVOM Epithelial Tissue Volt/ Ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) és STX-2 elektródok segítségével végeztük.

5.6. Oxidatív állapot változásának nyomon követése

5.6.1. H₂O₂ mennyiségi mérése extracellulárisan Amplex Red reagenssel

Az Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) egy nem-fluorogén, színtelen vegyület, amely segítségével mérni lehet a H₂O₂ mennyiségét biológiai rendszerekben (Dębski et al., 2016). A detektálás tormaperoxidáz által katalizált oxidáción alapszik, mely során az Amplex Red-ből fluoreszcens rezorufin keletkezik, amely 1:1 sztöchiometrikus arányban reagál felülúszóban (extracellulárisan) található H₂O₂ molekulákkal.

A kísérleteinkben az Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk. Az előírt módon előállítottuk a munkaidőoldatot, majd a kezeléseket követően a sejtekhez pipettáztuk az Amplex Red-et és tormaperoxidáz tartalmú reakció puffert. Az inkubációs idő leteltével a mintákat 560 nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhosszon olvastuk le a fluoriméter (Victor X2 2030, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) segítségével.

5.6.2. Intracelluláris ROS detektálása DCFH-DA módszer segítségével

A sejten belüli ROS mennyiségét a DCFH-DA (2,7-dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát), nem-fluoreszcens molekula segítségével határozhatjuk meg (Pavelescu, 2015). A DCFH-DA diffúzióval átjut a membránon keresztül a sejtbe, ahol észteráz enzimek hidrolizálják DCF-H₂ molekulává, amelyet a ROS molekulák oxidálnak és keletkezik a fluoreszcens DCF. A sejtekhez adott 10 μM DCFH-DA után detektálható fluoreszcencia egyenesen arányos a sejten belüli ROS mennyiségével.

A különböző kezelőoldatok eltávolítása után PBS mosást követően a sejtekhez hozzáadtuk a 20 μ M DCFH-DA festéket és sötét helyen 30 percig inkubáltuk azokat. Ezt követően a sejteket PBS-el mostuk, és 1% Triton X oldattal kezeltük 3 percen keresztül. A fluoreszcencia intenzitást fluoriméter (Victor X2 2030, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) segítségével olvastuk le 488 nm excitációs és 525 nm emissziós hullámhosszon.

5.7. Az IL-6 és IL-8 gyulladáshoz kapcsolódó citokinek vizsgálata

A kezeléseket követően mindkét kompartmentből mintákat vettünk. Ezeket használtuk fel az IL-6 és IL-8 koncentrációk meghatározásához ELISA módszer segítségével. A HIEC-6 és az IPEC-J2 sejteknél fajspecifikus ELISA Kit-ek segítségével határoztuk meg, a gyártó utasításait követve, mind a két citokin koncentrációját. A HIEC-6 mintáknál az IL-6 és IL-8 szendvics ELISA kitéket a Mercktől szereztük be, az IPEC-J2 minták esetében IL-6 (Aviva System Biology, San Diego, USA) és IL-8 (Merck, Darmstadt, Németország) kitéket használtunk.

5.8. Klaudin-1 és okkludin lokalizációjának és koncentrációjának meghatározása

A kezeléseket követően a munkaoldatokat eltávolítottuk a sejtekről és 3 x mostuk PBS oldattal. Ezután a sejteket fixáltuk a membráninzerter 100% metanolban (Merck, Darmstadt, Németország). Ezt követően 5% szarvasmarha szérumból albumin (BSA, Merck, Darmstadt, Németország) oldattal blokkoltuk a sejteket, szobahőmérsékleten. Az elsődleges antitestet (anti-klaudin-1 poliklonális elsődleges ellenanyag, Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA vagy anti-occludin nyúl poliklonális ellenanyag, Merck, Darmstadt, Németország) szintén 5% BSA oldatba oldottuk fel (1:200) és inkubáltuk vele a sejteket 1 óráig keresztül, szobahőmérsékleten. Ezután másodlagos ellenanyaggal lettek jelölve a sejtek, Alexa Fluor 546 festékekkel konjugálva (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) anti-nyúl IgG PBS-ben feloldva (1:200).

A sejtmembránban megtalálható szialinsav származékokat Alexa Fluor 488 festékekkel konjugált búzacsíra agglutinnal (WGA Alexa Fluor 488, Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) festettük meg (1:200), szobahőmérsékleten 10 percig.

A sejtmagokat 4',6-diamino-2-fenilindollal (DAPI) festettük meg. A DAPI-t PBS-ben oldottuk fel (1:500) és 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejtekkel. A festési lépések között 3 x 5 percig PBS oldattal mostuk a sejteket.

A festést követően az inzertereket tárgylemezre helyeztük és fluoreszcencia rögzítőfolyadékkal (Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dánia) fixáltuk egy fedőlemezrel. A mintákat konfokális mikroszkóppal elemeztük ki, 63 x nagyításban. Zeiss LSM 710 Confocal Microscope (Oberkochen, Németország) vagy Leica SP2 Confocal Microscope (Wetzlar, Németország) segítségével.

A TJ fehérjék mennyiségét fajspecifikus szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg a HIEC-6 kísérleteknél. A humán klaudin-1 szendvics ELISA Kit-et (Cloud-Clone Corp., Wuhan, Kína) és okkludin szendvics ELISA Kit-et (Elabscience, Central European Biosystems, Budapest, Magyarország) használtunk. A kezeléseket követően a sejteket 0,25% tripszin oldattal szedték fel a membrán felületéről és gyűjtöttük össze. 1000 x g, 5 °C, 5 percig centrifugáltuk és a kapott sejtszuspenziót hűtött PBS-ben vettük fel oldatba. Ezt követően tovább centrifugáltuk 1500 x g, 5 °C-on 10 percig. A sejtmentes felülúszót összegyűjtöttük és a gyártó utasításai szerint elvégeztük az ELISA vizsgálatot, majd 450 nm hullámhosszon leolvastuk az eredményeket fluoriméterrel (Victor X2 2030, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

5.9. Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai elemzéséhez az R2.14.2 szoftver került alkalmazásra (<https://cran.r-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>). Szignifikánsnak tekintettük az eredmények közti különbségeket, ha a $p < 0,05$. A vizsgált csoportok közötti különbségek megállapítására egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) és post-hoc Tukey tesztet végeztünk. A kontroll és a kezelt csoportok között mért szignifikáns eltéréseket csillagokkal (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), míg a csoportok egymáshoz viszonyított szignifikáns különbségeit vonalakon feltüntetett p értékkel jelöltük. Ha egy ábrán több kezelési idő került feltüntetésre, akkor az egy inkubációs időhöz tartozó csoportok közötti eltérések hasonló színű vonalon lettek ábrázolva. A kísérletek során mért adatok ábrázolása átlag \pm szórásként (SD) történt.

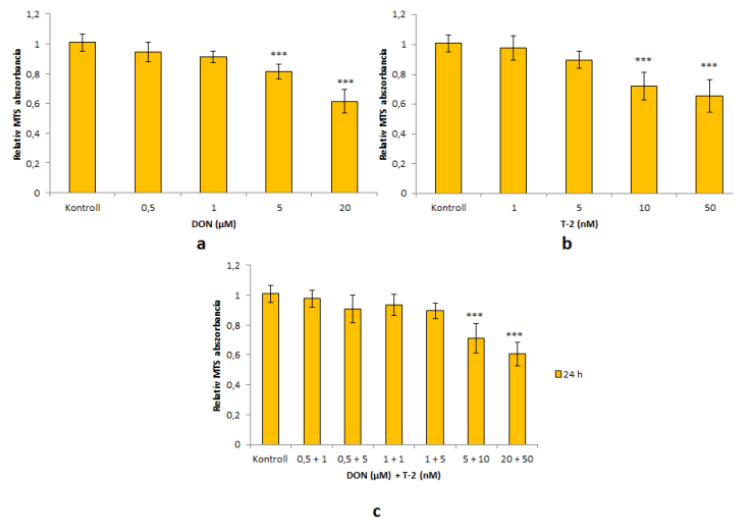
6. Eredmények

6.1. HIEC-6 sejtekkel végzett kísérletek

6.1.1. HIEC-6 sejtek mikotoxinokkal történő inkubációja

6.1.1.1. A DON és a T-2 toxin különálló és együttes hatása a sejtelétképességre

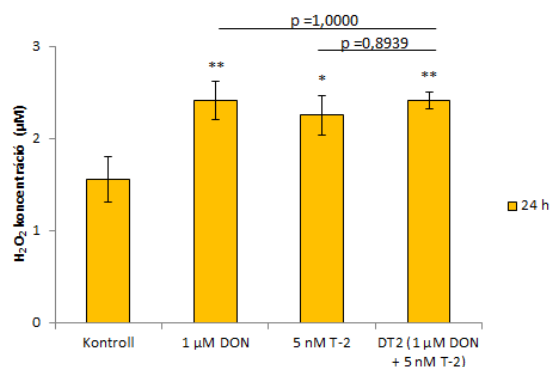
A DON, a T-2 és a DT2 toxinok citotoxikus hatását HIEC-6 sejteken 24 órás kezelési idővel vizsgáltuk MTS módszerrel (10. ábra). A DON hatását 0–20 μM közötti, míg a T-2 toxin hatását 0–50 nM közötti koncentráció tartományban teszteltük. A DT2 esetében az alábbi koncentráció párosításokat alkalmaztuk a sejteken: 0,5 μM DON + 1 nM T-2; 0,5 μM DON + 5 nM T-2; 1 μM DON + 1 nM T-2; 1 μM DON + 5 nM T-2; 5 μM DON + 10 nM T-2; 20 μM DON + 50 nM T-2. Szignifikáns MTS abszorbancia csökkenés volt megfigyelhető 5 és 20 μM DON koncentrációknál (mindkettő esetében $p < 0,001$). 10 és 50 nM koncentrációjú T-2 toxin kezeléseket követően csökkentek az MTS abszorbancia értékek (mindkettőnél $p < 0,001$). A DT2 koncentráció párosítások közül az 5 μM DON + 10 nM T-2 és a 20 μM DON + 50 nM T-2 kezelések citotoxikusnak bizonyultak 24 óra inkubációs idő elteltével (mindkét esetben $p < 0,001$).



10. ábra: A deoxinivalenol (DON), a T-2 toxin és a kettő keverékének (DT2) sejtelétképességre gyakorolt hatása HIEC-6 sejteknél 24 óra inkubálás után, MTS módszerrel vizsgáltuk. **a)** A DON hatását 0,5–20 μM koncentráció tartományban adtuk a sejtekhez. **b)** A T-2 toxin esetében 1–50 nM koncentrációk hatását néztük. **c)** A DT2 kombinációs kezeléseknél az alábbi koncentráció párosítások hatását vizsgáltuk: 0,5 μM DON + 1 nM T-2; 0,5 μM DON + 5 nM T-2; 1 μM DON + 1 nM T-2; 1 μM DON + 5 nM T-2; 5 μM DON + 10 nM T-2; 20 μM DON + 50 nM T-2. A kontroll értékektől való jelentős mértékű eltéréseket csillagokkal jelöltük: *** $p < 0,001$. A diagram adatait relatív értékek átlag \pm szórásként (SD) ($n = 9$) tüntettük fel, ahol 1-nek tekintettük a kontroll értéket.

6.1.1.2. Extracelluláris H₂O₂ koncentráció változása a DON, a T-2 toxin és a DT2 expozíció után

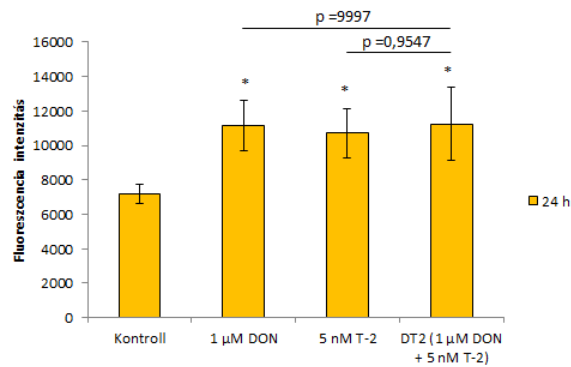
A HIEC-6 sejtek sejtmertes felülúszójában lévő H₂O₂ koncentráció változását megmértük 24 órával az 1 μM DON, az 5 nM T-2 toxin és DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelés után (11. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a kontroll kezeléshez képest az 1 μM DON (p =0,0063), az 5 nM T-2 toxin expozíció (p =0,0318) és a DT2 kezelés (1 μM DON + 5 nM T-2) szintén szignifikánsan növekedést eredményezett a H₂O₂ extracelluláris mennyiségében (p =0,0068) a kontroll csoporthoz viszonyítva. A DON és T-2 toxin kezeléssel összevetve a DT2-vel történő inkubáció nem mutatott számottevő eltérést a H₂O₂ koncentrációjára nézve (DON: p =1,000; T-2: p =0,8938).



11. ábra: Az extracelluláris H₂O₂ koncentráció változása 24 óráig tartó 1 μM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2 toxin és DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelésekkel végzett inkubáció után, a HIEC-6 sejtek felülúszójában mérve. A kontroll értékekhez viszonyított eltéréseket csillagokkal: *p <0,05; **p <0,01, a vizsgált csoportok közötti különbségeket a vonalon feltüntetett p értékekkel jelöltük. A diagram adatai átlag ± szórásként (SD) (n =8) lettek feltüntetve.

6.1.1.3. Intracelluláris ROS mennyiségi meghatározása DCFH-DA módszerrel

A HIEC-6 sejtek intracelluláris ROS mennyiségének változását mértük 24 óra 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin és DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) expozíció után (12. ábra). A DCFH-DA festést követően a sejtmertes felülúszóból detektálható fluoreszcencia intenzitás alkalmas a ROS mennyiségi változásának meghatározására a kezeléseket után. Az 1 μM DON, az 5 nM T-2 toxin és a DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) is szignifikánsan megemelte a ROS mennyiségi értékével korreláló fluoreszcencia értékeket a kontroll adatokhoz képest (DON: p =0,0134; T-2: p =0,0272; DT2: p =0,0112). A DON és a T-2 kezelés nem mutatott jelentős eltérést a DT2 expozíciónak kitett sejtek értékeihez viszonyítva (DON: p =0,9997; T-2: p =0,9547).



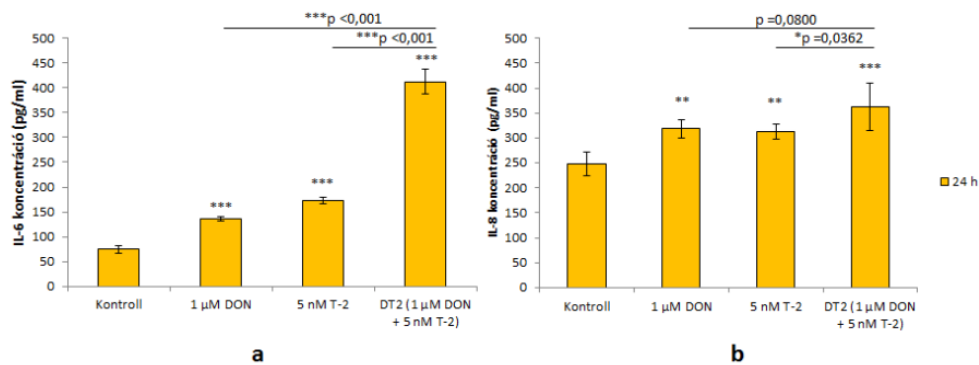
12. ábra: Az intracelluláris ROS mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitás változását meghatároztuk az 1 μM deoxinivalenol (DON), az 5 nM T-2 toxin és a DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) toxinokkal történő 24 órás inkubációt követően, HIEC-6 sejtekben. A kontroll értékhez képesti eltérést csillagokkal jelöltük: * $p < 0,05$, a csoportok közötti különbségek a vonal felett lévő p értékekkel lettek feltüntetve. A diagram adatai átlag \pm szórásként (SD) ($n = 10$) lettek feltüntetve.

6.1.1.4. A DON, a T-2 toxin és a DT2 kezelés hatása az IL-6 és IL-8 gyulladásozó citokinek koncentrációjára

A HIEC-6 sejtek 1 μM DON-nal, 5 nM T-2 toxinnal és DT2-vel (1 μM DON + 5 nM T-2) történő kezelését követő IL-6 és IL-8 koncentráció változás mérését szendvics ELISA módszerrel a sejtmentes felülúszóból 24 óra inkubáció után végeztük (13. ábra).

Az IL-6 koncentrációja számottevően nőtt a kontroll értékekhez képest az 1 μM DON, az 5 nM T-2 toxin és a DT2 kezeléseket után (mindegyik esetben $p < 0,001$). Összehasonlítva a kezelési csoportokat, a DT2-vel inkubált HIEC-6 sejteknél jelentősen magasabb volt az IL-6 citokin koncentrációja, mint az önmagában adott DON és T-2 toxin esetében ($p < 0,001$). Szignifikáns eltérés volt tapasztalható az 1 μM DON és az 5 nM T-2 toxin kezeléseket között is ($p < 0,001$).

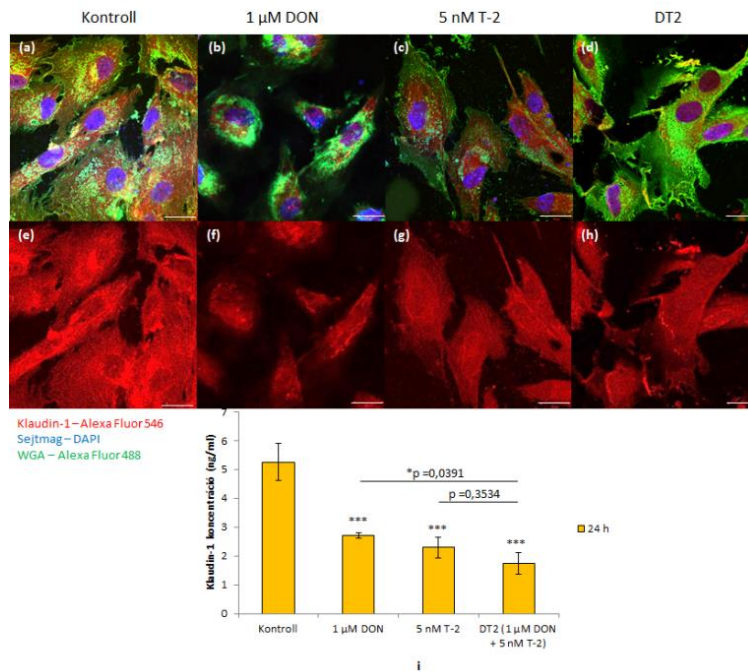
Az IL-8 koncentrációja szignifikánsan mértékben megemelkedett az 1 μM DON, az 5 nM T-2 és a DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezeléseket hatására (DON: $p = 0,0022$; T-2: $p = 0,0059$; DT2: $p < 0,001$) a kontroll kezelést kapott sejteknél mért koncentrációhoz képest. A DON és a DT2 által kiváltott IL-8 koncentráció emelkedés között nincs különbség ($p = 0,0800$). Ezzel szemben a T-2 toxin kezeléssel összehasonlítva, a DT2 hatására jelentős mértékben nőtt az IL-8 koncentráció ($p = 0,0362$).



13. ábra: Az IL-6 és IL-8 citokinek koncentráció változása HIEC-6 sejteknél, az 1 µM deoxinivalenol (DON), az 5 nM T-2 toxin és a DT2 (1 µM DON + 5 nM T-2) kezelések hatására, 24 óra inkubáció után. A sejtmentes felülúszóban található gyulladáscitokinek koncentrációját humán szendvics ELISA kit segítségével határoztuk meg. Az IL-6 (a) és az IL-8 (b) koncentrációjának változása. A kontroll értékektől való különbségeket csillagokkal: **p <0,01; ***p <0,001; míg a kezelési csoportok közötti eltéréseket a p értékek feltüntetésével jelöltük. A diagram adatai átlag ± szórás (SD) (IL-6: n =8, IL-8: n =6) kerültek bemutatásra.

6.1.1.5. A klaudin-1 fehérje lokalizációjának vizsgálata és mennyiségi meghatározása

Az 1 µM DON, 5 nM T-2 toxin és DT2 (1 µM DON + 5 nM T-2) kezelést követően a HIEC-6 sejteket immunfluoreszcens festékekkel (klaudin-1 – Alexa Fluor 546, sejtmag – DAPI, sejtmembránban található szialinsavak – WGA, Alexa Fluor 488) festettük, így a klaudin-1 elhelyezkedése láthatóvá vált a sejtmembránjában, valamint a sejtek feltárását követően, szendvics ELISA módszerrel meghatározásra került a klaudin-1 koncentrációja is (14. ábra). A konfokális mikroszkóppal készült képek azt mutatják, hogy a kontrollhoz képest mindegyik vizsgált mikotoxinnal történő kezelés mérsékelte a klaudin-1 fehérje expresszióját a sejtmembránban. A DON, a T-2 toxin és a DT2 kezelésnél is csökkent a klaudin-1 fehérje membránbeli jelenléte. A szendvics ELISA módszer alátámasztotta a felvételeken látottakat, vagyis a klaudin-1 koncentrációja számottevően csökkent minden mikotoxin kezelés hatására a kontroll értékekhez képest (mindegyik esetben p <0,001). Szignifikáns különbség volt az 1 µM DON és a DT2 kezelés között (p =0,0391), míg T-2 toxinnal összehasonlítva nem volt számottevő különbség kimutatható (p =0,3534).

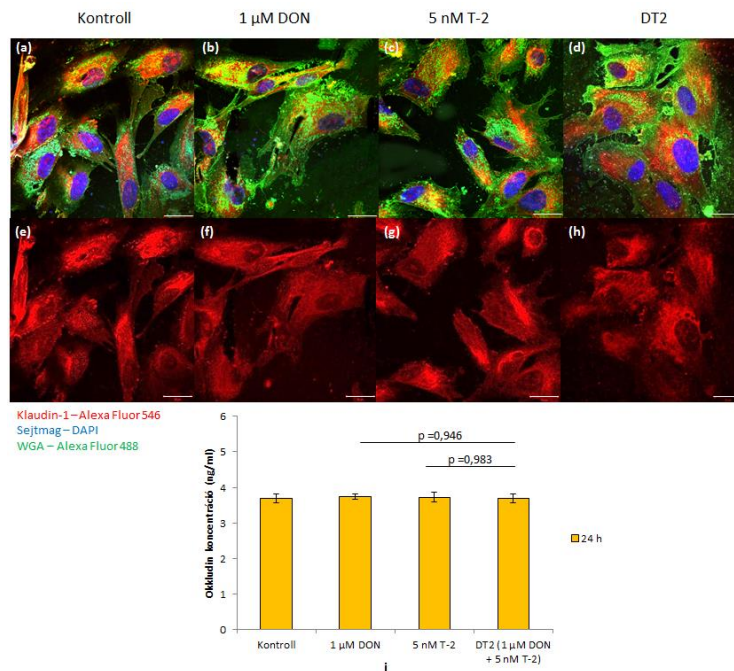


14. ábra: A kladin-1 fehérje lokalizálása és mennyiségi meghatározása HIEC-6 sejtek membránjában 24 óra inkubációt követően az 1 μM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2 és DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelések után. Az immunfluoreszcens festést követően konfokális mikroszkóp segítségével láthatóvá vált a kladin-1 elhelyezkedése a membránban. Piros színnel (Alexa Fluor 546) jelölt a kladin-1 fehérje. A HIEC-6 sejtek sejtmagja késsel lett megfestve (DAPI), míg a sejtmembránban található szialinsavak zöld színben láthatók (WGA, Alexa Fluor 488). **a,e**) Kontroll kezelést kapott HIEC-6 sejtek (a) és a kladin-1 TJ fehérjék (e). **b,f**) 1 μM DON hatása a sejt morfológiájára. **c,g**) A T-2 toxinnal történő kezelés hatása a sejtek alakjára. **d,h**) A DT2 által kiváltott változás a membránfehérje mennyiségére. A vonal 20 μm -t jelöl. **i**) A kladin-1 koncentráció változása a kezelések hatására. A kontrollhoz viszonyított különbségeket csillagokkal jelöltük: ***p < 0,001, míg a csoportok közötti különbséget a vonalon feltüntetett p értékekkel. A diagram adatai átlag \pm szórásaként (SD) (n = 4) lettek feltüntetve.

6.1.1.6. Az okkludin fehérje lokalizációjának vizsgálata és mennyiségi meghatározása

Az okkludin sejtmembránban való elhelyezkedését immunfluoreszcens festésekkel tettük láthatóvá kezeletlen kontroll, 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin és DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) oldatokkal történt 24 órás inkubációt követően, illetve meghatározásra kerültek az okkludin koncentrációjában történt változások is szendvics ELISA módszer segítségével (15. ábra). A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken látható, hogy a kezelések után az okkludin expressziója nem változott meg egyik mikotoxinnal történt inkubálás hatására sem. Az okkludin mennyiségi meghatározása alapján a mikotoxin expozíció nem befolyásolta az okkludin fehérje koncentrációját a kontroll értékhez viszonyítva (DON: p = 0,937;

T-2: $p = 0,979$; DT2: $p = 1,000$). A csoportok között sem volt megállapítható szignifikáns különbség.



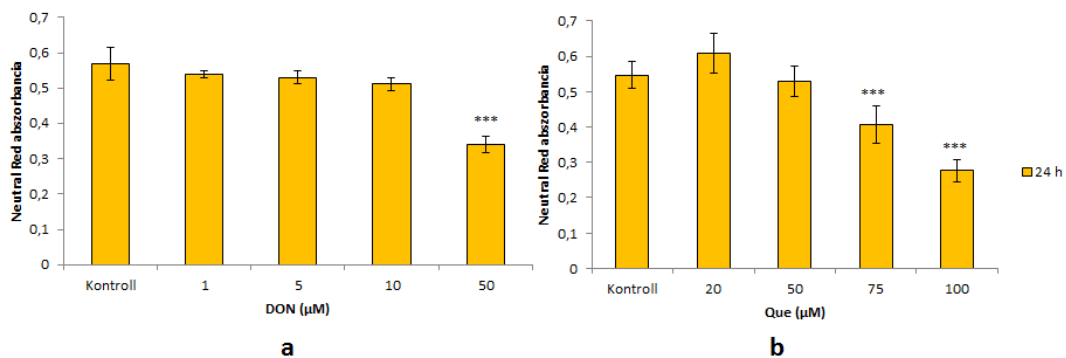
15. ábra: Az okkludin fehérje lokalizálása és mennyiségi meghatározása a HIEC-6 sejtek membránjában 24 órával az 1 μM deoxinivalenollal (DON), 5 nM T-2 toxinnal és DT2-vel (1 μM DON + 5 nM T-2) történt kezelések után. Az okkludin fehérje piros színnel (Alexa Fluor 546) lett jelölve, a HIEC-6 sejtek sejtmagja kékkel lett megfestve (DAPI), míg a sejtmembrán szialsav származékai zöld színben láthatók (WGA, Alexa Fluor 488). **a,e**) Kezeletlen HIEC-6 sejtek (a) és az okkludin TJ fehérjék (e). **b,f**) 1 μM DON hatása a sejtek felépítésére (b) és az okkludin expressziós mintázatára (f). **c,g**) A T-2 toxinnal történő kezelés hatása a sejtek alakjára (c) és az okkludin jelenlétére (g). **d,h**) A DT2 kezelést követően a sejtek morfológiája (d) és az okkludin fehérje expressziós mintázata látható (h). A vonal 20 μm -t jelöl. **i**) Az okkludin koncentráció változása a mikotoxinnal történő kezeléseket követően. A csoportok közötti különbséget a vonalon látható p értékkel jelöltük. A diagram adatait átlag \pm szórás (SD) ($n = 4$) formájában kerültek feltüntetésre.

6.2. IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérletek

6.2.1. IPEC-J2 sejtek elő- és együttkezelése kvercetinrel DON-expozíció mellett

6.2.1.1. Az IPEC-J2 sejtek életképességének meghatározása DON és kvercetin kezelést követően, NR módszerrel

A DON és a kvercetin IPEC-J2 sejtek életképességére gyakorolt hatását NR módszerrel határoztuk meg, 24 óra inkubációt követően (16. ábra). A DON mikotoxint 0–50 μM koncentrációban alkalmaztuk és eredményeink alapján a DON szignifikánsan csökkentette a sejtek NR abszorbancia értékeit 50 μM koncentrációban ($p < 0,001$) a kontroll értékhez viszonyítva. A kvercetin hatását 0–100 μM koncentráció tartományban teszteltük. Az IPEC-J2 sejteknél mérhető abszorbancia értékek jelentősen csökkentek 75 μM és magasabb koncentrációjú kvercetin kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$).

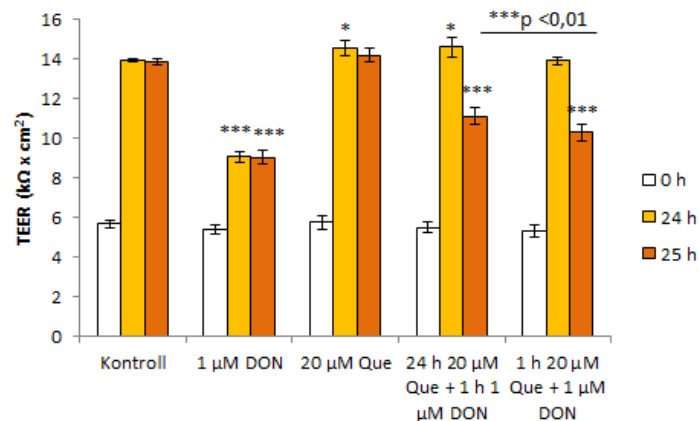


16. ábra: A deoxinivalenol (DON) és a kvercetin (Que) sejtleletképességre gyakorolt hatásának a vizsgálata Neutral Red módszerrel, 24 órás inkubációs időt alkalmazva az IPEC-J2 sejteken. **a)** A DON 1–50 μM koncentrációban alkalmazva **b)** kvercetin esetében a 20–100 μM koncentráció tartományban mért citotoxicitás eredménye. A különbségeket a kontroll csoporthoz viszonyítva csillagokkal adtuk meg: *** $p < 0,001$. A diagram adatait átlag \pm szórás (SD) (DON: $n = 5$; Que: $n = 8$) formájában ábrázoltuk.

6.2.1.2. A DON és a kvercetin hatása a sejtréteg integritására

A sejteket 6-os inzertet tartalmazó tenyésztőedényre ültettük ki és a konfluens állapot elérése utáni hetedik naptól mértük a TEER értékeket, biztosítva ezzel a sejtek polarizáltságának nyomon követését. Amikor az IPEC-J2 sejteken 1000 Ω körüli értékeket mértünk a TEER mérővel, az 1 μM DON és 20 μM kvercetin kezelést alkalmaztuk (0 h) (17. ábra). 24 óra inkubációs idő után a sejtréteg integritását meghatároztuk (24 h). Vizsgáltuk az 1 μM DON és a 20 μM kvercetin hatását önmagában, illetve kétféle kombinációs kezelésben. 24 óráig 20 μM kvercetin előkezelést követő 1 órás 1 μM DON inkubáció (24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON), illetve, ha az IPEC-J2 sejtek 24 óráig

kontroll kezelést kaptak, majd egy óráig egyszerre volt a sejteken a 20 μM kvercetin és 1 μM DON (1 h 20 μM kvercetin + 1 μM DON). Önmagában a 24 órás inkubáció 1 μM koncentrációjú DON-nal jelentősen mérsékelte a TEER értékeket ($p < 0,001$), míg az ugyanennyi ideig önmagában ható 20 μM kvercetin jelentősen megnövekedett TEER értéket adott, mint a kontroll kezelést kapott sejtek ($p = 0,0323$). A 24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON kezelés esetében a 24 órás kvercetin előkezelés után a TEER értékek szintén szignifikánsan magasabbak voltak a kontrollhoz képest ($p = 0,0191$). Azonban az ezt követő egy órás 1 μM DON kezelés csökkentette a 20 μM kvercetin előkezelést kapott sejtek között az integritást ($p < 0,001$). A 24 óráig kontroll, majd 1 óra hosszan 20 μM kvercetin + 1 μM DON kombinált kezelést követően az IPEC-J2 sejtek sejtréteg integritása jelentősen alacsonyabb volt, mint a kontroll ($p < 0,001$). A 24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON kezelés és az 1 óráig 20 μM kvercetin + 1 μM DON kezelést kapott sejtek között jelentős különbség volt a TEER értékekben ($p < 0,01$) a 25 órás eredményekben.

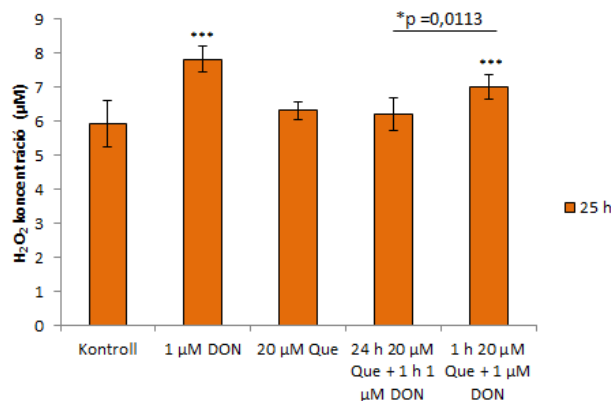


17. ábra: Az 1 μM deoxinivalenol (DON) és 20 μM kvercetin (Que) önmagában és kombinációban (24 h 20 μM Que + 1 h 1 μM DON és 1 h 20 μM Que + 1 μM DON) kifejtett hatása az IPEC-J2 sejtek TEER értékeire ($\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$) 24 óráig, illetve további egy óra kezelést (25 h) követően. A 20 μM Que és a 24 h 20 μM Que + 1 h 1 μM DON kezelést kapott sejtek 24 óra 20 μM kvercetin előkezelést kaptak mindkét esetben, míg az 1 h 20 μM Que + 1 μM DON csoport csak kontroll kezelést kapott az 1 óra kombinációs kezelés előtt. A TEER értékeket megállapítottuk az oldatok ráakása előtt (0 h), 24 órával később (24 h) és ezt követő 1 óra leteltével (25 h). A kontroll sejtekhez viszonyított különbségeket csillaggal: * $p < 0,05$ és *** $p < 0,001$, míg a két kezelési csoport közötti különbséget a vonalon feltüntetett p értékkel jelöltük. A diagram adatai átlag \pm szórás (SD) ($n = 6$) formájában vannak szemléltetve.

6.2.1.3. A DON és a kvercetin hatása az extracelluláris H_2O_2 termelődésére

A 25 órás, 1 μM DON, 20 μM kvercetin önmagában és kombinációban adott kezelése után Amplex Red segítségével megmértük a sejtmentes felülúszóban található H_2O_2 koncentrációját (18. ábra). A 20 μM kvercetin nem változtatta meg a H_2O_2 koncentrációját

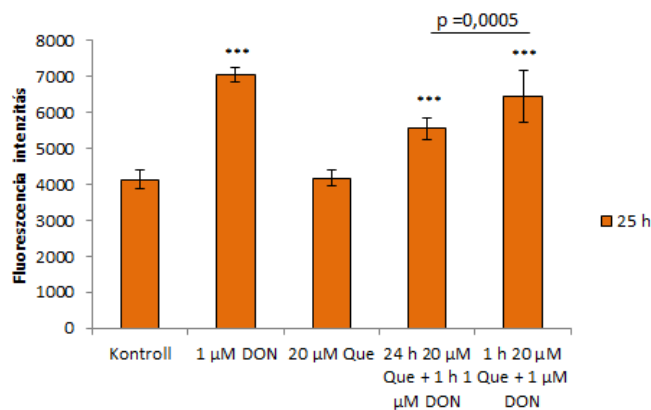
($p = 0,4161$), ahogyan a 24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON kezelésnél sem találtunk szignifikáns növekedést a H_2O_2 szintben ($p = 0,7006$). A 25 órán át tartó 1 μM DON kezelés megemelte a H_2O_2 koncentrációját ($p < 0,001$), hasonlóan a 24 órás kontroll kezelést követően 1 óráig tartó együttkezeléshez (1 h 20 μM kvercetin + 1 μM DON), amely után szintén jelentősen nőtt a H_2O_2 termelést a kontroll értékekhez képest ($p = 0,0003$). Számottevő különbséget találtunk a 25. órában mért 24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON és az 1 h 20 μM kvercetin + 1 μM DON kezelés H_2O_2 koncentráció értékei között ($p = 0,0113$).



18. ábra Az 1 μM deoxinivalenol (DON) és 20 μM kvercetin (Que) önmagában és kombinációban (24 h 20 μM Que + 1 h 1 μM DON és 1 h 20 μM Que + 1 μM DON) alkalmazott hatása az extracelluláris H_2O_2 koncentrációra 25 óra inkubációs idő elteltével, Amplex Red segítségével mérve az IPEC-J2 sejtek sejtmentes felülszójából. A kontroll csoporthoz viszonyítva az eltéréseket csillaggal: *** $p < 0,001$, a két csoportok közötti különbségeket a p érték megadásával jelöltük. A diagram adatait átlag \pm szórás (SD) ($n = 8$) formájában lettek szemléltetve.

6.2.1.4. A DON és a kvercetin kezeléseket hatásai az intracelluláris ROS mennyiségére

25 óra kezelés után meghatároztuk az IPEC-J2 sejteknél az intracelluláris ROS-ok mennyiségét, 1 μM DON, 20 μM kvercetin önálló és kombinációban adott (24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON és 1 h 20 μM kvercetin + 1 μM DON) kezelése után (19. ábra). A 25 órás, 1 μM DON kezelés szignifikánsan növelte a ROS értékeket ($p < 0,001$). A 20 μM kvercetin kezelés nem változtatta meg az intracelluláris ROS mennyiségét a kontrollhoz képest ($p = 0,9993$). A 24 óráig 20 μM kvercetin előkezelést kapott, majd 1 óráig 1 μM DON-nal inkubált sejtekben emelkedett a ROS mennyisége, ahogy a 24 órás kontroll kezelést követő 1 óráig tartó 20 μM kvercetin + 1 μM DON kezelésnél is megnőtt a ROS az IPEC-J2 sejteknél (mindkettőnél $p < 0,001$). Szignifikáns különbség volt mérhető a két kombinációs kezelés, a 24 h 20 μM kvercetin + 1 h 1 μM DON és az 1 h 20 μM kvercetin + 1 μM DON között ($p = 0,0005$).

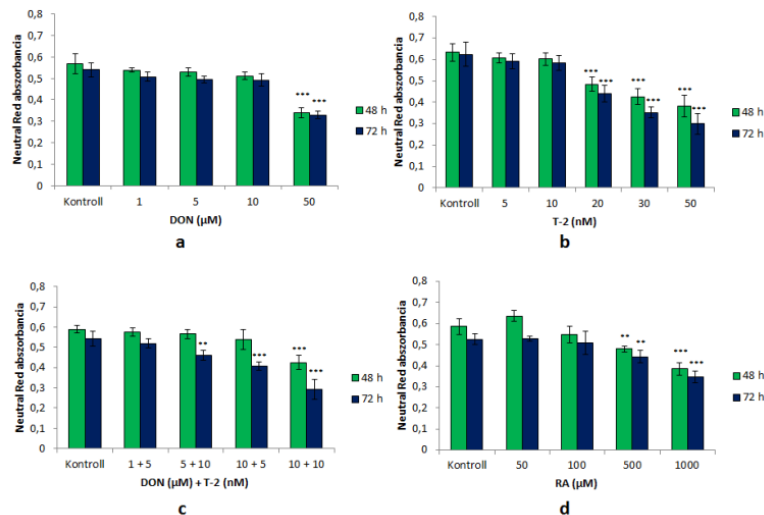


19. ábra: Az 1 µM deoxinivalneol (DON) és 20 µM kvercetin (Que) hatása önmagában és kombinációban (24 h 20 µM Que + 1 h 1 µM DON és 1 h 20 µM Que + 1 µM DON) adva az IPEC-J2 sejtek intracelluláris ROS mennyiségére nézve, DCFH-DA festéssel vizsgálva, 25 óra inkubációs idő után. A kezelések és a kontroll kezelés közötti különbségeket csillagokkal jelöltük: *** $p < 0,001$, a vizsgált csoportok közötti eltéréseket pedig a vonalon feltüntetett p értékkel jeleztük. A diagram adatai átlag \pm szórás (SD) ($n = 8$) formájában lettek ábrázolva.

6.2.2. A rozmaringsav előkezelés hatásának vizsgálata 48 és 72 órás mikotoxin kezelés után

6.2.2.1. A DON, a T-2 toxin, a DT2 és a rozmaringsav sejtéletképességre gyakorolt hatása

A DON, a T-2 toxin, valamint ezek kombinációjából összerakott DT2 és a rozmaringsav sejtéletképességre gyakorolt hatását 48 és 72 órás inkubációs idővel vizsgáltuk az IPEC-J2 sejteken Neutral Red módszerrel (20. ábra). A DON 0–50 µM, a T-2 toxint 0–50 nM, a rozmaringsavat 0–1000 µM koncentráció tartományban vizsgáltuk. A DT2 esetében az alábbi koncentráció párosítások hatását vizsgáltuk: 1 µM DON + 5 nM T-2; 5 µM DON + 10 nM T-2; 10 µM DON + 5 nM T-2; 10 µM DON + 10 nM T-2. Szignifikáns NR abszorbancia csökkenést okozott a DON kezelés 50 µM koncentrációban 48 és 72 órás inkubáció után (mindkét időnél $p < 0,001$). A T-2 toxin jelentősen csökkentette az NR abszorbancia értékeket 20 nM és annál magasabb koncentrációkban az IPEC-J2 sejtekenél, mindkét vizsgált idő esetében ($p < 0,001$). A DT2 adása után azt találtuk, hogy az 5 µM DON + 10 nM T-2, a 10 µM DON + 5 nM T-2 és a 10 µM DON + 10 nM T-2 kezelések mérsékeltek a NR abszorbancia értékeket 72 óra inkubáció után ($p < 0,01$ és $p < 0,001$), míg 48 órás kezelést követően egyedül a 10 µM DON + 10 nM T-2 kombináció bizonyult citotoxikusnak. A rozmaringsav kezelés 500 és 1000 µM koncentrációnál szignifikáns sejthalált okozott 48 és 72 óra inkubációs idő után is ($p < 0,01$ és $p < 0,001$).

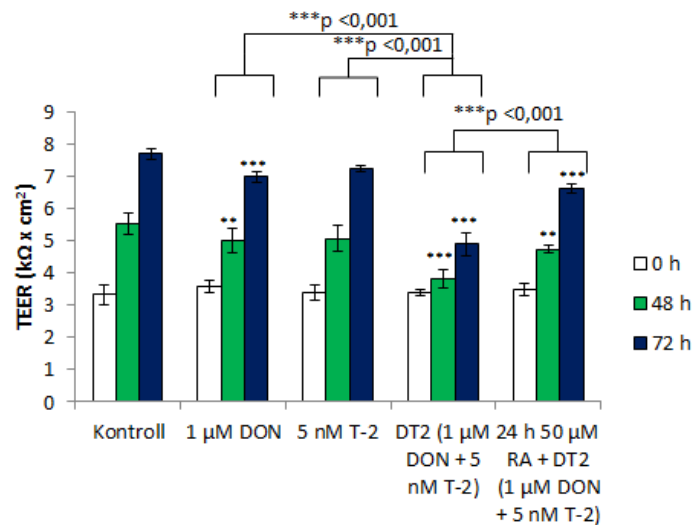


20. ábra: A deoxinivalenol (DON), a T-2 toxin, a kettő kombinációjából álló DT2 és a rozmaringsav (RA) sejtleletképesre gyakorolt hatása IPEC-J2 sejteken, NR módszerrel mérve, 48 és 72 órás inkubációs idő után. **a)** A DON hatását 1–50 μM koncentrációban néztük. **b)** A T-2 toxin esetében 5–20 nM koncentrációk hatását vizsgáltuk 48 és 72 óra után. **c)** A DT2 kezelésnél az alábbi koncentráció párok hatását vizsgáltuk: 1 μM DON + 5 nM T-2; 5 μM DON + 10 nM T-2; 10 μM DON + 5 nM T-2; 10 μM DON + 10 nM T-2. **d)** A rozmaringsavat 50–1000 μM koncentrációban adtuk a sejtekhez. A kontrolltól való különbségeket csillagokkal jelöltük: **p <0,01 és ***p <0,001. A diagram adatait átlag ± szórás (SD) (n =8) formájában tüntettük fel.

6.2.2.2. A DON, a T-2 toxin, a DT2 és a rozmaringsav + DT2 hatása a TEER értékekre

A TEER értékek megállapításra kerültek 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin, DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2), illetve 24 órás 50 μM rozmaringsav előkezelést követő DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelés után, 48 és 72 óra inkubációs időket alkalmazva. Amikor az IPEC-J2 sejtek elérték az 1000 Ohm körüli TEER értékeket, akkor adtuk a munkaoldatokat a sejtekhez (0 h) (21. ábra). Eredményeink szerint az 1 μM DON önmagában adva jelentősen alacsonyabb sejtrétegeintegritást okozott 48 óra (p =0,003) és 72 óra elteltével is (p <0,001), mint a kontroll. Az 5 nM T-2 toxin kezelés nem változtatta meg jelentősen a TEER értékeket sem 48 (p =0,0667), sem 72 óra elteltével (p =0,7708). A DT2 szignifikánsan csökkentette a TEER-t 48 és 72 óra elteltével (mindkét esetben p <0,001). Az 50 μM rozmaringsav előkezelést követő DT2 (24 h 50 μM rozmaringsav + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2)) kezelés után szintén szignifikánsan alacsonyabb TEER értékeket mértünk a sejteken a kontroll értékekhez képest 48 órával a kezelés megkezdése után (p =0,0058), 72 órával később ugyancsak alacsonyabb volt a TEER a kontroll kezelésnél mért értékhez viszonyítva (p <0,001). Szignifikáns eltérés volt tapasztalható a DON és a DT2 kezelés között 48 óra és 72 óra inkubáció után (mindkét esetben p <0,001), valamint a T-2 toxinnal és a DT2-vel történő inkubáció után is mindkét időintervallumban (p <0,001). Összehasonlítva a csak DT2 és a 24

h 50 μM rozmaringsav + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelést kapott sejtek TEER értékeit jelentős mértékű eltérés volt tapasztalható 48 és 72 óra inkubációt követően is (mindkét esetben $p < 0,001$).

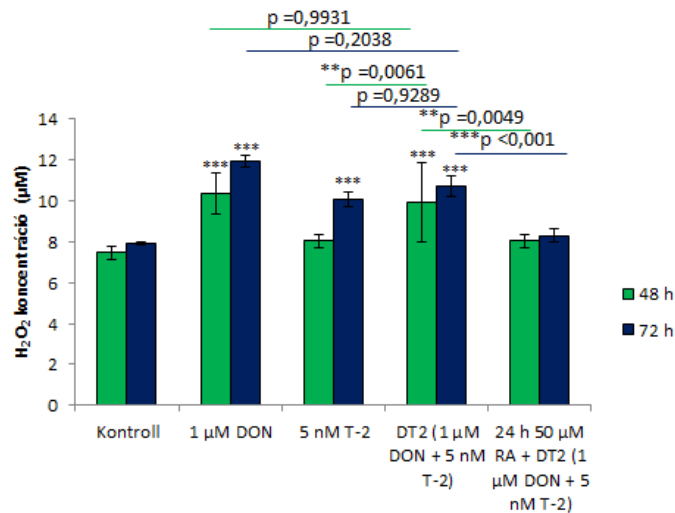


21. ábra: A TEER változás $\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$ -ben kifejezett értékei 48 és 72 óra inkubálás 1 μM deoxinivalenollal (DON), 5 nM T-2-vel, DT2-vel (1 μM DON + 5 nM T-2) és 24 órás 50 μM rozmaringsav (RA) előkezelést követő DT2-vel (24 h 50 μM RA + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelések után. A TEER értékek mérése a kezelések megkezdése előtt (0 h), valamint 48 óra (48 h) és 72 óra (72 h) inkubációt követően történt. Az 50 μM rozmaringsav előkezelés megelőzte a 0 h TEER mérést, az ekkor detektált TEER adatok nem kerültek ábrázolásra. A kontroll értékéhez viszonyított eltéréseket csillagokkal jelöltük: ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$, míg az összekapcsolt csoportok közötti (48 és 72 órára vonatkoztatott) különbségeket az összekötő vonalon látható p értékekkel tüntettük fel. A diagram adatai átlag \pm szórásaként (SD) ($n = 9$) lettek ábrázolva.

6.2.2.3. A DON, a T-2 toxin, az önálló DT2 és a rozmaringsav előkezelést követő DT2 kezelések hatása az extracelluláris H_2O_2 koncentrációra

A 48 és 72 óráig tartó 1 μM DON, 5 nM T-2 toxin, DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) és 50 μM rozmaringsav előkezelést követő DT2 kezeléseket követően meghatározásra került az IPEC-J2 sejtek sejtmentes felülűszojában a H_2O_2 koncentráció (22. ábra). Azok az IPEC-J2 sejtek, melyek az 1 μM DON vagy a DT2 kezelést kapták szignifikánsan magasabb volt a H_2O_2 koncentrációjuk 48 és 72 óra inkubáció után a kontroll értékhez képest (mindkét toxin kezelés, mindkét idő intervallumban $p < 0,001$). Az 5 nM T-2 toxin 48 óra alatt nem változtatta meg ($p = 0,9529$), de 72 óra után növelte a H_2O_2 koncentrációját az extracelluláris térben ($p < 0,001$). Az 50 μM rozmaringsavval előkezelt DT2 kezelést kapott sejteknél nincs szignifikáns eltérés a kontroll csoporthoz képest sem 48 órát ($p = 0,9653$), sem pedig 72 órát ($p = 0,9969$) követően. Összehasonlítva az 1 μM DON és a DT2 hatását a H_2O_2 koncentrációra nem találtunk szignifikáns különbséget (48 h: 0,9931; 72 h: 0,2038), míg 5 nM T-2 toxin és DT2 kezeléseket kapott csoportok között 48 órát követően jelentős eltérést

találtunk ($p = 0,0061$), azonban 72 órát követően ez az eltérés nem volt kimutatható ($p = 0,9289$). Jelentős mértékű különbség volt megfigyelhető a csak DT2 és a 24 h 50 μM rozmaringsav + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelések között, a rozmaringsav előkezelést kapott sejteknek szignifikánsan alacsonyabb volt a H_2O_2 termelése 48 órát ($p = 0,0049$) és 72 órát ($p < 0,001$) követően.



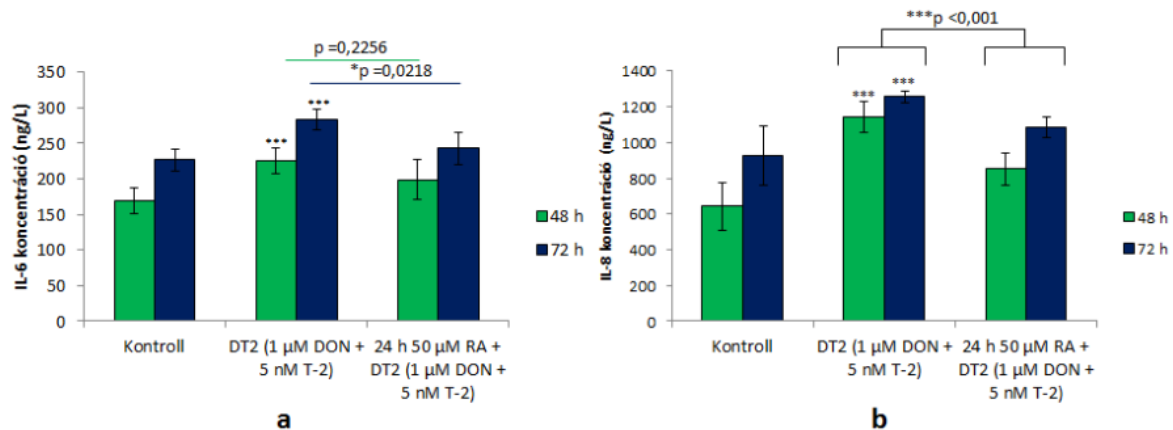
22. ábra: Az extracelluláris H_2O_2 koncentráció változásának mérését Amplex Red segítségével IPEC-J2 sejtek sejtmentes felülúszójából 1 μM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2 toxin, DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) és 50 μM rozmaringsav (RA) + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelést követően végeztük el. A mintavétel 48 (48 h) és 72 órával (72 h) a kísérlet megkezdése után történt. A kontroll értékektől való különbségeket csillagokkal jelöltük: *** $p < 0,001$, a kezelési csoportok közötti eltéréseket 48 óra inkubálást követően zöld vonalon, 72 órát követően kék vonalon feltüntetett p értékekkel jeleztük. A diagram adatait átlag \pm szórásként (SD) ($n = 8$) tüntettük fel.

6.2.2.4. A DT2 és a rozmaringsav előkezelést követő DT2 hatása az IPEC-J2 sejtek IL-6 és IL-8 termelésére

Az IPEC-J2 sejtek sejtmentes felülúszójából kimutatásra került az IL-6 és IL-8 citokinek koncentráció változása 48 és 72 órán át tartó DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) és 24 h 50 μM rozmaringsav + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelések után (23. ábra). Az IL-6 koncentrációja szignifikánsan megemelkedett DT2 kezelés hatására mind a 48, mind a 72 óra kezelési idő után (mindkét esetben $p < 0,001$), míg a rozmaringsav előkezelésnél nem történt változás a kontroll értékhez képest sem 48 ($p = 0,1451$), sem 72 órát követően ($p = 0,7118$). Az önmagában alkalmazott DT2 és az 24 h 50 μM rozmaringsav + DT2 kezelést kapott IPEC-J2 sejtek IL-6 citokin koncentrációjában 48 óra után nem volt különbség ($p = 0,2256$), addig a 72 óra inkubációt követően szignifikáns eltérés volt a két csoport között ($p = 0,0218$).

Az IL-8 koncentrációja szignifikánsan megnőtt DT2-vel történő inkubálás után az IPEC-J2 sejteknél, mind a 48, mind a 72 órát követően ($p < 0,001$). A 24 h 50 μM

rozmaringsav + DT2 kezelés hatására nem változott jelentős mértékben az IL-8 citokin koncentrációja, sem 48 óra ($p = 0,0602$), sem 72 óra kezelést követően a kontroll sejtek IL-8 koncentrációjához képest ($p = 0,0636$). Összehasonlítva a két kezelést, szignifikánsan alacsonyabb a 24 óra 50 μM rozmaringsav előkezelést kapott sejtek IL-8 termelése az önmagában DT2 kezelést kapott IPEC-J2 sejtekhez képest mind 48, mind 72 órát követően (mindkét esetben $p < 0,001$).

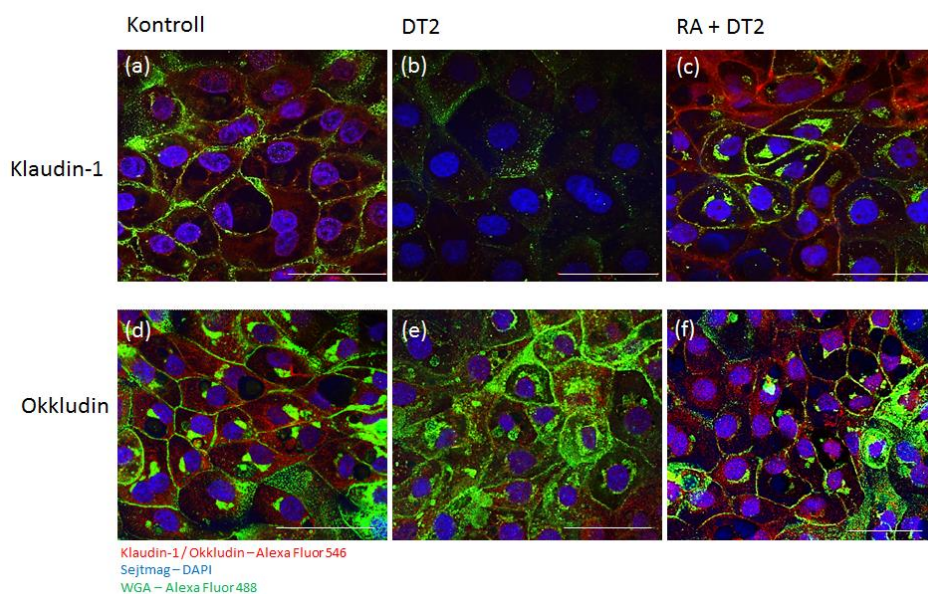


23. ábra: Az IPEC-J2 sejtek sejtmentes felülúszóiban mért IL-6 és IL-8 koncentráció változásai 48 (48 h) és 72 óráig (72 h) tartó DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) és 24 h 50 μM rozmaringsav (RA) + DT2 kezeléseket követően. **a)** Az IL-6 koncentráció változásai a két kezelés hatására. **b)** Az IL-8 citokin mennyiségi változása a két inkubációs időt követően. A kontrollhoz viszonyított jelentősen eltérő eredményeket csillagokkal különböztettük meg: *** $p < 0,001$, míg a kezelési csoportok közötti különbségeket IL-6 mérésnél, 48 óra inkubálást követően zöld, 72 órát követően kék vonalon feltüntetett p értékekkel jelöltük. IL-8 koncentráció változásánál a csoportok közötti szignifikáns eltérések, 48 és 72 órás eredményei kapcsos vonalakra írt p értékkel került bemutatásra. A diagram adatai átlag \pm szórásként (SD) ($n = 10$) kerültek bemutatásra.

6.2.2.5. A DT2 és a rozmaringsav előkezelést követő DT2 hatása a klaudin-1 és az okkludin lokalizációjára a sejtmembránban

Az IPEC-J2 sejtek sejtmembránjában a klaudin-1 és okkludin fehérjék lokalizációját 72 órás DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2), illetve 24 h 50 μM rozmaringsav + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezeléseket követően határoztuk meg (24. ábra). A DT2 hatására kevésbé detektálható a membránban a klaudin-1 a kontrollnál látható fehérjemennyiséghez képest. A rozmaringsav előkezelést, majd szintén 72 óra DT2-vel indukált IPEC-J2 sejteknél a klaudin-1 fehérje mennyisége hasonló maradt a kontroll képest.

A 72 órán át tartó DT2 kezelést követően az okkludin fehérje jelenléte a sejtmembránban a kontrollhoz képest nem változott a konfokális felvételek alapján. A rozmaringsav előkezelést követő DT2 kezelés után a membránban lévő okkludin fehérje mintázata hasonló maradt a kontroll sejteknél láthatóhoz.



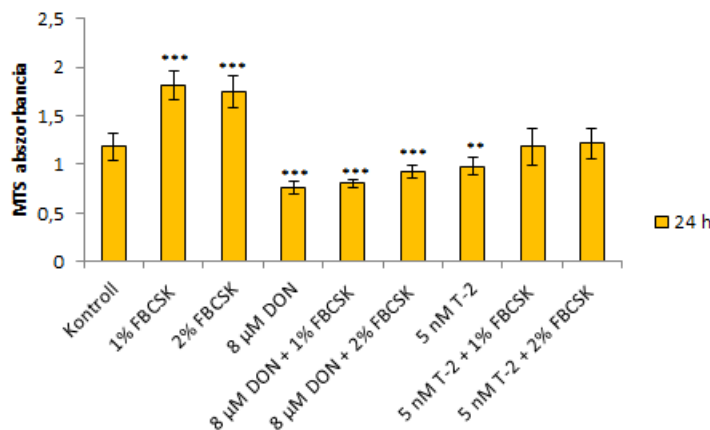
24. ábra: A DT2 (1 μM deoxinivalenol (DON) + 5 nM T-2) és a 24 h 50 μM rozmaringsav (RA) + DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) kezelés hatása a klaudin-1 és okkludin elhelyezkedésére a sejtmembránban. Az IPEC-J2 sejtek 72 órán keresztül inkubálódtak a kezelőoldatokkal, majd fixálást követően immunfluoreszcens festéssel tettük láthatóvá a két TJ membránfehérjét. Piros színnel (Alexa Fluor 546) a klaudin-1, valamint az okkludin TJ fehérjék láthatóak. Az IPEC-J2 sejtek sejtmagja kékekkel festődött (DAPI), míg a sejtmembrán zöld színben látható (WGA, Alexa Fluor 488). **a,d**) kezeletlen IPEC-J2 sejtek sejtmagja, valamint a membránban elhelyezkedő klaudin-1 (**a**) és okkludin TJ fehérjék (**d**). **b,e**) DT2 kezelés hatása a klaudin-1 (**b**) és az okkludin fehérje expressziós mintázatára (**e**). **c,f**) RA + DT2 kettős kezelést követően a klaudin-1 (**c**) és az okkludin (**f**) membránban történő kifejeződése és lokalizációja. A vonal 50 μm -t jelöl.

6.2.3. A fermentált búzacsíra kivonat védőhatásának vizsgálata DON és T-2 toxin terheléskor és az azt követő 24 órában

6.2.3.1. Citotoxicitás vizsgálat MTS módszer segítségével 24 óra kezelés után

Az IPEC-J2 sejteket 24 óráig kezeltük 8 μM DON, 5 nM T-2 toxinnal, valamint 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonattal. Továbbá teszteltük a vegyületek hatását kombinációban adva: 8 μM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 8 μM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat (25. ábra). A DON és a T-2 toxin is szignifikánsan csökkentette az MTS abszorbancia értékeit ($p < 0,001$ és $p = 0,0039$). Mind a két alkalmazott koncentrációjú fermentált búzacsíra kivonat oldat növelte a sejteknél mért MTS abszorbancia értékeket a kontroll értékhez képest ($p < 0,001$). A kombinációs kezelés eredményei azt mutatták, hogy a 8 μM DON citotoxikus hatását nem tudta csökkenteni sem az 1%, sem a 2% fermentált búzacsíra kivonattal történő kezelés a kontroll értékhez viszonyítva ($p < 0,001$). Azonban

5 nM T-2 hatását képes volt mind az 1%, mind a 2% fermentált búzacsíra kivonat javítani, összehasonlítva a kontrollnál kapott eredménnyel ($p = 1,000$ és $p = 0,999$).



25. ábra: A 8 µM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2, 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat (FBCSK) sejtelképességre gyakorolt önálló és kombinációban (8 µM DON + 1% FBCSK, 8 µM DON + 2% FBCSK, 5 nM T-2 + 1% FBCSK, 5 nM T-2 + 2% FBCSK) adott hatását MTS módszerrel vizsgáltuk, IPEC-J2 sejteken 24 óra kezelési időt alkalmazva. A kontroll értékhez viszonyított eltéréseket csillagokkal jelöltük ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$. Az adatok átlag \pm szórás (SD) ($n = 8$) formájában vannak megadva.

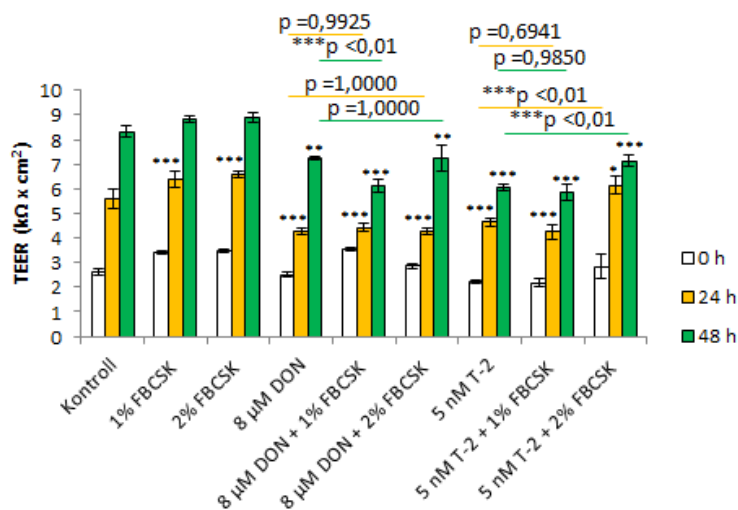
6.2.3.2. Mikotoxin kezeléseket követő regeneráció hatása az IPEC-J2 TEER értékeire

A mikotoxin és fermentált búzacsíra kivonattal történő kezeléseket megelőzően megmértük a sejtréteg integritásának erősségét (TEER értékeket) az IPEC-J2 sejteknél (0 h). Ezután 24 óráig tartó kezelés következett a mikotoxinokkal (8 µM DON és 5 nM T-2) és az 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat oldatokkal, illetve a keverékekkel (8 µM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 8 µM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat). Ezt követően további 24 óra regeneráció következett (48 h), melynek során minden kezelt csoporthoz kontroll tápoldatot (fenolvörös-mentes DMEM/F12) adtunk (26. ábra).

A 24 órás kezelést követően azt találtuk, hogy a 8 µM DON és 5 nM T-2 kezelés szignifikánsan csökkentette a TEER értékeket ($p < 0,001$). Az önmagában adott 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat emelte a sejtréteg integritást ($p < 0,001$). A kombinációs kezeléseket közül a 8 µM DON TEER csökkentő hatását nem tudta ellensúlyozni sem az 1%, sem a 2% fermentált búzacsíra kivonat, a kontroll értékeihez viszonyítva ($p < 0,001$). Az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat számottevően alacsonyabb értéket mutatott ($p < 0,001$), azonban az 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat együttkezelés jelentősen magasabb értéket mutatott a kontroll értékekhez képest ($p = 0,018$). Összehasonlítva a 8 µM DON kezeléskor mért TEER értékeket a két fermentált búzacsíra kivonattal kombinációban

megállapítottakkal, azt az eredményt kaptuk, hogy csoportok között nincs szignifikáns különbség (8 μ M DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat: $p = 0,9925$; 8 μ M DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat: $p = 1,000$). 5 nM T-2 toxin és az 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat kezelést kapott csoportok eredményei szignifikánsan eltérnek ($p < 0,001$), míg az önmagában adott T-2 toxin és az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat között ez nem állapítható meg ($p = 0,6941$).

A mikotoxinokkal és fermentált búzacsíra kivonattal történő inkubálást követően regenerációs kezelést kaptak az IPEC-J2 sejtek (48 h), vagyis fenolvörös-mentes DMEM/F12 tápfolyadék hozzáadása történt meg a sejtek apikális és bazolaterális kompartmentjében, PBS mosást követően. A korábban 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat kezelést kapott sejtek TEER értékei megközelítették a kontroll csoport TEER értékeit (1% fermentált búzacsíra kivonat: $p = 0,348$; 2% fermentált búzacsíra kivonat: $p = 0,194$), míg az előzőleg mikotoxin kezelést kapott IPEC-J2 sejtek értékei szignifikánsan alacsonyabbak maradtak (8 μ M DON és 5 nM T-2 esetében is: $p < 0,01$). A kombinációs kezelésen átesett sejtek esetében is jelentősen alacsonyan maradtak a TEER értékek a kontroll értékhez viszonyítva ($p < 0,001$). A korábban 8 μ M DON kezelést kapott sejtek eredményeit összehasonlítva a 24 óra kezelés alatt 1% fermentált búzacsíra kivonattal kombinációban kapott DON TEER értékeivel (8 μ M DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat) szignifikánsan alacsonyabb értéket mértünk ($p < 0,01$), míg az önálló 8 μ M DON kezeléshez képest a 8 μ M DON + 2% fermentált búzacsíra kivonattal kezelt csoportok összehasonlításánál nincs szignifikáns különbség ($p = 1,0000$). Összehasonlítva az 5 nM T-2 toxin és a két kombinációs kezelését a regeneráció után, azt kaptuk, hogy míg az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat esetében nincs szignifikáns különbség ($p = 0,9850$), addig 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat esetében jelentős mértékű TEER érték növekedés detektálható ($p < 0,01$).



26. ábra: A TEER értékek a kísérletek megkezdése előtt (0 h), 24 órás inkubációt (24 h) és a regenerációs kezelést követően (48 h) $k\Omega \times cm^2$ -ben kifejezve. Az IPEC-J2 sejtréteget kezeltük 8 μM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2, 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat (FBCSK) oldatokkal és ezek kombinációival: 8 μM DON + 1% FBCSK, 8 μM DON + 2% FBCSK, 5 nM T-2 + 1% FBCSK, 5 nM T-2 + 2% FBCSK. A kontroll értékhez viszonyított különbségeket csillagokkal jelöltük: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$, míg a csoportok egymáshoz viszonyított eltéréseit a 24 órás inkubációhoz tartozó eredményeket sárga vonalakkal, a regenerációt követően zöld vonalakkal feltüntetett p értékekkel jelöltük. Az adatokat átlag \pm szórás (SD) ($n = 9$) formájában tüntettük fel.

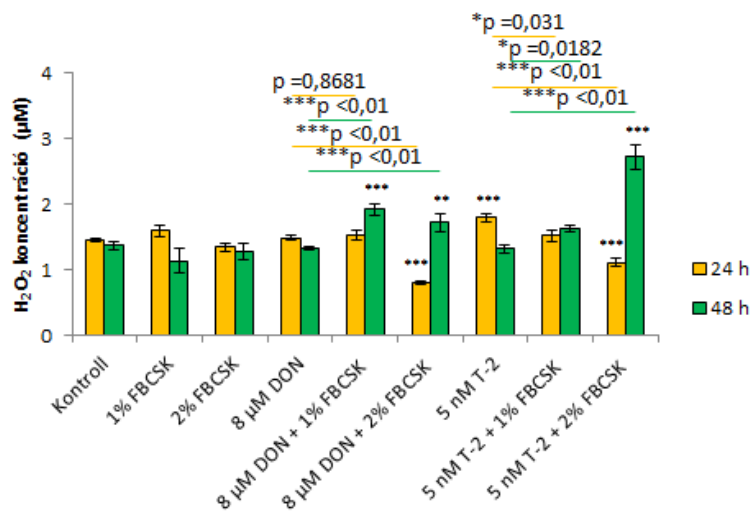
6.2.3.3. Extracelluláris H_2O_2 koncentráció meghatározása Amplex Red reagens segítségével

Az extracelluláris H_2O_2 koncentrációváltozás megmérésre került a 8 μM DON, az 5 nM T-2, 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonatok, valamint ezek kombinációjából álló oldatokkal (8 μM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 8 μM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat) történő 24 órás inkubáció után (24 h), majd az azt követő 24 órás regenerációs kezelés után is (48 h) (27. ábra).

Az inkubációs idő lejártá után, azt az eredményt kaptuk, hogy a 8 μM DON hatására a kontrollhoz hasonló ($p = 0,07$), míg az 5 nM T-2 toxin kezelés hatására szignifikánsan magasabb a H_2O_2 koncentrációját ($p < 0,001$). Az 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat nem változtatta meg a H_2O_2 szintjét az extracelluláris térben a kontroll értékhez viszonyítva ($p = 0,905$ és $p = 0,705$). A kombinációs kezeléseknél a 8 μM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat és az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat nem változtatta meg az extracelluláris H_2O_2 mennyiségét a kontroll kezelésekhöz képest (DON $p = 0,844$ és T-2 $p = 0,835$). Ezzel szemben a 2% fermentált búzacsíra kivonat kiegészítés mind a 8 μM DON,

mind az 5 nM T-2 esetében szignifikánsan csökkentette a H₂O₂ koncentrációját a kontroll értékhez képest ($p < 0,001$). Összehasonlítva, az 1% fermentált búzacsíra kivonattal kombinációban adott DON és az önálló DON kezelési csoportok között nem volt szignifikáns eltérés ($p = 0,8681$), míg az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat összevetve az 5 nM T-2 toxin H₂O₂ koncentrációra gyakorolt hatását jelentős mértékű csökkenést állapítottunk meg ($p = 0,031$). Szignifikánsan alacsonyabb volt a 8 μ M DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat és az 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat kezeléseket kapott sejtek H₂O₂ mennyisége (mindkettőnél $p < 0,01$), összehasonlítva azoknál a sejteknél mért értékekkel, melyeknél a mikotoxinok külön-külön lettek hozzáadva.

A regenerációs időt követően (48 h) a korábban mikotoxinokkal kezelt sejtek sejtmentes felülűszójában az extracelluláris H₂O₂ koncentrációja nem változott a kontroll csoport értékéhez képest, ahogy a fermentált búzacsíra kivonattal kezelt sejteknél sem történt változás a H₂O₂ koncentrációjához viszonyítva, amikor önmagukban lettek adva az IPEC-J2 sejtekhez. Az inkubáció alatt kombinációs kezeléseket kapott IPEC-J2 sejteknél a 8 μ M DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat, illetve a 8 μ M DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat hatására szignifikánsan megemelkedett a H₂O₂ koncentráció a kontrollhoz képest ($p < 0,001$ és $p = 0,009$). Az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat kezelést kapott sejtek extracelluláris terében a H₂O₂ a kontroll értéktől nem különbözött ($p = 0,097$), míg az 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat kapott sejteknél megnőtt a H₂O₂ termelés ($p < 0,001$). Szignifikánsan magasabb lett a H₂O₂ koncentráció a korábban kombinációs kezeléseket kapott sejtek extracelluláris terében (8 μ M DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat: $p < 0,01$; 8 μ M DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat: $p < 0,01$; 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat: $p = 0,0182$; 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat: $p < 0,01$) összehasonlítva a csak 8 μ M DON- nal vagy csak 5 nM T-2-vel inkubált sejtekhez képest.



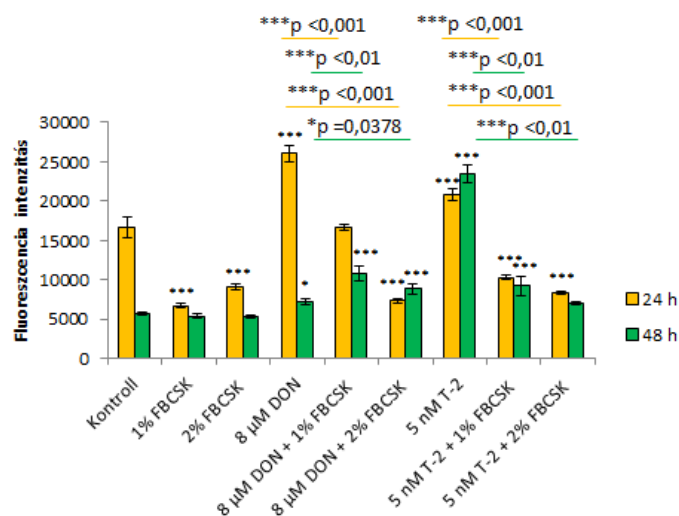
27. ábra: Az extracelluláris H₂O₂ koncentráció változásai a 8 µM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2 toxin, 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat (FBCSK) és ezek kombinációjával (8 µM DON + 1% FBCSK, 8 µM DON + 2% FBCSK, 5 nM T-2 + 1% FBCSK, 5 nM T-2 + 2% FBCSK) történő inkubációja (24 h), valamint az ezt követő regenerációs kezelés után (48 h). A kontroll értékekhez viszonyított eltéréseket csillagokkal jelöltük: **p < 0,01 és ***p < 0,001, illetve a csoportok közötti különbségeket, inkubációt követően sárga vonalon, regeneráció esetében zöld vonalon jelölt p értékekkel kerültek feltüntetésre. Az adatokat átlag ± szórás (SD) (n = 8) formájában adtuk meg.

6.2.3.4. Intracelluláris ROS meghatározása kezelés és regeneráció után

Az intracelluláris ROS szintet DCFH-DA festéssel határoztuk meg 24 óra 8 µM DON, 5 nM T-2, 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat, valamint ezek kombinációjából álló (8 µM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 8 µM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat, 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat) kezeléseket után (24 h) majd 24 óra regenerációs inkubációt követően (48 h) (28. ábra).

Mind a 8 µM DON, mind az 5 nM T-2 önálló adása után szignifikánsan megnőtt az intracelluláris ROS mennyisége (mindkét esetben p < 0,001). Az önállóan adott 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat jelentősen csökkentette a ROS szintjét (mindkét kezelésnél p < 0,001). Kombinációban adva 8 µM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat a kontroll értékhez hasonló eredményt adott (p = 1,000), míg 8 µM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat hatására jelentősen csökkent az intracelluláris ROS szintje (p < 0,001). Az 5 nM T-2 toxint kombinációban adva az 1% vagy a 2% fermentált búzacsíra kivonattal szignifikáns mértékű ROS csökkenést tapasztaltunk (mindkét esetben p < 0,001). Meghatározó mértékben csökkent az intracelluláris ROS mennyisége azokban az IPEC-J2 sejtekben, ahol a sejtek fermentált búzacsíra kivonattal együtt inkubálva kaptak mikotoxint összehasonlítva a csak önmagában mikotoxint kapott sejtekkel (minden esetben p < 0,001).

A regenerációt követően (48 h) az előzőleg 8 μM DON vagy 5 nM T-2 kezelést kapott IPEC-J2 sejtekben megnőtt az intracelluláris ROS mennyisége (DON: $p = 0,0439$, T-2: $p < 0,01$). Az inkubáció ideje alatt 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat oldatot kapott sejtek intracelluláris ROS mennyisége közelített a kontroll értékekhez a regeneráció után. A 8 μM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat és az 5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat kezelést kapott sejteknél a regenerációt követően jelentős mértékben magasabb volt a ROS mennyisége a kontrollnál mért értékhez képest (mindkét esetben $p < 0,01$). A 8 μM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat szignifikánsan magasabb ROS értékeket adott ($p < 0,001$), míg az 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat kezelés nem mutatott különbséget a kontroll értékekhez viszonyítva ($p = 0,142$). Összehasonlítva a 8 μM DON és az 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonattal együtt adott DON hatását a regenerációt követően, mindkét esetben szignifikáns intracelluláris ROS növekedést tapasztaltunk (8 μM DON + 1% fermentált búzacsíra kivonat: $p < 0,01$; 8 μM DON + 2% fermentált búzacsíra kivonat: $p = 0,0378$). Az 5 nM T-2 toxint és a kombinációs kezelésket (5 nM T-2 + 1% fermentált búzacsíra kivonat és 5 nM T-2 + 2% fermentált búzacsíra kivonat) kapott sejtek eredményeit összehasonlítva jelentős mértékű különbséget találtunk (mindkét esetben $p < 0,01$).



28. ábra: Az intracelluláris ROS szint változása 8 μM deoxinivalenol (DON), 5 nM T-2 toxin, 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat (FBCSK) és ezek kombinációs kezelése (8 μM DON + 1% FBCSK, 8 μM DON + 2% FBCSK, 5 nM T-2 + 1% FBCSK, 5 nM T-2 + 2% FBCSK) (24 h) valamint a regenerációt követően (48 h) az IPEC-J2 sejtekben. A kontroll értékektől eltérő különbségeket csillagokkal jelöltük * $p < 0,05$ és *** $p < 0,001$, továbbá a csoportok közötti eltéréseket, inkubációt követően sárga vonalakon, regeneráció után zöld vonalakon feltüntetett p értékekkel jelöltük. A diagram adatai átlag \pm szórásaként (SD) ($n = 6$) tüntettük fel.

7. Diszkusszió

A *Fusarium* penészgomba fajok által termelt, trichotecén-vázis mikotoxinok közé tartozik a DON és a T-2 toxin, melyek kimutathatóak a mérsékelt égövön termesztett, megfertőzött gabonafélékből. Az előfordulásuk természetes, ezért nem lehet teljes mértékben kiküszöbölni a penészgomba fertőződést és a mikotoxin szennyeződést (Zinedine és Mañes, 2009). Kulcsfontosságú a mikotoxinok kombinációban történő vizsgálata, mivel a fuzáriotoxinok természetes módon fordulnak elő egyszerre az élelmiszerekben és a takarmányokban. Nehézséget okoz a vizsgálatokban, hogy a takarmányban a mikotoxinok glikozilált formában is jelen lehetnek, így amikor a szervezetben deglikozilálódnak a bélbaktériumok vagy a gyomorsav pH hatására, akkor az adott toxin koncentrációja megnő a béltraktusban, akár meg is haladhatja a napi beviteli irányértéket is (Berthiller et al., 2013). Több humán és állat vékonybél-sejtvonalat izoláltak, hogy modellezhessék az élelmiszerekkel bekerült vegyületek hatását a vékonybélre. Cencic és Langerholc (2010) összefoglaló munkájukban felsorolják azokat a sejtvonalakat és sejtmodelleket, amelyek alkalmasak az ilyen vizsgálatokra. Az általunk választott két sejtvonal a HIEC-6 és az IPEC-J2.

7.1. HIEC-6 sejtek válaszkészségének vizsgálata a DON, a T-2 toxin és a DT2 kezelésekre

Kutatási munkámban elsőként vizsgáltuk a humán intesztinális, nem-daganatos HIEC-6 sejteken a DON és a T-2 toxin sejtszintű hatásait. Korábban olyan humán bélhám sejtvonalakon vizsgáltak a DON hatását, melyek vastagbél eredetűek és daganatosak. Graziani és munkatársai (2015) Caco-2 sejteken 24 órás DON-nal való kezelést követő laktát dehidrogenáz (LDH) vizsgálattal végzett kísérlet során 100 μM koncentráció esetében detektáltak citotoxikus hatást. Krishnaswamy és munkatársai (2010) a DON IC_{50} értékét 0,84 μM értékben határozták meg HT-29 sejteken MTT tetrazólium festés (MTT) és LDH vizsgálat segítségével 24 órás inkubációt követően. Del Favero és munkatársai (2018) ugyanúgy HT-29 sejtvonalon vizsgálták a DON sejtelétképességre ható befolyását 24 órás inkubációs idővel. A WST-1 formazán festés eredmények alapján szignifikáns csökkenést mértek a sejtek életképességében 1 és 10 μM DON koncentráció esetében. Ez korrelál az általunk kapott eredményekkel, miszerint a HIEC-6 sejteknél jelentős mértékű sejthalált mértünk 5 μM DON koncentráció fölött. Megállapítható, hogy a HIEC-6 sejteknél már az 5 μM DON koncentráció is citotoxikus volt, összehasonlítva a Caco-2 sejtekkel, míg az említett szakirodalmi adatok szerint a HT-29 daganatos eredete ellenére érzékenyebb volt a DON jelenlétére. A T-2 toxin humán sejtekre vonatkozó toxicitásáról kevés adat áll rendelkezésre. Calvert és munkatársai (2005) Caco-2 sejteken tesztelték a T-2 toxin hatását 0,34–1,7 μM koncentrációban 48 óráig. Az MTT teszt alapján a sejtvonal rezisztens a toxinra. Romero és munkatársai (2016) Caco-2 sejteknél a T-2 toxin IC_{50} értékét 14,83 μM koncentrációban

határozták meg MTT és LDH módszerekkel, 24 órás kezelést követően. A Caco-2 sejtvonalon kapott T-2 toxin citotoxicitási eredmények azonban nem extrapolálhatóak egy nem daganatos sejtvonalnál tapasztalt sejttéltképpességi vizsgálat adataival. Kísérleteink alapján a 24 órás inkubációt követően a T-2 toxin 10 nM koncentráció fölött vált citotoxikussá HIEC-6 sejtek esetében, aminek ismeretében Romero és munkatársainak (2016) Caco-2 sejtekkel végzett eredményeivel összevetve kijelenthető, hogy a HIEC-6 sejtek a T-2 toxin által okozott károsító hatására kifejezetten érzékenyek. Még kevesebb információ áll rendelkezésre a humán bélhámsejtekkel végzett kombinációs kezelésekről. Alassane-Kpembé és munkatársai (2013) a DON és más trichotecén-vázás mikotoxinok együttes hatását vizsgálták Caco-2 sejteken 48 órás inkubációs időt követően NR módszerrel. A DON-t 0,15–0,55 μM koncentrációban együttadagolva a többi mikotoxinnal szinergista hatást figyeltek meg. A HIEC-6 sejtekkel végzett saját kísérleteinkben a DON esetében 5 μM fölötti, a mellette adagolt T-2 toxin esetében 10 nM fölötti 24 órás kezelést követően detektáltunk szignifikáns mértékű sejthalált. Bár magasabb koncentrációkat alkalmaztunk, megállapíthatjuk, hogy egyik DT2 kezelés sem volt toxikusabb a csak DON vagy csak T-2 toxin kezelést kapott sejtekhez képest a HIEC-6 sejtek esetében.

In vitro kísérleti eredmények szerint a DON és a T-2 toxin jelentős mértékű oxidatív stresszt képes okozni. Kouadio és munkatársai (2005) MDA méréssel bizonyították, hogy 24 órás, 10 μM koncentrációjú DON kezelés hatására jelentősen megemelkedett a lipidperoxidáció Caco-2 sejtekben. HT-29 sejteken végzett DCFH-DA kísérletekben 1 μM DON kezelést alkalmaztak 0,5–6 órás inkubációs idővel, mely idő alatt szignifikánsan megemelkedett a ROS szint, viszont 24 óra elteltével nem volt változás a ROS mennyiségében (Wan et al., 2019). Ugyanilyen eredményt kaptak Bensassi és munkatársai (2009), akik HT-29 sejteket kezeltek 24 óráig 2,5–15 μM koncentrációjú DON-nal és a DCF szint nem változott meg. A HT-29 sejtekkel ellentétben, a HIEC-6 sejtekkel kapott eredményeink szerint az 1 μM DON szignifikánsan megemelte a H_2O_2 koncentrációját és az intracelluláris ROS mennyiségét. Ez összhangban van a szintén nem-daganatos eredetű IPEC-J2 kísérletek adataival, miszerint 6,7 μM DON megemelte az intracelluláris ROS szintet, DCFH-DA módszerrel vizsgálva, 24 óra kezelés után (Kang et al., 2019). A kísérleteink alapján az 5 nM T-2 toxin kezelés szignifikánsan megemelte az extracelluláris térben a H_2O_2 koncentrációját és intracellulárisan a ROS szintet. A kombinációban adott 1 μM DON és 5 nM T-2 toxin jelentős mértékben járult hozzá az oxidatív stressz kialakulásához.

Eckmann és munkatársai (1993) több daganatos eredetű sejtvonalon végeztek kísérletet és kimutatták, hogy az általuk vizsgált sejtvonalak (Caco-2, HT-29, SW620, T84) mindegyike szekretál IL-8-at és más citokineket (pl.: IL-12, TGF- β 1) is. Emellett mind a Caco-2, mind a HT-29 sejtvonal vizsgálata során mértek detektálható IL-6 szintet is (Vitkus

et al., 1998; Li et al., 2009). Az általunk alkalmazott HIEC-6 sejtvonal esetében is detektáltak IL-6 és IL-8 citokin termelést (Schwartz et al., 2005). HIEC-6 sejtek esetében azt találtuk, hogy a DON 1 μM koncentrációban is képes szignifikáns mértékben megnövelni az IL-6 és az IL-8 koncentrációját 24 óra inkubáció után. A T-2 toxin citokin termelésre gyakorolt hatásáról kevés adat áll rendelkezésre a szakirodalomban. Kruber és munkatársai (2011) Caco-2 sejteken vizsgálták a T-2 toxin hatását 4,29–275 nM koncentráció tartományban 20 órás inkubációs idő után. Azt találták, hogy az IL-8 szintje megnőtt, mely eredmény hasonló a saját következtetésekhez, miszerint 5 nM T-2 toxin szignifikáns mértékben megemelte az IL-8 koncentrációját HIEC-6 sejtek esetében. A kapott eredmények alapján, az együttesen alkalmazott mikotoxin kezelések hatására az IL-6 és az IL-8 szintje szignifikánsan megemelkedett, így igazolható a DON és a T-2 toxin kombinációjának gyulladáskeltő hatása HIEC-6 sejteknél is.

Van De Walle és munkatársai (2010) szerint a Caco-2 sejteknél nőtt a sejtek közötti permeabilitás a klaudin-4 alultermelődése miatt koncentrációfüggő módon. Vizsgálatukban a DON-t 0,17–17 μM koncentráció tartományban alkalmazták. A vizsgálati eredményeiket megerősítette Pinton és munkatársainak (2009) kutatási munkája, miszerint a Caco-2 sejtek esetében a DON hatására csökkent a klaudin-3 és klaudin-4 expressziója. Ezek az eredmények megegyeznek a kísérletünkben tapasztaltakkal, már 1 μM DON is jelentős mértékben csökkentette a klaudin-1 expresszióját HIEC-6 sejtekben. Az 5 nM T-2 toxin is jelentősen mérsékelte a klaudin-1 koncentrációját 24 óra inkubáció után, viszont az okkludin mennyisége nem változott. Az immunfluoreszcens festést követően láthatóvá vált két TJ fehérje eloszlása a HIEC-6 sejtek sejtmembránjában, mely bizonyította, hogy 24 óra kezelést követően az önmagában és a kombinációban adott mikotoxin kezelések hatással voltak az expressziós mintázatokra. A mennyiségi meghatározás eredményei is azt mutatják, hogy a klaudin-1 koncentrációja erőteljesen csökkent, míg az okkludin koncentrációja nem változott szignifikáns mértékben egyik kezelés hatására sem.

7.2. A két fuzáriotoxin IPEC-J2 sejtekre gyakorolt hatásának feltérképezése

Goossens és munkatársai (2012) meghatározták 72 órás DON és T-2 toxin inkubációt követően az IPEC-J2 sejteknél az élő, apoptotikus és nekrotizáló sejtek arányát áramlásos citometriai módszerrel. Eredményeik alapján a DON és a T-2 toxin IC_{50} értéke 23,52 μM és 20,4 nM volt. Springler és munkatársai (2016) NR festéssel és LDH teszt segítségével állapították meg, hogy a DON milyen hatással van az IPEC-J2 sejtekre. Azt találták NR festéssel, hogy a DON szignifikánsan csökkentette a sejtéletképességet 24 óra alatt, 50 μM koncentrációban alkalmazva, míg az LDH teszt 48 óra DON inkubációt követően 33% csökkenést mutatott az IPEC-J2 sejtek életképességében. Vandenbroucke és munkatársai (2011) leírták, hogy IPEC-J2 sejtek esetén a sejtpusztulás szignifikáns volt 24

órás DON hozzáadás után 0,8425–33,7 μM koncentrációk között. A saját eredményeink azt mutatták, hogy az IPEC-J2 sejteknél a DON már 8 μM koncentrációban és magasabb koncentrációban sejthalált okozott. A T-2 toxin toxicitását vizsgálva Verbrugghe és munkatársai (2012) megállapították, hogy a T-2 toxin IC_{50} értékei az IPEC-J2 sejtek esetében 0,0121–0,395 μM voltak. Az eredményeink összhangban vannak Verbrugghe és munkatársai (2012) által leírtakkal, az IPEC-J2 sejteknél 20 nM, illetve az annál magasabb koncentrációkban vált citotoxikussá a T-2 toxin.

A legtöbb tanulmány a külön hozzáadott mikotoxin kezelésekre összpontosít, azonban ismert, hogy a mikotoxinok együttesen fordulnak elő a takarmányban és feltételezhetően hatással vannak egymásra (Smith et al., 2016, Alassane-Kpembé et al., 2017, Weaver et al., 2020, Xu et al., 2020). Eddig csak néhány *in vitro* kísérletben vizsgálták a DON és a T-2 toxin együttes hatását. Lei és munkatársai (2017) megállapították, hogy a DON-nal (2,696 μM) és a T-2 toxinnal (21,4 nM) végzett együttes kezelés fokozta az oxidatív stresszt, így apoptózist indukált a kondrocitákban és a hepatocitákban. Ruiz és munkatársai (2011a, 2011b) megvizsgálták a DON és a T-2 toxin kombináció hatását az immortalizált hörcsög petefészek sejtekre (CHO-K1) és az emlős vese hámsejtjeire (Vero) és azt tapasztalták, hogy 24, 48 és 72 órás kezelés után antagonistá módon hatottak. Ezzel szemben Ficheux és munkatársai (2012) arra a következtetésre jutottak, hogy a kombináció toxicitása nagyobb volt, mint az egyes mikotoxinok egyéni toxicitása, 14 napig tartó kezelés után, fehérvérsejt progenitor sejteken, kolóniaképző granulocita / monocita egységen (CFU-GM). Szintén additív hatást állapítottak meg a trombocita-aggregáció gátlására valószínűleg hasonló biokémiai mechanizmusok révén, amikor a sertés trombocita-szuspenziókat ennek a mikotoxin-kombinációnak tették ki (Gentry et al., 1988). A DT2 (1 μM DON + 5 nM T-2) esetén 72 órás expozíció után sem befolyásolta a sejtek életképességét szignifikáns mértékben. Összehasonlítva a DON, a T-2 toxin és a DT2 utáni TEER értékeket megállapíthatjuk, hogy a kezelési csoportok között mind 48, mind 72 óra után szignifikáns a különbség.

Pinton és munkatársai (2009) 24 órás 5 μM DON kezelés után a TEER értékek dóziszfüggő csökkenését figyelték meg az IPEC-1 sejtekben. A TEER értékek jelentős mértékben mérséklődtek az IPEC-J2 sejteknél, miután 24 órás 6,74 μM koncentrációjú DON kezelést adtak hozzájuk bazolaterálisan (Diesing et al., 2011). Springler és munkatársai (2016) arról számoltak be, hogy IPEC-J2 sejteknél a DON hatására szignifikánsan alacsonyabb TEER értékek mérhetők 5–20 μM koncentrációk között, 24 óra elteltével. A saját eredményeink alapján az IPEC-J2 sejteknél a DON 1–8 μM koncentrációban szignifikáns TEER csökkenést okozott 24, 48 és 72 órát követően is. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a szakirodalmi adatokkal ellentétben a mi kísérletünkben felhasznált sejtek között sokkal kisebb koncentrációjú DON kezelés hatására is csökkent a sejtréteg

integritása. Goossens és munkatársai (2012) megállapították, hogy a T-2 toxin, 21,4 és 214 nM koncentráció között, 72 órás inkubáció után csökkentette az IPEC-J2 sejtréteg integritását. A T-2 toxint 1,6–10,5 nM koncentráció tartományban adva, 24 órás inkubáció után, a TEER értékekben történt változás nélkül gyengült meg annyira a bélhám, hogy a *Salmonella typhimurium* transzepiteliálisan áthaladt az IPEC-J2 sejtrétegen keresztül (Verbrugghe et al., 2012). Ezekkel az eredményekkel összhangban vannak a saját eredményeink is, ugyanis 5 nM T-2 toxin nem okozott a TEER értékekben változást 48 és 72 órás kezelést követően sem. A DT2 esetében a TEER érték szignifikánsan alacsonyabb, mint a DON vagy a T-2 toxinnál kapott értékek.

Kang és munkatársai (2019) beszámoltak arról, hogy DCFH-DA módszerrel vizsgálva a DON 6,7 μ M koncentrációban 24 órás mikotoxin-expozíció után jelentősen megemelte az intracelluláris ROS-szintet az IPEC-J2 sejtekben. Kísérleteinkben az oxidatív stresszt az extracelluláris H₂O₂ koncentráció- és az intracelluláris ROS mennyiségi változásával mértük IPEC-J2 sejtekben. Az 1 μ M DON már számottevően megemelte az extracelluláris H₂O₂ koncentrációt és az intracelluláris ROS mennyiségét is 24, 48 és 72 órás kezelést követően. 5 nM T-2 toxin koncentráció, 48 óra inkubációt követően nem okozott szignifikáns H₂O₂ koncentrációemelkedést, azonban az oxidatív stressz mértéke 72 órát követően már jelentősen magasabb volt a kontroll értékekhez képest.

Wan és munkatársai (2013) arról számoltak be, hogy a 0,5–2 μ M DON hozzáadása 48 órán keresztül az IL-6 és az IL-8 relatív mennyiségének növekedését okozta az IPEC-J2 sejtekben. A T-2 toxin hatását a bélhámsejtek citokin szintjére még nem vizsgálták széles körben. Caco-2 sejteknél a 4,29–275 nM koncentrációtartományban alkalmazott 20 órás T-2 toxin expozíció után megemelte az IL-8 fehérje szintjét (Kruber et al., 2011). A szakirodalomban nem találtam adatot a DT2 interleukin koncentráció változására vonatkozó hatásáról. Eredményeink alapján a DON és a T-2 toxin együttes alkalmazásakor (1 μ M DON + 5 nM T-2) mind 48, mind 72 óra után szignifikánsan megemelkedett az IL-6 és IL-8 koncentrációja a sejtmentes felülúszóban, így eredményeink alátámasztják Wan és munkatársai (2013) eredményeit.

Springler és munkatársai (2016) arról számoltak be, hogy a DON nem befolyásolta az okkludin és a klaudin-4 szintjét, ha 20 μ M koncentrációban és 72 órán keresztül kezelték az IPEC-J2 sejteket, de jelentősen csökkentette a klaudin-1 és a klaudin-3 szintjét. Ez a megfigyelés ellentétben áll Gu és munkatársai (2016) által leírtaktól, mivel ők arról számoltak be, hogy a DON alacsonyabb koncentrációja (6,74 μ M) 48 órás kezelést követően csökkentheti az okkludin expresszióját. Az eredményeink hasonlóak voltak Springler és munkatársai (2016) által megállapítottakhoz, hiszen immunfluoreszcens eredményeink alapján a 72 órán át alkalmazott DT2 (1 μ M DON + 5 nM T-2) nem változtatta meg az okkludin lokalizációs mintázatát. Kísérleti eredményeink szerint a DT2 azonban hatással volt

a HIEC-6 sejtek klaudin-1 koncentrációjára, amelyet eddig még nem vizsgáltak a szakirodalom szerint. Feltételezhető, hogy a DT2 kezelés által kiváltott TEER csökkenés legalább részben korrelálhat a klaudin-1 megváltozott mennyiségével.

7.3. A növényi polifenol vegyületek alkalmazhatósága

A közelmúltban végzett *in vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy egyes flavonoidok a sertések takarmányában csökkenthetik az oxidatív stresszt, a gyulladást és ez által javíthatja a sertések általános jóllétét (Liao et al., 2020, Zha et al., 2020a, 2020b). Növendék sertésekkel (Park et al., 2020) végzett vizsgálatokban leírták, hogy a kvercetin aglikon formájában adva hatékonyan felszívódott és képes volt az *Escherichia coli* lipopoliszacharid károsító hatását kivédeni. A rozmaringsav a fő fenolos komponens több, a *Lamiaceae* családba tartozó aromás növényben, többek között az orvosi zsályában (*Salvia officinalis* L.) is. Szárnyasoknak adhatják esszenciális olaj (Placha et al., 2015) vagy por formában (Galamatis et al., 2021) is. Megállapítható, hogy még nem áll rendelkezésre elég adat arra vonatkozóan, hogy milyen mennyiségben, milyen időtávon, mely élelmiszertermelő haszonállat esetén alkalmazhatóak a fenolos vegyületek takarmánykiegészítőként. Azonban *in vitro* kísérletek alapján látható, hogy a polifenolos vegyületek jótékony hatással bírhatnak a mikotoxinok által kiváltott negatív hatások megelőzésében az antioxidáns hatásuk miatt. A kvercetinnel kapcsolatban leírták, hogy fokozta a nyúl petefészeksejt-proliferációját és csökkentette a T-2 toxin által okozott apoptózist (Leśniak-Walentyn et al., 2013).

7.3.1. A kvercetin előkezelés és együttkezelés védő hatásának meghatározása DON által indukált oxidatív stresszel szemben

Chen és munkatársai (2018) szerint a kvercetin megvédi az IPEC-J2 sejteket az oxidatív károsodás által közvetített apoptózistól. Tanulmányukban a mechanizmus a mitokondriális apoptózis útjának gátlásához és a lipidperoxidációhoz kapcsolódik. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a kvercetin fokozta az IPEC-J2 sejtek proliferációját és védelmét a H₂O₂ által kiváltott oxidatív stressz ellen. Kísérleteikben 24 órás kezelést alkalmaztak, míg a 16,5 µM koncentrációjú kvercetin jelentősen megnövelte a sejtek életképességét, addig a 33 µM kvercetin koncentrációk jelentős sejtpusztulást okozott az IPEC-J2 sejtekben MTT vizsgálattal mérve. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy a kvercetin IPEC-J2 sejtekben citotoxikus 75 µM vagy annál magasabb koncentrációban 24 órás inkubációs időt alkalmazva. Vergauwen és munkatársai (2016) arról számoltak be, hogy az IPEC-J2 sejteket 18 órán át inkubálva 800 µM kvercetin koncentrációjú oldattal azok sejtpusztulást mutattak NR festési eljárást alkalmazva.

IPEC-J2 sejteken korábban Vergauwen és munkatársai (2016) bizonyították, hogy 25–200 µM kvercetin előkezelés 18 órán át erősítheti a sejtréteg integritását. Eredményeink

összhangban vannak a fenti megállapításokkal, mivel 20 μM kvercetinrel 24 óráig inkubált IPEC-J2 sejtek TEER értékei szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll kezeléshez viszonyítva. A 20 μM kvercetin előkezelés nem volt alkalmas arra, hogy megakadályozza 1 μM DON TEER csökkentő hatását. Az 1 óráig együtt adott kvercetin és DON szintén nem bizonyult alkalmasnak, hogy mérsékelje a TEER változását. Az 1 órán át adott, 1 μM DON hatását összehasonlíthatjuk aszerint is, hogy 24 óra 20 μM kvercetin előkezelést vagy 24 órán át tartó kontroll kezelést kaptak az IPEC-J2 sejtek előtte. Azt az eredményt kaptuk, hogy szignifikáns különbség van a két csoport között, vagyis a 20 μM kvercetin előkezelés segítette a DON által kiváltott bélhám integritásának sérülésének helyreállításában.

Vergauwen és munkatársai (2016) DCFH-DA kísérleteket végeztek IPEC-J2 sejteken különböző koncentrációjú kvercetin felhasználásával és megállapították, hogy a kvercetin csökkentheti az intracelluláris ROS mennyiségét. A DCFH-DA vizsgálat segítségével Chen és munkatársai (2018) kimutatták, hogy az IPEC-J2 sejtek ROS tartalmát csökkentette a kvercetin 16,5 μM koncentrációban. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az extracelluláris H_2O_2 termelés jelentősen megnőtt a 25 órás, 1 μM DON kezelés után. Az előkezelés 20 μM kvercetinrel, majd 1 μM DON-nak való kitettség 1 órán át nem mutatott szignifikáns változásokat a H_2O_2 termelésben a kontroll értékekhez képest. Az együttkezelés 20 μM kvercetinrel és 1 μM DON-nal 1 órán át jelentősen növelte az extracelluláris H_2O_2 koncentrációt, alátámasztva azt, hogy a 24 órás előkezelés megakadályozhatja a DON által indukált extracelluláris H_2O_2 termelést, míg a 20 μM kvercetinrel végzett 1 órás együttkezelés nem volt képes gátolni a DON által indukált H_2O_2 túltermelés hatását. Vizsgálatunkban 25 órát követően az 1 μM DON szignifikánsan növelte az intracelluláris ROS mennyiségét, míg a 20 μM koncentrációjú kvercetin kezelést kapott sejtek nem mutattak különbséget a kontroll sejtek ROS szintjéhez képest. A 20 μM kvercetinrel előkezelt, majd DON-nak kitett sejtek jelentősen magasabb intracelluláris ROS növekedést mutattak a kontroll sejtek értékeivel összehasonlítva.

7.3.2. A rozmaringsav előkezelés eredményei a mikotoxinokkal kezelt IPEC-J2 sejteken

Vergauwen és munkatársai (2016) vizsgálták az IPEC-J2 sejtek életképességét 12,5; 25; 50; 100; 200 és 400 μM rozmaringsavval történő 18 órás inkubálást követően. Eredményeik alapján 24 óra alatt mindegyik koncentráció növelte, míg a nagy koncentrációjú, 800 és 1600 μM rozmaringsav kezelés már szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét. A saját kísérleteink alátámasztják, hogy a magas koncentrációjú rozmaringsav már károsan befolyásolja az életképességet. Az IPEC-J2 sejteknél 48 és 72 óra inkubálást követően 500 μM rozmaringsav koncentráció esetében és a fölött volt jelentős sejtéletképesség csökkenés.

További vizsgálatainkban, Vergauwen és munkatársai (2016) arra a következtetésre jutottak, hogy 18 órán keresztül előkezelve az IPEC-J2 sejteket 200, 400 és 600 μM rozmaringsavval megerősítheti a sejtréteg integritását, 1 órás H_2O_2 kezelést követően. Saját vizsgálatomban, míg a DT2 kezelés szignifikánsan csökkentette a TEER értékeket, addig a 24 órás 50 μM rozmaringsav előkezelést követően, majd DT2-vel inkubált sejtek TEER értékei magasabbak voltak a DT2 kezeléshez viszonyítva. A rozmaringsav előkezelés hatékonynak bizonyult az 1 μM DON + 5 nM T-2 keverékének a TEER csökkentő hatását kivédeni, mivel szignifikáns az eltérés a két csoport TEER értékeiben.

12 órás előkezelés, 10–30 μM rozmaringsav oldattal képes csökkenteni az oxidatív stressz károsító hatásait a normál humán dermális fibroblaszt sejten úgy, hogy megakadályozza 10 perc 600 μM H_2O_2 kezelés indukálta ROS termelődést és gyulladást (Hahn et al., 2017). Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy 24 órás, 50 μM rozmaringsav előkezelés képes csökkenteni a DT2 által indukált extracelluláris H_2O_2 koncentráció növekedést IPEC-J2 sejteknél. A rozmaringsavval előkezelt, majd 48 és 72 órán keresztül DT2-vel inkubált sejteknél nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest. Összehasonlítva a csak DT2 kezelést kapott sejtek H_2O_2 termelésével, szignifikánsan alacsonyabb koncentráció mérhető a korábban rozmaringsav kiegészítést is kapott sejteknél, vagyis az 50 μM rozmaringsav 72 órával az inkubálást követően is hatással volt a sejt oxidációs állapotára.

Kevés adat található a szakirodalomban a rozmaringsav gyulladáscsökkentő hatásáról *in vitro* körülmények között. Kim és munkatársai (2013) azt találták, hogy 1 órás 50 és 100 μM koncentrációban adott rozmaringsav képes a 4 órán keresztül adott 10 μM kadmium só (CdCl_2) által indukált IL-6 és IL-1 β citokin termelést gátolni egy egét hallósejt sejtvonalon (HEI-OC1). Az IPEC-J2 sejtekkel végzett kísérletünkben a DT2 kezelés jelentős mértékben megemelte mind az IL-6, mind az IL-8 citokin koncentrációját. A 24 órás 50 μM rozmaringsav előkezelést, majd DT2 kezelést kapott sejtek esetében szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét citokin koncentrációja, vagyis a rozmaringsav előkezelés csökkentette a citokinek szintjének emelkedését 48 és 72 órával az inkubáció után.

A kontroll kezelést kapott IPEC-J2 sejtek okkludin és klaudin-1 eloszlása homogénnek mutatkozott, az immunfluoreszcens festés hatására láthatóvá váltak a sejthatárok. Qiang (2011) bizonyította, hogy az 50 μM rozmaringsav fokozta a ZO-1, ZO-2, a klaudin-1 és az okkludin mRNS-expresszióját Caco-2 sejtekben. Az eredményeink korrelálnak Qiang (2011) eredményeivel, ugyanis a rozmaringsavat 24 órán keresztül 50 μM koncentrációban adva az IPEC-J2 sejtekhez elősegítheti a klaudin-1 membránban való jelenlétét 48 és 72 óra DT2-vel történő inkubációt követően.

7.3.3. A fermentált búzacsíra kivonattal történő kezelés hatása önmagában és mikotoxinokkal kombinációban IPEC-J2 sejteken

A fermentált búzacsíra kivonat számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, amelyek miatt ez a több hatóanyagot tartalmazó kivonat hasznos lehet a két leggyakoribb mikotoxin által okozott oxidatív stressz ellen. Vizsgálatainkban mind az 1%, mind a 2% fermentált búzacsíra kivonat növelte a sejtek életképességét, a kontroll sejtekhez képest. A szakirodalomban az fermentált búzacsíra kivonatot többnyire tumoros sejtvonalakon vizsgálták, ahol a fermentált búzacsíra kivonat több esetben apoptózist és sejthalált indukált (Zhurakivska et al., 2018). Saját, IPEC-J2 sejtekkel végzett kutatásomban az 1% vagy 2% fermentált búzacsíra kivonat nem tudta mérsékelni a sejthalál mértékét, amikor 8 μM DON-t adtunk a sejtekhez. Ezzel szemben 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat fokozta a T-2 toxinnal egyidejűleg kezelt IPEC-J2 sejtek túlélését a csak 5 nM T-2 toxinnal kezelt sejtekhez képest.

Nem találtunk szakirodalmi adatot arra nézve, hogy korábban vizsgálták a fermentált búzacsíra kivonat TEER értékekre gyakorolt hatását. Eredményeink alapján az IPEC-J2 sejteknél a 8 μM DON és az 5 nM T-2 toxin szignifikánsan csökkentette a TEER értékeket a 24 órás inkubáció alatt és a regenerációs kezelés után is, míg az 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat önmagában adva a sejtekhez jelentősen növelte a TEER-t a kontroll értékekhez viszonyítva. Adataink alapján az 1% fermentált búzacsíra kivonat mikotoxinokkal kombinációban adva nem emelte meg az IPEC-J2 sejtek TEER értékeit. Ezzel szemben a 2% fermentált búzacsíra kivonat, mely 5 nM T-2 toxinnal lett együtt adva, segítette a bélbarrier integritás fenntartásában.

Kísérleti adataink szerint az IPEC-J2 sejtekben mind a 8 μM DON, mind az 5 nM T-2 toxin jelentősen növelte az intracelluláris ROS-szintet a 24 órás kezelés és a 24 órás regenerálás után. Ezt erősíti meg Kang és munkatársai (2019) tanulmánya, miszerint 6,7 μM DON IPEC-J2 sejtekben szignifikánsan megemelte az intracelluláris ROS-szintet 24 órás mikotoxin-expozíció után. A 2% fermentált búzacsíra kivonat csökkentette a ROS-t 24 órás kezelés után, mind DON-nal, mind T-2 toxinnal együtt kezelve. Ezek az eredmények összhangban állnak Karancsi és munkatársai (2020) megállapításaival, akik először tisztázták a fermentált búzacsíra kivonat jótékony hatását az LPS által kiváltott oxidatív károsodás esetén. A fermentált búzacsíra kivonat csökkentheti az intracelluláris ROS-szintet az LPS beadása után és védőhatást fejt ki az LPS-kezelésnek kitett IPEC-J2 sejtréteg integritására. Vizsgálatuk azt is kimutatta, hogy a fermentált búzacsíra kivonat különböző koncentrációkban (1%, 2% és 4%) nem befolyásolta a sejthalál mértékét; ezen kívül a 2% fermentált búzacsíra kivonat jelentősen javította a sejtek életképességét 24 órás kezelés után. Ezek az eredmények látszólag ellentétben állnak Otto és munkatársai (2016) azon

adatainak, melyek szerint 24 μM DMBQ gátolja a sejtciklus előrehaladását; apoptózist indukál és növeli az intracelluláris DCF fluoreszcenciát 24 órás kezelés után kilenc humán rákos sejtvonalban. Az ellentmondást Hidvégi és munkatársai (1999) munkája magyarázhatja meg azzal, hogy tisztázták, a fermentált búzacsíra kivonat hatásai nem kizárólag a benzokinonoknak tulajdoníthatók. További különbség, hogy az általunk is használt IPEC-J2 egy nem tumoros eredetű sejtvonal. Egyidejű 24 órás kezelés esetén mind az 1%, mind a 2% fermentált búzacsíra kivonat szignifikánsan csökkentette a DON és T-2 toxin által kiváltott ROS szintjének emelkedését. Érdeemes megemlíteni, hogy a 2% fermentált búzacsíra kivonat kezelésnél az extracelluláris H_2O_2 szignifikánsan csökkent a 24 órás kezelés során, azonban az IPEC-J2 sejtek több H_2O_2 -t termeltek a regenerációs időszak végén, összehasonlítva azokkal a sejtekkel, amelyek korábban DON vagy T-2 toxin expozíciónak voltak kitéve 24 órán keresztül. A fermentált búzacsíra kivonat jótékony hatást gyakorolt az IPEC-J2 sejtek életképességére. Ebben a munkában bizonyítást nyert, hogy a magas koncentrációban alkalmazott DON és a T-2 toxin által kiváltott oxidatív stresszt képes a fermentált búzacsíra kivonat csökkenteni, viszont további kísérletekre van szükség a hatásmechanizmus pontos meghatározásához.

A szakirodalmi adatokkal összhangban bizonyítottuk, hogy önmagukban alkalmazva a kvercetin, rozmaringsav és fermentált búzacsíra kivonat jótékony hatást gyakorol a sertés vékonybélhám sejtekre. Azonban fontos megjegyezni, hogy ezekben a kísérletekben a vegyületek természetes módon megjelenő koncentrációinak többszörösét alkalmaztuk aglikon formában. A növényekben található polifenol mintázat feltételezi, hogy a komponensek egymás hatását és hasznosulását befolyásolhatják. Ezért az általunk végzett kísérletekben, a vizsgált mikotoxinok és védő hatású anyagok koncentrációit minden esetben az IPEC-J2 és a HIEC-6 sejtek életképességére gyakorolt hatásuk alapján választottuk meg. A jövőben olyan kísérletekkel lehet jobban megismerni a hatásmechanizmusokat és a valódi biológiai hasznosulást, amelyek során több polifenol vegyületet tesztelésére kerül sor aglikon és glikozilált formában is, *in vitro* majd *in vivo* kísérletekben. Az így kapott eredmények segíthetik a természetes eredetű takarmány kiegészítők fejlesztését.

A sertéseknél használt nem szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID), a meloxicam egy preferenciális COX-2-inhibitor, melynek potenciális mellékhatásai vannak a gyomor-bél traktusra és befolyásolja a sertés növekedése szempontjából releváns folyamatokat (Gorissen et al., 2017). Gyógynövényekből származó kivonatok enyhe gyulladás esetén alkalmasak lehetnek kiváltani az NSAID gyógyszerek használatát. Scheckel és munkatársai (2008) HT-29 sejteken kapott eredménye szerint a rozmaringsav hatékony megelőző szer lehet a COX-2 aktiváció ellen daganatos sejtekben, ahogy a kvercetin is képes egy epiteliális, humán mellrák, MDA-MB-231 sejtvonalon gátolni a COX-2 expresszióját (Xiao et al., 2011). Ahogy Déciga-Campos és munkatársai (2021) patkányokon formalin- és

karragén-tesztel vizsgálták, hogy a szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* L.) olaja és a rozmaryng (*Rosmarinus officinalis* L.) etanolos kivonata 1:1 arányú kombinációban fokozza-e antinociceptív és gyulladáscsökkentő hatásukat.

8. Következtetés

A *Fusarium* gombafajok megfertőzhetik a gabonaféléket a betakarítás előtt, melyek kedvezőtlen környezeti feltételek között mikotoxinokat termelhetnek a gazdanövényen. A többféle kémiai szerkezettel rendelkező mikotoxinok számos negatív hatást gyakorolhatnak a mikotoxinokkal szennyezett növényt fogyasztó szervezetre. A trichotecén-vázis mikotoxinok közé tartozó DON és T-2 toxin a gasztrointesztinális traktusban okozhatnak szövet- és sejtszintű változásokat. Szakirodalmi források alátámasztják, hogy a mikotoxinokat sem fizikai, sem kémiai módszerekkel nem lehet teljes mértékben azokat a fogyasztásra szánt gabonaszemekből eltávolítani, ezért egyedüli védekezési lehetőség a bevitt mennyiség csökkentése. Napjainkban azonban előtérbe kerültek a növényi eredetű táplálék- és takarmánykiegészítők, melyek hozzájárulhatnak a béltraktus normál funkcióinak megőrzéséhez és jótékony hatásaikkal segíthetik a bél regenerálódását. A flavonoid és egyéb, többségükben aromás gyűrűvel rendelkező vegyületek antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezhetnek az *in vivo* és *in vitro* kutatási eredmények szerint.

Kísérleteinkben bélhámsejteken vizsgáltuk a mikotoxinok sejtéletképességre, oxidatív stresszre, gyulladáshoz vezető folyamatok mértékére és a TJ-ra gyakorolt károsító hatásait. Az HIEC-6 sejtek esetében először végeztük el a DON, a T-2 toxin és a DT2 hatásának nyomon követését. Alacsony koncentrációjú fuzáriotoxin kezelés hatására megemelkedett az oxidatív stressz és nőtt a gyulladáshoz vezető citokinek koncentrációja, a sejt-kapcsoló struktúrák fehérjéi közül a kladin-1 mennyisége pedig csökkent. Az IPEC-J2 sejteken először alkalmaztuk együtt a DON-t és a T-2 toxint, hogy megállapíthassuk, hogy milyen hatás várható, ha a bélhámsejtek egy időben lépnek kapcsolatba a két mikotoxinnal. Az eredményeink alapján, a kombinációs kezelésnél szignifikánsan alacsonyabb volt a TEER a külön-külön alkalmazott mikotoxinok sejtregión-integritás csökkentéséhez képest. Ezzel szemben nem találtunk szignifikánsan magasabb értékeket DT2 kezelést követően az extracelluláris H₂O₂ koncentráció változásában a vizsgált csoportok között. A mikotoxinokkal történő inkubálást követően csökkent a kladin-1 fehérjék sejtmembránbeli detektálhatósága is. Bizonyítottuk mindkét sejtvonalnál, hogy a DON és a T-2 toxin esetében a legmagasabb nem-citotoxikus koncentrációk is módosítják a sejtek oxidatív állapotát, gyulladást indukálhatnak és negatívan befolyásolják a sejtregión-integritás erősségét.

A polifenolok közé tartozó vegyületek közül több esetben igazolást nyert *in vitro* kísérletekben, hogy azok hatékonyan csökkentik az oxidatív stressz mértékét, a gyulladást

és jótékonyan hatnak a bélhámsejtek közötti kapcsolatok fenntartására. A munkában azt vizsgáltuk, hogy bizonyos növényi eredetű vegyületek (a kvercetin és a rozmaringsav) és az fermentált búzacsíra kivonat képesek-e a vizsgált mikotoxinok által előidézett változásokat mérsékelni. A polifenol vegyületek közé tartozó kvercetinnel és rozmaringsavval végzett 24 óráig tartó előkezelések minden esetben növelték az IPEC-J2 sejtek között az integritást. A mikotoxinok által kiváltott oxidatív stresszt részben vagy teljesen sikerült csökkenteniük a sejtmódel típusától függően. Bizonyítottuk továbbá azt is, hogy a rozmaringsav képes volt a DT2 klaudin-1 csökkentő hatását ellensúlyozni. Vizsgálataink során először határoztuk meg a fermentált búzacsíra kivonat hatását a TEER értékekre. A mérési eredményeink szerint a növényi kivonattal történő kezelés hatására nőtt az IPEC-J2 sejtréteg integritás 24 órát követően. Eredményeink szerint a 2% fermentált búzacsíra kivonattal történő együttkezelés képes volt csökkenteni a T-2 toxin által kiváltott oxidatív stresszt. A kísérleti elrendezésben vizsgáltuk 24 órás utánkövetéssel (regeneráció) az együttkezelések hosszútávú hatását. A regeneráció utáni mintavételből kiderült, hogy az intracelluláris ROS-ok mennyisége megemelkedett a mikotoxinokkal kombinációban adott fermentált búzacsíra kivonat kezeléseket kapott sejteknél, viszont a T-2 toxin hatását mérsékelte a 2% fermentált búzacsíra kivonat.

Kutatásunk során humán HIEC-6 és sertés eredetű IPEC-J2 sejtvonalon tanulmányoztuk mikotoxinok és védő hatású bioaktív anyagok hatását. Összefoglalásként megállapítható, hogy a nem daganatos humán és sertés bélhámsejtek alkalmasak a *Fusarium* toxinok által előidézett bélbarrier károsodás modellezésére. Kísérleti munkánkban növényi vegyületeket (kvercetint és rozmaringsavat) és a fermentált búzacsíra kivonatot teszteltünk, és bizonyítást nyert, hogy ezek az anyagok részt vettek a károsodott bélhámsejtréteg integritásának helyreállításában és az alkalmazott xenobiotikumok által okozott oxidatív stressz mérséklésében. Kísérleti adataink szerint a penészgomba fajokkal fertőzött gabonaféléken együttesen előforduló mikotoxinok közül a DON és a T-2 toxin kombinációjának alkalmazásakor egyes gyulladáscsökkentő citokinek (IL-6 és IL-8) szintje megemelkedett, és a sejtréteg ellenállása jelentős mértékben csökkent, amely káros elváltozásokat a rozmaringsavval való előkezelés hatékonyan állította helyre IPEC-J2 sejtekben. Az új *in vitro* eredmények megalapozhatják több antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatású természetes vegyület étrend- és takarmánykiegészítőként való későbbi gyakorlati alkalmazását.

9. Új tudományos eredmények

A kísérleti munkámban a trichotecén-vázis mikotoxinok közül a DON és a T-2 toxin bélhám károsító hatását vizsgáltam két, nem-daganatos eredetű bélhám sejtvonalon, a

humán HIEC-6 és a sertés IPEC-J2 sejteken. A két fuzáriotoxint vagy önmagukban, vagy védő hatású anyagokkal kombinációban adtam a sejtekhez.

- 1) HIEC-6 sejteken először vizsgáltam meg a mikotoxinok hatását. Meghatározásra került a DON ($\geq 5 \mu\text{M}$), a T-2 toxin ($\geq 10 \text{ nM}$) és a DT2 ($5 \mu\text{M}$ DON + 10 nM T-2) citotoxikus koncentrációja 24 óra inkubációt követően. A vizsgálatban alkalmazott, $1 \mu\text{M}$ DON, 5 nM T-2 toxin és a DT2: $1 \mu\text{M}$ DON + 5 nM T-2 kezelések szignifikánsan megemelték az oxidatív stressz mértékét, a vizsgált gyulladáscsökkentő citokinek koncentrációját és jelentős mértékben csökkentették a klaudin-1 koncentrációját, míg az okkludin mennyiségére nem voltak hatással. Ezzel a HIEC-6 sejteken végzett kísérleti elrendezéssel igazoltam, hogy a nem-daganatos eredetű, humán bélhámsejtekre negatív hatással vannak a vizsgált fuzáriotoxinok.
- 2) IPEC-J2 sejteken végzett vizsgálatokban az $1 \mu\text{M}$ DON és 5 nM T-2 toxin (DT2) kombinációja számottevően befolyásolta a sejtleletképeséget, szignifikánsan megemelte az oxidatív stressz mértékét és a gyulladáscsökkentő citokinek koncentrációját. Immunfluoreszcens festéssel bizonyítottuk, hogy a klaudin-1 lokalizációs mintázata a kezelést követően jelentősen csökkent a sejtmembránban, míg az okkludin membránbeli elhelyezkedése nem változott a DT2 kezelés hatására. A TEER csökkenés és a klaudin-1 fehérje membránbeli csökkenése alátámasztja, hogy a DT2 expozíció károsította a sejtréteg integritását.

Kutatásomban továbbá *in vitro* előszűrést végeztem a kvercetinrel és a rozmaringsavval, valamint a fermentált búzacsíra kivonattal az IPEC-J2 sejteken, hogy megvizsgáljam milyen mértékben képesek kifejteni az antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásukat DON illetve T-2 toxin expozíciót követően.

- 3) Kísérleteimben összehasonlítottam a 24 órás előkezelés és az 1 órás $20 \mu\text{M}$ kvercetinrel történő együttkezelés hatását a DON által indukált sejtréteg integritás károsodására és az oxidatív stressz növekedésére IPEC-J2 sejteknél. A $20 \mu\text{M}$ kvercetin előkezelés képes mérsékelni a TEER csökkenést, illetve a DON által kiváltott extracelluláris H_2O_2 és az intracelluláris ROS emelkedést, összehasonlítva az egy órás együttkezeléssel.
- 4) A 24 órás, $50 \mu\text{M}$ rozmaringsav előkezelés hatására a 48 és 72 óráig tartó DT2 ($1 \mu\text{M}$ DON + 5 nM T-2) kezelést követően a TEER érték magasabb volt az előkezelést kapott sejteknél, mint a csak DT2 kezelést kapott sejtek esetében. A rozmaringsav előkezelés szignifikáns mértékben csökkentette a DT2 által indukált extracelluláris H_2O_2 és gyulladáscsökkentő citokinek koncentrációinak

emelkedését a csak DT2 expozíciónak kitett sejtekkel szemben. A DT2-vel kezelt sejtek membránjában nem változott meg a klaudin-1 fehérje lokalizációs mintázata rozmaringsav adása mellett.

- 5) A fermentált búzacsíra kivonatot először alkalmaztam fuzáriotoxinokkal történő együttkezelésben. Bizonyítást nyert, hogy a fermentált búzacsíra kivonat hatására nőtt az IPEC-J2 sejtréteg-integritása 24 órás kezelést követően. Eredményeink szerint a DON által előidézett TEER csökkenést nem mérsékelte sem az 1%, sem a 2% fermentált búzacsíra kivonat, ezzel ellentétben a T-2 toxin hatását a 2% kezelőoldat jelentősen ellensúlyozta. A mikotoxinok által előidézett oxidatív stresszt a 24 óráig tartó 1% és 2% fermentált búzacsíra kivonat együttkezelés képes volt csökkenteni. További 24 óra regeneráció utáni mintavételekből kiderült, hogy az 1% fermentált búzacsíra kivonattal történő együttkezelés mind a DON, mind a T-2 toxin által kiváltott intracelluláris ROS mennyiségi növekedését képes volt kompenzálni, míg a 2% fermentált búzacsíra kivonat a T-2 toxinnal való együttinkubálás után csökkentette az intracelluláris ROS termelődését.

10. Irodalom

Abramson D., House J.D., Nyachoti C.M.: **Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat**, *Mycopathologia*, 160. 297–301, 2005.

Abysique A., Tardivel C., Troadec J.D., Félix B.: **The food contaminant mycotoxin deoxynivalenol inhibits the swallowing reflex in anaesthetized rats**, *PLoS One*, 10. e0133355, 2015.

Adhikari M., Negi B., Kaushik N., Adhikari A., Al-Khedhairy A.A., Kaushik N.K., Choi E.H.: **T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies**, *Oncotarget*, 8. 33933–33952, 2017.

Ahn J.Y., Kim J., Cheong D.H., Hong H., Jeong J.Y., Kim B.G.: **An in vitro study on the efficacy of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin B1, deoxynivalenol, and zearalenone**, *Animals (Basel)*, 12. 333, 2022.

Akbari P., Braber S., Gremmels H., Koelink P.J., Verheijden K.A., Garssen J., Fink-Gremmels J.: **Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown**, *F.A.S.E.B. J.*, 28. 2414–2429, 2014.

Alagawany M., El-Hack M.E.A.: **The effect of rosemary herb as a dietary supplement on performance, egg quality, serum biochemical parameters, and oxidative status in laying hens**, *J. Anim. Feed Sci.*, 24. 341–347, 2015.

Al-Ashy R., Chakroun I., El-Sabban M.E., Homaidan F.R.: **The role of NF-kappaB in mediating the anti-inflammatory effects of IL-10 in intestinal epithelial cells**, *Cytokine*, 36. 1–8, 2006.

Alassane-Kpembé I., Kolf-Clauw M., Gauthier T., Abrami R., Abiola F.A., Oswald I.P., Puel O.: **New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic**, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 272. 191–198, 2013.

Alassane-Kpembé I., Schatzmayr G., Taranu I., Marin D., Puel O., Oswald I.P.: **Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies**, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57. 3489–3507, 2017.

Alizadeh A., Braber S., Akbari P., Kraneveld A., Garssen J., Fink-Gremmels J.: **Deoxynivalenol and its modified forms: Are there major differences?**, *Toxins (Basel)*, 8. 334, 2016.

- Al-Sadi R., Khatib K., Guo S., Ye D., Yousef M., Ma T.: **Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier**, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 300. G1054–1064, 2011.
- Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S., Mankertz J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D.: **Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells**, *J. Nutr.*, 138. 1067–1073, 2008.
- Ámbrus A., Szeitzné-Szabó M., Zentai A., Sali J., Szabó I.J.: **Exposure of consumers to deoxynivalenol from consumption of white bread in Hungary**, *Food Addit. Contam. Part. A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.*, 28. 209–217, 2011.
- Anand David A.V., Arulmoli R., Parasuraman S.: **Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid**, *Pharmacogn. Rev.*, 10. 84–89, 2016.
- Arce C., Ramírez-Boo M., Lucena C., Garrido J.J.: **Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from Salmonella typhimurium**, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 33. 161–174, 2010.
- Arranz E., Peña A.S., Bernardo D.: **Mediators of inflammation and immune responses in the human gastrointestinal tract**, *Mediators Inflamm.*, 2013. 865638, 2013.
- Arrúa A.A., Mendes J.M., Arrúa P., Ferreira F.P., Caballero G., Cazal C., Kohli M.M., Peralta I., Ulke G., Fernández Ríos D.: **Occurrence of deoxynivalenol and ochratoxin A in beers and wines commercialized in Paraguay**, *Toxins (Basel)*, 11. 308, 2019.
- Baba S.P., Bhatnagar A.: **Role of thiols in oxidative stress**, *Curr. Opin. Toxicol.*, 7. 133–139, 2018.
- Bacanlı M., Aydın S., Taner G., Gökteş H.G., Şahin T., Başaran A.A., Başaran N.: **Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar Albino rats?**, *Hum. Exp. Toxicol.*, 35. 877–886, 2016.
- Bae H.K., Pestka J.J.: **Deoxynivalenol induces p38 interaction with the ribosome in monocytes and macrophages**, *Toxicol. Sci.*, 105. 59–66, 2008.
- Bamias G., Cominelli F.: **Cytokines and intestinal inflammation**, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 32. 437–442, 2016.
- Bánáti H., Darvas B., Fehér-Tóth S., Czéh Á., Székács A.: **Determination of mycotoxin production of Fusarium species in genetically modified maize varieties by quantitative flow immunocytometry**, *Toxins (Basel)*, 9. 70, 2017.
- Barrera G.: **Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy**, *I.S.R.N. Oncol.*, 2012. 137289, 2012.

- Bartsch H., Nair J.: **Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis**, *Cancer Detect. Prev.*, 28. 385–391, 2004.
- Benoit Y.D., Paré F., Francoeur C., Jean D., Tremblay E., Boudreau F., Escaffit F., Beaulieu J.F.: **Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line**, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 298. G504–517, 2010.
- Bensassi F., El Golli-Bennour E., Abid-Essefi S., Bouaziz C., Hajlaoui M.R., Bacha H.: **Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells**, *Toxicology*, 264. 104–109, 2009.
- Bensassi F., Gallerne C., Sharaf El Dein O., Lemaire C., Hajlaoui M.R., Bacha H.: **Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in deoxynivalenol cytotoxicity**, *Food Chem. Toxicol.*, 50. 1680–1689, 2012.
- Berek L., Petri I.B., Mesterházy A., Téren J., Molnár J.: **Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro**, *Toxicol. In Vitro*, 15. 25–30, 2001.
- Berini J.L., Brockman S.A., Hegeman A.D., Reich P.B., Muthukrishnan R., Montgomery R.A., Forester J.D.: **Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone**, *Front. Plant Sci.*, 9. 1257, 2018.
- Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S.: **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction**, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11. 127–152, 2005.
- Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., Saeger S.D., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J.: **Masked mycotoxins: a review**, *Mol. Nutr. Food Res.*, 57. 165–186, 2013.
- Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R.: **Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *J. Agric. Food Chem.*, 53. 3421–3425, 2005.
- Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E.: **Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases**, *Physiol. Rev.*, 94. 329–354, 2014.
- Bin-Umer M.A., McLaughlin J.E., Basu D., McCormick S., Tumer N.E.: **Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation--implication for the mechanism of toxicity**, *Toxins (Basel)*, 3. 1484–1501, 2011.

Bizottsági Ajánlás 2006/576/EK: **A deoxinivalenol, a zearalenon, az ochratoxin-A, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról**, Európai Unió Hivatalos Lapja, L 229/7, 2006.

Bizottsági Rendelet 1881/2006/EK: **Az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról**, Európai Unió Hivatalos Lapja, L 364/5, 2006.

Blázovics A., Szentmihályi K., Prónai L., Hagymási K., Lugasi A., Kovács A., Fehér J.: **Redox-homeosztázis gyulladássos bélbetegségekben**, Orv. Hetil., 145. 1459–1466, 2004.

Bohn T.: **Dietary factors affecting polyphenol bioavailability**, Nutr. Rev., 72. 429–452, 2014.

Bolton J.L., Dunlap T.: **Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects**, Chem. Res. Toxicol., 30. 13–37, 2017.

Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J.: **Role of quinones in toxicology**, Chem. Res. Toxicol., 13. 135–160, 2000.

Borrás-Linares I., Stojanović Z., Quirantes-Piné R., Arráez-Román D., Švarc-Gajić J., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A.: **Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds**, Int. J. Mol. Sci., 15. 20585–20606, 2014.

Boshtam M., Asgary S., Kouhpayeh S., Shariati L., Khanahmad H.: **Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: A review**, Inflammation, 40. 340–349, 2017.

Brosnahan A.J., Brown D.R.: **Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations**, Vet. Microbiol., 156. 229–237, 2012.

Calabró V., Litterio M.C., Fraga C.G., Galleano M., Piotrkowski B.: **Effects of quercetin on heart nitric oxide metabolism in I-NAME treated rats**, Arch. Biochem. Biophys., 647. 47–53, 2018.

Calvert T.W., Aidoo K.E., Candlish A.G., Fuat A.R.: **Comparison of in vitro cytotoxicity of Fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines**, Mycopathologia, 159. 413–419, 2005.

Cao X., Surma M., Simons K.: **Polarized sorting and trafficking in epithelial cells**, Cell. Res., 22. 793–805, 2012.

Carrasco-Pozo C., Morales P., Gotteland, M.: **Polyphenols protect the epithelial barrier function of Caco-2 cells exposed to indomethacin through the modulation of occludin and zonula occludens-1 expression**, J. Agric. Food Chem., 61. 5291–5297, 2013.

Catalkaya G., Venema K., Lucini L., Rocchetti G., Delmas D., Daglia M., De Filippis A., Xiao H., Quiles J.L., Xiao J., Capanoglu E.: **Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health**, Food Frontiers, 1. 109–133, 2020.

Cencic A., Langerholc T.: **Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review**, Int. J. Food Microbiol., 141. S4–14, 2010.

Chance B., Sies H., Boveris A.: **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs**, Physiol. Rev., 59. 527-605, 1979.

Chaudhari M., Jayaraj R., Santhosh S.R., Rao P.V.: **Oxidative damage and gene expression profile of antioxidant enzymes after T-2 toxin exposure in mice**, J. Biochem. Mol. Toxicol., 23. 212–221, 2009.

Chawengsub Y., Gauthier K.M., Campbell W.B.: **Role of arachidonic acid lipoxigenase metabolites in the regulation of vascular tone**, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 297. H495–507, 2009.

Chen Z., Yuan Q., Xu G., Chen H., Lei H., Su J.: **Effects of quercetin on proliferation and H₂O₂-induced apoptosis of intestinal porcine enterocyte cells**, Molecules, 23. 2012, 2018.

Cheng I.F., Breen K.: **On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex**, Biometals, 13. 77–83, 2000.

Chichova M., Tasinov O., Shkodrova M., Mishonova M., Sazdova I., Ilieva B., Doncheva-Stoimenova D., Kiselova-Kaneva Y., Raikova N., Uzunov B., Ivanova D., Gagov H.: **New data on Cylindrospermopsin cylindrospermopsin toxicity**, Toxins (Basel), 13. 41, 2021.

Circu M.L., Aw T.Y.: **Glutathione and modulation of cell apoptosis**, Biochim. Biophys. Acta., 1823. 1767–1777, 2012.

Çolakoğlu M., Tunçer S., Banerjee S.: **Emerging cellular functions of the lipid metabolizing enzyme 15-Lipoxygenase-1**, Cell. Prolif., 51. e12472, 2018.

Čolović R., Puvača N., Cheli F., Avantaggiato G., Greco D., Đuragić O., Kos J., Pinotti L.: **Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed**, Toxins (Basel), 11. 617, 2019.

Costantini D.: **Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead**, J. Exp. Biol., 222. jeb194688, 2019.

- Creppy E.E., Chiarappa P., Baudrimont I., Borracci P., Moukha S., Carratù M.R.: **Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?**, *Toxicology*, 201. 115–123, 2004.
- Cross D.E., McDevitt R.M., Hillman K., Acamovic T.: **The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age**, *Br. Poult. Sci.*, 48. 496–506, 2007.
- Cushnie T.P., Lamb A.J.: **Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids**, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 38. 99–107, 2011.
- Csuka Gy., Bárdos L., Ágota G.: **Természetes antioxidáns anyagok (β -karotin, E-vitamin és rozmaringörlemény) adagolása az oxidált zsírok káros hatásainak kivédésére (Japán fűrjekkel végzett modellkísérlet)**, *Magyar Állatorvosok LapjaMÁL*, 127. 413–421, 2005.
- Dabeek W.M., Marra M.V.: **Dietary Quercetin quercetin and Kaempferolkaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans**, *Nutrients*, 11. 2288, 2019.
- Dandawate P.R., Vyas A.C., Padhye S.B., Singh M.W., Baruah J.B.: **Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds**, *Mini. Rev. Med. Chem.*, 10. 436–454, 2010.
- Dänicke S., Matthäus K., Lebzien P., Valenta H., Stemme K., Ueberschär K.H., Razzazi-Fazeli E., Böhm J., Flachowsky G.: **Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows**, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 89. 303–315, 2005.
- Dänicke S., Valenta H., Döll S.: **On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig**, *Arch. Anim. Nutr.*, 58. 169–180, 2004.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R.: **Polyphenols, dietary sources and bioavailability**, *Ann. Ist. Super. Sanita*, 43. 348–361, 2007.
- Darwich A.S., Aslam U., Ashcroft D.M., Rostami-Hodjegan A.: **Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans**, *Drug Metab. Dispos.*, 42. 2016–2022, 2014.
- Das N., Islam M.E., Jahan N., Islam M.S., Khan A., Islam M.R., Parvin M.S.: **Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds**, *BMC Complement. Altern. Med.*, 14. 45, 2014.

De Boevre M., Di Mavungu J.D., Landschoot S., Audenaert K., Eeckhout M., Maene P., Haesaert G., De Saeger S.: **Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products**, *World Mycotoxin J.*, 5. 207–219, 2012.

Dębski D., Smulik R., Zielonka J., Michałowski B., Jakubowska M., Dębowska K., Adamus J., Marcinek A., Kalyanaraman B., Sikora A.: **Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies**, *Free Radic. Biol. Med.*, 95. 323–332, 2016.

Déciga-Campos M., Beltrán-Villalobos K.L., Aguilar-Mariscal H., González-Trujano M.E., Ángeles-López G.E., Ventura-Martínez R.: **Synergistic herb-herb interaction of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Syzygium aromaticum* and *Rosmarinus officinalis* combination**, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2021. 8916618, 2021.

Del Favero G., Woelflingseder L., Braun D., Puntscher H., Kütt M.L., Dellafiora L., Warth B., Pahlke G., Dall'Asta C., Adam G., Marko D.: **Response of intestinal HT-29 cells to the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol and its sulfated conjugates**, *Toxicol. Lett.*, 295. 424–437, 2018.

Devreese M., Antonissen G., De Backer P., Croubels S.: **Efficacy of active carbon towards the absorption of deoxynivalenol in pigs**, *Toxins (Basel)*, 6. 2998–3004, 2014.

Díaz Nieto C.H., Granero A.M., Zon M.A., Fernández H.: **Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered**, *Food. Chem. Toxicol.*, 118. 118:460–470, 2018.

Dickson K., Malitan H., Lehmann C.: **Imaging of the intestinal microcirculation during acute and chronic inflammation**, *Biology (Basel)*, 9. 418, 2020.

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

Dietrich B., Neuenschwander S., Bucher B., Wenk C.: **Fusarium mycotoxin-contaminated wheat containing deoxynivalenol alters the gene expression in the liver and the jejunum of broilers**, *Animal*, 6. 278–291, 2012.

Drummond E.M., Harbourne N., Marete E., Martyn D., Jacquier J., O'Riordan D., Gibney E.R.: **Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark**, *Phytother. Res.*, 27. 588–594, 2013.

Dudzińska E., Gryzinska M., Ognik K., Gil-Kulik P., Kocki J.: **Oxidative stress and effect of treatment on the oxidation product decomposition processes in IBD**, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018. 7918261, 2018.

- Eckmann L., Jung H.C., Schürer-Maly C., Panja A., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M.F.: **Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8**, *Gastroenterology*, 105. 1689–1697, 1993.
- Edwards S.G., Barrier-Guillot B., Clasen P.-E., Hietaniemi V., Pettersson H.: **Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production**, *World Mycotoxin J.*, 2. 173–179, 2009.
- El-Hack M.E.A., Mahgoub S.A., Alagawany M., Dhama K.: **Influences of dietary supplementation of antimicrobial cold pressed oils mixture on growth performance and intestinal microflora of growing Japanese Quails**, *Int. J. Pharmacol.*, 11. 689–696, 2015.
- Ellakany H., El-Sayed A.E-H., Soliman F., Elbestawy A.: **The effect of fermented wheat germ extract on biochemical, physiological and performance parameters of broiler chickens**, *Alex. J. Vet. Sci.*, 55. 91–97, 2017.
- Fadel O., El Kirat K., Morandat S.: **The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ**, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1808. 2973–2980, 2011.
- Fardet A.: **New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?**, *Nutr. Res. Rev.*, 23. 65–134, 2010.
- Farkas O., Palócz O., Pászti-Gere E., Gálfi P.: **Polymethoxyflavone apigenin-trimethylether suppresses LPS-induced inflammatory response in nontransformed porcine intestinal cell line IPEC-J2**, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015. 673847, 2015.
- Felgines C., Texier O., Morand C., Manach C., Scalbert A., Régerat F., Rémésy C.: **Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats**, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279. G1148–1154, 2000.
- Ferrer M., Manyes L., Mañes J., Meca G.: **Influence of prebiotics, probiotics and protein ingredients on mycotoxin bioaccessibility**, *Food Funct.*, 6. 987–994, 2015.
- Ficheux A.S., Sibiril Y., Parent-Massin D.: **Co-exposure of Fusarium mycotoxins: in vitro myelotoxicity assessment on human hematopoietic progenitors**, *Toxicol.*, 60. 1171–1179, 2012.
- Flannery B.M., Clark E.S., Pestka J.J.: **Anorexia induction by the trichothecene deoxynivalenol (vomitoxin) is mediated by the release of the gut satiety hormone peptide YY**, *Toxicol. Sci.*, 130. 289–297, 2012.
- Forsyth D.M., Yoshizawa T., Morooka N., Tuite J.: **Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 34. 547–552, 1977.

Galamatis D., Papadopoulos G.A., Lazari D., Fletouris D., Petridou E., Arsenos G.I., Fortomaris P.: **Effects of dietary supplementation of *Salvia officinalis* L. in organic laying hens on egg quality, yolk oxidative stability and eggshell microbiological counts**, *Animals (Basel)*, 11. 2502, 2021.

Garcia-Hernandez V., Quiros M., Nusrat A.: **Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1397. 66–79, 2017.

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

Geller F., Schmidt C., Göttert M., Fronza M., Schattel V., Heinzmann B., Werz O., Flores E.M., Merfort I., Laufer S.: **Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana***, *J. Ethnopharmacol.*, 128. 561–566, 2010.

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

Gheisar M.M., Kim I.H.: **Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review**, *Ital. J. Anim. Sci.*, 17. 92–99, 2018.

Giorni P., Rastelli S., Fregonara S., Bertuzzi T.: **Monitoring phenolic compounds in rice during the growing season in relation to fungal and mycotoxin contamination**, *Toxins (Basel)*, 12. 341, 2020.

Goliomytis M., Tsourekis D., Simitzis P.E., Charismiadou M.A., Hager-Theodorides A.L., Deligeorgis S.G.: **The effects of quercetin dietary supplementation on broiler growth performance, meat quality, and oxidative stability**, *Poult. Sci.*, 93. 1957–1962, 2014.

González A., Casado J., Lanás Á.: **Fighting the antibiotic crisis: Flavonoids as promising antibacterial drugs against *Helicobacter pylori* infection**, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11. 709749, 2021.

Gonzalez L.M., Moeser A.J., Blikslager A.T.: **Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research**, *Transl. Res.*, 166. 12–27, 2015.

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

Gorissen B.M.C., Uilenreef J.J., Bergmann W., Meijer E., van Rietbergen B., van der Staay F.J., Weeren P.R.V., Wolschrijn C.F.: **Effects of long-term use of the preferential COX-2 inhibitor meloxicam on growing pigs**, *Vet. Rec.*, 181. 564, 2017.

Goyarts T., Dänicke S., Tiemann U., Rothkötter H.J.: **Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes**, *Toxicol. In Vitro*, 20. 858–867, 2006.

Gratz S.W., Dinesh R., Yoshinari T., Holtrop G., Richardson A.J., Duncan G., MacDonald S., Lloyd A., Tarbin J.: **Masked trichothecene and zearalenone mycotoxins withstand digestion and absorption in the upper GI tract but are efficiently hydrolyzed by human gut microbiota in vitro**, *Mol. Nutr. Food Res.*, 61. 4, 2017.

Graziani F., Pujol A., Nicoletti C., Pinton P., Armand L., Di Pasquale E., Oswald I.P., Perrier J., Maresca, M.: **The food-associated ribotoxin deoxynivalenol modulates inducible NO synthase in human intestinal cell model**, *Toxicol. Sci.*, 145. 372–382, 2015.

Greene D.M., Azcona-Olivera J.I., Pestka J.J.: **Vomitoxin (deoxynivalenol)-induced IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse: dose response and male predilection**, *Toxicology*, 92. 245–260, 1994.

Gruber-Dorninger C., Faas J., Doupovec B., Aleschko M., Stoiber C., Höbartner-Gußl A., Schöndorfer K., Killinger M., Zebeli Q., Schatzmayr D.: **Metabolism of zearalenone in the rumen of dairy cows with and without application of a zearalenone-degrading enzyme**, *Toxins (Basel)*, 13. 84, 2021.

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

Günzel D., Yu A.S.: **Claudins and the modulation of tight junction permeability**, *Physiol. Rev.*, 93. 525–569, 2013.

György A., Tóth B., Varga M., Mesterhazy Mesterházy A.: **Methodical considerations and resistance evaluation against Fusarium graminearum and F. culmorum head blight in wheat. part 3. susceptibility window and resistance expression**, *Microorganisms*, 8. 627, 2020.

Habrowska-Górczyńska D.E., Kowalska K., Urbanek K.A., Domińska K., Sakowicz A., Piastowska-Ciesielska A.W.: **Deoxynivalenol modulates the viability, ROS production and apoptosis in prostate cancer cells**, *Toxins (Basel)*, 11. 265, 2019.

Hahn H.J., Kim K.B., An I.S., Ahn K.J., Han H.J.: **Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts**, *Mol. Med. Rep.*, 16. 9763–9769, 2017.

Hasanein P., Sharifi M.: **Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats**, *Pharm. Biol.*, 55. 1809–1816, 2017.

- Hashem N.M., Gonzalez-Bulnes A., Simal-Gandara J.: **Polyphenols in farm animals: Source of reproductive gain or waste?**, *Antioxidants* (Basel), 9. 1023, 2020.
- Helander H.F., Fändriks L.: **Surface area of the digestive tract – revisited**, *Scand. J. Gastroenterol.*, 49. 681–689, 2014.
- Hellin P., King R., Urban M., Hammond-Kosack K.E., Legrève A.: **The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (FcABC1)**, *Front. Microbiol.*, 9. 1385, 2018.
- Hernández L., Afonso D., Rodríguez E.M., Díaz C.: **Phenolic compounds in wheat grain cultivars**, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 66. 408–415, 2011.
- Hidvégi M., Rásó E., Tömösközi-Farkas R., Szende B., Paku S., Prónai L., Bocsi J., Lapis K.: **MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect**, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14. 277–289, 1999.
- Hoerr F.J., Carlton W.W., Yagen B.: **Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens**, *Vet. Pathol.*, 18. 652–664, 1981.
- Holanda D.M., Kim Y.I., Parnsen W., Kim S.W.: **Phytobiotics with adsorbent to mitigate toxicity of multiple mycotoxins on health and growth of pigs**, *Toxins* (Basel), 13. 442, 2021.
- Hong J.C., Steiner T., Aufy A., Lien T.F.: **Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers**, *Livest. Sci.*, 144. 253–262, 2012.
- IARC: **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**, 56. 297–444, 1993.
- Imir N.G., Aydemir E., Şimşek E.: **Mechanism of the anti-angiogenic effect of Avemar on tumor cells**, *Oncol. Lett.*, 15. 2673–2678, 2018.
- Janicsák G., Máthé I., Miklóssy-Vári V., Blunden G.: **Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species**, *Biochem. Syst. Ecol.*, 27. 733–738, 1999.
- Jennings P., Coates M.E., Turner J.A., Chandler E.A., Nicholson P.: **Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay**, *Plant Pathol.*, 53. 182–190, 2004.

Jerzsele Á., Somogyi Z., Szalai M., Kovács D.: **Effects of fermented wheat germ extract on artificial Salmonella Typhimurium typhimurium infection in broiler chickens**, Magyar Állatorvosok LapjaMagy. Allatorvosok Lapja, 142, 77–85, 2020.

Ji R., Wang A., Shang H., Chen L., Bao C., Wu L., Wu H., Shi Y.: **Herb-partitioned moxibustion upregulated the expression of colonic epithelial tight junction-related proteins in Crohn's disease model rats**, Chin. Med., 11. 20, 2016.

Joffe A.Z., Yagen B.: **Intoxication produced by toxic fungi Fusarium poae and F. sporotrichioides on chicks**, Toxicol., 16. 263–273, 1978.

Jung K., Miyazaki A., Hu H., Saif L.J.: **Susceptibility of porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells to infection with porcine deltacoronavirus (PDCoV) and serum cytokine responses of gnotobiotic pigs to acute infection with IPEC-J2 cell culture-passaged PDCoV**, Vet. Microbiol., 221. 49–58, 2018.

Kabak B., Dobson A., Var I.: **Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review**, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 46. 593–619, 2006.

Kadota T., Furusawa H., Hirano S., Tajima O., Kamata Y., Sugita-Konishi Y.: **Comparative study of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol on intestinal transport and IL-8 secretion in the human cell line Caco-2**, Toxicol. In Vitro., 27. 1888–1895, 2013.

Kandeil M.A., Mohamed A.E.H., Abdel Gabbar M., Ahmed R.R., Ali S.M.: **Ameliorative effects of oral ginger and/or thyme aqueous extracts on productive and reproductive performance of V-line male rabbits**, J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.), 103. 1437–1446, 2019.

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

Kaplanski G.: **Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis**, Immunol. Rev., 281. 138–153, 2018.

Karancsi Z., Mórítz A.V., Lewin N., Veres A.M., Jerzsele Á., Farkas O.: **Beneficial effect of a fermented wheat germ extract in intestinal epithelial cells in case of lipopolysaccharide-evoked inflammation**, Oxid. Med. Cell. Longev., 2020. 1482482, 2020.

Karasawa K., Uzuhashi Y., Hirota M., Otani H.: **A matured fruit extract of date palm tree (Phoenix dactylifera L.) stimulates the cellular immune system in mice**, J. Agric. Food Chem., 59. 11287–11293, 2011.

- Karlovsy P., Suman M., Berthiller F., De Meester J., Eisenbrand G., Perrin I., Oswald I.P., Speijers G., Chiodini A., Recker T., Dussort P.: **Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination**, *Mycotoxin Res.*, 32. 179–205, 2016.
- Karlovsy P., Suman M., Berthiller F., De Meester J., Eisenbrand G., Perrin I., Oswald I.P., Speijers G., Chiodini A., Recker T., Dussort P.: **Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination**, *Mycotoxin Res.*, 32. 179–205, 2016.
- Katika M.R., Hendriksen P.J., van Loveren H., A C M Peijnenburg A.: **Characterization of the modes of action of deoxynivalenol (DON) in the human Jurkat T-cell line**, *J. Immunotoxicol.*, 12. 206–216, 2015.
- Kaukoranta T., Hietaniemi V., Rämö S., Koivisto T., Parikka P.: **Contrasting responses of T-2, HT-2 and DON mycotoxins and Fusarium species in oat to climate, weather, tillage and cereal intensity**, *Eur. J. Plant Pathol.*, 155. 93–110, 2019.
- Kim B.G., Yang S.M., Kim S.Y., Cha M.N., Ahn J.H.: **Biosynthesis and production of glycosylated flavonoids in Escherichia coli: current state and perspectives**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99. 2979–2988, 2015.
- Kim S.J., Um J.Y., Kim S.H., Hong S.H.: **Protective effect of rosmarinic acid is through regulation of inflammatory cytokine in cadmium-induced ototoxicity**, *Am. J. Chin. Med.*, 41. 391–404, 2013.
- Kimura M., Tokai T., Takahashi-Ando N., Ohsato S., Fujimura M.: **Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71. 2105–2123, 2007.
- Kohl K.D., Weiss R.B., Cox J., Dale C., Dearing M.D.: **Gut microbes of mammalian herbivores facilitate intake of plant toxins**, *Ecol. Lett.*, 17. 1238–1246, 2014.
- Kopf A., Sixt M.: **Gut homeostasis: Active migration of intestinal epithelial cells in tissue renewal**, *Curr. Biol.*, 29. 1091–1093, 2019.
- Koşar M., Dorman H.J.D., Hiltunen R.: **Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species**, *Food Chem.*, 91. 525–533, 2005.
- Kouadio J.H., Mobio T.A., Baudrimont I., Moukha S., Dano S.D., Creppy E.E.: **Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2**, *Toxicology*, 213. 56–65, 2005.

Kovács D., Karancsi Z., Farkas O., Jerzsele Á.: **Antioxidant activity of flavonoids in LPS-treated IPEC-J2 porcine intestinal epithelial cells and their antibacterial effect against bacteria of swine origin**, *Antioxidants (Basel)*, 9. 1267, 2020.

Kovalikova Z., Kubes J., Skalicky M., Kuchtickova N., Maskova L., Tuma J., Vachova P., Hejnak V.: **Changes in content of polyphenols and ascorbic acid in leaves of white cabbage after pest infestation**, *Molecules*, 24. 2622, 2019.

Krishnaswamy R., Devaraj S.N., Padma V.V.: **Lutein protects HT-29 cells against deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: prevention of NF-kappaB nuclear localization and down regulation of NF-kappaB and cyclo-oxygenase-2 expression**, *Free Radic. Biol. Med.*, 49. 50–60, 2010.

Kroymann J.: **Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism**, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 14. 246–251, 2011.

Kruber P., Trump S., Behrens J., Lehmann I.: **T-2 toxin is a cytochrome P450 1A1 inducer and leads to MAPK/p38- but not aryl hydrocarbon receptor-dependent interleukin-8 secretion in the human intestinal epithelial cell line Caco-2**, *Toxicology*, 284. 34–41, 2011.

Kucharzik T., Hudson J.T. 3rd, Lügering A., Abbas J.A., Bettini M., Lake J.G., Evans M.E., Ziegler T.R., Merlin D., Madara J.L., Williams I.R.: **Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury**, *Gut*, 54. 1565–1572, 2005.

Kuchenbuch H.S., Becker S., Schulz M., Cramer B., Humpf H.U.: **Thermal stability of T-2 and HT-2 toxins during biscuit- and crunchy muesli-making and roasting**, *Food Addit. Contam. Part. A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.*, 35. 2158–2167, 2018.

Kumar N., Goel N.: **Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications**, *Biotechnol. Rep. (Amst.)*, 24. e00370, 2019.

Kumar P., Mahato D.K., Kamle M., Mohanta T.K., Kang S.G.: **Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management**, *Front. Microbiol.*, 7. 2170, 2017.

Kumar S., Pandey A.K.: **Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview**, *Sci. World J.*, 2013. 162750, 2013.

Kurek-Górecka A., Rzepecka-Stojko A., Górecki M., Stojko J., Sosada M., Swierczek-Zieba G.: **Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis**, *Molecules*, 19. 78–101, 2013.

Kushiro M.: **Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat**, *Int. J. Mol. Sci.*, 9. 2127–2145, 2008.

- Kwon D.H., Cha H.J., Lee H., Hong S.H., Park C., Park S.H., Kim G.Y., Kim S., Kim H.S., Hwang H.J., Choi Y.H.: **Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway**, *Antioxidants* (Basel), 8. 82, 2019.
- Lassègue B., San Martín A., Griendling K.K.: **Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system**, *Circ. Res.*, 110. 1364–1390, 2012.
- Lattanzio V.M., Visconti A., Haidukowski M., Pascale M.: **Identification and characterization of new Fusarium masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry**, *J. Mass Spectrom.*, 47. 466–475, 2012.
- Lavola A., Karjalainen R., Julkunen-Tiitto R.: **Bioactive polyphenols in leaves, stems, and berries of Saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) cultivars**, *J. Agric. Food Chem.*, 60. 1020–1027, 2012.
- Lei Y., Guanghui Z., Xi W., Yingting W., Xialu L., Fangfang Y., Goldring M.B., Xiong G., Lammi M.J.: **Cellular responses to T-2 toxin and/or deoxynivalenol that induce cartilage damage are not specific to chondrocytes**, *Sci. Rep.*, 7. 2231, 2017.
- Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M.: **Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin**, *J. Agric. Food Chem.*, 54. 6343–6351, 2006.
- Leśniak-Walentyn A., Kolesarova A., Medvedova M., Maruniakova N., Capcarova M., Kalafova A., Hrabia A., Sirotkin A.V.: **Proliferation and apoptosis in the rabbit ovary after administration of T-2 toxin and quercetin**, *J. Anim. Feed Sci.*, 22. 264–271, 2013.
- Li D., Ma H., Ye Y., Ji C., Tang X., Ouyang D., Chen J., Li Y., Ma Y.: **Deoxynivalenol induces apoptosis in mouse thymic epithelial cells through mitochondria-mediated pathway**, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 38. 163–171, 2014.
- Li R., Li Y., Su Y., Shen D., Dai P., Li C.: **Short-term ingestion of deoxynivalenol in naturally contaminated feed alters piglet performance and gut hormone secretion**, *Anim. Sci. J.*, 89. 1134–1143, 2018.
- Li Yao, Yao J., Han C., Yang J., Chaudhry M.T., Wang S., Liu H., Yin Y.: **Quercetin, inflammation and immunity**, *Nutrients*, 8. 167, 2016.
- Li Yuting, Jongberg S., Andersen M.L., Davies M.J., Lund M.N.: **Quinone-induced protein modifications: Kinetic preference for reaction of 1,2-benzoquinones with thiol groups in proteins**, *Free Radic. Biol. Med.*, 97. 148–157, 2016.

- Liao P, Li Y, Li M, Chen X, Yuan D, Tang M, Xu K.: **Baicalin alleviates deoxynivalenol-induced intestinal inflammation and oxidative stress damage by inhibiting NF- κ B and increasing mTOR signaling pathways in piglets**, *Food Chem. Toxicol.*, 140. 111326, 2020.
- Liao S.F., Nyachoti M.: **Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization**, *Anim. Nutr.*, 3. 331–343, 2017.
- Liew W.-P.-P., Mohd-Redzwan S.: **Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota**, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 8. 60, 2018.
- Lin R., Sun Y., Ye W., Zheng T., Wen J., Deng Y.: **T-2 toxin inhibits the production of mucin via activating the IRE1/XBP1 pathway**, *Toxicology*, 424. 152230, 2019.
- Ling K.H., Wan M.L., El-Nezami H., Wang M.: **Protective capacity of resveratrol, a natural polyphenolic compound, against deoxynivalenol-induced intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation**, *Chem. Res. Toxicol.*, 29. 823–833, 2016.
- Liu F., Li G., Wen K., Bui T., Cao D., Zhang Y., Yuan L.: **Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics**, *Viral Immunol.*, 23. 135–149, 2010.
- Liu H.N., Liu Y., Hu L.L., Suo Y.L., Zhang L., Jin F., Feng X.A., Teng N., Li Y.: **Effects of dietary supplementation of quercetin on performance, egg quality, cecal microflora populations, and antioxidant status in laying hens**, *Poult. Sci.*, 93. 347–353, 2014.
- Liu J.X., Zhang Y., Hu Q.P., Li J.Q., Liu Y.T., Wu Q.G., Wu J.G., Lai X.P., Zhang Z.D., Li X., Li G.: **Anti-inflammatory effects of rosmarinic acid-4-O- β -D-glucoside in reducing acute lung injury in mice infected with influenza virus**, *Antiviral. Res.*, 144. 34–43, 2017.
- Liu M., Zhao L., Gong G., Zhang L., Shi L., Dai J., Han Y., Wu Y., Khalil M.M., Sun L.: **Invited review: Remediation strategies for mycotoxin control in feed**, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 13. 19, 2022.
- Lopes L.A.A., Dos Santos Rodrigues J.B., Magnani M., de Souza E.L., de Siqueira-Júnior J.P.: **Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes**, *Microb. Pathog.*, 107. 193–197, 2017.
- Ma Q.: **Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity**, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53. 401–426, 2013.
- Mackei M., Vörösházi J., Sebők C., Neogrády Z., Mátis G., Jerzsele Á.: **Fermented wheat germ extract as a redox modulator: Alleviating endotoxin-triggered oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes**, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020. 3181202, 2020.

- Mahfuz S., Shang Q., Piao X.: **Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: a review**, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 12. 48, 2021.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: **Polyphenols: food sources and bioavailability**, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79. 727–747, 2004.
- Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S.: **Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses**, *Plant Signal. Behav.*, 5, 359–368, 2010.
- Maresca M., Mahfoud R., Garmy N., Fantini J.: **The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells**, *J. Nutr.*, 132. 2723–2731, 2002.
- Mariani V., Palermo S., Fiorentini S., Lanubile A., Giuffra E.: **Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 131. 278–284, 2009.
- Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F.: **Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties**, *Biomed. Res. Int.*, 2015. 905215, 2015.
- Marranzano M., Rosa R.L., Malaguamera M., Palmeri R., Tessitori M., Barbera A.C.: **Polyphenols: Plant sources and food industry applications**, *Curr. Pharm. Des.*, 24. 4125–4130, 2018.
- Martins M.L., Martins H.M.: **Determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal**, *J. Food Prot.*, 64. 1848–1850, 2001.
- Matsuda S., Nakagawa Y., Kitagishi Y., Nakanishi A., Murai T.: **Reactive oxygen species, superoxide dimutases, and PTEN-p53-AKT-MDM2 signaling loop network in mesenchymal stem/stromal cells regulation**, *Cells*, 7. 36, 2018.
- Mazid M., Khan T.A., Mohammad F.: **Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants**, *Biol. Med.*, 3. 232–249, 2011.
- McCormick S.P., Price N.P., Kurtzman C.P.: **Glucosylation and other biotransformations of T-2 toxin by yeasts of the trichomonascus clade**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78. 8694–8702, 2012.
- McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J.: **Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins**, *Toxins (Basel)*, 3. 802–814, 2011.
- McDougall G.J.: **Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits**, *Proc. Nutr. Soc.*, 76. 163–171, 2017.

Merhej J., Richard-Forget F., Barreau C.: **Regulation of trichothecene biosynthesis in Fusarium: recent advances and new insights**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91. 519–528, 2011.

Mishra S., Dixit S., Dwivedi P.D., Pandey H.P., Das M.: **Influence of temperature and pH on the degradation of deoxynivalenol (DON) in aqueous medium: comparative cytotoxicity of DON and degraded product**, *Food Addit. Contam. Part. A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.*, 31. 121–131, 2014.

Mohos V., Pánovics A., Fliszár-Nyúl E., Schilli G., Hetényi C., Mladěnka P., Needs P.W., Kroon P.A., Pethő G., Poór M.: **Inhibitory effects of quercetin and its human and microbial metabolites on xanthine oxidase enzyme**, *Int. J. Mol. Sci.*, 20. 2681, 2019.

Morales A.I., Vicente-Sánchez C., Jerkic M., Santiago J.M., Sánchez-González P.D., Pérez-Barriocanal F., López-Novoa J.M.: **Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats**, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 210. 128–135, 2006.

Morand C., Manach C., Crespy V., Remesy C.: **Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model**, *Biofactors*, 12. 169–174, 2000.

Moss G.P., Smith P.A., Tavernier D.: **Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995)**, *Pure Appl. Chem.*, 67. 1307–1375, 1995.

Mueller T., Voigt W.: **Fermented wheat germ extract--nutritional supplement or anticancer drug?**, *Nutr. J.*, 10. 89, 2011.

Murphy M.P.: **How mitochondria produce reactive oxygen species**, *Biochem. J.*, 417. 1–13, 2009.

Nagaraja H., Chennappa G., Poorna Chandra Rao K., Mahadev Prasad G., Sreenivasa M.Y.: **Diversity of toxic and phytopathogenic Fusarium species occurring on cereals grown in Karnataka state**, *India, 3 Biotech*, 6. 57, 2016.

Nagl V., Woechtl B., Schwartz-Zimmermann H.E., Hennig-Pauka I., Moll W.D., Adam G., Berthiller F.: **Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs**, *Toxicol. Lett.*, 229. 190–197, 2014.

Nascimento L.B.D.S., Leal-Costa M.V., Menezes E.A., Lopes V.R., Muzitano M.F., Costa S.S., Tavares E.S.: **Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of Kalanchoe pinnata**, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 148. 73–81, 2015.

Nayakwadi S., Ramu R., Kumar Sharma A., Kumar Gupta V., Rajukumar K., Kumar V., Shirahatti P.S., L R., Basalingappa K.M.: **Toxicopathological studies on the effects of T-2 mycotoxin and their interaction in juvenile goats**, PLoS One, 15. e0229463, 2020.

Ndakidemi P.A., Dakora F.D.: **Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development**, Funct. Plant Biol., 30, 729–745, 2003.

Nesic K., Ivanovic S., Nesic V.: **Fusarial toxins: secondary metabolites of Fusarium fungi**, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 228. 101–120, 2014.

Nieuwenhuis B.P., James T.Y.: **The frequency of sex in fungi**, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 371. 20150540, 2016.

Nossol C., Barta-Böszörményi A., Kahlert S., Zuschratter W., Faber-Zuschratter H., Reinhardt N., Ponsuksili S., Wimmers K., Diesing A.K., Rothkötter H.J.: **Comparing two intestinal porcine epithelial cell lines (IPECs): Morphological differentiation, function and metabolism**, PLoS One, 10. e0132323, 2015.

Ok H.E., Kang Y.W., Kim M., Chun H.S.: **T-2 and HT-2 toxins in cereals and cereal-based products in South Korea**, Food Addit. Contam. Part. B. Surveill., 6. 103–109, 2013.

Othmen O.B., Essefi S.A., Bacha H.: **Mutagenic and epigenetic mechanisms of zearalenone: Prevention by vitamin E**, World Mycotoxin J., 1. 369–374, 2008.

Otto C., Hahlbrock T., Eich K., Karaaslan F., Jürgens C., Germer C.T., Wiegering A., Kämmerer U.: **Antiproliferative and antimetabolic effects behind the anticancer property of fermented wheat germ extract**, BMC Complement. Altern. Med., 16. 160, 2016.

Pageot L.-P., Perreault N., Basora N., Francoeur C., Magny P., Beaulieu, J.-F.: **Human cell models to study small intestinal functions: Recapitulation of the crypt-villus axis**, Microsc. Res. Tech., 49. 394–406, 2000.

Palócz O., Pászti-Gere E., Gálfi P., Farkas O.: **Chlorogenic acid combined with Lactobacillus plantarum 2142 reduced LPS-induced intestinal inflammation and oxidative stress in IPEC-J2 cells**, PLoS One, 11. e0166642, 2016.

Park J.H., Sureshkumar S., Kim I.H.: **Influences of dietary flavonoid (quercetin) supplementation on growth performance and immune response of growing pigs challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide**, J. Anim. Sci. Technol., 62. 605–613, 2020.

Pasquali M., Beyer M., Logrieco A., Audenaert K., Balmas V., Basler R., Boutigny A.L., Chrprová J., Czembor E., Gagkaeva T., González-Jaén M.T., Hofgaard I.S., Köycü N.D.,

Hoffmann L., Lević J., Marin P., Miedaner T., Migheli Q., Moretti A., Müller M.E., Munaut F., Parikka P., Pallez-Barthel M., Piec J., Scauflaire J., Scherm B., Stanković S., Thrane U., Uhlig S., Vanheule A., Yli-Mattila T., Vogelgsang S.: **A european database of Fusarium graminearum and F. culmorum trichothecene genotypes**, *Front. Microbiol.*, 7. 406, 2016.

Pászti-Gere E., Czimmermann E., Ujhelyi G., Balla P., Maiwald A., Steinmetzer T.: **In vitro characterization of TMPRSS2 inhibition in IPEC-J2 cells**, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 31. 123–129, 2016.

Pavelescu L.A.: **On reactive oxygen species measurement in living systems**, *J. Med. Life*, 8. 38–42, 2015.

Pearce S.C., Al-Jawadi A., Kishida K., Yu S., Hu M., Fritzy L.F., Edelblum K.L., Gao N., Ferraris R.P.: **Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types**, *BMC Biol.*, 16. 19, 2018.

Pereira D.M., Valentão P., Pereira J.A., Andrade P.B.: **Phenolics: From chemistry to biology**, *Molecules*, 14. 2202–2211, 2009.

Perincherry L., Lalak-Kańczugowska J., Stępień Ł.: **Fusarium-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions**, *Toxins (Basel)*, 11. 664, 2019.

Pestka J.J., Lin W.S., Miller E.R.: **Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine**, *Food Chem. Toxicol.*, 25. 855–858, 1987.

Pestka J.J.: **Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance**, *Arch. Toxicol.*, 84. 663–679, 2010.

Pestka J.J.: **Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis**, *Food Addit. Contam. Part. A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.*, 25. 1128–1140, 2008.

Pettersson H., Brown C., Hauk J., Hoth S., Meyer J, Wessels D.: **Survey of T-2 and HT-2 toxins by LC-MS/MS in oats and oat products from European oat mills in 2005-2009**, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 4. 110–115, 2011.

Pierron A., Alassane-Kpembi I., Oswald I.P.: **Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health**, *Porcine Health Manag.*, 2. 21, 2016.

Pines A., Perrone L., Bivi N., Romanello M., Damante G., Gulisano M., Kelley M.R., Quadrifoglio F., Tell G.: **Activation of APE1/Ref-1 is dependent on reactive oxygen species generated after purinergic receptor stimulation by ATP**, *Nucleic Acids Res.*, 33. 4379–4394, 2005.

Pinton P., Nougayrède J.P., Del Rio J.C., Moreno C., Marin D.E., Ferrier L., Bracarense A.P., Kolf-Claw M., Oswald I.P.: **The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal**

barrier permeability and reduces claudin expression, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 237. 41–48, 2009.

Placha I., Chrastinova L., Laukova A., Cobanova K., Takacova J., Stropfova V., Chrenkova M., Formelova Z., Faix S.: **Effect of thyme oil on small intestine integrity and antioxidant status, phagocytic activity and gastrointestinal microbiota in rabbits**, *Acta Vet. Hung.*, 61. 197–208, 2013.

Placha I., Ryzner M., Cobanova K., Faixova Z., Faix S.: **Effects of dietary supplementation with sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil on antioxidant status and duodenal wall integrity of laying strain growers**, *Pol. J. Vet. Sci.*, 18. 741–749, 2015.

Pollmann D.S., Koch B.A., Seitz L.M., Mohr H.E., Kennedy G.A.: **Deoxynivalenol-contaminated wheat in swine diets**, *J. Anim. Sci.*, 60. 239–247, 1985.

Proctor R.H., McCormick S.P., Kim H.S., Cardoza R.E., Stanley A.M., Lindo L., Kelly A., Brown D.W., Lee T., Vaughan M.M., Alexander N.J., Busman M., Gutiérrez S.: **Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi**, *PLoS Pathog.*, 14. e1006946, 2018.

Qiang Z.: **Bioavailability and metabolism of botanical constituents and enhancement of intestinal barrier function by caffeic acid derivatives in Caco-2 cells**, Graduate Theses and Dissertations, Iowa State University, U.S.A., 2011.

Rafai P., Papp Z., Jakab L., Tuboly T., Jurkovich V., Brydl E., Ozsvári L., Kósa E.: **The effect of fermented wheat germ extract on production parameters and immune status of growing pigs**, *J. Anim. Feed Sci.*, 20, 36–46, 2011.

Ramakrishna A., Ravishankar G.A.: **Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants**, *Plant Signal. Behav.*, 6. 1720–1731, 2011.

Rasmussen P.H., Nielsen K.F., Ghorbani F., Spliid N.H., Nielsen G.C., Jørgensen L.N.: **Occurrence of different trichothecenes and deoxynivalenol-3- β -D-glucoside in naturally and artificially contaminated Danish cereal grains and whole maize plants**, *Mycotoxin Res.*, 28. 181–190, 2012.

Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y.: **Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling**, *Cell. Signal.*, 24. 981–990, 2012.

Razzuoli E., Villa R., Amadori M.: **IPEC-J2 cells as reporter system of the anti-inflammatory control actions of interferon-alpha**, *J. Interferon Cytokine Res.*, 33. 597–605, 2013.

Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A.: **Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species**, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1863. 2977–2992, 2016.

Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bareau I., Blanchard P., Gil-Munoz M.I., Barberan F.T.: **Polyphenolic compounds of mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say)**, J. Stored. Prod. Res., 40. 395–408, 2004.

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

Riaz U., Kharal M.A., Murtaza G., Zaman Q.U., Javaid S., Malik H.A., Aziz H., Abbas Z.: **Prospective roles and mechanisms of caffeic acid in counter plant stress: A mini review**, Pak. J. Agric. Sci., 32. 8–19, 2018.

Richter C.: **Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes**, Chem. Phys. Lipids., 44. 175–189, 1987.

Rizzello C.G., Mueller T., Coda R., Reipsch F., Nionelli L., Curiel J.A., Gobbetti M.: **Synthesis of 2-methoxy benzoquinone and 2,6-dimethoxybenzoquinone by selected lactic acid bacteria during sourdough fermentation of wheat germ**, Microb. Cell. Fact., 12. 105, 2013.

Romero A., Ares I., Ramos E., Castellano V., Martínez M., Martínez-Larrañaga M.R., Anadón A., Martínez M.A.: **Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay**, Toxicology, 353–354. 21–33, 2016.

Romero-Garcia S., Lopez-Gonzalez J.S., Báez-Viveros J.L., Aguilar-Cazares D., Prado-García H.: **Tumor cell metabolism: an integral view**, Cancer Biol. Ther., 12. 939–948, 2011.

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

Ruiz M.J., Macáková P., Juan-García A., Font G.: **Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells**, Food Chem. Toxicol., 49. 2718–2724, 2011b

Samoylenko A., Hossain J.A., Mennerich D., Kellokumpu S., Hiltunen J.K., Kietzmann T.: **Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence**, Antioxid. Redox Signal., 19. 2157–2196, 2013.

Sanbongi C., Takano H., Osakabe N., Sasa N., Natsume M., Yanagisawa R., Inoue K., Kato Y., Osawa T., Yoshikawa T.: **Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles**, Free Radic. Biol. Med., 34. 1060–1069, 2003.

- Sanchez-Munoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J.K.: **Role of cytokines in inflammatory bowel disease**, *World J. Gastroenterol.*, 14. 4280–4288, 2008.
- Santos Alexandre A.P., Vela-Paredes R.S., Santos A.S., Costa N.S., Canniatti-Brazaca S.G., Calori-Domingues M.A., Augusto P.E.D.: **Ozone treatment to reduce deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) contamination in wheat bran and its impact on nutritional quality**, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.*, 35. 1189–1199, 2018.
- Santos-Buelga C., Feliciano A.S.: **Flavonoids: From structure to health issues**, *Molecules*, 22. 477, 2017.
- Savard C., Gagnon C.A., Chorfi Y.: **Deoxynivalenol (DON) naturally contaminated feed impairs the immune response induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) live attenuated vaccine**, *Vaccine*, 33. 3881–3886, 2015.
- Scheckel K.A., Degner S.C., Romagnolo D.F.: **Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines**, *J. Nutr.*, 138. 2098–2105, 2008.
- Schieber M., Chandel N.S.: **ROS function in redox signaling and oxidative stress**, *Curr. Biol.*, 24. R453–462, 2014.
- Schierack P., Nordhoff M., Pollmann M., Weyrauch K.D., Amasheh S., Lodemann U., Jores J., Tachu B., Kleta S., Blikslager A., Tedin K., Wieler L.H.: **Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine**, *Histochem. Cell. Biol.*, 125. 293–305, 2006.
- Schluter J., Peled J.U., Taylor B.P., Markey K.A., Smith M., Taur Y., Niehus R., Staffas A., Dai A., Fontana E., Amoretti L.A., Wright R.J., Morjaria S., Fenelus M., Pessin M.S., Chao N.J., Lew M., Bohannon L., Bush A., Sung A.D., Hohl T.M., Perales M.A., van den Brink M.R.M., Xavier J.B.: **The gut microbiota is associated with immune cell dynamics in humans**, *Nature*, 588. 303–307, 2020.
- Schoental R., Joffe A.Z.: **Lesions induced in rodents by extracts from cultures of *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides***, *J. Pathol.*, 112. 37–42, 1974.
- Schuster A., Hunder G., Fichtl B., Forth W.: **Role of lipid peroxidation in the toxicity of T-2 toxin**, *Toxicon*, 25. 1321–1328, 1987.
- Schwartz S., Beaulieu J.F., Ruemmele F.M.: **Interleukin-17 is a potent immuno-modulator and regulator of normal human intestinal epithelial cell growth**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337. 505–509, 2005.

Selmar D., Kleinwächter M.: **Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products**, *Plant Cell. Physiol.*, 54. 817–826, 2013.

Sergent T., Parys M., Garsou S., Pussemier L., Schneider Y.J., Larondelle Y.: **Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations**, *Toxicol Lett.*, 164. 167–176, 2006.

Serrelli G., Incani A., Atzeri A., Angioni A., Campus M., Cauli E., Zurru R., Deiana M.: **Antioxidant effect of natural table olives phenolic extract against oxidative stress and membrane damage in enterocyte-like cells**, *J. Food Sci.*, 82. 380–385, 2017.

Sharma L., Marques G.: **Fusarium, an entomopathogen-A myth or reality?**, *Pathogens*, 7. 93, 2018.

Shekarchi M., Hajimehdipour H., Saeidnia S., Gohari A.R., Hamedani M.P.: **Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family**, *Pharmacogn. Mag.*, 8. 37–41, 2012.

Shin D., Chang S.Y., Bogere P., Won K., Choi J.Y., Choi Y.J., Lee H.K., Hur J., Park B.Y., Kim Y., Heo J.: **Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs**, *PLoS One*, 14. e0220843, 2019.

Sies H.: **Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress**, *J. Biol. Chem.*, 289. 8735–8741, 2014.

Silva-Guillen Y.V., Arellano C., Boyd R.D., Martinez G., van Heugten E.: **Growth performance, oxidative stress and immune status of newly weaned pigs fed peroxidized lipids with or without supplemental vitamin E or polyphenols**, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 11. 22, 2020.

Singla R.K., Dubey A.K., Garg A., Sharma R.K., Fiorino M., Ameen S.M., Haddad M.A., Al-Hiary M.: **Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures**, *J. A.O.A.C. Int.*, 102. 1397–1400, 2019.

Slámová K., Kapešová J., Valentová K.: **"Sweet Flavonoids": Glycosidase-catalyzed modifications**, *Int. J. Mol. Sci.*, 19. 2126, 2018.

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

- Sobral M.M.C., Faria M.A., Cunha S.C., Ferreira I.M.P.L.V.O.: **Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells**, *Chemosphere*, 202. 538–548, 2018.
- Son Y., Kim S., Chung H.T., Pae H.O.: **Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases**, *Methods Enzymol.*, 528. 27–48, 2013.
- Song P., Zhang R., Wang X., He P., Tan L., Ma X.: **Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats**, *J. Agric. Food Chem.*, 59. 6227–6232, 2011.
- Spit M., Koo B.K., Maurice M.M.: **Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer**, *Open Biol.*, 8. 180120, 2018.
- Spitzer F., Speiser S., Vahjen W., Zentek J.: **Effect of different feed ingredients and additives on IPEC-J2 cells challenged with an enterotoxigenic Escherichia coli strain**, *Cytotechnology*, 68. 1463–1471, 2016.
- Springler A., Hessenberger S., Reisinger N., Kern C., Nagl V., Schatzmayr G., Mayer E.: **Deoxynivalenol and its metabolite deepoxy-deoxynivalenol: multi-parameter analysis for the evaluation of cytotoxicity and cellular effects**, *Mycotoxin Res.*, 33. 25–37, 2017.
- Springler A., Vrabel G.J., Mayer E., Schatzmayr G., Novak B.: **Effect of fusarium-derived metabolites on the barrier integrity of differentiated intestinal porcine epithelial cells (IPEC-J2)**, *Toxins (Basel)*, 8. 345, 2016.
- Stamatovic S.M., Johnson A.M., Sladojevic N., Keep R.F., Andjelkovic A.V.: **Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1397. 54–65, 2017.
- Stipkovits L., Lapis K., Hidvegi M., Kósa E., Glávits R., Resetár A.: **Testing the efficacy of fermented wheat germ extract against Mycoplasma gallisepticum infection of chickens**, *Poult.*, 83. 1844–1848, 2004.
- Stone J.R., Yang S.: **Hydrogen peroxide: a signaling messenger**, *Antioxid. Redox. Signal.*, 8. 243–270, 2006.
- Su L.J., Zhang J.H., Gomez H., Murugan R., Hong X., Xu D., Jiang F., Peng Z.Y.: **Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis**, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019. 5080843, 2019.
- Sundstøl Eriksen G., Pettersson H., Lundh T.: **Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites**, *Food Chem. Toxicol.*, 42, 619–624, 2004.

Supriya Ch., Reddy P.S.: **Prenatal exposure to aflatoxin B1: developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats**, *Naturwissenschaften*, 102. 26, 2015.

Suzuki T., Hara H.: **Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula [corrected] occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells**, *J. Nutr.*, 139. 965–974, 2009.

Szakács Á., Kósa E., Tuboly T., Tornyo G., Fodor J., Rajli V., Kovács F., Horn P., Kovács M.: **A T-2 toxin és a fermentált búzacsíra kivonatának hatása választott malacok immunválaszára**, *Magyar Állatorvosok LapjaMagy. Allatorvosok Lapja*, 131. 276–282, 2009.

Takenaka T., Harada N., Kuze J., Chiba M., Iwao T., Matsunaga T.: **Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans**, *Drug Metab. Dispos.*, 42. 1947–1954, 2014.

Takenaka T., Harada N., Kuze J., Chiba M., Iwao T., Matsunaga T.: **Application of a human intestinal epithelial cell monolayer to the prediction of oral drug absorption in humans as a superior alternative to the Caco-2 cell monolayer**, *J. Pharm. Sci.*, 105. 915–924, 2016.

Takiishi T., Fenero C.I.M., Câmara N.O.S.: **Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life**, *Tissue Barriers*, 5. e1373208, 2017.

Telekes A., Hegedus Hegedűs M., Chae C.H., Vékey K.: **Avemar (wheat germ extract) in cancer prevention and treatment**, *Nutr. Cancer*, 61. 891–899, 2009.

Tima H., Brückner A., Mohácsi-Farkas C., Kiskó G.: **Fusarium mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields**, *Food Addit. Contam. Part B. Surveill.*, 9. 127–131, 2016a

Tima H., Rácz A., Guld Z., Mohácsi-Farkas C., Kiskó G.: **Deoxynivalenol, zearalenone and T-2 in grain based swine feed in Hungary**, *Food Addit. Contam. Part. B. Surveill.*, 9. 275–280, 2016.b

Tsao R.: **Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols**, *Nutrients*, 2. 1231–1246, 2010.

Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V.: **Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS**, *Molecules*, 12. 593–606, 2007.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 39. 44–84, 2007.

Van De Walle J., During A., Piront N., Toussaint O., Schneider Y.J., Larondelle Y.: **Physio-pathological parameters affect the activation of inflammatory pathways by deoxynivalenol in Caco-2 cells**, *Toxicol. In Vitro.*, 24. 1890–1898, 2010.

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

Van Wijk F., Cheroutre H.: **Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation**, *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 6. 559–566, 2010.

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

Verbrugghe E., Croubels S., Vandenbroucke V., Goossens J., De Backer P., Eeckhout M., De Saeger S., Boyen F., Leyman B., Van Parys A., Haesebrouck F., Pasmans F.: **A modified glucomannan mycotoxin-adsorbing agent counteracts the reduced weight gain and diminishes cecal colonization of Salmonella typhimurium in T-2 toxin exposed pigs**, *Res. Vet. Sci.*, 93. 1139–1141, 2012.

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

Verdile N., Mirmahmoudi R., Brevini T.A.L., Gandolfi F.: **Evolution of pig intestinal stem cells from birth to weaning**, *Animal*, 13. 2830–2839, 2019.

Vereecke L., Beyaert R., van Loo G.: **Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease**, *Trends Mol. Med.*, 17. 584–593, 2011.

Vergauwen H., Prims S., Degroote J., Wang W., Casteleyn C., van Cruchten S., de Smet S., Michiels, J., van Ginneken C.: **In vitro investigation of six antioxidants for pig diets**, *Antioxidants (Basel)*, 5. 41, 2016.

Vergauwen H.: **The IPEC-J2 cell line**. In: *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models [Internet]*. Szerk.: Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H., Cham (CH): Springer, 2015. Chapter 12.

- Vidal A., Sanchis V., Ramos A.J., Marín S.: **Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products**, *Food Chem.*, 178. 276–286, 2015.
- Vitkus S.J., Hanifin S.A., McGee D.W.: **Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion**, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 34, 660–664, 1998.
- Vogelsang K., Schneider B., Petersen M.: **Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3'-O-beta-D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton**, *Planta.*, 223. 369–373, 2006.
- Wan L.Y., Turner P.C., El-Nezami H.: **Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells**, *Food Chem. Toxicol.*, 57. 276–83, 2013.
- Wan M.L.Y., Turner P.C., Co V.A., Wang M.F., Amiri K.M.A., El-Nezami H.: **Schisandrin A protects intestinal epithelial cells from deoxynivalenol-induced cytotoxicity, oxidative damage and inflammation**, *Sci. Rep.*, 9. 19173, 2019.
- Weaver A.C., King W.D., Verax M., Fox U., Kudupoje M.B., Mathis G., Lumpkins B., Yiannikouris A.: **Impact of chronic levels of naturally multi-contaminated feed with Fusarium mycotoxins on Broiler broiler chickens and evaluation of the mitigation properties of different titers of yeast cell wall extract**, *Toxins (Basel)*, 12. 636, 2020.
- Wellington M.O., Bosompem M.A., Rodrigues L.A., Columbus D.A.: **Effect of long-term feeding of graded levels of deoxynivalenol on performance, nutrient utilization, and organ health of grower-finisher pigs (35 to 120 kg)**, *J. Anim. Sci.*, 99. skab109, 2021.
- Williamson G.: **The role of polyphenols in modern nutrition**, *Nutr. Bull.*, 42. 226–235, 2017.
- Winterbourn C.: **Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species**, *Nat. Chem. Biol.*, 4. 278–286, 2008.
- Wu Q., Dohnal V., Kuca K., Yuan Z.: **Trichothecenes: structure-toxic activity relationships**, *Curr. Drug Metab.*, 14. 641–660, 2013.
- Wu Q., Kuca K., Nepovimova E., Wu W.: **Type A trichothecene diacetoxyscirpenol-induced emesis corresponds to secretion of peptide YY and serotonin in mink**, *Toxins (Basel)*, 12. 419, 2020.
- Wu Q., Wang X., Nepovimova E., Miron A., Liu Q., Wang Y., Su D., Yang H., Li L., Kuca K.: **Trichothecenes: immunomodulatory effects, mechanisms, and anti-cancer potential**, *Arch. Toxicol.*, 91. 3737–3785, 2017a.

- Wu Q., Wang X., Nepovimova E., Wang Y., Yang H., Li L., Zhang X., Kuca K.: **Antioxidant agents against trichothecenes: new hints for oxidative stress treatment**, *Oncotarget.*, 8. 110708–110726, 2017b.
- Wu W., Bates M.A., Bursian S.J., Link J.E., Flannery B.M., Sugita-Konishi Y., Watanabe M., Zhang H., Pestka J.J.: **Comparison of emetic potencies of the 8-ketotrichothecenes deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, fusarenon X, and nivalenol**, *Toxicol. Sci.*, 131. 279–291, 2013.
- Wu W., Zhou H.R., He K., Pan X., Sugita-Konishi Y., Watanabe M., Zhang H., Pestka J.J.: **Role of cholecystinin in anorexia induction following oral exposure to the 8-ketotrichothecenes deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, fusarenon X, and nivalenol**, *Toxicol. Sci.*, 138. 278–289, 2014.
- Xiao X., Shi D., Liu L., Wang J., Xie X., Kang T., Deng W.: **Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling**, *PLoS One*, 6. e22934, 2011.
- Xu H.X., Lee S.F.: **Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria**, *Phytother. Res.*, 15. 39–43, 2001.
- Xu R., Karrow N.A., Shandilya U.K., Sun L.H., Kitazawa H.: **In-vitro cell culture for efficient assessment of mycotoxin exposure, toxicity and risk mitigation**, *Toxins (Basel)*, 12. 146, 2020.
- Xue X., Falcon D.M.: **The role of immune cells and cytokines in intestinal wound healing**, *Int. J. Mol. Sci.*, 20. 6097, 2019.
- Yang J., Yang X., Chu Y., Li M.: **Identification of Baicalin as an immunoregulatory compound by controlling T(H)17 cell differentiation**, *PLoS One*, 6. e17164, 2011.
- Yang J., Yang X., Li M.: **Baicalin, a natural compound, promotes regulatory T cell differentiation**, *BMC Complement. Altern. Med.*, 12. 64, 2012.
- Yang L., Yu Z., Hou J., Deng Y., Zhou Z., Zhao Z., Cui J.: **Toxicity and oxidative stress induced by T-2 toxin and HT-2 toxin in broilers and broiler hepatocytes**, *Food Chem. Toxicol.*, 87. 128–137, 2016.
- Yang Y.X., Yu S., Jia B.X., Liu N., Wu A.: **Metabolomic profiling reveals similar cytotoxic effects and protective functions of quercetin during deoxynivalenol- and 15-acetyldeoxynivalenol-induced cell apoptosis**, *Toxicol. In Vitro*, 66. 104838, 2020.
- Ye W., Chen Y., Li H., Zhang W., Liu H., Sun Z., Liu T., Li S.: **Two trichothecene mycotoxins from *Myrothecium roridum* induce apoptosis of HepG-2 cells via caspase**

activation and disruption of mitochondrial membrane potential, *Molecules*, 21. 781, 2016.

Ying Z., Zhao D., Li H., Liu X., Zhang J.: **Efficient adsorption of deoxynivalenol by porous carbon prepared from soybean dreg**, *Toxins (Basel)*, 13. 500, 2021.

Yoo J., Kim D., Park E., Lee J., Kim S., Kim M.: **Nuruk, a traditional korean fermentation starter, contains the bioactive compound 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,6-DMBQ)**, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 54. 795–798, 2011.

Yumbe-Guevara B.E., Imoto T., Yoshizawa T.: **Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat**, *Food Addit. Contam.*, 20. 1132–1140, 2003.

Zain M.E.: **Impact of mycotoxins on humans and animals**, *J. Saudi Chem. Soc.*, 15. 129–144, 2011.

Zakrzewski S.S., Richter J.F., Krug S.M., Jebautzke B., Lee I.F., Rieger J., Sachtleben M., Bondzio A., Schulzke J.D., Fromm M., Gunzel D.: **Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium**, *PLoS One*, 8. e79643, 2013.

Zarkovic N.: **Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology**, *Cells*, 9. 767, 2020.

Zha A, Cui Z, Qi M, Liao S, Chen L, Liao P, Tan B.: **Dietary baicalin zinc supplementation alleviates oxidative stress and enhances nutrition absorption in deoxynivalenol challenged pigs**, *Curr. Drug Metab.*, 21. 614–625, 2020b.

Zha A, Yuan D, Cui Z, Qi M, Liao S, Liao P, Tan B.: **The evaluation of the antioxidant and intestinal protective effects of baicalin-copper in deoxynivalenol-challenged piglets**, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020. 5363546, 2020a.

Zhai R., Zhao Y., Wu M., Yang J., Li X., Liu H., Wu T., Liang F., Yang C., Wang Z., Ma F., Xu L.: **The MYB transcription factor PbMYB12b positively regulates flavonol biosynthesis in pear fruit**, *BMC Plant Biol.*, 19. 85, 2019.

Zhang J., Zhang H., Liu S., Wu W., Zhang H.: **Comparison of anorectic potencies of type A trichothecenes T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and neosolaniol**, *Toxins (Basel)*, 10. 179, 2018.

Zhang J.Y., Xiao X., Dong Y., Wu J., Yao F., Zhou X.H.: **Effect of fermented wheat germ extract with lactobacillus plantarum dy-1 on HT-29 cell proliferation and apoptosis**, *J. Agric. Food Chem.*, 63. 2449–2457, 2015.

Zhang Q., Widmer G., Tzipori S.: **A pig model of the human gastrointestinal tract**, *Gut Microbes.*, 4. 193–200, 2013.

Zhang X., Jiang L., Geng C., Cao J., Zhong L.: **The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells**, *Toxicol.*, 54. 513–518, 2009.

Zhang Y., Chen X., Yang L., Zu Y., Lu Q.: **Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice**, *Food Funct.*, 6. 927–931, 2015.

Zhang Y., Gaikwad N.W., Olson K., Zahid M., Cavalieri E.L., Rogan E.G.: **Cytochrome P450 isoforms catalyze formation of catechol estrogen quinones that react with DNA**, *Metabolism*, 56. 887–894, 2007.

Zhang Y., Wang D., Yang L., Zhou D., Zhang J.: **Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity**, *PLoS One*, 9. e105725, 2014.

Zhao X., Xu X.X., Liu Y., Xi E.Z., An J.J., Tabys D., Liu N.: **The in vitro protective role of bovine lactoferrin on intestinal epithelial barrier**, *Molecules*, 24. 148, 2019.

Zhao Y., Seefeldt T., Chen W., Wang X., Matthees D., Hu Y., Guan X.: **Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 485. 56–62, 2009.

Zhu L., Gu P., Shen H.: **Gallic acid improved inflammation via NF- κ B pathway in TNBS-induced ulcerative colitis**, *Int. Immunopharmacol.*, 67. 129–137, 2019.

Zhurakivska K., Troiano G., Caponio V.C.A., Dioguardi M., Arena C., Lo Muzio L.: **The effects of adjuvant fermented wheat germ extract on cancer cell lines: A systematic review**, *Nutrients*, 10. 1546, 2018.

Zimmerman M.C., Clemens D.L., Duryee M.J., Sarmiento C., Chiou A., Hunter C.D., Tian J., Klassen L.W., O'Dell J.R., Thiele G.M., Mikuls T.R., Anderson D.R.: **Direct antioxidant properties of methotrexate: Inhibition of malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation and superoxide scavenging**, *Redox. Biol.*, 13. 588–593, 2017.

Zimmermann M., Zimmermann-Kogadeeva M., Wegmann R., Goodman A.L.: **Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes**, *Nature*, 570. 462–467, 2019.

Zinedine A., Mañes J.: **Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco**, *Food Contr.*, 20. 334–344, 2009.

Zoratti L., Karppinen K., Luengo Escobar A., Häggman H., Jaakola L.: **Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits**, *Front. Plant Sci.*, 5. 534, 2014.

Zou Y., Wei H.K., Xiang Q.H., Wang J., Zhou Y.F., Peng J.: **Protective effect of quercetin on pig intestinal integrity after transport stress is associated with regulation oxidative status and inflammation**, J. Vet. Med. Sci., 78. 1487–1494, 2016.

Zukiewicz-Sobczak W.A.: **The role of fungi in allergic diseases**, Postepy. Dermatol. Alergol., 30. 42–45, 2013.

11. A doktori kutatás eredményeinek közlései

Lektorált, impakt faktorraal bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

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

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

Pomothy J.M., Pászti-Gere E., Barna R.F., Prokoly D., Jerzsele Á.: **The impact of fermented wheat germ extract on porcine epithelial cell line exposed to deoxynivalenol and T-2 mycotoxins**, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020. 3854247, 2020.

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

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

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

Lektorált, impakt faktorraal nem bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

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

Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények listája

Pászti-Gere E., Pomothy J., Jerzsele Á., Pilgram O., Steinmetzer T.: **Exposure of human intestinal epithelial cells and primary human hepatocytes to trypsin-like serine protease inhibitors with potential antiviral effect**, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 36. 659–668, 2021.

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

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

Konferencia prezentációk

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Szakedolgozat és TDK munka irányítása

Paréj Zsuzsanna: Pharmacological and toxicological characterization of S1P as a treatment option in anemias. TDK dolgozat, témavezetők: Dr. Czimmermann Ágnes Eszter, Pomothy Judit Mercédesz, 2020.

Prokoly Dorottya: Fermentált búzacsíra kivonat hatásának vizsgálata fuzárium toxinokkal terhelt bélhámsejteken. TDK dolgozat, témavezetők: Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet, Pomothy Judit Mercédesz, 2019.

Kiss Zsófia: A zearalenon által okozott bélhám károsodások modellezése IPEC-J2 sejteken. Szakedolgozat, témavezetők: Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet, Pomothy Judit Mercédesz, 2017.

12. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönettel tartozom Dr. Neogrády Zsuzsannának és Dr. Mátis Gábornak a kísérleteim során mutatott folyamatos és összetett szakmai támogatásukért. Hálásan köszönöm Dr. Barna Réka Fanninak a segítséget a laboratóriumi munkában és konferenciákra való közös felkészülésben.

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

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

Hálásan köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak a támogatást és az építő kritikákat, amellyel segítettek a publikálást és a türelmüket, mellyel viseltetek irántam. Nélkülük ez az értekezés nem születhetett volna meg!

A dolgozat létrejöttében segítettek az alábbi elnyert pályázatok: az Európai Unió és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásában az EFOP-3.6.1-16-2016-00024; az EFOP-3.6.2-16-2017-00012 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005. A kutatás az NKFIH 124522, NKFIH 115685, valamint a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.