



OCHRATOXINNAL SZENNYEZETT TAKARMÁNY ETETÉSÉNEK HATÁSA A BROJLERCSIRKE GLUTATION REDOX RENDSZERÉRE ÉS LIPIDPEROXIDÁCIÓS FOLYAMATAIRA SZELÉNKIEGÉSZÍTÉS MELLETT

Kulcsár Szabina², Kövesi Benjámin², Balogh Krisztián Milán^{1,2}, Zándoki Erika¹,
Mézes Miklós¹

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet,
Takarmánybiztonsági Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.

²HUN-REN – MATE Mikotoxinok az élelmiszerláncban Kutatócsoport, Kaposvár, 7400 Guba S. u. 40

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ochratoxin A (OTA) az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségbe tartozó penészgombák másodlagos metabolitja, előfordulása gyakori a baromfitakarmányokban. Az OTA hatásaként ismert, hogy az állati szervezetben oxidatív stresszt vált ki, melynek hatására lipidperoxidációs folyamatok indukálódhatnak, amely befolyásolja a biológiai antioxidáns rendszer működését. A szelén esszenciális mikroelem, amely fontos szerepet játszik a szervezet antioxidáns-védelmében, így hatása lehet az OTA által előidézett toxikus hatások enyhítésében és/vagy megelőzésében. Rövidtávú (5 nap) OTA-terheléses (2 mg/kg) *in vivo* vizsgálatot terveztünk 21 napos életkorú brojlercsirkékkel, a szelénkiegészítést napos kortól a kísérlet végéig két dózisban alkalmazva: 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg. Biokémiai módszerekkel meghatároztuk a vérben a glutation rendszer markereit, a redukált glutation mennyiségét és a glutation-peroxidáz aktivitását, valamint a malondialdehid koncentrációját. Az eredmények alapján a vizsgált markerek mennyiségében és aktivitásában mutatott jelentős eltérések a kezeletlen csoporthoz képest, a kialakult oxidatív stressz jelenlétére utal, amelyet a szelénkiegészítés kis mértékben befolyásolt.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite of moulds belonging to the genera of *Aspergillus* and *Penicillium*, and its occurrence is common in poultry feed. As an effect of OTA, it is known that it causes oxidative stress in the animal body, causing lipid peroxidation, which affects the biological antioxidant system. Selenium is an essential element that plays an important role in antioxidant protection, so it can have an effect in mitigating and/or preventing the toxic effects caused by OTA. An *in vivo* study was performed in 21-day-old broiler chickens in a short-term (5-day) feeding trial with 2 mg/kg OTA, using selenium supplementation in two doses: 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg. We measured the markers of the glutathione system in the blood with biochemical methods: the amount of reduced glutathione, the activity of glutathione peroxidase and the concentration of malondialdehyde. Based on our results, significant differences were observed in the amount and activity of the elements of the glutathione system compared to the untreated group, which could be caused by oxidative stress, which was slightly influenced by selenium supplementation.

BEVEZETÉS

A klímaváltozás kedvező környezetet teremt a mikotoxintermelő gombák szaporodására, amelyek a takarmányokat szennyezve gazdasági állatoknál dóziszfüggően termeléskiesést, illetve toxikus válaszreakciót váltanak ki (Diaz, 2005). Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség bizonyos fajainak másodlagos metabolitja az ochratoxin A (OTA), amely a gabonaféléket (árpa, kukorica, zab, rizs, rozs, búza) és más növényi termékeket (kávébab, dió, szárított földimogyoró, fűszerek, szárított gyümölcsök, mazsola, bor, szőlőlé és sör) szennyezi. Átvivő hatás révén szermaradványként megtalálható az állati eredetű élelmiszerekben (sertés- és baromfihúsban, tejben, sajtban), ami hozzájárulhat az emberi expozícióhoz (Wang és mtsai., 2022). Emiatt globális aggodalomra adhat okot az élelmiszer- és takarmánybiztonság tekintetében.

Korábbi kutatások alapján elmondható, hogy egyes mikotoxinok toxicitásában fontos szerepet játszik az oxigén-szabadgyökök képződése és az ebből következő oxidatív stressz indukálása (Da Silva és mtsai., 2018). Az OTA hatásaként ismert, hogy az állati szervezetben oxidatív stresszt vált ki, ennek következtében a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációját okozhatja (Schaaf és mtsai., 2002). Ezt alátámasztják azok az eredmények, ahol az alacsony molekulatömegű antioxidánsok, mint például a tokoferol vagy az aszkorbinsav, csökkentik a lipid-peroxidok képződését és az OTA toxikus hatásait (Hoehler és Marquardt, 1996). A szelén esszenciális mikroelem, amely fontos szerepet játszik a szervezet antioxidáns-védelmében, így például a szelénfüggő glutation-peroxidáz izoenzimek megfelelő működésében, így hatása lehet az OTA által előidézett toxikus hatások enyhítésében és/vagy megelőzésében. A brojlercsirkék érzékenyek az OTA-ra, az LD 50 érték 21 napos korban $3,6 \pm 0,6$ mg/ttkg (Huff és mtsai., 1974). Immunszuppresszív hatását figyelték meg brojlercsirkékben még az Európai Unióban javasolt határérték (0,1 mg/kg takarmány) mellett is (Pozzo és mtsai., 2013). Felszívódás után az OTA nagy mennyiségben volt mérhető a vérben, ezt követte csökkenő sorrendben a vese, a máj, az izom és a zsírszövet (Gareis és Scheuer, 2000). Az OTA-val szennyezett takarmány etetése (2,5 mg OTA/kg) a testtömeg-gyarapodás szignifikáns csökkenését és a relatív vesetömeg növekedését idézte elő (Gentles és mtsai., 1999).

A vizsgálat célja a fentiek alapján annak feltárása volt, hogy az OTA-val mesterségesen szennyezett takarmány rövid távú etetése milyen hatást vált ki a mikotoxinok szállításában fontos vérben a lipidperoxidációs folyamatok iniciációs és terminációs fázisaira, valamint ezzel párhuzamosan célja volt felmérni a glutation redox rendszer egyes paramétereinek mennyiségét és aktivitását, illetve az alkalmazni kívánt szelénkiegészítés hatékonyságát.

ANYAG ÉS MÓDSZER

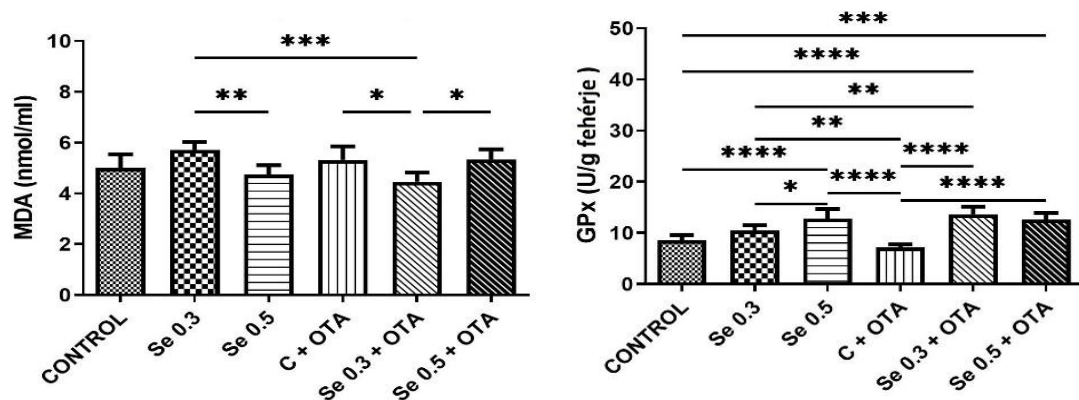
In vivo modellként brojlercsirkét mint az OTA-ra érzékeny gazdasági állatfajt alkalmaztunk. Cobb 500 napos kakasokat a kísérleti takarmányok etetésének megkezdése előtt faforgács almon neveltük, a Cobb technológiai előírásoknak megfelelően. Az egyes kísérleti csoportokat 20 napos életkorban alakítottuk ki, amelynek során egyedi mérlegeléssel meghatároztuk az egyes csoportokba kerülő madarak testtömegét, ügyelve arra, hogy az egyes kísérleti csoportok között az átlagos testtömeg ne térjen el 5%-nál nagyobb mér-

tékben. Az egyes kísérleti csoportokba tartozó madarakat ($n = 6$) alomanyagként fenyőfa-forgácsot tartalmazó fülkékben helyeztük el. Az ivóvizet és a takarmányt a madarak *ad libitum* fogyaszthatták, folyamatos megvilágítás mellett. A rövidtávú (5 nap) OTA-terheléses etetési vizsgálatot 21 napos brojlercsirkékkel végeztük, a következő kísérleti csoportokat kialakítva: 0,3 mg/kg és 0,5 mg/kg szeléntartalmú takarmányt fogyasztó csoport, illetve OTA-t (2 mg/kg) tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport. Ezek mellett kialakítottuk a 0,3 mg/kg és 0,5 mg/kg szelén + 2 mg/kg OTA-tartalmú takarmányt fogyasztó csoportokat is. A kontrollcsoport takarmánya a vizsgált mikotoxint a kimutathatósági határérték alatti mennyiségben tartalmazta, és szelénkiegészítést sem tartalmazott. A kísérlet során a mikotoxinnal szennyezett takarmány etetésének megkezdését követő 24., 72. és 120. órában kísérleti csoportonként 6-6 állatból vérmintát vettünk. A vérvétel heparinozott vérvételi csövekbe (0,005 ml Heparin ad us vet injekció; 125 NE heparin-Na) történt. A vérminták hűtött környezetben ($+4^{\circ}\text{C}$) szállítottuk a laboratóriumba, ahol az alakos elemeket 10 percig történő centrifugálással (1500 fordulat/perc) elválasztottuk a vérplazmától. A vérplazmamintákat a vizsgálatok elvégzéséig -70°C -on tároltuk. Meghatároztuk a lipidperoxidációs folyamat iniciációs fázisa során keletkező konjugált diének, és triének, valamint a terminációs fázis során keletkező meta-stabil végtermék, a malondialdehid (MDA) koncentrációját, valamint a glutation redox rendszer egyes elemeinek, a redukált glutation (GSH) mennyiségét és a glutation-peroxidáz (GPx) aktivitását. A konjugált diének (CD) és triének (CT) meghatározása a vér lipidtartalmának trimetil-pentánban való kivonását követően az abszorpciós spektrum alapján történt (AOAC, 1984). A MDA-tartalmat savanyú közegben, magas hőmérsékleten való komplex képzéssel, 2-tiobarbitursavval határoztuk meg (Botsoglou és mtsai., 1994). A GSH-tartalmat: Rahman és mtsai. (2007) módszerével, a GPx-aktivitást pedig Lawrence és Burk (1976) módszere alapján mértük. Az eredmények statisztikai értékelését GraphPad Prism for Windows 5.04 szoftverrel (GraphPad Software Inc. San Diego, USA) végeztük. Az átlag- és a szórásértékek kiszámítása után egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk. A kísérleti csoportok középértékei között mutatkozó különbségek vizsgálatára Tukey-féle többszörös összehasonlító post-hoc tesztet használtunk ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

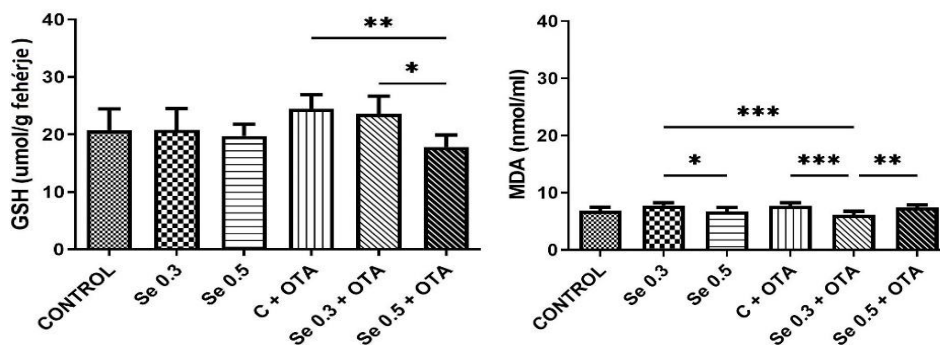
A vérplazmában a MDA mennyisége az OTA-val szennyezett takarmányt fogyasztó csoportban szignifikánsan nagyobb volt ($p < 0,01$) a 0,3 mg/kg szelént tartalmazó takarmánnyal kezelt csoporthoz képest. A brojlercsirkék veséjében már 0,5 $\mu\text{g/kg}$ OTA hatására is az MDA-szint növekedését mérték a 0,4 mg/kg szelén és a 0,4 mg/kg szelén + OTA-val kezelt csoporthoz képest (Li és mtsai., 2020). Az OTA-val, illetve az OTA-val szennyezett és 0,5 mg/kg szelént tartalmazó takarmányt fogyasztó csoporthoz képest kisebb volt ($p < 0,05$) az MDA-tartalom az OTA + 0,3 mg/kg szelénkiegészítést kapott madarak vérplazmájában. Ebben a csoportban a csökkenés szignifikáns mértékű ($p < 0,001$) volt a 0,3 mg/kg szelénkiegészítésben részesült brojlerkekhez képest mért értékek esetében is. A GPx aktivitásában jelentős eltéréseket lehet megfigyelni a csoportok között a kísérlet 5. napjára. A kontrollcsoportban mért értékekhez képest szignifikánsan

növekedett a „0,5 mg/kg szelén” ($p < 0,0001$), a „0,3 mg/kg szelén” + OTA ($p < 0,0001$), illetve a „0,5 mg/kg szelén” + OTA ($p < 0,001$) csoportokban mért enzimaktivitás. A szelénkiegészítés növelte a szelénfüggő GPx aktivitását, ugyanis a szelenoproteinek szintézise függ a szelén mennyiségétől a szervezetben (Papp és mtsai., 2007). Az OTA-val kezelt csoportban mért csökkenés szignifikáns volt mindkét szelénrel kiegészített takarmányt fogyasztó és a többi kezelt csoporthoz képest is (1. ábra). A GPx-enzim aktivitásának csökkenése feltehetően a 2 mg/kg OTA hatására kialakult nagyobb mértékű oxidatív stressznek köszönhető, amelynek következtében nem állt rendelkezésre elegendő idő a glutation-diszulfid regenerációjára és *de novo* szintézisére és/vagy a GPx poszttranszlációs aktiválására.



1. ábra. Oxidatív (MDA) és antioxidáns (GPx) paraméterek változása a vérplazmában (átlag $\pm$ S.D.; $n = 6$) „Se 0.3” és „Se 0.5” 0,3 mg/kg és 0,5 mg/kg szeléntartalmú takarmányt fogyasztó csoport; „C+OTA” OTA-t (2 mg/kg) tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport; „Se 0.3 + OTA” és „Se 0.5 + OTA” 0,3 mg/kg és 0,5 mg/kg szelén + 2 mg/kg OTA tartalmú takarmányt fogyasztó csoport
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

A GSH-tartalom szignifikánsan csökkent a vörösvérsejt-hemolizátumban a „0,5 mg/kg szelén + OTA” csoportban az OTA-val ($p < 0,01$) és a „0,3 mg/kg szelén + OTA” ($p < 0,05$) kezelt csoporthoz képest. Ez a különbség valószínűleg a GPx gyors aktiválódásának köszönhető 0,5 mg/kg szelén + OTA hatására, amely a GSH-tartalom gyors csökkenését eredményezte. Az MDA mennyiségét csökkentette a „0,3 mg/kg szelén + OTA” kezelés az OTA-val szennyezett takarmánnyal etetett ($p < 0,001$) és a „0,5 mg/kg szelén + OTA” ($p < 0,01$) csoportokhoz képest (2. ábra). A 0,3 mg/kg szelénkiegészítés jelentősen mérsékelte az OTA lipidperoxidációt indukáló hatását.



2. ábra. Oxidatív (MDA) és antioxidáns (GSH) paraméterek változása a vörösvérsejt-hemolizátumban (átlag $\pm$ S.D.; $n = 6$) „Se 0.3” és „Se 0.5” 0,3 mg/kg és 0,5 mg/kg szeléntartalmú takarmányt fogyasztó csoport; „C+OTA” OTA-t (2 mg/kg) tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport; „Se 0.3+OTA” és „Se 0.5+OTA” 0,3 mg/kg és 0,5 mg/kg szelén + 2 mg/kg OTA-tartalmú takarmányt fogyasztó csoport
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az OTA-terhelés csökkentette, a szelénkiegészítés viszont növelte a GPx aktivitását a vérplazmában. Az OTA által előidézett lipidperoxidációs folyamatok csökkentek a hozzáadott 0,3 mg/kg szelén hatására a vérplazmában és a vörösvérsejtekben. Az eredmények alapján látható, hogy a szelén fontos a szelenoproteinek közé tartozó GPx-enzim aktivitásához. A 0,3 mg/kg szelénkiegészítés tehát megfelelő lehet az OTA által előidézett oxidatív stressz mérsékléséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-MATE/2024/25/K kódszámú Egyetemi kutatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával és a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kutatási Kiválósági Programjának támogatásával készült.

IRODALOM

- AOAC (1984): Official Methods of Analysis (28.054) 14th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 243.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994): Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1931–1937. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00045a019>
- da Silva, E. O., Bracarense, A. P. F. L., & Oswald, I. P. (2018): Mycotoxins and oxidative stress: where are we? *World Mycotoxin J.*, 11(1), 113–134. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2267>
- Diaz, D. E. (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, 125. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0007-z>
- Gareis, M., & Scheuer, R. (2000): Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 102–104.
- Gentles, A., Smith, E. E., Kubena, L. F., Duffus, E., Johnson, P., Thompson, J., Harvey, R. B., & Edrington, T. S. (1999): Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poult. Sci.*, 78(10), 1380–1384. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/78.10.1380>

- Hoehler, D., & Marquardt, R. R. (1996): Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poult. Sci.*, 75(12), 1508–1515. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0751508>
- Huff, W. E., Wyatt, R. D., Tucker, T. L., & Hamilton, P. B. (1974): Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poult. Sci.*, 53(4), 1585–1591. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0531585>
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976): Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 952–956. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(76)90747-6)
- Li, K., Cao, Z., Guo, Y., Tong, C., Yang, S., Long, M., Li, P., & He, J. (2020): Selenium Yeast Alleviates Ochratoxin A-Induced Apoptosis and Oxidative Stress via Modulation of the PI3K/AKT and Nrf2/Keap1 Signaling Pathways in the Kidneys of Chickens. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, (1), 4048706. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4048706>
- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., & Khanna, K. K. (2007): From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & redox signaling*, 9(7), 775–806. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1528>
- Pozzo, L., Salamano, G., Mellia, E., Gennero, M. S., Doglione, L., Cavallarin, L., Tarantola, M., Forneris, G., & Schiavone, A. (2013): Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg). 1. Effects on growth and slaughter performance, haematological and serum traits. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97, 13–22. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12050>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007): Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulphide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.*, 1, 3159–3165. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Schaaf, G. J., Nijmeijer, S. M., Maas, R. F. M., Roestenberg, P., De Groene, E. M., & Fink-Gremmels, J. (2002): The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 1588(2), 149–158. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00159-X)
- Wang, L., Hua, X., Shi, J., Jing, N., Ji, T., Lv, B., Liu, L., & Chen, Y. (2022): Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11–18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.010>