

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DR. SZABÓNÉ RAJLI VERONIKA

**KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

2019

KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoport

A doktori iskola vezetője:
PROF. DR. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja

Témavezető:
PROF. DR. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja

Társ-témavezető:
PROF. DR. CSEH SÁNDOR
az MTA doktora

**A T-2 MIKOTOXIN SEJTKÁROSÍTÓ HATÁSÁNAK
KIMUTATÁSA *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* KÍSÉRLETEKBEN**

Készítette:
DR. SZABÓNÉ RAJLI VERONIKA

KAPOSVÁR
2019

DOI: 10.17166/KE2019.009

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
2.1. A mikotoxinokról általában	12
2.1.1. A penészgombák mikotoxin termelése, a toxin termelődését befolyásoló főbb tényezők	14
2.1.2. Mikotoxinok előfordulása	20
2.2. A T-2 és a HT-2 mikotoxin	31
2.2.1. Előfordulásuk	31
2.2.2. Kémiai szerkezetük és tulajdonságaik	37
2.2.3. Kinetikájuk (felszívódás, eloszlás, kiürülés)	39
2.2.4. A T-2 és HT-2 mikotoxin metabolizmusa	41
2.2.5. Hatásmechanizmusuk	42
2.2.5.1. A fehérjeszintézis gátlása	43
2.2.5.2. DNS- és RNS-szintézis gátlása	44
2.2.5.3. Apoptózis indukálása	44
2.2.5.4. Lipidperoxidáció kiváltása	45
2.2.5.5. Genotoxicitás	46
2.2.6. A T-2 és HT-2 mikotoxin toxicitása, károsító hatásai	47
2.2.6.1. Az immunválaszra kifejtett hatásuk	51
2.2.6.2. Hatás a szaporodási folyamatokra	52
2.2.6.3. Egyéb károsító hatások (testsúly, termelés, nyálkahártya erózió, emésztőkészülék, vérképzés, stb.)	55
2.2.7. PTDI adatok, EU ajánlások a T-2 és HT-2 mikotoxinokra	59
3. CÉLKITŰZÉSEK	65
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	66
4.1. Reprodukciós toxicitás vizsgálatok baknyulakon	66
4.1.1. A kísérleti állatok, elhelyezésük és takarmányozásuk	67
4.1.2. A gombatenyészet és a tisztított T-2 toxin előállítás	68
4.1.3. A T-2 expozíció módja és időtartama	69
4.1.3.1. Magas dózisu (4 mg/állat/nap) szubakut expozíció (1. kísérlet)	69
4.1.3.2. Alacsony dózisu (0,05, 0,1, és 0,2 mg/állat/nap), hosszan tartó (65 nap) toxinterhelés (2. kísérlet)	70
4.1.3.3. Alacsony dózisu (0,33 és 0,66 mg/takkg), hosszan tartó (65 nap) toxinterhelés (3. kísérlet)	70
4.1.4. Mintavételek, spermium vizsgálati módszerek	71
4.1.5. Statisztikai analízis	72
4.2. A T-2 és a HT-2 toxin citotoxikus hatásának vizsgálata MTT-módszerrel	73
4.2.1. MTT teszt főbb lépései	74
4.2.1.1. A limfociták izolálása	74
4.2.1.2. Sejtszámlálás festékkötés alapján	75

4.2.1.3. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) eljárás.....	76
4.2.2. Statisztikai analízis.....	77
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	79
5.1. A T-2 toxin hatása a baknyulak spermiumaira.....	79
5.1.1. Szubakut toxikózis hatása (1. kísérlet).....	79
5.1.2. Kis dózisu, hosszan tartó, nyelöcsöszondán át bejuttatott T-2 toxin hatása (2. kísérlet).....	87
5.1.3. Kis dózisu, takarmányba kevert T-2 toxin krónikus hatása (3. kísérlet).....	90
5.2. A T-2 és HT-2 toxin önálló és együttes citotoxikus hatásának <i>in vitro</i> vizsgálata idő és koncentráció függvényében.....	94
5.2.1. Az első kísérlet eredményei.....	95
5.2.2. A második kísérlet eredményei.....	99
6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	107
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	109
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	110
9. SUMMARY.....	114
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	118
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	119
12. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK.....	138
13. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜL MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK.....	141
14. SZAKMAI ÖNÉLETRAJZ.....	143
15. MELLÉKLETEK.....	145

A disszertációban szereplő rövidítések jegyzéke

AFB	aflatoxin B
AFM ₁	aflatoxin M1
ATA	alimentary toxic aleukia (toxikus leukopénia)
BEA	beauvericin
BMDL50	benchmark dose lower confidence limit 50% (annak a legkisebb dózisonak a felső 95%-os valószínűséggel megadott értéke, amely a kísérleti állatok 50%-ában idéz elő elváltozást)
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CCM	complete culture media (teljes táptalaj)
CM	culture media (táptalaj)
DAS	diacetoxiscirpenol
DMSO	dimethylsulphoxide
DON	deoxinivalenol
EFSA	European Food Safety Authority (Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok)
FAO	Food and Agriculture Organization (Egyesült Nemzetek Élelmészeti és Mezőgazdasági Szervezete)
FB	fumonizin B
FBs	fumonizinek
FCS	foetal calf serum (magzati borjú szérum)
FX	fuzarenon-x
GSH	glutathion
HT-2	HT-2 mikotoxin
IARC	International Agency for Research for Cancer (Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség)
IC ₅₀	inhibitor koncentráció, amely 50%-kal gátolja az enzim aktivitását

JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (a FAO/WHO Egyesített Élelmiszeradalék Szakértői Bizottsága)
LC-MS	tömegspektroszkópia folyadékkromatográfiával
LD ₅₀	medián halálos adag (a kísérleti állatok 50%-ának elhullását okozza 24 órán belül)
LOAEL	lowest observed adverse effect level (a legkisebb dózis, mely megfigyelhető káros hatást okoz)
MTT	Methyl Thiazol Tetrazolium
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
NIV	nivalenol
NK sejtek	természetes ölő (natural killer) sejtek
NOAEL	no observable adverse effect level (felvételi vagy terhelési küszöb, megfigyelhető káros hatást még nem okozó szint)
NOEL	no observed effect level (megfigyelhető hatást nem okozó szint)
OD	optikai denzitás
OTA	ochratoxin-A
PBS	foszfát pufferes sóoldat
PHA	phytohaematoglutinin
PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake (ideiglenesen megállapított megengedhető maximális napi bevitel)
PMTWI	Provisional Maximum Tolerable Weekly Intake (ideiglenesen megállapított megengedhető maximális heti bevitel)
ppb	part per billion; milliárdnyi rész (µg/kg)
ppm	part per million; milliomod rész (mg/kg)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCF	Scientific Committee on Food (Élelmiszerügyi Tudományos Bizottság)
T-2	T-2 mikotoxin
takkg	takarmány kilogramm
TDI	tolerably daily intake (napi tolerálható beviteli érték)
ts kg	testsúly kilogramm
tTDI	temporary tolerably daily intake (ideiglenesen megállapított napi tolerálható beviteli érték)

WHO World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
ZEA zearalenon (vagy F-2 toxin)

1. BEVEZETÉS

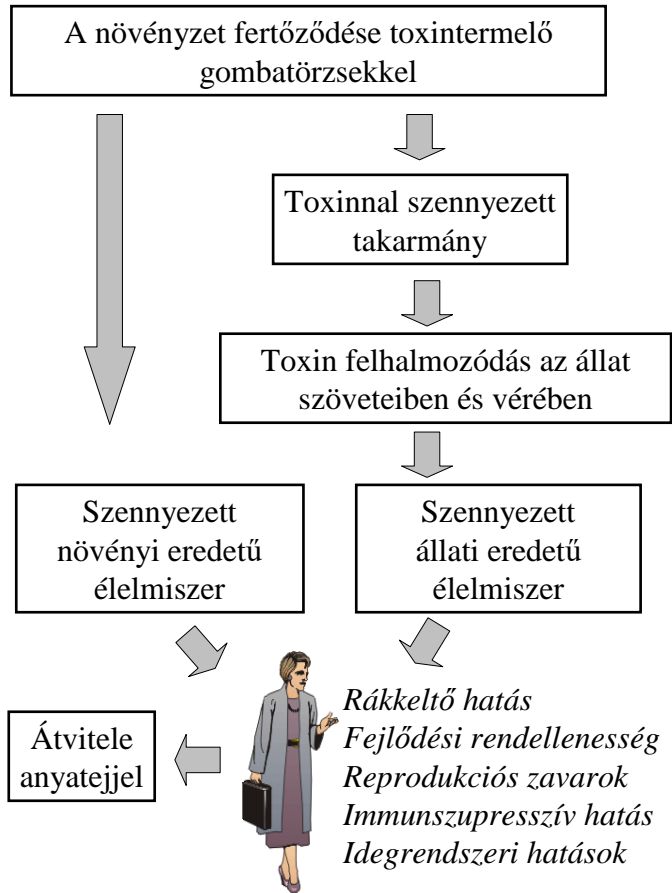
Napjaink egyik nagy problémája a népesség ugrásszerű növekedése mellett a termőföldek területeinek fokozott csökkenése. Az élelmiszerellátásban nem csak a mennyiségi probléma merül fel, hanem a minőségi tényezők is egyre nagyobb befolyásoló szerepet játszanak. Folyamatosan hallhatunk különböző élelmiszer botrányokról, melyeknek a gazdasági károkozáson felül fontos következménye az emberek egészségkárosodása is. A veszélyeztetettek egyik kiemelt csoportját a csecsemők képezik, akik fokozottan érzékenyek az élelmiszer minőségére immunitásuk és emésztőrendszerük fejletlensége miatt. Így korunk még mindig aktuális és fontos kérdése a takarmányminőség, ezen keresztül az élelmiszerminőség problémaköre. Ennek megoldására az Európai Unió igen szigorú élelmiszerminőségi és -biztonsági előírásokat hozott, melynek betartása minden tagállamban kötelező, és vonatkozik az export cikkek minőségére is. A kidolgozott metodika nyomon követi az élelmiszer sorsát a „termőföldtől az asztalig”, ezzel biztosítva az előállítás minőségi követelményeinek betartását. A mikotoxinok jelentősége kiemelkedő a természetes eredetű élelmiszer-szennyezők csoportjában. Akut mérgező hatásuk mellett jelentős, és részleteiben még nem ismert késői egészségkárosodást okozhatnak, melyekre napjainkban derül fény. A humán egészségkárosító hatásuk mellett gazdasági kihatásuk is jelentős az állattenyésztésben és a növénytermesztésben egyaránt. A szennyezettség a megtermelt javak exportképességét csökkentheti, mely kihatással van a nemzetgazdaság egészére (Kovács, 2001). Magyarországon is szigorúan ellenőrzik és nyomon követik az élelmiszerek sorsát. Ezt a feladatot a NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc-

biztonsági Hivatal) látja el a 2008. évi XLVI. törvény *az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletéről* alapján.

(<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0800046.tv>)

Az élelmiszerbiztonság annak biztosítása, hogy az elfogyasztott élelmiszer nem ártalmas az emberi egészségre, ha azt a szokásos módon készítik és fogyasztják el (FAO-WHO, the Food and Agriculture Organization of the United Nations - the World Health Organization, 1969). Fontos tudományos eleme a kockázatelemzés, melynek alapidokumentumait a FAO/WHO Codex Alimentarius dolgozta ki (FAO/WHO, 1990) és amelynek három eleme a kockázatbecslés, kockázat kezelés és a kockázati kommunikáció.

A mikotoxinok mikroszkópus penészgombák szekunder anyagcseretermékei, amelyek előfordulásával szinte minden körülmények között számolni kell a táplálékláncban. Ismert a takarmányokban előforduló mikroszkópus gombák sokrétű kártétele. Elsődleges anyagcseréjük forrása a takarmányok tápanyagai, másodlagos anyagcseréjük eredményeképpen alakulhatnak ki a mikotoxinok. Kémiai szerkezetük igen változatos, ebből kifolyólag a szervezetre gyakorolt hatásuk is eltérő lehet, antigénhatással nem rendelkező és a környezeti hatásokkal szemben nagyfokú ellenálló képességgel rendelkező molekulák. Hazánkban a sertés és baromfi takarmányozásában nagy szerepet játszó gabonafélék, köztük a kiemelt jelentőségű kukorica, gyakran fertőzöttek penészgombákkal, illetve szennyezettek azok mérgező anyagcseretermékeivel. Az ember a gombamérgeket (továbbiakban: mikotoxinok) általában közvetlenül, a szennyezett növényi táplálékkal (korpa, liszt stb.), vagy élvezeti cikkekkel (kávé, sör), veszi fel. Ritkábban és kis mennyiségben állati eredetű élelmiszerrel, az ún. „carry over” (átjuttatás) révén, jutunk hozzá (1. ábra).



1. ábra: Mikotoxinok a táplálékláncban (Kovács, 1998)

A legtöbb mikotoxin stabil, hőnek, savnak ellenáll. Az élelmiszer konyhai előkészítése, kezelése, feldolgozása, illetve a takarmányok előkészítése során a toxinok nem válnak ártalmatlanná, esetleg csak nagyon csekély mértékben csökken toxicitásuk. A mikotoxinok kémiai szerkezetüktől függően másképpen hatnak: rákkeltő, teratogén (magzatkárosító), mutagén, citotoxikus (sejttoxikus), ösztrogén-mimetikus (ösztrogén-szerű) és immunszuppresszív (védekezőrendszer gyengítő) hatással rendelkeznek, károsítják az idegrendszert és a parenchimás szerveket. Egy egészséges szervezet a mikotoxinok egy jelentős részét át tudja alakítani. Néhány

mikotoxin kémiai formája megváltozhat a máj xenobiotikum-transzformáló enzimrendszerének, illetve a bélben lévő mikroorganizmusok (intesztinális mikrobiota) tevékenységének köszönhetően. Ennek során a kiindulási molekulánál toxikusabb, biológiailag aktívabb vegyületek is keletkezhetnek. Magyarországon 1991-ben a kukoricaminták átlagos mikotoxin szennyezettsége 56%-os volt (Kovács és mtsai., 1995), ami igen jelentős mennyiség. Egy 2016-os, hazánkban végzett tanulmány alapján, gabona alapú sertés takarmányokat vizsgálva, minden minta (három takarmánygyártótól származó, 15-15 minta egységként) esetében mutattak ki bizonyos mértékű deoxynivalenol (DON), zearalenon (ZEA), illetve T-2 mikotoxin (T-2) szennyezettséget. Ez jelzi, hogy hazánkban is problémát jelent a *Fusarium* toxinok jelenléte a táplálékláncban (Tima és mtsai., 2016). A környezeti toxikus hatásoknak szaporodásbiológiai rendellenességek is tulajdoníthatóak. A toxinok zavart okozhatnak a spermiogenezisben, ennek következtében csökken a spermiumszám, illetve megnő a morfológiai rendellenességek aránya. Mindez a hímivarban csökkent termékenységet, vagy terméketlenséget idéz elő. Mascarenhas és mtsai. (2012) tanulmányozták a terméketlenségi számokat 1990 és 2010 között világviszonylatban. Tanulmányukban a meddő párok számát 1990-ben 42 millióra becsülték, 2010-ben ez a szám 48,5 millióra nőtt. A publikációk jelzik az egészséges férfiak életképes spermiumszámának csökkenését és a sperma minőségének drasztikus romlását (Ibeh és mtsai., 1994; Bradbury, 1997; Krausz és Forti, 2000).

Míg a mikotoxinok nőivarú állatok szaporodási folyamataira gyakorolt káros hatása viszonylag jól feltárt, addig a hímivarú egyedek ebből a szempontból kevésbé vizsgált csoportot képviselnek. Ezt a hiányosságot szeretnénk volna pótolni a vizsgálataink során, a T-2 toxin sejtkárosító hatásának vizsgálatával, ahol *in vitro* a sertés limfocitákat, míg *in vivo* a nyúl spermium sejteket választottuk modellként. *In vivo* kísérleteinkben több, a hímivarú

állatok szaporodási folyamatait jellemző paraméter meghatározásával megcéloltuk a felvételi vagy terhelési küszöb (no observable adverse effect level, NOAEL), azaz a még károsító hatást nem okozó toxinkoncentráció meghatározását baknyulakban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A mikotoxinokról általában

A mikotoxinok a penészgombák extracellulárisan kiválasztódó, többnyire másodlagos anyagcsere termékei. Fő toxintermelő gomba nemzetségek az *Aspergillus*, a *Penicillium* és a *Fusarium* (Streit és mtsai., 2012). Akut mérgező hatásuk mellett jelentős, és részleteiben még nem ismert, késői egészségkárosodást okozhatnak. Humán egészségkárosító hatásuk mellett gazdasági kihatásuk is jelentős az állattenyésztésben és a növénytermesztésben egyaránt (Kovács, 2001).

A környezeti toxikus hatások közé tartoznak a penészgombák által termelt mikotoxinok, mint természetes takarmány- és élelmiszerszennyezők. Több mint ezer másodlagos anyagcsere terméket ismerünk, de humán- és állategészségügyi jelentősége csak 15-20-nak van (Rafai, 2001). Napjainkban az ismert mikotoxinok közül 300-400 vegyület esetében írtak le toxikus hatást, de csak kis részük kapott széleskörben elterjedt és megkülönböztetett figyelmet. A legfontosabb mikotoxinok, illetve csoportjaik az aflatoxinok B csoportja (AFB), a zearalenon (ZEA), a deoxynivalenol (DON), a fumonizinek B csoportja (FB) és az ochratoxin-A (OTA), melyek élelmiszerekben és takarmányokban való koncentrációját számos országban maximum értékekkel és/vagy ajánlásokkal szabályozzák (Schatzmayr és Streit, 2013).

Szerkezetük és hatásmechanizmusuk igen változatos, így az állati és az emberi szervezetet eltérő hatásmechanizmussal károsítják. Külön problémát jelenthet a szervezetben történő esetleges akkumulációjuk, egymást erősítő szinergista vagy additív hatásuk, illetve az anyagcsere folyamatok során

toxikusabb metabolit kialakulásának esélye (Sexton és mtsai., 1995; WHO, 2000).

A mikotoxinok hatásai különböző formában jelenhetnek meg a szervezetben. Lehetnek karcinogének (pl: AFB, OTA, FB, szterigmatocisztin), immunszuppresszív hatásúak (OTA, trichotecének), mutagének (AFB, ZEA), teratogének (AFB, OTA), kardiotoxikusak (ergot alkaloidok, penicillinsav), dermatotoxikusak (pl: trichotecének), emetikus hatásúak (DON, T-2), hemorrágiás hatásúak (patulin), hepatotoxikusak (AFB, rubratoxin), nefrotoxikusak (citrinin, OTA), neurotoxikusak (ergot alkaloidok, citreoviridin, FB, trichotecének, OTA), ösztrogén hatásúak (ZEA). Ennek köszönhetően szinte minden szervet és életműködést befolyásolhatnak. Egy mikotoxin többirányú toxikus hatással bír, illetve többféle mikotoxin egyidejű jelenléte esetén szinergizmus léphet fel. Az egyes mikotoxinok által okozott egészségkárosítás jellege, mértéke, súlyossága természetesen függ a bevitt mikotoxin mennyiségétől, az adagolás időtartamától, az élőlény fajától, nemétől, egészségi és tápláltsági állapotától stb. (Weidenbörner, 2001).

A mikotoxin kutatás igen fiatal terület, mely a felmerülő kérdésekre sajnos csak hiányosan tud még választ adni. Számos eltérő megközelítésre lehet szükség a célszövetre kifejtett hatások és a dózisok összefüggésének vizsgálatában, valamint ezek humán vonatkozásának vizsgálatára, mellyel kapcsolatban nem állnak rendelkezésre adatok. Ez a folyamat sok bizonytalanságot foglal magában. Az emberre vonatkozó potenciális kockázatbecslésben a legelterjedtebb módszer az állat modell alkalmazása. Mindazonáltal az állat-humán extrapolációnak megvannak a maga problémái. A szabályozó hatóságok számos nehézségbe ütköznek, hogy az állatkísérleteken keresztül próbálják megjósolni a károsító tényezők humán kockázatát (Sexton és mtsai., 1995; WHO, 2000).

2.1.1. A penészgombák mikotoxin termelése, a toxin termelődését befolyásoló főbb tényezők

A gabonaféléket fertőző penészgombákat két nagy csoportra bontjuk: az ún. szántóföldi penészgombák toxinjai keletkeznek a szántóföldeken (ezek növekedésükhöz több vizet igényelnek), de a raktározás során is alakulhatnak ki penésztelepek (raktári penészgombák). Jelen esetben a számunkra fontos szántóföldiek csoportjába tartoznak a *Fusarium* fajok, amelyeknek állat- és humán-egészségügyi szempontból fontosabb toxinjaik a ZEA (vagy F-2 toxin), a trichotecének (T-2, HT-2, nivalenol [NIV], DON, diacetoxyscirpenol [DAS], fusarenon-X [FX]) és a fumonizinek B csoportja (FB). A raktári penészgombák főbb képviselői az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok, melyek fontosabb toxinjai: az AFB, OTA, citrinin, patulin, rubratoxin B. Egyes mikotoxinokat több gombafaj termelhet, melyet az 1. táblázatban foglaltam össze (Streit és mtsai., 2012; Ibáñez-Vea és mtsai., 2012).

1. táblázat: A fő mikotoxinokat előállító gomba nemzetségek (Streit és mtsai., 2012; Ibáñez-Vea és mtsai., 2012)

Mikotoxinok/mikotoxin csoportok	Elsődlegesen termelő gombafajok
Aflatoxinok	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i> ; <i>A. nomius</i>
Deoxynivalenol	<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i>
T-2, HT-2	<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i> ; más <i>Fusarium</i> fajok
Zearalenon	<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. heterosporum</i>
Fumonizinek	<i>F. proliferatum</i> ; <i>F. verticillioides</i>
Ochratoxin-A	<i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>A. carbonarius</i> (melegebb éghajlaton)

Az aflatoxinok (B₁, B₂, G₁ és G₂) világszerte leggyakrabban előforduló mikotoxin csoport. Az AFB₁ a leggyakoribb és legnagyobb toxicitással rendelkező aflatoxin, rákkeltő hatása sok esetben kimutatható. Az International Agency for Research for Cancer (IARC) a humán rákkeltő anyagok 1-es típusába sorolja be. Tejtermelő állatok tejében AFM₁ metaboliként jelenik meg, ami a lehetséges humán karcinogének 2B csoportjába sorolt toxin. Eredetileg trópusi, szubtrópusi klímán termelődik, így európai viszonylatban az importált élelmiszerek jelentik a fő problémát, mint például a földimogyoró, pálmamag olajpogácsa és a kukoricaliszt. Olaszországban 2003-ban mutattak ki AFB₁ szennyeződést aszályos, meleg időjárást követően, mikor magas rovar kártételt észleltek. Itt a vizsgált tejminták AFM₁ tartalma meghaladta az EU által előírt 0,05 µg/kg határértéket, mely a takarmányként használt kukorica 4,4 µg/kg-os AFB₁ szennyezettségének volt a következménye (EFSA, 2004a).

Napjaink egyik jelentős problémája a globális felmelegedés. Ennek a jelenségnek a mikotoxin termelésben is fontos szerepe van, mivel a mérsékelt égövi országokban, mint hazánkban is, megjelennek egyes melegkedvelő toxintermelő gombafajok. Ezek közé tartoznak az előzőekben tárgyalt aflatoxint termelő *Aspergillus* fajok. Így az éghajlatváltozás következtében a mikotoxinok elleni védekezés fő irányvonala az ellenálló gabonafajták termesztése, a biológiai védekezés, valamint a helyettesítő növények alkalmazása (Baranyi és mtsai., 2013). Borbély és mtsai. (2010) hazánkban végzett takarmányvizsgálatok alkalmával mértek uniós előírásokat meghaladó AFB₁ szintet. Dobolyi és mtsai. (2011) hazai kukorica mintákon mutattak ki aflatoxint termelő *Aspergillus flavus* gomba szennyezettséget.

Hazánkban 2018-ban indult egy kutatás a Debreceni Egyetemen „A magyar fogyasztók rövid- és hosszútávú aflatoxin-terhelésének meghatározása a tejtermékláncban és a kockázatkezelő intézkedések megalapozása” címen. Ez méltón tükrözi a probléma aktualitását és hangsúlyosságát. A projekt a

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal nemzeti kiválóság pályázata keretében folyik. A projekt célja a fogyasztói expozíció feltárásán alapuló élelmiszerbiztonsági kockázatbecslés pontosítása, valamint a megelőzés, a tejbe kerülő, közegészségügyi veszélyt jelentő aflatoxin M1 visszaszorítása a különböző növényfajták, kukoricahibridek és tárolástechnológiák megfelelő használatával

(http://hirek.unideb.hu/sites/hirek.unideb.hu/files/20181009_nkp_2018-00002_sajtokozlemenya_magyar_fogyasztok_rovid_es_hosszu_tavu_aflatoxin-terhelesenek_meghatarizasa.pdf).

Legfrissebb aflatoxin szennyezettségi adatok a kukoricában a 2018 augusztusában megkezdett vizsgálatok alapján a következőképpen alakultak. Több, mint 1000 mintát vizsgáltak meg, ami kb. 1 millió tonna árut reprezentál a 6,7 millió tonnás termésből. Az analízisek a vizsgált tételek 15-20%-ában mutattak szennyezettséget. 55%-a az eredményeknek 2 ppb alatti értéket jelzett. 20% 2-5 ppb között, 10% 5-10 ppb, 5% 10-20 ppb, 10% 20 ppb feletti sávba esett (<https://www.kwizda.hu/szaccikk/trifender-pro-pannon-starter-perfect-pro-kukorica>).

Az aflatoxin károsítás fő szerve a máj (EFSA, 2004a). Hosszú ideig tartó, alacsony bevitel esetén kialakulhat májkárosodás és/vagy tumor (Wogan, 1966), tojásbéj képződési zavar, csökkent húsminőség; csökkent ellenálló képesség (Bryden, 2004); romló takarmányértékesítés (D'Mello és Macdonald, 1997) és magzatkárosodás (Binder, 2007).

A trichotecének csoportjába tartozó mikotoxinokat a *Fusarium* gombák termelik. Az A-típusú trichotecének csoportjának képviselői a T-2 és HT-2 mikotoxin, melyet részletesen a 2.2. fejezetben tárgyalok. A B-típusú trichotecének csoportjába tartozó DON magas elterjedtsége következtében érdemel nagyobb figyelmet. Világszerte jelentkező szennyező ágens a gabonamagvakban, főként a búza, kukorica, árpa esetében, valamint a kukorica szilázs előállításnál is problémát jelent (EFSA, 2004b). Az

állattenyésztésben vomitoxinként ismert, mely sertéseknél takarmány-visszautasítást, valamint hányást idéz elő (Bryden, 2012). Befolyással van az immunválasz kialakulására és az emésztőrendszer működésére. A DON mellett két jellemző metabolitja (3-acetil-DON és 15-acetil-DON) is kialakulhat, melyek szintén a sertés emésztőrendszerére vannak hatással (Pinton és mtsai., 2012). A baromfi nem érzékeny a DON szennyezettségre, csak igen magas koncentrációban (16-20 mg/takkg) vált ki takarmány-visszautasítást (EFSA, 2004b). A kérődzők a legkevésbé érzékenyek bendő mikroflórájuk detoxikáló hatásának köszönhetően (Rotter és mtsai., 1996).

A ZEA-t szintén a *Fusarium* gombák termelik. A szennyeződés a gabonamagvak (abraktakarmányok) esetében érhet el magas értékeket, de érintett még az állattenyésztés a szilázs és a szalma kontaminációján keresztül. Az ösztrogénhez hasonló kémiai szerkezete miatt kötődik az ösztrogén-kötő receptorokhoz és szaporodásbiológiai problémákat okoz. A sertés nőivarú egyedei nagy érzékenységet mutatnak a toxinnal szemben (EFSA, 2004a), míg a baromfi faj igen toleráns (Müller, 1978). Tejelő marhák esetében kevés adat áll rendelkezésre, de ezek alapján alacsony érzékenységet mutatnak a ZEA szennyeződéssel kapcsolatban (EFSA, 2004a).

A *Fusariumok* által termelt toxinok másik nagy csoportja a fumonizinek, melyeknek a B változatai a legjelentősebbek, mint a fumonisin B₁, B₂ és B₃. Közülük is a FB₁ a legnagyobb figyelmet igénylő mikotoxin, előfordulását és toxicitását tekintve. A potenciálisan rákkeltő anyagok (2B) csoportjába sorolják (IARC, 2002). Elsődlegesen a kukoricát és az abból származó termékeket szennyezi. Nem kizárólagosan *Fusarium* fajok termelik, kimutatták aszalt szőlőben FB₁₋₄ és más izomer jelenlétét, mely esetben *Aspergillus niger* gombafertőzöttség állt fent. Sertéseknél tüdőödémát, lovak esetében encephalomaláciát váltott ki (Henry és Wyatt, 1993). Általánosságban elmondható, hogy immunrendszer károsító (Bryden, 2004),

hepato- és nefrotoxikus hatással rendelkezik (Binder, 2007). A FB, a DON és a ZEA a *Fusarium* toxinok legjelentősebb képviselői. Elmondható, hogy a fő probléma forrás a *Fusarium* gombák által termelt toxinok együttes megjelenése (multi-mikotoxikózis), azok egymásra kifejtett additív vagy szinergista hatásai, az általuk okozott károsítások (Streit és mtsai., 2012).

A szántóföldi penészgombák szaporodásához a főbb környezeti feltételek (20-25 °C és 30-32% nedvességtartalom) a mérsékelt éghajlatú országokban, így Magyarországon is adóttak a betakarítás előtti időszakban. A mennyiségi élelmiszer-előállítás globális problémájával, a termőföld folyamatos csökkenésével a fusariotoxikózis kockázata is megnövekedett (Kovács és mtsai., 1995). A mikotoxinok termelődését számos tényező befolyásolja, többek között a növény genetikai adottságai, a gombaspóra szennyezettségnek való kitettség, az időjárási viszonyok és klimatikus körülmények, a növénytermesztési módszerek, a kártevők jelenléte, növényápolás, betakarítási módszerek, gombaölő használata (Rodrigues és Naehrer, 2012).

Edwards és mtsai. (2009) több vizsgálatot folytattak a T-2 és HT-2 termelődést befolyásoló tényezőkkel kapcsolatban. Megállapították, hogy az időjárási és a klimatikus viszonyok erősen befolyásoló tényezők, meleg és száraz időjárás esetén nőtt a T-2 és HT-2 szennyezettség. A mikotoxinok kialakulását nagyban befolyásolja a szubsztrátumot képező gabona faja, fajtája is. A fent említett két mikotoxint termelő gombafertőzéssel szemben a legnagyobb fogékonyságot a zab mutatja. Ezen belül is eltérő zab-- fajta/-hibrid esetén más az érzékenység, melyet egy egyesült királyságbeli kutatás is alátámaszt. Megállapították, hogy az őszi vetésű zab háromszor nagyobb koncentrációban tartalmazta ezt a két toxint, mint a tavaszi fajta (Edwards és mtsai., 2009). Más vizsgálatok alapján (Barrier-Guillot, 2009) árpa esetében a tavaszi vetésű fajta mutatott nagyobb érzékenységet (2-3-szoros mértékben) az ősziével szemben. Az adott év termésének toxin szennyezettségét

befolyásolja az előző év talajművelése, az előzőleg vetett gabona fajtája. Kétszer nagyobb T-2/HT-2 koncentrációt mértek tavaszi árpában, amikor árpa vagy búza volt az előveteménye, mint amikor kukorica, répa vagy más volt az elővetemény (Barrier-Guillot, 2009; Fournier, 2009). Ezt az eredményt, több vizsgálat is alátámasztotta. Tehát nagyon fontos szerepe van a vetéscserének a prevencióban. Gombaölő szer használata elhanyagolható mértékű hatást fejtett ki a T-2/HT-2 termelődésre. Van der Fels-Klerx és Stratakou (2010) több szakirodalom feldolgozása után az alábbi megállapításokat tették. A bio (organikus), illetve hagyományos (konvencionális) talaj-előkészítésnek csak zab esetén volt érzékelhető jelentősége, mely során az organikus gazdálkodás mutatott kedvezőbb képet. Az aratást követő tisztítási és feldolgozási folyamatok során is jelentősen csökken a termék toxin szennyezettsége. Zab T-2/HT-2 szennyezettségének mértékét a malomipari feldolgozás 70-95%-kal csökkentette. Viszont az élelmiszer-feldolgozás során termelődő melléktermékek, melyek adott esetben takarmányként funkcionálnak, koncentráltabban tartalmazzák (akár tízszer nagyobb mennyiségben) a mikotoxinokat (Hietaniemi és mtsai., 2009; Pettersson, 2008; Scudamore és mtsai., 2007). Mérések alapján bizonyított, hogy búzaliszt előállítás során keletkező csíra 2-3-szor, míg a korpa 6-szor magasabb koncentrációban tartalmaz T-2/HT-2 toxint, mint a kiindulási termék. Ezt a tendenciát kukorica feldolgozása során is bizonyították. Más feldolgozási folyamatok, mint a forralás, erjesztés, főzés, fagyasztás és sajtolás, nincsenek hatással a T-2/HT-2 koncentrációra. Tehát a hántolás során az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerek toxinkoncentrációja csökken. Viszont a keletkező melléktermék takarmányként való felhasználása problémát jelenthet a feldúsult toxintartalma miatt (Van der Fels-Klerx és Stratakou, 2010).

2.1.2. Mikotoxinok előfordulása

A mikotoxin problémát erősíti a korábban már említett globális felmelegedés jelensége, mely megteremti a kedvező feltételeket a gombák szaporodásához és a toxinok képződéséhez olyan országokban is, ahol eddig ez nem jelentett veszélyt. Amikor az országban a gabonamagvak mikotoxin szennyezettsége 15% vagy ezt meghaladó, járványról beszélhetünk, mely lehet időszakos vagy állandó. Magyarországon 4-5 évente tapasztalhatunk járványokat (Mesterházy, 2006). Nagyobb mennyiségben a müzliben, korpában, sörben, teában és kávéban mutathatóak ki a mikotoxinok. Egy másik fontos tényező a napjainkban divatos reformkonyha térhódítása. A teljeskiőrlésű termékek jelentős forrást képeznek, mivel a toxinok, úgymint a vegyszerek is, a magvak héjában halmozódnak fel (Rafai és Bata, 1998). Közvetett forrást képeznek az állati eredetű élelmiszerek, főként a belsőségek (máj, vese) és a vér (Kovács, 2001).

A mikotoxinok a mezőgazdasági termelésben mindenhol előforduló szennyezést jelentenek, a gabonamagvakban és olajos magvakban egyaránt. Az EU országokban a következő mikotoxinok esnek szabályozás alá, illetve dolgoztak ki ajánlásokat a takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásukra: AFB₁ (2002/32/EK), DON, ZEA, FB és OTA (2006/576/EK), valamint T-2 és HT-2 (2013/165/EU). A *Fusarium* toxinok előfordulása, alacsony szennyezettségi értékben általános (például a DON általában a minták több mint 50%-ában kimutatható) és igen gyakori együttes előfordulásuk. A multi-mikotoxinok analízisek a minták 75-100%-ában mutattak ki egynél több toxin általi kontaminációt, ami már kis dózisban is állategészségügyi problémát jelenthet (Streit és mtsai., 2012). 2004-ben a BIOMIN egy felmérési programot indított el a keverék takarmányok és takarmány-alapanyagok mikotoxin szennyezettségének vizsgálatára

(Schatzmayr és Streit, 2013). Ennek keretében 2005 januárjától 2012 decemberéig közel 20.000 mintát gyűjtöttek, és 64.000-nél is több vizsgálatot végeztek el. A minták 45%-a Ázsiából, 37%-a Európából, 15%-a Amerikából, 2%-a Afrikából és 1%-a Közép-Keletről származott. A minták 72%-ában mutattak ki AFB, FB, DON, ZEA vagy OTA szennyezettséget, 38%-ban kettő vagy több mikotoxin jelenlétével. Az előfordulások gyakorisága a vártnak megfelelően országonként különböző volt, valamint az öt mikotoxin, illetve mikotoxin csoport is eltérő mértékben jelent meg az egyes földrészeken (2. táblázat). A táblázat adatai tükrözik, hogy az egyes mikotoxinok mely régióban fordulnak elő a legnagyobb arányban. Az eredmények mutatják, hogy a régióként eltérő klimatikus viszonyok, nagyban befolyásolják az egyes mikotoxinok termelődését.

2. táblázat: Mikotoxinok előfordulási gyakorisága és koncentrációja régióként (Schatzmayr és Streit, 2013)

Mikotoxin/-csoport	Előfordulásuk		
	Helye	Gyakorisága (%)	Átlagos szennyezettség (µg/kg)
Aflatoxin	Dél-Ázsia	78	128
	Délkelet-Ázsia	55	61
ZEA	Észak-Ázsia	56	386
DON	Észak-Ázsia	78	1060
	Észak-Amerika	68	1418
Fumonizin	Dél-Amerika	77	2691
OTA	Dél-Ázsia	55	20
	Kelet-Európa	49	4

Legtöbb esetben a szennyezettség mértéke nem érte el az EU által javasolt biztonsági vagy maximális értéket. Viszont nem szabad figyelmen kívül hagyni a két vagy több mikotoxin együttes jelenléte során kialakuló szinergista hatás lehetőségét. Külön figyelmet érdemel a takarmányként felhasznált élelmiszeripari melléktermékek toxintartalma, mely sokszor meghaladja a feldolgozott gabona kiindulási állapotában jelenlévő toxinkoncentrációt. A legjobb megoldást a megelőzés jelenti, a már meglévő

szennyezettség csökkentése, megszüntetése sokkal nehezebb feladat. Ilyen megelőző módszer a már említett vetésforgó és az ellenálló fajták használata. A mikotoxin szennyezettség teljes mértékben nem szüntethető meg prevenciós módszerekkel sem. Így indokolt a detoxifikáló módszerek folyamatos vizsgálata és kidolgozása az élelmiszer-mérgezések elkerülése érdekében (Schatzmayr és Streit, 2013).

Rodrigues és Naehrer (2012) szintén az előzőleg említett öt mikotoxin/mikotoxin csoportot vizsgálta 2009 elejétől 2011 végéig, mely kutatásba több mint 7000 mintát vontak be Amerika, Európa és Ázsia területéről. Közel 24.000 mikotoxin vizsgálatot végeztek el. Az esetek 81%-ában mutattak ki mikotoxin szennyezettséget. A minták 48%-ában volt jelen kettő vagy több vizsgált toxin. Megállapították, hogy a gombanövekedéshez, ezáltal a mikotoxin termeléshez legkedvezőbb szubsztrátumot a kukorica képezi a szójával és a búzával összehasonlítva. Az eredmények ez esetben is jelezték, hogy a vizsgált régió klimatikus viszonyai, az adott év időjárási körülményei nagyban befolyásolták az egyes mikotoxinok előfordulásának mértékét. Számos időjárási, klimatikus tényező, növénytermesztési, illetve növényápolási eljárás, valamint betakarítási, tárolási és feldolgozási körülmények hatást gyakorolnak a szennyezettség kialakulására és mértékére. A különböző növényfajok eltérő érzékenységet mutattak a gombafertőzésre.

Serrano és mtsai. (2012) a mediterrán térségek, Spanyolország, Olaszország, Marokkó és Tunézia mikotoxin szennyezettségét vizsgálták takarmány (135) és élelmiszer (130) mintákban, 14 mikotoxint (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, FB2, DON, NIV, DAS, ZEN, BEA, T-2, HT-2) figyelembe véve. A minták 53%-ában találtak toxin szennyezettséget, mely országonként lebontva a következő volt: Spanyolország 33%, Olaszország 52%, Marokkó 96% és Tunézia 50%. A vizsgált mikotoxinok közül, a ZEN kivételével, mindegyik jelenlétét kimutatták a minták valamelyikében. A fő szennyező ágensek a NIV (pozitív minták 96%-ában) és a beauvericin (BEA, 27%-ában)

voltak. A T-2 és a HT-2 a pozitív minták 6-6%-ában jelent meg. A legmagasabb mikotoxin szennyezettséget a gabonamagvak közül az árpa (100%), míg az élelmiszerek közül a kekszek (67%) mutatták a vizsgált mediterrán térségekben.

Spanyolországban 2007-2008 során vizsgált 123 árpaminta esetében kimutatták, hogy 95%-ban kettőnél több mikotoxin van jelen az egyes mintákban. Ennek oka az, hogy egy gombafaj többféle toxint is termelhet, illetve, hogy azonos környezeti feltételek több penészgombafaj elszaporodásának is kedveznek. Így egy toxin megjelenése indikálhatja egy másik toxin jelenlétét is. Leggyakrabban észlelt kombinációk a következők voltak: AFB₁, OTA és DON (29%) és AFB₁, OTA, DON és ZEA (26%). Leggyakrabban a DON és acetilált formája jelent meg (15-acetil-DON 57%; 3-acetil-DON 28%), valamint ZEA-val kombináltan termelődött (37%). A DON és HT-2 mikotoxin együttes jelenléte 22%-os volt. Az előző két toxin, kombinálva ZEA vagy OTA mikotoxinnal, már 30-74%-os jelenlétet mutatott az egyes minták tekintetében. Ezek az eredmények is jól tükrözik, hogy egy gombafaj megjelenése több mikotoxin termelődését is jelezheti előre. Ugyanakkor a DON és ZEA termelődése közt nem mutatkozott erős korreláció ($r=0,141$, NS), melynek oka lehet, hogy a két mikotoxin termelődésének eltérő klimatikus viszonyok kedveznek (Ibáñez-Vea és mtsai., 2012). A *F. graminearum*nak két kemotípusa ismert, az egyik DON-t és acetilezett formáit (3, illetve 15-ac-DON) termeli, a másik NIV-et és FUS-X-et, mindkét típus esetében a ZEA is társ-szennyező lehet (Miller és mtsai., 1991). A DON és a ZEA termelődésének kinetikája eltérő (kukoricacső *F. graminearum*mal való mesterséges fertőzésének eredménye alapján), a DON korán és gyors ütemben termelődik, míg a ZEA később és lassabban (Muller és mtsai., 1997). Ha ez az árpa esetében is igaz, akkor ez magyarázhatja a DON/ZEA eltérő mennyiségét/arányát a mintákban (Ibáñez-Vea és mtsai., 2012).

Streit és mtsai. (2013) készítettek egy tanulmányt, mely az öt alap mikotoxin /mikotoxin csoport 139 metabolitját vizsgálta multi-mikotoxin LC-MS/MS módszerrel. A 83 vizsgált takarmánymintában 139 különböző metabolit jelenlétét mutatták ki. Minden egyes minta esetében minimum 7, maximum 69 különböző metabolitot detektáltak (3. táblázat). A multi-mikotoxikózis felfedésének abban van jelentősége, hogy egyes mikotoxinok, illetve metabolitok egymásra szinergista vagy akár antagonistá hatással lehetnek. Bizonyos esetekben a fő mikotoxin elfedheti valamely metabolitja jelenlétét, mely adott esetben nagyobb kockázatot jelenthet, mint a kiindulási forma (Streit és mtsai., 2013).

3. táblázat: Mikotoxin/metabolitok előfordulási száma egyes mintákban (Streit és mtsai., 2013)

Előforduló mikotoxin/metabolitok száma	Pozitív minták száma (n)*
<10	2
10-15	4
16-20	12
21-25	17
26-30	26
31-35	7
36-40	3
41-45	5
46-50	5
>50	2

*összminta szám: 83

Serrano és mtsai. (2012) által végzett vizsgálat során, a mediterrán országokban, a minták döntő többségében egy mikotoxin jelenlétét detektálták (14 mikotoxint vizsgáltak). A mérések 14%-ában kettő, 18%-ában kettőnél több toxin kontaminációt tapasztaltak mintánként.

A multi-mikotoxikózis problémáját alátámasztja napjaink legfrissebb tanulmánya is. 2017-2018 során, világviszonylatban gyűjtött adatok összesítésének alapján, a minták 10%-ában mérési határ alatti volt a toxinkoncentráció, 20%-ában csupán egy mikotoxin volt detektálható, míg a

minták 70%-ában egynél több mikotoxin jelenlétét mérték. A számszerű adatokat a 4. táblázat mutatja (BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2018).

4. táblázat: Mikotoxin/metabolitok előfordulási száma 2018-as összesített adatok alapján (BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2018)

Előforduló mikotoxin/metabolitok száma	Pozitív minták száma (%)*
<10	2
10-19	14
20-29	25
30-39	23
40-49	21
50-59	12
≥60	3

*2017-2018-ban gyűjtött adatok alapján

Serrano és mtsai. (2012) vizsgálata során a BEA-t a minták 98%-ában detektálták, ezt követték a sorban az ennitianok 96%-kal, majd a DON és emodion 89%-kal. Néhány ismert és gyakran előforduló mikotoxin/mikotoxin csoport/metabolit előfordulási gyakoriságát az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat: Néhány mikotoxin előfordulása a vizsgált mintákban (Streit és mtsai., 2013)

Mikotoxin/metabolit	Pozitív minta (n)	Pozitív minta (%)	Középérték (µg/kg)	Maximum érték (µg/kg)
Deoxynivalenol	74	89	122	25.928
Zearalenon	72	87	14	5.326
DON-3-glükózid	62	75	15	7764
Nivalenol	61	63	17	1.760
T-2	26	31	3,8	427
HT-2	18	22	13	1.910
Fumonizinek	18	22	203	57.667
T-2 tetraol	3	4	9,5	1.655
T-2 triol	1	1	-	278

Évszakonként és évenként igen nagy különbség mutatkozott egyes mikotoxinok/metabolitok megjelenésében. Ez alátámasztja azt a megállapítást, hogy az időjárási viszonyok nagyban befolyásolják a gombák

növekedését, ezáltal a mikotoxinok és metabolitjaik termelődését is. A 6. táblázatban néhány példa szemlélteti a mikotoxin szennyezettséget egyes vizsgált időszakokban (Streit és mtsai., 2013).

6. táblázat: Mikotoxin szennyezettség Alsó-Ausztriában
2010 és 2012-ben

Mikotoxin/metabolit	Toxinkoncentráció (µg/kg minta)					
	2010-1*	2010-2*	2012-1-**	2012-2**	2012-3**	2012-4**
α-Zearalenol	-	-	-	-	-	35
Aurofusarin	240	3380	1,3	44	0,9	17.659
Beauvericin	1390	970	1591	64	699	57
β-Zearalenol	-	-	-	-	-	174
Deoxynivalenol	12	43	65	48	36	25.928
Nivalenol	147	1760	2,3	-	-	41
Zearalenon	-	-	-	-	-	5326

*félév

**negyedév

Az Európai Unióban maximálisan megengedhető értéket határoztak meg AFB₁ esetében, valamint javasolt határértékeket dolgoztak ki DON, ZEN, OTA és FB mikotoxinok esetében a takarmányozásra vonatkozóan (7. táblázat). A szigorúbb szabályozás AFB₁ esetében a nagyobb humán egészségügyi kockázata miatt szükséges, mivel igazolt a meatbolizációja AFM₁ formává és a tejben való kiválasztása (carry-over) (Streit és mtsai., 2012).

7. táblázat: Az EU-ban érvényes AFB₁ határértékek (Európai Parlament, 2002) és DON, OTA, ZEN, FB ajánlások (Európai Bizottság, 2006) a takarmányokra vonatkozóan (Streit és mtsai., 2012)

Mikotoxin	Takarmány	Maximum érték vagy ajánlott érték (µg/kg)
Aflatoxin B ₁	Tejelő és növendék takarmánykeverék	5
	Takarmány alapanyag	20
Deoxynivalenol	Sertés takarmány és - kiegészítő	900
	Gabonamagvak és termékeik	8000
	Kukorica melléktermék	12000
Zearalenon	Malac és kocasüldő takarmány és - kiegészítő	100
	Borjú, tejelő marha, juh és kecske takarmány és - kiegészítő	500
	Kukorica melléktermék	3000
Fumonizin B ₁ +B ₂	Sertés, ló, nyúl és társállat takarmány és - kiegészítő	5000
	Kukorica és kukorica alapú takarmány	60000
Ochratoxin A	Sertés takarmány és - kiegészítő	50
	Gabonamagvak és termékeik	250

Az európai viszonylatban előforduló mikotoxin szennyezettséget mutatják a 8. táblázat adatai, melyeket 2017-2018 során gyűjtöttek össze különböző gabona mintákat figyelembe véve. A számok jól tükrözik, hogy Európa területén a mikotoxinokat termelő penészgombák szaporodásának fő szubsztrátuma a kukorica (BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2018).

8. táblázat: Mikotoxinok előfordulása Európában vizsgált minta típusonként (BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2018)

		AFB	ZEA	DON	T-2	FB	OTA
Kész takarmány	Szennyezett minta (%)	12	77	71	42	78	40
	Átlag érték (ppb**)	5	30	249	30	512	4
	Maximum érték (ppb**)	136	1420	8559	721	26204	90
Kukorica	Szennyezett minta (%)	18	51	65	44	74	13
	Átlag érték (ppb**)	9	76	816	266	1540	156
	Maximum érték (ppb**)	76	2056	40700	6062	26114	5912
Egyéb gabona*	Szennyezett minta (%)	11	38	59	47	25	12
	Átlag érték (ppb**)	2	40	912	35	206	19
	Maximum érték (ppb**)	19	615	22984	2113	2354	569

*búza, árpa, zab, tritikálé, rozs, cirok, köles

**"pars per billion" azaz µg/kg

Világviszonylatban a mikotoxinok előfordulási arányát a 9. táblázat szemlélteti. Jól látható, hogy a T-2 mikotoxin legnagyobb arányban Kelet-Európában jelent meg (BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2018).

9. táblázat: Mikotoxinok előfordulása és kockázata régióként
(BIOMIN World Mycotoxin Survey, 2018)

Régió	Össz kockázat (%)*	Mikotoxinok / Mikotoxin csoportok előfordulása (%)					
		AFB	ZEA	DON	T-2	FB	OTA
Észak-Amerika	73	8	34	67	3	44	3
Közép-Amerika	70	14	10	70	0	84	3
Dél-Amerika	72	27	48	67	25	72	7
Észak-Európa	56	1	42	66	49	44	10
Közép-Európa	46	15	56	64	44	47	16
Dél-Európa	61	21	67	58	24	84	31
Kelet-Európa	36	3	53	66	54	37	35
Közép-Kelet	60	15	71	65	15	87	15
Afrika	65	26	81	77	10	71	6
Dél-Afrika	67	7	72	72	1	74	6
Észak-Ázsia	60	10	55	82	2	72	14
Délkelet-Ázsia	70	54	51	68	1	81	30
Dél-Ázsia	86	87	22	33	0	86	73
Kína és Taiwan	85	28	77	90	1	87	7
Óceánia	17	4	19	47	0	27	5
Javasolt kockázati küszöb érték (ppb**)	-	2	50	150	50	500	10

*0-25% - mérsékelt; 26-50% - magas; 51-75% - súlyos; 76-100% - extrém magas

**µg/kg

Serrano és mtsai. (2012) a mediterrán országokban vizsgálták a mikotoxin szennyezettséget, valamint a napi beviteli értéket. A the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) által javasolt napi tolerálható beviteli értéket (tolerable daily intake, TDI) (10. táblázat) bizonyos területeken, egyes mikotoxinok tekintetében túllépi ezen országok lakosságának felvétele. Kiemelt figyelmet érdemel Tunézia, ahol NIV és OTA esetében többszörösen meghaladja a napi fogyasztás a megállapított tolerálható értéket. Ez a számottevő különbség tükrözi a klimatikus viszonyok erős befolyásoló hatását a mikotoxin termelésre (Serrano és mtsai., 2012).

10. táblázat: A JECFA (2001) által javasolt tolerálható napi beviteli érték és a vizsgált országok mikotoxin felvétele

Mikotoxinok	TDI* µg/ts kg/nap (JECFA javaslat)	TDI szint a JECFA javaslat viszonylatában (%)			
		Olaszország	Tunézia	Spanyolország	Marokkó
NIV	0,7	112,95	487,23	61,84	0,87
DON	1,0	-	18,88	-	0,02
FB1 + FB2	2,0	-	2,53	-	-
OTA	0,1	-	235,66	-	0,29
T-2 + HT-2	0,06	-	72,67	-	0,60

*TDI=tolerably daily intake

Magyarországon gabona alapú sertés takarmányminták (koca-, kan- és malactáp) DON, ZEA és T-2 toxin tartalmát vizsgálták, mely során három különböző takarmánygyártó cégtől, egységenként 15 mintát vettek (Tima és mtsai., 2016). Minden egyes mintában detektálták a fent említett három mikotoxint. Legnagyobb mennyiségben a DON volt mérhető, melyet a T-2, majd a ZEA követett (11. táblázat).

11. táblázat: Magyarországi sertés takarmányminták mikotoxin szennyezettsége (Tima és mtsai., 2016)

Mikotoxin	Átlag (µg/kg)	Középérték (µg/kg)	Minimum (µg/kg)	Maximum (µg/kg)
DON	261	180	137	997
ZEA	39	21	18	192
T-2	40	39	18	55

DON esetében 2 mintánál mértek a Magyar Takarmánykódexben (2004) meghatározott (12. táblázat) depresszív érték feletti koncentrációt.

12. táblázat: A Magyar Takarmánykódexben (2004) meghatározott depresszív és toxikus mikotoxin értékek (µg/kg) sertés takarmányok esetén

Mikotoxin	Takarmány típus	Depresszív határérték	Toxikus határérték
ZEA és metabolitjai	Tenyész sertés	150	250
	Tenyész süldő	50	-
	Malac és hízó sertés	200	400
T-2 toxin	Sertés	250	600
DON	Sertés	400	1000

A fenti eredmények nemcsak a mikotoxin jelenlétének problémáját tükrözik, hanem az egyes mikotoxinok együttes megjelenését, ezáltal az esetlegesen előforduló szinergista hatásuk veszélyét is.

2.2. A T-2 és a HT-2 mikotoxin

A mikotoxinok egy nagy csoportját képviselik a trichotecének, melyeket különböző gombafajok, elsődlegesen gabonamagvakon a *Fusarium* fajok termelik. Az utóbbi évtizedekben a trichotecén kutatás jelentős mértékben fejlődött. A humán élelmiszermérgezők kiváltó tényezői kapcsán valószínűsíthető egyes trichotecén toxinok, úgymint a DON (vomitoxin) és NIV szerepe. Számos humán egészségügyi járványszerű megbetegedés kirobbanásával hozták összefüggésbe az élelmiszerekben jelen lévő trichotecéneket.

2.2.1. Előfordulásuk

A mikotoxinok kémiai meghatározása a 60-as években kezdődött, de már ezt megelőzően is voltak feljegyzések a toxinok által kiváltott megbetegedésekről, igaz, akkor még nem tudták, hogy mi áll a betegségek hátterében. Voronin 1891-es feljegyzései alapján (látási zavarok, remegés, szédülés, fokozott nyálképzés) a betegséget „részeg kenyér” betegségnek nevezték el (Rafai és Bata, 1998). A második világháború során Oroszországban járványszerű megbetegedést okozott a civil lakosság körében az elfogyasztott búza, mely *Fusarium* gombával volt fertőzött. Az áldozatok egy hosszán elhúzódó, általában halálos kimenetelű betegségen mentek keresztül, melynek tünetei hasonlóak voltak a később leírt toxikus leukopénia (alimentary toxic aleukia - ATA) nevű betegségéhez. Ebben az esetben az élelmiszer szennyeződése természetes úton történt, ami a rossz tárolási

körülményeknek tudható be, de ez indikálja, hogy akár biológiai fegyverként is alkalmazhatóak a mikotoxinok. Az esetet követően húsz év múlva felfedezték a mikotoxinokat és izolálták a T-2 toxint (Doi és mtsai., 2006; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Adhikari és mtsai., 2017). Hasonló tüneteket írtak le 1987-ben Indiában és 1993-ban Kínában, mely bizonyítottan trichotecén szennyezett élelmiszerfogyasztással volt összefüggésben. Japánban és Koreában írtak le 1946-1963 között gabonafogyasztással kapcsolatos megbetegedéseket (WHO, 2001).

A T-2 és HT-2 toxin túlnyomórészt a gabonamagvakban, úgymint búzában, kukoricában, árpában, rizsben és zabban, valamint a szójában és ezek termékeiben található. A mikotoxin termelődésnek kedvező a nedves szubsztrátum (10-20% nedvességtartalom) és a környezet 70%-os vagy afölötti relatív páratartalma, valamint 0-50 °C hőmérséklet (gombafajtól függően) és az oxigén jelenléte. Közvetlen befolyásoló tényező a nedvességtartalom, a vízaktivitás, a szubsztrátum és a növény típusa és az ásványi anyag összetétel. Fontos szerepe van a betakarítás utáni körülményeknek és kezeléseknél, mint a szárítás, keverés és tartósítószer adagolás. Természetesen a mikotoxin termelődést alapvetően befolyásolja a gombafaj, a kártevők jelenléte és a mikrobiológiai ökoszisztéma (Adhikari és mtsai., 2017).

Európában a T-2/HT-2 termelődése alacsony szintű, fő problémát Észak-Skandináviában és az Egyesült Királyságban jelent. Európai viszonylatban az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) a rendelkezésre álló adatok alapján az egészségügyi kockázatát alacsonynak ítélte (Streit és mtsai., 2012). A T-2 jelenlétét a mezőgazdasági terményekben számos országban regisztrálták, a szennyezettség napjainkban is jelentős probléma (Doi és mtsai., 2006). Egy 2002-es vizsgálat során finn és olasz helyi piacokon jelenlévő gabona alapú élelmiszerek vizsgálata során 20 µg/kg koncentrációban mutatták ki a T-2 és a HT-2 toxint (Jestoi és mtsai., 2004).

A legfogékonyabb gabonának a zab bizonyult, melyet alátámaszt egy 2002-2006 közötti vizsgálat az Egyesült Királyságban (Edwards, 2009c; Edwards, nem publikált adatok). Ennek során a minták közel mindegyikében, magas koncentrációban mutattak ki T-2 és HT-2 szennyezettséget (13. táblázat) (Edwards, 2009c). A 2008-as adatok alacsonyabb szennyezettséget mutattak zab esetében, mint a megelőző években kapott értékek (Edwards, nem publikált adatok).

13. táblázat: T-2 és HT-2 szennyezettség 2002-2006 közötti időszakban az Egyesült Királyságban (Edwards, 2009c)

Mikotoxin	Előfordulás (%)	Átlag (µg/kg)	Maximális érték (µg/kg)
T-2	84	84	430
HT-2	92	2406	7584

Malomipari termékeket vizsgálva 2004-2007 között, hasonlóan magas koncentrációban jelent meg a T-2 (1610 µg/kg) és a HT-2 (3570 µg/kg) (Scudamore és mtsai., 2009). Finnországban a 2005-2007-es időszakban gyakran tapasztaltak magas (500 µg/kg vagy magasabb) T-2 és HT-2 toxin szennyezettséget a vizsgálatok során, különösen 2006-ban, amikor a minták 44%-a pozitív volt (Pettersson és mtsai., 2008; Hietaniemi és mtsai., 2009). 2008-ban és 2009-ben a minták alacsonyabb szennyezettséget mutattak, mint az előző években (Hietaniemi és mtsai., 2009). Norvégiában 1998-2001 között relatíve alacsony átlagos HT-2 értéket mértek, mely 2002-2004-es időszakban 100 µg/kg-ra, majd ezt követően 200-240 µg/kg-ra növekedett 2005 és 2007 között. 2005-ben a maximum érték meghaladta a 800 µg/kg-ot, mely 2006-ban már 1050 µg/kg volt (Eriksen, 2008). Más vizsgálatok során 2005-ben általánosan megjelenő magas T-2 és HT-2 szennyezettséget mértek, mely meghaladta az 1000 µg/kg-os értéket Norvégiában. Ezt 2006-2007-ben egy mérsékelt magas szennyeződés (Brodal és mtsai., 2008), majd 2008-ban alacsonyabb kontamináció követte (Pettersson, 2009). Svédországban

szintén a 2005-2007-es időszak (különösen 2006) mutatott magasabb T-2 és HT-2 szennyezettségi értéket, mint a 2008-as adatok (Pettersson, nem publikált adatok). Franciaországi eredmények is ugyanezt a tendenciát mutatják 2006 és 2008 közötti mintákat vizsgálva a T-2 és HT-2 szennyezettség tekintetében (Barrier-Guillot, 2009). Kukoricamintákban Olaszországban 2006-2008-as mérések alapján a T-2 és HT-2 szennyezettség mértéke 13 és 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ között volt (Causin, 2009). Franciaországban 2004-2007 között magasabb értékeket kaptak, a T-2/HT-2 szennyezettség elérte a 107, illetve a 149 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ot (Scudamore és mtsai., 2009). Egy 1999-2008-as időszakot átölelő vizsgálat (mely érinti Franciaországot, Olaszországot, Argentínát és Brazíliát) alapján a minták 93%-ánál kevesebb, mint 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4% esetén 50-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3%-nál pedig 100-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os T-2/HT-2 szennyezettséget mértek (Stuart, 2009). Számos európai kutatás szerint a T-2 és HT-2 mikotoxint termelő penészgomba-fertőzés iránt alacsonyabb fogékonyságú a búza, durum búza, rizs és tritikálé, mint az árpa, zab vagy a kukorica (Perkowski és mtsai., 2007; Brodal és mtsai., 2008; Eriksen, 2008; Barrier-Guillot, 2008, 2009; Causin, 2009; Edwards, 2009a; Edwards és mtsai., 2009; EFM, 2009; Scudamore és mtsai., 2009; Battilani és Pietri, nem publikált adat; Pettersson, nem publikált adat; Van der Fels-Klerx, nem publikált adat).

Összegezve elmondható, hogy az Egyesült Királyságban (kiemelten) és a Skandináv országok esetén magas T-2 és H-2 koncentráció volt mérhető a 2003-2007-es időszakban. A vizsgált időszakban az érintett régiókban az árpa és a kukorica T-2 és HT-2 mikotoxin szennyezettsége lényegesen alacsonyabb volt, mint a zabé. A búza, durum búza, rizs és a tritikálé nem mutat fogékonyságot a T-2 és HT-2 szennyeződéssel szemben (Van der Fels-Klerx és Stratakou, 2010).

Hasonló tendenciát mutatnak az élelmiszeripari termékek vizsgálati eredményei. 2005-2008 során zab alapú termékeket vizsgálva az Egyesült

Királyság, Finnország, Németország és Írország területén a T-2/HT-2 szennyezettség átlagosan 19 µg/kg volt, melynek maximális mértéke elérte a 197 µg/kg-os értéket is (Pettersson, 2009). Német kiskereskedésekben vizsgált búza-, rizs- és zabalapú termékek majdnem mindegyikében mértek T-2/HT-2 szennyezettséget. Ez az érték zabtermékek esetén átlag 15 µg/kg, maximum 85 µg/kg volt. Búza- és rizsalapú termékeknél ezek az értékek lényegesen alacsonyabbak voltak (Gottschalk és mtsai., 2009). Németország területén folytatott más vizsgálatok is alátámasztották ezt a nagy számban megjelenő, viszont alacsony értéket képviselő kontaminációt az említett élelmiszerek kapcsán (Usleber, 2008). A zabpelyhek voltak a legnagyobb mértékben szennyezettek, 2006-ban 20,5 µg/kg (maximum 79,5 µg/kg), míg 2007-ben 14,4 µg/kg (maximum 50,7 µg/kg) átlagértéket mértek. 2005-2008 között vizsgált európai zabpelyhely minták esetén 5 µg/kg átlag T-2 (maximum 38 µg/kg) és átlag 14 µg/kg HT-2 (maximum 159 µg/kg) szennyezettséget állapítottak meg (Pettersson, 2008, 2009). Európai sör mintát vizsgálva 2006-ban 0,098 µg/l, 2007-ben 0,053 µg/l T-2; HT-2 esetén e két évben 0,30 µg/l, illetve 0,14 µg/l átlagértékben mutattak ki kontaminációt. Az egyes sör típusok közt (lágér, világos, barna, speciális) nem volt kimutatható különbség a toxin szennyezettség tekintetében (Cantrell, 2008). Összességében látható, hogy élelmiszerekben alacsonyabb T-2/HT-2 szennyezettséget mértek, mint a nyers gabonamagvak esetében. Legnagyobb toxinkoncentrációt a zabalapú élelmiszereknél mértek. Az európai viszonylatban növekvő búzaalapú élelmiszerfogyasztás és a zab visszaszorulása alacsonyabb toxin szennyezettséget eredményez a kenyér és egyéb pékáruk tekintetében (Van der Fels-Klerx és Stratakou, 2010).

Az A-típusú trichotecének, mint a T-2, HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol és a neosolaniol megjelenésében van összefüggés, melynek oka az, hogy azonos *Fusarium* fajok termelik őket és hasonló a metabolizációjuk. A T-2 triol és a neosolaniol erős korrelációt mutat a T-2 és a HT-2 termelődéssel; mérések

alapján (zab mintákon) a T-2 triol 5%-os arányban jelenik meg a HT-2 mennyiségéhez viszonyítva. Norvég zab, búza és árpa mintákban a T-2 és HT-2 megjelenésében erős korrelációt ($r=0,73$) mutattak ki (Langseth és Rundberget, 1999). Más vizsgálatok is bizonyították ezt az erős korrelációt zab, búza és rizs mintákban. Egymáshoz viszonyított együttes előfordulási arányuk 1,75 és 7 között változik, különböző vizsgálatok alapján (Barrier-Guillot, 2009; Gottschalk és mtsai., 2009; Langseth és Rundberget, 1999; Scudamore és mtsai., 2007, 2009). Francia adatok szerint a HT-2 mennyisége 2,5-szerese a T-2-ének (Barrier-Guillot, 2009). Búzában mértek 7-szeres, míg zab esetén 2-szeres, illetve 3,5-szeres különbséget a két toxin arányában (Gottschalk és mtsai., 2009; Scudamore és mtsai., 2007, 2009). Streit és mtsai. (2013) 139 különböző mikotoxint/metabolitot vizsgálva a következő eredményt kapta: T-2 toxin a pozitív minták 31%-ában, míg a HT-2 toxin 22%-ban volt jelen (14. táblázat).

14. táblázat: A T-2 és a HT-2 előfordulása a vizsgált mintákban (Streit és mtsai., 2013)

Mikotoxin/metabolit	Pozitív minta (n)	Pozitív minta (%)	Középérték ($\mu\text{g}/\text{kg}^*$)	Maximum érték ($\mu\text{g}/\text{kg}^*$)
T-2	26	31	3,8	427
HT-2	18	22	13	1.910

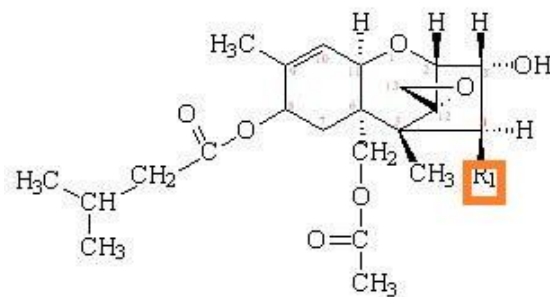
* μg toxin / kg minta

Összegezve elmondható, hogy a HT-2 toxin 2-7-szer nagyobb mennyiségben jelenik meg egyes gabonamagvakban, mint a T-2 toxin. Ez a korreláció élelmiszerek és sör esetén nem mutatható ki (Van der Usleber, 2008; Cantrell, 2008; Fels-Klerx és Stratakou, 2010). A T-2/HT-2 toxin termelődés más trichotecén toxinokkal (például a DON és a NIV) nem korrelál (Barrier-Guillot, 2009; Edwards, 2009a,b,c; Scudamore és mtsai., 2007, 2009; Slaiding, 2009). Ennek oka lehet, hogy ezeket a toxinokat más *Fusarium* fajok termelik (Edwards, 2009b,c).

2.2.2. Kémiai szerkezetük és tulajdonságaik

A trichotecének szerkezetileg tetraciklikus szeszkviterpének 12,13-epoxitrichotecén gyűrűvel, melyben ez az epoxi-gyűrű rendelkezik toxikológiai aktivitással. Kémiai szerkezetét meghatározza a C-3 atomon lévő hidroxyl (-OH) csoport, a C-4 és C-15 pozícióban lévő acetiloxo (-OCOCH₀) csoport, a C-7 atomon lévő hidrogén és a C-8 szénatomon lévő észterizált-izovaleril [OCOCH₂CH(CH₃)₂] csoport (Swanson és mtsai., 1987). Ezáltal négy nagy csoportba sorolják őket A-D-ig terjedően. Leggyakoribbak a B típusú trichotecének, mint a DON, 3-O-acetil-deoxynivalenol, 15-O-acetil-deoxynivalenol és a NIV. Gyakoriságban ezt követi az A típus, melynek képviselői a T-2 és a HT-2 toxin, melyek a trichotecének csoportjának legtoxikusabb képviselői. Ezekre jellemző, hogy a C-8 szénatomon nem tartalmaznak karbonil csoportot.

Általánosságban elmondható, hogy az A típusú trichotecének toxikusabbak a B típusba tartozó társaiknál. A szerkezetben a T-2 metabolizálódik HT-2 formává (EFSA, 2011). Az A típusú trichotecének jellemzője, hogy a C9 és C10 szénatom közt kettős kötés van, valamint a C-12 és C-13 szénatomok epoxi gyűrűt alkotnak. Nem illékony, alacsony molekulásúlyú, szeszkviterpén-epoxid vegyület. A T-2 részlegesen hidrolizált formája a HT-2 mikotoxin (2. ábra).



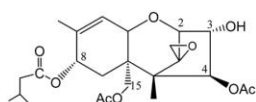
T-2: (R₁ = OAc)

HT-2: (R₁ = OH)

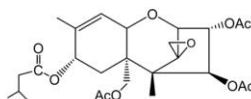
2. ábra: A T-2 és HT-2 szerkezete

(Forrás: http://www.famic.go.jp/ffis/oie/obj/hc_T2toxin.pdf)

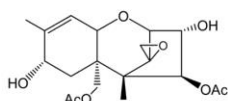
A T-2 mikotoxinnak több metabolitja ismert, melyek szerkezeti felépítését a 3. ábra mutatja.



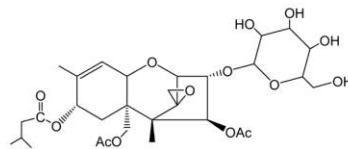
T-2 toxin



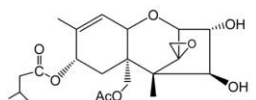
3-acetyl T-2 toxin



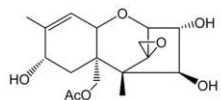
Neosolaniol



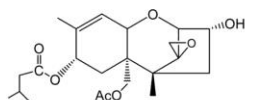
T-2 toxin 3-glucoside



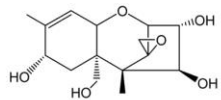
HT-2 toxin



T-2 triol



4-deoxy T-2 toxin



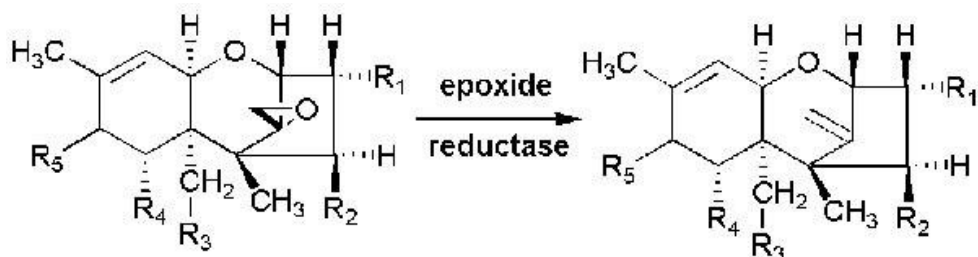
T-2 tetraol

3. ábra: A T-2 és ismert metabolitjainak szerkezete

(Forrás: <https://aem.asm.org/content/aem/78/24/8694/F1.large.jpg>)

A normál étel- és takarmányelőállítás során nem károsodik. Savnak, lúgnak ellenálló, az emésztési folyamat során nem hidrolizálódó vegyületcsoport (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010).

A T-2 képes az emésztési folyamat során egy de-epoxilált formává alakulni, melynek fontos szerepe van a toxin semlegesítésében, illetve hatásának csökkentésében (4. ábra) (Adhikari és mtsai., 2017).



4. ábra: Trichotecének szerkezeti átalakulása egy de-epoxilált formává az emésztési folyamatok során (Adhikari és mtsai., 2017)

Az emésztőrendszer természetes mikrobiótája a kémiai szerkezetének módosításán keresztül képes részben detoxikálni. Mesterséges úton, magas hőmérsékleten semlegesíthető, melyhez 482,3 °C-os 10 perces, illetve 260 °C-os 30 perces forralás szükséges (Adhikari és mtsai., 2017).

2.2.3. Kinetikájuk (felszívódás, eloszlás, kiürülés)

A trichotecén mikotoxinok különböző úton kerülhetnek a szervezetbe, szájon át, bőrön keresztül vagy belégzéssel. A szájon át bejutó toxin gyorsan szívódik fel és gyorsan ki is ürül anélkül, hogy bármely szövetben akkumulálna (Eriksen és Pettersson, 2004).

Egerekben (szájon át adagolva) 30 perc elteltével már mérhető volt a vérplazmában a toxin (Doi és mtsai., 2006); csirkékben (szájon át adagolva) 120 perc után már 60-65%-os összfelszívódást mértek, az abszorpció mértéke

60-90 perc között volt a legmagasabb (Reddy és mtsai., 2004). A HT-2 felszívódására közvetlenül kevés adat áll a rendelkezésünkre. Mini sertéseken végzett kísérlet során már 1 óra elteltével mérték a toxin jelenlétét a szérumban, majd 4 óra elteltével már csökkent a HT-2 koncentrációja (SCF, 2001). Bőrön keresztül való felszívódása viszont lassan megy végbe (Sudakin, 2003). Intravénásan bejuttatva 4 óra elteltével már a gasztrointesztinális- és egyéb szövetekben (például izom és máj) mérhető volt a toxin jelenléte (SCF, 2001). Sertésekben intravasculáris bevitel esetén 90 perc volt a plazmában a toxin felezési ideje (Corley és mtsai., 1986; Doi és mtsai., 2006), 3 óra elteltével már kimutatták a limphoid szövetekben a toxin jelenlétét (Doi és mtsai., 2006). Szájon át történő bevitel esetén hosszabb időre (18 óra) volt szükség, hogy a toxin megjelenjen az izom, illetve a máj szöveteiben. Ez a beviteli módtól függő eloszlási tendencia más fajoknál is hasonló volt, úgymint a szarvasmarha és baromfi esetében (Jaradat, 2005). Lipofil tulajdonságainak köszönhetően átjut a vér-agy-gáton, így a szervezet minden szövetébe képes eljutni. A placentán keresztül a magzat szervezetébe is átjut (Doi és mtsai., 2006).

A rágcsálók szervezetéből a mikotoxin vizelet és epe segítségével távozik, a kiürülés mértéke azonban függ a rágcsáló fajtól (SCF, 2001; WHO, 2001). Tengerimalacok szervezetéből a toxin 75%-a kiürült 5 nap elteltével, mely 4:1 arányban vizelettel, illetve széklettel távozott. A vizelet útján történő kiürülés 24 óra elteltével tetőzött és a toxin 99%-a eliminálódott a szervezetből 28 nap elteltével (WHO, 2001). Patkányoknál a széklettel való toxinürülés dominál. A kiürülés ideje azonban függ a bevitel módjától (SCF, 2001; WHO, 2001). Egereknél az elimináció 3:1 arányban széklettel és vizelettel történik (Eriksen és Alexander, 1998). Laktáló szarvasmarhánál szájon át történő bevitel esetén vizelettel, epével és tejjel távozik a szervezetből a toxin (Wu és mtsai., 2010). Kérődzők tejében megjelenő toxinkoncentráció függ a bendőben végbemenő metabolizmustól, aminek

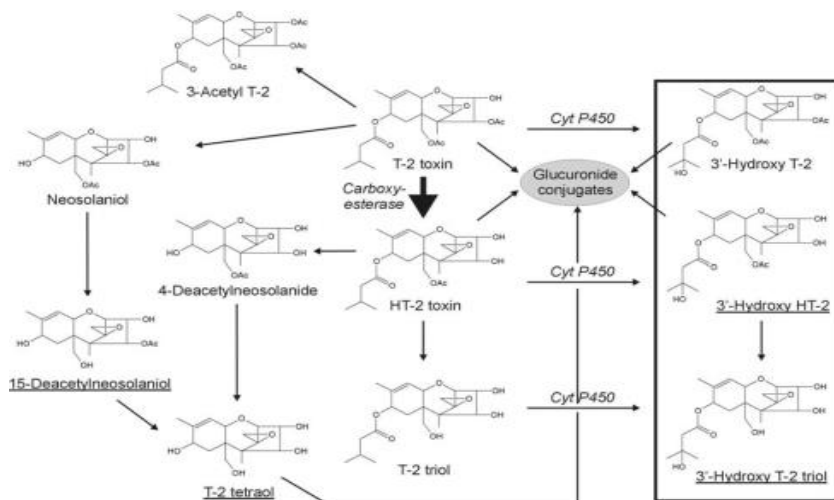
köszönhetően 4-szer gyorsabb a kiürülés, mint hasonló kondíciókkal más fajokban (Cavret és Lecoœur, 2006). Tyúkknál a tojásban is megjelent a T-2 mikotoxin, viszont a terhelést megszüntetve hamar csökkent a mért koncentráció (WHO, 2001). Túlnyomó többségben konjugált glükoron formában távozott a szervezetből (Corley és mtsai., 1986), mely azt jelzi, hogy a T-2 mikotoxin az enterohepatikus körforgás alanya (Doi és mtsai., 2006).

Korábbi vizsgálatok során nem mutattak T-2 akkumulációt az egyes szervekben, szövetekben. Ezt okozhatta az alkalmazott dózis nagysága is, illetve az, hogy az akkumulálódott mikotoxin mennyisége a kimutatási határ alatt volt. Chandratre és mtsai. (2014) által alkalmazott magas T-2 bevitel (20 ppm) során kimutatták a szervekben/szövetekben való akkumulációt (Chandratre és mtsai., 2014).

2.2.4. A T-2 és HT-2 mikotoxin metabolizmusa

A T-2 toxin gyorsan metabolizálódik egyes fajokban. Majmok esetén már 5 perccel a bevitt követően detektáltak T-2 metabolitot, 24 óra elteltével csupán 8% volt mérhető eredeti formában. Különböző fajok esetén más-más úton, acetiláción, deacetiláción, hidroxiláción, deepoxidáción és glükoron konjugáción keresztül (5. ábra) megy végbe a metabolizációja (Naseem és mtsai., 1995; Doi és mtsai., 2006; Wu és mtsai., 2010).

Leggyakrabban és leggyorsabban a C-4-es szénatomon történő deacetiláción keresztül HT-2 metabolittá alakul át. Humán bőrszövetet alkalmazva 48 óra elteltével az eredeti molekulaforma 15%-ban, míg a HT-2 71%-ban volt mérhető (Kemppainen és mtsai., 1986). Máj, vese és lép szövetet használva kizárólagosan csak HT-2 metabolit alakul ki (SCF, 2001). Tehát a metabolizmus útját befolyásolja az alkalmazott faj, illetve szerv/szövet, valamint a bevitel módja és időtartama is hatással van rá.



5. ábra: A T-2 metabolizmusa a humán és állati szervezetben (Dohnal és mtsai., 2008)

Utóbbi patkányokon végzett kísérletek támasztják alá, ahol eltérő metabolitok alakultak ki hosszabb/rövidebb idejű intravénás, illetve szájon át történő bevitel esetén. A metabolizmus útját a bevitt toxin koncentrációja nem befolyásolta (Pfeiffer és mtsai., 1988; WHO, 2001; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2010; EFSA 2011; Li és mtsai., 2011; Wu és mtsai., 2014).

2.2.5. Hatásmechanizmusuk

A trichotecének esetében az alapvázhoz kapcsolódó oldalláncok befolyásolják a toxikusságukat. Eddig megismert káros hatásai a következők: gastrointestinális zavarokat okoznak, dermatotoxikusak, módosítják a mellékvese és befolyásolják a szaporítószervek működését, nekrotikus és gyulladásozó folyamatokat, illetve idegrendszeri elváltozásokat indukálnak. Gátolják a fehérje-, a DNS- és RNS-szintézist, befolyásolják a membrántranszport folyamatokat, lipid peroxidációt fokoznak és apoptózist

indukálnak. Ennek a csoportnak írták le a legerősebb immunszuppresszív hatását, a T-2 hatására a T- és B-sejtek, valamint a természetes ölósejtek (NK sejtek) aktivitása csökken (Surai és Dvorska, 2005). Nagy dózisu expozíciót követően a T-2 kiválasztódik a tejben és a tojásban is, de ennek nincs gyakorlati jelentősége (Kovács, 2010).

Állategészségügyileg jelentős károsító hatásai a következők: a fehérje-, valamint a DNS- és RNS-szintézis gátlása miatt negatívan hatnak az aktívan osztódó sejtekre, pl. bélhám limfoid és eritroid sejtekre, illetve csökkentik az ellenanyagok és a citokinek termelődését (Niyo és mtsai., 1988b; Richard, 1991). Sertésekben immunválasz gyengítő hatást mutattak ki, baromfiban nyelőcső károsodást okozott a toxin, valamint mindkét fajnál takarmányfelvétel- és súlycsökkenés lépett fel. Magas toxinbevitel esetén károsította a tojástermelődést, csökkent héjszilárdságot váltott ki tojók esetében. A sertések érzékenyebbek a T-2/HT-2 terhelésre, mint a baromfi. A kérődzők, emésztőszervi sajátosságaiknak köszönhetően, erre a toxinra is csökkent érzékenységet mutatnak (Streit és mtsai., 2012).

A T-2 és metabolitja, a HT-2 általában együttes károsítóként jelenik meg, eddig a két toxin interakcióját még nem vizsgálták.

2.2.5.1. A fehérjeszintézis gátlása

A fehérjeszintézis gátló hatása *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is bizonyított. A T-2 mikotoxin interakcióba lép a 60S riboszómális alegységen a peptidil transzferáz enzimmel, ezáltal meggátolja a peptid kötések kialakulását (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Arunachalam és Doohan, 2013; Wan és mtsai., 2015).

2.2.5.2. DNS- és RNS-szintézis gátlása

DNS- és RNS szintézis gátlása *ex vivo* és *in vitro* kísérletekben bizonyított (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Arunachalam és Doohan, 2013; Wan és mtsai., 2015). Csirke leukocytákban kimutatták, hogy DNS fragmentációt okoz (Frankic és mtsai., 2006, 2008). Zhang és mtsai. (2016) egér Leydig-sejteket alkalmazva *in vitro* kimutatták a DNS károsító hatást. Yuan és mtsai. (2016) szintén igazolták a T-2 mikotoxin DNS károsító hatását Leydig-sejteken.

2.2.5.3. Apoptózis indukálása

Apoptózist serkentő hatását *in vivo* és *in vitro* (SCF, 2001), valamint *in utero* kísérletek egyaránt alátámasztják (SCF, 2001; WHO, 2001). A hatás hátterében a fehérjeszintézis gátlása állhat, amelynek másodlagos hatásaként fellép a DNS károsítás; vagy oxidatív stresszt kiváltva (a glutation szint csökkenésével, a lipid peroxidáció növelésével) intrinszik, mitokondriális úton indukál apoptózist. Összességében elmondható, hogy a T-2 és HT-2 a gyorsan szaporodó sejtekben/szövetekben apoptózist indukál, így pl. a vér-, a limfoid-, a gasztrointesztinális, a hám- és a magzati sejtekben/szövetekben (Doi és mtsai., 2006; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Li és mtsai., 2011; Arunachalam és Doohan, 2013; Yuan és mtsai., 2016).

2.2.5.4. Lipidperoxidáció kiváltása

A T-2 citotoxikus hatását az oxigén szabadgyök képzésnek, következményesen a lipid peroxidációs folyamatok indukciójának tulajdonítják. Vitatott, hogy szabadgyök képzéssel közvetlenül hat, vagy indirekt módon növeli a lipidperoxidáció iránti érzékenységet. Az antioxidáns rendszer gátlásának hátterében a szulfhidril csoportot tartalmazó fehérjékhez való kötődés állhat. Hatással lehet az antioxidáns enzimek aktivitására, valamint a fokozott oxidatív stressz hatására a xenobiotikum (esetünkben a T-2 és metabolitjai) transzformáló rendszer sérülhet. A szakirodalmi adatokban sok az ellentmondás, így e terület tanulmányozásának fontossága egyértelmű. A lipidperoxidációs hatással magyarázzák a DNS károsítást és az apoptózis indukciót (EFSA, 2011). Megállapították, hogy a T-2 sejtkárosító hatását egyes antioxidánsok csökkenteni tudják, úgymint az E-vitamin és a szelén (Dvorska és mtsai., 2007). Ez is igazolja a toxin prooxidáns hatását. Brojler csirkében 0,31 és 0,262 mg/takkg T-2 és HT-2 hatására szignifikánsan nőtt a szívizom redukált glutation (GSH) tartalma a glutation-peroxidáz aktivitás és a malondialdehid koncentráció változása nélkül, ugyanakkor a májban lipidperoxidációt jelzett a megnőtt malondialdehid koncentráció (Pál és mtsai., 2009). Ennek magyarázata az egyes szöveteknek az oxidatív stresszel szembeni eltérő érzékenysége. Már korábban megfigyelték a kifejezettebb glutation szintézist az oxidatív stresszel szemben ellenállóbb szöveteknél (Sagara és mtsai., 1998). A T-2 mikotoxin lipidperoxidációs hatásának igazolására, közvetetten a toxin prooxidáns hatását igazolandóan vizsgálták az antioxidáns védőrendszerre gyakorolt hatásait. Ennek egyik eleme a szívizom redukált glutation (GSH) tartalma, mely a mikotoxin terhelés hatására szignifikánsan nagyobb értéket mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ilyen mértékű változás csak a szívizomban volt mérhető. Ez arra enged következtetni, hogy

lipidperoxidációs folyamatok a májban és a vesében indukálódtak a toxin terhelés hatására. Ponty esetében a glutation redox rendszer képes a toxinok peroxidatív hatásának csökkentésére (Mézes és Balogh, 2010). A T-2 felületaktív tulajdonságának köszönhetően könnyen átjut a sejt membrán kettős foszfolipid rétegén, ahol lipidperoxidációt indukál és oxidatív stresszt vált ki, ezáltal károsítva a sejteket (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Chaudhary és mtsai., 2013; Arunachalam és Doohan, 2013; Wu és mtsai., 2014; Bócsai és mtsai., 2015; Wan és mtsai., 2015; Yuan és mtsai., 2016). Rövid idejű terhelés esetén, brojlercsirkéken megfigyelték, hogy a lipidperoxidációs folyamat kompenzálására képes a szervezet a glutation redox rendszer aktiválódásával. A lipidperoxidációra kifejtett hatás nagymértékben függ a toxinbevitel óta eltelt időtől és az állatok korától (Bócsai és mtsai., 2015). Zhang és mtsai. (2016) egér Leydig-sejten végzett *in vitro* kísérletük során szintén igazolták az oxidatív stresszt kiváltó hatást.

2.2.5.5. Genotoxicitás

A T-2 nem bizonyult genotoxikusnak *Salmonella typhimurium*-mal, *Escherichia coli*-val és *Saccharomyces cerevisiae*-vel végzett tesztekben (WHO, 2001). A T-2 hatására májsejtekben DNS fragmentációt mutattak ki *in vitro* és *in vivo*, amely antioxidánsok adásával kivédhető volt, így feltételezhető, hogy a génkárosodás oxidatív stressznek volt köszönhető (Jaradat, 2005). Brojler csirkékkel 17 napig 10 mg/takkg T-2-t etetve a lép fehérvérsejtjeiben szintén DNS fragmentáció volt kimutatható (Frankic és mtsai., 2006). Hasonló jelenséget igazoltak sertésben 3 mg/kg T-2 14 napig történő etetését követően (Frankic és mtsai., 2008).

2.2.6. A T-2 és HT-2 mikotoxin toxicitása, károsító hatásai

A T-2 mikotoxin akut toxicitása magas. A HT-2 hatásait közvetetten, a T-2 mikotoxin kísérletek során kapott eredményekből határozzák meg, egyéb adatok hiányában. Rágcsálók esetében a T-2 orális LD₅₀ (a kísérleti állomány 50%-ának elhullását okozó adag) értéke 5-10 mg/ts kg, megállapították, hogy egerekben az újszülött, illetve fiatal egyedek, valamint a nőivarúak nagyobb érzékenységet mutatnak a mikotoxin terheléssel szemben. Sertésekben az LD₅₀ érték 5 mg/ts kg, csirkékben az LD₅₀ T-2-re 2-6 mg/ts kg, míg HT-2 toxinra 7,2 mg/ts kg (SCF, 2001; WHO, 2001; Jaradat, 2005).

Humán sejttenyészeteken végzett vizsgálatok során citotoxikus hatást észleltek mindkét toxin esetében. A T-2 IC-50 (inhibítor koncentráció, amely 50%-kal gátolja az enzim aktivitását) értékét 0,2-0,5 µM-ban, míg a HT-2 esetén 0,7-3,0 µM-ban állapították meg (Königs és mtsai., 2009).

Schuhmacher-Wolz és mtsai. (2010) több kísérleti munkája során kapott eredményeket foglalja össze a 15. táblázat, a hosszú ideig tartó szubkrónikus, illetve krónikus T-2 toxin expozíció hatásairól.

15. táblázat: T-2 mikotoxin toxicitása eltérő időtartam és dózis esetében (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010)

Faj	Beviteli mód	Dózis (mg/ts kg/nap)	Terhelés időtartama	N(L)OAEL* (mg/ts kg/nap)	Hatás
Rövid ideig tartó terhelés					
Sertés	Szájon át	0,03-0,09	3 hét	0,03 (L)	- 10%-os csökkenés a takarmányfelvételben 0,03 mg/ts kg/nap dózisonál - alacsonyabb glükóz, szerves foszfor és magnézium szint 0,06 mg/ts kg/nap dózisonál
		0,03-0,13	3 hét	0,03 (L)	immunrendszer károsítás
		0,016-0,132	5 hét	0,132	- hematológiai paraméterekre nincs hatással - takarmányfelvétel csökkenés (nem szignifikáns)
		0,04-0,64	8 hét	0,04 (L)	testsúlycsökkenés
Mini-sertés	Szájon át (szonda)	0,012; 0,06	7 hét	0,06	betegségekre való fogékonyságra, súlyra, egészségi állapotra, hematológiai paraméterekre nincs hatással
Majom	Szájon át (szonda)	0,1	4-5 hét	0,1 (L)	immunrendszer károsítás (hányás, vérzékenység, légúti betegségek, halál)
Patkány	Szájon át	0,25; 0,5; 0,75	4 hét	0,25	gyomor özofáguszban reverzibilis károsodás (hipoplázia, hiperkeratózis, akantózis, papillomatózis)
Krónikus toxicitás					
Egér	Szájon át (szonda)	0,1	25 hét	0,1 (L)	papillóma
	Szájon át	0; 1,5; 2,25	12 hó	1,5 (L)	gyomorkárosodás (lásd. patkány rövid idejű terhelésnél)
	Szájon át	0,22; 0,45	71 hét	0,22 (L)	- tüdő és máj adenóma - gyomor epithelium hiperplázia - szívnagyobbodás (nagy dózisonál)
Patkány	Szájon át	0,5	8 hó	0,5	- nincs hatás

*N(L)OAEL=no (low) observable effect level

(L)=low

Számos kísérlet alátámasztja azt, hogy a toxin által kifejtett hatás erősen függ a bevitel módjától, idejétől, a toxin dózisától, a fajtól, azon belül a kortól és a nemtől egyaránt. Van der Fels-Klerx és Stratakou (2010) az előzőekben leírt eredményekhez hasonlókat gyűjtöttek össze. A T-2 toxin által okozott akut toxicitás esetén az LD₅₀ érték tág határok között mozog, melyet hím patkányok esetében 0,05 mg/ts kg-ban, míg nőivarú egereknél 14 mg/ts kg-ban határoztak meg (Fairhurst és mtsai., 1987; Creasia és mtsai., 1990; JECFA, 2001). A nemek közötti különbség a toxinra való érzékenység tekintetében minden patkány és egér kísérlet során bizonyított (JECFA, 2001; SCF, 2001). Az akut toxikózis tünetei különböző emlősfajok esetében a bőr nekrosis, gyengeség, étvágytalanság, hasmenés, szapora szívverés és légzés, szívizom károsodás, hányás, cianózis, anorexia, letargia; a gyomor és bélrendszer, a csontvelő, a lép, a petefészek és a here epithelium sejtjeinek károsodása (Weaver és mtsai., 1978c; Yarom és mtsai., 1983; Thurman és mtsai., 1986; WHO, 1990; Rafai és mtsai., 1995a; Eriksen és Alexander, 1998; JECFA, 2001; SCF, 2001; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010). Rövid ideig tartó terhelés esetén patkányokon alacsony dózisban gyomor nyálkahártya sérülést és táplálkozási rendellenességet, magas dózisban máj-, vese- és szívsejt elhalást okozott (Ohtsubo és Saito, 1977; Sinovec és Jovanovic, 1993; JECFA, 2001). Baromfiaknál takarmányfelvétel- és testsúlycsökkenést, szájnyálkahártya károsodást, csökkenő tojástermelést és romló tojásminőséget eredményezett (Wyatt és mtsai., 1972; Chi és mtsai., 1977). Brojler csirkéknél a T-2 és HT-2 együttes hatása a szájüreg és a nyelv sebesedése, vékonybélgyulladás (Weber és mtsai., 2010). Sertéseknél étvágy- és testsúlycsökkenést, valamint vérképzési zavarokat okozott, melynek során a LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level) értéket 0,03 mg/ts kg/nap-ban határozták meg (Harvey és mtsai., 1994; Rafai és mtsai., 1995a). Juhoknál

szájgyulladást, fokális hiperémiát, hányást, fehérvérsejt-számcsökkenést, nyirokcsomó és lép károsodást váltott ki (Friend és mtsai., 1983). Borjaknál enyhe bélgyulladást mutattak ki (Pier és mtsai., 1976). Majmoknál hányást, hemorrágiát, légzőszervi károsodást és halált okozott (SCF, 2001), a korábban 0,1 mg/ts kg/nap mennyiségben meghatározott LOAEL érték fehérvérsejt-számcsökkenést váltott ki (Rukmini és mtsai., 1980). Macskáknál hányást, hasmenést, súlycsökkenést, lesóványodást okozott (Lutsky és mtsai., 1978). Hím patkányokon máj, vese és szív károsodást mutattak ki (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010). Az állatkísérletek során kapott eredmények alapján az IARC a humán rákkeltő anyagok 3-as csoportjába sorolta, melyek nem minősülnek emberben rákkeltőnek (IARC, 1993).

A HT-2 toxin akut toxicitást kiváltó koncentrációját 1-10 mg/ts kg között határozták meg (JECFA, 2001). Brojlersirkéken végeztek rövid idejű nagy dózisú terhelést T-2 toxinnal kombinálva, melynek során a szájüreg és nyelv nyálkahártya károsodását és vékonybél-gyulladást mutattak ki. Hosszantartó terhelésre vonatkozó adatok nincsenek (Weber és mtsai., 2010).

A trichotecén csoport embernél és állatoknál megjelenő káros hatásai közé sorolhatóak az anorexia, gastroenteritis, hányás és különböző hematológiai betegségek (Pestka és Casale, 1990). A mikotoxin szennyeződés munkahelyi ártalomként is megjelenik. Mayer és mtsai. (2008) T-2 és HT-2 toxin jelenlétét mutatták ki a gabonabetakarítás során leülepedett porban, valamint a szellőztető berendezések felületén. Problémát okozhat a bőrön át történő szennyeződés is.

2.2.6.1. Az immunválaszra kifejtett hatásuk

Az immunrendszer nagyfokú érzékenységet mutat e csoport képviselőivel szemben, melyek már kis dózisban is befolyásolják a működését, nagy toxinterhelés a limfoid szövetekben apoptózist indukál, tehát immunszuppresszív hatású (CAST, 2003; Pestka és mtsai., 2004). Szájon át történő akut toxicitás esetén sejtkárosítást indít el a csontvelőben, limfoid szervekben, lépben, a tímuszban és az intesztinális sejtekben. Más trichotecén toxinokhoz hasonlóan az immunszuppresszív, illetve immunstimuláló hatása függ a bevitel időtartamától és a dózis nagyságától egyaránt. Számos tanulmány született a T-2 humorális- és celluláris immunválaszra kifejtett hatásával kapcsolatban. Hosszantartó terhelés esetén növeli a fogékonyságot különböző patogénekkal szemben. Sertéseken végzett vizsgálat során a LOAEL értéket 0,029 mg/ts kg/nap-ban határozták meg (Eriksen és Pettersson, 2004; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Arunachalam és Doohan, 2013; Wan és mtsai., 2015).

A T-2 toxin immunogenezis gátlása és az ellenálló képesség csökkentő hatása már többszörösen bizonyított (Pier és mtsai., 1980). Shinozuka és mtsai. (1997) megállapították, hogy a T-2 toxin által kiváltott lymphoid sejthalál valójában apoptózis, ezáltal csökken a lymphoid szövetek tömege és mérete. Megállapították, hogy a lymphoid sejtek T-2 toxinra való érzékenysége eltérő a szövetekben (Shinozuka és mtsai., 1997; Nagata és mtsai., 2001). Egerekben szájon át adagolva, a felszívódás útját követve, először a Peyer-plakkokat, azután a mezenterialis nyirokcsomókat, végül a thymust támadta meg a toxin (Nagata és mtsai., 2001).

Túry és mtsai. (1989) a T-2 toxinnal etetett (5 mg/takkg) sertés lymphoid szerveinek vizsgálatára irányuló kísérletükben a thymusban és a lépben

tapasztalták a legjelentősebb elváltozásokat. Rafai és mtsai. (1995b) kísérleteikben bizonyították, hogy 0,5 mg/kg T-2 mikotoxin koncentrációjú takarmány etetése 7-10 nap alatt károsítja az immunrendszert, így közvetve hozzájárul a fakultatív patogén mikroorganizmusok által kiváltott betegségek kialakulásához.

Immunstimuláns hatást Weber és mtsai. (2006) mutattak ki egy T-2 mikotoxin dózis és expozíciós idő függő hatásának vizsgálata során. A hivatkozott kísérletben 14 napon át etettek brojlercsirkéket 2,35 és 4,18 mg/takkg dózissal T-2 mikotoxinnal. Az alacsonyabb dózis esetében mutattak ki növekvő antitesttermelést a Newcastle vírus elleni vakcinázást követő első napon.

2.2.6.2. Hatás a szaporodási folyamatokra

A reprodukciós eredmények diagnosztikai, állomány egészségügyi és termelés ökonómiai szempontból meghatározóak. Az állatok egészségi állapotát állomány szinten a szaporodási mutatók tükrözik. A szaporodási mutatókat a genetikai determináltság és a környezet alakítja. Korábban a fogyasztóvédelmi biztonsági vizsgálatokban az akut toxicitásra, a rákkeltő és a fejlődési rendellenességet okozó hatásokra fektették a hangsúlyt. Napjainkra az ún. reprodukciós- és/vagy genetikai toxicitás fontosságát is kezdik figyelemmel kísérni. Kezdetekben ezeket a vizsgálatokat elsősorban a nőivarban végezték. Mára felismerték, hogy a hím állatok hasonló érzékenységet mutatnak a környezetterhelő anyagok iránt. Ezt alátámasztja a WHO tanulmánya, mely szerint az elmúlt 15-20 évben a férfiak spermium koncentrációja felére csökkent. Napjainkban a meddőség forrása 40-40%-ban valamelyik fél és 20%-ban a pár mindkét tagja (Cseh és Kovács, 2010). A kis mennyiségű, de hosszú ideig tartó toxinfelvétel idéz elő

szaporodásbiológiai zavarokat. A hím állatokon végzett kutatások száma igen csekély. Bikákban erősen szennyezett takarmány esetén a sperma minőségének erőteljes romlását tapasztalták, mely elsősorban a motilitás arányának csökkenésében nyilvánult meg (Alm és mtsai., 2002).

A szennyezőanyagok gátolhatják a hím állatok szaporodását azáltal, hogy zavart okoznak a spermiogenezisben és a spermiumok fejlődésében. Az előbbi csökkenti a spermiumszámot, az utóbbi fokozza a rendellenes spermiumok számát, illetve azok százalékos előfordulását. Ez a két hatás együttesen, illetve egymástól függetlenül is közreműködik a csökkent termékenység és a terméketlenség kialakulásában. További kártételként jelentkeznek a szaporodásbiológiai zavarok. A mikotoxinok több aspektusban is befolyásolhatják a hím reprodukciós képességet, úgymint a spermatogenezisnél, Leydig-sejtek funkciójában, szeminális plazmatermelésben vagy a toxinnal kezelt hímekekkel párosztatott nőstények esetén jelentkező alomméretben (Egbunike, 1982; Ibeh és mtsai., 1994; Ibeh és Saxena, 1998). Azonban a mikotoxinok spermatozoákra kifejtett hatásmechanizmusa nem ismert, még alig vizsgált terület. Így a pontos hatásmechanizmus, dózishatás ismerete az egyes mikotoxinokra vonatkozóan ellentmondásos eredményeken alapul. A T-2 reprodukcióra kifejtett hatásait elsősorban sertés és baromfi fajokban vizsgálták. A vemhesség utolsó negyedében adagolt toxin fokozott mortalitást váltott ki sertésben (Ványi és mtsai., 1991), míg a vemhesség utolsó harmadában, majd választásig adagolt T-2-nek nem volt hatása a mortalitásra (Weaver és mtsai., 1978a). Hathetes malacokkal 13,52 mg T-2/takkg és 5,42 mg HT-2/takkg adagban külön-külön etetett toxinok méh atrófiát váltottak ki (Palyusik és mtsai., 1990). A T-2-vel és más trichotecén toxinnal szennyezett takarmányok romló termékenyülési eredményeket okoztak a kocasüldőknél és az anyakocáknál. Patomorfológiai vizsgálatok

eredményeként kimutatták, hogy az ivarzási ciklus és a sárgatest képződés zavara a méh és méhnyálkahártya elhalásával jár együtt (Ványi és mtsai., 1995). Alacsony dózisu, szájon át adagolt T-2 toxin üszőkben petefészek működési zavarokat okozott, kérődzőknél késleltette a sárgatest képződését és a peteérést (Huszenicza és mtsai., 2000). A kocák nem ivarzanak, a ciklikus ovulációk leállnak, romlik a vemhesülési arány és a sikertelen termékenyítés után a visszaivarzás késve jelentkezik, illetve elmarad (Rafai és Bata, 1998).

Szűz nőtény nyulaknál petefészek működési rendellenességet és alacsony plazma progeszteron szintet mutattak ki (Fekete és mtsai., 1992). Baromfinál negatívan befolyásolja a tojásképzést és a keltethetőséget (Speers és mtsai., 1977; Tobias és mtsai., 1992; Diaz és mtsai., 1994; Ványi és mtsai., 1994a; Bata és Rafai, 2001). Ványi és mtsai. (1994b) dózisfüggő negatív hatást mutattak ki tojó ludakban.

Yang és mtsai. (2016) nőtény patkányokon igazolták a T-2 többrétű, közvetett károsító hatását az ivari folyamatokra. A toxin a reproduktív szervek (méh, petefészek) súlycsökkenését idézte elő. A méh izomzat és az endometriális mirigyek száma csökkent; a petefészekben végbemenő sejt képződésben zavart okozott, valamint a hüvely nyálkahártyájában is kóros elváltozást váltott ki. Csökkent az LH és FSH, valamint az ösztrogén szint. Más oldalról viszont nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre a T-2 toxin szaporodásbiológiai hatásairól hím állatok esetében, ezek is többnyire baromfi fajra korlátozódnak. A 0,1-3,0 mg/kg adagban bevitt T-2 nem befolyásolta a spermioenezist és nem okozott rendellenességet a here epithelsejtjeiben gunarakban (Ványi és mtsai., 1994b). A T-2 nem csökkentette a kakasok hereműködését, de a párzási kedv már kis mennyiségű toxin hatására is csökkent. A T-2-vel kezelt gunarak szintetikus

GnRH injekció hatására szignifikánsan kisebb tesztoszteron-termeléssel reagáltak (Nikodémusz és Mézes, 1992).

Károsítja a tesztoszteron szintézist és a spermatogenezis folyamatát (Eriksen és Pettersson, 2004; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Yang és mtsai., 2015a). Chandratre és mtsai. (2014) magas dózist alkalmazva (20 ppm) a spermatogonium károsodását figyelték meg, csökkent a spermatidák száma és a spermatogenikus aktivitás.

2.2.6.3. Egyéb károsító hatások (testsúly, termelés, nyálkahártya erózió, emésztőkészülék, vérképzés stb.)

A T-2 toxin elsődleges hatása a vérképző rendszerben a leukopénia (alacsony fehérvérsejt szám) és a koagulációs zavar kiváltása. A neurotoxikus hatás vizsgálatok során eltérő eredményeket kaptak az egyes szerzők. Károsodást csak magas dózis esetén mutattak ki, így ennek a potenciális veszélyét elvetették. Karcinogén hatást egér, patkány és szivárványos pisztráng esetén észleltek szájon át történő adagolást alkalmazva, valamint egérnél bőrön át adagolva egyaránt (IARC, 1993; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010). Humán vonatkozásban nincs adat karcinogenitással kapcsolatban. Ezért az IARC 1993-ban a karcinogén anyagok 3-as csoportjába (nem minősülnek emberben rákkeltőnek) sorolta, figyelembe véve azt is, hogy az állatkísérletek során kapott eredmények sem adnak elegendő bizonyítékot a karcinogén hatásra (Eriksen és Pettersson, 2004; Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; Chandratre és mtsai., 2014). Chandratre és mtsai. (2014) magas dózist (20 ppm) *ad libitum* 14 napon át alkalmazva szignifikáns testsúlycsökkenést, hányást, anorexiát, letargiát, púpos tartást, csökkent takarmányfelvételt észleltek patkányokban.

Csökkenett a létfontosságú szervek relatív súlya, romlottak a hematológiai paraméterek, oxidatív stressz alakult ki.

Frankic és mtsai. (2006) 10 mg/takkg T-2-t *ad libitum* etetve, 17 napos periódust követően, szintén észlelték a testsúly, a takarmányfelvétel és a szervek relatív súlyának csökkenését csirkékben.

A takarmányfelvétel csökkenés hátterében a központi idegrendszer zavara áll. A szájon át felvett toxin gyulladásozó citokinek termelődésének serkentése révén vált ki takarmány-visszautasítást (Gaigé és mtsai., 2014).

Rafai (1997) brojlercsirkékkel végzett kísérletében a T-2 már 0,2 mg/takkg mennyiségben is takarmány-visszautasítást váltott ki, ennek következtében kis mértékben csökkent a súlygyarapodás is, a fajlagos takarmányfelhasználás azonban nem módosult. A toxin tartós etetése (0,4-0,6 mg/kg takarmány, 5 héten át), a kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok eredményei alapján, a lymphoid szervek sorvadását, csökkent ellenanyagtermelést és a vérképzés romlását okozta (Rafai és Bata, 1998).

A kérődző állatok a bendőmikrobák detoxikáló képességének köszönhetően általában toleránsabbak a mikotoxinnal szennyezett takarmányokkal szemben, mint az együregű gyomrú állatok (Akanke és mtsai., 2006). A szarvasmarha bendőjében a T-2 toxin HT-2-vé majd T-2 tetraollá alakul, így biológiai aktivitása csökken. Ennek köszönhetően a szarvasmarha nem különösebben érzékeny a trichotecén toxinokkal szemben. A juh bendő detoxikáló kapacitása szerényebb, mint a szarvasmarháé, 24%-os elhullást tapasztaltak a két hónapon át 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 mg/takkg koncentrációban T-2, illetve HT-2 toxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó állatok körében (Friend és mtsai., 1983). A takarmány minősége is meghatározó tényező a bendőben történő toxinsenlegesítés szempontjából. A szálatakarmány struktúrájánál fogva lassabban emésztődik, így több idő jut a toxin lebontására, mint abraktakarmány esetén (Rafai és Bata, 1998). Problémák

idősebb, illetve bendőműködési zavarokkal küzdő állatok esetében jelentkezhettek. Ez takarmány-visszautasításban, tejhozamcsökkenésben nyilvánulhat meg, de kísérleti beszámolók alapján a T-2 toxin nem hat az ellés menetére és a borjú egészségére.

Patkányok esetében kardiomiopátiát tapasztaltak (Magnuson és mtsai., 1987), míg a rhesus majmok és a macskák az emberi ATA-hoz hasonló tüneteket mutattak (Lutsky és Mor, 1981).

A gazdasági állatfajok közül a sertés a legérzékenyebb a T-2 mikotoxinra (Ratcliff, 2002). Megbetegedésre csak ritkán kerül sor, hiszen a sertések általában nem fogyasztják el a szennyezett takarmányt, bár ezt befolyásolja a toxin koncentrációja a takarmányban és az állatok egyedi érzékenysége. A mérgezés hatásaként csökken a takarmányfogyasztás és emiatt a testsúlygyarapodás elmarad az elvárhatótól. Ez a hatás 1 mg/kg koncentrációtól már szignifikáns eltérést eredményez növendék sertésekben (Rafai és Bata, 1998). Rafai és mtsai. (1995a) dermatotoxikus hatást is észleltek 4 mg/kg koncentrációjú toxinbevitel esetén. Túry és mtsai. (1989) 25 napon keresztül 5 mg/takkg T-2 toxint etettek növendék sertésekkel. Az állatok ajkain, pofájuk nyálkahártyáján kimaródást, nyelvükön hámsiányt észleltek. A vesemedence hámsejtjeiben súlyos vacuolás elfajulást figyeltek meg. Utóbbi, Fekete és mtsai. (1983) szerint, nyulakkal végzett vizsgálataikra alapozva, a vizelettel ürülő toxin, és annak metabolitjai okozhatták. Csökkent a malacok testsúlya, melyet a takarmány-visszautasító hatásnak (49-77%) tulajdonítottak. Mindegyik állatban lép és mellékvese károsodást figyeltek meg. A kezelt állatok májában hepatocytá degenerációt írtak le.

Weaver és mtsai. (1978b) 8 hétig etettek sertésekkel 1, 2, 4, 8 mg/kg T-2 toxinnal szennyezett takarmányt. Úgy találták, hogy a toxin nem hatott a fehérvérsejtszámra és a lymphoid szövetekre. Friend és mtsai. (1983) 0,4,

0,8, 1,6, 3,2 mg/takkg koncentrációban adagolták a T-2 toxint, ami nem módosította a vörösvértestszámot, a vörösvértestek közepes térfogatát, a hematokrit értékét és a hemoglobin koncentrációt. Bata és Rafai (2001) a tolerálható határértékeket tanulmányozták az ellentmondások feloldása érdekében. Malacokkal 3 héten át etettek 0,5, 1,0, 2,0 és 3,0 mg/takkg T-2-t. Már a legkisebb koncentráció esetén is megfigyelhető volt a csökkent testsúlygyarapodás, melynek oka a takarmány-visszautasítás lehetett. Egy ludakon végzett kísérlet során a 0,1 mg/ts kg T-2 adagolásakor már megfigyelhető volt a tojástermelés csökkenése és a keltethetőség romlása. A 0,5-0,6 mg/kg-os expozíciónál a tojástermelés, míg már 0,3 mg/ts kg koncentráció esetén a keltethetőség 50%-os visszaesése volt megfigyelhető. A 0,6 mg/ts kg T-2 esetén már kisebb számú elhullás is jelentkezett. Yazdanpanah és mtsai. (1997) a T-2 hatását vizsgálták kábító fájdalomcsillapítókkal kölcsönhatásban. Az tudott, hogy a toxikózis sokkhatás következtében endogén opioidok, endorfinok szabadulnak fel. Egereken végzett kísérleteik során megállapították, hogy a morfin (opioid agonista) felerősíti, míg a naloxon (opioid antagonist) kivédheti, illetve csökkentheti a toxikózist. Sertéseken végzett agyi vérkeringési vizsgálatok során megállapították, hogy a T-2 0,6 mg/ts kg esetén a kis- és nagygyi véráramlást jelentősen csökkentette; 2,4 mg/ts kg koncentráció esetén az agytörzsi vérkeringés is csökkent. Megállapították a mérgezést követően a neurotranszmitterek vizsgálatával, hogy a hatás elsődleges helye az agy és nem kizárólag a hipoxia miatt lép fel károsodás. Antibiotikumként használt cikloheximide-del keverve a T-2 toxikus hatása fokozódik az agyban. Így a gyógyszerek hatásának módosítása kiemeli a T-2 mikotoxin kutatás fontosságát (Banczerowski, 2001).

2.2.7. PTDI adatok, EU ajánlások a T-2 és HT-2 mikotoxinokra

Az Európai Unió ajánlásokkal szabályozza a tagországokon belül a gabonafélék és a gabonatermékek mikotoxin tartalmát. Az Európai Bizottság ajánlást adott ki a T2 és HT-2 jelenlétével kapcsolatban. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) keretein belül működő Contam Panel (az élelmiszerláncba bekerülő szennyező anyagok tudományos testülete) szakvéleményt dolgozott ki a fent említett két mikotoxin állat- és közegészségügyi kockázatáról az élelmiszerekben és takarmányokban való jelenlétük alapján (EFSA, 2011). Állategészségügyi vonatkozásban a becsült értékek szerint kérődzők, nyulak és halak esetében a kitettség nem jelent állategészségügyi kockázatot. Sertés, baromfi, ló és kutya esetében a káros egészségi hatások lehetősége alacsony értéket képvisel. A macska a legérzékenyebb állatfaj a T-2 és HT-2 kontaminációra. Már alacsony (0,06 mg/ts kg) toxin kitettség esetén is súlyos egészségügyi károsodást mutatnak, így nem állapítható meg NOAEL és LOAEL érték. Macskaeledelek esetében szigorúbb szabályozások váltak szükségessé (2013/637/EU).

Megállapították, hogy a takarmányokból igen kis mértékben kerül át a szennyezettség állati eredetű termékekbe, így ezek az élelmiszerforrások elhanyagolhatóak az emberek toxin kitettségére vonatkozóan.

Még több adat gyűjtése szükséges a T-2 és HT-2 gabonafélékben való jelenlétéről, tekintve a megfigyelhető nagy éves ingadozást. Szükséges az élelmiszerek feldolgozása, valamint a mezőgazdasági tevékenységek által kifejtett hatások tanulmányozása a T-2 és HT-2 koncentrációjára, valamint metabolizációjára. Ezek alapján megfelelő mezőgazdasági, takarmány- és élelmiszer-feldolgozási módszereket kell kidolgozni a toxin termelődésének

megelőzésére, illetve csökkentését megcélózva. Az Európai Közösség ajánlása (401/2006/EK) nem tartalmazza a rizst, illetve rizstermékeket, mivel ezekben a T-2 és HT-2 tartalom kis mértékben, vagy egyáltalán nem mutatható ki. Ahhoz, hogy meghatározzák, mely esetekben kell további vizsgálatokat végezni, kidolgoztak egy úgynevezett indikatív értéket a gabonafélék és gabonatermékek esetében (16. táblázat) (Az Európai Unió Hivatalos Lapja, 2013).

16. táblázat: A gabonafélék és a gabonatermékek indikatív értékei (*)(**)
(Az Európai Unió Hivatalos Lapja, 2013)

	A T-2 és a HT-2 toxin együttes mennyiségének indikatív értékei (µg/kg)(*)
Feldolgozatlan gabonafélék (***)	
Árpa (sörárpa is), kukorica	200
Zab (magburokkal)	100
Búza, rozs, más gabonaféle	100
Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonamagvak (****)	
Zab	200
Kukorica	100
Más gabonafélék	50
Emberi fogyasztásra szánt gabonatermékek	
Zabkorpá, pelyhesített zab	200
Gabonafélék korpája, malomipari zabtermékek, malomipari kukoricatermékek	100
Más malomipari gabonatermékek	50
Reggelire való gabonafélék (formázott gabonapehely is)	75
Kenyér (kisméretű pékáru is), cukrászsütemény, keksz, gabonaszelet, tésztafélék	25
Csecsemőknek és kisgyermekeknek szánt gabonaalapú élelmiszerek	15
Takarmányként való felhasználásra szánt gabonatermékek, takarmánykeverékek (*****)	
Malomipari zabtermékek (magburok)	2000
Más gabonatermékek	500
Takarmánykeverék (kivéve: macskaeledel)	250

(*) Az e mellékletben található értékek olyan indikatív értékek, amelyek felett -többszöri kimutatás esetén bizonyosan- ajánlott vizsgálatokat végezni a T-2 és a HT-2 toxin nagy mennyiségeit eredményező tényezők feltárására vagy az élelmiszer- és a takarmányfeldolgozás hatásainak meghatározására. Az indikatív értékek az EFSA

adatbázisában rendelkezésre álló, az EFSA szakvéleményében bemutatott adatokon alapulnak. Az indikatív értékek nem tekinthetők takarmány-, illetve élelmiszer-biztonsági határértékeknek.

(**) Ezen ajánlás alkalmazásában a gabonafélék fogalma a rizst, a gabonatermékek fogalma a rizstermékeket nem tartalmazza.

(***) A feldolgozatlan gabonafélék azok a gabonafélék, amelyek a szárítástól, a tisztítástól és a válogatástól eltekintve nem estek át sem fizikai, sem hőkezelésen.

(****) A közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonamagvak azok a gabonamagvak, amelyek átestek szárítási, tisztítási, magburokeltávolítási és válogatási folyamatokon, de az élelmiszerláncban való további feldolgozásuk előtt más további tisztítási és válogatási műveleteken nem esnek át.

(*****) A takarmányként való felhasználásra szánt gabonafélék és gabonatermékek, valamint a takarmánykeverékek indikatív értékei 12% nedvességtartalmú takarmányra vonatkoznak.

A rákkeltő hatású toxinok esetében az az alapelv, hogy nincs olyan dózis, melynek ne lenne rák kialakulását indukáló hatása. Így ezen toxinok esetében nincs tolerálható érték, ezek jelenléte nem elfogadott az élelmiszerekben (Fan és Tomar, 1999). A JECFA és a FAO számos mikotoxin esetében elvégezte a kockázatbecslést és tolerálható határértékeket határozott meg: PMTWI (Provisional Maximum Tolerable Weekly Intake) és PMTDI (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake), melyek a NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) állatkísérletekben történő meghatározásán alapulnak általában /100-as biztonsági faktort alkalmazva. A T-2 és a HT-2 esetében a PMTDI értéket 60 ng/ts kg/nap-ban határozták meg (WHO, 2001). A 2001-es tanulmány szerint a gyermekek által közkedvelt élelmiszerek a legkritikusabbak a szennyeződés szempontjából (FDA, 2001). A T-2 és HT-2 felvétel a legtöbb esetben a tTDI (temporary TDI) érték feletti volt. Az eddigi kutatások eredményei alapján, az SCF (Scientific Committee on Food) és a JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) szervezetek a T-2 és HT-2 toxinra együttesen adtak meg átmeneti tolerálható napi beviteli értéket (tTDI), mivel a HT-2 esetében a TDI és a NOEL (no observed effect level) érték meghatározásához nem álltak rendelkezésre megfelelő adatok (SCF

2001.; JECFA 2001). Rafai és mtsai. (1995b) kísérletük alapján megállapították, hogy alig egy hetes kezelést követően a T-2 toxin már 0,5 mg/takkg koncentrációban is csökkentette a vérpályában keringő fehérvérsejtek számát, a T-lymphocyták arányát, az ellenanyagképzést, valamint a sejtes immunitás számos paraméterét. A JECFA és a SCF ezen eredményeket vette alapul és állapította meg tTDI (temporary Tolerable Daily Intake) értéként a 0,06 µg/ts kg koncentrációt (Schlatter, 2004). Mindkét bizottság hangsúlyozta annak fontosságát, hogy a két toxin esetében külön-külön is történjen kockázatbecslés és a tolerálható érték meghatározása (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010).

Az Európai Tanács nem határoz meg maximálisan megengedhető határértéket a két toxinra külön-külön, csak együttes koncentrációjukat szabályozza (17. táblázat).

17. táblázat: A T-2 és HT-2 toxin maximálisan megengedhető együttes határértéke (Van der Fels-Klerx és Stratakou, 2010)

Élelmiszer típusa	Maximálisan megengedett érték (µg/kg)
Feldolgozatlan gabona és gabona alapú termékek	100
Feldolgozatlan zab	500
Zab alapú termékek	200
Bébiétel	50

1998-ban egy fuzáriummal foglalkozó munkacsoport (Eriksen és Alexander, 1998) az átmenetileg tolerálható napi beviteli értéket (tTDI) 0-0,2 µg/ts kg/nap-ban határozta meg T-2 és HT-2 mikotoxinra vonatkozóan együttesen, a lehetséges karcinogén hatását alapul véve és 1000-szeres biztonsági faktort alkalmazva a NOAEL érték alapján. A szerzők véleménye szerint, ez az érték védelmet nyújt az immunotoxikus és egyéb kritikus toxikus hatásokkal szemben egyaránt (Eriksen és Alexander, 1998). Rafai és mtsai. (1995a) sertéseken végzett kísérletük során 0,029 mg/ts kg/nap

LOAEL értéket kaptak, 500-as biztonsági faktort alkalmazva. Ezt az értéket a T-2 és a HT-2 mikotoxin együttes, illetve egyedüli jelenléte esetén egyaránt alkalmazták. Ez megalapozta az SCF által 2001-ben meghatározott tTDI értéket, melyek védelmet biztosítanak krónikus, szubkrónikus és reprodukzív hatásokkal szemben egyaránt (Schuhmacher-Wolz és mtsai., 2010; EFSA 2011). A két toxin esetében az együttes napi tolerálható beviteli (TDI) értéket 100 ng/ts kg-ra módosította a CONTAM (Élelmiszerlánc szennyeződés) Panel a BMDL50 (95% lower confidence limit for the benchmark dose for a 50% response) érték alapján. A rendelkezésre álló előfordulási adatok alapján végzett becslés szerint, ez nem jelent közvetlen egészségügyi aggályt, mivel minden korcsoportnál a toxinnal való kitettség nem éri el a TDI értéket (EFSA 2011). 2011-2016 között 11 európai országban végeztek egy igen sokrétű élelmiszer- és takarmányvizsgálatot a T-2 és HT-2-re vonatkozóan. Ennek egyik eredményeként meghatározták a korosztályonként elfogyasztott T-2 és HT-2 mennyiségét (18. táblázat) (Arcella és mtsai., 2017).

18. táblázat: Átlag T-2 és HT-2 terhelés korosztályonként Európában (Arcella és mtsai., 2017)

Korosztály	T-2 fogyasztás			HT-2 fogyasztás		
	Min	Középérték	Max	Min	Középérték	Max
	ng/ts kg/nap					
Csecsemő	10,2	16,9	40,6	12,9	23,1	50,9
Kisgyerek	26,8	36,2	43,8	40,4	47,7	54,8
Gyerek	20,7	30,0	41,9	28,5	39,8	52,6
Serdülő	9,76	18,2	26,4	12,8	24,3	34,3
Felnőtt	9,58	13,4	18,4	12,5	17,1	23,4
Idős	9,06	12,2	16,3	11,9	15,3	20,3
Agg	9,77	13,0	14,2	12,9	16,7	18,4
Várandós	-	-	15,3	-	-	21,6
Szoptató anya*	-	-	11,0	-	-	14,6

*csak egy adat állt rendelkezésre

Számos tanulmány arra a következtetésre jutott, hogy a hím állatoknál kialakuló szaporodási zavarok és meddőség tekintetében a környezeti tényezők közül a legfontosabb szerepet a mikotoxinok játsszák, mint a leggyakrabban előforduló táplálkozási mérgek, azonban az erre irányuló kísérletek száma igen csekély. A gabona és egyéb növényi alapú élelmiszerek gyakran szennyezettek *Fusarium* toxinokkal. E csoport képviselői a T-2 és a HT-2 mikotoxin, melyek jelenléte közt erős összefüggés mutatható ki. Számos kísérlet alkalmával bizonyították e két mikotoxin sejtkárosító hatását, azonban a két toxin egymásra gyakorolt hatása még kevésbé kutatott terület. A T-2 károsító hatásait már számos területen bizonyították. Azonban a tolerálható értékekről és a károsítás mértékéről ellentmondásokba ütköztek.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Míg a reprodukcióra gyakorolt toxikus hatás a nőivarban jól ismert, az egyes mikotoxinok hatásaival és hatásmechanizmusával kapcsolatos ismereteink hiányosak a hím reprodukció és a spermatermelés tekintetében. A T-2 és a HT-2 toxin citotoxikus hatása bizonyított.

A kutatómunka során a kitűzött céljaim az alábbiak voltak:

1. A sejtkárosító hatás meghatározása *in vivo*: a T-2 toxin spermiogenezist befolyásoló hatásának vizsgálata, valamint a hím állatok egyéb reprodukciós paramétereire gyakorolt hatásának meghatározása nyúlban, egy rövid idejű, nagy dózisu és két krónikus, alacsony dózisu terhelés esetén.
2. Sertés limfociták alkalmazhatóságának tesztelése a citotoxikus hatás MTT teszttel történő meghatározásában.
3. A sejtkárosító hatás kimutatása *in vitro*, MTT tesztben: a T-2 és a HT-2 dózis- és expozíciós idő-függő, együttesen és külön-külön érvényesülő sejtkárosító hatásának meghatározása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Reprodukciós toxicitás vizsgálatok baknyulakon

Az *in vivo* kísérletek során a spermiumokat választottuk modellsejteknek, mert gyors osztódásúak és a toxikus hatásokkal szemben nagyon érzékenyek.

Az állat modellek rendkívül hasznosak a reprodukciós jelenségek vizsgálatában (Schardein és mtsai., 1985; Christian és Hoberman, 1996). A nyúl kiváló modellállat; kistestű, könnyen kezelhető, szapora és még több pozitív tulajdonsága is van. A toxikológiai vizsgálatok során szívesen alkalmazzák a spermiumok károsodásának vizsgálatára (Foote és Carney, 2000).

Három kísérletet végeztünk el baknyulakkal:

- 1. kísérlet: magas dózisu (4 mg/állat/nap), rövid ideig (3 nap) tartó T-2 expozíció;
- 2. kísérlet: alacsony dózisu (0,05, 0,1, és 0,2 mg/állat/nap), hosszan (65 nap) tartó T-2 terhelés, melyben a tisztított toxint gyomorszondán keresztül juttattuk a szervezetbe;
- 3. kísérlet: alacsony dózisu (0,33 és 0,66 mg/takkg), hosszan (65 nap) tartó T-2 expozíció, takarmányba kevert gombatenyészettel.

A kísérleti protokollokat a Somogy Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága 23.1/02322/007/2008 szám alatt engedélyezte.

4.1.1. A kísérleti állatok, elhelyezésük és takarmányozásuk

Mindhárom kísérletben tenyésztésben lévő, 9 hónapos korú, ondóvételhez szoktatott, kb. 4050-4500 g testsúlyú Pannon Fehér baknyulak (n=24) vettek részt. Az egyedi ketrecekben (42 x 50 cm) elhelyezett állatokból alakítottuk ki a csoportokat; 16 : 8 órás fényprogram mellett, az átlaghőmérséklet 16-18 °C között változott, az épületben túlnyomásos ventiláció működött. Az állatok önetetőkből fogyaszthattak étvágy szerint kereskedelmi forgalomban lévő granulált baknyúl tápot (10,3 MJ DE/kg, 15,5% nyersfehérje, 4,0% nyerszsír és 14,7% nyersrost). Vizet súlyszelepes önitátón keresztül *ad libitum* kaptak.

A T-2 gombatenyészet és a toxinnal szennyezett tápok mikotoxin tartalmát LC-MS (Shimadzu, Kyoto, Japan) készüléssel történő méréssel ellenőriztük. A homogenizált minták 50 g-ját IKA M20 laboratóriumi darálóval fix 20 000 1/perc fordulaton 2 percig daráltuk. Az extrahálás metanol:víz=75:25 keverékével, 1% ecetsavtartalommal történt. Az LC-MS analízishez Shimadzu Prominence UFLC szeparációs rendszer és LC-MS-2020 single quadrupole (ultra-fast) folyadék kromatográf - tömegspektrométer (Shimadzu, Kyoto, Japan) állt rendelkezésre, atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) és electrospray ionizációs (ESI) rendszerrel. Paraméterek: 4.5 kV interfész feszültség, 1.05 kV detektor feszültség negatív módban, 1.25 kV pozitív módban, 200 °C. A gáz porlasztásához és szárításához nitrogént használtunk (1.5 L/perc, illetve 15 L/perc áramlás). A kromatográfias elválasztás paraméterei: fordított fázisú RP-18 oszlop (2.1 × 100 mm, 2.6 µm, Kinetex™ Phenomenex USA), 50 °C. A kapott kromatogramokat a készülékhez tartozó LCSolution szoftver segítségével értékeltük. A T-2 kimutatási határa (LOD) 10 µg/kg volt. A

kontroll táp nem tartalmazott kimutatható mennyiségű T-2-t. Egyik tápban sem volt DON, ZEN vagy FUM kimutatható.

4.1.2. A gombatenyészet és a tisztított T-2 toxin előállítása

A T-2 toxin előállítása *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 törzs (Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, USA), darált kukoricán történő elszaporításával Fodor és mtsai. (2006) módszere alapján történt. 800 g kukoricadarát (sárga szemű, szemcseméret: 2-3 mm) 4,2 literes szélesszájú befőttesüvegben, lefedve autoklávoztuk 2 órán keresztül 121 °C-on, egy éjszakán át tartó áztatást és szűrést követően. Az inokulum Czapek agaron 25 °C-on 8 nap elteltével termelt gombát. A kultúrából 2,5 ml steril desztillált víz segítségével állítottunk elő spóra szuszpenziót. Steril kacs segítségével vittük át a szuszpenziót a steril, autoklávozott kukoricadarára. Az így elkészült kultúrát sötét helyen inkubáltuk 1 héten át 24 °C-on, ezt követően további 2 hétig 8 °C-on. A gombával szennyezett kukoricát ezután pár napon át szobahőmérsékleten szárítottuk. Ezt a gombatenyészetet (T-2 és HT-2 toxintartalom 5870, illetve 1300 mg/kg) kevertük a takarmányba a 3. kísérletben.

A tisztított T-2 előállításához 500 g légszáraz végső alap gombatenyészetünket kétszer extraháltuk 1,5 l metanol-víz 3:2 arányú keverékével. A gombatenyészetből extrahált T-2 és HT-2 elválasztása szilárd-folyadék extrakciót követően preparatív oszlop kromatográfiás módszerrel történt (Kametler, nem publikált adatok), mely során 96%-os tisztaságú T-2 mikotoxint állítottunk elő.

4.1.3. A T-2 expozíció módja és időtartama

4.1.3.1. Magas dózisú (4 mg/állat/nap) szubakut expozíció

(1. kísérlet)

A kísérleti csoportnak (n=12) a tisztított T-2-t szuszpenzióban gyomorszondán át adagoltuk 3 napon keresztül. Az állatok 2 ml szuszpenziót kaptak, ami 4 mg/állat napi toxinbevitelnek, vagyis <1 mg/ts kg-nak (0,78-0,99 mg/ts kg) felel meg. Az állatok takarmányfogyasztását figyelembe véve ez kb. 26 mg/kg takarmány szennyezettséget jelent. A kontroll csoport (n=12) toxinmentes szuszpenziót kapott 3 napon át.

Az egyedi takarmányfogyasztást naponta, az állatok testsúlyát a 0., 17., 29., 36., 43. és 51. napon mértük. Már a kísérlet 2. napjától kifejezett takarmányvisszautasítást észleltünk, mely a testsúlygyarapodásban visszaesést eredményezett. Annak vizsgálatára, hogy a csökkent takarmányfelvétel vagy kizárólag a toxinterhelés okoz-e szaporodásbiológiai problémákat, beállítottunk egy korlátozott takarmányfogyasztású kontroll csoportot is (n=12). A takarmányadagokat a visszautasítás arányában alakítottuk ki 10 g (1-3. napon), 30 g (4-7. nap) és 100 g (8-10. napon) takarmány/állat, ezt követően *ad libitum* takarmányozást folytattunk. Az állatok egészségi állapotát naponta 3 alkalommal ellenőriztük.

4.1.3.2. Alacsony dózisú (0,05, 0,1, és 0,2 mg/állat/nap), hosszan tartó (65 nap) toxinterhelés (2. kísérlet)

A kísérleti csoportnak (n=10) a tisztított T-2-t szuszpenzióban gyomorszondán át adagoltuk. Az állatok 0,05, 0,1, és 0,2 mg/állat/nap T-2 toxint fogyasztottak 65 napon keresztül. A kontroll csoport (n=10) toxinmentes szuszpenziót kapott 65 napon át. Az egyedi takarmányfogyasztást naponta, az állatok testsúlyát hetente mértük, az egészségi állapotukat naponta ellenőriztük.

4.1.3.3. Alacsony dózisú (0,33 és 0,66 mg/takkg), hosszan tartó (65 nap) toxinterhelés (3. kísérlet)

A második kísérlet eredményei alapján, annak meghatározására, hogy a nyulak elfogyasztják-e az alacsony dózisban T-2-vel szennyezett takarmányt, a 3. kísérletben két kísérleti csoportnak (n=10) a T-2-t gombatenyészetben, takarmányba keverve adagoltuk úgy, hogy a takarmány 0,33 és 0,66 mg/kg koncentrációban tartalmazzon T-2-t. Ez kb. 0,05, és 0,1 mg/állat/nap T-2 toxin felvételnek felelt meg. A kontroll csoport (n=10) toxinmentes takarmányt kapott 65 napon át. Az egyedi takarmányfogyasztást naponta, az állatok testsúlyát hetente mértük, az egészségi állapotukat naponta ellenőriztük.

A három kísérleti beállítást a 19. táblázatban foglaltam össze.

19. táblázat: *In vivo* kísérleti beállítások

Kísérlet	A toxin expozíció hossza (nap)	T-2 dózis (mg/állat/nap)	Expozíció módja	Mintavétel időpontja
1.	3	4	tiszta toxin gyomorszájon keresztül	a kísérlet 51. napján (48 nappal a toxinterhelés megszüntetését követően)
2.	65	0,05; 0,1 és 0,2	tiszta toxin gyomorszájon keresztül	a kísérlet 65. napján
3.	65	0,05 és 0,1 (0,33 és 0,66 mg/takkg)	gombatenyészet takarmányba keverve	a kísérlet 65. napján

4.1.4. Mintavételek, spermium vizsgálati módszerek

A szubakut toxikózis késői hatásának meghatározására a 3 napos toxinterhelés megszüntét követően a 48. napon (1. kísérlet), a krónikus terhelés hatásainak vizsgálatára a kísérleti periódus 65. napján (2. és 3. kísérlet) műhüvellyel spermamintát vettünk. Az általunk is megfigyelt elhúzódó toxinhatás (úgy mint a toxinterhelést 48 nappal követően megjelenő morfológiai abnormalitás) oka lehet a különböző sejttípusok eltérő érzékenysége a toxinokkal szemben, amit Sprando és mtsai. (2005) DON esetében leírtak különböző érettségi fázisban lévő spermiumoknál. Ettlín és mtsai. (1984) patkányokkal való vizsgálata alapján a szöveti fixációt megelőzően 28 nappal kell a toxinterhelésnek megtörténnie. E két publikáció eredményei alapján választottuk a 48 napos időtartamot az elhúzódó hatás vizsgálata érdekében. A kísérlet végén az állatokat bódítást követően elvéreztettük. Kórboncolást követően lemértük a here súlyát és mintát vettünk szövettani vizsgálatra.

A spermatológiai vizsgálatok keretében a következő paramétereket ellenőriztük:

- sperma pH-ja;
- spermiumok koncentrációja: Neubauer sejtszámláló kamra segítségével mikroszkóposan;
- spermiumok mozgása (motilitása): számítógépes sperma analizátorral (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) (Medealab TM CASA System, Erlangen Németország) teljes mozgékonyág és gyors/alacsony spermium továbbjutás vizsgálata, ahol a koncentrációt $80-120 \times 10^6/\text{ml}$ -re állítottuk be foszfát pufferes sóoldat (PBS) segítségével, minimum 500 spermium vizsgálata;
- morfológiai és acrosomális rendellenességek: natív és festett kenet (Spermac TM festés, Beernem, Belgium), minimum 200 spermium vizsgálata;
- a járulékos nemi mirigyek funkciójának ellenőrzése: az ondóplazma citromsav (Citric Acid Test, FertiPro, Belgium), cink (Wako Chemicals GmbH, Németország), és fruktóz (Fructose Test, FertiPro, Belgium) koncentrációjának meghatározása.

A spermatológiai vizsgálatokat a SZIE ÁOTK (jelenleg: Állatorvostudományi Egyetem) Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszékének Andrológiai és Asszisztált Reprodukciós Laboratóriumában végeztük el.

4.1.5. Statisztikai analízis

A takarmányfogyasztás és a testsúlygyarapodás adatait többtényezős varianciával vizsgálom, a kezelés és a kezelési idő hatásának kimutatására. A többi paraméter esetében egytényezős varianciaanalízist vagy t-próbát alkalmaztam. Az eltérések szignifikanciáját LSD (Least

Significant Difference) post hoc teszttel határoztam meg. Mindehhez az SPSS 10.0 (2002) programcsomagot használtam.

4.2. A T-2 és a HT-2 toxin citotoxikus hatásának vizsgálata MTT-módszerrel

Az *in vitro* tesztek nagy előnye, hogy nem szükséges kísérleti állatállományt fenntartani, ezáltal nagyban csökkenthetők a kísérleti költségek. Másik fontos pozitívuma, hogy segítségével biztosítható az azonos kísérleti körülmények megteremtése, ezáltal lehetőség nyílik a könnyű ismételtetésre. Toxikus anyagoknak az állatkísérleteket megelőzően *in vitro* rendszerekben való tesztelése eleget tesz a három R (Refinement, Reduction, Replacement, azaz tökéletesítés, csökkentés, helyettesítés) elvének (Russell és Burch, 1959), melynek értelmében etikailag kívánatos az állati modellek helyettesítése más módszerekkel, modellekkel.

Az általunk használt módszer gyors, pontos, megbízható kvantitatív mérési eljárás, melyben egy lépésben nagyszámú kísérleti beállítás alkalmazható. *In vitro*, MTT tesztben, sertés limfociták felhasználásával vizsgáltuk a T-2, a HT-2 és a T-2 + HT-2 dózis- és expozíciós idő-függő citotoxikus hatását. A konkrét dózisok meghatározása egy előkísérlet eredményei alapján történt.

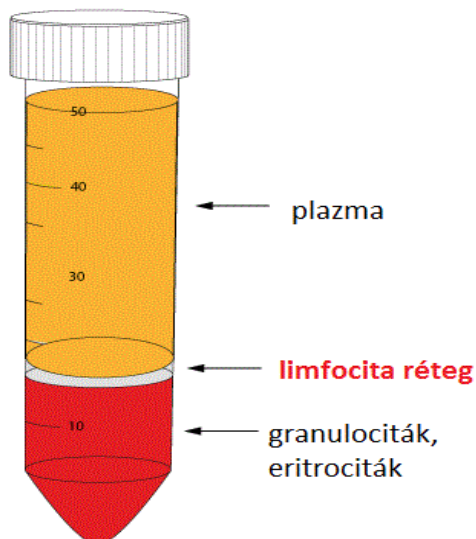
Az MTT tesztet Mwanza és mtsai. (2009) módszere alapján, kisebb módosításokkal végeztük.

Az *in vitro* kísérlet során felhasznált vegyszereket, beleértve a T-2 és HT-2 mikotoxin standardekét a Sigma-Aldrich magyarországi kirendeltségétől szereztük be.

4.2.1. MTT teszt főbb lépései

4.2.1.1. A limfociták izolálása

A vérvétel lapály-nagyfehér F1 genotípusú növendék sertésekből (4 hónapos, 24 kg-os egyedek) történt, a *vena cava cranialis*-on keresztül. A steril, heparinos vérvételi csövekbe vett vérből 3 ml-t azonos mennyiségű, RPMI-1640 (glutaminnal kiegészített) tenyésztő folyadékkal összekevertem egy 15 ml-es, steril centrifugacsőben. A vér-RPMI keveréket óvatosan rárétegeztem 6 ml Histopaque 1077 folyadékra egy másik centrifugacsőben, és ezt 30 percig 1000-es fordulaton centrifugáltam, szobahőmérsékleten. Ennek hatására a frakciók szétváltak, melyből a limfocita réteg eltávolíthatóvá vált (6. ábra).



6. ábra: A véralkotók elhelyezkedése centrifugálás hatására
(Forrás: <https://www.pluriselect.com/hu/knowledge-base/sample-material/buffy-coat.html>)

A mononukleáris sejteket tartalmazó rétegből 3 ml-t gyűjtöttem Pasteur-pipetta segítségével egy újabb centrifuga csőbe, majd feltöltöttem 12 ml-re RPMI-1640 oldattal, ezt 15 percig, 3000-es fordulaton centrifugáltam szobahőmérsékleten. A felülúszót leöntöttem, a visszamaradó pelletet fellazítottam és ismét felöntöttem 12 ml-re RPMI-1640 tenyésztő folyadékkal, majd 5 percen keresztül 3000-es fordulaton centrifugáltam szobahőmérsékleten. A felülúszót leöntve a sejtszuszpenziót fellazítva CM-ben (culture media) reszuszpendáltam, így elkészült a CCM (complet culture media), melynek végső mennyisége 10 ml. Ezután 96 lyukú plate-re helyeztem a sejtenyészetet, lyukanként 100 µl leosztással, majd 37 °C-on 5% CO₂ kiegészítéssel termosztátban inkubáltam, 24 órán keresztül. A reszuszpendálás során használt CM keverék összetétele: 1 ml FCS (foetal calf serum) vagy FBS (foetal bovine serum); 100 µl Penstrep (100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin); 150 µl glutamin és kiegészítjük RPMI-1640 tenyésztőfolyadékkal, hogy a végtérfogat 10 ml legyen.

4.2.1.2. Sejtszámlálás festékkötés alapján

100 µl CCM-et (1:1) 100 µl 0,2%-os trypan kék oldattal elegyítettem egy 1,5 ml-es eppendorf csőben, és szobahőmérsékleten 5-10 percig állni hagytam. Neubauer sejtszámláló kamra segítségével (Haemocytometer) megállapítottam az ép sejtek arányát:

$$\text{életképesség\%} = (\text{nem festődő sejtek/összes sejt}) \times 100$$

4.2.1.3. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) eljárás

A 24 órás inkubációt követően a sejtek stimulálása érdekében 20 µl PHA-t (phytohaematoglutinin) adagoltam a sejttenyészethez lyukanként. A 96-lyukú ELISA lemezen a kísérleti elrendezésnek megfelelően (20-21. táblázat) helyeztem el a vizsgált tisztított toxin adott koncentrációjú oldatából 100 µl-t. A végső térfogatot 400 µl-re állítottam be úgy, hogy a kontroll sejtekhez 200 µl, a kezeltékhez 100 µl RPMI-1640 tenyésztőfolyadékot adtam. A leolvasási időpontokhoz 1-1 lemezt állítottam elő. A lemezeket 5%-os CO₂ kiegészítéssel, 37 °C-on termosztátban inkubáltam 6, illetve 24 órán (1. kísérlet), valamint 6, 12 és 24 órán (2. kísérlet) keresztül. Az adott inkubációs idő letelte után a citotoxicitást MTT oldat hozzáadásával határoztam meg. 30 µl MTT oldatot (MTT-só PBS-ben oldva) adtam lyukanként a sejttenyészetekhez, melyet a pipetta segítségével összekevertem. Ezt követően a lemezt 2 órán át ismét inkubátorba helyeztem. Végül a formazan kristályok feloldása érdekében 50 µl DMSO-t (dimethylsulphoxide) adagoltam lyukanként, és 20 percre ismét inkubátorba helyeztem a lemezeket. Az élő sejtek az MTT-t színes formazanná alakítják át. Az optikai denzitás értéke egyenesen arányos az élő sejtek számával. Az optikai denzitást (OD) ELISA leolvasón mértem, 540 és 620 nm-en.

$$\text{életképesség\%} = (\text{ODM}/\text{ODN}) \times 100$$

(Ahol ODM a mikotoxinnal kezelt, míg az ODN a mikotoxinnal nem kezelt, azaz kontroll minták OD értéke.)

A kezelés, a koncentráció és az idő hatásának vizsgálata hat ismétlésben történt.

20. táblázat: Az 1. kísérlet során alkalmazott mikotoxin kezelések

Kezelés	Koncentráció kategóriák / toxinkoncentrációk (μM)				
	1	2	3	4	5
T-2	0,001	0,01	0,05	0,1	0,5
HT-2	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0
Kombináció	0,001 T-2 + 0,05 HT-2	0,01 T-2 + 0,1 HT-2	0,05 T-2 + 0,2 HT-2	0,1 T-2 + 0,5 HT-2	0,5 T-2 + 1,0 HT-2

21. táblázat: A 2. kísérlet során alkalmazott mikotoxin kezelések

Kezelés	Koncentráció kategóriák / toxinkoncentrációk (μM)					
	1	2	3	4	5	6
T-2	0,001	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0
HT-2	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
Kombináció	0,001 T-2 + 0,05 HT-2	0,01 T-2 + 0,1 HT-2	0,05 T-2 + 0,2 HT-2	0,1 T-2 + 0,5 HT-2	0,5 T-2 + 1,0 HT-2	1,0 T-2 + 2,0 HT-2

A kontroll sejtek életképességét vettem elméleti 100%-nak, ehhez viszonyítva számítottam a kezelt sejtek életképesség%-át.

4.2.2. Statisztikai analízis

A kísérletből származó alapadatok értékelésekor a csoportok közötti szignifikanciát többszörös varianciaanalízissel (Multiway ANOVA), illetve LSD (Least Significant Difference) és Tukey típusú „post hoc” teszttel ($P \leq 0,05$) értékeltem.

Az adatfeldolgozáshoz és a matematikai statisztikai számítások elvégzéséhez az SPSS for Windows 19 (2010) szoftver „Compare Means”, „Correlate” és „Descriptive Statistics” moduljait (SPSS Inc., Chicago IL, USA), valamint az EXCEL 2003 táblázatkezelő és ábrakeresztő programjait alkalmaztam.

A két toxin kombinációjának eredményeként mért értékeket összehasonlítottam az egyes toxinok külön-külön mért hatásai alapján várt értékekkel. A várt értékeket Šegvić Klarić és mtsai. (2012) szerint határoztam meg:

$$\text{várt \u00e1tlag (T-2 + HT-2) = m\u00e9rt \u00e1tlag (T-2) + m\u00e9rt \u00e1tlag (HT-2) - 100}$$

(kontroll)

$$\text{v\u00e1rt SD (T-2 + HT-2) = } [(\text{SD T-2})^2 + (\text{SD HT-2})^2]^{1/2}$$

Addit\u00edvnak tulajdon\u00edthat\u00f3 a hatás, ha a m\u00e9rt \u00e9s a v\u00e1rt \u00e9rt\u00e9kek nem t\u00e9rnek el egym\u00e1st\u00f3l szignifik\u00e1nsan. Ha a k\u00e9t toxin egy\u00fcttes hat\u00e1sa szignifik\u00e1nsan kisebb sejt \u00e9letk\u00e9pes\u00e9get eredm\u00e9nyezett, mint a v\u00e1rt (sz\u00e1m\u00edtott) \u00e9rt\u00e9k, akkor a k\u00e9t toxin hat\u00e1sa szinergista. Ellenkez\u0151 esetben (azaz, a m\u00e9rt \u00e9rt\u00e9k szignifik\u00e1nsan nagyobb, mint a sz\u00e1m\u00edtott) antagonizmus \u00e1ll fent a k\u00e9t toxin k\u00f6z\u00f6tt.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. A T-2 toxin hatása a baknyulak spermiumaira

5.1.1. Szubakut toxikózis hatása (1. kísérlet)

Elhullások, kórbonctani tünetek

A kísérlet során a toxint fogyasztó csoportból öt állat elhullott: 1-1 állat a 2. és 3., kettő pedig a 4. napon, egy további elhullás a 35. napon következett be. Az elhullott állatok tünetei nagyon hasonlóak voltak: a májban jól látható szerecsendió rajzolat, kifejezett centrolobuláris zsíros infiltrációval, fakó vesék gombostűfejnyitől borsónyi méretű világosabb területekkel, véres gyomortartalom, a gyomor nyálkahártyáján pontszerű bemélyedések, illetve fekélyek, fakó szívizomzat, bővérű tüdők. A 35. napon elhullott állatnál kóros mértékű lesoványodást tapasztaltunk. Az akut toxikózis tünetei voltak: lehangoltság, csökkent takarmányfelvétel és lesoványodás. A kontroll csoportban és a korlátozott takarmányfogyasztású csoportban nem jelentkezett elhullás, az állatok egészségesek voltak, kóros tüneteket nem mutattak.

A T-2 különböző fajok esetében 0,06-10 mg/ts kg expozíciónál alakít ki akut toxikózist. A hatás nem specifikus tünetekben mutatkozik, mint a súlyvesztés, takarmány-visszautasítás, dermatitisz, hányás (macska, kutya, sertés és kacs), hasmenés, vérzés és hámsejtelhalás a gyomorban és belekben, csontvelőben, lépben, herében és petefészekben (SCF, 2001). Figyelembe kell venni a nyulak relatíve nagyobb érzékenységét a T-2

mikotoxinnal szemben, melyet a viszonylag alacsony LD₅₀ érték (1,1 mg/ts kg) jelez (Wannemacher és Wiener, 1997). Ez a nagyfokú érzékenység, a cökotrófia jelensége miatt, a toxin újra fogyasztásának tulajdonítható (Fekete és mtsai., 1989b). Az SCF (2002) a tTDI (temporary tolerable daily intake) értékét T-2 és HT-2 esetében együttesen határozta meg 0,06 µg/ts kg/nap mennyiségben. Mi a T-2 toxin TDI értékének közel 15-szörösét alkalmaztuk, mely LD₅₀ érték közeli. Nem tapasztaltunk specifikus hatást, általánosan volt észlelhető a takarmány-visszautasítás, illetve az étvágy teljes hiánya (anorexia). A tipikus elhalásos elváltozások hiánya a száj nyálkahártyáján a toxinbevitel módjának köszönhető, mivel a toxint a szondával közvetlenül a gyomorba juttattuk. Az elhullott állatoknál a gyomor és bél nyálkahártya felületén kimaródásokat és fekélyeket láttunk, melyet korábban a toxin közvetlen citotoxikus hatásaként írtak le (Fekete és mtsai., 1989a). A máj, vese, szív és tüdő patológiai elváltozásait csakúgy, mint a takarmány-visszautasítást, számos szerző leírta korábban nyúlban (Niyo és mtsai., 1988a; Glávits és mtsai., 1989; Sándor és Ványi, 1990), sertésben és pulykában (Sundstøl és Pettesson, 2004).

Takarmányfogyasztás és testsúlyváltozás

Már az első T-2 toxinbevitel után is drasztikusan csökkent az állatok takarmányfelvétele (a kontroll csoport 27%-ára, $P < 0,05$); a napi takarmányfelvétel a kísérleti csoportban az első toxinbeadást követő napon 2-22 g volt. A 2-3. napon a toxin etetés hatására a takarmányfogyasztás egy állat kivételével 10 g alá csökkent. A 3. naptól, a toxin megvonását követően a nyulak takarmányfogyasztása napokig nem változott, maradt a 10 g alatti értéken, emelkedése egyedenként változó időpontban, a toxin

bevitelt követő 3. és a 10. nap között indult meg. A toxinetést követő két hétben a kísérleti csoport egyedei szignifikánsan kevesebb takarmányt fogyasztottak, mint a kontroll csoport (22. táblázat). A következő két hétben is elmaradt a takarmányfogyasztásuk a kontroll csoportétól, de a különbség már nem volt szignifikáns. A kontroll csoport fogyasztása 150-160 g körüli volt az egész kísérleti periódus alatt. A korlátozott csoport fogyasztása az első kéthetes korlátozást követően nem mutatott szignifikáns különbséget sem a kísérleti, sem a kontroll csoporthoz képest.

22. táblázat: A kísérleti és a kontroll csoport átlag napi takarmány felvétele (g, átlag \pm SD, n=12) heti bontásban

Csoport	A kísérleti napok száma						
	1-7.	8-14.	15-21.	22-28.	29-35.	36-42.	42-49.
Kísérleti (T-2)	39,8 ^{a,A} \pm 30,9	106,4 ^{a,B} \pm 33,7	139,9 ^B \pm 41,1	146,7 ^B \pm 62,3	136,9 ^B \pm 31,4	133,9 ^B \pm 19,1	144,7 ^B \pm 27,1
Kontroll	150,1 ^b \pm 20,8	159,6 ^b \pm 22,6	151,3 \pm 28,9	163,7 \pm 33,3	167,6 \pm 33,4	161,6 \pm 47,7	158,5 \pm 32,2
Korlátozott	*	*	167 \pm 38,2	158 \pm 32,7	156 \pm 30,8	162 \pm 29,3	157 \pm 25,6

^{a,b} csoportok és ^{A,B} vizsgálati időpontok közötti szignifikáns ($P < 0,05$) különbség
 *takarmány-korlátozás: 10 g (1-3. napon), 30 g (4-7. napon), 100 g (8-10. napon) állatonként, majd *ad libitum* fogyasztás

Az állatok testsúlyában a kísérleti és a kontroll csoport között csak a kísérlet 17. és 29. napján volt szignifikáns különbség (23. táblázat), a kontroll csoport testsúlyának 88%-át érte el a kísérleti csoport. A 29. napot követően a kísérleti csoport testsúlygyarapodása lassú növekedést mutatott, de nem érte el a kontroll csoport értékeit a kísérleti periódus végéig. A többi időpontban is kisebb maradt a toxint fogyasztó csoport súlya, de a különbség nem szignifikáns. Ennek háttérében a kísérleti csoportnál tapasztalt nagy szórás állhat. Egy alacsony mértékű testsúlycsökkenést figyeltünk meg a korlátozott fogyasztású csoport esetében a 10. napnál, de

ezt követően nem volt szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva.

23. táblázat: A kísérleti és a kontroll csoport egyedeinek átlag testsúlya (g, átlag \pm SD, n=12) az egyes vizsgálati időpontokban

Csoport	A kísérleti napok száma					
	0.	17.	29.	36.	43.	51.
Kísérleti (T-2)	4401 ^A \pm 269	4027 ^{a,B} \pm 523	4001 ^{a,B} \pm 677	4158 ^B \pm 559	4170 ^B \pm 553	4187 ^B \pm 585
Kontroll	4493 \pm 302	4557 ^b \pm 336	4579 ^b \pm 356	4506 \pm 370	4492 \pm 401	4493 \pm 452
Korlátozott	4381 \pm 286	4372 \pm 345 ^b	4395 \pm 370 ^b	4403 \pm 346	4450 \pm 371	4428 \pm 369

^{a,b} csoportok és ^{A,B} vizsgálati időpontok közötti szignifikáns ($P < 0,05$) különbség

A trichotecének megváltoztatják a központi idegrendszer szerotonin aktivitását. A T-2 terhelés a májban gátolja a protein szintézist, mely hyperaminoacémiát okoz, ami az agy fokozott triptofán felvételéhez és szerotonin szintéziséhez vezet. A szerotonin receptorok fontos szerepet játszanak az étvágy szabályozásában, ezáltal a szerotonin koncentráció növekedése étvágycsökkenést és takarmány-visszautasítást vált ki (Smith, 1992). Zhang és mtsai. (2017) a CCK és GLP-1 étvágy szabályozásában szerepet játszó hormonok termelődését mérték 1 mg/ts kg T-2 és HT-2 toxin adagolását követően. Kísérletük során bizonyították, hogy a két toxin hatására hirtelen hormonszint emelkedés alakul ki, mely étvágycsökkenést, takarmány-visszautasítást eredményezett az egerekben. Irodalmi adatok szerint nyulakban a legmagasabb T-2 toxinkoncentráció, mely még nem vált ki takarmány-visszautasítást 0,01 mg/ts kg (Fekete és Huszenicza, 1993). Ez a toxinszint azonban már csökkenti az immunrendszer aktivitását, megváltoztatja a májműködést, a vesék glomeruláris funkcióját és a petefészkek aktivitását (Szilágyi és mtsai., 1994).

Spermaminőség

Az ondó pH értékére nem volt hatása a toxinterhelésnek (6,9-7,2 érték között mozgott, mindegyik csoport esetében). A sperma mennyiségében (átlagosan 1 ml minden csoportnál) és az ondósejtek koncentrációjában (245-263 x 10⁶/ml) sem volt toxihatás kimutatható. A toxinnal kezelt csoportban az ondósejtek motilitása csökkent (53%) a kontrollhoz (65%) képest, azonban az eltérés nem volt szignifikáns (P>0,05). A toxinnal kezelt és a korlátozott fogyasztású csoportokban növekedett az abnormális morfológiájú spermiumok aránya (P<0,05) (24. táblázat).

24. táblázat: Normál morfológiájú spermiumok aránya (% , átlag ±SD, n=12) a kísérleti és a kontroll csoport átlagában

Csoport	Normál morfológiájú spermiumok aránya
Kísérleti (T-2)	58±25 ^b
Kontroll	89±7 ^a
Korlátozott	59±24 ^b

^{a,b} csoportok közti szignifikáns különbség (P<0,05)

A leggyakrabban előforduló morfológiai abnormalitások: farkok rendellenességek (60%), citoplazmacsepp visszamaradása, acrosoma hiány, vagy megváltozott alakú fej (7. ábra).



Citoplazma csepp maradvány



Görbült farok



Csavarodott farok

7. ábra: A spermiumoknál előforduló fő morfológiai rendellenességek

A magas dózisú toxinbevitel a szemínális plazma citromsav koncentrációjának csökkenését váltotta ki ($P < 0,05$), más összetevő koncentrációjában nem okozott szignifikáns eltérést (25. táblázat).

25. táblázat: A szemínális plazma citromsav, fruktóz és cink koncentrációja (átlag \pm SD, n=12)

Csoport	Citromsav (mg/ml)	Fruktóz (mg/ml)	Cink (mg/100ml)
Kísérleti (T-2)	2,7 \pm 1,6 ^b	2,4 \pm 1,1	702,6 \pm 109,3
Kontroll	12,8 \pm 1,3 ^a	2,4 \pm 1,0	560,0 \pm 174,5
Korlátozott	10,4 \pm 1,2 ^a	2,3 \pm 0,9	601,3 \pm 94,6

A termékenység egyik fontos tényezője a spermium motilitása, mely szignifikáns kapcsolatban van a született utódok számával (Barnett és mtsai., 1993; Krause, 1995; Parkinson, 2009). Elfogadott tény, hogy alacsony százalékban a normál ejakulátum is tartalmaz abnormális morfológiájú spermiumot. Csökkent termékenységet jelez az ondó magas arányú abnormális alakú spermiumtartalma (Kruger és mtsai., 1988; Gillan és mtsai., 2008; Parkinson, 2009). Vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy magas koncentrációjú T-2 toxin terhelés még 48 nappal a bevitel megszüntetése után is csökkent motilitást vált ki és növeli az abnormális morfológiájú spermiumok arányát. A hereműködésre kifejtett hatása, úgymint az abnormális spermiumok arányának növekedése, közvetlen citotoxikus hatásnak tekinthető, ami mutatja a trichotecének toxikus hatását a gyorsan osztódó sejtek esetében. Citotoxikus hatást eredményezhet a toxinnak a fehérjeszintézist gátló hatása (a riboszómákhoz való kötődése miatt), valamint a sejtmembrán diszfunkciója is (WHO, 1990). Az általunk is megfigyelt elhúzódó toxinhatás (úgymint a toxinterhelést 48 nappal követően is kimutatható morfológiai abnormalitás) hátterében a különböző sejtípusok toxinnal szembeni eltérő érzékenysége állhat, amit Sprando és mtsai. (2005) DON esetében leírtak. Kimutatták, hogy a DON-ra

legérzékenyebben a korai stádiumú spermatoцитák reagáltak. Kísérletünk során a takarmánykorlátozás negatívan befolyásolta a spermiumok morfológiáját. Súlyos takarmánykorlátozás és súlycsökkenés (kontroll 50-60%-a) is erősen ronthatja a reprodukciót patkányok esetében. Azonban Chapin és mtsai. (1993) eredményei alapján a Sprague-Dawley patkányok képesek tolerálni a takarmánykorlátozást és a kontrollhoz viszonyított 10-30%-os testsúlycsökkenést, akár 17 héten keresztül, minden termékenységre kifejtett hatás nélkül. A takarmánykorlátozás nyulakban is okozhat reprodukciós zavarokat (Assane és mtsai., 1995; Brecchia és mtsai., 2006). Kísérletünk során a takarmánykorlátozás alacsony (2-4%) testsúlycsökkenést eredményezett, ami aligha magyarázza a normál morfológiájú spermiumok arányának csökkenését. Ez az egyetlen általunk vizsgált paraméter, ami a takarmánykorlátozás negatív hatását mutatja.

A toxinnal kezelt csoport esetén tapasztalt csökkent motilitás oka lehet a károsodott mellékhere funkció, mely befolyásolja a spermiumok érési folyamatait (Yeung, 1995; Parkinson, 2009). A plazma komponensek koncentrációjának csökkenése általában jelzi a járulékos nemi mirigyek szekréciójának zavarát. Az ondóplazma összetételének változása, úgymint a citromsav koncentráció csökkenése, mint a környezeti tényező optimálistól való eltérése, okozhatja a spermiumok motilitásának csökkenését (Cooper és Yeung, 2000).

Ismert, hogy a vér-here gát rendkívül szelektív és megvédi a szervet a legtöbb toxikus anyagtól (Steinberger és Klinefelter, 1993). A trichotecének tetraciklikus vegyületek, melyek a 12-es és 13-as szénatomon epoxi csoportot tartalmaznak (SCF, 2002). Az, hogy a vér-here gáton átjutnak-e vagy sem, nem bizonyított. Egy másik magyarázat szerint a T-2 közvetlenül az agyalapi mirigyre vagy a Sertoli-sejtek inhibin termelésére van hatással, melyet Sprando és mtsai. (2005) DON esetén igazoltak. A Sertoli-sejtek

funkció zavara okozhatja az abnormális spermiumok számának növekedését. A Sertoli-sejtek ugyanis aktív szerepet játszanak a lumenben a normál morfológiájú spermiumok felszabadításában, illetve az abnormális sejtek visszatartásában.

5.1.2. Kis dózisu, hosszan tartó, nyelőcsőszondán át bejuttatott T-2 toxin hatása (2. kísérlet)

Takarmányfelvétel és testsúlyváltozás

A toxinterhelés nem volt szignifikáns hatással a testsúlyra. A kísérlet ideje alatt az állatok semmilyen toxinhatásra utaló klinikai tünetet nem mutattak, nem történt elhullás.

A T-2 toxin 0,1, illetve 0,2 mg/állat adagja az első héten szignifikánsan, 63, illetve 47%-ra csökkentette a takarmányfelvételt a kontroll csoporthoz viszonyítva. A legkisebb dózis (0,05 mg/állat) alkalmazásánál időszakos takarmány-visszautasítás jelentkezett a második héten ($P < 0,05$), míg a harmadik héten szignifikáns különbség csak a legnagyobb koncentráció esetén volt mérhető. A toxinhoz való alkalmazkodást jelzi, hogy a második hét után a toxinnal kezelt csoportoknál nőtt a takarmányfelvétel és a 4. héttől már nem volt szignifikáns eltérés (26. táblázat).

26. táblázat: Önkéntes takarmányfelvétel (g/nap, átlag±SD) kísérleti csoportonként heti bontásban

Hét	Napi T-2 bevitel (mg/állat) n=10/csoport			
	0	0,05	0,1	0,2
1	155±39 ^c	118±40 ^{bc}	98±32 ^{ab}	73±29 ^a
2	141±38 ^b	98±32 ^a	93±45 ^a	77±25 ^a
3	139±39 ^b	122±24 ^{ab}	111±35 ^{ab}	83±33 ^a
4	130±31	121±11	129±22	101±30
5	125±21	118±16	123±33	114±16
6	154±29	140±16	143±29	140±28
7	151±34	144±21	152±22	140±29
8	134±25	117±14	133±29	130±30
9	128±18	128±19	133±21	130±28

^{a,b,c} szignifikáns (P<0,05) eltérés a csoportok között

Spermaminőség

Az ondó mennyisége átlagosan 1,5 ml volt minden csoportban. A vizsgált sperma minőségi paraméterekben a csoportok közt nem volt szignifikáns különbség, kivéve a citoplazmacsepp maradvány aránya esetén, mely a legnagyobb T-2 dózisinál a kontrollhoz képest 3,2-szeresére nőtt (27. táblázat). Az adatok tendenciája azt mutatja, hogy a toxinetés negatívan befolyásolta a spermiumok motilitását, bár szignifikáns különbség nem volt mérhető a csoportok között. A morfológiai rendellenességek a következő arányban jelentek meg: 13,3%-ban (SE=0,6) a csavarodott farok, 4,5%-ban (SE=0,8) a törött farok, 2,8%-ban (SE=0,8) a kicsi fej, 1,4%-ban (SE=0,9) az akroszóma hiány és 0,7%-ban (SE=0,2) a nagy fej. Azonban az egyes csoportok között szignifikáns különbséget nem mutatott az abnormális morfológiájú sejtek aránya.

27. táblázat: A vizsgált sperma minőségi paraméterek (átlag±SD) alakulása a kezelések hatására

Paraméter	Napi T-2 bevitel (mg/állat) n=10/csoport			
	0	0,05	0,10	0,20
Spermium szám (10 ⁶ /ml)	300±136	345±159	265±139	277±111
pH	7,14±0,14	7,23±0,27	7,06±0,22	7,09±0,16
Citromsav (mg/ml)	3,23±1,6	4,06±1,86	3,56±1,2	3,51±1,79
Fruktóz (mg/ml)	1,43±0,7	1,4±0,7	1,2±0,7	0,9±0,3
Zn (µg/ml)	596±145	686±115	537±223	675±207
Normál morfológia (%)	70±14	69±19	77±8	70±7
Citoplazmacsepp maradvány	3 ^a ±0,6	5,4 ^{ab} ±2,0	2,9 ^a ±1,0	9,6 ^b ±2,4
Motilitás (%)	85,4±5,5	74,6±9,0	72,9±18,1	79,0±9,0

^{a,b} csoportok közti szignifikáns különbség (P<0,05)

A szövettani vizsgálatok eredményei

A here súlya 10,4±1,7 és 11,1±2,0 g között változott, a kezelések nem okoztak szignifikáns eltérést.

A szövettani vizsgálatok alapján a 0,05 mg/állat/nap T-2 toxinnal etetett csoportban aktív hereműködés, fiziológias spermiogenezis és ép here parenchima volt megfigyelhető. A napi 0,1 mg/állat expozíciónál a Leydig-sejtek enyhe hiperpláziája, míg a legnagyobb (0,2 mg/állat/nap) terhelésű csoport esetében emellett megnövekedett proliferatív aktivitás volt mérhető. Az utóbbi esetben a herék enyhén hiperémiásak voltak.

A T-2 toxinnak a spermiumok képződésére gyakorolt negatív hatásának lehetséges okait az előző fejezetben ismertettem. A 2. kísérletünk szövettani eredményei felvetették a Leydig-sejtek működési zavarának lehetőségét is. A hím reprodukciós folyamatok erősen tesztoszteronfüggőek. A tesztoszteron szabályozza a spermiogenezist, a spermiumok érését, az ondóplazma termelést és egyéb ivari folyamatokat (De Kretser és Kerr, 1994). Így a Leydig-sejtek esetleges diszfunkciója szintén okozhatta a spermiumok érésének zavarát, amely nagyobb arányban eredményezett olyan sejteket, amelyek citoplazmacsepp maradványt tartalmaztak. Zhang és

mtsai. (2016) *in vitro* kimutatták, hogy a T-2 károsítja az egerekből izolált Leydig-sejteket, és hogy a károsító hatás hátterében a toxin által kiváltott oxidatív stressz áll. A cito- és genotoxikus hatás kimutatására MTT tesztet, illetve comet assay-t alkalmaztak. Az oxidatív stresszt és a lipidperoxidációt jelezte a csökkent szuperoxid-dizmutáz, glutation-peroxidáz és kataláz aktivitás, és a megemelkedett malondialdehid koncentráció. Ugyancsak egerekből izolált Leydig-sejteket T-2 toxinnal kezelve igazolták azt, hogy a toxin szignifikánsan csökkenti a hCG indukált tesztoszterontermelést (Yang és mtsai., 2015b).

Egérben és patkányban 0,23 és 0,5 mg/ts kg/nap értékben határozták meg a T-2 toxin NOAEL értékét krónikus expozíciónál (SCF, 2001). A SCF szerint a megállapított tTDI (0,06 µg/ts kg/nap) érték csökkenti a krónikus, szubkrónikus és reprodukciós toxicitás hatás kialakulásának lehetőségét. Az általunk alkalmazott 3 koncentráció a TDI-nél nagyobb, de az egérben és patkányban megállapított NOAEL-nél lényegesen kisebb expozíciót jelentett (0,01; 0,02 és 0,05 mg/ts kg/nap). Az átlagos takarmányfogyasztással számolva ez 0,3; 0,6 és 1,3 mg/takkg szennyezettséget reprezentál, melyből a két alacsonyabb (0,3 és 0,6 ppm) már gyakorlati körülmények között is előfordulhat (BIOMIN, 2018).

5.1.3. Kis dózisú, takarmányba kevert T-2 toxin krónikus hatása (3. kísérlet)

A második kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a 0,05 mg/állat dózis még nem, míg a 0,1 mg/állat terhelés kismértékű változásokat okozott a vizsgált paraméterekben. Annak meghatározására, hogy a nyulak elfogyasztják-e az alacsony dózisban T-2-vel szennyezett takarmányt, a 3. kísérletben két kísérleti csoportnak (n=10) a T-2-t gombatenyészetben, takarmányba

keverve adagoltuk úgy, hogy az kb. 0,05, és 0,1 mg/állat/nap T-2 toxin felvételnek feleljen meg. Visszaméréssel a takarmány T-2 koncentrációját 0,33 és 0,66 mg/kg-nak találtuk. Így a harmadik kísérletben ezt a két dózist választottuk ki, hogy meghatározzuk, ilyen alacsony toxinterhelés okoz-e takarmány-visszautasítást.

Takarmányfogyasztás

Az állatok a kísérlet ideje alatt nem mutattak klinikai tüneteket, elhullás nem történt. A csoportok között sem a testsúlyban, sem a takarmányfelvételben nem volt szignifikáns különbség. Bár a takarmányfogyasztásban némi ingadozást megfigyeltünk, ez a kontroll csoportban is mutatkozott, nem volt toxinhatásra visszavezethető (28. táblázat).

28. táblázat: Önkéntes takarmányfelvétel (g/nap, átlag±SD) kísérleti csoportonként heti bontásban

Hét	Napi T-2 bevitel (mg/takkg) n=10/csoport		
	0	0,33	0,66
1	123±40	130±41	157±23
2	116±24	107±24	129±16
3	149±19	130±37	153±16
4	92±19	85±28	96±14
5	132±8	104±28	129±26
6	146±20	137±33	151±24
7	108±18	106±21	120±16
8	123±40	130±41	157±23
9	116±24	107±24	129±16

Spermaminőség

A vizsgált spermaminőségi paraméterek közül egyik sem mutatott szignifikáns különbséget a toxinnal kezelt és a kontroll csoportok között (29. táblázat).

29. táblázat: A vizsgált sperma minőségi paraméterek (átlag±SD) alakulása csoportonként

Paraméter	Napi T-2 bevitel (mg/takkg) n=10/csoport		
	0	0,33	0,66
Spermium szám (10 ⁶ /ml)	213±102	244±167	211±88
Normál morfológiájú sejtek aránya (%)	77±12	75±9	77±10
Citoplazmacsepp előfordulásának aránya (%)	3±2	4±1,7	6±3,4
Motilitás (%)	70±8	70±4	68±15
Citromsav (mg/ml)	2,0±0,9	3,3±1,5	2,1±1,3
Fruktóz (mg/ml)	1,7±0,6	2,1±0,8	1,8±0,6
Cink (µg/ml)	672±97	601±100	647±159

A szövettani vizsgálatok eredményei

A here súlya 12,4±1,7 és 14,1±2,0 g között változott, a kezelések nem okoztak szignifikáns eltérést.

A szövettani vizsgálatok alapján minden állatban aktív hereműködés, fiziológiás spermiogenezis és ép here parenchima volt megfigyelhető. A here tubulusok dajka sejtjei normális eloszlásúak és alakúak voltak. Az őssejtek különböző fejlődési stádiumban, megfelelő arányban és számban voltak jelen. Az interstitiumban kóros eltérés nem volt látható. A Leydig-sejtek száma, formája, szerkezete megfelelő volt.

Ahogy ezt az 1. kísérlet eredményeinek értékelése során kifejtettem, a T-2 által kiváltott takarmány-visszautasítás háttérében a központi idegrendszerben megváltozó hormonális hatások állnak (Smith, 1992; Zhang és mtsai., 2017). Fekete és Huszenicza (1993) eredményei alapján a legnagyobb T-2 koncentráció, mely még nem okoz takarmány-visszautasítást nyulak esetében 0,01 mg/ts kg volt. Esetünkben a 2. kísérletben 0,05 mg/állat (azaz ugyancsak 0,01 mg/ts kg) T-2 bevitel átmeneti, csak az expozíció 2. hetében jelentkező takarmányfelvétel visszaesést okozott, melyet pár napon belül kompenzált az állat. A két

nagyobb dózis (0,1 és 0,2 mg/állat) esetében is a 4. héttől a kontrollhoz hasonló takarmányfelvételt tapasztaltunk a gyomorszondán keresztül történő expozíció esetén. Ugyanaz a toxinkoncentráció gombatenyészettel a takarmányba keverve (3. kísérlet) nem okozott csökkenést a tápfogyasztásban, nem rontotta szignifikánsan a mért spermaminőségi paramétereket és nem okozott szövettanilag kimutatható kóros elváltozásokat. Ennek oka feltételezhetően a tisztított, etanol:víz elegyében oldott, illetve a gombatenyészettel bevitt T-2 eltérő felszívódásával és toxikokinetikájával magyarázható. A mikotoxinok a takarmányban lévő táplálóanyagokkal komplexeket képezhetnek (Meca és mtsai., 2012b). DON esetében kimutatták a folyadékban szondán át bejuttatott tiszta toxin és a természetes szennyeződés révén takarmánnyal felvett toxin eltérő biológiai aktivitását (Meca és mtsai., 2012a).

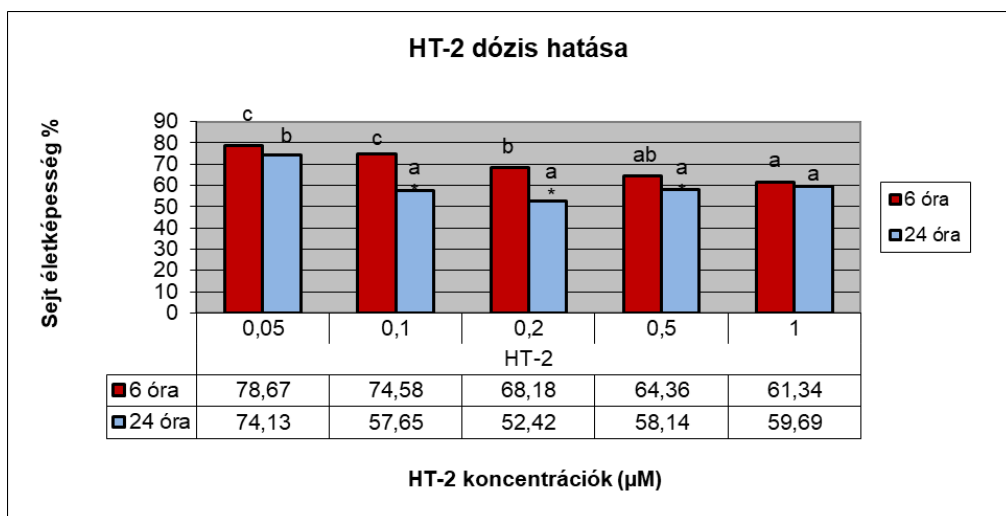
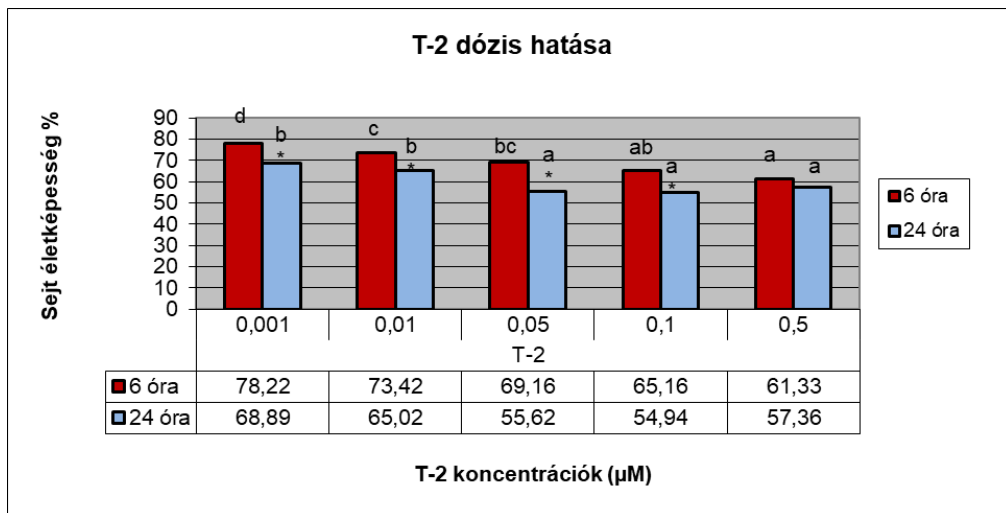
5.2. A T-2 és HT-2 toxin önálló és együttes citotoxikus hatásának *in vitro* vizsgálata idő és koncentráció függvényében

A kísérlet során három kezelést (T-2, HT-2 és a kettő kombinációja) vizsgáltam; az 1. kísérletben kezelésként öt koncentrációban, két kísérleti periódusban (6 és 24 órás terheléssel), a 2. kísérletben kezelésként hat koncentrációban, három kísérleti periódusban (6, 12 és 24 órás terheléssel). MTT módszer segítségével mértem a sejtéletképességre kifejtett hatást.

A vizsgálati koncentrációkat, a T-2 és HT-2 mikotoxin citotoxicitás vizsgálatával kapcsolatos, rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján határoztam meg. Königs és mtsai. (2009) két humán sejtvonalon végzett vizsgálataik során erősebb citotoxikus hatást állapítottak meg T-2 esetében (IC_{50} érték, mely az enzim aktivitást 50%-osra csökkenti, 0,2-0,5 μM), míg metabolitjainál, a HT-2 és neosolaniol esetében jóval alacsonyabb (IC_{50} érték 0,7-3,0 μM) hatást mértek. Hasonló eredményekről számoltak be Nielsen és mtsai. (2009), akik az IC_{50} értéket T-2 esetében 4,4-10,8 nmol/l, míg a HT-2-nél 7,5-55,8 nmol/l-ben állapították meg. Sertés limfocitákra vonatkozóan semmilyen adat nem állt rendelkezésünkre. Korábbi vizsgálatunkban (Mwanza és mtsai., 2009), FB1 és OTA önálló és együttes citotoxikus hatásának *in vitro* MTT tesztben történő vizsgálatakor igazoltuk, hogy a sertés limfociták érzékenyen reagálnak a mikotoxinok sejtkárosító hatására, és praktikusán jól alkalmazhatóak citotoxicitás és mikotoxin kombinációk tesztelésében.

5.2.1. Az első kísérlet eredményei

A vizsgálat során mindkét toxin mutatott dóziszfüggő hatást (8. ábra).



n=6, *szignifikáns (P<0,05) eltérés 6 és 24 óra között, ^{a,b,c,d} szignifikáns (P<0,05) eltérés az egyes koncentrációk közt

8. ábra: A sejtek életképességének változása 6 és 24 óra elteltével T-2 (0,001, 0,01, 0,05, 0,1 és 0,5 µM) és HT-2 (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 és 1,0 µM) esetében növekvő toxinkoncentrációval

A 6 órás inkubációt követően a T-2 0,001-ről 0,5 μM -ra, illetve HT-2 esetében a 0,05-ről 1,0 μM koncentrációra való növekedése a sejtek életképességének 17%-os visszaesését váltotta ki. 24 órát követően a sejtek életképessége szignifikánsan alacsonyabb volt a 6 órás értékeknél minden koncentrációban, kivéve T-2 esetében 0,5 μM , illetve HT-2-nél 0,05 és 1,0 μM koncentrációknál. A 24 órás inkubációt követően a T-2 toxinkoncentráció növekedése 0,001 μM -ról 0,1 μM -ra 14%-os visszaesést okozott a sejtek életképességében, további csökkenés a toxinkoncentráció növekedésével (0,5 μM -ra) nem tapasztaltam. HT-2 esetében a legmagasabb életképesség-csökkenés (22%) 0,2 μM -nál volt mérhető.

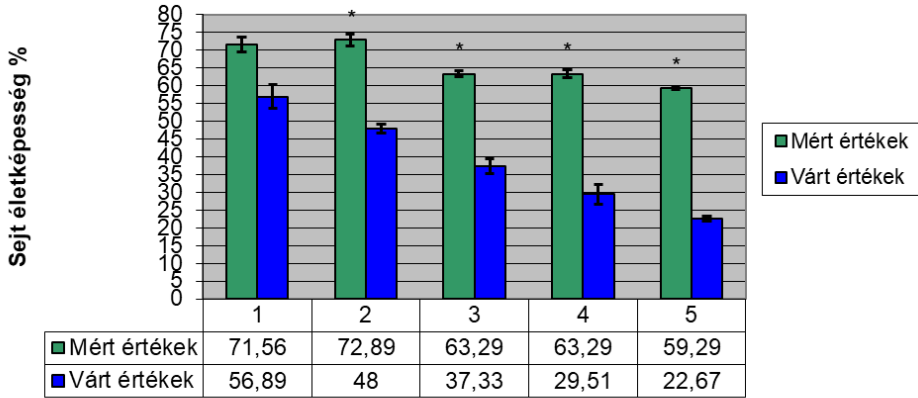
Szignifikáns ($P < 0,001$) interakciót figyeltem meg koncentráció x kezelés, illetve koncentráció x idő kapcsolatában, míg az idő x kezelés viszonylatában nem volt statisztikailag igazolható ($P = 0,084$).

A T-2 és HT-2 kölcsönhatásának becsült értékét Šegvić Klarić és mtsai. (2012) módszere alapján számoltam ki, melyet a mért értékekkel hasonlítottam össze (9. ábra).

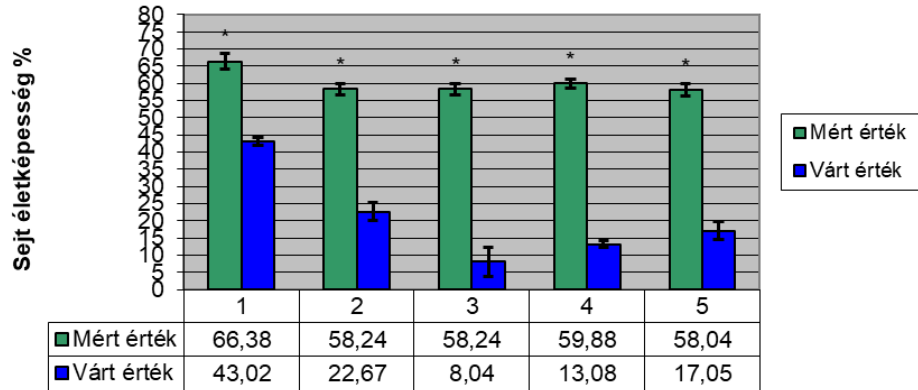
A 6 órás inkubációt követően minden koncentráció esetében magasabb sejt életképességet mértem a számított értékhez viszonyítva, a legalacsonyabb koncentrációt kivéve, ahol a különbség nem volt szignifikáns.

Ha összehasonlítjuk a toxinok együttes és külön-külön kiváltott hatását, azonos koncentrációban és inkubációs időben (10. ábra), látható, hogy a két toxin kombinációban következetesen alacsonyabb sejt túlélést okoz, mint egyedüli szennyezőként a 6 órás inkubációs idő leteltét követően.

T-2 és HT-2 együttes hatása 6 órás toxinkezelés esetén



T-2 és HT-2 együttes hatása 24 órás toxinkezelés esetén



n=6, *szignifikáns ($P < 0,05$) eltérés a mért és a várt értékek között

1: 0,001 T-2 és 0,05 HT-2 toxinkoncentráció

2: 0,01 T-2 és 0,1 HT-2 toxinkoncentráció

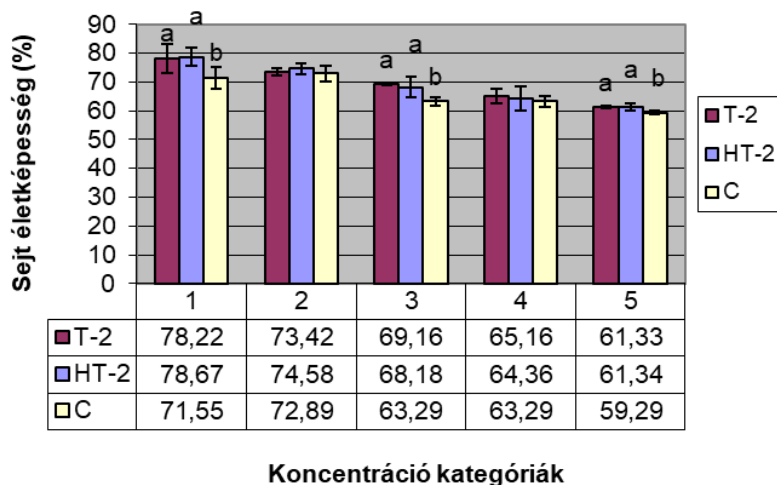
3: 0,05 T-2 és 0,2 HT-2 toxinkoncentráció

4: 0,1 T-2 és 0,5 HT-2 toxinkoncentráció

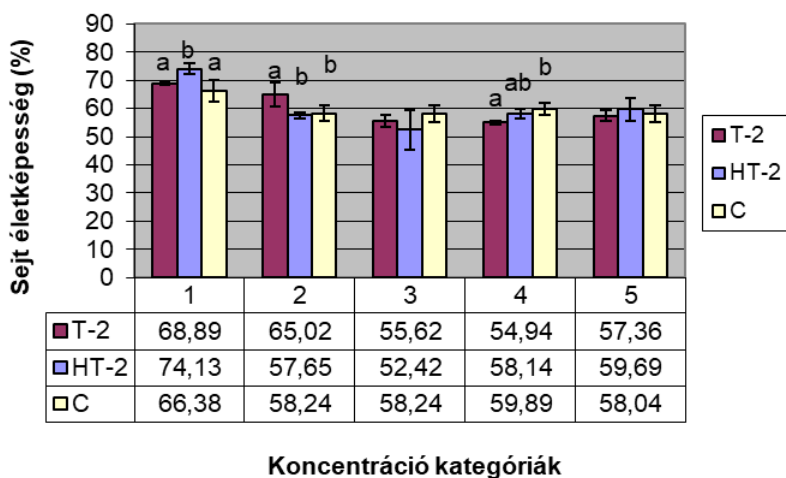
5: 0,5 T-2 és 1,0 HT-2 toxinkoncentráció

9. ábra: Sertés limfociták életképessége (átlag \pm SE) 6 és 24 órás T-2 (0,001, 0,01, 0,05, 0,1 és 0,5 μ M) és HT-2 (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 és 1,0 μ M) kombinált toxin kezelés hatására, a számított várt értékekkel összehasonlítva

Koncentráció / kezelés hatás 6 órás toxinkezelés esetén



Koncentráció / kezelés hatás 24 órás toxinkezelés esetén



C=T-2 és HT-2 kombinált alkalmazása

^{a,b}szignifikáns eltérés a kezelések (T-2, HT-2 és C) között azonos toxinkoncentráció (1-5 között) és inkubációs idő esetén ($P < 0,05$)

10. ábra: A T-2 és HT-2 egyedüli és együttes hatásának összehasonlítása¹ öt növekvő toxinkoncentráció alkalmazása esetén 6 és 24 óra elteltével¹ (lásd. Anyag és módszer c. fejezet)

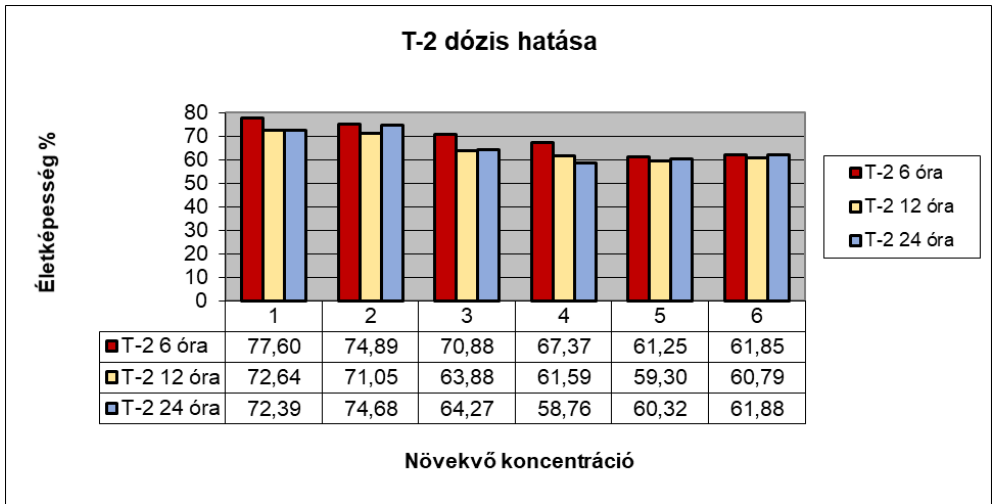
Ez a tendencia a 24 órás inkubációt követően nem volt tapasztalható, ahol a 2-es koncentráció kategória esetén a két toxin együttes hatása, míg a 4-es és az 5-ös kategóriában a T-2 és HT-2 egyedüli hatása magasabb sejttúlélést váltott ki, vagyis kevésbé volt sejttoxikus.

Összegezve megállapítható, hogy bár a két toxin együttes sejtkárosító hatása erősebb volt, mint a toxinoké külön-külön, a várt (számított) citotoxicitástól jelentősen elmaradt, azaz nem additív hatásúak egymás viszonylatában.

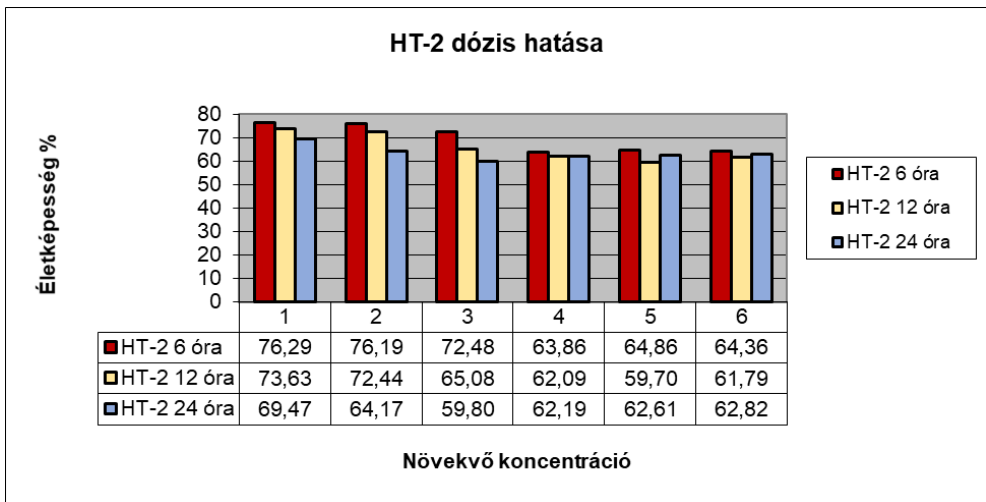
5.2.2. A második kísérlet eredményei

A második kísérletben vizsgáltam egy 12 órás inkubációs időtartamot is, valamint beiktattam egy, az előző kísérletben alkalmazott legmagasabb koncentrációjú kezeléshez képest kétszeres expozíciót.

Ebben a vizsgálatban is kimutatható volt mindkét toxin dóziszfüggő citotoxicitása (11. ábra).



T-2	1=0,001 μ M	2=0,01 μ M	3=0,05 μ M	4=0,1 μ M	5=0,5 μ M	6=1,0 μ M
6 óra	a	ac	cd	d	b	b
12 óra	a	a	b	b	b	b
24 óra	a	a	c	b	bc	bc



HT-2	1=0,001 μ M	2=0,01 μ M	3=0,05 μ M	4=0,1 μ M	5=0,5 μ M	6=1,0 μ M
6 óra	a	a	a	b	b	b
12 óra	ac	ac	c	bc	b	bc
24 óra	a	b	b	b	b	b

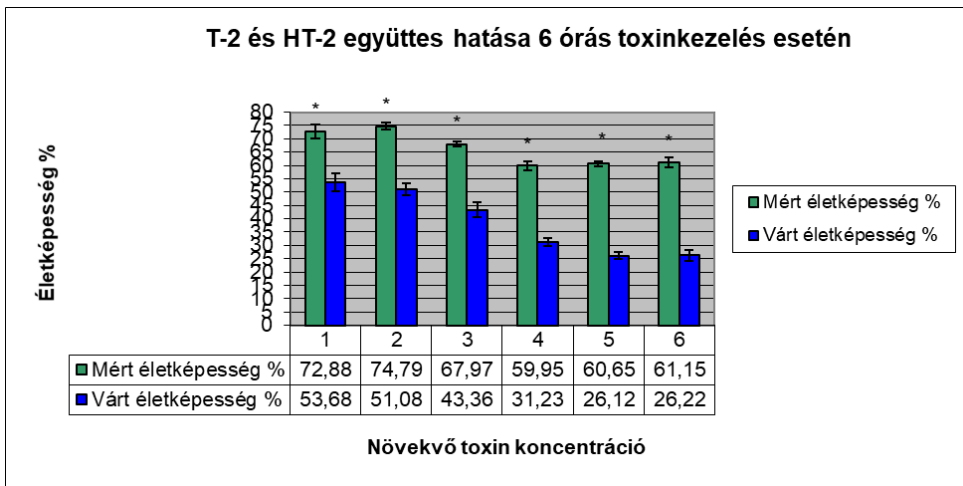
n=6, ^{a,b,c,d} szignifikáns (P<0,05) eltérés az egyes koncentrációk között

11. ábra: A sejtek életképességének változása 6, 12 és 24 óra elteltével T-2 (0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 és 1,0 μ M) és HT-2 (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 és 2,0 μ M) esetében növekvő toxinkoncentrációval

A 6 órás inkubációs idő eltelte után T-2 esetében a 0,001-ről 0,5 μM -ra való koncentráció növekedés a sejtek életképességi mutatóiban több mint 16%-os visszaesést eredményezett. A további koncentráció növekedés nem mutatott szignifikáns különbséget az eredményekben. A HT-2 esetében a 0,5 μM -nál volt a legalacsonyabb életképességi érték (12-13%-os csökkenés), mely a további koncentráció növekedéssel szignifikáns eltérést nem mutatott. A további két inkubációs periódus letelte után T-2 esetében ez a tendencia továbbra is érzékelhető a 6 órás adatokhoz viszonyítva, azonban itt a legnagyobb életképesség-csökkenés már csak 12-13%-os volt. A legerősebb hatást, az időpontokat és dózisokat összegezve, a 0,5 és az 1,0 μM T-2 koncentráció mutatta, melyek között szignifikáns eltérés nem volt mérhető. A HT-2 sejtkárosító hatása 12 és 24 óra esetén kisebb mértékben jelentkezett (10% körüli sejt túlélési csökkenés), szignifikáns eltérést csak a legkisebb koncentráció mutatott a nagyobbakhoz viszonyítva. Mindhárom időpontot együtt megfigyelve látható, hogy a T-2 toxin a legnagyobb károsítást 0,5-1,0 μM -os koncentrációban fejt ki, a 0,001 μM -hoz viszonyítva 12-16%-kal kisebb sejt túlélési%-ot eredményez. A legerősebb hatást HT-2 esetében a 12 órás terhelést követően az 1,0 μM -os koncentrációnál mértük, de a sejtkárosítás itt csak 14%-os eltérést mutatott a legkisebb HT-2 terheléshez (0,05 μM) viszonyítva.

Megvizsgáltam a T-2 és HT-2 hatását inkubációs idő függvényében koncentráció kategóriánként, melynek eredményeit az 1. mellékletben részletezek, mivel nem kötődik szorosan a vizsgálataim célkitűzéseiben megfogalmazottakhoz.

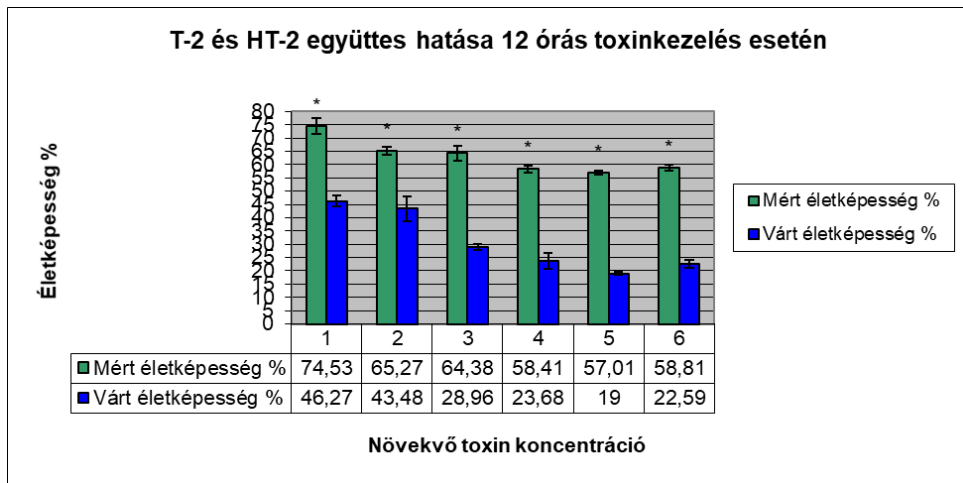
A T-2 és HT-2 kölcsönhatásának mért értékeit összehasonlítottam a Šegvić Klarić és mtsai. (2012) módszere alapján kiszámított várt értékekkel (12.a., b., c. ábra).



n=6, *szignifikáns ($P < 0,05$) eltérés a mért és a várt értékek közt

Kategóriák	1	2	3	4	5	6
Koncentráció (μM)	0,001 T-2 + 0,05 HT-2	0,01 T-2 + 0,1 HT-2	0,05 T-2 + 0,2 HT-2	0,1 T-2 + 0,5 HT-2	0,5 T-2 + 1,0 HT-2	1,0 T-2 + 2,0 HT-2

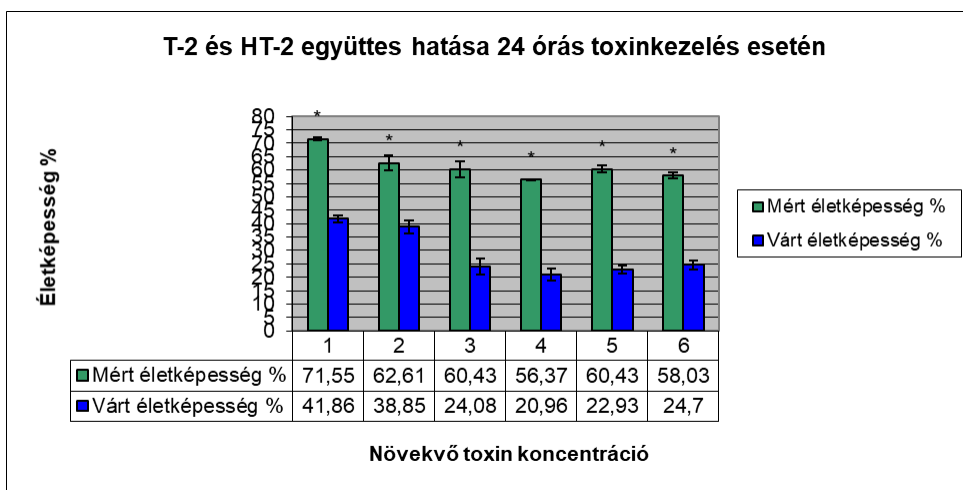
12.a. ábra: Sertés limfociták életképessége (átlag \pm SE) 6 órás T-2 (0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 és 1,0 μM) és HT-2 (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 és 2,0 μM) kombinált toxinkezelés hatására, a számított várt értékekkel összehasonlítva



n=6, *szignifikáns ($P < 0,05$) eltérés a mért és a várt értékek közt

Kategóriák	1	2	3	4	5	6
Koncentráció (μM)	0,001 T-2 + 0,05 HT-2	0,01 T-2 + 0,1 HT-2	0,05 T-2 + 0,2 HT-2	0,1 T-2 + 0,5 HT-2	0,5 T-2 + 1,0 HT-2	1,0 T-2 + 2,0 HT-2

12.b. ábra: Sertés limfociták életképessége (átlag \pm SE) 12 órás T-2 (0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 és 1,0 μM) és HT-2 (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 és 2,0 μM) kombinált toxinkezelés hatására, a számított várt értékekkel összehasonlítva



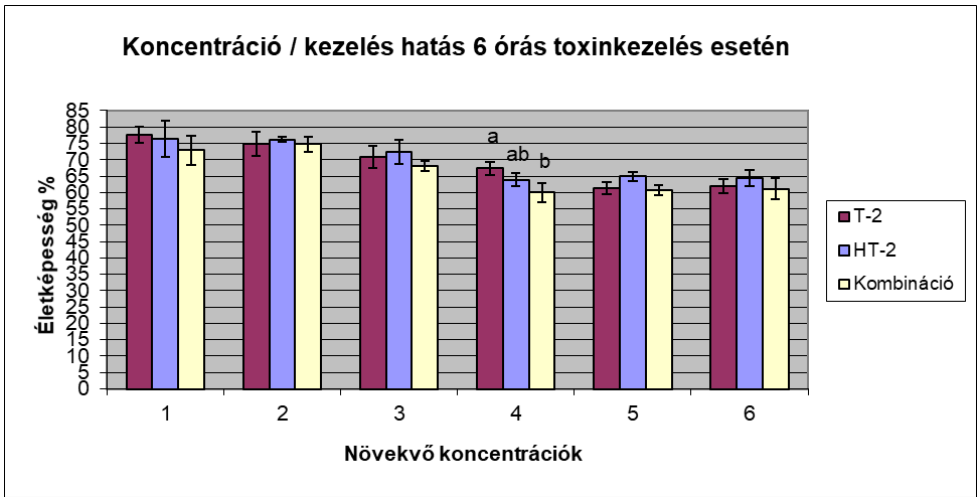
n=6, *szignifikáns (P<0,05) eltérés a mért és a várt értékek közt

Kategóriák	1	2	3	4	5	6
Koncentráció (µM)	0,001 T-2 + 0,05 HT-2	0,01 T-2 + 0,1 HT-2	0,05 T-2 + 0,2 HT-2	0,1 T-2 + 0,5 HT-2	0,5 T-2 + 1,0 HT-2	1,0 T-2 + 2,0 HT-2

12.c. ábra: Sertés limfociták életképessége (átlag±SE) 24 órás T-2 (0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 és 1,0 µM) és HT-2 (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 és 2,0 µM) kombinált toxinkezelés hatására, a számított várt értékekkel összehasonlítva

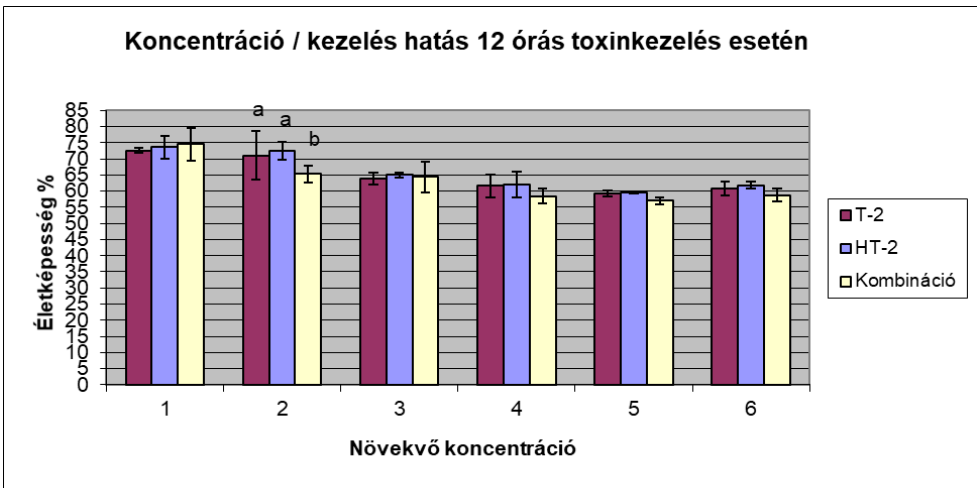
A 6, 12 és 24 órás inkubációt követően minden koncentráció esetében magasabb sejt életképességet mértem a számított értékhez viszonyítva. A különbségek minden esetben szignifikánsnak (P<0,05) bizonyultak.

Ha összehasonlítjuk a toxinok együttes és külön-külön kiváltott hatását, azonos koncentrációban és inkubációs időben (13.a., b., c. ábra), akkor látható, hogy a két toxin kombinációban következetesen alacsonyabb sejt túlélést okoz, mint egyedüli szennyezőként minden időpontban és koncentrációban.



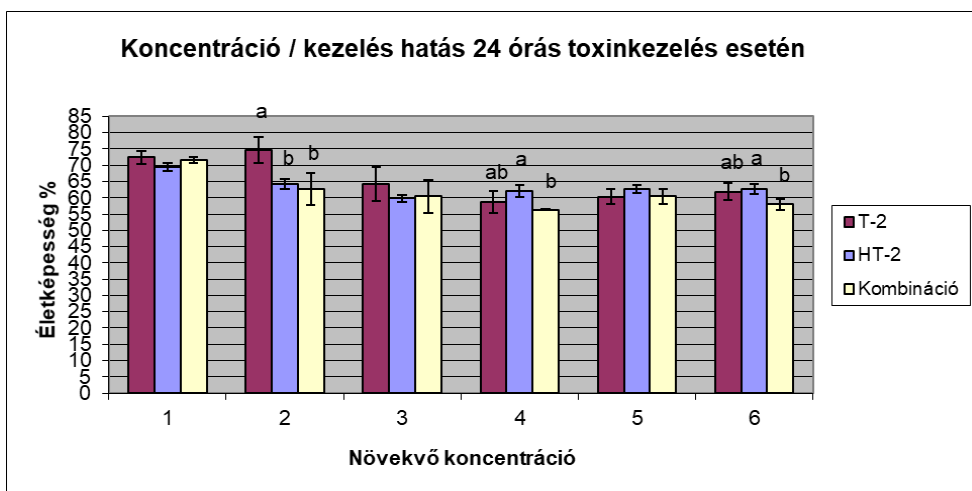
^{a,b}szignifikáns eltérés a kezelések (T-2, HT-2 és kombináció) között azonos toxinkoncentráció (1-6 között) és inkubációs idő esetén ($P < 0,05$)

13.a. ábra: A T-2 és HT-2 egyedüli és együttes hatásának összehasonlítása¹ hat növekvő toxinkoncentráció egyszeri és együttes alkalmazása esetén 6 óra elteltével (¹lásd. Anyag és módszer c. fejezet)



^{a,b}szignifikáns eltérés a kezelések (T-2, HT-2 és kombináció) között azonos toxinkoncentráció (1-6 között) és inkubációs idő esetén ($P < 0,05$)

13.b. ábra: A T-2 és HT-2 egyedüli és együttes hatásának összehasonlítása¹ hat növekvő toxinkoncentráció egyszeri és együttes alkalmazása esetén 12 óra elteltével (¹lásd. Anyag és módszer c. fejezet)



^{a,b}szignifikáns eltérés a kezelések (T-2, HT-2 és kombináció) között azonos toxinkoncentráció (1-6 között) és inkubációs idő esetén ($P < 0,05$)

13.c. ábra: A T-2 és HT-2 egyedüli és együttes hatásának összehasonlítása¹ hat növekvő toxinkoncentráció egyszeri és együttes alkalmazása esetén 24 óra elteltével (¹lásd. Anyag és módszer c. fejezet)

A második *in vitro* kísérlet eredményei alátámasztották az első kísérletben tapasztaltakat. Jelen esetben is megállapítható, hogy a két toxin együttes sejtkárosító hatása erősebb volt, mint a toxinoké külön-külön, a várt (számított) citotoxicitástól jelentősen elmaradt, azaz nem additív hatásúak egymás viszonylatában.

A T-2 gyorsan felszívódik a bélből, eloszlik a szervezetben, viszonylag gyorsan kiürül, csekély felhalmozódással. A HT-2 hatásával kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre, az elérhető adatok alapján a T-2 és HT-2 toxikus hatása hasonló erősségűnek tekinthető (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001).

Számos tanulmány a T-2 metabolitjai (HT-2, T-2 triol és T-2 tetraol) kapcsán alacsonyabb citotoxikus határról számol be, feltételezve a szervezet természetes detoxikáló hatását (Babich és Borenfreund, 1991). Mivel a T-2

metabolizációja HT-2-vé *in vivo* gyorsan lezajlik, a T-2 által okozott káros hatások részben a HT-2 hatásának tulajdoníthatóak.

A kísérleteinkben alkalmazott T-2 és HT-2 koncentrációk kategóriánként közel azonos sejt túlélési adatokat mutattak (55 és 80% között), az azonos kategóriákon belül nem volt szignifikáns eltérés a T-2 és a HT-2 által okozott károsítás mértékében. Figyelembe véve azt, hogy kategóriánként a HT-2 mindig magasabb koncentrációban képviseltette magát, mint a T-2 toxin, vizsgálatunk azokat a korábbi eredményeket támasztotta alá, amelyek szerint a HT-2 kisebb toxicitású, mint a T-2. Nielsen és mtsai. (2009) nyolc humán sejtvonalban (Hep-G2, A549, CaCo-2, HEp-2, A204, U937, RPMI 8226 és Jurkat) tesztelték a két toxin citotoxicitását. Az IC_{50} értéket T-2 esetében 4,4–10,8 nmol/l, míg HT-2-nél 7,5–55,8 nmol/l koncentrációban állapították meg. Humán vékonybél hámsejtekben közel 4-szeres toxicitást mutattak ki T-2-re, mint HT-2-re (IC_{50} érték T-2: 6.4 nM, HT-2: 24 nM) (Nielsen és mtsai., 2009). Königs és mtsai. (2009) két primér sejt kultúrát (RPTEC és NHLF) használtak, a T-2 metabolitjait kevésbé toxikusnak találták, mint az intakt toxinét (IC_{50} érték T-2: 0,2-0,5 μ M, HT-2: 0,7-3,0 μ M). Kísérletünkben T-2 esetében hasonló koncentráció tartományban nem értük el az IC_{50} értéket, 0,5 μ M T-2 expozíció 60-70%-os életképességet, HT-2 esetében a legmagasabb dózis (2 μ M) is csak 40% körüli sejtpusztulást váltott ki (60%-os életképesség). Ez a sertés limfociták toxinnal szembeni kisebb érzékenységét jelezheti a hivatkozott vizsgálatokban használt sejtvonalakhoz képest.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A magas dózisú T-2 toxinbevitel elhúzódó hatását jelzi nyulakban a spermiumok mozgékonyságának csökkenése, az abnormalis morfológiájú és a citoplazmacsepp maradványt tartalmazó sejtek számának növekedése, valamint a plazma citromsav koncentrációjának csökkenése még egy 3 napos akut toxikózist követő 48.-dik napon is. Mindezen változások önmagukban vagy együttesen csökkent termékenyítőképességet okozhatnak hímivarú állatokban. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy eltérő koncentrációjú expozíció hogyan befolyásolja a nőstény nyulak termékenyülését. Számos hatásmechanizmus vár még feltárára a T-2 toxin hím nemi működésre gyakorolt hatásával kapcsolatban is (spermiogenezis, spermiumok érése, ondóplazmatermelés, tesztoszteron termelés stb.). A takarmánykorlátozás, vagyis csökkent táplálóanyagbevitel hatásait is javasolt tovább vizsgálni, mivel nem egyértelműek az eredmények (a morfológiai abnormalitás arányát növelte, a motilitásra és a plazma összetételre nem volt hatással; enyhe fokú testsúlycsökkenést okozott).

Egy felnőtt baknyúl 0,33 és 0,66 ppm-es (azaz 0,05, illetve 0,1 mg/állat/nap) T-2 toxinterhelést képes tolerálni a vizsgált spermaminőségi paraméterek jelentős romlása, valamint takarmány-visszautasítás nélkül. A 0,2 mg/állat/nap expozíció már takarmány-visszautasítást váltott ki, nagymértékben növelte a citoplazmacseppek arányát (mely jelzi a spermium érési folyamatainak zavarát) és a herében kimutatható szöveti elváltozásokat

okozott. Ezek alapján a vizsgált paraméterekre a NOAEL érték felnőtt baknyulakban $<0,1$ mg/állat/nap ($<0,02$ mg/ts kg/nap).

MTT tesztben egészséges sertésekből izolált limfocitákat alkalmazva megállapítottuk a T-2 és HT-2 koncentráció és expozíciós idő-függő hatását. A HT-2 2-50-szer nagyobb koncentrációban mutat hasonló mértékű citotoxicitást, mint a T-2 mikotoxin. A két toxint együttesen alkalmazva következetesen alacsonyabb sejttúlélést figyeltünk meg az egyedi hatásokhoz képest, 6 órás inkubációt követően. Mivel a két toxin együttes hatásaként mért citotoxicitás a várt (számított) citotoxicitástól jelentősen elmaradt, a két toxin hatása nem additív. További vizsgálatok szükségesek a T-2 és HT-2 IC_{50} értékének meghatározására sertés limfocitákon, valamint a két toxin interakciójának vizsgálatára alacsonyabb koncentráció esetén is. Szükséges a sertés limfociták esetleges T-2/HT-2 metabolizáló képességének megállapítása a más sejtek esetében bizonyított mechanizmushoz hasonlóan (Königs és mtsai., 2009).

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A T-2 mikotoxin 3 napig tartó, nagy dózisu (4 mg/állat) expozíciója hosszútávú (a toxinbevitel megszüntetését követően 48 nappal) negatív hatást fejt ki a baknyulak spermiumainak morfológiájára.
2. Baknyulakban a takarmány-visszautasításra, a spermiumok motilitására és morfológiájára vonatkozó NOAEL érték T-2 mikotoxinra vonatkozóan <0,1 mg/állat/nap (<0,02 mg/ts kg/nap).
3. Igazoltam a T-2 és HT-2 mikotoxin expozíciós idő- és dózisfüggő hatását MTT-teszt segítségével, egészséges sertésekből izolált limfocitákon.
4. A HT-2 mikotoxin a T-2 toxinhoz hasonló mértékű citotoxikus hatást sertés limfociták esetében 2-50-szeres koncentrációban képes kifejteni, mint a T-2 toxin.
5. Megállapítottam, hogy sertés limfociták esetében a T-2 és a HT-2 mikotoxin együttes alkalmazása következetesen alacsonyabb sejttúlélést eredményezett az egyedi hatásokhoz képest. Azonban mivel a két toxin együttes hatásaként mért citotoxicitás a várt (számított) citotoxicitástól elmaradt, a két mikotoxin hatása nem additív.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Számos szerző véleménye szerint a hím állatok szaporodási zavarainak hátterében gyakran a takarmányt szennyező mikotoxinok állnak (Scott, 1990). A mikotoxinok hímivarú állatok szaporodási folyamataira gyakorolt káros hatása kevésbé vizsgált. A T-2 toxin a trichotecének legtoxikusabb képviselője (SCF, 2001). Az állat modellek rendkívül hasznosak a reprodukciós jelenségek vizsgálatában (Schardein és mtsai., 1985; Christian és Hoberman, 1996). A nyúl kiváló modellállat; kistestű, könnyen kezelhető, szaporas és még több pozitív tulajdonsága is van. A toxikológiai vizsgálatok során szívesen alkalmazzák a spermiumok károsodásának vizsgálatára (Foote és Carney, 2000).

Célul tűztük ki a T-2 toxin hímivar reprodukciós folyamataira gyakorolt hatásainak vizsgálatát egy rövid idejű, nagy dózisu és két krónikus, alacsony dózisu terhelés esetén baknyulakban.

Három kísérletben vizsgáltuk a T-2 toxin dózis és expozíciós idő függvényében kiváltott hatásait az alábbi kezeléseket alkalmazva: (1) 4 mg/állat/nap tisztított toxin, 3 napon át, gyomorszondán keresztül; (2) 0,05; 0,1 és 0,2 mg/állat/nap tisztított toxin, 63 napon át, gyomorszondán keresztül; (3) 0,33 és 0,66 mg/takkg gombatenyészettel bekevert toxin 63 napon keresztül.

A nagy dózisu T-2 kezelés már a 2. napra drasztikusan csökkentette (a kontroll csoporthoz képest 27%-ra, $P < 0,05$) a takarmányfelvételt, amely a toxin megvonását követően két hétig alacsonyabb szinten maradt ($P < 0,05$). A kísérleti csoport állatainak testsúlya a 17. napról a 29. napra a kontroll állatok testsúlyának 88%-ára csökkent ($P < 0,05$). A kezelésnek nem volt

hatása a sperma mennyiségére, koncentrációjára és a pH-ra. Az 51. napon (azaz, a toxinmegvonást követően 48 nappal) a kezelt állatokban a spermiumok gyengébb motilitását (kontroll: 65%, kezelt: 53%, $P < 0,05$), az abnormális morfológiájú sejtek arányának növekedését ($P < 0,05$) tapasztaltuk. Csökkent az ondóplazma citromsav koncentrációja ($P < 0,05$). A csökkent takarmányfelvételnek tulajdonítható esetleges hatások meghatározására beállítottunk egy kontroll csoportot, melynek takarmányfelvételét a T-2 csoportéhoz igazítottuk. Ezen csoport spermaminőségi paramétereit vizsgálva, csak az abnormális morfológiájú sejtek arányában találtunk szignifikáns eltérést az *ad libitum* etetett és toxin terhelésnek nem kitett csoport eredményeihez viszonyítva.

A tisztított és gyomorszondán keresztül a szervezetbe juttatott T-2 0,1 és 0,2 mg/állat/nap dózisban átmeneti csökkenést eredményezett a takarmányfelvételben, a csoportok közötti különbség a 4. hétre megszűnt. A spermaminőséget jelző paraméterek közül csak az abnormális morfológiájú sejtek arányában tapasztaltunk változást, amely 0,2 mg T-2 hatására a kontrollhoz képest több mint háromszorosára nőtt ($P < 0,01$). A 0,1 mg T-2-vel kezelt csoportnál enyhe hyperplasia volt megfigyelhető a Leydig-sejtekben, míg a legnagyobb dózisban terhelt állatoknál vérbőség, a Leydig-sejtek hyperplasia-ja és megnövekedett proliferációs aktivitás alakult ki.

A harmadik kísérlet célja annak meghatározása volt, hogy van-e a hatásokban különbség, ha a T-2 toxint a két alacsonyabb dózisban (0,05 és 0,1 mg/állat/nap, ami a takarmányfelvétel alapján 0,33 és 0,66 mg/takkg/nap adagnak felelt meg) a takarmányba gombatenyészetként keverve adjuk az állatoknak. A csoportok között nem mutatkozott szignifikáns eltérés sem a takarmányfelvételben, sem a vizsgált spermaminőségi paraméterekben.

Figyelembe kell venni a nyulak relatíve nagyobb érzékenységét a T-2 mikotoxinnal szemben, melyet a viszonylag alacsony LD_{50} érték (1,1 mg/ts

kg) jelez (Wannemacher és Wiener, 1997). Az SCF (2002) a tTDI (temporary tolerable daily intake) értékét T-2 és HT-2 esetében együttesen határozta meg 0,06 µg/ts kg/nap mennyiségben. Egérben és patkányban 0,23 és 0,5 mg/ts kg/nap értékben határozták meg a T-2 toxin NOAEL értékét krónikus expozíciónál (SCF, 2001). Az ez alapján számított tTDI érték védelmet nyújt a krónikus, szubkrónikus és a reprodukzív toxicitással szemben. A három kísérlet eredményei alapján elmondható, hogy a szubakut T-2 toxikózis hatása tartósan, esetünkben még 48 nappal a toxinmegvonást követően is érzékelteti kedvezőtlen hatását. A 0,33 mg/takkg (0,05 mg/állat/nap) T-2 felvételt a hím állatok a szaporodási folyamatokat jellemző vizsgált paraméterek szignifikáns változása nélkül képesek voltak tolerálni.

A T-2 és HT-2 termelődésében erős összefüggést mutattak ki. Számos *in vitro* kísérlet során vizsgálták a T-2 és HT-2 citotoxikus hatását, de a két toxin között interakciót még nem írtak le. Az *in vitro* Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) eljárás a leggyakrabban használt vizsgálati módszer a *Fusarium* toxinok citotoxikusság vizsgálatára. Egy gyors, pontos, megbízható kvantitatív mérési eljárás, melyben egy lépésben nagyszámú kísérleti beállítás alkalmazható. (Dombrink-Kurtzman et al., 1994). Számos sejt tenyészetet használtak a kutatások során, de egyik sem mutatott nagyfokú érzékenységet a *Fusarium* mikotoxinok változataival szemben (Cetin és Bullerman, 2005). Maenetje és mtsai. (2008) a mikotoxinok citotoxikusságának vizsgálatában humán limfocitákat alkalmaztak. Ideális alany lehet a humán limfocita mellett a sertés limfocita tenyészet, mivel nagyfokú fiziológiai hasonlóságot mutat és a mikotoxinokkal szembeni érzékenysége a háziállatok között a legnagyobb ennél a fajnál. Ezt alátámasztja az előzetesen végzett kísérletünk során mutatott érzékenysége a FB1 és az ochratoxin-A citotoxikus hatásával szemben (Mwanza és mtsai.,

2009). Kutatómunkám célja volt a sejtkárosító hatás kimutatása *in vitro*, MTT tesztben: a T-2 és a HT-2 dózis- és expozíciós idő-függő, együttesen és külön-külön érvényesülő sejtkárosító hatásának meghatározása. Két kísérlet sorozatban a két mikotoxint külön (1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 és 0,001 μM koncentrációban T-2 esetén, illetve 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 és 0,05 μM koncentrációban HT-2 esetén), valamint kombinációjukat teszteltem, 6, 12 és 24 órás kísérleti periódusokban. Az MTT assay alkalmazásával a T-2 és HT-2 toxin idő és dózisfüggő citotoxikus hatása volt kimutatható sertés limfocitákon. A 6 órás inkubációs periódust követően a toxinkoncentráció növekedése (T-2 esetén 0,001-ről 0,5 μM -ra és HT-2 esetében 0,05-ről 1,0 μM -ra) közel 17%-os csökkenést eredményezett a sejtek életképességében. A 24 órás inkubációt követően szignifikánsan alacsonyabb volt a sejtek életképessége mindkét toxin minden alkalmazott koncentrációja esetében. A két toxint együttesen alkalmazva következetesen alacsonyabb sejttúlélést eredményezett az egyedi hatásokhoz képest, de mivel a két toxin együttes hatásaként mért citotoxicitás a várt (számított) citotoxicitástól jelentősen elmaradt, a két toxin hatása nem érvényesült additív módon.

9. SUMMARY

In several studies it has been concluded that the major factors with regard to male subfertility or infertility can be attributable to environmental factors, like mycotoxins, as frequently occurring dietary toxins (Scott, 1990). Our knowledge about mechanisms of action and the effects of certain mycotoxins on male reproduction processes is incomplete since it has not been widely adequately studied. T-2 toxin is the most acute toxic compound among trichothecens (SCF, 2001). Animal models are useful for studying various reproductive phenomena (Christian and Hoberman, 1996; Schardein et al, 1985). The rabbit has many advantages as a nonrodent and second model for assessing the effects of toxic agents on semen quality (Foote and Carney, 2000). The aim of the present study was to examine the chronic and subsequent effect of T-2 toxin in high and low doses on sperm quality, using rabbit as a model animal. The subsequent effect of T-2 toxin applied to rabbits in high dose (4 mg/animal/day) manifested in decreased sperm motility, in increased the number of spermatozoa with morphological abnormalities, and decreased testosterone level even after 48 days following a 3-day long acute toxicosis. Adult male rabbits may tolerate the concentration of 0.33 ppm (0.05 mg/animal/day) T-2 toxin, without any significant decay in sperm quality. The 0.2 mg/animal/day toxin had a pronounced feed refusal effect, dramatically increased the ratio of spermatozoa with cytoplasmic droplets, and reduced GnRH induced testosterone production. None of the sperm quality parameters examined showed significant difference between groups (in case of 2a and 2b experiments), except the ratio of spermatozoa with cytoplasmic droplets,

which increased by 320% in animals treated with the highest dose of T-2. Daily 0.1 mg/animal exposure resulted in slight hyperplasia of the Leydig cells. The highest dose caused increased proliferative activity of the Leydig cells beside hyperplasia, the testes were slightly hyperaemic. Rabbit can be considered rather sensitive to T-2 toxin, it has relatively low (1.1 mg/kg bw) LD₅₀ values (Wannemacher and Wiener, 1997). The SCF (2002) has established a combined t-TDI of 0.06 µg/kg bw/day for the sum of T-2 and HT-2. The NOAELs (no observed adverse effect level) for T-2 have been identified by the Scientific Committee on Food (SCF, 2001), NOAELs in mouse and rats are 0.23 and 0.5 mg/kg bw/day, respectively, in chronic toxicosis. According to the committee's report this t-TDI would protect against the chronic, subchronic and reproductive effects. The T-2 toxin dose we applied was 0.01-0.02-0.05 mg/kg bw/day, it represents about 0.3-0.6-1.3 mg/kg feed contamination, the lower values can be considered as a risk under practical conditions. The higher ratio of spermatozoa with cytoplasmic droplets and the decreased motility can be the result of the impaired epididymal function, i.e. maturation of spermatozoa (Yeung, 1995; Parkinson, 2009). According to the results it can be concluded, that adult male rabbits tolerate the concentration of 0.05 and 0.1 mg/animal/day T-2 toxin, without any significant decay in sperm quality, however 0.1 mg/animal/day toxin caused a slight alteration in the Leydig cells. 0.2 mg T-2 dramatically increased the ratio of spermatozoa with cytoplasmic droplets, caused hyperaemia in the testes, proliferation and hyperplasia in the Leydig cells.

Fusariotoxins are frequently existing contaminants in cereal and other plant products. High relationship was found between the levels of the trichothecene T-2 and HT-2 toxin detected in contaminated commodities. Many *in vitro* studies investigated the cytotoxicity of T-2 and HT-2, but the

interaction between them has not been thoroughly studied yet. *In vitro* Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) cell culture assay is one of the most frequently used tests for preliminary screening of cytotoxicity of *Fusarium* toxins. It is a rapid, versatile, quantitative, and highly reproducible colorimetric assay for mammalian cell viability/metabolic activity; it is useful on a large scale mycotoxins screening assay (Dombrink-Kurtzman et al., 1994). Although a variety of mammalian cell cultures were used to detect *Fusarium* mycotoxins in contaminated extracts none of them showed high sensitivity to all of the *Fusarium* mycotoxins tested (Cetin and Bullerman, 2005). The use of human lymphocytes has been described in mycotoxin cytotoxicity test by Maenetje et al. (2008). Pigs are better test animals, may better correlate with human physiology and are more sensitive to most mycotoxins than other domesticated animals. Our preliminary results obtained in a study on the combined effect of FB₁ and ochratoxin A have shown the feasibility of using isolated pig lymphocytes as test cells in the MTT assay (Mwanza et al., 2009). The aim of the study was to examine the dose dependent cytotoxic effect of T-2 and HT-2 toxins, single and in combination, using pig lymphocytes in the methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. The mycotoxins were added at various concentrations, i.e. 1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 and 0.001 μM of T-2; 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 and 0.05 μM of HT-2; and both mycotoxins combined. Three exposure times (6, 12 and 24 h) were tested. Both T-2 and HT-2 toxins exerted a dose dependent effect. After 6 h incubation, the increase in concentration of T-2 from 0.001 to 0.5 μM and HT-2 for 0.05 to 1.0 μM resulted in lower cell viability by 17%, respectively. After 24 h cell viability was significantly lower compared to values obtained at 6 h, except 0.5 μM T-2 and 0.05, 1.0 μM HT-2, respectively. Measured cell viability for combinations of T-2 and HT-

2 was higher than in single administration in case of all concentration and incubation period.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Kovács Melinda** professzor asszonynak, aki a PhD képzés alatt irányította munkámat, a kísérletek tervezésében és azok kivitelezésében nyújtott segítséget, hasznos tanácsaival segített disszertációm elkészítésében. Köszönetet mondok **Dr. Cseh Sándor** professzor úrnak, aki társ-témavezetőmként szakmai segítséggel látott el és segítette az *in vivo* kísérletek kivitelezését.

Köszönöm **Dr. Horn Péter** akadémikus úrnak, hogy mint az általa irányított Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola hallgatójának támogatta és lehetővé tette a doktori kutatási témám elfogadását.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani az **Élettani és Állathigiéniai Tanszék** dolgozóinak odaadó és önzetlen szakmai segítségükért. Külön köszönettel tartozom **Dr. Szendrő Zsolt** professzor úrnak, hogy a volt Sertés- és Kisállattenyésztési Tanszék vezetőjeként biztosította munkámhoz az állatkísérletek infrastruktúráját, valamint hálával tartozom **Dr. Matics Zsoltnak** és **Dr. Gerencsér Zsoltnak**, hogy idejüket nem sajnálva közreműködtek az állatok gondozásában és a kísérletek lebonyolításában. Köszönöm **Dr. Szabó András** nélkülözhetetlen segítségét a statisztikai analízis megvalósítása kapcsán. Köszönetet mondok **Keresztes Zsuzsának** a budapesti Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika dolgozójának, aki segítette az *in vivo* kísérletek technikai megvalósítását. Köszönettel és hálával tartozom **Férjemnek és Fiaimnak**, hogy türelmükkel és megértésükkel támogatták és ösztönözték dolgozatom elkészülését.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairy, A. A., Kaushik, N. K., Choi, E. H. (2017):** T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, Vol. 8., (No. 20.), pp. 33933-33952.
2. **Akande, K. E., Abubakar, M. M., Adegbola, T. A., Bogoro, S. E. (2006):** Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5 (5), pp. 398- 403.
3. **Alm, K., Dahlbom, M., Säynäjärvi, M., Andersson M. A., Salkinoja- Salonen, M. S., Andersson, M. C. (2002):** Impaired semen quality of AI bulls fed with moldy hay: a case report. *Theriogenology*, 58., pp. 1497-1502.
4. **Arcella, D., Gergelova, P., Innocenti, M. L., Steinkellner, H. (2017):** Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal*, 15(8), p. 4972.
5. **Arunachalam, C., Doohan, F. M. (2013):** Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Toxicology Letters*, 217., pp. 149– 158.
6. **Assane, M., Katiellou, M.D., Sere, A., Gongnet, P., Missohou, A. (1995):** Effect of partial restriction of drinking-water output and reproduction performance in rabbit. *Revue de Medecine Veterinaire*, 146., pp. 427-432.
7. **Az Európai Unió Hivatalos Lapja (2013):**4.3., pp. 12-15.
8. **Babich, H., Borenfreund, E. (1991):** Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 57., pp. 2101-2103.
9. **Banczerowski, J. (2001):** A mikotoxinok idegrendszeret károsító hatása. *Penészgombák-mikotoxinok a táplálékláncban*, Tanulmány MTA Agrártudományok Osztálya, Budapest, 2001., pp. 97-120.
10. **Baranyi N., Kocsubé S., Tóth B., Palágyi A., Szekeres A., Pál R., Szarvas Cs., Győri T., Varga J. (2013):** Potenciális mikotoxin termelő *Aspergillus* izolátumok azonosítása hazai mezőgazdasági termékekben. „DE tudományos képzési műhelyeink támogatása” Debrecen, <http://www2.sci.u-szeged.hu/microbiology/TOXFREEFEED/Downloads/FullTexts/POTENTIALIS%20MIKOTOXIN%20TERMELO%20ASPERGILLUS%20I>

ZOLATUMOK%20AZONOSITAS%A%20HAZAI%20MEZOGAZDAS
AGI%20TERMEKEKEN.pdf.

11. **Barnett, C. I. R., Tomlinson, M. J., Cooke, I. D. (1993):** Prognostic significance of computerized motility analysis for *in vivo* fertility. *Fertility and Sterility*, 60., pp. 520-525.
12. **Barrier-Guillot, B. (2008):** T-2 and HT-2 in cereals grown in France. 5th EC *Fusarium* Toxin Forum, 10-11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_542.pdf.
13. **Barrier-Guillot, B. (2009):** T-2 and HT-2 in cereals in France. 6th *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_879.pdf.
14. **Bata Á., Rafai P. (2001):** A T-2 toxin hatásának és tolerálható értékeinek tanulmányozása. Penészgombák-mikotoxinok a táplálékláncban, Tanulmány MTA Agrártudományok Osztálya, Budapest, pp. 63-68.
15. **Binder, E. M. (2007):** Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133., pp. 149–166.
16. **BIOMIN (2018):** Annual Report No. 15. World Mycotoxin Survey 2018.
17. **Bócsai A., Pelyhe Cs., Zándoki E., Ancsin Zs., Szabó-Fodor J., Erdélyi M., Mézes M., Balogh K. (2015):** Short-term effects of T-2 toxin exposure on some lipid peroxide and glutathione redox parameters of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100., pp. 520-525.
18. **Borbély M., Sipos P., Pelles F., Győri Z. (2010):** Mycotoxin contamination in cereals. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 16., pp. 96-98.
19. **Bradbury, J. (1997):** It's not looking good for sperm counts. *Lancet*, 350., p. 1605.
20. **Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, C., Maranesi, M., Gobbetti, A., Zerani, M., Boiti, C. (2006):** Hormonal and metabolic adaptation to fasting: Effects on the hypothalamic–pituitary–ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domestic Animal Endocrinology*, 31., pp. 105-122.
21. **Brodal, G., Klemsdal, S., Elen, O., Hofgaard, I. (2008):** Mycotoxin situation in Norwegian cereals in recent years. 5th EC *Fusarium* Toxin Forum, 10-11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_553.pdf.
22. **Bryden, W. L. (2004):** Mycotoxins and Animal Production: Insidious Problems Associated with Contaminated Feedstuffs. In *Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Animal Nutrition*, Kuala Lumpur, Malaysia.

23. **Bryden, W.L. (2012):** Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 173, 134–158.
24. **Cantrell, I. (2008):** EBC/The brewers of Europe survey of *Fusarium*-toxins in European beers. 5th EC *Fusarium* Toxin Forum, 10- 11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_549.pdf.
25. **Causin, R. (2009):** Trichothecenes and other mycotoxin in Italian unprocessed cereals: maize and small cereals. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_867.pdf.
26. **Cavret, S. and Lecoeur, S. (2006):** Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, 44., pp. 444-453.
27. **Cetin, Y., Bullerman, L. B. (2005):** Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 43., pp. 755-764.
28. **Chandratre, G. A., Telang, A. G., Badgular, P. C., Raut, S. S., Sharma, A. K. (2014):** Toxicopathological Alterations Indiced by High Dose Dietary T-2 Mycotoxin and its Residue Detection in Wistar Rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, DOI 10.1007/s00244-014-0006-x.
29. **Chapin, R. E., Gulati, D. K., Barnes, L. H., Teague, J. L. (1993):** The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 20., pp. 23-29.
30. **Chaudhary, M., Bhaskar, A. S. B., Rao, P. V. L. (2013):** Differential Effects of Route of T-2 Toxin Exposure on Hepatic Oxidative Damage in Mice. *Environmental Toxicology*, DOI 10.1002/tox 21895.
31. **Chi, M. S., Mirocha, C. J., Kurtz, H. J., Weaver, G., Bates, F., Shimoda, W. (1977):** Effects of T-2 toxin on reproductive performance and health of laying hens. *Poultry Science*, 56., pp. 628-637.
32. **Christian, M. S., Hoberman, A. M. (1996):** Perspectives on the U.S., EEC, and Japanese developmental toxicity testing guidelines. In: Hood RD, editor. *Handbook of Developmental Toxicology*, Boca Raton: CRC Press, pp. 551-595.
33. **Council for Agricultural Science ans Technology (CAST) (2003):** Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report no. 139., Ames, IA, pp. 1-191.
34. **Cooper, T. G., Yeung, C. H. (2000):** Physiology of sperm maturation and fertilization. In *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction* (eds. E Nieschlag, HM Behre), Second Edition. Springer, Berlin, Germany, 2000., pp. 63-79.

35. **Corley, R. A., Swanson, S. P., Gullo, G. J., Johnson, L., Beasley, V. R., Buck, W. B. (1986):** Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in intravascularly dosed swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34., pp. 868-875.
36. **Creasia, D. A., Thurman, J. D., Wannemacher, R. W. J., Bunner, D. L. (1990):** Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in the rat and guinea pig. *Fundamental and Applied Toxicology*, 14., pp. 54-59.
37. **Cseh S., Kovács M. (2010):** Mikotoxinok reprodukcióra kifejtett hatásai. Szerk: Kovács Melinda, Agroinform Kiadó. Kaposvár, pp 73-83.
38. **Diaz, G. J., Squires, E. J., Julian, R. J., Boermans, H. J. (1994):** Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *British Poultry Science*, 35., pp. 393-405.
39. **D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C. (1997):** Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69., pp. 155-166.
40. **Dobolyi Cs., Sebők F., Varga ., Kocsubé S., Szigeti Gy., Baranyi N., Szécsi Á., Lustyik Gy., Micsinai A., Tóth B., Varga M., Kriszt B., Kukolya J. (2011):** Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. *Növényvédelem*. 47. (4)., pp. 125-133.
41. **Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., Kuca, K. (2008):** Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism*, 9., pp. 77-82.
42. **Doi, K., Shinozuka, J., Sehata, S. (2006):** T-2 Toxin and Apoptosis. *Journal of Toxicologic Pathology*, 19., pp. 15- 27.
43. **Dombrink-Kurtzman, M. A., Bennett, G. A., Richard, J. L. (1994):** An optimized MTT bioassay for determination of cytotoxicity of fumonisins in turkey lymphocytes. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 77., pp. 512-516.
44. **Dvorska, J.E., Pappas, A.C., Karadas, F., Speake, B.K., Surai, P.F. (2007):** Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.*, 145C, 582-587.
45. **European Commission (EC) (2002):** Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on the presence of undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union L 140.*, pp. 10-21.
46. **European Commission (EC) (2006):** Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EU). *Official Journal of the European Union L 229.*, pp. 7-9.

47. **European Commission (EC) (2010):** Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union L 50., pp. 8-12.
48. **Edwards, S. G. (2009a):** *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. Food Additives and Contaminants Part A 26., pp. 1185-1190.
49. **Edwards, S. G. (2009b):** *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. Food Additives and Contaminants Part A 26., pp. 496-506.
50. **Edwards, S. G. (2009c):** *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional oats. Food Additives and Contaminants Part A 26., pp. 1063-1069.
51. **Edwards, S., Barrier-Guillot, B., Clasen, P. E., Hietaniemi, V., Pettersson, H. (2009):** Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. World Mycotoxin Journal, 2., pp. 173-179.
52. **European Flour Millers (EFM) (2009):** T-2, HT-2 in soft wheat and rye. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_867.pdf.
53. **EFSA (2004a):** Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 39., pp. 1–27.
54. **EFSA (2004b):** Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.*, 73, 1–42.
55. **EFSA (2011):** Scientific Opinion on the risk for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal*, 9 (12)., p. 2481.
56. **Egbunike, G. N. (1982):** Steroidogenic and spermatogenic potentials of the male rat after acute treatment with aflatoxin B1. *Andrologia*, 14., pp. 440-446.
57. **Eriksen, G. S., Alexander, J. (1998):** *Fusarium* toxins in cereals - a risk assessment. TemaNord 502, Nordic Council of Ministers, Copenhagen.
58. **Eriksen, G. A., Pettersson, H. (2004):** Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114., pp. 205-239.
59. **Eriksen, G. S. (2008):** Occurrence of trichothecenes in Norwegian cereals 1990-2007. 5th EC *Fusarium* Toxin Forum, 10-11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_552.pdf.

60. **Ettlin, R. A., Bechter, R., Lee, I. P., Hodel, C. (1984):** Aspects of testicular toxicity induced by anticancer drugs. In: Disease, Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs and Other Chemicals. Archives of Toxicology (Suppl. 7), 151-154.
61. **Fairhurst, S., Maxwell, S. A., Scawin, J. W., Swanston, D. W. (1987):** Skin effects of trichothecenes and their amelioration by decontamination. Toxicology, 46., pp. 307-319.
62. **Fan, A. N., Tomar, R. S. (1999):** Risk assessment of environmental chemicals in food. Szerk.: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C.: Modern Nutrition in Health and Disease, 9., 114., Lippincott, Williams and Wilkins, USA. pp. 1861-1874.
63. **FAO/WHO (1969):** General principles of food hygiene CAC/RCP 1-1969., rev-4 in 2003.
64. **FAO/WHO (1990):** REPORT OF THE TWENTY SECOND SESSION OF THE CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. The Hague, The Netherlands, 19–24 March 1990.
65. **FAO/WHO (1995):** Application of risk analysis to food standard issues: Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation Food Additives (JECFA), WHO, Geneva.
66. **FAO/WHO (2002):** Global forum of food safety regulators. Proceedings of the Forum, editorial, Marrakech, Morocco, 28-30 January 2002, FAO/WHO, Rome.
67. **FDA (Food and Drug Administration) (2001):** Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds, released November 9, 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>.
68. **Fekete S., Huszenicza Gy. (1993):** Effects of T-2 toxin on ovarian activity and some metabolic variables of rabbits. Laboratory Animal Science, 43., pp. 646-649.
69. **Fekete S., Huszenicza G., Szilagyi M., Albert M., Szilagyi A. (1992):** Effect of long-term feeding of sublethal quantities of T-2 toxin upon the ovarian activity of the rabbit. The Journal of Applied Rabbit Research, 15., pp. 583-593.
70. **Fekete S., Tamás J., Ványi A., Glávits R., Bata Á. (1983):** Proc IVth Congr. World Rabbit Sci. Ass. Budapest, 3., p. 115.
71. **Fekete S., Tamás J., Ványi A., Glávits R., Bata Á. (1989a):** Effect of T-2 toxin on feed intake digestion and pathology of rabbits. Laboratory Animal Science, 39., pp. 603-606.
72. **Fekete S., Tamás J., Ványi A., Glávits R., Bata Á. (1989b):** Effect of T-2 toxin fed in sublethal quantity on digestion in the rabbit (in Hungarian). Magyar Állatorvosok Lapja, 44., pp. 739-740.
73. **Fodor J., Németh M., Kametler L., Pósa R., Kovács M., Horn P. (2006):** Novel methods of *Fusarium* toxins' production for

- toxicological experiments. Methodological study. *Acta Agraria Kaposvariensis*, 10 (2), pp. 277-285.
74. **Foote, R. H., Carney, E. W. (2000):** The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies (Review), *Reproductive Toxicology*, 14., pp. 477-493.
 75. **Fournier, R. (2009):** Fusariotoxins on malting barley from field to end products and by-products. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_871.pdf.
 76. **Frankic, T., Pajk, T., Rezar, V., Levart, A., Salobir, J. (2006):** The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 44., pp. 1838-1844.
 77. **Frankic, T., Salobir, J., Rezar, V. (2008):** The effect of vitamin E supplementation on reduction of lymphocyte DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol on weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 141., pp. 274-286.
 78. **Friend, S. C. E. Hancock, D. S., Schiefer, H. B., Babiuk, L. A. (1983):** Experimental T-2 toxicosis in sheep., *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47., pp. 291-297.
 79. **Gaigé, S., Djelloul, M., Tardivel, C., Airault, C., Félix, B., Jean, A., Lebrun, B., Troadec, J-D., Dallaporta, M. (2014):** Modification of energy balance induced by the food contaminant T-2 toxin: A multimodal gut-to-brain connection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37., pp. 54–72.
 80. **Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W. M. C., Evans, G. (2008):** Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, 103., pp. 201-214.
 81. **Glávits R., Ványi A., Fekete S., Tamás J. (1989):** Acute toxicological experiment of T-2 toxin in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37., pp. 75-79.
 82. **Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K. (2009):** Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants Part A* 26., pp. 1273-1289.
 83. **Grove, J. F. (2007):** The trichothecenes and their biosynthesis. *Fortschr. Chem. Org. Nat.* 88, 63-130.
 84. **Harvey, R. B., Kubena, L. F., Elissalde, M. H., Rottinghaus, G. E., Corrier, D. E. (1994):** Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. *American Journal of Veterinary Research*, 55., pp. 1757-1761.

85. **Henry, M. H.; Wyatt, R. D. (1993):** A review of fumonisin production by *fusarium moniliforme* and fumonisin toxicosis in animals. *The Journal of Applied Poultry Research*, 2., pp. 188–192.
86. **Hietaniemi, V., Rämö, S., Manninen, P., Parikka, P., Hankomäki, J. (2009):** The effect of cleaning and de-hulling on the trichothecene content in oats and barley. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_889.pdf.
87. **Huszenicza Gy., Fekete S., Szigeti Gy., Kulcsár M., Fébel H., Kellems R. O., Nagy P., Cseh S., Veresgyházy T., Hullár I. (2000):** Ovarian consequences of low dose peroral *fusarium* (T-2) toxin in a ewe and heifer model. *Theriogenology*, 53., pp. 1631-1639.
88. **IARC (1993):** Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 56. IARC, Lyon, France, p. 599.
89. **IARC (2002):** Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 82., pp. 301–366.
90. **Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. (2012):** Co-occurrence of mycotoxins in Spanish barley: A statistical overview. *Food Control*, 28., pp. 295-298.
91. **Ibeh, I. N., Uraih, N., Ogonar, J. I. (1994):** Dietary exposure to aflatoxin in human male infertility in Benin City, Nigeria. *International Journal of Fertility and Menopausal Studies*, 39., pp. 208-214.
92. **Ibeh, I. N., Saxena, D. K. (1998):** Effect of alpha-tocopherol supplementation on the impact of aflatoxin B₁ of the testis of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 50., pp. 221-234.
93. **Jaradat, Z. W. (2005):** T-2 mycotoxin in the diet and its effects on tissues. In: Watson RR and Preedy VR. *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*, Volume 4. CRC Press., pp. 173-212.
94. **Jestoi, M., Somma, M. C., Kouva, M., Veijalainen, P., Rizzo, A., Ritieni, A., Peltonen, K. (2004):** Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48., pp. 299-307.
95. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2001):** Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series, No. 47/FAO Food and Nutrition Paper 74. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v74je01.htm>.
96. **Kemppainen, B. W., Riley, R. T., Pace, J. G., Hoerr, F. J., Joyave, J. (1986):** Evaluation of monkey skin as a model for *in vitro*

- percutaneous penetration and metabolism of [3H]T-2 toxin in human skin. *Fundamental and Applied Toxicology*, 7., pp. 367-375.
97. **Kovács F. (1998):** Környezetszennyező penészgomba toxinok a táplálékláncban, kártételek és népegészségügyi vonzatok. Mikotoxinok a táplálékláncban. Szerk: Kovács Ferenc, Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, pp. 5-12.
 98. **Kovács F. (2001):** Penészgombák és mikotoxinok a táplálékláncban. Szerk: Kovács Ferenc, Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, pp. 13-20.
 99. **Kovács F., Ványi A., Domány S. (1995):** Penészgombák-mikotoxinok-népegészségügy. *Magyar Tudomány*, 11., pp. 1293-1305.
 100. **Kovács M. (2010):** A mikotoxinok humán-egészségügyi vonatkozásai. Szerk: Kovács Melinda, Agroinform Kiadó, Kaposvár, pp. 59-71.
 101. **Königs, M., Mulac, D., Schwerdt, G., Gekleb, M., Humpf, H. U. (2009):** Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology*, 258., pp. 106–115.
 102. **Krause, W. (1995):** Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, 10., pp. 60-66.
 103. **Krausz, C., Forti, G. (2000):** Clinical aspects of male infertility. In *The Genetic Basis of Male Infertility* (ed. K McElreavey), Springer, Heidelberg, Germany, pp. 1-21.
 104. **de Kretser, D. M., Kerr, J. B. (1994):** The cytology of testis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*, Raven Press Ltd, New York, USA, pp. 1117-1290.
 105. **Kruger, T. F., Acosa, A.A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., Oehninger, S. (1988):** Predictive value of abnormal sperm morphology. In *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 49., pp. 112-117.
 106. **Langseth, W., Rundberget, T. (1999):** The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147., pp. 157-165.
 107. **Li, Y., Wang, Z., Beier, R. C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S., Zhang, S. (2011):** T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59., pp. 3441–3453.
 108. **Lutsky, I., Mor, N., Yagen, B., Joffe, A. Z. (1978):** The role of T-2 toxin in experimental alimentary toxic aleukia: a toxicity study in cats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 43., pp. 111-124.
 109. **Lutsky, I., Mor, N. (1981):** Experimental alimentary toxic aleukia in cats. *Laboratory Animal Science*, 31., pp. 43- 47.

110. **Maenetje, W. M., de Villiers, N., Dutton, M. F. (2008):** The use of isolated human lymphocytes in mycotoxin cytotoxicity testing. *International Journal of Molecular Sciences*, 9., pp. 1515-1526.
111. **Magnuson, B. A., Schiefer, H. B., Hancock, D. S., Bhatti, A. R. (1987):** Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 65., pp. 799-802.
112. **Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., Stevens, G. A. (2012):** National, Regional and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* Dec. 2012. 9(12):. e1001356, <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pmed.1001356>.
113. **Mayer, S., Engelhart, S., Kolk, A., Blome, H. (2008):** The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin Research*, 24., pp. 151-164.
114. **Meca, G., Manes, J., Font, G., Ruiz, M. J. (2012a):** Study of the potential toxicity of commercial crispy breads by evaluation of bioaccessibility and bioavailability of minor *Fusarium* mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*, 50., pp. 288-294.
115. **Meca, G., Meneghelli, G., Ritieni, A., Manes, J., Font, G. (2012b):** Influence of different soluble dietary fibres on the bioaccessibility of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin. *Food and Chemical Toxicology*, 50., pp. 1362-1368.
116. **Mesterházy Á. (2006):** Mikotoxinok a gabonatermesztésben: az élelmiszerbiztonsági kihívás. Mikotoxin fórum, 2006. november 20.
117. **Mézes M., Balogh K. (2010):** Mikotoxinok hatása a szervezet lipidperoxidációs folyamataira és antioxidáns rendszerére. Szerk: Kovács Melinda, Agroinform Kiadó, Kaposvár, pp. 59-71.
118. **Miller, J. D., Grennhalg, R., Wang, Y. Z., & Lu, M. (1991):** Trichothecene chemotypes of 3 *Fusarium* species. *Mycologia*, 83(2), 121e130.
119. **Muller, H. M., Reimann, J., Schumacher, U., & Schwadorf, K. (1997):** Natural occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 137, 185e192.
120. **Müller, H. M. (1978):** Zearalenon - Ein östrogen wirksames Mycotoxin. *Übersichten zur Tierernährung*, 6., pp. 265–300.
121. **Mwanza, M., Kametler, L., Bonai, A., Rajli, V., Kovacs, M., Dutton, M. F. (2009):** The cytotoxic effect of fumonisin B1 and ochratoxin A on human and pig lymphocytes using Methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. *Mycotoxin Research*, 25. 4., pp. 233-238.
122. **Nagata, T., Suzuki, H., Ishigami, N., Shinozuka, J., Uetsuka, K.,**

- Nakayama, H., Doi, K. (2001):** Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53., pp. 309- 315.
123. **Naseem, S. M., Pace, J. G., Wannemacher, R. W., Jr. (1995):** A high-performance liquid chromatographic method for determining [3H]T-2 and its metabolites in biological fluids of the cynomolgus monkey. *Journal of Analytical Toxicology*, 19., pp. 151-156.
124. **Nielsen, C., Casteel, M., Dider, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E. (2009):** Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines. *Mycotoxin Research*, 25., pp. 77-84.
125. **Nikodémusz E., Mézes M. (1992):** Subchronic toxic effects of dietary T-2 toxin in breeding geese. *Proceedings, 9th International Symposium on Water Fowl, Pisa, Italy*, pp. 201-203.
126. **Niyo, K. A., Richard, J. L., Niyo, J., Tiffany, L. H. (1988a):** Pathologic, hematologic and serologic changes in rabbits given T-2 mycotoxin orally and exposed to aerosols of *Aspergillus fumigatus* conidia. *American Journal of Veterinary Research*, 49., pp. 2151-2160.
127. **Niyo, K. A., Richard, J. L., Tiffany, L. H. (1988b):** Effect of T-2 mycotoxin ingestion on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by rabbit alveolar macrophages and on hemathologic, serum biochemical, and pathologic changes in rabbits. *American Journal of Veterinary Research*, 49., pp. 1766-1773.
128. **Ohtsubo, K., Saito, M. (1977):** Chronic effects of trichothecene toxins. In: *Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehlman, M.A. (eds.) Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publishers, Park Forest South, IL, USA*, pp. 255-262.
129. **Pál L., Dublicz K., Weber M., Balogh K., Erdélyi M., Szigeti G., Mézes M. (2009):** Effect of combined treatment with aflatoxin B1 and T-2 toxin and metabolites on some production traits and lipid peroxide status parameters of broiler chicken. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57:(1). pp. 75-84.
130. **Palyusik, M., Harrach, B., Horváth, Gy., Mirocha, C. J. (1990):** Experimental fusariotoxicosis of swine produced by zearalenone and T-2 toxin. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10/1., pp. 52-55.
131. **Parkinson, T. (2009):** Normal reproduction in male animals. In: *Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England G.C.W. (Eds.). Veterinary Reproduction and Obstetrics, Saunders Elsevier, London, UK*, 9., pp. 681-705.
132. **Perkowski, J., Wiwart, M., Busko, M., Laskowska, M., Berthiller, F., Kandler, W., Krska, R. (2007):** *Fusarium* toxins and total fungal

- biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003. *Food Additives and Contaminants* 24: pp. 1292-1298.
133. **Pestka, J. J., Casale, W. L. (1990):** Naturally occurring fungal toxins. Eds.: Hriaga, J.O., Simmons, M.S., *Food Contamination from Environmental Sources*. Wiley, New York, pp. 613-638.
 134. **Pestka, J. J., Zhou, H. R., Moon, Y., Chung, Y. J. (2004):** Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichotecens: unraveling a paradox. *Toxicology Letters*, 153., pp. 61-73.
 135. **Pettersson, H., Börjesson, T., Persson, L., Lerenius, C., Berg, G., Gustafsson, G. (2008):** T-2 and HT-2 toxins in oats grown in northern Europe. *Cereal Research Communications* 36 Suppl. B: pp. 591-592.
 136. **Pettersson, H. (2008):** T-2 and HT-2 toxins in oats and oat products. 5th *Fusarium* Toxin Forum, 10-11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_545.pdf.
 137. **Pettersson, H. (2009):** T-2 and HT-2 toxins in oats and oat products. Update from CEEREAL on the status of the research activities of the European oat milling industry. 6th *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_873.pdf.
 138. **Pfeiffer, R. L., Swanson, S. P., Buck, W. B. (1988):** Metabolism of T-2 toxin in rats: effects of dose, route and time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36., pp. 1227-1232.
 139. **Pier, A. C., Cysewski, S. J., Richard, J. L., Baetz, A. L., Mitchell, L. (1976):** Experimental mycotoxicoses in calves with aflatoxin, ochratoxin, rubratoxin, and T-2 toxin. In: *Proceedings of the 80th Annual Meeting of the US Animal Health Association*. US Animal Health Association, Richmond, VI, USA, pp. 130-148.
 140. **Pier, A. C., Richard, J. L., Thurston, H. R. (1980):** *Natural Toxins*. Eds.: Eaker, D., Wadstrom, T., 691., Pergamon Press, Oxford.
 141. **Pinton, P., Tsybulskyy, D., Luciola, J., Laffitte, J., Callu, P., Lyazhri, F., Grosjean, F., Bracarense, A.P., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P. (2012):** Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junctions proteins and MAPKinases. *Toxicol. Sci.*, doi:10.1093/toxsci/kfs239.
 142. **Rafai P. (1997):** Eljárás a kukorica fuzáriumos fertőzöttségének (csőfuzáriózis) megelőzésére és a mikotoxikózisok okozta károk mérséklésére. OMFB kutatás (szerződés száma: 93-97-46-0558) jelentés az 1995-ben és 1996-ban végzett vizsgálatok eredményeiről. Budapest, pp. 1- 102.

143. **Rafai P. (2001):** Penészgombák és mikotoxinok a táplálékláncban. Szerk.: Kovács Ferenc: A hazai állattenyésztésben gyakoribb fuzáriumtoxinok biológiai és gazdasági hatásai. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, pp. 43- 46.
144. **Rafai P., Bata Á. (1998):** Mikotoxinok a táplálékláncban. Szerk.: Kovács, Ferenc: A toxinszennyezés előfordulása és jelentősége Magyarországon. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, pp. 78-111.
145. **Rafai P., Bata Á., Ványi A., Papp Z., Brydl E., Jakab L., Tuboly S., Tury E. (1995a):** Effect of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance and metabolism of growing pigs. *Veterinary Record*, 136., pp. 485-489.
146. **Rafai P., Tuboly S., Bata A., Till P., Vanyi A., Papp Z., Jakab L., Tury E. (1995b):** Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Veterinary Record*, 136., pp. 511-514.
147. **Ratcliff, J. (2002):** The role of mycotoxins in Food and Food Safety. AFMA (Animal Feed Manufacturers Association) 16th August 2002. www.facs.org.uk.
148. **Reddy, N. B., Devegowda, G., Shashidhara, R. G. (2004):** Ability of modified glucomannan to sequesterate T-2 toxin in the gastrointestinal tract of chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17., pp. 259-262.
149. **Richard, J. L. (1991):** Mycotoxins as immunomodulator in animal system. Eds.: Bray, G. A., Ryan, D. H.: *Mycotoxins, Cancer and Health*, Pennington Center Nutrition Series. Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA, pp. 197-220.
150. **Rodrigues, I., Naehrer, K. (2012):** A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. *Toxins*, 4., pp. 663-675; doi: 10.3390/toxins4090663.
151. **Rotter, B.A.; Prelusky, D.B.; Pestka, J.J. (1996):** Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, 48, 1–34.
152. **Rukmini, C., Prasad, J. S., Rao, K. (1980):** Effects of feeding T-2 toxin to rats and monkeys. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18., pp. 267-269.
153. **Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1959):** (as reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.
154. **Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. and Maher, P. (1998):** Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1375–1389.
155. **Sándor G., Ványi A. (1990):** Mycotoxin research in the Hungarian Central Veterinary Institute. *Acta Veterinaria Hungarica*, 38., pp. 61-68.

156. **Schardein, J. L., Schwetz, B. A., Kenel, M. F. (1985):** Species sensitivities and prediction of teratogenic potential. *Environ Health Perspect*, 61., pp. 55-67.
157. **Schatzmayer, G., Streit, E. (2013):** Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal*, 2013 August 6 (3). pp. 213-222.
158. **Schlatter, J. (2004):** Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology Letters*, 153. pp. 83–89.
159. **Schuhmacher-Wolz, U., Heine, K., Schneider, K. (2010):** Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA, Question No. EFSA-Q-2010-0143.
160. **Scientific Committee on Food (SCF) (2001):** Opinion on *Fusarium* Toxins. Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin. http://www.ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf.
161. **Scientific Committee on Food (SCF) (2002):** Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. European Commission, Brussels, Belgium. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf.
162. **Scott, P. M. (1990):** Trichothecenes in grains. *Cereal Foods World*, 35., pp. 661-666.
163. **Scudamore, K., Patel, S., Edwards, S. (2009):** HT-2 toxin and T-2 toxin in commercial cereal processing in the United Kingdom, 2004-2007. *World Mycotoxin Journal*, 2., pp. 357-365.
164. **Scudamore, K. A., Baillie, H., Patel, S., Edwards, S. G. (2007):** Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Additives and Contaminants*, 24., pp. 1374-1385.
165. **Šegvić Klarić, M., Zeljezic, D., Rumora, L., Peraica, M., Pepeljnjek, S., Domijan, A. M. (2012):** A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. *Archives of Toxicology*, 86 (1)., pp. 97-107.
166. **Serrano, A. B., Font, G., Ruiz, M.J., Ferrer, E. (2012):** Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry*, 135., pp. 423–429.
167. **Sexton, K., Klefman, D., Callahan, M. (1995):** An introduction to the national human exposure assessment survey and related phase 1 field studies. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 5., pp. 221-232.

168. **Shinozuka, J., Li, G., Kiatipattan, W., Uetsuka, K., Nakayama, H., Doi, K. (1997):** T-2 toxin induces apoptosis in lymphoid organs of mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49., pp. 387- 392.
169. **Sinovec, S., Jovanovic, M. (1993):** Development of pathomorphologic alterations in the liver, kidney and heart of rats treated with T-2 toxin. *Acta Veterinaria – Beograd*, 43., pp. 155-164.
170. **Slaiding, I. (2009):** T-2 and HT-2 and deoxynivalenol (DON) in malting barley and malt. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_870.pdf.
171. **Smith, T. K. (1992):** Recent advances in the understanding of *Fusarium* trichothecene mycotoxicoses. *Journal of Animal Science*, 70., pp. 3989-3993.
172. **Speers, G. M., Mirocha, C. J., Christensen, C. M., Behrens, J. C. (1977):** Effect on laying hens of feeding corn invaded by 2 species of *Fusarium* and pure T-2 mycotoxin. *Poultry Science*, 56., pp. 98-102.
173. **Sprando, R. L., Collins, T. F. X., Black, T. N., Olejnik, N., Rorie, J. I., Eppley, R. M., Ruggles, D. I. (2005):** Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food and Chemical Toxicology*, 43., pp. 623-635.
174. **Steinberger, A., Klinefelter, G. (1993):** Sensitivity of Sertoli and Leydig cells to xenobiotics in *in vitro* models. *Reproductive Toxicology*, 7., pp. 23-37.
175. **Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., Oswald, I. P. (2012):** Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*, 4., pp. 788-809; doi:10.3390/toxins4100788.
176. **Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., Schatzmayr, G. (2013):** Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. *Toxins*, 5., pp. 504-523; doi:10.3390/toxins5030504.
177. **Stuart, K. (2009):** Regulation and the occurrence of T-2 and HT-2 in maize and maize products. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, 9-10 February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_863.pdf.
178. **Sudakin, D. L. (2003):** Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143., pp. 97-107.
179. **Sundstøl, G. E., Pettesson, H. (2004):** Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114., pp. 205-239.

180. **Surai, P. F., Dvorska, J. E. (2005):** Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In: *The Mycotoxin Blue Book* (Ed.: Diaz, D.) Nottingham Press, pp. 93-138.
181. **Swanson, S. P., Nicoletti, J., Rood, H. D., Buck, W. B., Cote, L. M., Yoshizawa, T. (1987):** Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol by bovine rumen microorganisms. *Journal of Chromatography*, 414., pp. 335-342.
182. **Szilágyi M., Fekete S., Huszenicza Gy., Albert M. (1994):** Biochemical and physiological effects of long-term sublethal T-2 toxin feeding in rabbits. *Acta Biologica Hungarica*, 45., pp. 69-76.
183. **Thurman, J. D., Creasia, D. A., Quance, J. L., Johnson, A. J. (1986):** Adrenal cortical necrosis caused by T-2 mycotoxicosis in female, but not male mice. *American Journal of Veterinary Research*, 47., pp. 1122-1124.
184. **Tima H., Rácz A., Guld Zs., Mohácsi-Farkas Cs., Kiskó G. (2016):** Deoxynivalenol, zearalenone and T-2 in grain based swine feed in Hungary. *Food Additives & Contaminants: PART B*, <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2016.1213318>.
185. **Tobias, S., Rajic, I., Ványi, A. (1992):** Effect of T-2 toxin on egg production and hatchability in laying hens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 40., pp. 47-54.
186. **Túry E., Rafai P., Tuboly S. (1989):** A T-2 fuzáriotoxin hatása a sertés lymphoid szöveteire és egyes szerveire. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 44 (5), pp. 305- 311.
187. **Usleber, E. (2008):** Improvement and validation of methods of analysis for type A trichothecenes (T-2 toxin and HT-2 toxin) and occurrence of these mycotoxins in foods in Germany. 5th EC *Fusarium* Toxin Forum, 10-11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_546.pdf.
188. **Van der Fels-Klerx, H.J., Stratakou, I. (2010):** T-2 toxin and HT-toxin in grain and grain-based commodities in Europe: occurrence, factors affecting occurrence, co-occurrence and toxicological effects. *World Mycotoxin Journal*, 3 (4), pp. 349-367.
189. **Ványi A., Bata Á., Kovács F. (1994a):** Effects of T-2 toxin treatment on the egg yield and hatchability in geese. *Acta Veterinaria Hungarica*, 42., pp. 79-85.
190. **Ványi A., Glávits R., Bata Á., Kovács F. (1994b):** Pathomorphological changes caused by trichothecene fusariotoxin in geese. *Acta Veterinaria Hungarica*, 42., pp. 447-457.
191. **Ványi A., Glávits R., Gajdács E., Sándor G., Kovács F. (1991):** Changes induced in newborn piglets by the trichothecene toxin T-2. *Acta Veterinaria Hungarica*, 39., pp. 29-37.

192. **Ványi A., Glávits R., Molnár T. (1995):** Reproductive disorders due to F-2 and T-2 toxins in large-scale pig farms [in Hungarian]. *Hungarian Veterinary Journal*, 50., pp. 424-430.
193. **Wan, Q., Wu, G., He, Q., Tang, H., Wang, Y. (2015):** The toxicity of acute exposure of T-2 toxin evaluated by metabonomics technique. *Molecular BioSystems*, DOI: 10.1039/C4MB00622D.
194. **Wannemacher, R. W., Wiener, S. L. (1997):** Trichothecene mycotoxins. In: *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Textbook of Military Medicine* (R. Zajtcuk, ed), Burden Institute, Washington, DC, pp. 655-677.
195. **Weaver, G. A., Kurtz, H. J., Mirocha, C. J., Bate, F.Y., Behrens, J. C., Robison, T. S. (1978a):** Effect of T-2 toxin on porcine reproduction. *The Canadian Veterinary Journal*, 19(11)., pp. 310-314.
196. **Weaver, G. A., Kurtz, H. J., Mirocha, C. J., Bates, F. Y., Behrens, J. C., Robison, T. S., Gripp, W. F. (1978b):** Mycotoxin-induced abortions in swine. *The Canadian Veterinary Journal*, 19., pp. 72-74.
197. **Weaver, G. A., Kurtz, H. J., Bates, F. Y., Chi, M. S., Mirocha, C. J., Behrens, J. C., Robison, T. S. (1978c):** Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. *Veterinary Record*, 103., pp. 531-535.
198. **Weber M., Fodor J., Balogh K., Erdélyi M. és Mézes M. (2006):** Dose-dependent effect of T-2 toxin on the immunity against Newcastle disease virus in chickens. *Acta Vet. Brno*, 75, 387-391.
199. **Weber M., Balogh K., Fodor J., Erdélyi M., Ancsin Z., Mézes M. (2010):** Effect of T-2 and HT-2 toxin during the growing period on body weight, lipid peroxide and glutathione redox status of broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno*, 79., pp. 27-31.
200. **Weidenbörner, M. (2001):** *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 173.
201. **Wogan, G. N. (1966):** Chemical Nature and Biological Effects of the Aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, 30., pp. 460-470.
202. **World Health Organisation (WHO) (1990):** International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria 105. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecens, Ergot*. Geneva, Switzerland. Retrieved March 6, 1990, from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc105.htm#PartNumber:2>.
203. **World Health Organisation (WHO) (2000):** Evaluation of certain food additives and contaminants. Technical Report Series no. 896, WHO, Geneva.
204. **World Health Organization (WHO) (2001):** Food Additives Series: 47. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>.

205. **Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Yuan, Z. (2010):** Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metabolism Reviews*, 42., pp. 250-267.
206. **Wu, Q. H., Wang, X., Yang, W., Nussler, A. K., Xiong, L. Y., Kuca, K., Dohnal, V., Zhang, X. J., Yuan, Z. H. (2014):** Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Archives of Toxicology*, DOI 10.1007/s00204-014-1280-0.
207. **Wyatt, R. D., Harris, J. R., Hamilton, P. B., Burmeister, H. R. (1972):** Possible outbreaks of fusariotoxicosis in avians. *Avian Diseases*, 16., pp. 1123-1130.
208. **Yang, R., Wang, Y-M., Zhang, L., Zhao, Z-M., Zhao, J., Peng, S-Q. (2016):** Prepubertal exposure to T-2 toxin advances pubertal onset and development in female rats via promoting the onset of hypothalamic–pituitary–gonadal axis function. *Human and Experimental Toxicology*, 1–10., DOI: 10.1177/0960327116629529.
209. **Yang, J. Y., Zhang, Y. F., Li, Y. X., Guan, G. P., Kong, X. F., Liang, A. M., Ma, K. W., Li, G. D., Bai, X. F. (2015a):** Effects of T-2 toxin on the regulation of steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Toxicology and Industrial Health*, 1–7., DOI: 10.1177/0748233715590516.
210. **Yang, J. Y., Zhang, Y. F., Meng, X. P., Li, Y. X., Ma, K. W., Bai, X. F. (2015b):** T-2 toxin inhibits gene expression and activity of key steroidogenesis enzymes in mouse Leydig cells. *Toxicology in Vitro*, 29., pp. 1166–1171.
211. **Yarom, R., More, R., Sherman, Y., Yagen, B. (1983):** T-2 toxin-induced pathology in the heart of rats. *British Journal of Experimental Pathology*, 64., pp. 570-577.
212. **Yazdanpanah, H., Rasekh, H. R., Roshanzamir, F., Shafaghi, R., Abbasi, K. H., Naderi, N. (1997):** An assessment of possible protective roles of morphine and naloxone on the acute toxicity of T-2. *Cereal Research Communications*, 25.
213. **Yeung, C. H. (1995):** Development of sperm motility. In: Hamanah, S., Mieusset, R., Dacheux J. L. (Eds.). *Frontiers in endocrinology. Epididymis: role and importance in the infertility treatment*, Ares Serono Symposia, Rome, Italy, pp. 73-86.
214. **Yuan, Z., Matias, F. B., Yi, J., Wu, J. (2016):** T-2 toxin-induced cytotoxicity and damage on TM3 Leydig cells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 181–182., pp. 47–54.
215. **Zhang, J., Liu, S., Zhang, H., Li, Y., Wu, W., Zhang, H. (2017):** Gut satiety hormones cholecystokinin and glucagon-like Peptide-17-36 amide mediate anorexia induction by trichothecenes T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol and neosolaniol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 335., pp. 49–55.

216. **Zhang, Y. F., Yang, J. Y., Li, Y. K., Zhou, W. (2016):** Toxicity and Oxidative Stress Induced by T-2 Toxin in Cultured Mouse Leydig Cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*; DOI: 10.1080/15376516.2016.1258747; ISSN: 1537-6516 (Print) 1537-6524 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/itxm20>.
217. http://www.famic.go.jp/ffis/oie/obj/hc_T2toxin.pdf
218. <https://www.pluriselect.com/hu/knowledge-base/sample-material/buffy-coat.html>
219. <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0800046.tv>
220. <https://aem.asm.org/content/aem/78/24/8694/F1.large.jpg>
221. http://hirek.unideb.hu/sites/hirek.unideb.hu/files/20181009_nkp_2018-00002_sajtokozlemen_y_a_magyar_fogyasztok_rovid_es_hosszu_tavu_a_flatoxin-terhelesenek_meghatarizasa.pdf
222. <https://www.kwizda.hu/szakcikk/trifender-pro-pannon-starter-perfect-pro-kukorica>

12. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelven megjelent tudományos közlemények:

- Mwanza, M., Kametler, L., Bonai, A., Rajli, V., Kovacs, M., Dutton, M.F.: The cytotoxic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A on human and pig lymphocytes using Methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. *Mycotoxin Research*, 2009. 25. 4. 233-238. Q3
- Kovács, M., Tornyos, G., Matics, Zs., Kametler, L., Rajli, V., Bodnár, Zs., Kulcsár, M., Huszenicza, Gy., Keresztes, Zs., Cseh, S.: Subsequent effect of subacute T-2 toxicosis on spermatozoa, seminal plasma and testosterone production in rabbits. *Animal*, 2011.10.1563-1569. Q1, IF: 1,744
- Tornyos, G., Cseh, S., Matics, Zs., Kametler, L., Rajli, V., Bodnár, Zs., Rusvai, M., Mándoki, M., Kovács, M.: Preliminary results on the effect of chronic T-2 toxin exposure in rabbit bucks. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2011. 76. 369-373. Q3
- Rajli, V., Bodnár, Zs., Horvatovich, K., Kametler, L., Dutton, M. F., Kovács, M.: Preliminary investigations on the single and combined cytotoxic effect of T-2 and HT-2 toxin measured by Methyl thiazol tetrazolium (MTT) cytotoxicity test using pig lymphocytes. *Acta Agriculturae Slovenica*, 2012., Supplement 3, 253-257. Q3
- Kovács, M., Tornyos, G., Matics, Zs., Mézes, M., Balogh, K., Rajli, V., Bloch-Bodnár, Zs., Rusvai, M., Mándoki, M., Cseh, S.: Effect of chronic T-2 toxin exposure in rabbit bucks, determination of the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL). *Animal Reproduction Science*, 2013. 137. 3-4. 245-252. (2013) Q1, IF: 0,60

Proceedings-ben idegen nyelven megjelent közlemények:

- Rajli, V., Tornyos, G., Cseh, S., Matics, Zs., Kametler, L., Bodnár, Zs., Rusvai, M., Mándoki, M. and Kovács, M.: Effect of T-2 toxin in low doses on sperm quality in rabbit as a model animal. Budapest, 2. June 2012. CEELA-II- 2012 Conference Budapest. 124-125.
- Rajli, V., Bodnár, Zs., Horvatovich, K., Kametler, L., Dutton, M. F., Kovács, M.: Preliminary investigations on the single and combined cytotoxic effect of T-2 and HT-2 toxin measured by Methyl thiazol

tetrazolium (MTT) cytotoxicity test using pig lymphocytes. 20th Int. Symp. „Animal Science Days”, Krajnska gora, Slovenia, Sept. 19-21, 2012. Acta agriculturae Slivenica, Supplement 3, Ljubljana 2012, p. 253-257.

Proceedings-ben magyarul megjelent közlemények:

Rajli V., Cseh S., Tornyos G., Matics Zs., Huszenicza Gy., Kulcsár M., Rusvai M., Mándoki M., Kovács M.: A T-2 toxin reprodukciós toxicitása baknyulakban. 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2012. 99-104.

Abstractok idegen nyelven:

Mwanza, M., Kovacs, M., Rajli, V., Dutton, M.F.: The cytotoxic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A on human and pig lymphocytes using Methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. ESTIV 2010 16th International Congress on *In Vitro* Toxicology, Linz, 2-4 September, 2010., ALTEX, 27. Suppl. p. 94.

Tornyos, G., Cseh, S., Matics, Zs., Kametler, L., Rajli, V., Bodnár, Zs., Rusvai, M., Mándoki, M., Kovács, M.: Subsequent effect of subacute T-2 toxicosis and effect of chronic T-2 exposure in rabbit bucks. Conference on ‘Power of fungi and mycotoxins in health and disease’, 19-22 Oct 2011, Primosten, Croatia, p. 35.

Rajli, V., Cseh, S., Tornyos, G., Keresztes, Zs., Matics, Zs., Huszenicza, Gy., Kulcsár, M., Kovács, M.: Response of male rabbits to T-2 exposure. 10th WRSA World Rabbit Congress, 3-6. September 2012, Sharm El Sheikh, Egypt, p. 139.

Abstract magyar nyelven:

Rajli V., Cseh S., Tornyos G., Matics Zs., Huszenicza Gy., Kulcsár M., Rusvai M., Mándoki M., Kovács M.: A szubakut és krónikus T-2 expozíció hatásai baknyulaknál. 38. Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2012. jan. 16-19. 9.
http://www.vmri.hu/Nagyb/allathigi_2011.pdf

Előadások magyar nyelven:

Rajli V., Cseh S., Tornyos G., Matics Zs., Huszenicza Gy., Kulcsár M., Rusvai M., Mándoki M., Kovács M.: A T-2 toxin reprodukciós

toxicitása baknyulakban. 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2012.

Rajli V., Cseh S., Tornyos G., Matics Zs., Huszenicza Gy., Kulcsár M., Rusvai M., Mándoki M., Kovács M.: A szubakut és krónikus T-2 expozíció hatásai baknyulaknál. 38. Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2012. jan. 16-19.

13. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜL MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Magyarul megjelent tudományos közlemények:

- Fodor J., Balogh J., Weber M., Mézes M., Kametler L., Pósa R., Rajli V., Bauer J., Horn P., Kovács F., Kovács M.: A fumonizin B1 metabolizmusának *in vivo* és *in vitro* vizsgálata. Magyar Állatorvosok Lapja, 2007/12. 735-745.
- Szakács Á., Kósa E., Tuboly T., Tornyos G., Fodor J., Rajli V., Kovács F., Horn P., Kovács M.: A T-2 toxin és a fermentált búzaacsíra kivonatának hatása választott malacok immunválaszára. Magyar Állatorvosok Lapja, 2009. 131. 5. 276-282.
- Hafner D., Bogner P., Rajli V., Tornyos G., Pósa R., Horn P., Kovács M.: A fumonizin B1 mikotoxin hatása humán és házinyúl vörösvérsejtek membrán-fluiditására. Acta Agraria Kaposvariensis, 2009. 13. 1. 27-36.

Proceedings-ben idegen nyelven megjelent közlemények:

- Kovács, M., Kósa, E., Tuboly, T., Szakács, Á., Tornyos, G., Pósa, R., Rajli, V., Kovács, F., Horn, P.: Combined effect of T-2 toxin and a grain extract feed additive on the immune response in pigs. Cereal Research Communication, 2008. 36. Supplemenetum B, 369-373.
- Fodor, J., Kametler, L., Pósa, R., Mamet, R., Rajli, V., Bauer, J., Horn, P., Kovács, F., Kovács, M.: Kinetics of fumonisin B1 in pigs and persistence in tissues after ingestion of a diet containing a high fumonisin concentration. Cereal Research Communication, 2008. 36. Supplemenetum B, 331-337.
- Bónai, A., Horvatovich, K., Rajli, V., Kametler, L., Kovács, M.: *In vitro* metabolism of inulin by rabbit microbiota. Celle, 13-14. Mai 2009. 16th International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furbearing Animals and Pet Animals. 80-87.

Proceedings-ben magyarul megjelent közlemények:

- Bónai A., Horvatovich K., Rajli V., Kametler L., Kovács M.: Inulin kiegészítés hatása nyulak vakbél ökoszisztémájára *in vitro*

kísérletben vizsgálva. 22. Nyúltenyésztési Tudományos Nap,
Kaposvár, 2010. 97-101.

Előadás idegen nyelven:

Fodor, J., Kametler, L., Pósa, R., Mamet, R., Rajli, V., Bauer, J., Horn, P.,
Kovács, F., Kovács, M.: Kinetics of fumonisin B1 in pigs and
persistence in tissues after ingestion of a diet containing a high
fumonisin concentration. Cereal Research Communication, Szeged,
2008.

14. SZAKMAI ÖNÉLETRAJZ

1983. november 2-án születtem Dombóváron. Általános iskolai tanulmányaimat a döbröközi Petőfi Sándor Általános- és Zenei Iskolában végeztem (1990-1998). Középiskolás éveimet a kaposvári Pannon Lovasakadémia és Mezőgazdasági Szakközép Iskolában töltöttem 1998-2003 között, ahol 2002-ben sikeres érettségi vizsgát tettem, majd 2003-ban képesített gazda technikus minősítést szereztem.

2002-ben felvételt nyertem a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karára, agrármérnök és agrár-mérnök-tanár szakokra. 2008-ban okleveles agrármérnöki diplomát szereztem állattenyésztő mérnök szakirányon, 2009-ben pedig az agrár-mérnök-tanári diplomát vettem át.

2006-ban német nyelvből, majd 2012-ben angol nyelvből középfokú, „C” típusú, szakmai (agrár) nyelvvizsgát tettem.

2008 júliusa és 2009 szeptembere között a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karán, az Élettani és Állathigiéniai Tanszéken, az MTA-KE Állattenyésztési és állathigiéniai Kutatócsoportban kutató agrármérnökként dolgoztam.

Külföldi tanulmányúton vettem részt 2008 őszén a Dél-Afrikai Köztársaság Johannesburgi Egyetemén, a doktori kutatómunkám során *in vitro* kísérletben alkalmazott MTT módszer tanulmányozása céljából.

2009-ben felvételt nyertem a Kaposvári Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskolájába, ahol 2009-2012 között PhD tanulmányaimat végeztem.

2013 májusától 2015 februárjáig a gödöllői Teva Gyógyszergyár Zrt. Biológiai Ellenőrzési Osztályán, a Módszervalidációs Csoportban

minőségellenőrzési munkatársként, valamint az *In Vitro* laboratórium csoportvezető helyetteseként dolgoztam, ahol az ELISA microplate reader-t használtam munkám során. Második fiammal otthon töltött szülési szabadságról visszatérve, 2016 őszétől az MLT és Bioburden csoportban az előzőekkel megegyező beosztásban dolgoztam 2017 őszéig.

Jelenleg harmadik fiunkkal vagyok otthon, szülési szabadságon.

Fiaim: Márton (2010), Bertalan (2015) és Vilmos (2017).

15. MELLÉKLETEK

1. melléklet: A T-2 és HT-2 mikotoxin hatás vizsgálatának eredményei inkubációs idő függvényében koncentráció kategóriánként mérve

A Tukey tesztet (1. táblázat) alkalmazva szignifikáns eltérés az időpontok tekintetében csak HT-2 esetében volt megfigyelhető a 6 és 24 órás inkubációs idők között, a 0,1 és 0,2 μM -os toxinkoncentrációkra vonatkozóan.

1. Táblázat: Tukey teszt alkalmazásával ($P < 0,05$) kapott szignifikancia értékek kezelési csoportonként az inkubációs idő függvényében

6 és 24 órás kezelések közti szignifikancia érték koncentrációnként						
<i>Tukey teszt</i>	Koncentráció kategóriák					
HT-2	1	2	3	4	5	6
Szign. érték	NS	0,001	0,000	NS	NS	NS

NS: nincs szignifikáns különbség

LSD teszt használatával már több esetben mértünk szignifikáns különbséget az időpontok tekintetében. A T-2 toxin (2. táblázat) megfigyelve a 6 órás inkubációs idő adatai mutattak szignifikáns eltérést a 12 és 24 órához képest. Az utóbbi két inkubációs időt követően mért adatok közt nem volt mérhető szignifikáns eltérés a toxinkoncentráció kategóriákon belül. A 6 órás adatokat figyelembe véve a 0,05 és 0,1 μM -os T-2 koncentráció esetében volt mérhető szignifikáns eltérés a másik két inkubációs periódus során kapott eredményekhez viszonyítva.

2. Táblázat: LSD teszt alkalmazásával ($P < 0,05$) kapott szignifikancia értékek T-2 mikotoxinnal kezelt csoportok esetében az inkubációs idő függvényében

<i>LSD teszt</i>		6 óra					
		1	2	3	4	5	6
T-2	Koncentráció kategóriák						
12 óra	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	3	NS	NS	0,006	NS	NS	NS
	4	NS	NS	NS	0,022	NS	NS
	5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	6	NS	NS	NS	NS	NS	NS
24 óra	1	0,034	NS	NS	NS	NS	NS
	2	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	3	NS	NS	0,006	NS	NS	NS
	4	NS	NS	NS	0,000	NS	NS
	5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	6	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: nincs szignifikáns különbség

A HT-2 toxinnál (3. táblázat) minden időpont viszonylatában volt szignifikáns különbség. Érdekes megfigyelni, hogy a legnagyobb ($2,0 \mu\text{M}$) koncentráció tekintetében egyik időpont viszonylatában sem mérhető szignifikáns eltérés. A 6 órás adatok a 12 órával összevetve a 3 ($0,2 \mu\text{M}$) és az 5-ös ($1,0 \mu\text{M}$) koncentráció kategóriában; míg a 24 órás értékekhez viszonyítva a 3 legkisebb ($0,05$, $0,1$ és $0,2 \mu\text{M}$) koncentráció kategóriák esetében mutatott szignifikáns különbséget. A 12 és 24 óra viszonylatában azonos az eredmény, mint a 6 és 12 órát párhuzamba állítva, ahol a 3 ($0,2 \mu\text{M}$) és az 5-ös ($1,0 \mu\text{M}$) koncentráció kategóriák mutattak szignifikáns eltérést.

Mindhárom időpontot figyelembe véve csak a 3-as (0,2 μ M) HT-2 koncentráció kategória esetében figyelhetünk meg szignifikáns különbséget a mért adatok tekintetében.

3. Táblázat: LSD teszt alkalmazásával ($P < 0,05$) kapott szignifikancia értékek HT-2 mikotoxinnal kezelt csoportok esetében az inkubációs idő függvényében

LSD teszt		6 óra				12 óra			24 óra		
HT-2		1	2	3	5	2	3	5	1	2	3
6 óra	1					NS	NS	NS	0,004	NS	NS
	2					NS	NS	NS	NS	0,000	NS
	3					NS	0,004	NS	NS	NS	0,000
	5					NS	NS	0,040	NS	NS	NS
12 óra	2	NS	NS	NS	NS				NS	0,001	NS
	3	NS	NS	0,004	NS				NS	NS	0,034
	5	NS	NS	NS	0,040				NS	NS	NS
24 óra	1	0,004	NS	NS	NS	NS	NS	NS			
	2	NS	0,000	NS	NS	0,001	NS	NS			
	3	NS	NS	0,000	NS	NS	0,034	NS			

NS: nincs szignifikáns különbség