

# DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KAPOSVÁRI EGYETEM**

**AGRÁR- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

**MIKOTOXINOK AZ ÉLELMISZERLÁNCBAN KUTATÓCSOPORT**

Doktori iskola vezetője:

**Prof. Dr. Kovács Melinda**

az MTA levelező tagja

Témavezető:

**Prof. Dr. Kovács Melinda**

az MTA levelező tagja

Társ-témavezető:

**Dr. Szabó-Fodor Judit**

tudományos főmunkatárs, PhD

## **A FUMONIZIN B<sub>1</sub>, A DEOXINIVALENOL ÉS A ZEARALENON MIKOTOXINOK DÓZIS- ÉS IDŐFÜGGŐ CITO- ÉS GENOTOXIKUS HATÁSA**

Készítette:

**KACHLEK MARIAM LILIA**

KAPOSVÁR

2017

DOI: 10.17166/KE2018.003

## 1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A mikotoxinok, amelyek a penészgombák másodlagos metabolitjai, súlyos állategészségügyi problémákkal hozhatók összefüggésbe. Eddig hozzávetőlegesen 400 mikotoxin metabolit azonosítása történt meg; a legfontosabb penészgomba nemzetségek a *Fuzárium*, *Aspergillus*, *Penicillium* és az *Alternaria*. Világszerte a leggyakrabban előforduló mikotoxinok a *Fuzárium* toxinok, különösen a fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), a deoxinivalenol (DON) és a zearalenon (ZEN).

A mikotoxinok szabályozása már a világ számos pontján előtérbe került, de a szabályozás alapján adó kockázatbecslések a mikotoxinok önálló hatásának vizsgálata alapján történnek. Csupán az utóbbi évtizedben változott meg ez az irányvonal, nevezetesen az együttesen előforduló mikotoxinok és azok kölcsönhatása került a kutatások középpontjába. A mikotoxinok együttes előfordulását számos tanulmány alátámasztja. A keresztszennyezettség a minták 70-100%-ában előfordul. Egy újabban készült felmérés szerint a vizsgált mintáknak legalább az 50%-ában jelen volt a DON, a fumonizinek (FUMs) és a ZEN. Európában a FB<sub>1</sub>, a DON és a ZEN a leggyakrabban előforduló mikotoxinok. Ennek ellenére a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN együttes hatásáról ismereteink nem olyan széleskörűek, mint az aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) vagy az ochratoxin A (OTA) esetében.

A FB<sub>1</sub>, DON és ZEN együttes hatásáról nincs *in vivo* kísérletekből származó információnk. *In vitro* vizsgálatok eredményeiről van már egy kevés számú tanulmány, a kombinált genotoxicitás (comet assay módszerrel) azonban még nem vizsgált terület.

A mikotoxinok egyik fő hatásmechanizmusa az oxidatív stresszhez köthető. Ez irányította a kutatók figyelmét az irányba, hogy számos gyógynövény lehetséges protektív hatását megvizsgálják a mikotoxinokkal végzett kísérletek során. Az oxidatív stressz kiváltásán túl, a mikotoxinok leggyakoribb célszervei a máj és a vese. Néhány gyógynövénynek ismert a

máj és vese funkcióit támogató hatása mikotoxin terhelést követően. A *Carduus marianus* növényfaj, amely az Asteraceae család tagja, ismert májvédő, illetve antioxidás hatású.

A kutatómunka során kitűzött céljaink a következők voltak:

- 1.) Megvizsgálni az alacsony dózisú FB<sub>1</sub>, DON és ZEN önálló, illetve kombinációban kifejtett hatását baknyulakban, kifejezetten a szaporodásbiológiai folyamatokra fókuszálva.
- 2.) Meghatározni a viszonylag magas dózisú (10 mg/takarmány kg) DON expozíció hatását növendék nyulakban a termelési paraméterekre, egyes vér és immunológiai paraméterekre, a kórszöveti elváltozásokra, az oxidatív státuszra és a genotoxicitásra. További célom volt meghatározni a *Carduus marianus* gyógynövény lehetséges protektív hatását DON expozíció során.
- 3.) Meghatározni a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN azon koncentrációját, amely 50%-kal csökkenti az élő sejtek számát (IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration) citotoxicitás tesztben, egészséges sertésekből izolált limfocitákat alkalmazva. Továbbá megvizsgáljuk két, majd a három toxin kombinált hatását, cito-és genotoxicitás tesztekben.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A két *in vivo* kísérletünkben Pannon fehér nyulakat használtunk. A kísérleti takarmányok mikotoxin szennyezésére *Fusarium verticillioides* (NRRL 20960; FB<sub>1</sub>) és *Fusarium graminearum* (NRRL 5883; DON, ZEN) törzseket alkalmaztunk. A második alkalommal végzett állatkísérletben, *F. graminearum* IFA 77 törzset használtunk, amelynek a tenyésztése során 28oC-os inkubációt alkalmazva csak DON termelődött, mellőzve a ZEN termelődést. Mindkét kísérletben, a mortalitást és a morbiditást naponta ellenőriztük, míg a takarmányfelvételt és a testtömeget hetente mértük. Az állatkísérleteket a Somogy Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Földhivatali Főosztálya engedélyezte a alábbi nyilvántartási számon: SOI/31/1679-11/2014. A takarmányok mikotoxin és szilibinin koncentrációját LC-MS készülékkel (Shimadzu Prominence UFLC, LC-MS-2020, Shimadzu, Kyoto, Japán) ellenőriztük.

Az *in vitro* vizsgálatok során sertésből izolált limfocitákat használtunk, melyek kísérleti végpontja a cito- (CCK-8; cell counting kit – sejtszámláló próba) és genotoxicitás (comet assay) megállapítása volt.

### 2.1 A FB<sub>1</sub>, DON és ZEN hatása baknyulakban

Célunk volt meghatározni a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN önálló és ezek kombinációban kifejtett hatását baknyulakban, különös tekintettel a mikotoxinok reprodukciós folyamatokra kifejtett hatására.

A 24 hetes baknyulakat (n=60, 4,0±0,5 kg) egyedileg helyeztük el. A baknyulak *ad libitum* fogyaszthatták a takarmányt, és ivóvíz is folyamatosan rendelkezésükre állt.

Négy kezelést alkalmaztunk: kontrol (C, toxinnal nem szennyezett takarmány), F (5 mg/takarmány kg FB<sub>1</sub>), DZ (1 mg/takarmány kg DON + 0,25 mg/takarmány kg ZEN), FDZ (5 mg/takarmány kg FB<sub>1</sub> + 1 mg/takarmány kg DON + 0,25 mg/takarmány kg ZEN).

A kísérlet 30. és 60. napján vér- és spermamintákat vettünk (n=15/csoport), és elvégeztük a GnRH (gonadotropin-releasing hormone) tesztet (n=6/csoport; vérvétel 0, 15, 50, 75, 90 és 115 perccel a GnRH kezelést követően) a tesztoszteron termelés nyomonkövetése céljából. A vérmintákból meghatároztuk a klinikai-kémiai paramétereket és az antioxidáns státuszt (malondialdehid [MDA], redukált glutation [GSH] és glutation-peroxidáz [GPx]), illetve comet assay vizsgálatot végeztünk. Az antioxidáns státusz paraméterei a vörösvértest hemolizátumból (RBCH) és a plazmából is meghatározásra kerültek. A malondialdehid, illetve a konjugált diének (CD) és triének (CT) koncentrációját a máj homogenizátumokból mértük meg.

A spermológiai vizsgálatok a következő paraméterek meghatározását jelentette: pH, spermiumok koncentrációja (Neubauer sejtszámláló kamra), motilitás, morfológia (natív és festett) és acrosoma integritás (Spermac<sup>TM</sup> festés). A motilitást spermium analízátor (Medealab<sup>TM</sup> Casa System) segítségével végeztük.

A comet assay vizsgálatok céljából a kísérlet 60. napján spermát gyűjtöttünk (n=15/csoport). A vizsgálatban humán spermiumokra kidolgozott módszert alkalmaztunk, néhány módosítással. Az ondó mosását követően a spermiumokat mikroszkóp lemezre ágyasztuk, majd lízist hajtottunk végre. Elektroforézist követően a lemezeket lemostuk, szárítottuk és ethidium-bromiddal (EtBr) festettük. Az elkészített tárgylemezeken az elváltozásokat fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük. A "comet" értékeket '0' (nincs elváltozás), '1', '2', '3' és '4' (legsúlyosabb elváltozást mutató sejt) osztályozással értékeltük a DNS károsodás mértéke és a fej/farok elváltozása alapján.

A kísérlet végén (65. nap) az állatokat bódítás után elvéreztettük. Lemértük a máj, vesék, herék és a lép tömegét, leírtuk a makroszkopikus elváltozásokat, illetve mintákat gyűjtöttünk kórszövettani vizsgálatokhoz.

A tesztoszteron koncentráció és a spermatológiai paraméterek meghatározása az Állatorvostudományi Egyetemen (Budapest) történt, míg az antioxidáns státuszra vonatkozó vizsgálatokat a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Karának laboratóriumában (Gödöllő) végezték el. A kórszövettani vizsgálatokat az Autopsy Kft. végezte el a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium 9/2011. rendelete szerint.

A statisztikai analízist IBM SPSS (20.0 verzió) szoftver segítségével végeztük. Az adatok feldolgozása az átlagok összehasonlítását (kétmintás T-próba, egytényezős variancia analízis, Tukey teszt), a kezelés és az idő közötti interakció meghatározását (GLM) és a korreláció és az alapstatisztikai adatok meghatározását jelentette. A comet assay estében a kék-négyzet tesztet keresztábrás adatelemzésre alapoztam.

A lehetséges interakció-típusok meghatározását Greiner és Oswald (2011) meta-analízise alapján végeztük. Szinergista hatásként értelmeztük, ha egy adott mikotoxin kombináció (FDZ) hatása meghaladta azt, ami az azt alkotó egyes vagy párosított (F és DZ) komponensek esetében várható volt. Szintén szinergista hatásként értelmeztük, ha egy adott kezelés (F vagy DZ) nem váltott ki mérhető hatást, de együttes hatásuk (FDZ) erősebb volt, mint az amúgy hatásos kezelésé önmagában. Additív hatás alatt azt a jelenséget értelmeztük, mikor az együttesen ható tényezők hatása az egyes komponensek egyedi hatásaiból összegződve származtatható.

## **2.2 A DON és a *Carduus marianus* hatása növendék nyulakban**

A kutatás célja volt megvizsgálni a magas dózisú (10 mg/kg takarmány) deoxinivalenol hatását, illetve a *C. marianus* gyógynövény lehetséges védő/megelőző hatását növendék nyulakban.

A 35 napos nyulakat (n=72) dróthálóból készült, szabványos nyúlketrecekben helyeztük el (n=3/ketrec, 4 ketrec/csoport) és a következő takarmányozási csoportokat alakítottuk ki: kontroll (C), amely normál

alaptakarmányt fogyasztott; a kontroll takarmányt fogyasztó csoport kiegészítve *C. marianus* növényvel 5 g/kg (H1), illetve 10 g/kg (H2) dózisban; kontroll takarmányt fogyasztó csoport 10 mg/kg DON szennyezettséggel (CT); kontroll takarmányt fogyasztó csoport kiegészítve *C. marianus* növényvel 5 g/kg dózisban, 10 mg/kg DON szennyezettséggel (H1T); és egy kontroll takarmányt fogyasztó csoport kiegészítve *C. marianus* növényvel 10 g/kg dózisban, 10 mg/kg DON szennyezettséggel (H2T). A *C. marianus* növényt a Parceval (Pty) Ltd Gyógyszerészetből, Dél-Afrikából, por formájában (magdarálmány) szereztük be.

A 21. napon vért vettünk a fülvénából klinikai-kémiai, hematológiai, immunológiai (leukociták, fagocitáló aktivitás), antioxidáns paraméterek (GPx aktivitás, GSH és MDA koncentráció) meghatározása céljából, valamint comet assay teszt elvégzésére. Az antioxidáns paramétereket a vörösvértest hemolizátumból is meghatároztuk.

A kísérleti nyulaktól vett vérből izolált limfocitákkal comet assay-t végeztünk el. A farok-csóva intenzitást (DNS mennyisége %-ban a farok-csóvában) Epifluoreszcens mikroszkóppal (B600 TiFL; optimum filter 4;  $\lambda = 302$  nm) és Comet IV (4.3.1.) szoftverrel értékeltük.

A 21. napon csoportonként 6 állatot bódítást követően elvéreztettünk. Az emésztő traktus azonnali eltávolítását követően szeparáltuk a vékony- és vakbelet. A vakbél tartalmából mintát vettünk pH, mikrobiota összetétel és a rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) meghatározása céljából. A mikrobiota összetétel klasszikus mikrobiológiai módszerrel került meghatározásra. Az SCFA koncentrációkat gázkromatográfiás módszerrel mértük.

Mintát vettünk a jejunumból (1 cm távolságra a Meckel divertikulumtól), az ileumból (1 cm távolságra az ileocekális billentyűtől), májból, lépből, vesékből és a szívből kórszövettani vizsgálatok céljára, illetve a jejunum középső szakaszából a citokinek (IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ ) meghatározására (rt-RT-



PCR). Az immunológiai paraméterek meghatározása az Állatorvostudományi Egyetemen (Budapest) történt.

A statisztikai analízist IBM SPSS (20.0 verzió) szoftver segítségével végeztük (T-próba, egytényezős variancia analízis (ANOVA), Tukey posthoc teszt). Minden esetben  $p < 0.05$  szignifikancia szinten értékeltünk.

### **2.3 *In vitro* kísérletek**

Az elvégzett kísérletek célja a következő volt: a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN toxinok IC<sub>50</sub> értékének meghatározása, illetve ezen toxinok kettős és hármas kombinációban kifejtett hatásának vizsgálata (cito- és genotoxicitás-comet assay) sertés limfociták felhasználásával. Az *in vitro* kísérletekben kémiaiilag tiszta mikotoxinokat használtunk, melyeket a Sigma Aldrich Kft.-től vásároltunk.

A limfocitákat egészséges sertésekből izoláltuk, számuk a citotoxicitás tesztben  $2 \times 10^6$  sejt/ml, míg a comet assay tesztben  $4-5 \times 10^6$  sejt/ml volt.

#### **2.3.1. Citotoxicitás vizsgálatok**

Citotoxicitás vizsgálatok céljára gyakran használják a 3-[4,5, dimethylthiazol-2, -yl]-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) só-t. A munkánk során az MTT vízdoldékony verzióját használtuk [WST-8; cell counting kit-8 (CCK-8)]. A CCK8 sokkal kevésbé mérgező a sejtek számára, magasabb szenzitivitással bír és oldhatósága kiváló.

A citotoxicitás tesztek során a sejteket 24, 48 és 72 órán keresztül inkubáltuk, 96 lyukú teszt lemezekben. Az inkubációs idők leteltét követően CCK-8 oldatot adagoltunk a sejtekhez, majd azokat további 4 órán keresztül inkubáltuk. Az abszorbanciát 450 és 620 nm-en értékeltük Microplate Reader készülékkel. Az IC<sub>50</sub> érték meghatározása során a következő koncentráció-

tartományokat teszteltük: 50–150 µg/ml a FB<sub>1</sub>, 0,07–0,84 µg/ml a DON és 1–50 µg/ml a ZEN esetében.

A dózisfüggés vizsgálatára vonatkozóan lineáris és nem lineáris illesztést alkalmaztam, míg az életképességet 50%-ra csökkentő koncentráció-értéket (IC<sub>50</sub>) OriginPro 9.0 szoftverrel számítottam ki.

### **2.3.2. Genotoxicitás vizsgálatok**

A genotoxicitás tesztekben izolálást követően a sejt kultúrát 100 µl-es dózisokban Eppendorf csövekben osztottuk szét, melyeket egy éjszakán keresztül 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> tenzióban inkubáltunk. Ezt követően a tesztcsövekhez adagoltuk a toxin szuszpenziót, majd inkubáltuk azokat további 24, 48 és 72 órán keresztül. A Horvatovich és mtsai (2013) által leírt comet assay módszert követtük a továbbiakban, néhány módosítással. Foszfát pufferolt fiziológiás sóval (PBS) mostuk át a lemezeket, majd azokat ethidium bromidba (EtBr) ágyaztuk és fluorszcens mikroszkóppal, illetve Comet IV (4.3.1) szoftverrel értékeltük. Az analízis során 100 sejtet értékeltünk gélenként (vagyis 400 sejt/koncentráció). A sejtek besorolása a szoftver analízis szerint történt (farok-csóva intenzitás, azaz a DNS mennyisége %-ban a farok-csóvában).

### **2.3.3. Kombinált cito-és genotoxicitás tesztek**

Az interaktív hatások megállapítása céljából a mikotoxinok kettős, illetve hármas keverékének kombinált hatását vizsgáltuk, alacsony dózisban (IC<sub>50</sub> érték alatti). A kettős, illetve három toxinból álló keverékek cito-és genotoxicitásának vizsgálata során 5 µg/ml (FB<sub>1</sub>, ZEN) és 0,07 µg/ml (DON) koncentrációt alkalmaztunk. A második genotoxicitás kísérlet-sorozat alkalmával magasabb (de még IC<sub>50</sub> érték alatti) koncentrációkat teszteltünk (25 µg/ml FB<sub>1</sub>, 0,21 µg/ml DON és 10 µg/ml ZEN). Az alkalmazott

kombinációk a következők voltak: DON+FB<sub>1</sub> (DF), DON+ZEN (DZ), FB<sub>1</sub>+ZEN (FZ), DON+FB<sub>1</sub>+ZEN (DFZ).

Azon kísérletekben, ahol kombinációk fordultak elő a valós mérési eredményeket várható értékkel vettem össze, a statisztikai eltérések vizsgálata érdekében. Utóbbi értékek számításánál a következő módon vontam be az egyes kezelésenként mért csoportátlagokat:

Átlag % (várható érték myc1+myc2 esetére) = átlag % (myc1) + átlag % (myc2) – 100% kontroll

Átlag % (várható érték myc1+myc2+myc3 esetére) = átlag % (myc1) + átlag % (myc2) + átlag % (myc3) – 100% kontroll

Szórás (SD) és standard hiba (SE) kiszámítása:

SD (várható érték myc1+myc2 esetére) =  $[(SD \text{ myc1})^2 + (SD \text{ myc2})^2]^{1/2}$

SD (várható érték myc1 + myc2 + myc3 esetére) =  $[(SD \text{ myc1})^2 + (SD \text{ myc2})^2 + (SD \text{ myc3})^2]^{1/2}$

Az eredmények interpretálása a következő módon történt:

(i) additív hatást állapítottam meg, ha a mért adatok nem tértek el szignifikánsan a várható értékektől;

(ii) szinergista hatásnak tekintettem, ha a mért és várható értékek szignifikáns eltérést mutattak (a fark-csóva intenzitás esetében a mért értékek magasabbak voltak a becsülnél, és életképesség vonatkozásában ennek ellentettje);

(iii) antagonista hatásnak tekintettem, ha a mért és várható értékek szignifikáns eltérést mutattak (a fark-csóva intenzitás esetében a mért értékek alacsonyabbak voltak a becsülnél, és életképesség vonatkozásában ennek ellentettje).

A különbségek igazolására vagy elvetésére a mért és számított adatok átlagainak vonatkozásában páratlan T-tesztet alkalmaztam.

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1 FB<sub>1</sub>, DON és ZEN hatása baknyulakban

A takarmány FB<sub>1</sub> (5 mg/kg), DON (1 mg/kg) és ZEN (0,25 mg/kg) koncentrációja 169-193 µg FB<sub>1</sub>/tt.kg, 33,7-38,7 µg DON/tt.kg, és 8,5-9,7 µg ZEN/tt.kg toxinfelvételnek felelt meg. Csak a FB<sub>1</sub> hatását tudtuk megvizsgálni önállóként, mivel a *F. graminearum* törzs DON és ZEN toxint is termel egyidejűleg (ahogyan ez a gyakorlatban is tapasztalható). Ezért a DON és ZEN terhelést egy kezelésként vizsgáltuk, habár következtetéseinket önálló hatásaikra vonatkozóan vontuk le. Az interakció összes formáját (additív, szinergista, antagonist) megfigyelhettük ebben a kísérletben.

A csoportok között nem volt különbség a takarmány felvételben. Nem volt szignifikáns különbség a csoportok között a testtömeg vonatkozásában sem (12 mérési időpont), a csoportokban az átlagos testtömeg 4252 és 4442 g volt a kísérlet végén. Nem volt mikotoxikózisra utaló tünet megfigyelhető.

A szervek (herék, máj, vesék, lép) közül csak a lép tömegében volt szignifikáns különbség a csoportok között (legmagasabb a DZ csoportban, legalacsonyabb a C csoportban).

Egyik kezelés sem okozott májkárosodást, funkcióban való eltérést, amelyet alátámasztottak a fiziológiás ALT, AST, GGT és CREA értékek, a közel azonos máj és vese tömegek és a kórszöveti elváltozások hiánya. Ezek a szervek toleránsnak bizonyultak az alacsony dózisú mikotoxin terhelésre.

Az összfehérje (TP), a globulin (GLOB) és az összkoleszterin (tCHOL) koncentrációban enyhe szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a kezelések között. Az adatok a referencia tartományokon belüliek voltak. Egyedül a GLOB koncentrációja volt a határérték fölött a C és az FDZ csoportokban a 30. napon.

Nem volt interakció a klinikai kémiai paraméterek esetében, kivéve a TP és GLOB értékeit. Az azonos csoportokon belüli idő hatását minden csoport esetében megfigyeltük, de az ALT és a TP esetében nem.

Nem volt különbség az azonos csoportokban a két mintavételi időpont között. A 30. napon a kezelések között nem volt szignifikáns különbség. A 60. napon a DZ kezelés szignifikánsan emelkedett GPx aktivitást eredményezett a vörösvértetekben, illetve magasabb MDA koncentrációt okozott a vörösvértest hemolizátumban és a plazmában is, míg a vérplazmában mért GSH koncentráció alacsonyabb volt. A többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációja során kialakuló konjugált diének és triének koncentrációja megemelkedett a DZ kezelésben, a hármastoxinkombinációhoz (FDZ) viszonyítva.

A 60. napon, a 75., 90. és a 115. percben vett mintákban mért tesztoszteron koncentráció szignifikánsan különbözött a mikotoxin terhelés hatására. Az FDZ csoport állatainak Leydig sejtei szignifikánsan kevesebb tesztoszteront szintetizáltak a GnRH kezelésre reagálva a 60. napon, összehasonlítva a többi csoport adataival.

Egyik időpontban sem volt interakció megfigyelhető a kezelés és idő hatása vonatkozásában. Továbbá nem volt az időnek hatása egyik mintavételi időpont esetében sem.

Nem volt a toxin kezeléseknél hatása az ondó pH-jára (átlagosan 6,4-8,2 minden csoportban), az ondó mennyiségére (átlagosan 1 ml a csoportokban), a spermiumok koncentrációjára ( $2,4$  to  $2,6 \times 10^7$ /ml) és motilitására. A progresszív előrehaladó motilitást mutató spermiumok aránya 80%-ról (kísérlet kezdete) 67%-ra csökkent az FDZ csoportban a 60. napon, amely szignifikánsan különbözik a másik három kezelésben mért adatoktól. Különbség volt tapasztalható a DZ (66%) és C (80%) csoportok között a normál morfológiát mutató sejtek arányában. A leggyakoribb morfológiai

abnormalitások a következők voltak: abnormális farok, citoplazma csepp megtartottsága, az akroszóma hiánya és fej morfológiájának megváltozása.

Az összes toxin kezelés DNS károsodást okozott (comet assay-vel vizsgálva) és a kezelt sejtek 98,6 (F), 91,6 (DZ) és 91,8%-át (FDZ) 1-től 3-ig terjedő comet kategóriába soroltuk az értékelés során. Az önálló fumonizin kezelés szignifikánsan kevesebb 0 értéket (sértetlen sejt) eredményezett, összehasonlítva a többi csoporttal. A 2-es kategóriát jelentő "comet" értékek az F és DZ csoportok állatainak mintáiban volt a leggyakoribb, az FDZ csoportban az ebbe a kategóriába sorolt sejtek száma szignifikánsan kevesebb volt. Ez antagonist interakciót jelez a F és DZ csoportok között. A comet assay 4-es kategóriájába egy sejtet sem soroltunk be, ami azt jelzi, hogy egyik toxin kezelésnek sem volt kifejezetten erős genotoxikus hatása.

Kórszövettani vizsgálattal megállapítható volt, hogy az F, DZ és FDZ csoportokban a spermatogenezis intenzitása 43, 31, illetve 64%-kal csökkent, melyet a differenciálódott spermiumok hiánya, az elvékonyodott csírahám és a sokmagvú óriássejtek megjelenése (utalva a csírahám sejtek meióziséban és mitózisában bekövetkező zavarra) és néhány esetben a spermatogóniumok hiánya jelzett. Ezek az elváltozások különböző súlyossággal (1-3 fokozat) voltak megfigyelhetők a here csatornácskáiban.

A toxinnal kezelt állatok heréiben a Leydig intersticiális sejtek aránya és morfológiája nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A lép Malpighi-féle testjeiben a DZ és FDZ csoportok állatainak esetében enyhe limfocita kiürülés (a Malpighi-féle testekben a T és B függő zónáknak az enyhe elvékonyodása) volt megfigyelhető. Ugyanakkor a limfoblasztok és limfociták morfológiája nem különbözött a kontroll csoporttól.

### 3.2. A DON és a *Carduus marianus* hatása növendék nyulakban

A takarmányfelvételben, a testtömegben és a testtömeg gyarapodásban nem volt szignifikáns különbség tapasztalható. A toxinnal terhelt nyulak nem mutattak klinikai tüneteket, nem volt takarmány visszautasítás tapasztalható, illetve nem volt toxinhatásra visszavezethető elhullás sem. Nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető a növényi kiegészítés hatására, sem önállóan, sem a DON toxinnal kombinálva.

A kontroll csoportban szignifikánsan magasabb volt a neutrofil granulociták száma a többi csoporthoz képest. Ezzel ellentétben, a monociták és az eozinofil granulociták aránya szignifikánsan magasabb volt a toxinnal kezelt csoportokban, összehasonlítva a kontroll csoporttal.

A szérum összfehérje, albumin, glükóz, triglicerid, összkoleszterin, karbamid és a kreatinin koncentrációja, csakúgy mint az ALT, AST és GGT aktivitás nem különbözött szignifikánsan a csoportokban, illetve az átlagértékek a referencia tartományba estek.

A DON toxinnak és a növényi kiegészítésnek nem volt hatása az állatok antioxidáns státuszára.

Nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető egyik bél citokin (IL-1, IL-2 és INF- $\gamma$ ) esetében sem. A makrofágok száma és a makrofágok fagocitáló aktivitása sem különbözött szignifikánsan a csoportok között.

A DON kezelés nem fejtett ki szignifikáns hatást a bél és bélboly morfológiájára. Mindkét csoportban a bél nyálkahártya morfológiája normálisnak volt mondható, illetve a bélbolyhok epiteliális rétege érintetlen volt. A bélbolyhok megvastagodása és fúziója csak egyetlen toxinnal kezelt csoportban volt megfigyelhető, míg meglepő módon, ez az elváltozás a HT2 csoportba tartozó állatok közül háromban előfordult. A bélbolyhok magassága és a kripták mélysége a duodenumban és jejunumban hasonlóan alakult mindegyik csoportban. A 6 DON-nal kezelt állat közül 4 esetében a



GALT-ban (gut associated lymphoid tissue) a limfoblaszt proliferációja és egyidejű apoptózisa arányában az apoptózis döntő mértékűvé vált.

A DON kezelés hatására a lép fehér pulpájának centrális részén, a Malpighi-féle testekben limfocita kiürülés volt megfigyelhető, ami kisebb méretű nyirokszövethez vezetett a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez utóbbi, DON által kiváltott elváltozások kialakulását az alkalmazott növényi kiegészítés (mindkét koncentrációban) megakadályozta.

A DON kezelés a májsejtek degeneratív elváltozása nélküli, enyhe fibrózist okozott a májban, amelyet a *C. marianus* kiegészítés kivédett, jelezve a májvédő hatást.

A DON nem okozott patológias elváltozásokat sem a szívben, sem pedig a vesékben.

A comet assay vizsgálatban kapott eredmények alapján a DON nem bizonyult genotoxikusnak a limfociták esetében.

A kezelések nem változtatták meg szignifikánsan a vakbél tartalom pH-ját, a rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) koncentrációját (mmol/kg) és az egyes zsírsavak (ecetsav, propionsav és vajsav) arányát. A vakbél microbiota összetételében szintén nem volt szignifikáns különbség kimutatható (anaerob baktériumok és a *Bacteroides*-ek száma). A coliformok száma nagyon alacsony volt minden minta esetében (<100 telep). Ugyanakkor, a C és a H1 csoportokban szignifikánsan kevesebb volt az aerob baktériumok száma, összevetve azokat a CT, H1T és H2T csoportokkal.

### **3.3. *In vitro* kísérletek**

Mindhárom toxin dózis- és időfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét. A DON és a ZEN esetében az IC<sub>50</sub> értékek minden inkubációs időpontban meghatározhatóak voltak. Ezzel ellentétben, a FB<sub>1</sub> toxinnal végzett kísérletek során az 50%-os életképességet csak a 72 órás inkubációt követően értük el. A citotoxicitás mértéke növekvő sorrendben a következő

volt:  $FB_1 < ZEN < DON$ . Az IC értékek tartománya nagyban függött az expozíció hosszától; 0,31-0,42  $\mu\text{g/ml}$  volt a DON, 16,6-22,9  $\mu\text{g/ml}$  a ZEN és 101,15  $\mu\text{g/ml}$  a  $FB_1$  esetében (72 órát követően).

Ebben a kísérlet sorozatban a  $FB_1$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ), DON (0,07  $\mu\text{g/ml}$ ) és ZEN (5  $\mu\text{g/ml}$ ) kombinációja antagonist hatásokat eredményezett a sejtek életképességére. A toxinok együttes alkalmazása (DFZ) jelentős antagonizmust fejtett ki az összes inkubációs időt követően, amely a legjellegzetesebben a 72 órás inkubációt követően volt megfigyelhető. A kettős kombinációk esetében is hasonló trend volt megfigyelhető az inkubációs idő függvényében, amely interaktív hatásokat (FZ) vagy az interakció mértékének a fokozódását (DF és DZ) eredményezte.

Tudomásunk szerint nem vizsgálták még a  $FB_1$ , DON és ZEN kombinált genotoxikus hatását. A comet assay-vel végzett kísérleteink során két különböző vizsgálat sorozatot végeztünk el, alacsonyabb és magasabb tartományú koncentrációk alkalmazásával.

Alacsonyabb tartományú koncentrációk (5  $\mu\text{g/ml}$   $FB_1$ , 0,07  $\mu\text{g/ml}$  DON és 5  $\mu\text{g/ml}$  ZEN) alkalmazása során antagonizmust tapasztaltunk az egyes mikotoxinok között.

24 órás inkubációt követően az összes alkalmazott kombinációban antagonizmus volt megfigyelhető, azonban ez csak a hármas kombinációban volt statisztikailag is szignifikáns. 48 órát követően a DZ és a DFZ antagonist hatást eredményezett, ugyanakkor statisztikailag szignifikáns antagonizmus csak a DFZ esetében találtunk. A DF kombináció szinergista hatást fejtett ki, míg a FZ kombinációban nem volt interakció kimutatható. 72 órás inkubáció után mindegyik alkalmazott kombináció esetében antagonizmus volt megfigyelhető, azonban statisztikailag igazolható csak a DF esetében volt.

Kifejezettebb hatás kimutatása érdekében, magasabb tartományú koncentrációkat (25  $\mu\text{g/ml}$   $FB_1$ , 0,21  $\mu\text{g/ml}$  DON és 10  $\mu\text{g/ml}$  ZEN)

alkalmaztunk az interakciók további vizsgálata céljából. A DFZ kombináció antagonista hatása megerősítést nyert.

24 órát követően szignifikáns antagonizmust figyeltünk meg a DF és DFZ kombinációban, míg a DZ nem szignifikáns szinergizmust produkált, a FZ kombinációt megvizsgálva pedig nem volt interakció kimutatható. A 48 órás inkubációt alkalmazva a DZ és DFZ esetében azonos hatást figyeltünk meg, azonban a DF kombináció interakciót nem váltott ki, az FZ pedig antagonista hatást eredményezett, amely nem volt szignifikáns. 72 órát követően antagonizmust tapasztaltunk a DF (nem szignifikáns) és DFZ (szignifikáns) esetében. Ugyanakkor a DZ és FZ kombináció szignifikáns szinergizmust indukált.

#### 4. KÖVETKEZTETÉSEK

A mikotoxinok gazdasági haszonállatokra gyakorolt hatása általánosan negatívként értékelhető. A *Fuzárium* mikotoxinok a leggyakrabban előforduló penészgomba toxinok világszerte. A FB<sub>1</sub>, DON és ZEN kombinált hatása *in vivo* nem eléggé vizsgált terület. Továbbá, habár számos *in vitro* tanulmány jelent meg a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN interaktív hatását tekintve, csak kevés számú tanulmány foglalkozik azok hármas kombinációban kifejtett hatásával.

A multitoxin terheléses (FB<sub>1</sub>, DON, ZEN) kísérletünkben kapott eredmények egyértelműen jelzik, hogy egy viszonylag hosszú ideig tartó, alacsony dózisú mikotoxin expozíció negatívan befolyásolja a hím ivarúak szaporodási folyamatait. Additív, valamint az additív hatásnál gyengébb összefüggést igazoltunk a spermatogenezis és a sejtmorfológia esetében, míg szinergista hatást mutattunk ki a tesztoszteron szintézis esetében. Az FB<sub>1</sub> és a DON+ZEA antagonistáknak bizonyultak a takarmány felvétel, a lipidperoxidáció és a genotoxicitás tekintetében. Mindegyik mikotoxin mérsékelt lipid peroxidációt és enyhe genotoxicitást indukált. Az eredményeink alapján levonható az a következtetés, hogy a mikotoxinok közötti interakció természete nagyban függ a kísérleti végponttól.

A második *in vivo* kísérletünkben egy hepatoprotektív hatásáról ismert gyógynövény (*Carduus marianus*) kiegészítést alkalmaztunk két különböző dózisban (5 és 10 g/kg) DON terhelés során annak érdekében, hogy az alkalmazott gyógynövény lehetséges védő hatását vizsgáljuk növendék nyulakat alkalmazva. Az alkalmazott magas DON koncentráció (10 mg/kg) ellenére, a toxinnak nem volt kifejezetten negatív hatása, mikotoxikózisra utaló tüneteket nem okozott. Habár közismert, hogy a DON takarmány visszaautasítást és anorexiát indukál már alacsony dózisban is (1 mg/ kg takarmány), az eredményeink ennek ellent mondanak. Ez utóbbi

alapján levonható az a következtetés, mely szerint a házinyúl sokkal kevésbé szenzitív a DON toxinra, mint egyéb állatfajok.

A nyulak DON-al szembeni ellenállóképességét számos megvizsgált paraméter is alátámasztja. A toxin terhelésnek nem volt negatív hatása a szérumbiokémiai paraméterekre (máj és vese funkciók), azonban a DON terhelés a májban a májsejtek degeneratív elváltozása nélküli, enyhe fibrózist okozott. A bél citokinek és a makrofágok fagocitáló aktivitása nem különbözött szignifikánsan, ugyanakkor DON terhelés hatására limfocita kiürülés volt megfigyelhető a lépben, ami kisebb méretű nyirokszövethez vezetett. Továbbá a GALT-ban a limfoblasztok apoptózisának aránya megnövekedett. Mindezek azt jelzik, hogy a DON toxin az immunrendszer működését negatívan befolyásolja. A DON által kiváltott máj fibrózist, a limfocita kiürülést és a nyirokszövet atrófiát (lép) az alkalmazott növényi kiegészítés teljes mértékben kivédte.

Egyetértésben a DON IARC általi besorolással, mely szerint a toxin humán vonatkozásban nem karcinogén, jelen esetben sem tapasztaltuk annak genotoxikus hatását.

A házinyúl a többi emlős állatfajhoz képest kevésbé szenzitívnek bizonyul a DON toxinra. A toxin terhelés a legkifejezettebb hatást az immunrendszerre gyakorolta, azonban másodlagos negatív hatás (fertőzés) nem volt tapasztalható. További vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy megállapítsuk a nyulak DON toxinnal szembeni viszonylagos ellenállóképességét. A *C. marianus* májvédő hatása megerősítést nyert, illetve megállapítottuk a növény nyirokszerveket-védő hatását és vakbél fermentációt támogató hatását.

*In vitro* kísérlet sorozatainkban a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN cito- és genotoxikus hatásait vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a három toxin közül a DON a leginkább citotoxikus, illetve, hogy a FB<sub>1</sub> csak hosszabb expozíciós időt követően vált ki citotoxikus hatást.

A citotoxicitásra irányuló vizsgálatokban a megfigyelt fő interakció az antagonizmus volt. A három toxin kombinációja esetén ez utóbbi interakció nyilvánvaló volt mindegyik expozíciós időtartam vonatkozásában, azonban a toxinok kettős kombinációja során az interakciók nem voltak következetesek és az expozíciós időtől is függetlenül változtak.

A genotoxicitásra irányuló vizsgálatok során alacsonyabb és magasabb koncentráció-sorozatokat is megvizsgáltunk. Az első sorozatban (alacsonyabb koncentráció tartomány) hasonlóan a citotoxicitás tesztekben tapasztaltakhoz, a fő interakció típus az antagonizmus volt. Ugyanakkor, magasabb koncentráció tartományt vizsgálva, az antagonizmus csak a DFZ esetében igazolódott, míg a DZ és a FZ kombinációban szinergizmus volt megfigyelhető. Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy sertés limfociták esetében a ZEN nem annyira számottevő mértékben befolyásolja az interakció típusát a kettős kombinációk vonatkozásában, mint a FB<sub>1</sub> és/vagy a DON. Összességében megállapítható, hogy az interakciók típusát nagyban befolyásolja az alkalmazott expozíciós idő, illetve az egyes mikotoxinok koncentrációja.

További vizsgálatok javasoltak (pl. DNS fragmentáció, fehérjeszintézis) annak érdekében, hogy tisztázzuk azokat a mechanizmusokat, amelyek az interakciókat okozzák.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként határoztuk meg a FB<sub>1</sub> (5 mg/kg), DON és ZEN (1 mg/kg + 0,25 mg/kg) interaktív hatásait baknyulakban, orális toxinepozíció során. Additív, valamint az additív hatásnál gyengébb összefüggést igazoltunk a spermatogenezis és a sejtmorfológia, szinergizmust a tesztoszteron szintézis esetében, míg az FB<sub>1</sub> antagonistaként lépett föl a DON+ZEA kombinációval szemben a genotoxicitásban és a lipidperoxidációban.
2. Megállapítottuk, hogy a házinyulak ellenállóak a magas koncentrációjú (10 mg/kg takarmány) deoxinivalenollal szemben. Habár nem volt kimutatható kifejezett immunstátusz befolyásoló hatás, a kórszövettani eredmények a lépben limfocita kiürülést és nyirokszövet atrófiát, a bélhez kapcsolódó limfoid szövetben a limfoblaszt apoptózis arányának növekedését mutatták ki, jelezve, hogy a DON befolyásolhatja az immunrendszer működését.
3. A *Carduus marianus* növény (5 és 10 mg/kg takarmány) védőhatású volt a máj fibrózis, a lépben a limfocita kiürülés és a nyirokszövetatrófia kialakulásával szemben, míg nem jelentkezett jótékony hatása a Peyer-plakkokban a DON által kiváltott apoptózisban.
4. Egészséges sertésekből izolált limfocitákat használva citotoxicitás tesztben megállapítottuk a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN IC<sub>50</sub> értékeit. Az IC értékek tartománya az expozíciós idő (24, 48 és 72 h) függvényében 0,31-0,42 µg/ml volt a DON esetében, míg 16,6-22,9 µg/ml a ZEN vonatkozásában. FB<sub>1</sub> esetében az 50%-os életképességet csak a 72 órás inkubációt követően értük el, az IC<sub>50</sub> érték 101,15 µg/ml. Az IC<sub>50</sub> értékek alapján megállapítható,

hogy a DON toxin bizonyult a leginkább citotoxikus hatásúnak, míg a FB<sub>1</sub> a legkevésbé.

5. A sejtek életképességére a FB<sub>1</sub> (5 µg/ml), DON (0,07 µg/ml) és ZEN (5 µg/ml) interakciója antagonistá hatású volt mindegyik kombináció esetében, mely hatás expozíciós idő (24, 48 és 72 h) függést is mutatott.
6. Comet assay módszerrel vizsgálva a FB<sub>1</sub>, DON és ZEN interakciójában antagonizmus volt kimutatható alacsonyabb koncentrációt (5 µg/ml FB<sub>1</sub> és ZEN, míg 0,07 µg/ml DON esetében) alkalmazva, míg magasabb koncentrációk (25 µg/ml FB<sub>1</sub>, 0,21 µg/ml DON és 10 µg/ml ZEN) esetében szinergista hatás volt megállapítható a két komponenst tartalmazó keverékek közül kettő vonatkozásában.



## 6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

### 6.1 KÖZLEMÉNYEK IDEGEN NYELVŰ REFERÁLT FOLYÓIRATBAN

Szabó-Fodor, J., **Kachlek, M.**, Cseh, S., Somoskői, B., Szabó, A., Blochné Bodnár, Zs., Tornyos, G., Mézes, M., Balogh, K., Glávits, R., Hafner, D., Kovács, M. (2015): Individual and combined effects of subchronic exposure of three Fusarium toxins (fumonisin B, deoxynivalenol and zearalenone) in rabbit bucks. *Journal of Clinical Toxicology*, 5: 264. doi:10.4172/2161-0495.1000264

**Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Bonai, A., Bors, I., Celia, C., Gerencsér, Zs., Matics, Zs., Szendrő, Zs., Dalle Zotte, A., Kovács, M. (2015): Assessing the possible interaction between *Carduus marianus* and dietary deoxynivalenol on caecal microbiota and fermentation of growing rabbits. *Poljoprivreda*; 21(1): 186-189. doi: [10.18047/poljo.21.1.sup.44](https://doi.org/10.18047/poljo.21.1.sup.44)

**Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Bonai, A., Bors, I., Celia, C., Gerencsér, Zs., Matics, Zs., Szendrő, Zs., Dalle Zotte, A., Kovács, M. (2017): Subchronic exposure to deoxynivalenol exerts slight effect on the immune system and liver morphology of growing rabbits. *Acta Veterinaria Brno*; 86, 37-44. (IF<sub>2015/2016</sub>: 0,37, Q3)

## 6.2 KÖZLEMÉNYEK HAZAI KIADÁSÚ NEMZETKÖZI FOLYÓIRATBAN ANGOL NYELVEN

**Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Blochné Bodnár, Zs., Horvatovich, K., Kovács, M. (2017): Preliminary results on the interactive effects of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1 on porcine lymphocytes. Acta Veterinaria Hungarica, 65, 3: 340-353. (IF<sub>2015/2016</sub>: 1,14, Q2)

**Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Kovács, M. (2017): Interaction of the Fusarium mycotoxins, fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone: A review. Állattenyésztés és Takarmányozás, 3: 181-195.

## 6.3 ANGOL NYELVŰ KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK

**Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Kovács, M.: Rabbits in mycotoxin research at Kaposvár University. In: Matics Zsolt (szerk) 119 p. 28. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, Magyarország, 2016.05.25, pp. 71-76. (ISBN:[978-615-5599-30-9](https://doi.org/10.1007/978-615-5599-30-9))

Celia, C., **Kachlek, M. L.**, Gerencsér, Zs., Matics, Zs., Szendrő, Zs., Dalle Zotte, A., Giaccone, V., Kovács, M.: Effect of *Carduus marianum* herb on the productive performances of growing rabbits. In: Steffen Hoy (szerk.) The 20<sup>th</sup> International Symposium on Housing and diseases of Rabbits, Fur providing Animals and Pet Animals, Celle, Németország, 2015.05.27-2015.05.28., pp 149-152.

## 6.4 ANGOL NYELVŰ ABSZTRAKTOK

**Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Blochné Bodnár, Zs., Kovács, M.: Possible antagonistic effect of three *Fusarium* mycotoxins on genotoxicity of spermatozoa of breeding rabbit bucks. The International Conference of Food Contaminants 2015, Challenges in Chemical Mixtures, Lisszabon, Portugália, 2015.04.13-2015.04.14.

Szabó-Fodor, J., **Kachlek, M.**, Szabó, A., Blochné Bodnár, Zs., Hafner, D., Tornyos, G., Cseh, S., Somoskői, B., Kovács, M.: Individual and combined effect of *Fusarium* toxins *in vivo*. The 37<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop 2015, Pozsony, Szlovákia, 2015.06.01-2015.06.03.

## 7. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜL MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

### 7.1 KÖZLEMÉNYEK IDEGEN NYELVŰ REFERÁLT FOLYÓIRATBAN

Szabó-Fodor, J., Dall'Asta, C., Falavigna, C., **Kachlek, M.**, Szécsi, Á., Szabó, A., Kovács, M. (2015): Determination of the amount of bioaccessible fumonisin B<sub>1</sub> in different matrices after *in vitro* digestion. World Mycotoxin Journal, 8 (3), 261-267. (IF: 2,541)

Cullere, M., Dalle Zotte, A., Celia, C., Renteria-Monterrubio, A.L., Gerencsér, Zs., Szendrő, Zs., Kovács, M., **Kachlek, M.L.**, Matics, Zs. (2016): Effect of Silybum marianum herb on the productive performance, carcass traits and meat quality of growing rabbits. Livestock Science 194, 31-36. doi: [10.1016/j.livsci.2016.10.012](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.10.012)

### 7.2 MAGYAR NYELVŰ KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK

Bónai, A., Toldi, M., Ölbeiné Horvatovich, K., Bagóné Vántus, V., Tuboly, T., **Kachlek, M.L.**, Hafner, D., Pápai, G., Zsolnai, A., Szabó-Fodor, J., Kovács, M.: Néhány probiotikus baktérium törzs mikrobiológiai vizsgálata – *in vitro* szimulált humán emésztést megelőzően és követően – tejipari termékfejlesztés céljából. Óvári Tudományos Napok, Mosonmagyaróvár, November 13, 2014.

### 7.3 ANGOL NYELVŰ ABSZTRAKTOK

Cirlini, M., Falavigna, C., **Kachlek, M.**, Szabó-Fodor, J., Kovács, M., Dall'Asta, C.: N-deoxyfructosyl-fumonisin B<sub>1</sub> may cause DNA damage in porcine mononuclear blood cells. The 8<sup>th</sup> conference of The World Mycotoxin Forum, Bécs, Ausztria, 2014. 11.10-12.

Szabó-Fodor, J., Dall'Asta, C., Falavigna, C., **Kachlek, M.**, Szécsi, Á., Szabó, A., Kovács M.: Determination of the proportion of matrix-associated fumonisin B<sub>1</sub> in different, animal feeding experiment-aided matrices after *in vitro* digestion. The 8th conference of The World Mycotoxin Forum, Bécs, Ausztria, 2014. 11.10-12.

### 7.4 MAGYAR NYELVŰ ABSZTRAKTOK

Tornyos, G., Szabó-Fodor, J., Cseh, S., Somoskői, B., Pósa, R., Hafner, D., **Kachlek, M.**, Kovács, M.: Mikotoxinok hatása a hím szaporodási folyamataira. 21 Szaporodásbiológiai találkozó, Visegrád, Szeptember 22, 2015.