

TDK dolgozat



Állatorvostudományi Egyetem

Élettani és Biokémiai Tanszék

Biokémiai Osztály

**A baicalin antioxidáns hatásának vizsgálata mikotoxin-kezelt csirke eredetű
háromdimenziós májsejttenyészeteken**

Készítette:

Fácán Zsófia

Témavezetők:

Vörösházi Júlia

PhD hallgató

Dr. Mátis Gábor

egyetemi docens

Tartalom jegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	5
A trichotecénvázak mikotoxinok szerkezete és csoportosítása	6
Dezoxinivalenol (DON).....	7
A DON sejtszintű hatásai.....	8
Baicalin	10
3D sejtenyésztés	11
Célkitűzés	13
Anyag és módszer	14
Kísérleti állatok, vegyszerek.....	14
Az oldatok előkészítése	14
A sejtek izolálása.....	14
A 3D sejtenyészetek kialakítása	16
A sejtek életképességének mérése	17
LDH aktivitás mérése.....	18
Az oxidatív homeosztázis paramétereinek mérése	18
Statisztika.....	19
Saját munka	19
Eredmények	20
A sejtek metabolikus aktivitása	20
A sejtkárosodás mértékének vizsgálata	21
Az NRF-2 mennyisége.....	23
A 8-OHdG mennyisége	24
Megbeszélés	26
Összefoglalás.....	30
Summary.....	32
Irodalom jegyzék.....	34
Köszönetnyilvánítás	38

Rövidítések jegyzéke

2D	Kétdimenziós
3D	Háromdimenziós
8-OHdG	8-hidroxi-2-dezoxiguanozin
ALP	Alkalikus-foszfátáz
AST	Azpartát-aminotranszferáz
BAI	Baicalin
BSA	Szarvasmarha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
CCK-8	Cell Counting Kit-8
COX-2	Ciklooxygenáz 2
DR	Dózisválasz (Dose response)
Drp-1	Dynamin-kapcsolt fehérje 1
DON	Dezoxinivalenol
DON-3s	Dezoxinivalenol-3-szulfát
ECM	Extracelluláris mátrix
EGTA	Etilén-glikol-tetraacetát
ELISA	Enzimhez kötött immunszorbens próba (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FBS	Magzati szarvasmarha szérum (Fetal Bovine Serum)
Fis1	Mitokondriális fission 1 fehérje
F-X	Fuzarenon-X
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HO-1	Hem oxigenáz-1
IL-1 β	ké
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
INT	Jód-nitro-tetrazólium só
LDH	Laktát-dehidrogenáz
LPS	Lipopoliszacharid
MAPK	Mitogén aktivált fehérje kináz
MIEF-1	Mitokondriális elongációs faktor 1
Mfn1	Mitofusin-1
Mfn2	Mitofusin-2

NIV	Nivalenol
NMDR	Nem monoton dózis-válasz
NRF-2	Nukleáris faktor eritroid-2-hez kapcsolódó faktor 2
NP	Nem parenchimális
NQO-1	NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési faktor
PINK1	Parkin-függő mitofág faktor-1
PXR	Pregnán X receptor
ROS	Reaktív oxigéngyökök
SGLT-1	Na ⁺ -függő glükóz/galaktóz transzporter
TNF- α	Tumor nekrosis faktor α
UGT	UDP-glükuronozil-transzferáz
VEGF	Vaszkuláris endothél eredetű növekedési faktor
WST-8	Vízoldható tetrazólium só (Water Soluble Tetrazolium Salt-8)

Bevezetés

A globális felemelegedés hatására egyre jelentősebb a takarmányozásra szánt gabonamagvak, mint a kukorica, a búza, a zab, és az árpa mikotoxin-szennyezettsége szerte a világon [1]. A dezoxinivalenol (DON) egy trichotechénvázas mikotoxin, melyet a *Fusarium* nemzetségbe tartozó *F. culmorum* és a *F. graminearum* penészgombák másodlagos anyagcseretermékként termelnek. E toxin dózis- és kitettségfüggő módon lehet citotoxikus és immunotoxikus, illetve okozhat reprodukciós problémákat is. Kis adagban a szervezetbe jutva csökkent étvágyat, ezáltal a takarmány kisebb mértékű felvételét eredményezi, míg hosszabbtávú kitettség során romlik a takarmányhasznosulás, csökkenhet a növekedési ráta, illetve immunrendszeri és reprodukciós zavarok is felléphetnek, melyek komoly gazdasági károkat okozhatnak [2–4]. Fő sejtszintű hatása a riboszóma 60S alegységéhez való kötődéssel a fehérjeszintézis gátlása, valamint befolyásolhatja a membránszerkezetet is [5]. Hatására szabadgyökök szabadulhatnak fel a sejtekben, amely oxidatív stressz kialakulásához vezethet. Ez együtt járhat DNS és RNS károsodással, fokozott mértékű lipidperoxidációval és egyes gyulladásos faktorok szintjének emelkedésével, végül pedig apoptózishoz is vezethet [6].

A baicalin (BAI) egy flavonoid vegyület, melyet elsőként a bajkái csucsóka (*Scutellaria baicalensis Georgi*) gyökeréből izolálták, és pozitív hatásai már régóta ismertek. Antioxidáns tulajdonsága révén képes csökkenteni az oxidatív stressz mértékét, valamint gyulladáscsökkentő, tumorellenes és antivirális hatását is leírták már [7].

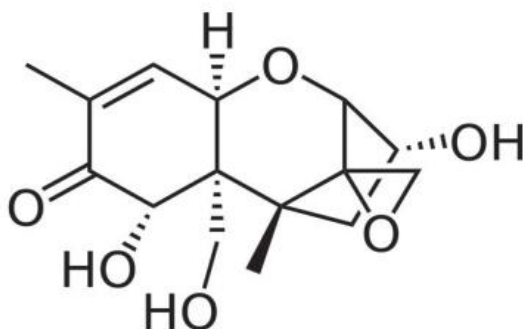
TDK munkám során csirke eredetű háromdimenziós (3D) májsejttenyészeteken tanulmányoztuk a DON sejtkárosító és a baicalin védő hatását. Első vizsgálataink során meghatároztuk a sejtek metabolikus aktivitását, melyből a sejtek életképességére lehet következtetni. A DON membránkárosító hatását a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim extracelluláris aktivitásának mérésével vizsgáltuk. A DON és baicalin által kiváltott, az oxidatív homeosztázisban szerepet játszó folyamatok jobb megismerése érdekében pedig két paraméter, a nukleáris faktor eritroid-2-hez kapcsolódó faktor 2 (NRF-2) és a 8-hidroxi-2-dezoxiguanozin (8-OHdG) mennyiségét vizsgáltuk csirke specifikus ELISA tesztek segítségével.

Irodalmi áttekintés

A trichotecénvázak mikotoxinok szerkezete és csoportosítása

A trichotecénvázak mikotoxinok másodlagos anyagcseretermékek, melyeket többek között a *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák állítanak elő [8]. A különböző *Fusarium* fajoknak más és más hőmérséklet az optimális a fertőzéshez, azonban mindegyik számára ideális körülmény a hőmérséklet csökkenése és a növekvő páratartalom. A *F. avenaceum* és a *F. graminearum* optimális fertőzési hőmérséklete 28,0-29,0 °C, míg a *F. culmorum* esetében 26,5 °C. Európában a *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* és *F. sporotrichoides* fordul elő a leggyakrabban [9].

Kémiaiailag a trichotecénvázak mikotoxinok tetraciklusos spiro-epoxi-szeszkviterpének. Toxikus hatásukért a szerkezetben található 12,13-epoxid gyűrű, valamint a C9 és C10 között kialakult kettős kötés a felelős, melyek hatását tovább erősítheti a C3-nál lévő OH csoport is [10].



1. ábra: A DON szerkezeti képlete

A trichotecénvázak mikotoxinok kémiaiailag a funkciós csoportok jelenléte, vagy hiánya szerint négy csoportba sorolhatók. Ezek alapján A, B, C és D típusokat különíthetünk el. A *Fusarium* fajok az A és B csoportba tartozó mikotoxinokat termelik, a C és D típusúakat pedig a *Cephalosporium* és a *Myrothecium* fajok állítják elő. Az A és a B típusok közötti szerkezeti eltérés a B típus C8-as pozíciójában található karbonil-csoportja. Az A csoportba sorolható többek között az egyik legtoxikusabb trichotecénvázak mikotoxin, a T-2 toxin, valamint a diacetoxiszcirpenol (DAS) is. A B csoportba tartozó mikotoxinok mérsékeltebb toxicitással rendelkeznek. Ide sorolható az egyik leggyakrabban előforduló, általunk is vizsgált DON (ábra 1 [11]), a fuzarenon-X (F-X) és a nivalenol (NIV). A C-típusú trichotecének C-7/C-8 epoxiddal

rendelkezik (pl. krotocin). A D-típusú trichotecénekben pedig a C-4 és C-15 pozíció között egy gyűrű található (pl. roridin A, verrucarin A, satratoxin H) [12].

Dezoxinivalenol (DON)

A DON a *Fusarium spp.* által termelt egyik legelterjedtebb mikotoxin, mely gyakran szennyezi az élelmiszer- és takarmánytermelésre szánt gabonát, többet között a búzát, az árpát és a kukoricát. Egy vizsgálat során igazolták már, hogy egyes élelmiszerekben is a DON koncentrációja meghaladhatja a megengedett határértékeket, többek között búzából származó mintában, ahol 0,9-7,6 g/kg-os koncentrációban mutatták ki [13]. Ez a mennyiség már kockázatot jelenthet humán- és haszonállat-egészségügyi szempontból is [14].

Az egyes állatfajok között eltérhet a DON-ra való érzékenység, mivel eltérő módon tudják metabolizálni a toxint. A madár fajok jellemzően kevésbé érzékenyek a toxin káros hatásaira, mint például az emlősök, de a hosszabbtávú kitettség még esetükben is komoly negatív következményekkel járhat.[15] Általában a DON mikotoxikózis akut formája normál körülmények között ritkán fordul elő baromfiállományokban. Ha azonban, a takarmány alacsony DON-tartalmú (kevesebb, mint 5 mg DON/kg takarmány), csökkent súlygyarapodáshoz, csökkent immunitáshoz, ezáltal pedig a fertőző betegségekre való fogékonysághoz vezethet [16].

A DON főként az immunrendszerben és a bélrendszerben okoz zavarokat, melyek mértéke kitettség és koncentráció függő [13]. Nagy dózisban akut toxicitást okoz, melynek tünetei a hasmenés, hányás, leukocitózis, vérzés, a keringés összeomlása, végső esetben pedig az állat elhullása is bekövetkezhet. Ezzel szemben a krónikus alacsony dóziséjú kitettség során csökkent súlygyarapodás, tápanyag-felszívódási zavarok, neuroendokrin elváltozások és az immunrendszer zavara jellemző [17].

A szennyezett takarmányt felvételét követően a mikotoxinok először a bélhámsejtekkel kerülnek kapcsolatba. Alacsony, 10 mol/l alatti koncentrációban a DON szelektíven modulálja a bélrendszerben található Na⁺-függő glükóz/galaktóz (SGLT-1) transzportert, amely a víz megfelelő felszívódásáért felelős [14] Az SGLT-1 meghibásodása magyarázatot adhat a toxinnal szennyezett takarmány felvétele utáni hasmenéses kórképre. Emellett a DON közvetlenül is képes károsítani a bélhámsejteket. Egy vizsgálat során DON kezelés hatására a bélbolyhok magasságában rövidülést és a sejtek apoptózisát tapasztalták, melynek következtében a tápanyagok csak kisebb felületen tudnak felszívódni. Továbbá a DON negatívan befolyásolja a bél mikrobiomegyensúlyát is a hasznos baktériumok környezetének megváltoztatásával [18]. A *Bacteroidetes* és a *Firmicutes* fontos, egészséges állapotban a

bélben élő baktériumok, melyek jelenlétének hiánya az étvágytalansággal van összefüggésben. [19] Wan és mtsai kutatásuk során arról számoltak be, hogy a *Fusarium* mikotoxinok képesek aktiválni különféle antimikrobiális védekező mechanizmusokat, amelyek szintén hatással lehetnek a bélmikrobiomra [20]. Ez a módosult bél mikrobiom-egyensúly negatív hatással van a szervezet általános egészségi állapotára, mivel ennek megváltozása csökkent mértékű immunválasszal járhat különböző bakteriális illetve virális fertőzések esetén [21].

A DON felszívódás után a májba kerül. A máj elsődleges feladata a méregtelenítés, azonban túl nagy DON kitettség májgyulladásához, májkárosodáshoz vezethet, gátolva annak élettani funkcióit. Ez magyarázható azzal, hogy tartós DON kitettség hatására zavart szenved egy ún. pregnán X receptor (PXR) expressziója, melynek fontos szerepe van különböző metabolikus folyamatok szabályozásában, beleértve a gyógyszerürítést, a gyulladásos folyamatokat, a sejtdifferenciálódást és az oxidatív homeosztázis fenntartását. Például a hepatocitákon belüli glükuronizációs folyamatokban résztvevő UDP-glükuronil-transzferázok (UGT-k) is a PXR által szabályozódnak. Tehát a PXR receptor elégtelen működése gátolja a normál méregtelenítő reakciókat, valamint túlzott oxidatív stresszhez vezethet, ami sejtkárosodást indukál a májsejtekben [22].

A DON sejtszintű hatásai

A DON legfontosabb sejtszintű hatása a fehérjeszintézis gátlása, melyet a peptidil-transzferáz enzim megkötésén keresztül ér el. Ez bizonyítottan stresszválaszt indukál, és növekszik a mitogén aktivált fehérje kinázok (MAPK-k) jelenléte a riboszómák peptidil-transzferáz aktivitását befolyásoló riboszómális konformációs változások miatt. A ciklooxygenáz 2 (COX2) indukcióját követően a prosztaglandinszint is emelkedik [16]. A DON emellett képes felborítani az oxidatív homeosztázist reaktív oxigéngyökök (ROS-ok) termelődésének serkentésével. A ROS-ok a lipidmembránban lipidperoxidációs reakciót indíthatnak el, amely a sejtmembránt felépítő foszfolipidek és lipoproteinek roncsolását, valamint a DNS károsodását okozhatja. Ezenkívül a fokozott ROS termelődés kedvez különböző gyulladásos és apoptotikus folyamatoknak is [4].

Az NRF-2 fehérje jelentős szerepet tölt be az oxidatív homeosztázis fenntartásában azáltal, hogy számos gén transzkripcióját szabályozza, mint például a NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1 (NQO-1) és a hemoxigenáz-1 (HO-1). A DON által indukált májkárosodás elleni válaszreakcióban az NRF-2 nagyon fontos szerepet játszik antioxidáns hatása révén. Azonban a DON által kiváltott oxidatív stressz csökkentheti az NRF-2 antioxidáns és citoprotektív

hatását. Az NRF-2 hiánya fokozhatja a májsejtek károsodását, illetve a gyulladásos választ a reperfüziós sérülésekben [1].

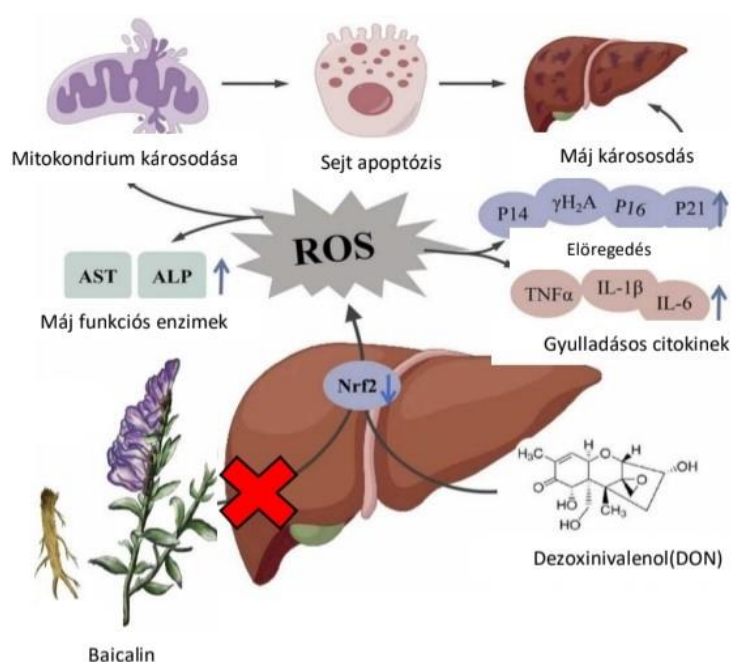
A 8-OHdG a DNS oxidációjának egyik fő terméke. A 8-OHdG az oxidatív stressz biomarkere lehet, mivel szintje emelkedhet, ha a túl sok keletkezett ROS oxidálja a sejtmagi vagy mitokondriális DNS-t. Mivel a DON a ROS serkentésén keresztül oxidatív stresszt és DNS károsodást indukálhat, hatására emelkedhet a 8-OHdG szintje [23].

Ezenkívül a DON negatív hatással lehet a mitokondrium működésére is azáltal, hogy megnyitja a permeabilis fehérjecsatornákat és megszünteti a mitokondrium membránpotenciálját. Kutatások bizonyították, hogy DON kitettség hatására növekedett a mitokondriális hasadási faktorok (dynamin-kapcsolt fehérje 1 [Drp1], mitokondriális hasadás 1 fehérje [Fis1], mitokondriális elongációs faktor 1[MIEF1]), illetve a mitofág faktorok koncentrációja is (Parkin-függő mitofág faktor-1 [PINK1], Parkin és a mikrotubulus-asszociált 1A/1B könnyűlánc 3A [LC3]). Továbbá, csökkentette a mitokondriális fúziós faktorok szintjét is (mitofusin-1 [Mfn1] és mitofusin-2 [Mfn2]). Ezen folyamatok következtében a mitokondrium működésének egyensúlya zavart szenved, illetve mitofágia is aktiválódhat [24]. Bekövetkezhet apoptózis is, amely egy aktív és szabályozott sejthalál folyamat. A szervezetben intracelluláris és extracelluláris serkentő faktorok aktiválják, és szigorú jelátviteli mechanizmusok szabályozzák. A mitokondrium az egyik legfontosabb sejtorganellum a sejtek energiatermelése és túlélése szempontjából, és a mitokondriális útvonal kulcsfontosságú az intracelluláris apoptózis jelkaskádájában. A mitokondriális útvonal által okozott apoptózist elsősorban a fehérjék, a gének és a mitokondriális membrán permeabilitásának változásai okozzák, melyekre a DON mind hatással van [25].

A DON magas koncentrációban képes tönkretenni a bélhámsejtek közötti kapcsolatokat. Ezt egy kutatás során is alátámasztották, melyben a DON-expozíció károsította az IPEC-J2 sejtek élettani morfológiáját. DON hatására LDH lépett ki a sejtekből, csökkent a sejtek közötti kapcsolatot fenntartó fehérjék expressziója, illetve a sejtek életképessége. Ezen folyamatok mind hozzájárulhatnak a bélhámréteg barrier sérüléséhez. Az LDH egy citoplazmatikus enzim, mely a sejtmembrán károsodásakor jut ki a sejtekből és aktivitása emelkedik a tápfolyadékban. A daganatos megbetegedések vizsgálata során is fontos szerepet játszik ez a biokémiai paraméter, mivel a sejt malignus transzformációjának is jelzője lehet. Újabb molekuláris biológiai módszerekkel kimutatták, hogy az LDH, mint intracelluláris enzim, érzékeny indikátora lehet a sejtek metabolikus állapotának, a glikolízis aerob, illetve anaerob irányának meghatározásához [26].

Baicalin

A baicalin és aglikonja, a baicalein, egy flavonoid vegyület, amelyet elsőként a bajkái csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) gyökeréből vontak ki. Antioxidáns, antimikrobiális, gyulladáscsökkentő, valamint rákellenes hatása miatt különböző betegségek kezelésére már régóta használják. A baicalin antioxidáns hatását többek között az NRF-2 útvonalon keresztül tudja kifejteni. A BAI aktiválja az NRF-2 jelátviteli mechanizmusát, ezáltal növelve különböző antioxidáns enzimek (HO-1, NQO-1) expresszióját. [27, 28]. Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a baicalin számos citokin és fehérje, többek között a tumor nekrosis faktor α (TNF- α), az immunglobulin E (IgE), az interleukin-6 (IL-6) és az interleukin-1 β (IL-1 β) szintjét csökkentheti. Ezzel mérsékelni tudja a gyulladás okozta károsodást, illetve a szöveti sérüléseket. Számos tudományos kutatás bizonyította, hogy a baicalin antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatása révén elősegítheti a neurális védőfaktorok expresszióját és a neurogenezist (2. ábra) [29][1, 30].



2. ábra: A baicalin antioxidáns befolyása a ROS negatív hatásaival szemben. Az aszpartát-aminotranszferáz (AST) és az alkalikus foszfatáz (ALP) szintjét a baicalin csökkenti, a nukleáris faktor eritroid-2-hez kapcsolódó faktor 2 (Nrf2) útvonalon keresztül gátolva a reaktív oxigéngyökök (ROS) felszabadulását. Ugyanezen útvonalon keresztül csökkenti a gyulladásos citokinek (tumor nekrosis faktor alfa [TNF α], interleukin-1 β [IL-1 β], interleukin-6 [IL-6]) szintjét, valamint mérsékli az apoptotikus markerek (P14, P16, P21 γ H2A) felszabadulását [1, 30.]

3D sejtenyésztés

Az *in vitro* kísérletek előnye az *in vivo* kísérletekkel szemben, hogy kevés állat felhasználásával is elvégezhetőek, a kísérleti körülmények az adott módszernek megfelelően standardok, jól kontrollálhatók, illetve a kezelésre adott válasz igen rövid időn belül tanulmányozható. Természetesen az *in vivo* kísérleteket nem helyettesítheti, mivel az élő szövethez képest ez egy leegyszerűsített rendszer, amelyben csak adott sejttípusokat és meghatározott jelátviteli útvonalakat lehet vizsgálni.

Az *in vitro* vizsgálatok legfontosabb lépése a megfelelő sejtmodell létrehozása. Napjainkban a kutatások legnagyobb hányada hagyományos kétdimenziós (2D) sejt kultúrákon folyik, azonban egyre jobban elterjedtek a különféle 3D módszerek. A 2D tenyészetek megjelenése nagyban hozzájárult számos sejtszintű biológiai folyamat megértéséhez, azonban nem képes pontosan utánozni azt a mikrokörnyezetet, ami a szövetekben jelen van. A 2D sejtenyészetekben a sejtek alakja lapos és megnyúlt, a növekedés csak síkban valósul meg. Ezzel szemben a 3D sejt kultúrákban a sejtek természetes alakja és növekedési iránya megmarad. A sejtek több rétegben, 3D aggregátumokban, ún. szferoidokban nőnek. A hagyományos módszerrel kialakított tenyészetekben minden egyes sejt ugyanolyan mértékben képes hozzájutni a különféle tápanyaghoz és növekedési faktorokhoz, így több sejt lesz a sejtciklus ugyanazon szakaszában. Ezzel szemben a 3D tenyészetekben a sejtek között a tápanyagok megoszlása eltérő, mivel a 3D struktúra belsejében elhelyezkedő sejtekhez kevesebb anyag juthat el, mint a külső rétegben lévőkhöz. Emellett a 3D sejt kultúrák már képesek az sejtek közötti és a sejt és extracelluláris mátrix (ECM) kapcsolatok megfelelő modellezésére. Mindezek miatt a 3D tenyészetek jobban tudják imitálni az *in vivo* környezetet, amely tulajdonság miatt pontosabb információt kaphatunk a sejtek közötti kölcsönhatásokról.

Nagy előre lépést jelentettek ezek a sejtenyésztési módszerek a gyógyszerfejlesztésben, az őssejt- és rákkutatásban, illetve az alap kutatásban. A gyógyszer kutatásban nagy szerepet tölt be a sejtek közötti kapcsolatok, illetve a sejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) közötti interakciók vizsgálata. Az ECM-ot a mátrixfehérjék, glikoproteinek, glikozaminoglikánok és proteoglikánok építik fel és megtalálhatóak benne növekedési faktorok, többek között a vaszkuláris endothél eredetű növekedési faktor (VEGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) illetve a hepatocita növekedési faktor (HGF), valamint egyéb fehérjék. Ezek a növekedési faktorok és fehérjék kulcsszerepet játszanak a sejtek proliferációjában, migrációjában, valamint a sejtek közötti adhéziók szabályozásában. Az ECM szerkezete, illetve

a sejtek közötti kapcsolatok befolyásolhatják a sejtek hatóanyagokra adott válaszát. Ez különböző úton mehet végbe; egyrészt megváltoztathatják a gyógyszer hatásmechanizmusát, másrészt felerősíthetik a gyógyszer hatékonyságát, illetve a sejtek rezisztencia affinitását a hatóanyaggal szemben [31].

A 3D sejt kultúrákban a sejteknek lehet támasza, azaz az ECM-ben növekednek, valamint kialakíthatóak támasz nélkül is. Az utóbbi eljárásnak 4 féle típusa van, attól függően, hogy a sejtek milyen módon rendeződnek össze. Az „anti-adhéziós” módszerrel meggátolják a sejtek összetapadását azáltal, hogy a sejteket bevonják egy sejt megkötő anyaggal, vagy pedig a táptalaj folyamatos áramoltatásával. Ilyen módszer lehet a statikus szuszpenziós sejtenyésztés, a rotációs kamrás sejtenyésztés, és a mágneses lebegtetéses módszer, mely mágneses részecskéket használ a sejtek aggregálására. [32]

A támaszos rendszerek kialakításához különféle bioanyagokat használnak fel. Ezek az anyagok 4 fő csoportra oszthatóak: polimer vázak, hidrogélek, decellularizált szöveti állványok és hibrid vázak (pl. mikrofluidikai eszközöket tartalmazó) [33].

Vizsgálatunk során mágneses 3D bioprinting módszerrel hoztunk létre 3D májsejt-nem parenchimális (NP) sejt ko-kultúrákat. Az NP sejtek nagyrészt makrofágokat foglalnak magukban, melyek jelenléte a gyulladásos és oxidatív válaszreakció modellezéséhez fontos. A 3D bioprinting módszer első lépéseként a sejteket magnetizálni kell mágneses nanorészecskékkal, melyek vas-oxidból, aranyból és poli-L-lizinből állnak. Ezek a nanorészecskék elektrosztatikusan kötődnek a sejtekhez a poli-L-lizinen keresztül, körülbelül 50 pg/sejt koncentrációban. Ezen nanorészecskék nem a teljes sejtmembránt vonják be, csupán elszórtan figyelhetők meg a sejtek felszínén, azonban ez a mennyiség már elegendő a sejtek megfelelő magnetizálásához. Ezek a magnetizált sejtek ezt követően mágneses térbe helyezve képesek aggregálódni és szferoidokat alakítani ki. Az alkalmazott nanorészecskék biokompatibilitása bizonyított, a sejtek életképességét, proliferációját és metabolizmusát nem befolyásolják [34].

Célkitűzés

Kutatásunk során a DON sejtkárosító, oxidatív folyamatokra gyakorolt, illetve a baicalin védő antioxidáns hatásását kívántuk vizsgálni csirke eredetű 3D májsejttenyészeteken. Célunk volt a sejtekben kialakult oxidatív stressz következményeinek vizsgálata, melyből következtethetünk az adott szervre és az egész szervezetre gyakorolt hatásra is. Továbbá pontosabb ismereteket szerettünk volna szerezni a baicalin sejtszintű hatásairól.

Kísérleteink során kétféle inkubációs időt terveztünk alkalmazni (24 h, 48 h) így vizsgálva az előzőekben említett vegyületek hatásait különböző koncentrációban, valamint kombinációban adagolva. E vizsgálatok során kívántunk adatokat nyerni arra vonatkozólag, hogy a DON és a baicalin milyen mértékben képesek befolyásolni egymás hatását.

Továbbá, kiemelt célunk volt az *in vivo* körülményekhez hasonló *in vitro* környezetet létrehozni, ezért terveztünk a vizsgálatunk során csirke eredetű 3D májsejt-NP sejt kultúrákat alkalmazni, melyeket mágneses 3D bioprinting módszerrel kívántunk kialakítani. Kutatásunk fő céljaként szerettünk volna alátámasztani a baicalin, mint potenciális takarmánykiegészítő alkalmazásának hatékonyságát a mikotoxinok okozta gazdasági károk mérséklése érdekében.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok, vegyszerek

A kísérlet során felhasznált vegyszereket, a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország) szereztük be, néhány később említésre kerülő anyag kivételével. Az állatokon folytatott kísérletek megfeleltek a nemzetközi és a hazai jogszabályoknak egyaránt. A beavatkozások a budapesti Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (MAB) és a Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztálya által is jóváhagyva történtek (Engedélyszám: ZAI/040/005227/2020).

Az oldatok előkészítése

A kísérletet megkezdése előtt elkészítettük a pufferoldatokat, amelyek a sejtizoláláshoz voltak szükségesek. Ezek az alábbiak voltak:

- 150 ml etilén-glikol-tetraacetát (EGTA) (0,5 mmol/l)-tartalmú Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)
- 150 ml EGTA-mentes HBSS
- 100 ml IV. típusú 1 mg/ml kollagenáz tartalmú oldat, kiegészítve 7 mmol/l MgCl_2 és 7 mmol/l CaCl_2 oldattal

Miután a HBSS törzsoldatot steril desztillált vízzel tízszeresére hígítottuk, és 4,7 ml 7,5%-os NaHCO_3 -t adtunk hozzá, (a nyert puffer oldat térfogata 1000 ml volt). Az EGTA-tartalmú HBSS előkészítéséhez 1,052 ml EGTA-t kevertünk 200 ml pufferoldathoz, így 0,5 mmol/l-es koncentrációt kaptunk. A kollagenáz tartalmú oldat előállításához 100 ml HBSS-t, 1 ml 7mmol/l koncentrációjú CaCl_2 oldatot, 1 ml 7mmol/l koncentrációjú MgCl_2 oldatot és 250 mg IV típusú kollagenázt kevertünk össze. A felhasználás előtt az oldatokat átbuborékolattuk 1 l/perc áramlási sebességű Carbogennel (5% CO_2 és 95% O_2). Mindezek mellett kiegészítettük a sejtek tápfolyadékául szolgáló Williams Medium E oldatot 50 mg/ml gentamicinnel, 0,22% NaHCO_3 -val, 2 mmol/l glutaminnal, 20 IU/l inzulinnal, és 4 $\mu\text{g/l}$ dexametazonnal, illetve a teljes mennyiség egyik feléhez 5% magzati szarvasmarha szérumot (fetal bovine serum – FBS) adtunk.

A sejtek izolálása

A májsejteket és a NP sejteket 6 hetes, hímvivarú Ross-308 típusú brojlercsirkéből (Gallus Kft., Devecser, Magyarország) izoláltuk, a kutatócsoportunk által már korábban kifejlesztett módon.[35] Az állat bódítása CO_2 -vel történt, ezután dekapitáltuk és hátfekvésben rögzítettük.

A ventrális területet a tollaktól megtisztítottuk, majd laparotómiát végeztünk. A máj megfelelő perfúziójához a *vena gastropancreaticoduodenalis*-t kanüláltuk, mely befolyó ágként szolgált, a jobb pitvarba pedig egy üvegkanült vezettünk be, hogy elvezessük a puffereket.

A perfúzió folyamán egy háromlépcsős rendszert alkalmaztunk. Az oldatokat 40°C-on tartottuk, és 30 ml/min áramlási sebességet állítottunk be. A kalcium és magnézium eltávolításához a májat először 150 ml 0,5 mmol/l koncentrációjú EGTA-tartalmú HBSS pufferoldattal mostuk át. Az EGTA egy kelátképző, így megkötí a magnézium- és kalciumionokat. Ennek következtében fellazulnak a sejtek közötti kapcsolatok, ami megkönnyíti a sejtek izolálását. A következő lépésben 150 ml EGTA-mentes HBSS oldattal öblítettük át a májat, hogy teljesen EGTA mentes legyen, mivel a következő alkalmazott oldat magnézium és kalcium tartalmú. Ezután átmostunk a szervet 100 ml kollagenázoldattal, amely a sejtek közötti ECM lebontásáért felelős. Egy steril tripszinező lombikban gyűjtöttük össze a kifolyó kollagenáz oldatot, és recirkuláltattuk, amíg a máj szerkezete fel nem lazult. Végül a szervet egy steril főzőpohárba tettük, melyet jégre helyeztünk, majd a további lépéseket steril környezetben végeztük el.

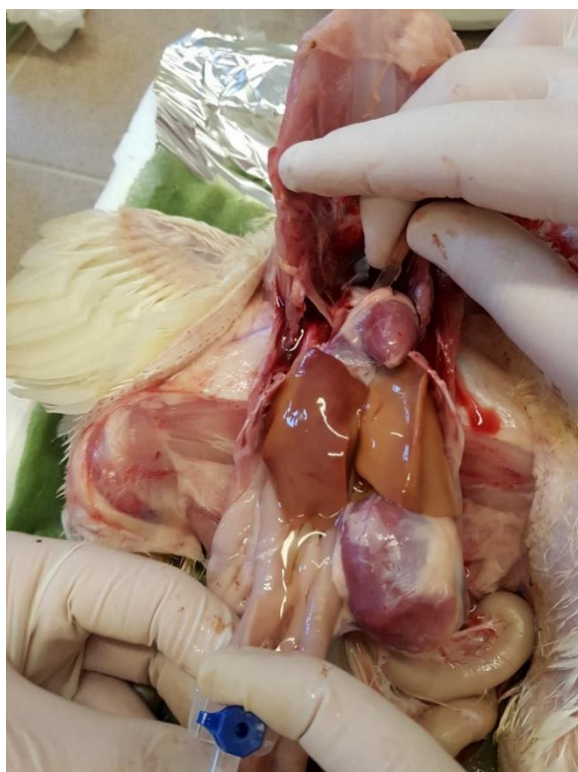
A Glisson-tokot eltávolítottuk, és a májat 50 ml szarvasmarha szérum albuminnal (bovine serum albumin – BSA) (2,5%) kiegészített 4 °C-os HBSS pufferbe raktuk. A BSA hozzájárul a sejtek szétválásához, illetve megakadályozza, hogy a már szétvált sejtek újból összekapcsolódjanak. Annak érdekében, hogy a szuszpenzióból eltávolítsuk az emésztetlen interstitiumot és a sejtaggregátumokat, átszűrtük három réteg steril gézen, majd 50 percig jégen inkubáltuk. Ezután háromlépcsős centrifugálással választottuk el a májsejteket az NP sejtektől. Elsőként BSA-tartalmú HBSS-ben alacsony fordulatszámon (100×g) 3 percig centrifugáltuk a szuszpenziót, majd az üledéket reszuszpendáltuk FBS-tartalmú Williams Medium E tápfolyadékban. Ezt követően még kétszer 3 percig 100×g-n centrifugáltuk a szuszpenziót, és az üledéket mindig újra reszuszpendáltuk. A centrifugálás során keletkezett felülúszót mindhárom lépés után steril centrifugacsőbe gyűjtöttük, ez tartalmazta a NP sejteket. Az utolsó centrifugálás során keletkezett, FBS-tartalmú Williams Medium E tápfolyadékban reszuszpendált üledék tartalmazta a májsejteket.

A teljes sejtszámot, illetve az életképes sejtek számát Bürker-kamrában, tripánkékes festéssel határoztuk meg. 200 µl tömény sejtsuszpenziót hígítottunk 800 µl Williams Medium E-vel. Ezek után a kapott szuszpenzió 200 µl-éhez tripánkék festéket adtunk azonos mennyiségben. Ezzel a módszerrel megkülönböztethetőek az élő és a már elpusztult sejtek, mivel a tripánkék csak azon sejtekbe képes bejutni, amelyek sejtmembránja elvesztette integritását, azaz kékre színezi a már elpusztult sejteket. Végül kiszámoltuk az élő és már elpusztult sejtek arányát,

amely eredmény 90% felett volt, tehát a szuszpenzió megfelelő volt a sejttenyészetek kialakítására. A szuszpenzió sejtszámát 10^6 sejt/ml koncentrációra állítottuk be.

Az NP sejtek elkülönítése során az előzőekben kapott felülúszót centrifugáltuk. Elsőként 10 percen keresztül $350\times g$ -n, majd 10 percen át $800\times g$ -n. A keletkezett felülúszót minden lépés után steril centrifugacsőbe öntöttük. Végül az eredményül kapott, NP sejtekben gazdag üledéket reszuspendáltuk 5 ml FBS-tartalmú Williams Medium E-ben.

Az összsejtszámot, valamint az életképes sejtek számát és arányát az NP sejteknél is az előzőekben leírt módon, Bürker-kamrában, tripánkékes festéssel állapítottuk meg. A végső koncentrációt Williams Medium E tápfolyadékkal 10^6 sejt/ml-re hígítottuk. Ezt követően 60 ml májsejt szuszpenziót hozzáadtunk 10 ml NP sejt szuszpenzióhoz, így hoztuk létre 70 ml ko-kultúra szuszpenziót, melyben a hepatocita :NP sejt arányt 6:1-re állítottuk be.



3. ábra: A vena gastropancreaticoduodenalis kanülálása a májsejtek izolálása során

A 3D sejttenyészetek kialakítása

A mágneses 3D sejtkultúrák előállításához szükséges összes berendezést és vegyszert a Greiner Bio-One Hungary Kft-től (Mosonmagyaróvár, Magyarország) szereztük be. 10 ml hepatocita-NP sejt ko-kultúra szuszpenzióhoz 1000 μ l mágneses nanorészecskéket (NanoShuttle™-PL) adtunk, így magnetizáltuk a sejteket. Ezek a nanorészecskék biokompatibilisek és nincsenek hatással a sejtek életképességére és proliferációjára. A sejteket ezután 96-lyukú sejttaszító

tenyésztőlemezekre raktuk le, és 37 °C-on inkubáltuk 1 órán át. Ez idő alatt a mágneses nanorészecskék kötődtek a sejtmembránhoz. Ezt követően úgynevezett Spheroid Drive-ra helyeztük a sejtenyésztő lemezt, melynek minden lyuka alatt található egy mágnes a Drive-on. A mágnesek a magnetizált sejteket középre vonzzák, melyek ott 3D struktúrákba rendeződnek. A lemezt 48 órán át 37°C-on inkubáltuk a Spheroid Drive-val. 24 óra elteltével tápfolyadékot cseréltünk szérummentes tápfolyadékra, amihez egy ún. Holding Drive-ot használtunk fel. Ezen Drive-on 4-4 lyuk között egy-egy nagyobb mágnes található, így ezek a lyukak peremére húzzák ki a szferoidokat, és a tápfolyadékcseréje alatt ott tartják őket. Miután letelt a 48 órás inkubációs idő a sejteket háromféle baicalin (5, 15 és 45 µg/ml) és kétféle DON koncentrációval (2 és 20 µg/ml) kezeltük, önmagukban vagy kombinációban, 24 és 48 órán keresztül (1. táblázat). Az inkubációs idők végén a tápfolyadékból mintát vettünk, majd 48 óra elteltével a sejteket 40 µl M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher SSC, Budapest, Magyarország) pufferben, Bandelin Sonopuls HD 2200 homogenizátorral (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Németország) végzett intermittáló szonikációval (1/mp) lizáltuk. A mintákat ezután -80°C-on tároltuk a további felhasználásig.

Csoport	DON koncentráció	BAI koncentráció
Kontroll	-	-
BAI5	-	5 µg/ml
BAI15	-	15 µg/ml
BAI45	-	45 µg/ml
DON2	2 µg/ml	-
DON20	20 µg/ml	-
DON2+BAI5	2 µg/ml	5 µg/ml
DON2+BAI15	2 µg/ml	15 µg/ml
DON2+BAI45	2 µg/ml	45 µg/ml
DON20+BAI5	20 µg/ml	5 µg/ml
DON20+BAI15	20 µg/ml	15 µg/ml
DON20+BAI45	20 µg/ml	45 µg/ml

1. táblázat. Az alkalmazott kezelési csoportok. BAI: baicalin, DON: dezoxinivalenol.

A sejtek életképességének mérése

Az inkubációs idők leteltével mértük a sejtek metabolikus aktivitásának mértékét, melyből a sejtek életképességére lehet következtetni. Ehhez egy kolorimetriás módszert, a Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, Egyesült Államok) tesztet alkalmaztuk. A CCK-8 reagens tartalmaz egy vízben oldható tetrazólium sót (Water Soluble

Tetrazolium Salt 8 – WST-8), melyet az életképes sejtek redukált koenzimjei képesek narancssárga formazánná alakítani. A kialakult szín erőssége spektrofotométerrel mérhető, és arányos a sejtek metabolikus aktivitásának mértékével. A mérés során a sejtek tápfolyadékából kimért 100 µl-hez 10 µl CCK-8 reagenst mértünk, és ezt 2 órán át, 37°C-on inkubáltuk. Az abszorbanciát Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével olvastuk le 450 nm-en.

LDH aktivitás mérése

Az LDH tápfolyadékban való megjelenése a sejtmembrán károsodását jelezheti. A mérés az LDH redukáló tulajdonságán alapul, ugyanis a NAD^+ -ot NADH-vá redukálja, amely képes egy hidrogén leadásával az eredetileg sárga színű jód-nitro-tetrazólium só (INT) piros színű INT-formazánná redukálni, mely szín intenzitása fotometriásan mérhető. A mérést 96-lyukú lemezen végeztük el. A mintákat úgy hígítottuk, hogy 50 µl legyen a végtérfog, ehhez a kithoz tartozó LDH Assay puffert használtuk. A hígított oldathoz 50 µl munkareagenst (48 µl LDH Assay puffer, 2 µl LDH Substrate Mix keveréke) adtunk, majd fénytől elzárva 37°C-on, 2-3 percig inkubáltuk a lemezt. Az abszorbancia értékeket 5 percenként 450 nm-en olvastuk le Multiskan GO 3.2 reader segítségével, és a mérést addig folytattuk, amíg a legaktívabb minta abszorbanciája el nem érte a legtöményebb standard értékét. Az LDH aktivitását ezt követően a gyártói protokollban megadott képlet alapján számoltuk ki.

Az oxidatív homeosztázis paramétereinek mérése

Kísérletünk során az oxidatív homeosztázis állapotát a NRF-2 és a 8-OHdG mennyiségének meghatározásával vizsgáltuk. Ezek koncentrációját csirkespecifikus szendvics ELISA (enzimhez kötött immunszorbens próba – enzyme-linked immunosorbent assay) tesztekkel (MyBioSource, San Diego, Egyesült Államok) mértük. Az ELISA egy antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló módszer, amely segítségével meg tudjuk mérni egy választott fehérje koncentrációját. Az antigén-antitest kötődést egy színreakció teszi láthatóvá, amelyet az antigénhez kötött enzim katalizál. Ezt a színváltozást fotometriás módszerrel lehet mérni. A szendvics ELISA módszer érzékenyebb a direkt ELISA tesztnél, hiszen itt a lemezt beborító és az elsődleges antitest egyféle antigén különböző epitópjait tudja azonosítani. Az eljárás során a lemez előre be van vonva ellenanyaggal, amely specifikus az általunk vizsgált antigénre, így képes megkötni azt. Az így stabilizált antigénhez egy biotinnal megjelölt antitest kötődik. Ehhez kapcsolódik egy enzimmel jelölt komplex. Utolsóként az enzim szubsztrátja kötődik a komplexhez, így jön létre a színváltozás, amit spektrofotometriásan mérhető. A kísérlet alatt a

mérés adott lépéseit a gyártó által előírt protokoll alapján végeztük. A méréshez egy a gyártó által antitesttel előre bevont 96-lyukú lemezt alkalmaztunk. A lemezt a mérések során 37°C-on inkubáltuk, valamint az adott lépések között mostuk, hogy eltávolítsuk a nem kötődött anyagokat.

Statisztika

A statisztikai adatelemzést R 3.5.3 szoftver (v4.3.1; R Core Team 2023) segítségével végeztük el. Az összes kezelési csoport $n=8$ mintát tartalmazott. Az eredményeink összehasonlítása során a csak DON-nal és csak baicalinnal kezelt sejtkultúra csoportokat a kezeletlen sejtekhez viszonyítottuk. A kombinációs csoportokat adott koncentrációjú DON-nal (2 $\mu\text{g/ml}$ vagy 20 $\mu\text{g/ml}$) kezelt csoportok eredményeivel vetettük össze. Az egyes csoportok közötti különbségeket egyszempontos varianciaanalízissel (one-way analysis of variance – ANOVA) határoztuk meg. A páronkénti összehasonlításhoz Dunnett *post hoc* próbát alkalmaztuk. A kapott eredményeket átlag $\pm$ standard hiba (standard error of the mean – SEM) értékeként értelmeztük. Az eltéréseket $p < 0,05$ értéktől szignifikánsnak tekintettük. Az eredmények statisztikai megjelenítéséhez Graphpad Prism 9.1.2. verziójú Windows szoftvert használtuk (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Saját munka

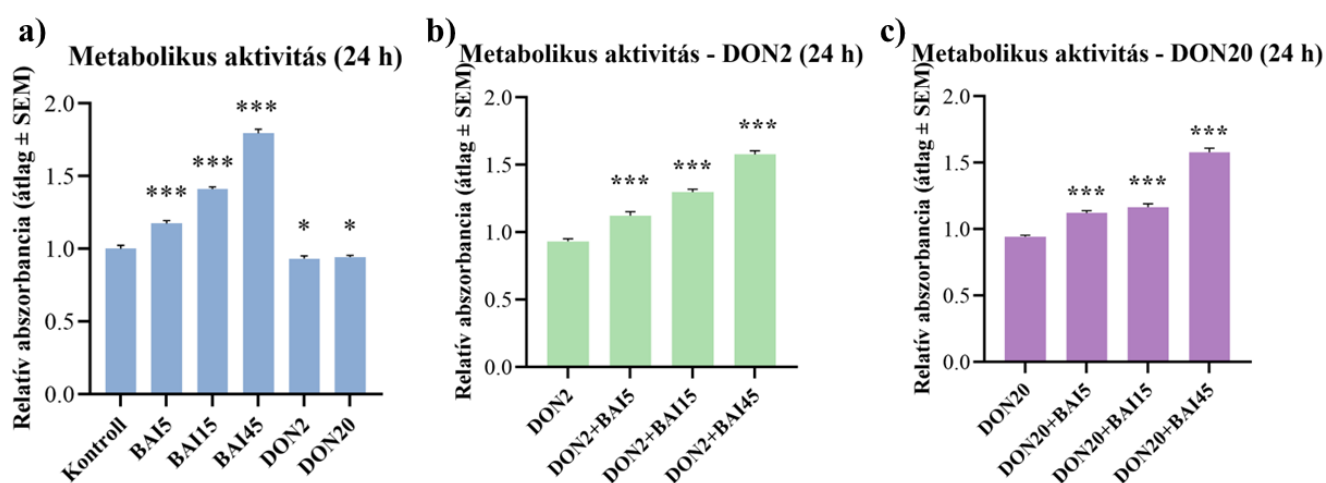
Dolgozatom készítése során segítettem a májsejtek izolálása és a sejtenyészetek kialakítása, illetve fenntartása során. Utóbbi során részt vettem a sejtek 24 órás tápfolyadékcseréjében, illetve a kezelésük idején is jelen voltam. A mérések közül az oxidatív paraméterek meghatározásában vettem részt. A 8-OHdG szintjének megállapításához szolgáló ELISA teszt elvégzésében segítettem, míg az NRF-2 mennyiségének meghatározását önállóan, témavezetőm felügyelete alatt végeztem el, szintén ELISA teszt segítségével. Továbbá a statisztikai elemzéseket követően az eredményeket szemléltető ábrákat Graphpad Prism 9.1.2. szoftverrel elkészítettem. Ezt követően a kísérlet során kapott eredményeket összevettem előzetes szakirodalmi adatokkal.

Eredmények

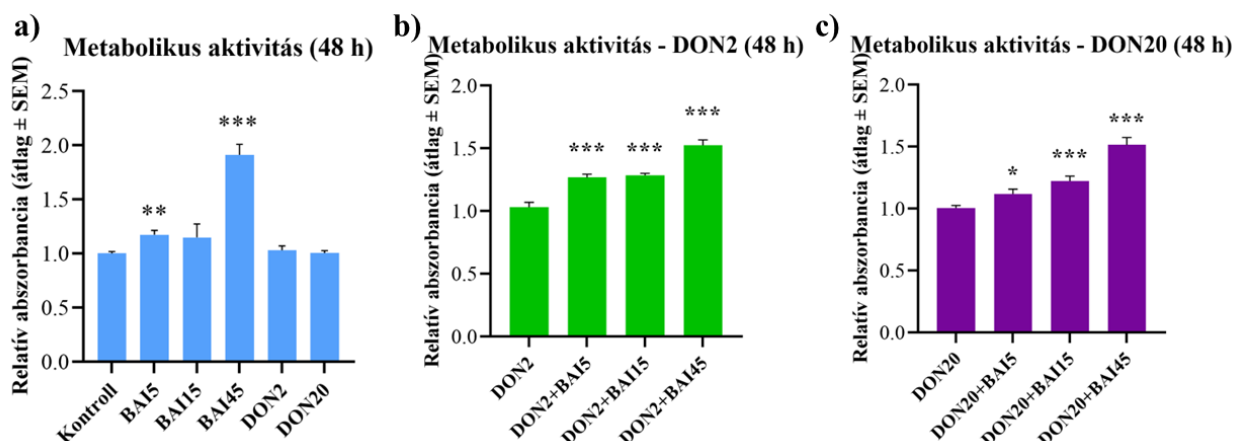
A sejtek metabolikus aktivitása

A sejtek metabolikus aktivitását, életképességét CCK-8 teszttel határoztuk meg. A baicalinnal kezelt tenyészetek életképessége a koncentráció emelésével arányosan növekedett (mindegyik esetben $p < 0,001$) a kontroll csoporthoz képest. Ezzel ellentétben a DON kezelés csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását ($p = 0,042$; $p = 0,044$) (3/a ábra). A 2 $\mu\text{g/ml}$ DON-nal kezelt sejt kultúrák esetében mindhárom alkalmazott baicalin koncentráció növelte (mindegyik esetben $p < 0,001$) a sejtek életképességét a csak DON-nal kezelt csoporthoz képest (3/b ábra). A 20 $\mu\text{g/ml}$ DON-nal történő kezelés mellett szintén mindhárom baicalin képes volt növelni (mindegyik esetben $p < 0,001$) a sejtek metabolikus aktivitását a kizárólag DON-nal kezelt sejtekhez viszonyítva (3/c ábra).

48 óra után az 5 és a 45 $\mu\text{g/ml}$ baicalin kezelés hatására növekedett a sejtek metabolikus aktivitása ($p = 0,001$; $p < 0,001$) (5/a ábra). Emellett mindhárom koncentrációjú baicalin kezelés növelte a sejtek életképességét 2 $\mu\text{g/ml}$ (mindegyik esetben $p < 0,001$) és 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,017$; $p < 0,001$; $p < 0,001$) DON-nal együttesen alkalmazva (5/b-c ábra).



4. ábra: A sejtek metabolikus aktivitása 24 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON és 5 $\mu\text{g/ml}$ BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON és 15 $\mu\text{g/ml}$ BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON és 45 $\mu\text{g/ml}$ BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON és 5 $\mu\text{g/ml}$ BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON és 15 $\mu\text{g/ml}$ BAI kezelés; DON20+DON45: 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DON és 45 $\mu\text{g/ml}$ BAI kezelés. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

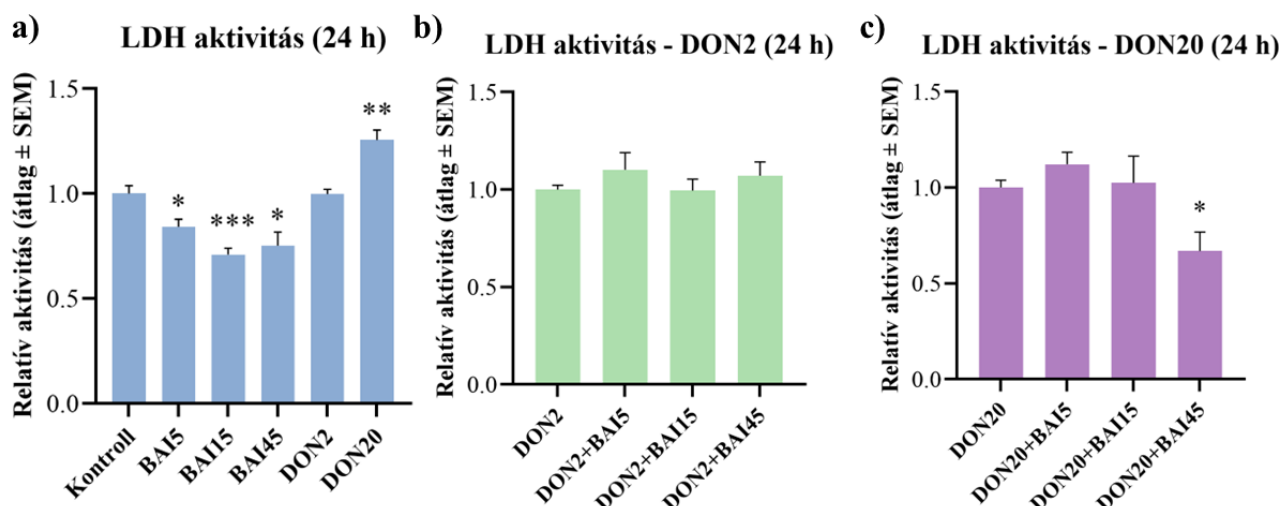


5. ábra: A sejtek metabolikus aktivitása 48 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

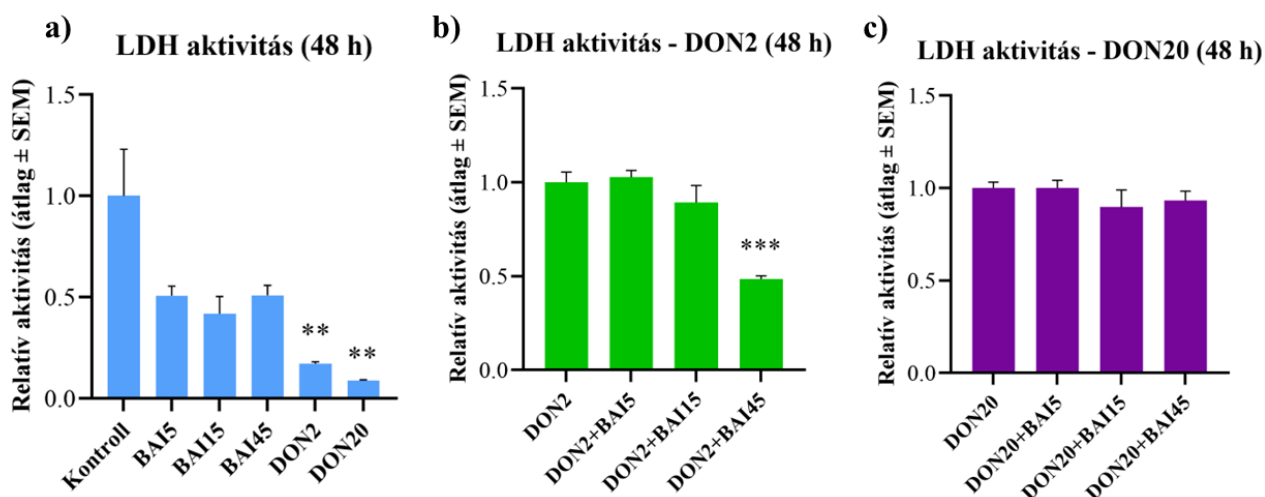
A sejtkárosodás mértékének vizsgálata

Az LDH enzim extracelluláris aktivitásának mértéke alapján határoztuk meg a sejtmembránok károsodását. 24 óra elteltével a baicalin kezelés hatására csökkenést tapasztaltunk az LDH aktivitásában ($p = 0,017$; $p < 0,001$; $p = 0,010$) a kontroll csoporthoz képest. A DON-nal való kezelések közül csak a 20 µg/ml DON kezelés esetében emelkedett az LDH aktivitása szignifikánsan ($p = 0,003$) a kontroll csoporthoz viszonyítva (6/a ábra). A 2 µg/ml DON-nal és ezzel kombinációban baicalinnal kezelt sejtek esetében nem volt megfigyelhető változás (6/b ábra). Azonban a 20 µg/ml DON-nal kombinált 45 µg/ml baicalin kezelés hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk ($p = 0,014$) a csak 20 µg/ml DON-nal kezelt csoporthoz képest (6/c ábra).

48 óra után mindkét alkalmazott DON koncentráció csökkentette ($p = 0,005$; $p = 0,003$) a sejtkárosodás mértékét a kontrollhoz képest (7/a ábra). A 2 µg/ml DON-nal kezelt sejtekben a 45 µg/ml baicalin hatására további LDH csökkenést ($p < 0,001$) tapasztaltunk (7/b ábra). A 20 µg/ml DON mellett alkalmazott baicalin hatására nem volt mérhető változás (7/c ábra).



6. ábra: Az LDH aktivitása 24 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

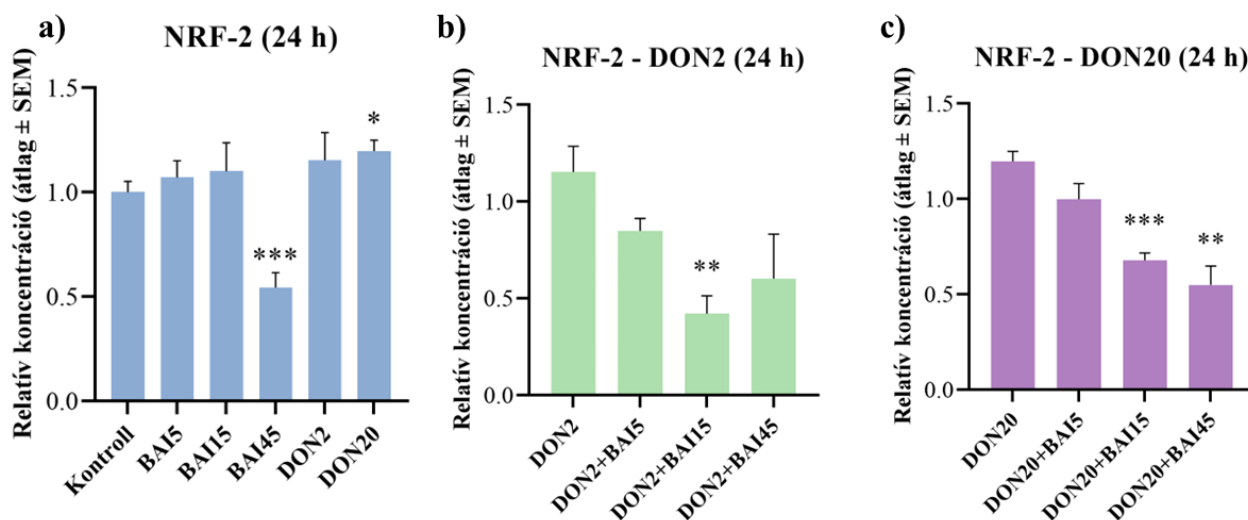


7. ábra: Az LDH aktivitása 48 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

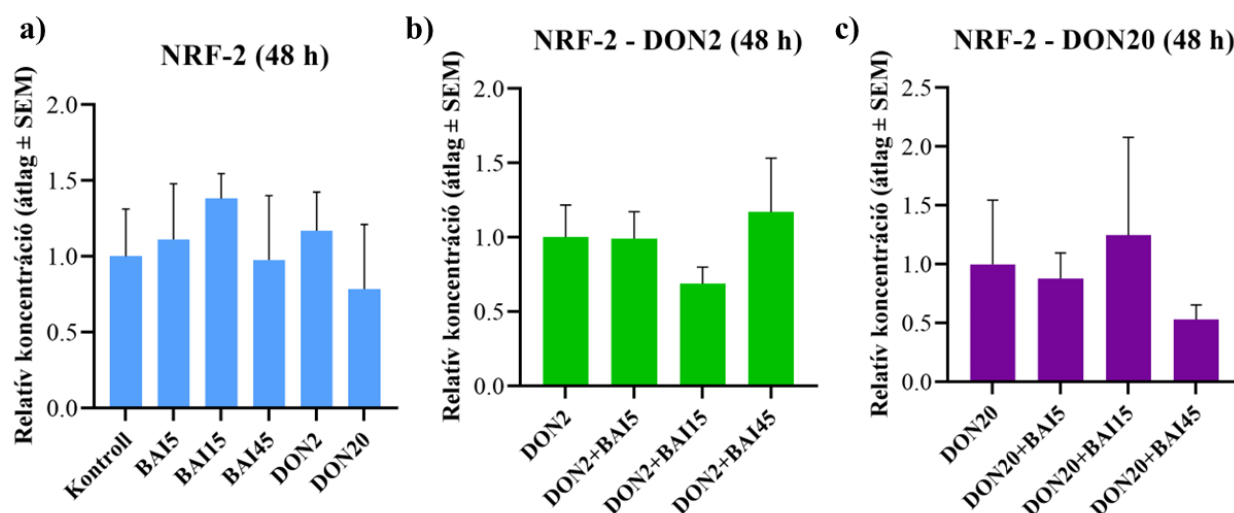
Az NRF-2 mennyisége

Az NRF-2 koncentrációját csirke-specifikus szendvics ELISA teszt segítségével határoztuk meg a sejtenyészetek tápfolyadékából. 24 óra után a 45 µg/ml baicalin hatására szignifikáns NRF-2 csökkenést ($p < 0,001$), míg a 20 µg/ml DON hatására növekedést ($p = 0,029$) tapasztaltunk (8/a ábra). A kombinációs kezelések során a 2 µg/ml DON-nal kezelt tenyészetekben a 15 µg/ml baicalin ($p = 0,007$) (8/b ábra), míg a 20 µg/ml DON-nal kezelt sejtekben a 15 és a 45 µg/ml baicalin csökkentette ($p < 0,001$; $p = 0,003$) az NRF-2 szintet (8/c ábra).

48 óra elteltével nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést egyik kezelés hatására sem (9/a-c ábra).



8. ábra: Az NRF-2 koncentrációja 24 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * < 0,05; ** < 0,01; *** $p < 0,001$.

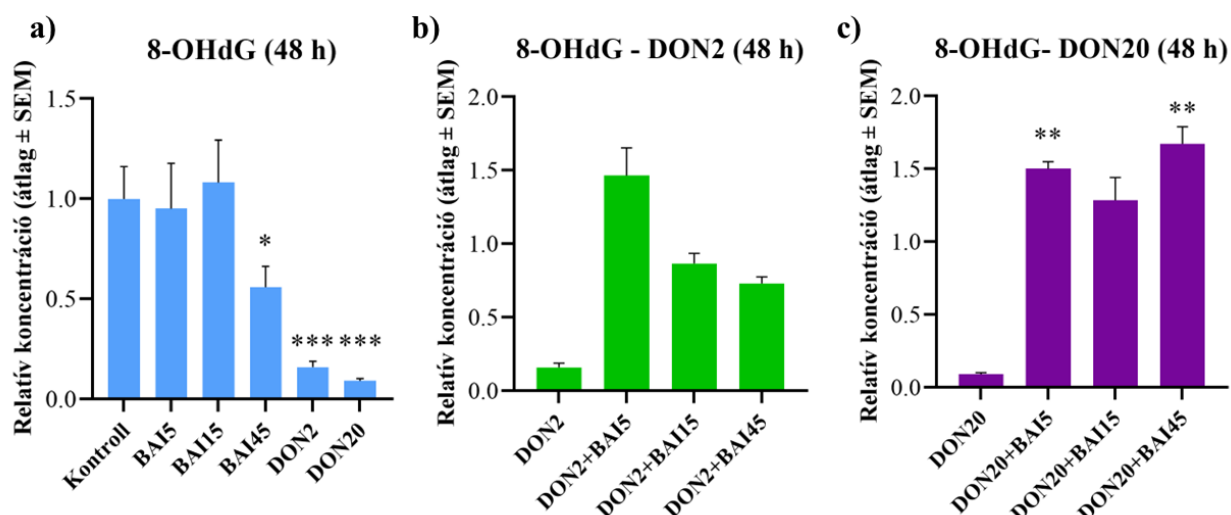


9. ábra: Az NRF-2 koncentrációja 48 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+BAI45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001.

A 8-OHdG mennyisége

Az 8-OHdG koncentrációját ez előző paraméterhez hasonlóan csirke-specifikus ELISA tesztel mértük a szferoidok lizátumából. 48 óra elteltével a kezeletlen sejtekhez képest csökkenést ($p = 0,049$) tapasztaltunk a 45 µg/ml baicalin hatására. Emellett mindkét DON és DON koncentráció csökkentette (mindkét esetben $p < 0,001$) a 8-OHdG mennyiségét (10/a ábra).

A 2 µg/ml DON-nal és baicalinnal kezelt sejtek esetében nem figyeltünk meg szignifikáns változást (10/b ábra). Azonban a 20 µg/ml DON20-al kezelt sejt kultúráknál az 5 és 45 µg/ml baicalin kezelés a 8-OHdG mennyiségének növekedését ($p = 0,005$; $p = 0,004$) okozta (10/c ábra).



10. ábra: Az 8-OHdG koncentrációja 48 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * < 0,05; ** < 0,01; *** $p < 0,001$.

Megbeszélés

A DON egy trichotechénvázas mikotoxin, amelyet a *Fusarium* gombafajok állítanak elő másodlagos anyagcseretermékként. A globális felmelegedés hatására az elmúlt évtizedben a takarmányokban egyre nagyobb mértékben fordul elő DON szennyezettség. Fő sejtszintű hatásai közé tartozik a ROS termelődés serkentése, mellyel az oxidatív homeosztázis felborulását és a sejtmembránok károsodását idézi elő, valamint gyulladásos folyamatokat indít el. Nagyobb koncentrációban, hosszú időn keresztül fogyasztott szennyezett takarmány olyan kórképeket idézhet elő, mint az étvágytalanság, a fejlődésben való elmaradás, a szaporodási képesség csökkenése és immunszupresszió, melynek következtében növekszik a különböző megbetegedésekre való fogékonyság is [5, 13].

A baicalin és aglikonja, a baicalein egy flavonoid, amely a bajkái csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) gyökerében található meg. Több tanulmány is foglalkozott a baicalin védő tulajdonságaival, és beszámoltak már antioxidáns, antimikrobiális, immunprotektív, gyulladáscsökkentő, valamint rákellenes hatásáról is [27].

A kísérletünkhöz szükséges májsejtkultúrákat mágneses 3D bioprinting módszerrel hoztuk létre. Az alkalmazott módszer során a sejteket mágneses nanorészecskékkal magnetizáltuk, melyek aranyból, vas-oxidból és poli-L-lizinből állnak. Ezek a részecskék kapcsolódtak a sejtek membránjához, melyek ezek után szferoidokba rendeződtek. A sejtenyészetekben a hepatociták és NP sejtek 6:1 arányban voltak jelen. A 3D tenyészetek jobban tudják imitálni az *in vivo* környezetet, mivel a sejtek több rétegben nőnek és kialakulnak a sejtek közötti és a sejt és extracelluláris mátrix (ECM) közötti kapcsolatok is, amely tulajdonságok révén pontosabb információt kaphatunk a sejtek közötti kölcsönhatásokról [31].

A DON és a baicalin életképességre gyakorolt hatását CCK-8 teszttel mértünk 24 és 48 óra kezelés után. A kontroll csoporthoz viszonyítva a DON-nal kezelt kultúrában szignifikáns csökkenést, míg mindhárom baicalin hatására szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. Emellett mindegyik DON kezelés mellett az összes baicalin növelni tudta a sejtek életképességét. Ezen eredményeink alapján elmondható, hogy a baicalin pozitív, míg a DON negatív hatással volt a sejtek életképességére [36, 37]. A DON fő hatását a fehérjeszintézis gátlásán keresztül fejtí ki, amellyel képes csökkenteni a sejtek katabolikus folyamatait, ezáltal energiahányos állapotot idéz elő [34]. Ez összhangban van korábbi eredményekkel, ahol a sejtek életképességét a DON dózisfüggő módon csökkentette, többek között szarvasmarha emlőhámsejtekben, malac idegsejtekben, csirke lép limfocitákban vagy csirkeembrió fibroblasztokban [38]. Ez a hatás azonban nem bizonyult citotoxikusnak, mivel a sejtek életképességének csökkenése átlagosan

10%-nál kisebb volt. Korábbi kísérleteinkben egy másik trichotecénvázas mikotoxint, a T-2-toxint vizsgáltuk ugyanezen sejt kultúra modellen, amely egy sokkal erőteljesebb csökkentő hatást fejtett ki a sejtek életképességére (átlagosan 25%), de ez sem számított citotoxikusnak [34, 36]. 48 óra után a baicalin továbbra is életképességet növelő hatást fejtett ki. Továbbá, a DON életképességet csökkentő hatása megszűnt, ami a májsejtek metabolikus adaptációjára utalhat. Ez azt jelenti, hogy a sejtek képesek voltak regenerálódni a hosszabb expozíció követően, ami előnyös, mivel javíthatja a sejtek reagálását különböző stresszorokra [39].

Az LDH aktivitása alapján a sejt károsodás mértékét vizsgáltuk. Az LDH egy citoplazmatikus enzim, amely a sejtmembrán károsodásakor kiszabadul a sejtekből és szintje emelkedik a tápfolyadékban. A 24 órás kezelés során a csak baicalinnal kezelt tenyészetek esetében az LDH koncentráció szignifikánsan csökkent, valamint a legmagasabb DON kezelés hatására emelkedett, mely növekedést azonban a legmagasabb baicalin mérsékelni tudott. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábbi eredményekkel, ahol a DON hatására emelkedett extracelluláris LDH aktivitása, míg a baicalin azt csökkentette. Liao és mtsai által végzett vizsgálatban a baicalin bélvédő hatását vizsgálták DON-kezelt malacokban. Ebben a kísérletben azt tapasztalták, hogy a DON-nal szennyezett takarmányt fogyasztó állatok szérum LDH aktivitása szignifikánsan megnövekedett, amit aztán a baicalin képes volt mérsékelni [40]. 48 óra elteltével azonban mindkét DON csökkentette az LDH enzim aktivitását, illetve az alacsonyabb DON-nal kezelt sejtekben a legmagasabb baicalin hatására további csökkenést tapasztaltunk. Ez arra utalhat, hogy 48 óra DON expozíció után beindultak a sejtekben bizonyos védőmechanizmusok, többek között az autofágia, amely során a károsodott sejtorganellek eltávolítása történik. Ezekkel a folyamatokkal a sejtek kompenzálják a kedvezőtlen hatásokat, és igyekeznek helyreállítani a homeosztázist [34, 36].

Az antioxidáns válaszban szerepet játszó NRF-2 mennyisége csökkent a legmagasabb baicalin koncentráció hatására, míg a magasabb DON hatására növekedett 24 órás inkubációt követően a kezeletlen sejtekhez képest. Ez arra utalhat, hogy a DON által kiváltott oxidatív stressz a sejtekben védekező folyamatokat indított be, ami az NRF-2 szintjének növekedését eredményezte. Ugyanakkor, a baicalin antioxidáns hatása érvényesült, és önmagában segítette az oxidatív homeosztázis fenntartását, ami az NRF-2 csökkenését eredményezte. Az alacsonyabb DON kezelésnél a közepes baicalin csökkentette az NRF-2 mennyiségét a tápfolyadékban, így az valószínűleg antioxidáns hatást fejtett ki a sejtekben. Érdekes módon azonban ezt a hatást nem tapasztaltuk a legmagasabb baicalinnal kezelt sejtek esetében. Erre az úgynevezett nem monoton dózis-válasz (NMDR) lehet a magyarázat. Az alaphipotézis szerint a dózisválaszok (DR) dózisfüggő monotonitást mutatnak. NMDR esetén azonban a DR görbe

iránya bizonyos dózisok hatására megváltozik, de az ehhez vezető konkrét feltételek még nem ismertek [41, 42]. Ugyanakkor, magasabb DON kezelés mellett a közepes és a legmagasabb baicalin koncentráció is csökkentő, tehát antioxidáns hatást fejtett ki. A DR ebben az esetben monotonitást mutatott. Ezzel szemben 48 óra inkubáció után az NRF-2 szintjében nem volt szignifikáns változás egyik kezelés hatására sem. Ez megfelel a fent említett hipotézisnek, miszerint sejtek alkalmazkodtak a kezelésekhöz és helyreállt a sejtek homeosztázisa.

A 8-OHdG a DNS oxidációjának egyik fő terméke, melyet kísérletünk során az oxidatív stressz biomarkereként vizsgáltunk 48 óra inkubációs idő után a sejtizátumból. A baicalin kezelés hatására csökkent a 8-OHdG szintje a kontroll csoporthoz képest, melyből arra következtethetünk, hogy a BAI antioxidáns hatása kifejeződött. Azonban a két különböző DON koncentrációval kezelt sejtenyészetekben szintén csökkent a 8-OHdG mennyisége. Ez arra utalhat, hogy a sejtekben aktiválódtak a fentebb említett különböző védelmi mechanizmusok [34, 36]. Emellett a magasabb DON-nal kezelt kultúráknál a legalacsonyabb és a legmagasabb baicalin növekedést okozott, azonban a közepes koncentrációjú baicalin nem. Ez az eredmény szintén magyarázható az NMDR elmélettel. A baicalin növelő hatása emellett esetlegesen utalhat a flavonoidok kettős, antioxidáns és prooxidáns tulajdonságára is [43]. A prooxidáns hatás miatt ezen vegyületek képesek oxidatív károsodást okozni a lipidekben, fehérjékben és a DNS-ben is. A flavonoidok prooxidáns tulajdonsága valószínűleg koncentráció- és szerkezetfüggő. Előzőekben leírták már, hogy a glikoziláció számos flavonoid *in vitro* antioxidáns aktivitását csökkentheti a megfelelő aglikonhoz képest [44]. A baicalin Jurkat sejtekben kifejtett citotoxikus hatását is leírták, melynek során serkentette a ROS-termelést, amely a mitokondriális útvonalon keresztül kaspáz-3 aktivációt és apoptózist indukált [43]. Továbbá, Yen és mtsai megfigyelték, hogy különböző flavonoid vegyületek koncentrációfüggő módon képesek voltak a DNS-ben szálszakadásokat indukálni [45]. Hasonló koncentrációfüggő prooxidáns és DNS-károsító hatásokat figyeltek meg patkánymáj-mikroszómákban és emberi leukocitákban is [46].

Eredményeink alapján elmondható, hogy a DON negatív hatással volt a sejtekre, csökkentette azok metabolikus aktivitását, károsította a sejtmembránokat, és oxidatív folyamatok beindulását idézte elő. Az előbb említett negatív hatásokat azonban a különböző baicalin koncentrációk képesek voltak mérsékelni. A hosszabb kitettség után a sejtekben valószínűleg beindultak különböző védekező mechanizmusok, melyekkel a sejtek igyekeztek visszaállítani homeosztázisukat. Emellett a hosszabb kezelési idő után a baicalin prooxidáns hatását is megfigyeltük. Mindezek alapján elmondható, hogy a baicalin megfelelő koncentrációban

alkalmas lehet, mint potenciális takarmánykiegészítő a mikotoxinokkal szembeni védekezés során. Azonban ennek alátámasztásához további *in vivo* vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás

A mikotoxinok a gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek közül kiemelten fontos a *Fusarium* fajok által termelt dezoxinivalenol (DON). Elfogyasztása koncentrációtól, illetve időtől függően citotoxicitással, immuntoxicitással és a reprodukciós képesség csökkenésével járhat. Ezen káros hatások megelőzése céljából fontos olyan vegyületek vizsgálata, amelyek képesek mérsékelni a toxinnal szennyezett takarmány elfogyasztása után jelentkező tüneteket. Ilyen vegyület lehet a baicalin (BAI), mely a *Scutellaria baicalensis* gyökerében található meg. TDK munkám során a DON oxidatív folyamatokra gyakorolt, illetve a BAI védő hatásását vizsgáltuk csirke eredetű 3D májsejttenyészeteken. A sejteket két DON (2 és 20 µg/ml= DON2 és DON20), három BAI (5, 15 és 45 µg/ml=BAI5, BAI15 és BAI45) koncentrációval kezeltük 24 és 48 órán keresztül. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 módszerrel, a sejtkárosodás mértékét pedig a laktát-dehidrogenáz (LDH)-extracelluláris aktivitásának mérésével határoztuk meg, amely eredményekből a sejtek életképességére lehet következtetni. A nukleáris faktor eritroid-2-hez kapcsolódó faktor 2 (NRF-2) és a 8-hidroxi-dezoxi-guanozin (8-OHdG) mennyiségének mérésével pedig az oxidatív homeosztázis állapotát vizsgáltuk.

24 óra után a sejtek életképessége növekedett a kontrollhoz képest a BAI, illetve a kombinációs kezeléseket követően is, míg a DON a sejtek életképességének csökkenését eredményezte. 48 óra elteltével a BAI5 és a BAI45 hatására életképesség növekedést tapasztaltunk, illetve mindhárom koncentrációjú BAI kezelés DON-nal együttesen alkalmazva növelte a sejtek életképességét. A 24 órás inkubáció során a BAI kezelések csökkentették az LDH aktivitást, míg a DON20 növelte azt, mely növekedést a BAI45 mérsékelte. 48 óra után azonban mindkét alkalmazott DON koncentráció csökkentette az LDH enzim aktivitását, illetve a DON2-vel kezelt sejtekben a BAI45 hatására további csökkenést tapasztaltunk. Az NRF-2 szintje 24 óra elteltével a BAI45 hatására csökkent, míg a DON20 kezelés hatására növekedett. Továbbá, a DON2-vel kezelt tenyészetekben a BAI15, míg a DON20-al kezelt sejtekben a BAI15 és a BAI45 csökkentette az NRF-2 szintet. A 8-OHdG mennyisége 48 óra után mindkét DON koncentráció hatására csökkent, míg a BAI45 kezelés növekedést eredményezett. Emellett a DON20-al kezelt kultúráknál a BAI5 és a BAI45 a 8-OHdG mennyiségének növekedését okozta.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a DON csökkentette a sejtek életképességét, de ez a hatás nem volt citotoxikus, és a BAI hozzáadása képes volt ezt a csökkenést mérsékelni. A DON negatív hatását a sejtek oxidatív állapotának befolyásolásán keresztül fejtette ki, mellyel szemben a BAI antioxidáns tulajdonsága érvényesült, azonban a 48 órás inkubációt követően a

BAI esetében prooxidáns hatást is tapasztaltunk. Emellett eredményeink alapján feltételezzük, a hosszabb kitettséget követően a sejtekben védekező útvonalak aktiválódtak a homeosztázis fenntartása érdekében.

Summary

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi, of which deoxynivalenol (DON) produced by several *Fusarium* species is of particular importance. Depending on the concentration and time of consumption, they can cause cytotoxicity, immunotoxicity, and reproductive impairment. To prevent these harmful effects, it is important to investigate compounds that can reduce the symptoms after ingestion of feed contaminated with this toxin. One such compound is baicalin (BAI), a compound found in the roots of *Scutellaria baicalensis*.

This study investigated the effects of DON and the protective activity of BAI on oxidative processes in 3D liver cell cultures of chicken origin. Cells were treated with two concentrations of DON (2 and 20 µg/ml= DON2 and DON20), three concentrations of BAI (5, 15 and 45 µg/ml=BAI5, BAI15 és BAI45), and the combinations of these concentrations (DON+BAI) for 24 and 48 hours. The metabolic activity of the cells was determined by CCK-8 method, and the cell damage was evaluated by measuring the extracellular activity of the lactate dehydrogenase (LDH), which results indicate the viability of cells. The status of oxidative homeostasis was assessed by measuring the amount of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF-2) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG).

After 24 h, cell viability was increased by all applied BAI concentrations and by the combination treatments, whereas the two types of DON treatment resulted in a decrease. After 48 hours, an increase was observed in the case of the BAI5 and BAI45, and all three BAI when used in combination with DON. During the 24 h incubation, BAI treatments reduced the LDH activity, while the DON20 increased it, which was moderated by the BAI45. In contrast, after 48 h both DON concentrations lowered the LDH activity, and a further decrease was observed in cells treated with the DON2 combined with BAI45. After 24 h, NRF-2 levels were reduced by the BAI45 and increased in response to DON20. Furthermore, in cultures treated with DON2, BAI15 reduced NRF-2 levels, whereas in cells treated with DON20, BAI15 and BAI45 treatments decreased its amount. The levels of 8-OHdG was decreased after 48 h by both DON concentrations, while they were increased by BAI45. In addition, in the cultures treated with DON20 combined BAI5 and BAI45, also an increase was observed.

These results suggest that DON reduced cellular viability, but this effect was not cytotoxic and could be mitigated by BAI. DON exerted its negative effects by affecting the oxidative state of the cells, against which the antioxidant property of BAI was dominated. However, after 48 h of incubation, a prooxidant effect of the BAI was also observed. Moreover, it is likely that after

prolonged exposure, protective pathways in cells were activated to maintain the cellular homeostasis.

Irodalom jegyzék

1. Ma R, Fan Y, Yang X, Liu C, Wan J, Xu C, Wang R, Feng J, Jiao Z (2024) Detoxification of DON-induced hepatotoxicity in mice by cold atmospheric plasma. *Ecotoxicol Environ Saf* 280:116547. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116547>
2. Hou S, Ma J, Cheng Y, Wang H, Sun J, Yan Y (2023) The toxicity mechanisms of DON to humans and animals and potential biological treatment strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 63:790–812. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1954598>
3. Panisson JC, Wellington MO, Bosompem MA, Nagl V, Schwartz-Zimmermann HE, Columbus DA (2023) Urinary and Serum Concentration of Deoxynivalenol (DON) and DON Metabolites as an Indicator of DON Contamination in Swine Diets. *Toxins* 15:120. <https://doi.org/10.3390/toxins15020120>
4. Ren Z, He H, Zuo Z, Xu Z, Wei Z, Deng J (2020) ROS: Trichothecenes' handy weapon? *Food Chem Toxicol* 142:111438. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111438>
5. Awad W, Ghareeb K, Böhm J, Zentek J (2013) The Toxicological Impacts of the Fusarium Mycotoxin, Deoxynivalenol, in Poultry Flocks with Special Reference to Immunotoxicity. *Toxins* 5:912–925. <https://doi.org/10.3390/toxins5050912>
6. Kang R, Li R, Dai P, Li Z, Li Y, Li C (2019) Deoxynivalenol induced apoptosis and inflammation of IPEC-J2 cells by promoting ROS production. *Environ Pollut* 251:689–698. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.026>
7. Ma L, Wu F, Shao Q, Chen G, Xu L, Lu F (2021) Baicalin Alleviates Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Nephropathy via Nrf2 and MAPK Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther* 15:3207–3221. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S319260>
8. Chen Y, Kistler HC, Ma Z (2019) *Fusarium graminearum* Trichothecene Mycotoxins: Biosynthesis, Regulation, and Management. *Annu Rev Phytopathol* 57:15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100318>
9. Ejaz MR, Jaoua S, Ahmadi M, Shabani F (2023) An examination of how climate change could affect the future spread of *Fusarium* spp. around the world, using correlative models to model the changes. *Environ Technol Innov* 31:103177. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103177>
10. Wu Q, Dohnal V, Kuca K, Yuan Z (2013) Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. *Curr Drug Metab* 14:641–660. <https://doi.org/10.2174/1389200211314060002>
11. Pomothy J, Barna RF, Czimmermann ÁE, Szóládi Á, Pásztiné Gere E (2020) A deoxinivalenol mikotoxin toxikus hatásai a gazdasági haszonállatokra. *Magy Állatorvosok Lapja* 142:117–127
12. McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ (2011) Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* 3:802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>

13. Feizollahi E, Roopesh MS (2022) Mechanisms of deoxynivalenol (DON) degradation during different treatments: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 62:5903–5924. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1895056>
14. Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, Fantini J (2002) The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J Nutr* 132:2723–2731. <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2723>
15. Pestka JJ, Smolinski AT (2005) Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. *J Toxicol Environ Health Part B* 8:39–69. <https://doi.org/10.1080/10937400590889458>
16. Awad W, Ghareeb K, Böhm J, Zentek J (2013) The Toxicological Impacts of the Fusarium Mycotoxin, Deoxynivalenol, in Poultry Flocks with Special Reference to Immunotoxicity. *Toxins* 5:912–925. <https://doi.org/10.3390/toxins5050912>
17. Sergeant T, Parys M, Garsou S, Pussemier L, Schneider Y-J, Larondelle Y (2006) Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol Lett* 164:167–176. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.12.006>
18. Robert H, Payros D, Pinton P, Théodorou V, Mercier-Bonin M, Oswald IP (2017) Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 20:249–275. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1326071>
19. Peng Z, Chen L, Xiao J, Zhou X, Nüssler AK, Liu L, Liu J, Yang W (2017) Review of mechanisms of deoxynivalenol-induced anorexia: The role of gut microbiota. *J Appl Toxicol JAT* 37:1021–1029. <https://doi.org/10.1002/jat.3475>
20. Wan ML-Y, Woo C-SJ, Allen KJ, Turner PC, El-Nezami H (2013) Modulation of Porcine β -Defensins 1 and 2 upon Individual and Combined Fusarium Toxin Exposure in a Swine Jejunal Epithelial Cell Line. *Appl Environ Microbiol* 79:2225–2232. <https://doi.org/10.1128/AEM.03277-12>
21. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EMM (2013) Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil* 25:4–15. <https://doi.org/10.1111/nmo.12046>
22. Feng Y, Shen J, Lin Z, Chen Z, Zhou M, Ma X (2024) PXR Activation Relieves Deoxynivalenol-Induced Liver Oxidative Stress Via Malat1 LncRNA m6A Demethylation. *Adv Sci* 11:2308742. <https://doi.org/10.1002/adv.202308742>
23. Omari Shekaftik S, Nasirzadeh N (2021) 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative DNA damage induced by occupational exposure to nanomaterials: a systematic review. *Nanotoxicology* 15:850–864. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1936254>
24. Zhang C, Zhang K-F, Chen F-J, Chen Y-H, Yang X, Cai Z-H, Jiang Y-B, Wang X-B, Zhang G-P, Wang F-Y (2022) Deoxynivalenol triggers porcine intestinal tight junction disorder: Insights from mitochondrial dynamics and mitophagy. *Ecotoxicol Environ Saf* 248:114291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114291>

25. Cao L, Jiang Y, Zhu L, Xu W, Chu X, Zhang Y, Rahman SU, Feng S, Li Y, Wu J, Wang X (2021) Deoxynivalenol Induces Caspase-8-Mediated Apoptosis through the Mitochondrial Pathway in Hippocampal Nerve Cells of Piglet. *Toxins* 13:. <https://doi.org/10.3390/toxins13020073>
26. Jurisic V, Radenkovic S, Konjevic G (2015) The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* 867:115–124. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_8
27. Balkrishna A, Sinha S, Kumar A, Arya V, Gautam AK, Kuca K, Amarowicz R (2023) Sepsis-mediated renal dysfunction: Pathophysiology, biomarkers and role of phytoconstituents in its management. *Biomed Pharmacother* 165:115183. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115183>
28. Baicalin-Copper Complex Modulates Gut Microbiota, Inflammatory Responses, and Hormone Secretion in DON-Challenged Piglets. <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/9/1535>. Accessed 4 Oct 2024
29. Ma L, Wu F, Shao Q, Chen G, Xu L, Lu F (2021) Baicalin Alleviates Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Nephropathy via Nrf2 and MAPK Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther* 15:3207–3221. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S319260>
30. Wang R, Wang C, Lu L, Yuan F, He F (2024) Baicalin and baicalein in modulating tumor microenvironment for cancer treatment: A comprehensive review with future perspectives. *Pharmacol Res* 199:107032. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.107032>
31. Jensen C, Teng Y (2020) Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci* 7:33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>
32. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models - SLAS Discovery. [https://slas-discovery.org/article/S2472-5552\(23\)00028-X/fulltext](https://slas-discovery.org/article/S2472-5552(23)00028-X/fulltext). Accessed 4 Oct 2024
33. Abuwatfa WH, Pitt WG, Hussein GA (2024) Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *J Biomed Sci* 31:7. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y>
34. Vörösházi J, Mackei M, Sebők C, Tráj P, Márton RA, Horváth DG, Huber K, Neogrády Z, Mátis G (2024) Investigation of the effects of T-2 toxin in chicken-derived three-dimensional hepatic cell cultures. *Sci Rep* 14:1195. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51689-1>
35. Effects of Acute Heat Stress on a Newly Established Chicken Hepatocyte—Nonparenchymal Cell Co-Culture Model. <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/3/409>. Accessed 5 Oct 2024
36. Mackei M, Orbán K, Molnár A, Pál L, Dublec K, Husvéth F, Neogrády Z, Mátis G (2020) Cellular Effects of T-2 Toxin on Primary Hepatic Cell Culture Models of Chickens. *Toxins* 12:46. <https://doi.org/10.3390/toxins12010046>
37. Gao W, Xu B, Zhang Y, Liu S, Duan Z, Chen Y, Zhang X (2022) Baicalin Attenuates Oxidative Stress in a Tissue-Engineered Liver Model of NAFLD by Scavenging Reactive Oxygen Species. *Nutrients* 14:541. <https://doi.org/10.3390/nu14030541>

38. Wang J, Jin Y, Wu S, Yu H, Zhao Y, Fang H, Shen J, Zhou C, Fu Y, Li R, Wang R, Wang J, Zheng K, Fan Q, Chen B, Zhang J (2019) Deoxynivalenol induces oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. *J Anim Physiol Anim Nutr* 103:1663–1674. <https://doi.org/10.1111/jpn.13180>
39. Williams GM, Iatropoulos MJ (2002) Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol* 30:41–53. <https://doi.org/10.1080/01926230252824699>
40. Liao P, Li Y, Li M, Chen X, Yuan D, Tang M, Xu K (2020) 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 Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 140:111326. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111326>
41. C V, A B, L B, Bgh B, Pe B, M B, L DW-B, A F, A H, S L-K, W S, G W, J Z, C B, C R (2018) Evaluating the evidence for non-monotonic dose-response relationships: A systematic literature review and (re-)analysis of in vivo toxicity data in the area of food safety. *Toxicol Appl Pharmacol* 339:. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.11.018>
42. Birnbaum LS (2012) Environmental Chemicals: Evaluating Low-Dose Effects. *Environ Health Perspect* 120:a143–a144. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205179>
43. Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J (2002) Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol* 38:781–791. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00115-8](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00115-8)
44. D P, I B, N W (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
45. Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L, Huang S-L (2003) Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1215–1222. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1215>
46. Lc W, Jc K, Ej M, Jj B (2008) Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 22:. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.09.002>

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Vörösházi Júlia PhD hallgatónak, aki gyors válaszaival és remek tanácsaival sokat segített, hogy a dolgozat létrejöjjön.

Hálás vagyok Dr.Mátis Gábor egyetemi docens úrnak és Dr Neogrády Zsuzsanna egyetemi docens asszonynak, hogy szakmai tudásukkal és tapasztalatukkal hozzájárultak munkámhoz.

Nem utolsó sorban, köszönettel tartozom édesanyámnak és páromnak, hogy töretlenül támogatottak és motiváltak az elmúlt időszakban.