

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉS

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. 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 mikotoxinok jelentősége kiemelkedő a természetes eredetű élelmiszer-szennyezők csoportjában. A humán egészségkárosító hatásuk mellett gazdasági kihatásuk is jelentős az állattenyésztésben és a növénytermesztésben egyaránt (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>).

A mikotoxinok mikroszkópikus penészgombák szekunder anyagcseretermékei, amelyek előfordulásával szinte minden körülmények között számolni kell a táplálékláncban. A szántóföldi penészgombák 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], deoxinivalenol [DON], diacetoxyscirpenol [DAS], fusarenon-X [FX]) és a fumonizinek B csoportja (FB) (Streit és mtsai., 2012). Antigénhatással nem rendelkező és a környezeti

hatásokkal szemben nagyfokú ellenálló képességgel rendelkező molekulák. Az élelmiszer konyhai előkészítése, kezelése, feldolgozása, illetve a takarmányok előkészítése során a toxinok nem válnak ártalmatlanná, esetleg csak nagyon csekély mértékben csökken toxicitásuk. Kémiai szerkezetük igen változatos, ebből kifolyólag a szervezetre gyakorolt hatásuk is eltérő lehet (Kovács és mtsai., 1995). Egy 2016-os, Magyarországon végzett tanulmány alapján, gabona alapú sertés takarmányokat vizsgálva, minden minta 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 mikotoxin problémát erősíti a globális felmelegedés jelensége, mely megteremti a kedvező feltételeket a gombák szaporodásához és a toxinok képződéséhez olyan országokban is, ahol eddig ez nem jelentett veszélyt (Mesterházy, 2006). A teljeskiőrlésű termékek jelentős forrást képeznek, mivel a toxinok úgy, mint 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 környezeti toxikus hatásoknak szaporodásbiológiai rendellenességek is tulajdoníthatóak. 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 (Alm és mtsai., 2002).

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 (Methyl Thiazol Tetrazolium) 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.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Reprodukciós toxicitás vizsgálatok baknyulakon

Az *in vivo* kísérletek során a spermiumokat választottuk modellsejteknek, mert gyors osztódásúak és a toxikus hatásokkal szemben nagyon érzékenyek (Schardein és mtsai., 1985; Christian és Hoberman, 1996). A nyúl kiváló modellállat; kistestű, könnyen kezelhető, szapora (Foote és Carney, 2000).

Három kísérletet végeztünk el baknyulakkal:

- 1. kísérlet: magas dóziszú (4 mg/állat/nap), rövid ideig (3 nap) tartó T-2 expozíció;
- 2. kísérlet: alacsony dóziszú (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 dóziszú (0,33 és 0,66 mg/takkg), hosszan (65 nap) tartó T-2 expozíció, takarmányba kevert gombatenyészettel.

2.1.1. A kísérleti állatok, elhelyezésük és takarmányozásuk

Mindhárom kísérletben tenyésztésben lévő, 9 hónapos korú, ondóvételez szoktatott, kb. 4050-4500 g testsúlyú Pannon Fehér baknyulak (n=24) vettek részt. Az egyedileg, szabályozott klimatikus viszonyok közt elhelyezett állatokból alakítottuk ki a csoportokat. Az állatok a kereskedelmi forgalomban lévő tápot és a vizet *ad libitum* fogyasztották.

A T-2 gombatenyészet és a toxinnal szennyezett tápok mikotoxin tartalmát LC-MS (tömegspektroszkópia folyadékkromatográfiával) készülékekkel történő méréssel ellenőriztük. A kontroll táp nem tartalmazott kimutatható mennyiségű T-2-t.

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

A T-2 toxin előállítása Fodor és mtsai. (2006) módszere alapján történt. A gombatenyészetből 96%-os tisztaságú T-2 mikotoxint állítottunk elő.

2.1.3. A T-2 expozíció módja és időtartama

2.1.3.1. 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. 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. Beállítottunk egy korlátozott takarmányfogyasztású kontroll csoportot is (n=12), melyben a takarmányadagokat a visszautasítás arányában alakítottuk ki. Az állatok egészségi állapotát naponta 3 alkalommal ellenőriztük.

2.1.3.2. 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. 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.

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

A második kísérlet eredményei alapján, a T-2-t gombatenyészettel a takarmányba keverve adagoltuk úgy, hogy a takarmány a második kísérlet két alacsonyabb T-2 koncentrációját tartalmazza. 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.

2.1.4. Mintavételek, spermium vizsgálati módszerek

A szubakut toxikózis késői hatásának meghatározására a 3 napos toxinterhelés megszűntét követően a 48. napon (1. kísérlet), a krónikus terhelés hatásainak vizsgálatára a kísérleti periódus 65. napján (2. és 3. kísérlet) műhüvellyel spermamintát vettünk. Kórboncolást követően lemértük a here súlyát és mintát vettünk szövettani vizsgálatra.

A spermatológiai vizsgálatok keretében a következő paramétereket ellenőriztük:

- sperma pH-ja;
- spermiumok koncentrációja;
- spermiumok mozgása (motilitása);
- morfológiai és acrosomális rendellenességek;
- a járulékos nemi mirigyek funkciójának ellenőrzése céljából meghatároztuk az ondóplazma citromsav, cink és fruktóz koncentrációját.

2.1.5. Statisztikai analízis

Az adatok elemzése során végeztem egy- és többtényezős varianciánálízist, t-próbát, LSD post hoc tesztet, az SPSS 10.0 (2002) programcsomag használatával.

2.2. 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, biztosítható az azonos kísérleti körülmények megteremtése,

ezáltal lehetőség nyílik a könnyű ismételhetőségre. 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.

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.

2.2.1. MTT teszt főbb lépései

2.2.1.1. 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 vér-RPMI (Roswell Park Memorial Institute) keverékből Histopaque 1077 folyadék segítségével a limfocita réteg eltávolíthatóvá vált. Előállítottam a sejttenyészetet, ezután 96 lyukú lemezre helyeztem. A kísérletben felhasznált sejteket meghatározott körülmények között inkubáltam.

2.2.1.2. Sejtszámlálás festékkötés alapján

Neubauer sejtszámláló kamra segítségével, trypan-kék festéssel megállapítottam az ép sejtek arányát:

életképesség% = (nem festődő sejtek/összes sejt) x 100

2.2.1.3. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) eljárás

A 96-lyukú ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) lemezen a kísérleti elrendezésnek megfelelően helyeztem el a vizsgált tisztított toxin adott koncentrációjú oldatát. A leolvasási időpontokhoz 1-1 lemezt állítottam

elő. A lemezeket meghatározott körülmények közt 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. 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.)

Két kísérlet sorozatban a két mikotoxint külön, valamint kombinációjukat teszteltem:

1. kísérlet: a T-2-t 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 és 0,001 μM koncentrációban, a HT-2-t 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 és 0,05 μM koncentrációban, valamint kombinációjukat teszteltem, 6 és 24 órás kísérleti periódusokban.

2. kísérlet: a T-2-t 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 és 0,001 μM koncentrációban, a HT-2-t 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 és 0,05 μM koncentrációban, valamint kombinációjukat teszteltem, 6, 12 és 24 órás kísérleti periódusokban.

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

2.2.2. Statisztikai analízis

A kísérletből származó alapadatok értékelésekor többtényezős varianciaanalízist (Multiway ANOVA), illetve LSD (Least Significant Difference) és Tukey típusú „post hoc” tesztet ($P \leq 0,05$) alkalmaztam, az SPSS for Windows 19 (2010) szoftver használatával. A két toxin kombinációjának várt értékét Šegvić Klarić és mtsai. (2012) szerint határoztam meg.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A T-2 toxin hatása a baknyulak spermiumaira

3.1.1. Szubakut toxikózis hatása (1. kísérlet)

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: a májban jól látható szerecsendió rajzolat, kifejezett centrolobuláris zsíros infiltrációval, fakó vesék gombostűfejnyitól 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 kacsa), hasmenés, vérzés és hámsejtelhálás 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 (a kísérleti állatok 50%-ának elhullását okozza 24 órán belül) 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 toxin bevitel 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 csak úgy, 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).

Már az első T-2 toxin bevitel után is drasztikusan csökkent az állatok takarmányfelvétele (a kontroll csoport 27%-ára, $P < 0,05$), a napi takarmányfelvétel a kísérleti csoportban az első toxinbeadáskövető 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. Első héten a kezelt csoport átlag fogyasztása 40 g, a kontroll csoporté 150 g; második héten ez az arány 106 g és 160 g volt. A következő két hétben is elmarad 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 két hetes korlátozást követően (átlag 156-167 g között mozgott) nem mutatott szignifikáns különbséget sem a kísérleti, sem a kontroll csoporthoz képest.

Az állatok testsúlyában a kísérleti és a kontroll csoport között csak a kísérlet 17. (4027 g, illetve 4557 g) és 29. (4001 g, illetve 4579 g) napján volt szignifikáns különbség, 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. Egy alacsony mértékű testsúlycsökkenés volt megfigyelhető a korlátozott fogyasztású csoport esetében a 10. napnál, de ezt követően nem volt szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A trichotecének megváltoztatják a központi idegrendszer szerotonin aktivitását. A szerotonin receptorok fontos szerepet játszanak az étvágy szabályozásában, ezáltal a szerotonin koncentráció növekedése étvágy csökkenést és takarmány-visszautasítást vált ki (Smith, 1992). Irodalmi adatok szerint nyulakban a legalacsonyabb 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 petefészek aktivitását (Szilágyi és mtsai., 1994).

Az ondó pH értékére nem volt hatása toxinterhelésnek (6,9-7,2 érték között mozgott, mindegyik csoport esetében). A sperma mennyiségében (átlag 1 ml minden csoportnál) és az ondósejtek koncentrációjában ($245-263 \times 10^6/\text{ml}$) sem volt toxinhatás 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 ($P < 0,05$). A kontroll csoport normál morfológiájú spermium száma átlag 89%, ez a szám a kezelt csoport esetén 58%, míg a korlátozott fogyasztású állatoknál 59% volt. A leggyakrabban előforduló morfológiai

abnormalitások: fark rendellenességek (60%), citoplazmacsepp visszamaradása, acrosoma hiány, vagy megváltozott alakú fej.

A magas dózisú toxin bevitel a szeminális plazma citromsav koncentrációjának csökkenését (átlag 12,8-ról 2,7 mg/ml-re) váltotta ki ($P < 0,05$), más összetevő koncentrációjában nem okozott szignifikáns eltérést. Elfogadott tény, hogy alacsony százalékban a normál ejakulátum is tartalmaz abnormális morfológiájú spermiumot. Csökkent termékenységet jelez az ondo magas arányú abnormális alakú spermium tartalma (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. Ez 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 elhúzódo toxinhatás háttérében 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 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, melyek a takarmány korlátozás 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). Az ondóplazma összetételének változása, úgymint a citromsav koncentráció csökkenése, mint a környezeti tényező optimálistól való eltérése, szintén 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). Az, hogy a trichotecének átjutnak-e a vér-here gáton, nem bizonyított. Egy másik magyarázat szerint a T-2 közvetlenül az agyalapi mirigyre vagy a Sertolli-sejtek inhibin termelésére van hatással, melyet Sprando és mtsai. (2005) DON esetén igazoltak. A Sertolli-sejtek funkció zavara okozhatja az abnormális funkciójú spermiumok számának növekedését.

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

A toxinterhelésnek nem volt szignifikáns hatása a testsúlyra. Az állatok nem mutattak toxinhatásra utaló klinikai tünetet.

A T-2 toxin 0,1, illetve a 0,2 mg/állat adagja az első héten szignifikánsan 63 (átlag 98 g/nap), illetve 47%-ra (átlag 73 g/nap) csökkentette a takarmányfelvételt a kontroll (átlag 155 g/nap) csoporthoz viszonyítva. A legkisebb dózis (0,05 mg/állat) alkalmazásánál időszakos takarmányvisszautasítás jelentkezett a második héten ($P < 0,05$; átlag 98 g/nap a 141 g/nap-os fogyasztáshoz viszonyítva), míg a harmadik héten szignifikáns különbség csak a legnagyobb koncentráció esetén (átlag 83 g/napos fogyasztás a kontroll 139 g/nap-hoz viszonyítva) 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 a csoportok között. A vizsgált sperma minőségi paraméterekben a csoportok közt nem volt mérhető szignifikáns különbség, kivéve a citoplazmacsepp maradvány aránya esetén, mely a legnagyobb T-2 dózis esetében a kontrollhoz (átlag 3) képest 3,2-szeresére (átlag 9,6) nőtt. Az adatok tendenciája azt mutatja, hogy a toxinetetés negatívan befolyásolta a spermiumok motilitását, bár szignifikáns különbség nem volt mérhető a csoportok között. Az abnormális morfológiájú sejtek aránya nem mutatott szignifikáns különbséget az egyes csoportok között. 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 2. kísérletünk szövettani eredményei felvetették a Leydig-sejtek működési zavarának lehetőségét is. A hím reprodukciós folyamatok erősen tesztoszteron függőek. 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. Yang és mtsai. (2015b) ugyancsak egerekből izolált Leydig-sejteket T-2 toxinnal kezelve igazolták azt, hogy a toxin szignifikánsan csökkenti a hCG indukált tesztoszterontermelést.

Egérben és patkányban 0,23 és 0,5 mg/ts kg/nap értékben határozták meg a T-2 toxin NOAEL (no observable adverse effect level: felvételi vagy terhelési küszöb, megfigyelhető káros hatást még nem okozó szint) értékét

krónikus expozíciónál (SCF, 2001). A SCF szerint a megállapított $tTDI$ (0,06 $\mu\text{g}/\text{ts kg}/\text{nap}$) érték csökkenti a krónikus, szubkrónikus és reprodukciós toxicitás hatásainak kialakulását. Az 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 $\text{mg}/\text{ts kg}/\text{nap}$). 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 (mg/kg)] már gyakorlati körülmények között is gyakran előfordul (BIOMIN, 2018).

3.1.3. Kis dózisu, takarmányba kevert T-2 toxin krónikus hatása (3. kísérlet)

A második kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a 0,05 $\text{mg}/\text{állat}$ dózis még nem, míg a 0,1 $\text{mg}/\text{állat}$ terhelés kismértékű változásokat okozott a vizsgált paraméterekben. Így ezt a két dózist választottuk ki, hogy meghatározzuk, ilyen alacsony toxinterhelés okoz-e takarmány-visszautasítást, ha a toxint tartalmazó gomba tenyészetet közvetlenül a takarmányba keverjük. A takarmányfogyasztásban némi ingadozás volt megfigyelhető, ez a kontroll csoportban is mutatkozott, és nem volt visszavezethető a toxinhatásra. A vizsgált spermaminőségi paraméterek közül egyik sem mutatott szignifikáns különbséget a toxinnal kezelt és a kontroll csoportok között. A tisztított toxinkezeléssel megegyező toxinkoncentráció a takarmányba gombatenyésztéssel bekeverve (3. kísérlet) nem okozott csökkenést a tápfogyasztásban, nem rontotta szignifikánsan a mért spermaminőségi paramétereket és nem okozott szövettani kóros elváltozásokat. Ennek oka lehet a tisztított, etanol:víz elegyében oldott, illetve a gombatenyésztéssel bevitt T-2 eltérő felszívódása és toxikokinetikája. 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).

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

A kísérletben alkalmazott toxin koncentrációkat, a T-2 és HT-2 mikotoxin citotoxicitás vizsgálatával kapcsolatos, rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján választottam ki. Königs és mtsai. (2009) két humán sejtvonalon végzett vizsgálataik során magasabb citotoxikus hatást állapítottak meg T-2 esetében (IC_{50} érték 0,2-0,5 μM , inhibitor koncentráció, amely 50%-kal gátolja az enzim aktivitását), mint metabolitjainál, a HT-2 és neosolaniol esetében (IC_{50} érték 0,7-3,0 μM). 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-ban állapították meg. Sertés limfocitákra vonatkozóan semmilyen adat nem állt rendelkezésünkre. Korábbi vizsgálatunkban (Mwanza és mtsai, 2009), FB1 és OTA (ochratoxin-A) 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.

3.2.1. Az első kísérlet eredményei

(T-2 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 és 0,001 μM koncentrációban, HT-2 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 és 0,05 μM koncentrációban, valamint kombinációjuk, 6 és 24 óra elteltével)

A vizsgálat során mindkét toxin mutatott dózisfüggő hatást. A 6 órás inkubációt követően a T-2, illetve HT-2 koncentráció 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 $0,001 \mu\text{M}$ -ról $0,1 \mu\text{M}$ -ra 14%-os visszaesést okozott a sejtek életképességében, további csökkenés a toxinkoncentráció növekedésével ($0,5 \mu\text{M}$ -ra) nem volt megfigyelhető. HT-2 mikotoxint alkalmazva a legmagasabb életképesség csökkenés (22%) $0,2 \mu\text{M}$ -nál volt mérhető.

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

A T-2 és HT-2 kölcsönhatásának becsült értékét (expected value) Šegvić Klarić és mtsai. (2012) módszere alapján számoltam ki, melyet összehasonlítottam a mért értékekkel (measured value). A 6 órás inkubációt követően minden koncentráció esetében magasabb sejtleletképességet 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, látható volt, hogy a két toxin kombinációban következetesen alacsonyabb sejt túlélést okoz, mint egyedüli szennyezőként a 6 órás inkubációs idő leteltét követően. Ez a tendencia a 24 órás inkubációt követően nem volt tapasztalható, ahol a 2-es koncentráció kategória esetén a két toxin együttes hatása, 4 és 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.

3.2.2. A második kísérlet eredményei

(T-2 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 és 0,001 μ M koncentrációban, HT-2 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 és 0,05 μ M koncentrációban, valamint kombinációjuk, 6, 12 és 24 óra elteltével)

Ebben a vizsgálatban is kimutatható volt mindkét toxin dózisfüggő citotoxicitása. A 6 órás inkubációs idő eltelte után a T-2 mikotoxinnál a 0,001-ről 0,5 μ M-ra való koncentrációnövekedés a sejtek életképességi mutatóiban több mint 16%-os visszaesést eredményezett. A további koncentrációnövekedés nem mutatott szignifikáns különbséget az eredményekben. A HT-2 esetében a 0,5 μ M-nál volt a legalacsonyabb életképességi érték (12-13%-os csökkenés), mely a további koncentrációnövekedéssel nem mutatott szignifikáns eltérést. A további két inkubációs periódus letelte után T-2-nél ez a tendencia továbbra is érzékelhető volt 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, 0,5 és 1,0 μ M 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 μ M-os koncentrációban fejtette ki, a 0,001 μ M-hoz viszonyítva 12-16%-kal kisebb sejttúlélési %-ot eredményez. A legerősebb hatást HT-2 esetében a 12 órás terhelést követően az 1,0 μ M-os koncentrációnál mértük, de a sejtkárosítás itt csak 14%-os eltérést mutatott a legkisebb HT-2 (0,05 μ M) terheléshez viszonyítva.

A T-2 és HT-2 kölcsönhatásának mért értékei magasabb sejtleletképeséget eredményeztek a számított értékekhez viszonyítva ($P < 0,05$). A második *in vitro* kísérlet eredményei alátámasztották az első kísérletben tapasztaltakat.

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 hatásról 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 sejttúlélési 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 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 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 életképeséget, HT-2 esetében a legmagasabb

dózis (2 μM) 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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

A magas dózisú T-2 toxin bevitel elhúzódó hatását jelzi nyulakban a spermiumok mozgékonyságának csökkenése, az abnormális 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.

Egy felnőtt baknyúl 0,33 és 0,66 ppm-es (azaz 0,05, illetve 0,1 mg/állat/nap) T-2 terhelést képes tolerálni a vizsgált spermaminőségi paraméterek jelentős romlása, valamint takarmány-visszautasítás nélkül. A 0,2 mg/állat/nap expozíció 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.

5. ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

1. A T-2 mikotoxin 3 napig tartó, nagy dózisú (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 dóziszfüggő citotoxikus 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.

6. JAVASLATOK

További *in vivo* vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy eltérő koncentrációjú T-2 toxin expozíció hogyan befolyásolja a baknyulak termékenyítő képességét. Számos hatásmechanizmus vár még feltárásra a T-2 hím nemi működésre gyakorolt hatásával kapcsolatban is (spermiogenezis, spermiumok érése, ondóplazmatermelés, tesztoszterontermelés, stb.). A takarmánykorlátozás, vagyis csökkent tápanyagbevitel hatásait is javasolt tovább vizsgálni, mivel nem egyértelműek az eredmények (morfológiai abnormalitás növekedése, viszont motilitásbeli és plazma összetételre nincs hatással; enyhe fokú testsúly csökkenést okoz).

További *in vitro* vizsgálatok szükségesek a T-2 és HT-2 IC₅₀ 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. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK; ISMERETTERJESZTŐ PUBLIKÁCIÓK, ELŐADÁSOK

Idegen nyelven megjelent tudományos közlemény:

- 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 Slovenica*, 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.

Abstract 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.