

## ZÁRÓJELENTÉS

### a „Mikotoxinok együttes hatásának *in vitro* tesztelése” c. T100810 sz. OTKA projekt keretében végzett munkáról

A mikotoxinok biológiailag aktív, másodlagos anyagcsere termékei a mezőgazdasági terményeket gyakran szennyező mikroszkópikus penészgombáknak. A táplálékláncba való bekerülésük a világ minden táján jelentős kockázatot jelent. Ugyanazon környezeti körülmények között többféle penészgomba is elszaporodik, és egy penészgomba több mikotoxin termelésére is képes (multitoxikus hatások). Magyarországon a szántóföldi *Fusarium* fajok által termelt toxinok és a raktározás alatt keletkező ochratoxin A okozza a legtöbb problémát. Ezek együttes előfordulása gyakori. Egy 2014-es magyarországi, teljes értékű keveréktakarmányokra vonatkozó felmérés szerint a vizsgált minták több mint 80%-a tartalmazott deoxinivalenolt (DON) és fumonizineket. A *Fusarium* toxinok közül a zearalenon volt még nagyobb arányban (25%) kimutatható. A teljes értékű keveréktakarmányok 72%-a tartalmazott több mint egy mikotoxint. Míg az egyes mikotoxinok hatásmechanizmusa több területen jól ismert, addig sokkal kevesebbet tudunk ezek együttes (antagonista, szinergista, additív) hatásáról, ugyanakkor ezek jelentősége lényegesen nagyobb állat- és humánegészségügyi szempontból is. Egy közelmúltban megjelent tanulmány (Grenier és Oswald, 2011) több mint száz olyan kísérlet meta-analízisét végezte el, amelyekben mikotoxin interakciókat vizsgáltak. A közlemény felhívja a figyelmet arra, hogy nagyon kevés az olyan vizsgálat, amely a gyakorlati problémát modellezi, azaz több *Fusarium* mikotoxin alacsony dózisban való együttes előfordulásának hatását mutatja ki. Ezért vizsgálatainkban a leggyakoribb *Fusarium* toxinok (trichotecének, zearalenon és fumonizinek) hatásaira koncentráltunk. A T-2 és HT-2 toxin (T-2, HT-2), a deoxinivalenol (DON), a fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), és a zearalenon (ZEA) különálló és együttes hatásait vizsgáltuk főleg *in vitro* tesztekben: a sejtkárosító hatást (citotoxicitás) Metil-Tiazol-Tetrazolium (MTT) és Cell Counting Kit-8 (CCK) tesztben, a génkárosító hatást (genotoxicitás) comet assay-ben, az embriókárosító hatást (embriotoxiciás) egér embrió tenyészetben. Az *in vitro* vizsgálatokban használt limfociták, spermium sejtek és embriók részben egészséges (egér, sertés), részben pedig toxinnal etetett állatokból (nyúl) származtak (akut és krónikus toxikus hatás vizsgálata).

#### 1. A T-2 (és HT-2) toxin hatásainak vizsgálata

##### 1.1. A T-2 toxin génkárosító hatásának vizsgálata comet assay-ben

Az erősen citotoxikus hatású trichotecén toxin, a T-2 toxin (T-2) dózis és idő-függő génkárosító hatását vizsgáltuk comet assay-ben. A vizsgálatnak, annak a módszertani kérdésnek a megválaszolása is célja volt, hogy a sertésből származó perifériás mononukleáris vérsejtek (limfociták) alkalmasak-e a mikotoxinok génkárosító hatásának jelzésére. Három koncentrációt (0,1, 0,5 és 1,0  $\mu\text{mol}$ ) és két inkubációs időtartamot (24 és 42 óra) teszteltünk.

A legkisebb koncentráció hatására a sejtek 50%-a szenvedett enyhébb-súlyosabb fokú génkárosodást (1-4 közötti comet score). A koncentráció emelésével az intakt sejtek aránya 50%-ról 36%-ra csökkent az első 24 órában. 4-es comet score-t (legsúlyosabb elváltozás) csak az 1,0  $\mu\text{mol}$  T-2 kezelésnél találtunk. A kezelési időnek nem, míg a koncentrációnak szignifikáns ( $P < 0,0001$ ) hatása volt a sejtkárosodásra. A dózis és az idő interakciója szignifikáns volt, és ha a két tényezőt együtt, fix faktorként kezeltük, akkor a kezelések hatása szintén szignifikánsnak bizonyult ( $P < 0,0001$ ). A sertés limfociták érzékenyen jelezték a toxin hatását, alkalmasak a T-2 toxin génkárosító hatásának comet assay-ben való meghatározására.

In vivo, választott nyulakban vizsgáltuk 2 mg/takarmány kg T-2 génekárosító hatását, valamint azt, hogy a takarmányba kevert mannan oligoszacharid (MOS) csökkenti-e a toxin károsító hatását. Három hét toxinetetés után az állatokból vért vettünk, izoláltuk a limfocitákat és comet assay-ben vizsgáltuk a bekövetkezett génekárosodást. A kontroll és a MOS-t fogyasztó állatok minden esetben negatívak voltak (comet score=0). A T-2 csoportban mindössze 33%-a volt a sejteknek intakt, számos sejt 5-ös comet értéket mutatott, ami a DNS teljes dezintegrációját jelezte. A T-2 mellett MOS-t is fogyasztó állatok limfocitáinak 55%-a ép volt, az 1, 2, 3 és 4 comet érték kategóriákban szignifikánsan alacsonyabb volt arányuk, mint a toxinnal kezelt állatokban. Szétesett DNS-ű sejtet nem találtunk. A MOS védő hatása feltehetően vagy a toxinkötő képességének, vagy antioxidáns jellegének volt köszönhető.

Vonatkozó publikációk:

*Horvatovich, K., Hafner, D., Bodnár, Zs., Berta, G., Hancz, Cs., Dutton, M., Kovács, M.: Dose-related genotoxic effect of T-2 toxin measured by comet assay using peripheral blood mononuclear cells of healthy pigs. Acta Veterinaria Hungarica, 2013. 61(2) 175-186.*

*Hafner, D., Bodnár, Zs., Horvatovich, K., Berta, G., Kovács, M.: Preliminary investigations into the effect of feeding mannan oligosaccharide (MOS) on the genotoxic effect of T-2 toxin in rabbits measured by comet assay. Acta Agriculturae Slovenica, 2012. Supplement 3, 351-257.*

### **1.2. A T-2 és a HT-2 toxin sejt-károsító hatásának vizsgálata MTT tesztben**

Kísérletünkben a T-2 és a HT-2 dózis és idő-függő sejt-károsító hatását vizsgáltuk metil-tiazol-tetrazolium (MTT) tesztben, célsejtként egészséges sertés limfociták használatával. Az alkalmazott toxin koncentrációk: 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 és 0,001 $\mu$ mol T-2; 1,0, 0,5, 0,2, 0,1 és 0,05 $\mu$ mol HT-2; valamint ezek kombinációja voltak. Két expozíciós időt (6 és 24 óra) teszteltünk.

Mindkét toxin dózis és idő-függő sejt-károsítást mutatott. Hat órás inkubációt követően a dózis emelése 0,001-ről 0,5  $\mu$ molra a T-2, illetve 0,05-ről 1,0  $\mu$ molra HT-2 esetében, a sejtek életképességét 22, illetve 17%-al csökkentette. A 24 órás inkubáció szignifikánsan kisebb életképességet eredményezett a 6 órás állapothoz képest (kivéve a 0,5  $\mu$ mol T-2 és 0,05, 1,0  $\mu$ mol HT-2 dózisokat). A két toxinnal történő együttes kezelés, a toxinok egyedüli hatásához viszonyítva kisebb életképességet eredményezett a 6 órás inkubáció végén. A 24. óra után ez nem volt egyértelmű, feltételezhető, hogy a T-2  $\rightarrow$  HT-2 átalakulás az idő alatt in vitro is elindult.

Vonatkozó publikáció:

*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.*

### **1.3. Különböző mértékű T-2 szennyezettség hatása egérembriók korai fejlődésére**

Kísérleteink célja az volt, hogy elsőként tanulmányozzuk a toxin közvetlen hatását az osztódási stádiumú, korai embriók fejlődésére a blasztociszta stádiumig. A vizsgálatokat BDF1 egértörzs embrióin végeztük, amelyeket a T-2 toxinnal különböző mértékben szennyezett tápfolyadékban (9 kezelt és egy kontroll csoport) tenyésztettünk 96 óráig. Az alkalmazott koncentrációk: 0,1, 0,5, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,5 és 3 ng/ml T-2. Ezt követően

értékeljük a blasztociszták arányát az egyes csoportokban, majd két kezelés esetében a mitokondriumok mintázatát (sejten belüli elhelyezkedését), aktivitását, valamint a reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyiségét.

A T-2 toxint nagyobb koncentrációban tartalmazó csoportokban ( $\geq 1$  ng/ml) szignifikánsan alacsonyabb fejlődési arány mutatkozott. Emellett a 2,5 ng/ml toxintartalmú táptalajba helyezett zigóták fejlődése már a 2-sejtes stádiumban, az első 24 órát követően megrekedt. Ennek oka valószínűleg a mikrotubulusok felépülésének gátlása. A 2,5 ng/ml toxintartalmú tápoldatban tenyésztett, kétsejtes stádiumban megrekedt embriók sejtjeiben a mitokondriumok eloszlása eltérést mutatott a kontroll csoporthoz képest. A kontroll embriók blasztoméráiban a mitokondriumok perinukleáris és perikortikális elrendeződést mutattak, szemben a kezelt embriókkal, amelyekben a mitokondriumok diffúzan helyezkedtek el a citoplazmában. A 0,5 ng/ml töménységű tápfolyadékban tenyésztett csoportban az aktív mitokondriumok és a ROS mennyisége nem mutatott eltérést a kontroll csoport eredményeitől.

#### Vonatkozó publikáció:

*Somoskői B., Keresztes Zs., Solti L., Kovács M., Cseh S.: A T-2 mikotoxin hatása egérembriók korai fejlődésére. Magyar Állatorvosok Lapja, 2012. 134(10) 614-619.*

#### **1.4. T-2 szennyezettség hatása egérembriók fejlődésére és a kromatin állomány minőségére**

A kísérletek során 6 hetes, BDF1 szuperovuláltatott és egyedileg pároztatott nőstény egerekből nyertük a zigótákat, a pázás után kb. 8-10 órával. A zigótákat a T-2 toxint különböző töménységben (kontroll; 0,5 ng/ml; 0,75 ng/ml; 1 ng/ml) tartalmazó tápfolyadékba helyeztük, majd 96 óráig tenyésztettük. Az in vitro tenyésztést követően a csoportokban vizsgáltuk a blasztociszta stádiumú embriók arányát, valamint a kromatin állomány állapotát (DAPI festés, Nikon A2 konfokális mikroszkóp). Az embriókat 3 osztályba soroltuk, annak megfelelően, hogy a blasztomerek hány %-a tartalmaz mikro-vagy lebenyezett nukleuszt (Grade 1: 0%; Grade 2: <20%; Grade 3: >20%).

A 96 órás tenyésztést követően a kontroll csoportban 86,6%, a 0,5 ng/ml csoportban 83,5%, 0,75 ng/ml-ben 39,0%, 1 ng/ml-ben 29,6% átlagos blasztociszta arányt találtunk. A 0,75 ng/ml és 1 ng/ml töménységű csoportok eredményei szignifikánsan különböztek ( $P < 0,05$ ) a kontroll, és a 0,5 ng/ml-es toxin koncentrációjú csoportokétól. A 0,5 ng/ml toxinkoncentráció nem okozott szignifikáns különbséget a kontroll csoport továbbfejlődési eredményeihez képest.

A kromatin állomány vizsgálata hasonló eredményt mutatott. A kontroll és a 0,5 ng/ml csoportok embriói az 1-es és 2-es osztályba voltak sorolhatók. A 0,75 ng/ml-es csoportban megjelentek a 3-as osztályú embriók, az 1 ng/ml-es csoportban ez a tendencia megmaradt és 1. osztályú embriókat nem találtunk.

A LOAEL (lowest observed adverse effect level) értéket az in vitro tenyésztés eredményei alapján 0,75 ng/ml-ban határoztuk meg. Ezt az értéket a kromatin állomány vizsgálata is alátámasztotta.

#### Vonatkozó publikáció:

*Somoskői, B., Kovács, M., Cseh, S.: Effects of T-2 mycotoxin on in vitro development and chromatin status of mouse embryos being in preimplantation stages. Toxicology and Industrial Health, first published on November 25, 2014 doi:10.1177/0748233714555394*

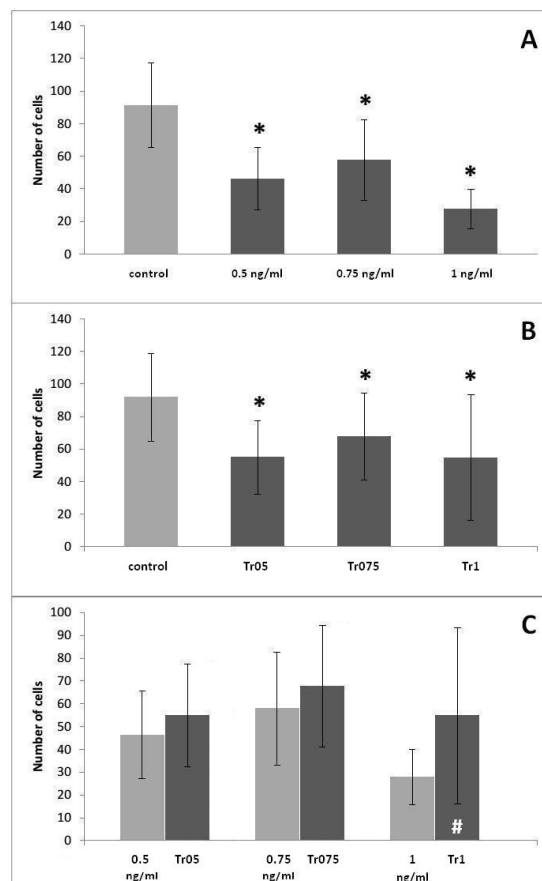
### 1.5. Eltérő időtartamú (96 és 24 óra) T-2-expozíció hatása a blasztociszták minőségére

A szuperovuláltatott BDF1 nőstény egerekből nyert zigótákat a toxint különböző koncentrációban tartalmazó (0,5 ng/ml, 0,75 ng/ml és 1 ng/ml) illetve toxinmentes (kontroll) tápfolyadékba helyeztük, 96 órára (Treatment I), illetve 72 órás toxinmentes közegben történő tenyésztést követően 24 órára (0,5 ng/ml: Tr05; 0,75 ng/ml: Tr075; 1 ng/ml: Tr1) (Treatment II). 72 és 96 óra elteltével vizsgáltuk a fejlődési állapotot, meghatároztuk a sejtszámot (SYBR Green festés) valamint a fejlődési stádiumnak megfelelő embriókban ellenőriztük a mikronukleuszt tartalmazó blasztomerek arányát. Morfológiai elemzést végeztünk a blasztocisztákon és osztályoztuk aszerint, hogy a blasztocöl milyen kiterjedtségű (korai, expandált vagy kibújt (hatched) stádium).

#### Sejtszám

A morfológiailag megfelelő embriók sejtszáma 72 órát követően minden kezelt csoportban szignifikánsan elmaradt a kontroll csoport embrióitól (0,5 ng/ml:  $20 \pm 7,2$ ; 0,75 ng/ml:  $18,7 \pm 5,5$ ; 1 ng/ml:  $13,1 \pm 7,3$ ; kontroll:  $27,7 \pm 7,3$ ).

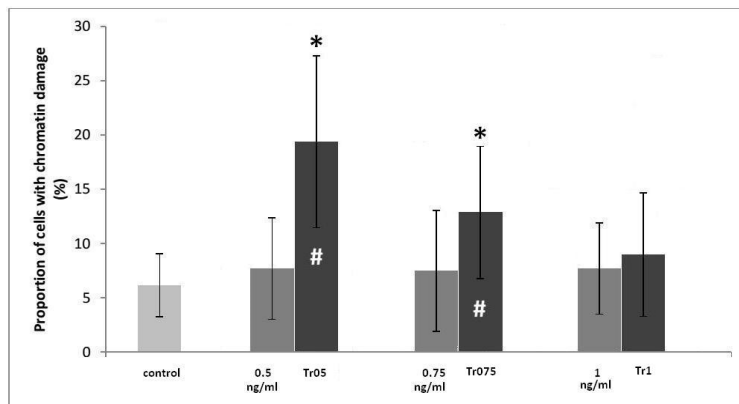
A 96 órás tenyésztést követően a kontroll csoport blasztocisztáinak átlagos sejtszáma  $91,5 (\pm 26,1)$  volt. A Treatment I blasztocisztáinak a sejtszáma (0,5 ng/ml:  $46,3 \pm 19,1$ ; 0,75 ng/ml:  $57,9 \pm 24,7$ ; 1 ng/ml:  $27,8 \pm 12,8$ ) minden T-2-koncentráció esetében elmaradt a kontroll embriókétől, ahogyan azt a Treatment II blasztocisztáiban is tapasztaltuk (Tr05:  $54,9 \pm 22,5$ ; Tr075:  $67,7 \pm 26,7$ ; Tr1:  $54,7 \pm 38,7$ ). A 24 órás expozíció esetén minden toxinkezelt blasztociszta sejtszám magasabb volt, mint a 96 órás expozíció esetében (1. ábra).



**1.ábra.** Blasztociszták sejtszámjai az egyes kezelési csoportokban 96 órás *in vitro* tenyésztést követően. (\*) $P < 0,05$ , eltérés a kontroll csoporttól; (#) $P < 0,05$ , eltérés a megfelelő koncentrációk között.

A mikronukleuszt tartalmazó blasztomerek aránya a Treatment I csoportjaiban (0,5 ng/ml:  $7,7\% \pm 4,7$ ; 0,75 ng/ml:  $7,5\% \pm 5,6$ ; 1 ng/ml:  $7,7\% \pm 4,2$ ) nem különbözött szignifikánsan a

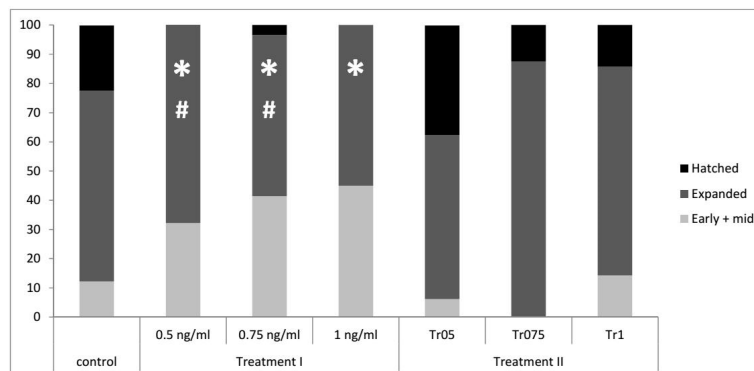
kontroll csoport embrióitól ( $6,1\% \pm 2,9$ ). A Treatment II mindhárom csoportjában azonban a kontrollhoz és a Treatment I koncentrációihoz képest is magasabb arányt tapasztaltunk (Tr05:  $19,4\% \pm 7,9$ ; Tr075:  $12,9\% \pm 6,1$ ; Tr1:  $8,9\% \pm 5,7$ ), ami a Tr05 és Tr075 csoportokban szignifikánsnak mutatkozott (2. ábra).



2. ábra. Mikornukleuszt tartalmazó blasztomerek aránya. (\*) $P < 0,05$ , eltérés a kontroll csoporttól; (#) $P < 0,05$ , eltérés a megfelelő koncentrációk között.

### Blasztocöl expanszió

Az expandált/hatched blasztociszták aránya a kontroll csoportban 87,7% volt. Ettől az aránytól szignifikánsan kisebb mértékben voltak jelen ezek a blasztociszták a Treatment I mindhárom csoportjában (67,9, 58,6 és 55%). A Treatment II csoportjai esetében azonban nem találtunk különbséget az expandált/hatched blasztociszták arányában a kontroll csoporthoz képest (3. ábra).



3. ábra. Különböző fejlettségű blasztociszták aránya az egyes csoportokban. (\*) $P < 0,05$ , eltérés a kontroll csoporttól; (#) $P < 0,05$ , eltérés a megfelelő koncentrációk között.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a T-2 embriókra kifejtett hatása az expozíció kezdetének függvényében változott. A zigóta kortól T-2-vel szennyezett környezetben fejlődő embriók kromatin állománya a kontrollhoz hasonló minőségű, de a blasztocöl expanszió lassabb volt. A tenyésztés utolsó 24 órájában alkalmazott expanszió azonban magasabb kromatin-törési rátát (mikornukleusz arányt) eredményezett, a blasztocöl expansziót viszont nem befolyásolta. Mindemellett a sejtszám minden kezelés esetén alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban.

Vonatkozó publikáció:

*Somoskői, B., Kovács, M., Cseh, S.: T-2 mycotoxin slows down the development, decreases blastomer number and increases chromatin damage in mouse blastocysts. Reproduction, Fertility and Development, közlésre leadva 2015. november 5-én*

*(Somoskői B., Kovács M., Cseh S.: T-2 mikotoxin preimplantációs embriók fejlődésére gyakorolt hatásainak vizsgálata. Akadémiai Beszámolók, 2015.január 26-29., Budapest*

*Somoskői B., Kovács M., Cseh S.: T-2-mikotoxin okozta fejlődési anomáliák preimplantációs embriókban. Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság, 2015. május 8-9., Sümeg)*

## **2. A T-2 és a FB1 együttes hatásának vizsgálata**

### **2.1. A T-2 és a FB1 mikotoxinok koncentrációtól és expozíciós időtől függő citotoxikus hatása MTT tesztben vizsgálva, egészséges sertésből származó limfociták felhasználásával**

Kísérletünkben a metil-tiazol-tetrazólium (MTT) tesztben az alábbi toxinkezeléseket alkalmaztuk: 0,001; 0,01; 0,05; és 0,1  $\mu\text{M}$  T-2, 1; 10; 50 és 100  $\mu\text{M}$  FB1, valamint ezek kombinációja. Az in vitro inkubálás időtartama 24 és 48 óra volt.

24 h-s inkubálást követően a T-2 és a FB1 önmagában, a legnagyobb koncentrációban 55,9, illetve 73,5%-os életképességet eredményezett, jelezve (a koncentrációkat is figyelembe véve) a T-2 toxin lényegesen nagyobb toxicitását. A két toxin legnagyobb dózisának együttes alkalmazásakor a sejtek életképessége 60,3%-os volt, azaz, a FB1 mérsékelte a T-2 toxin hatását. 48 h elteltével ugyanez a tendencia volt megfigyelhető, a 24 és 48 h-s életképesség között nem volt szignifikáns eltérés. A legkisebb dózisok esetében ugyanakkor a 24 h-s inkubálást követően a T-2, FB1 és T-2+FB1 esetében 93, 91, illetve 87%-os életképességet mértünk. A két toxin esetében a 48 h-s inkubáció szignifikánsan kisebb életképességet eredményezett a 24 h-hoz képest, míg együttes hatás (T-2+FB1) nem okozott szignifikáns eltérést.

Vonatkozó publikáció:

*Hafner, D., Horvatovich, K., Blochné Bodnár, Zs., Kovács, M.: Single and combined cytotoxic and genotoxic effect of T-2 toxin and fumonisin B1. Közlemény előkészítés alatt, a közlés tervezett helye: Acta Veterinaria Hungarica*

### **2.2. Hosszantartó (21 nap), kombinált T-2 és FB1 toxinetetés hatásának vizsgálata nyulakban**

Választott, 35 napos Pannon fehér nyulakat 4 csoportba osztottunk (n=12/csoport). A két vizsgált toxin (T-2 és FB1) önálló és együttes hatását vizsgáltuk. Az alkalmazott kezelések: kontroll, 2 mg/tak.kg T-2, 10 mg/tak.kg FB1, T-2 + FB1.

A T-2 toxin önmagában és FB1-el kombinálva is szignifikánsan csökkentette a takarmányfelvételt (12, illetve 19%-al a T-2 és T-2+FB1 kezelésnél) és a testsúlyt (9%-al a T-2 és a T-2+FB1 csoportban is) a kontroll csoporthoz képest.

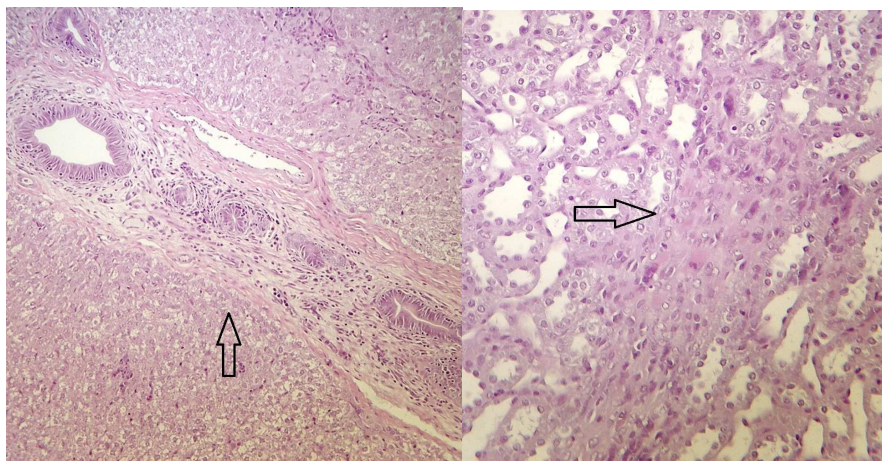
A FB1 megnövelte a szérum összfehérje és albumin tartalmát, ez a hatás T-2-vel együtt alkalmazva nem érvényesült. A fruktózamin és a kreatinin koncentráció szintén nagyobb volt a FB1-el kezelt csoportban a T-2 és a kontrollhoz viszonyítva, mindkét vizsgált időpontban (2. és 4. hét).

A redukált glutation koncentrációját a T-2 megnövelte, míg a kombinált kezelés csökkentette azt a kontrollhoz és az FB1-hez képest a 2. héten, a 4. hétre mindhárom toxinnal kezelt csoport kisebb értéket mutatott. Ugyanez a tendencia volt tapasztalható a glutation peroxidáz (GSHPx) esetében. A két toxin együttes expozíciója szignifikánsan nagyobb malondialdehid (MDA) termelést okozott a 2. hétre, a másik 3 csoporthoz viszonyítva.

A két toxin ellentétes hatást idézett elő a vörösvérsejtek  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-áz aktivitásában, a T-2 csökkentette, míg a FB1 növelte azt. A T-2 önállóan és FB1-el együtt is növelte a mean cell volume (MCV) értékét. Mindkét toxin okozott szignifikáns változást a vörösvérsejtek zsírsav-összetételében.

A toxinkezelés megváltoztatta a máj foszfolipidjeinek zsírsav-összetételét, csökkentette a palmitoleinsav (C16:1 n7) arányát. A két toxin külön-külön csökkentette a mitokondriumok foszfolipidjeiben a margarinsav (C17:0) arányát, míg ez a hatás a két toxin együttes adásakor nem volt tapasztalható. Az egyszeresen telített zsírsavak aránya a FB1 expozíció esetében volt a legmagasabb. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy mindkét toxin átjut a májsejt és azon belül a mitokondrium membránon, számottevő károsító hatás nélkül, de kimutatható lipidperoxidációt okozva.

A különböző kísérleti csoportokba tartozó állatok szerveinek vizsgálata során a csak T-2-vel, a csak FB1-el, valamint a T-2+FB1-el kezelt állatok egy részében a májbeli nagyobb epeutak hámjának megvastagodását, helyenként többsorosá válását, epeársarjadzás jeleit, valamint intersticiális fibrózist lehetett felismerni (4. ábra). A vesékben a tubulusok (főként az elvezető csatornaszakaszok) hámsejtjeinek citoplazmájában vakuolizáció, az érintett tubulusok üregében levált hámsejtek maradványai, a tubulusok közötti kötőszövetben pedig fibrózis látszott (5. ábra). A felsorolt elváltozások gyakorisága a T-2+FB1-el kezelt csoportban magasabb volt, mint a csak T-2 toxinnal vagy FB1-el kezelt csoportokban. A T-2 toxinnal kezelt állatok lépében a Malpighi-testekben enyhefokú limfocita kiürülés (a Malpighi-test T- és B-dependens zónáinak enyhefokú megkeskenyedése) jeleit lehetett felismerni.



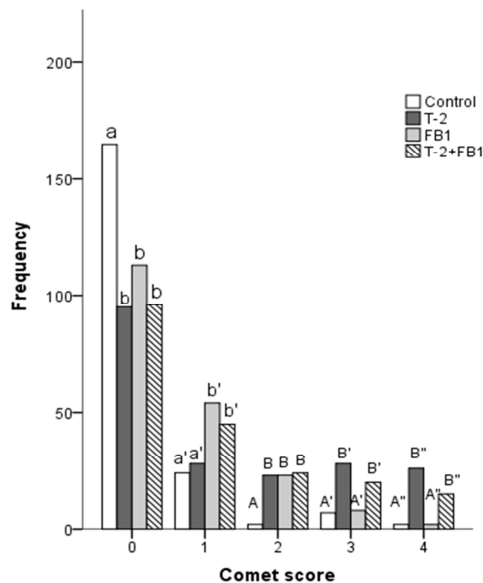
**4. ábra.** T-2+FB1-et tartalmazó takarmánnyal etetett nyúl májában a kötőszövet megszorodása és az epeerek sarjadzása (H.E., 200x)

**5. ábra.** T-2+FB1-et tartalmazó takarmánnyal etetett nyúl veséjében a csatornácskák közötti kötőszövet megszorodása (H.E., 400x)

A kísérleti állatoktól vett vérből limfocitákat izoláltunk és elvégeztük a comet assay-t a toxinok okozta esetleges génekárosodás meghatározására. Az ép sejtek (comet score: 0) előfordulási gyakorisága mindhárom kezelt csoport esetében 32-38%-al kisebb volt ( $p < 0,001$ ) volt, mint a kontroll csoportban. A két toxin együttes hatása a T-2-höz és a kontrollhoz képest megnövelte az enyhe károsodás mértékét (score 1). Mindhárom kezelés szignifikánsan

megnövelte a súlyosabb fokú károsodást (score 2). A T-2 önmagában erőteljesebb károsodást eredményezett, mint a FB1 (score 3). A súlyosabb károsodások (score 3 és 4) T-2 és T-2+FB1 hatására következtek be. A kombinált kezelés és a T-2 között nem volt szignifikáns különbség a kifejezettebb génekárosodás esetén (2-es, 3-as és 4-es score), ami arra utal, hogy a T-2 a FB1 jelenlétében nem toxikusabb a limfocitákra nézve, a két toxin nem erősíti egymás hatását (6. ábra).

Az eredmények felhívják a figyelmet a kevert toxikus hatások bonyolultságára, hiszen a két toxin interakciója eltérő volt a különböző vizsgált paraméterek esetében: antagonist (takarmány felvétel, testsúly, GSH, GSHPx, ATP-áz aktivitás, genotoxicitás), illetve szinergista/additív (MDA, máj és vese elváltozások).



**6. ábra.** Az eltérő súlyosságú DNS elváltozást jelző comet score-ok eloszlása a kontroll és a kezelt állatokban (0=nincs károsodás, 4= súlyos fokú károsodás) Az eltérő indexek csoportok közötti szignifikáns eltérést jeleznek ( $P < 0.001$ ).

#### Vonatkozó publikációk:

Szabó, A., Szabó-Fodor, J., Fébel, H., Romvári, R., Kovács, M.: Individual and combined haematotoxic effects of fumonisin B<sub>1</sub> and T-2 mycotoxins in rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 2014. 72. 257-264.

Szabó, A., Szabó-Fodor, J., Fébel, H., Mézes, M., Kovács, M.: Oral administration of fumonisin B<sub>1</sub> and T-2 individually and in combination affects hepatic total and mitochondrial membrane lipid profile of rabbits. *Acta Physiologica Hungarica, Közlésre leadva 2015. December 2.*

Hafner, D., Szabó, A., D'Costa, L., Szabó-Fodor, J., Tornóyos, G., Blochné Bodnár Zs., Horvatovich, K., Baloghné Zándoki, E., Glávits, R., Kovács, M: Individual and combined effects of subchronic exposure to two feed-borne Fusarium mycotoxins, the fumonisin B<sub>1</sub> and T-2 toxin in weaned rabbits. *Közlemény előkészítés alatt, a közlés tervezett helye: World Mycotoxin Journal*

### **2.3. Fumonizin B<sub>1</sub> és T-2 mikotoxinok együttes előfordulásának hatása egérembriók korai fejlődésére *in vitro***

A kísérletek során 6 hetes, BDF1 szuperovuláltatott és egyedileg pároztatott nőstény egerekből nyertük a zigótákat, a pározás után kb. 8-10 órával. A zigótákat ekvilibráltatott tápfolyadékba (Cleavage Medium, Cook Medical, Roskilde, Denmark) helyeztük, amelyek a



FB1 különböző koncentrációit, alacsony dózisu T-2-t vagy a két toxin kombinációját tartalmazta, az 1. táblázat szerint. Az embriókat 96 óráig tenyésztettük.

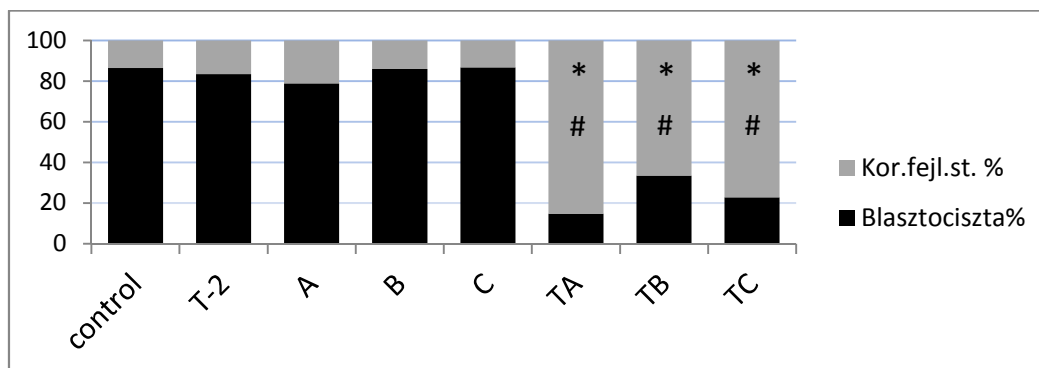
Az in vitro tenyésztést követően minden kezelési csoportban megvizsgáltuk a blasztociszták arányát (fejlődési ráta). Ezt követően osztályoztuk a morfológiailag megfelelő embriókat a blasztocöl-expanzió mértéke szerint („Early”: korai- és mid blasztociszták; „Late”: expandált és kibújt blasztociszták) (Saiz és Plusa, 2013). A morfológiai vizsgálatok után SYBR14 festéssel (Life Technologies, USA) ellenőriztük a sejtszámot valamint a mikronukleusz tartalmú blasztomerek arányát.

1. táblázat. A kísérletben alkalmazott tápfolyadékok összetétele

Csoportnév (n)	Toxin	Toxinkoncentráció (ng/ml)
kontroll (n=140)	-	0
T-2 (n=108)	T-2	0,5
A (n=99)	FB1	1
B (n=107)	FB1	2
C (n=90)	FB1	10
TA (n=128)	T-2 + FB1	0,5 + 1
TB (n=137)	T-2 + FB1	0,5 + 2
TC (n=202)	T-2 + FB1	0,5 + 10

#### Fejlődési potenciál és blasztocöl expanszió

A 96 órás tenyésztést követően a FB1 (A:78,8%; B:86%; C:86,7%) és T-2-kezelt (83,3%) embriók fejlődési stádiuma nem különbözött a kontroll csoport embrióitól (86,4%). A kombinált kezelések esetén azonban minden csoportban (TA:74,4%; TB:33,6%; TC: 22,8%) szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mind a kontroll, mind pedig a megfelelő FB1-kezelt csoportokhoz képest (7. ábra).



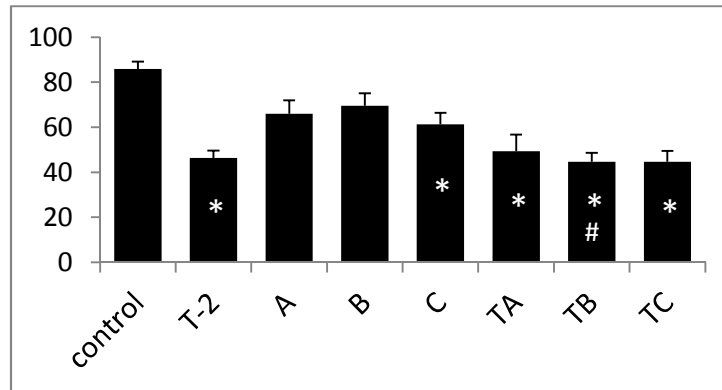
7. ábra. Blasztociszták aránya az egyes kezelési csoportokban (Kor.fejl.st.% = korábbi fejlődési stádiumok %-os aránya). (\*) $P < 0,001$ , eltérés a kontroll csoporttól; (#) $P < 0,001$ , eltérés a megfelelő FB1 kezeléstől (A vs. TA, B vs. TB és C vs. TC).

A toxinkezelt csoportok mindegyikében csökkent az expandált és kibújt blasztociszták („Late” blasztociszták) aránya a kontroll csoporthoz képest (83,6%). Ez a csökkenés a T-2 és 1 ng/ml FB1 kezelés esetén nem volt szignifikáns (67,9 illetve 72,8%), szemben a magasabb FB1 és a kombinált kezelésekkel (B:66,2%; C:61,7%; TA:25%). A TB és TC csoportok esetén a blasztociszták mindegyike a korai fázisokban rekedt (TB és TC: 0%).

#### Sejtszám és mikronukleusz-ráta

A blasztociszták sejtszámát illetően minden kezelt csoportban eltérést tapasztaltunk a kontroll (85,9±3,3) embriókhoz képest. Az eltérés a T-2 (46,3±3,3), C (61,3±5,1), TA (49,3±7,5), TB

( $44,6\pm 3,9$ ) és TC ( $44,6\pm 4,9$ ) csoportok esetében volt szignifikáns. A kombinált kezelések esetén mindegyik csoportban alacsonyabb sejtszámot tapasztaltunk a megfelelő FB1 kezelésekhez képest. Szignifikáns eltérés azonban csak a B-TB kezeléspár esetében volt kimutatható ( $69,5\pm 5,6$  vs.  $44,6\pm 3,9$ ) (8. ábra).



8. ábra. A blasztociszták sejtszámjai az egyes csoportokban. (\*) $P < 0,001$ , eltérés a kontroll csoporttól; (#) $P < 0,001$ , eltérés a megfelelő FB1 kezeléstől (A vs. TA, B vs. TB és C vs. TC).

A mikronukleuszt tartalmazó blasztomerek arányában nem mutatkozott különbség sem a kontroll csoporthoz ( $8,9\pm 0,7\%$ ) képest, sem pedig a kezeléspárokon belül (A vs. TA:  $5,1\pm 1\%$  vs.  $6\pm 0,8\%$ ; B vs. TB:  $6,5\pm 0,8\%$  vs.  $6,8\pm 1,9\%$ ; C vs. TC:  $5,3\pm 1\%$  vs.  $8,9\pm 1,1\%$ ).

Eredményeinkből kiderült, hogy a két toxin, az általunk vizsgált koncentrációkban, külön-külön nem befolyásolja a fejlődési rátát, együttes előfordulásuk mégis jelentősen csökkenti a blasztociszta stádium elérésének esélyét. A blasztocisztákat megvizsgálva kiderült, hogy az expandált és kibújt blasztociszták aránya minden toxin-kezelt csoportban elmarad a kontroll csoport értékeitől, vagy teljesen mértékben hiányzik (TB és TC csoportok). Az egérben az implantációs ablak (az az időszak, ami alatt az embriónak lehetősége van a beágyazódásra) kevesebb, mint 24 óra. Ha ebben az időszakban a blasztociszta a korai stádiumok valamelyikében van, az a beágyazódás sikertelenségét eredményezheti.

Az embriók sejtszáma általánosan elfogadott értékmérője az embrió minőségének, viabilitásának. Jelen kísérletünkben csökkent sejtszámot találtunk minden toxin-kezelt csoportban, a kontroll embriókhoz képest. A csökkenés, bár nem szignifikánsan, de megfigyelhető volt az egyes FB1-kombinált kezeléspárok között is. A mikronukleuszok a blasztomerekben kromatin sérülést jeleznek, ami az osztódási orsó diszfunkciójára, az S fázis zavaraira és végső soron a beágyazódás elmaradására/zavarára utalhat. Kísérletünkben nem találtunk különbséget a toxin-kezelt embriókban a kontroll csoport embrióihoz képest.

#### Vonatkozó publikáció:

Somoskői, B., Kovács, M., Cseh, S.: *Effects of T-2 and Fumonisin B1 co-occurrence on embryo development and blastocyst quality. A közlés tervezett helye: Reproductive Toxicology*

Somoskői B., Kovács M., Cseh S.: *Mikotoxinok hatása a korai embriók in vitro fejlődésére. 21. Szaporodásbiológiai Találkozó, 2015. szeptember 21-22., Visegrád (előadás)*

Somoskői B., Kovács M., Cseh S.: *T-2 és fumonizin B1 mikotoxinok hatása egérembriók fejlődésére. TOX'2015, 2015. október 14-16., Harkány (poszter)*

### **3. Krónikus, alacsony dózisú, multitoxikus hatás (DON, ZEA, FB1) vizsgálata baknyulakban**

A kísérletben három, a leggyakrabban szennyező *Fusarium* toxin hatását vizsgáltuk baknyulakban. A 65 napig tartó toxinexpozíció az EU határértékekhez (2006/576/EC) közeli, alacsony volt. Az alkalmazott kezelések: kontroll (K, toxin-mentes), F (5 mg/kg FB<sub>1</sub>), DZ (1 mg/kg DON + 0.25 mg/kg ZEA), FDZ (5 mg/kg FB<sub>1</sub> + 1 mg/kg DON + 0.25 mg/kg ZEA) (n=15/csoport).

Mindhárom mikotoxin enyhe lipidperoxidációt indukált (GSH, GSHPx, konjugált diének és triének mérési eredményei alapján).

A toxinok negatív hatása a legkifejezettebben a szaporodásbiológiai mutatókban nyilvánult meg. Az előrehaladó mozgást mutató spermiumok motilitása 80%-ról 60%-ra (P<0.05) csökkent az FZD csoportban. A DZ kezelés a kontrollhoz képest csökkentette (P<0.05) a normál morfológiájú sejtek arányát (80%-ról 66%-ra). A GnRH által indukált tesztoszteron termelés kisebb mértékű volt az FZD állatokban, a másik három kezeléshez viszonyítva.

A here szövettani vizsgálata azt mutatta, hogy az F, DZ és FDZ állatokban 43, 31, illetve 64 %-al csökkent a spermiogenezis intenzitása a kontrollhoz képest. Ezt a differenciált sejtek csökkent száma, a csírahám elvékonyodása jelezte. Helyenként a csírahámsejtek mitózisának ill. meiózisének a zavarát jelző többmagvú óriássejtek is felismerhetők voltak, súlyos esetben a spermiogenezis fejlődési formáinak csökkenése, ill. hiánya valamennyi herecsatornácskában szembetűnő volt és egyes csatornácskákban a spermiogenezis kiindulási sejtjei, a spermatogóniumok is hiányoztak.

A frissen vet ondómintákból izolált spermiumokkal elvégeztük a comet assay-t. Az alkalmazott mikotoxinok enyhe génkárosító hatását mutatta a teszt, mivel szinte alig volt erős károsodást jelző 3-as és 4-es comet értékű sejt. Az egészséges sejtek aránya az F csoportban 98%-al, míg a ZD és FZD kezelésekre 88%-al csökkent (P<0,001). Az 1-es score-ba tartozó sejtek aránya az alábbiak szerint alakult: K 30%, a toxinnal kezelt csoportokban: 75-81% (P<0,001). A kontroll állatok spermiumai között nem találtunk 2-es comet értékű sejtet, míg a toxinnal kezelt csoportokban ezek aránya a FZD csoportban 10%, a F és ZD állatokban pedig 19, illetve 16% volt (P<0,001). Ez esetben a FB1 és a másik két *Fusarium* toxin (ZEA és DON) együttes expozíciója csökkentette a károsodás mértékét, antagonistát jelezve.

Az interakció jellege jelen esetben is változékony volt: additív a spermiogenezis és a sejt morfológia esetében, szinergista a tesztoszteron termelésre, míg a FB1 antagonistát hatást fejtett ki a DON+ZEA-ra a genotoxicitásban.

#### Vonatkozó publikáció:

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.: *Individual and combined effects of subchronic exposure of three Fusarium toxins (fumonisin B, deoxynivalenol and zearalenone) in rabbit bucks. J Clinical Toxicology, 2015. (5)4, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.1000264>*

Szabó-Fodor, J., Kachlek, M., Szabó, A., Matics, Zs., Gerencsér, Zs., Tornyos, G., Pósa, R., Mézes, M., Balogh, K., Kovács, M.: *Combined effects of Fusarium toxins on some clinicochemical and antioxidant parameters of rabbit bucks. Journal of Animal Feed Sciences, közlésre leadva 2015. október 28-án.*

### **A jelentésben hivatkozott szakirodalmak:**

Grenier, B., Oswald, I.: Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*, 2011. 4(3), 285-313.

Saiz, N., Plusa, B.: Early cell fate decisions in the mouse embryos. *Reproduction*, 2013. 145(3):65–80.

### **Megjegyzés az elvégzett munkához**

A pályázatban beadott munkatervben vállaltakhoz képest kismértékű eltérés történt: változott a vizsgált mikotoxinok köre. A jelentés bevezetőjében hivatkozott Grenier és Oswald (2011) tanulmány felhívta a figyelmet arra, hogy a *Fusarium* toxinok alacsony dózisú együttes hatása nagyon kevésbé vizsgált, sok, hiánypótló eredmény szükséges ezek dózis és/vagy időfüggő interakciójának megismeréséhez. Ezért vizsgálatainkban ezekre a mikotoxinokra és kombinációikra fókuszáltunk, a tervezettől eltérően nem végeztünk kísérleteket az ochratoxin-A hatására.

2013. november 8.-án hosszabbítási kérelmet adtam be, kérve a projekt végső határidejének egy évvel történő kitolását, azaz a futamidő egy évvel való meghosszabbítását. Az első évben a munkatervben foglaltaknak maximálisan eleget tettünk. 2013-ban a Kaposvári Egyetem Állattudományi Kara átalakult, szeptember 1.-től új névvel és szerkezeti struktúrában működik. Mint az újonnan alakult intézetek közül az egyik megbízott vezetője, új tanszék létrehozásával és az intézeti struktúra kialakításával jelentős időt és energiát kellett fordítanom szervezési feladatokra, ami sajnos a kísérletes munka rovására is ment.

További lassító tényező volt az is, hogy a mikotoxinok genkárosító hatásának vizsgálatában alkalmazott comet assay-hez új szoftvert vásároltunk (Comet Assay IV), amelynek adaptálása és gyakorlati alkalmazása időt igényelt. A hosszabbítási kérelmünket az OTKA Iroda jóváhagyta (EIK-6919/2013.11.14-i engedély). 2014-ben további késést jelentett a publikálás terén az, hogy nem tervezetten újként adaptáltuk a limfocitákra kidolgozott comet assay-t spermiumok vizsgálatára.

A jelen projekt keretében megjelent és várhatóan megjelenő tudományos közlemények száma:

- megjelent: 5 nemzetközi (2 IF-os), 1 hazai idegen nyelvű (IF-os), 1 magyar (IF-os)
- elbírálás alatt áll: 2 nemzetközi (IF-os), 1 hazai idegen nyelvű (IF-os)
- közlésre előkészített: 2 nemzetközi (IF-os), 1 hazai idegen nyelvű (IF-os)

A tudományos közlemények mellett számos hazai és nemzetközi fórumon jelentek meg az eredmények előadás, vagy poszter formájában.

Költségtervben történtek módosítások, ezek főként az egyéb költségek és a beruházás kategóriát érintették. A módosítások a munkát érdemben nem befolyásolták, bizonyos esetekben lehetővé tették a tervezettnél korábban amortizálódott kisebb eszközök (pl. mérleg, inkubátor) cseréjét, ami a munka szempontjából lényegi volt.

Személyi változás nem történt, ugyanaz a kutatói gárda dolgozott a projektben. Négy PhD hallgató munkája kapcsolódik a projekthez: Somoskői Bence (SZIE ÁOK – KE közös témavezetés), Rajli Veronika (KE - SZIE ÁOK közös témavezetés), Hafner Dóra (KE) és Mariam Kachlek (KE).

Kaposvár, 2016. január 28.