

AFLATOXIN B1 ÉS SZTERIGMATOCISZTIN BRCA2, RAD51 ÉS XPA DNS JAVÍTÓ GÉNEKRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA BROJLERCSIRKÉBEN

Szabó Rubina Tünde¹ – Vlaskality Sára Dóra¹ – Kovács-Weber Mária¹ – Balogh Krisztián² – Erdélyi Márta² – Mézes Miklós² – Kovács Balázs³

¹Állattenyésztés-technológiai és Állatjólléti Tanszék, Állattenyésztési Tudományok Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.

²Takarmánybiztonsági Tanszék, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

³Molekuláris Ökológia Tanszék, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
szabo.rubina.tunde@uni-mate.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Célunk volt felmérni az aflatoxin B1 és az előanyagának tekintett szterigmatocisztin RAD51, BRCA2, és XPA DNS javító gének expressziójára gyakorolt hatását. A brojlercsirkéket 4 csoportba osztottuk: kontroll, aflatoxin B1 mikotoxinnal (AFLATOXIN, 149,1 µg/kg), szterigmatocisztinnel (STER, 1590 µg/kg) és ultratiszta szterigmatocisztinnel szennyezett (USTER, 1570,5 µg/kg) csoportokba. A 1., 2., 3., 7. és 14. napokon történt mintavétel májból. Szignifikáns génexpressziós növekedés a RAD51 gén esetében az 1., 3. és 7. napon következett be a kezelt csoportokban, a BRCA2 gén esetében 1. és a 7. napon, míg az XPA génnél csak a 3. napon. A 14. napon minden esetben génexpressziós csökkenést detektáltunk. Összességében elmondható, hogy az aflatoxin B1, illetve előanyaga (természetes és mesterséges formában is) jelentősen képes befolyásolni a vizsgálatba vont DNS javító gének kifejeződését brojlercsirkében.

Kulcsszavak: Brojlercsirke, DNS javítás, aflatoxin B1, szterigmatocisztin

Bevezetés, irodalmi áttekintés

Az aflatoxinok természetes karcinogének közé tartoznak (Rushing és Selim, 2019; Udomkun et al., 2017). Az aflatoxinok csoportján belül pedig az aflatoxin B1 rendelkezik a legerősebb karcinogén hatással és mindemellett a nagy mennyiségben fordul elő élelmiszereinkben. Az aflatoxin expozíció legjellemzőbben májdegenerációt eredményez használatuk szervezeteiben. Különböző állatfajok azonban különböző ellenállóképességgel bírnak az aflatoxinok való kitettséggel szemben. A baromfifélék sem mutatnak egységes képet mikotoxinokkal szembeni érzékenység esetén, tyúk faj kevésbé érzékeny a víziszárnyasokhoz viszonyítva (Baliey et al., 1988). Brojler csirkében végzett *in vitro* kísérlet során az aflatoxin B1 1, 10 és 20 ng/ml koncentrációja megnövelte a DNS szálak töredezettségének mértékét a kontrollhoz képest. Majd a kísérlet további részében 72 óra után a DNS-károsodás több mint 100%-kal nőtt az aflatoxin B1-vel kezelt limfocitákban a kontroll csoporthoz képest (Zimmermann et al., 2015). Az aflatoxin B1 a májban metabolizálódik a P450 enzimrendszer révén, a végső karcinogén aflatoxin B1-8,9-epoxiddá (AFBO), amelynek két izomerje van, az endo-8,9-epoxid és exo-8,9-epoxid. Az aflatoxin-exo-epoxid és a DNS reakcióképessége legalább 1000-szer nagyobb, mint az endo-izomeré (Bedard és Massey, 2006). Ezt a metabolikus átalakulást

a májban elsősorban a citokróm P450 enzimesalád 3A4 és 1A2 tagja (CYP3A4 és CYP1A2) végzi. A DNS-sel reagálva az AFBO kovalensen kötődik az N7 pozícióhoz, AFB1-N7-guanin adduktot képezve ezzel. Az aflatoxin-N7-guanin képződés guanin-timin transzverziókat eredményez, ami az aflatoxin B1 által leggyakrabban megfigyelt mutáció. A szterigmatocisztin az aflatoxin B1 prekursorának tekinthető, tehát jelentős egyezést mutatnak kémiai felépítésükben. Ám toxicitás szempontjában attól eltér. A szterigmatocisztin többek között hepatotoxicitással, hepatokarcinogén hatással és immunotoxicitással rendelkezik (Gao et al., 2015). A szterigmatocisztin kettős szálú DNS-töréseket indukálhat, így tehát DNS károsodást válthat ki (Nieto et al., 2018). A szterigmatocisztin első fázisú metabolitja elősegíti az N7-guanil DNS adduktok képződését. Valószínű, hogy a genotoxicitása eme DNS-adduktumok képződésén alapul, melyek ki nem javításuk esetén növelik a mutáció rögzülésének valószínűségét (Viegas et al., 2020). Megfigyelték emellett, hogy a szterigmatocisztin szignifikánsan növeli az intracelluláris ROS szintet (Cooke et al., 2003).

A mikotoxinok képesek növelni a szabadgyökök szintjét a szervezetben. A szabadgyökök, azaz a reaktív oxigén túltermelése pedig oxidatív stresszt eredményezhet. Ez végül DNS károsodáshoz vezethet, illetve akár bekövetkezhet a DNS javító (repair) folyamatok gátlása vagy nem megfelelő működése is (García-Medina et al., 2013). Sokféle módon, sokféle behatásra (pl.: öregedés, xenobiotikumok) következhet be DNS károsodás. Ezen hibák kiküszöbölésére hozta létre a szervezet a DNS károsítást elhárító mechanizmusokat, a DNS javító géneket. Azonban, ha károsodás magában a DNS repair génekben következik be, a hibák kijavítása elmaradhat, ami további negatív folyamatokhoz, szélsőséges esetben akár sejthalálhoz vezethet.

A RAD51 gént a kettős szálú DNS-törések helyrehozásának összefüggésében tanulmányozták. Két fő út segítségével lehet javítani ezen töréseket: nem homológ végcsatlakozással (NHEJ), amely magában foglalja a DNS-végek közvetlen ligálását a törés lezárására, és a homológ rekombináció (HR) segítségével. A HR egy homológ szekvenciát használ a DNS-szintézis templátjaként a törött DNS helyettesítésére, amely lehetővé teszi a törés hibamentes javítását. A homológ rekombináció fontos eleme a RAD51 rekombináz, mely a genomi stabilitás egyik fő őrzőjének tekinthető (Wassing és Esashi, 2020). A Xeroderma pigmentosum A komplementációs csoport (XPA) esszenciális fehérje a nukleotid kivágó javításban (NER), amely az egyik fő DNS javító útvonal. Kapcsolatban áll a többi NER fehérje komponenssel és kötődik a DNS-hez is. A BRCA2 számos funkciót lát el a sejt életében, közvetlenül képes kapcsolódni az egyszálú, illetve kétszálú DNS-hez is. Szerepe van a kettős szálú DNS javításában, a DNS replikációjában, mivel a RAD51 stabilizálását végzi a replikációs villa védelmében (Hu et al., 2020).

Ismereteink szerint a fent felsorolt gének közül egyiket sem vizsgálták *Gallus gallus* faj esetében. Így munkánk során célunk volt a RAD51, a BRCA2 és az XPA gének expressziójának vizsgálata aflatoxin B1, illetve szterigmatocisztin kitettség esetében.

Anyag és módszer

Kísérleti elrendezés, kísérleti állatok és mintavétel

Az aflatoxin B1-et (AFLATOXIN) izolált *Astergillus flavus* törzs segítségével termeltettük kukoricában. A szterigmatocisztint (STER) pedig izolált *Aspergillus creber* 2663 törzs alkalmazásával termeltettük. Az ultratiszta szterigmatocisztint (USTER) vásároltuk (Romer Labs Diagnostic). Az USTER-t feloldottuk abszolút etanolban, majd

ilyen formában permeteztük a takarmányra. Az AFLA és a STER szennyezettség szintjének visszaellenőrzése folyadékkromatográfiás módszerrel történt. A dózisok meghatározása során figyelembe vettük az aflatoxin B1 tízszeres hatáskülönbségét a szterigmatocisztinhez képest. Ennek fényében a következő csoportok kerültek beállításra: 149,1 μg testtömeg kg^{-1} aflatoxin B1, 1590 μg testtömeg kg^{-1} szterigmatocisztin és 1570,5 μg testtömeg kg^{-1} ultratiszta szterigmatocisztin.

A hím Cobb 540 naposcsibék 26 °C-os hőmérsékletű, mélyalmos ólban kerültek elhelyezésre, ahol *ad libitum* állt rendelkezésükre takarmány és víz. Egészen a 21. életnapig mikotoxin mentes takarmányozásban részesültek (Vitafort Zrt., nevelő takarmánykeverék).

A májmintákat *post mortem* vettük az első, második, harmadik, hetedik és tizennegyedik napok alkalmával, csoportonként 6 egyedből. 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük a mintákat, folyékony nitrogénben mélyhűtöttük, majd -80 °C-on tároltuk a mintákat felhasználásig.

RNS izolálás, cDNS írás, qPCR vizsgálat

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

A vizsgálat során a RAD51, a BRCA2 és a XPA célgéneket határoztuk meg (1. táblázat). Endogén referenciagénként, az UB gént használtuk (De Boever et al., 2008). Csoportonként a hat csirke máj mintát három technikai ismétléssel vizsgáltunk. A PCR reakciókat tiszta PCR csövekben hajtottuk végre a StepOnePlus™ Real Time PCR rendszerrel (Thermo Fisher Scientific, San Jose), a StepOne™ / StepOnePlus™ szoftver segítségével. A kvantitatív valós idejű PCR reakcióhoz 40 ng templát cDNS-t, 5x Hot FirePol® EvaGreen® qPCR Supermix-et (Solis BioDyne, Észtország) és 6,6 pM/ μl primereket használtunk 10 μl végtérfogatban. Ezenkívül használtunk templátot nem tartalmazó kontrollt, minden mérés alkalmával. A kiválasztott PCR profil alapján, a kezdeti inkubációs hőmérséklet 12 percen keresztül tartó 95 °C volt. Ezt egy negyvenszer ismétlődő ciklus követte, ami RAD51, BRCA2 és XPA esetében 10 másodpercig 94 °C-t, 20 másodpercig 59 °C-t, majd 30 másodpercen keresztül tartó 72 °C -t jelentett. UB esetében azonban 10 másodpercig 94 °C-t, 20 másodpercig 61 °C-t, végül 30 másodpercig 72 °C-t alkalmaztunk. Olvadási görbe analízis és gélelektroforézis segítségével ellenőriztük a kapott termékeket. StepOne™/StepOnePlus™ szoftver segítségével határoztuk meg a célgének és a referencia kontroll gén Ct értékeit. A relatív kvantifikációt a Pfaffl módszerrel számítottuk ki (PFAFFL, 2001).

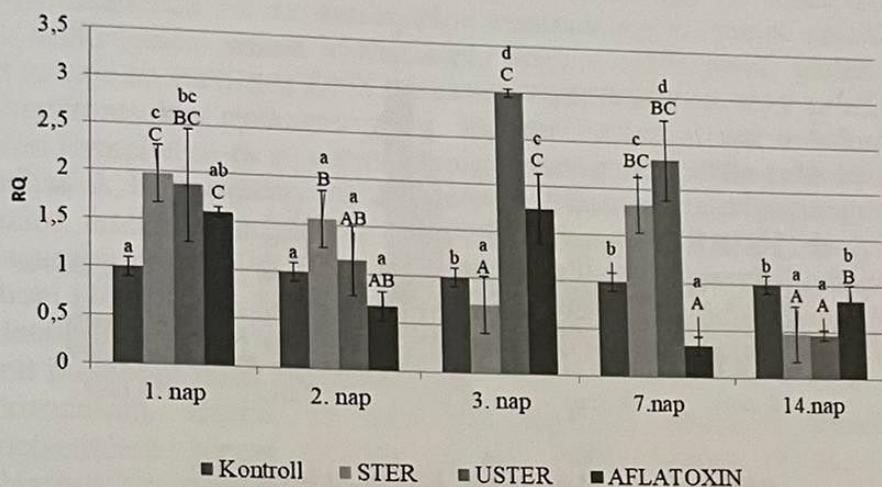
A StepOne™/StepOnePlus™ szoftverrel meghatározott Ct értékeket Microsoft Excel programban rögzítettük. Az egytényezős varianciaanalízist (ANOVA), illetve a Tukey-féle utótesztet az R statisztikai program által készítettük el az előfeltételek teljesülése mellett (R Core Team, 2013). A szignifikáns szintként $p \leq 0,05$ volt meghatározva.

1. táblázat: A felhasznált primerek szekvenciái

Primer	Forward szekvencia 5'-3'	Reverz szekvencia 5'-3'
RAD51	TTTGGTGTGGCTGTTGTGAT	CAGGAAGGCAAGGAGAGTCA
BRCA	TCTTATCAGCCACCATGTGC	GACTGCCACTGAAGGTTGCT
XPA	AGGGAACCGGTGCTTAGATT	TTGCAAGGATTCCTCATTCC
UB	GGGATGCAGATCTTCGTGAAA	CTTGCCAGCAAAGATCAACCTT

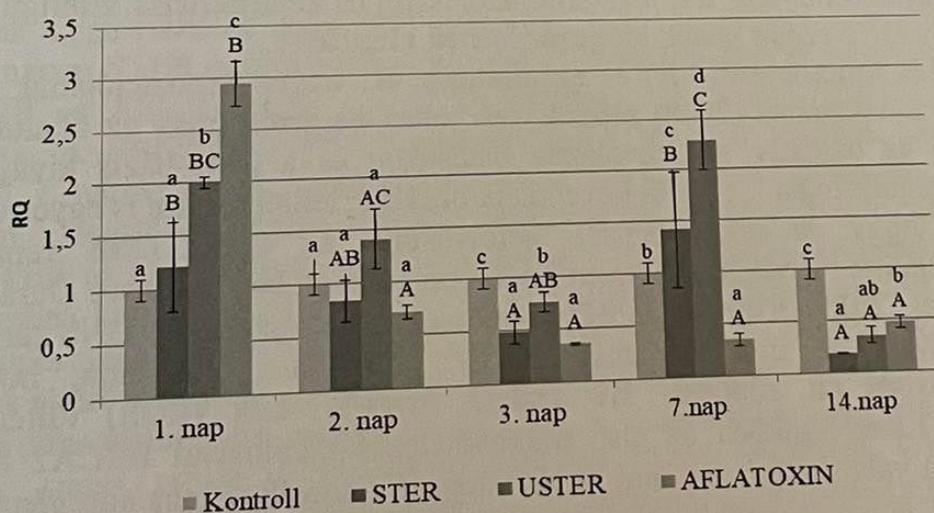
Eredmények és megvitatásuk

Az első napon a RAD51 gén esetében (1. ábra) a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan nőtt a STER és az USTER csoportok expressziója. Az AFLATOXIN csoport csak a STER csoporttól tért el szignifikánsan. A BRCA2 gén (2. ábra) kifejeződése szignifikáns módon megnövekedett az USTER, illetve az AFLATOXIN csoportokban a kontrollhoz képest. Mindhárom kezelt csoport egymástól szignifikánsan is eltért. A BRCA génhez hasonlóan, az XPA esetében (3. ábra) is az USTER és az AFLATOXIN csoportok tértek el szignifikánsan a kontroll értéktől, a STER csoporttól is eltértek statisztikailag igazolható mértékben. A második mintavételezés alkalmával minhárom vizsgált célgén valamennyi csoportja közel azonos eredményt mutatott, szignifikánsan nem volt kimutatható különbség a kontroll csoport expressziójának mértékétől. A harmadik napi mintavételezés során RAD51 gén esetében az AFLATOXIN és az USTER csoportok értékei szignifikáns mértékben emelkedtek a kontrollhoz képest, ezzel ellentétesen a STER csoport génexpressziója szignifikánsan csökkent. Valamint a különböző toxinnal kezelt csoportok között is szignifikáns eltéréseket mértünk. A BRCA2 gén expressziója minden esetben szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollhoz viszonyítva. Illetve jelentős volt az eltérés az USTER és STER, illetve az AFLATOXIN és USTER csoportok összehasonlításában. A RAD51 génhez hasonlóan, az XPA esetében is az USTER és AFLATOXIN csoportok mutattak szignifikáns növekedést, illetve szintén szignifikáns különbséget tapasztaltunk a három kezelt csoport között. A hetedik napon a RAD51 és a BRCA2 génkifejeződése során egyaránt szignifikáns emelkedést tapasztaltunk STER és USTER kezelésekre hatására, míg az AFLATOXIN csoportban ezzel ellentétesen szignifikáns csökkenést detektáltunk a kontrollhoz viszonyítva. Valamint mindkét célgén esetében valamennyi vizsgált csoport között jelentős különbségeket észleltünk. Az XPA gén expressziója STER és USTER expozíció hatására kontrollhoz közeli értéket mutatott. Azonban az előző két génhez hasonlóan az AFLATOXIN csoport génexpressziója szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. A 14. napi mintavételezés eredményei minden esetben kontroll alatti génkifejeződést produkáltak. A RAD51 kifejeződése során azonban az AFLATOXIN csoport expressziójának kontrollhoz viszonyított csökkenése nem volt szignifikáns mértékű. Ezzel ellentétben az AFLATOXIN csoport az USTER és STER csoporttal történő összehasonlítása során szignifikáns eltéréseket írhatók le. BRCA2 és XPA esetében minden esetben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kontroll értékhez viszonyítva. Valamint az AFLATOXIN és USTER összehasonlításának kivételével minden csoport eredményei között szignifikáns különbséget figyeltünk meg.



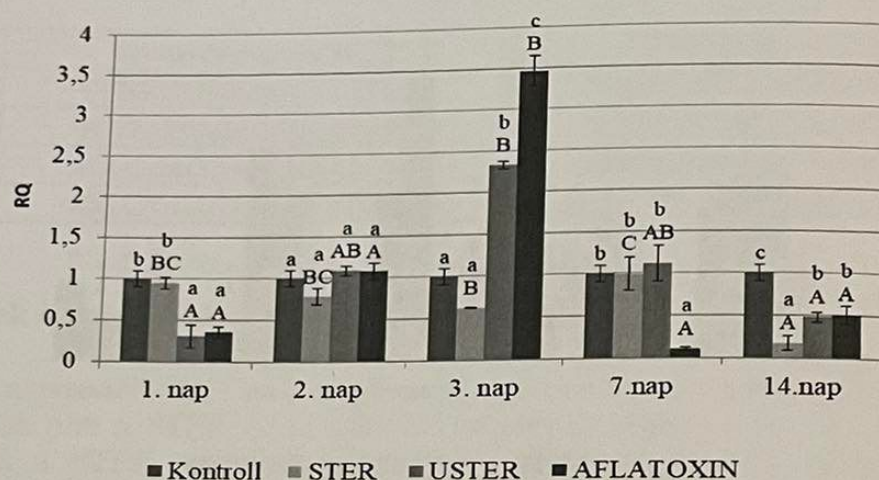
1. ábra: A RAD51 gén expressziós értékei a kontroll és a kezelt csoportokban az adott mintavételi időpontokban

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



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

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



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

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

Következtetések és javaslatok

Kapott eredmények által levonható a következtetés, hogy mindegyik általunk vizsgált mikotoxin, így az aflatoxin B1, a szterigmatocisztin és az ultratiszta szterigmatocisztin hatással volt a DNS repair gének kifejeződésének mértékére.

Az MC-LR (microcystin-LR) és az aflatoxin B1 közös expozíciójának vizsgálata során Liu és munkatársai (2018) először számoltak be arról, hogy az általuk kiváltott genotoxicitás az oxidatív stressz okozta hatásokon és a DNS-bázis kivágási javító géneinek deregulációján keresztül következik be. Kísérletünkben mi is egyértelműen azt tapasztaltuk, hogy az aflatoxin B1 befolyásolja az egyes DNS repair gének génexpressziójának mértékét. Ahogyan az a szakirodalomban található (Juránek et al., 2013; Gao et al., 2015), a túl magas ROS szint oxidatív stresszhez és DNS károsodáshoz vezethet. Kövesi és munkatársainak (2018) vizsgálata kimutatta, hogy ponty hepatopancreasban az aflatoxin B1 szabad oxigéngyökök (ROS) túltermelődését eredményezi. Kísérletünkben az első mintavételezés alkalmával BRCA2 és RAD51 gének esetében valamennyi toxinnal kezelt csoport kontrollt meghaladó génexpressziót produkált. Az általunk kapott kiugróan magas génexpressziós eredmények szintén utalhatnak arra, hogy a vizsgált toxinok nagy valószínűséggel DNS károsodásokat eredményeztek, melynek kiküszöbölésére aktiválódott a szervezet javító mechanizmusa. Az 1. nap XPA gén esetében a kontrollhoz képest kisebb génexpressziós értékeket tapasztalhattunk mindegyik csoport esetében. Ehhez hasonlóan Balogh és munkatársai (2019) a glutation szintetáz és a glutation reduktáz alulexpresszált állapotát figyelték meg csirkemáj vizsgálatakor azonos aflatoxin B1, illetve szterigmatocisztin dózis mellett. Vizsgálatunkban a 7. napon az AFLATOXIN csoportok mindegyike, valamint a 14. napon már valamennyi toxinnal kezelt csoport génexpressziós vizsgálata során kontroll

alatti értéket kaptunk, mindhárom vizsgált génben. Balogh és társai (2019) hasonló tendenciákról számoltak be az antioxidáns rendszer egyes génei esetében. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a DNS javító gének alacsonyabb expressziós szintje az esetleges DNS károsodás csökkenésével vagy az adott mikotoxin javító mechanizmusokra gyakorolt gátló, károsító hatásával van-e összefüggésben. A természetesen termeltetett és az ultratisztaságú szterigmatocisztin hatásának összevetése után elmondhatjuk, hogy néhány eset kivételével, a tisztított szterigmatocisztin magasabb génexpressziós értékeket produkált. A STER csoport a RAD51 és XPA génekben mutatott magasabb expressziót az 1. napon, illetve a RAD51 génnél a 2. napon. BALOGH és munkatársai (2019) az 1. és 14. napon hasonló eltéréseket találtak a glutation redukáz gén vizsgálatakor, ami a természetes úton előállított szterigmatocisztin esetében a nem beazonosított metabolitokkal magyarázható.

A szakirodalom szerint az aflatoxin legalább tízszeres toxicitása bír, a szterigmatocisztinhez képest (Reddy et al., 1985; Viegas et al., 2020). Ennek megvizsgálásához tízszeres dózist alkalmaztunk a szterigmatocisztinnel kezelt csoportok esetében, az AFLATOXIN csoport mennyiségéhez viszonyítva. A 14 napos kísérletet követően döntően azt tapasztaltuk, hogy az USTER csoportok igen hasonló tendenciákat ír le az AFLATOXIN csoportokhoz képest. Ez által arra következtethetünk, hogy az ultratisztaságú szterigmatocisztin eléri a tízszer kisebb hatást az aflatoxin B1 toxinhoz képest, ám a természetesen előállított szterigmatocisztin ennél is kisebb toxikus hatással bír az általunk vizsgált DNS javító gének kifejeződésére.

Az általunk vizsgált repair gének egyes mintavételezési időpontokban viszonylag összezsengő trendet mutattak génkifejeződésükben. Az első nap mintavételezése is sok hasonlóságot mutatott, RAD51 és BRCA2 gének esetében egyaránt minden csoportban magasabb génexpressziót mértünk a kontroll csoportnál. Ezzel teljesen ellentétes trend mutatkozott az XPA expressziójában. A második napon a kezelt csoportok nem különböztek szignifikánsan a kontroll csoporttól vagy egymástól, egyik gén esetében sem. A 3. napon STER hatására minden génben alulexpresszált állapotot tapasztaltunk, míg USTER és AFLATOXIN expozíció következtében nőtt a RAD51 és az XPA kifejeződése. A BRCA2 esetében az utóbbi két csoport is kontroll alatti értékeket mutatott. A 7. napon kapott eredmények szintén nagyon hasonló tendenciát mutattak. Mindhárom vizsgált célgénben kontroll közeli vagy azt meghaladó génexpressziót mértünk STER és USTER hatására. Azonban az AFLATOXIN csoportok expressziója minden esetben kontroll értéket múlta alul. A 14. napon viszont minden csoportban a kontroll csoportnál alacsonyabb génkifejeződést tapasztaltunk. Az általunk vizsgált DNS javító gének eltérő funkció ellenére is hasonló génkifejeződéssel rendelkeztek, kivételt csak az 1. napi mintavételezés során, az XPA gén és a 3. napi BRCA1 gén jelentett. További vizsgálatok során egyéb DNS javító géneket volna érdemes vizsgálni, hogy feltérképezzünk egyéb DNS javító útvonalakon működő repair gének mechanizmusait mikotoxin kitettség hatására.

Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését a EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Irodalomjegyzék

- Bailey G.S. – Williams D.E. – Wilcox J.S. – Loveland P.M. – Coulombe R.A. – Hendricks J.D.: 1988. Aflatoxin B1 carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish, *Carcinogenesis*, 9(11): 1919–1926.
- Balogh K. – Kövesi B. – Zándoki E. – Kulcsár Sz. – Ancsin Zs. – Erdélyi M. – Dobolyi Cs. – Bata-Vidács I. – Inotai K. – Szekeres A. – Mézes M. – Kukolya J.: 2019. Effect of Sterigmatocystin or Aflatoxin Contaminated Feed on Lipid Peroxidation and Glutathione Redox System and Expression of Glutathione Redox System Regulatory Genes in Broiler Chicken, *Antioxidants*, 8(7): 201 p.
- Bedard L.L. – Massey T.E.: 2006. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair, *Cancer Letters*, 241(2): 174–183.
- Cooke M.S. – Evans M.D. – Dizdaroglu M. – Lunec J.: 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *Faseb*, 17(10): 1195–1214.
- De Boever S. – Vangestel C. – De Backer P. – Croubels S. – Sys S.U.: 2008. Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122: 312–317.
- Gao W. – Jiang L. – Ge L. – Chen M. – Geng C. – Yang G. – Li Q. – Ji F. – Yan Q. – Zou Y. – Zhong L. – Liu X.: 2015. Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage, *Toxicology in Vitro*, 29(1): 1–7.
- García-Medina S. – Núñez-Betancourt J.A. – García-Medina A.L. – Galar-Martínez M. – Neri-Cruz N. – Islas-Flores H. – Gómez-Oliván L.M.: 2013. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminium levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96: 191–197.
- Hu K.L. – Wang S. – Ye X. – Zhang D.: 2020. Effects of BRCA gene mutation on female reproductive potential: A systematic review, *Maturitas*, 137: 11–17.
- Juránek I. – Nikitovic D. – Kouretas D. – Hayes A. W. – Tsatsakis A.M.: 2013. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 61: 240–247.
- Kövesi B. – Pelyhe Cs. – Zándoki E. – Mézes M. – Balogh K.: 2018. Changes of lipid peroxidation and glutathione redox system, and expression of glutathione peroxidase regulatory genes as effect of short-term aflatoxin B1 exposure in common carp, *Toxicon*, 144: 103–108.
- Liu W. – Wang L. – Zheng C. – Liu L. – Wang J. – Li D. – Tan Y. – Zhao X. – He L. – Shu W.: 2018. Microcystin-LR increases genotoxicity induced by aflatoxin B1 through oxidative stress and DNA base excision repair genes in human hepatic cell lines, *Environment Pollution* 23: 455–463.
- Nieto C.H.D. – Granero A.M. – Zon M.A. – Fernandez H.: 2018. Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered, *Food and Chemical Toxicology*, 118: 460–470.
- Pfaffl, M.W.: 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): 45p.
- R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2013. Available online: <http://www.R-project.org/>
- Reddy M.V. – Irvin T.R. – Randerath K.: 1985. Formation and persistence of sterigmatocystin-DNA adducts in rat liver determined via 32P-postlabeling analysis, *Mutation Research*, 152: 85–96.
- Rushing B.R. – Selim M.I.: 2019. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods, *Food and Chemical Toxicology*, 124: 81–100.
- Udomkun P. – Wiredu A.N. – Nagle M. – Müller J. – Vanlauwe B. – Bandyopadhyay R.: 2017. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review, *Food Control*, 76: 127–138.

- Viegas C. – Nurme J. – Piecková E. – Viegas S.: 2020. Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider, *Mycology*, 11(2): 91–104.
- Wassing I.E. – Esashi F.: 2020. RAD51: Beyond the break, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 113: 38–46.
- Zimmermann C.E.P. – Cruz I.B.M. – Cadoná F.C. – Machado A.K. – Assmann C. – Schlemmer K.B. – Zanette R.A. – Leal D.B.R. – Santurio J.M.: 2015. Cytoprotective and genoprotective effects of β -glucans against aflatoxin B1-induced DNA damage in broiler chicken lymphocytes, *Toxicology in Vitro*, 29(3): 538–543.