

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Biológia Intézet, Ökológia Tanszék

T-2 mikotoxin hatása egérembriók *in vitro* fejlődésére

Szakdolgozat

Készítette:

Somoskői Bence

Biológia MSc II.

Témavezetők:

Dr. Cseh Sándor

SZIE ÁOTK Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék

Dr. Kovács Melinda

KE Állattudományi Kar, Élettani Tanszék

Budapest

2011.

TARTALOMJEGYZÉK

ÖSSZEFOGLALÁS	3
BEVEZETÉS	4
A mikotoxinok fogalma, jelentősége.....	4
A <i>Fusarium</i> nemzetség gazdasági jelentősége	5
T-2 toxin	7
A T-2 élettani hatásai.....	8
CÉLKITÚZÉS	10
ANYAG ÉS MÓDSZER	11
A kísérleti állatok elhelyezése és takarmányozása	11
Szuperovuláció	11
Az embriók kinyerése	11
A embriók kiválogatásának szempontjai	12
Az embriók elhelyezése	13
Mitokondriális- és ROS festés	13
A festés kiérékelése	14
Statisztikai analízis	14
EREDMÉNYEK	16
Morfológiai vizsgálatok	16
Sejttani vizsgálatok.....	18
MEGBESZÉLÉS	23
SUMMARY	25
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	26
IRODALOMJEGYZÉK	27
NYILATKOZAT	30

ÖSSZEFOGLALÁS

A mikotoxinok mikroszkópikus penészgombák másodlagos anyagcsere-termékei, amelyek jelenlétével a tápláléklánc bármely szintjén számolni kell. Eddig mintegy 400 típust izoláltak, ezek között nagyszámban fordulnak elő olyanok, amelyeknek sejtkárosító hatást tulajdonítanak.

Hét csoportjuk közül a trichotecén vázas vegyületeket a *Fusarium* nemzetség több faja is termeli (*F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. sporotrichoides*, *F. graminearum*). Ezek a penészgombák képesek szinte valamennyi gabonafélén megtelepedni. Nagyfokú ellenálló-képességük következtében toxinjaik jelen vannak állati takarmányokban és élelmiszerekben, amelyek toxin-szennyezettsége súlyos problémákat és gazdasági károkat okoz mind a fejlődő, mind a fejlett országokban. Ezek a vegyületek gyakran idéznek elő reprodukciós zavarokat és a női- valamint a hím nemi működésre egyaránt negatív hatással vannak, továbbá a fejlődő magzatot is károsíthatják.

Vizsgálataink célja a trichotecén vázas gombatoxinok csoportjába tartozó T-2 toxinnak az egérembriók *in vitro* körülmények közötti fejlődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. A kísérletekben felhasznált embriókat 6 hetes, szuperovuláltatott, C57Bl/6 nőtény egerekből nyertük.

Munkánk során 10 csoportot alakítottunk ki, attól függően, hogy az embriótenyésztő tápfolyadék milyen koncentrációban tartalmazta a T-2 toxint (0,1; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5 és 3 ng/ml). A kontroll csoport embrióit toxint nem tartalmazó médiumban tenyésztettük 5 napon keresztül. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az egyes csoportokban milyen arányban érik el a zigóták az expandált blasztociszta stádiumot, valamint két (0,5 ng/ml és 2,5 ng/ml toxintartalmú) csoport esetében azt, hogy a vegyület milyen hatást gyakorol az aktív mitokondriumok valamint a reaktív oxigén gyökök (ROS) eloszlására és mennyiségére.

Eredményeink alapján elmondható, hogy 2,5 ng/ml T-2 toxin tartalom felett a zigóták fejlődése megreked; nem indul el vagy 24 órán belül, a kétsejtes állapot elérését követően megáll. Ennek oka valószínűleg a mikrotubulusok felépülésének gátlása. Alacsonyabb koncentrációk mellett a zigóták változó arányban érték el a blasztociszta stádiumot. A 0,5 ng/ml töménységű tápfolyadékban tenyésztett csoportban az aktív mitokondriumok és a ROS mennyisége nem mutatott eltérést a kontroll csoport eredményeitől.

BEVEZETÉS

A mikotoxinok fogalma, jelentősége

A mikotoxinok mikroszkópikus penészgombák másodlagos anyagcsere-termékei, melyek a gombák fejlődésében és növekedésében nem játszanak közvetlen szerepet (Moss, 1991), azonban jelenlétükkel a tápláléklánc szinte minden szintjén számolni kell. Ezek a vegyületek a gombák micéliumában termelődnek, de jelen vannak a spórákban is (D’Mello és Macdonald, 1997). Napjainkig több mint 400 eltérő kémiai szerkezettel, hatásmechanizmussal és toxicitással rendelkező mikotoxint fedeztek fel és írtak le (Toumi és mtsai, 2000).

A mikotoxinokat 7 nagy csoportba sorolhatjuk: aflatoxinok, ochratoxinok, fumonizinek, trichotecének, zearalenon, moniliformin valamint a tremorgének és ergot alkaloidok. Az aflatoxinokat és az ochratoxinokat elsősorban *Aspergillus* fajokban, a fumonizineket, trichotecéneket, moniliformint és a zearalenont főként *Fusarium* fajokban találjuk meg, a tremorgének és ergot alkaloidok pedig az *Acremonium*, *Claviceps* és *Penicillium* nemzetségek néhány fajában termelődnek (Hussein és Brasel, 2001). Ezek a gombafajok a legtöbb gabonafélén megtelepszenek, toxinjaik többsége pedig ellenáll a hagyományos élelmiszer- és takarmány-előállítási folyamatok során alkalmazott kezeléseknek, így azok jelenléte kimutatható nemcsak állati takarmányokban, de alapvető emberi élelmiszerekben is (Scott, 1984). Mindegyik csoportban találhatóak erősen toxikus és kevésbé toxikus vegyületek is.

Az élelmiszerek és állati takarmányok toxin szennyezettsége súlyos problémákat és gazdasági károkat okoz mind a fejlődő, mind a fejlett országokban. Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete (FAO) becslése szerint a mikotoxin szennyezettség a világ gabonatermésének akár 25 % -át érintheti évente (Rai, 2010).

Az elsődleges mezőgazdasági termelés (takarmánynövények, növényi eredetű élelmiszerek) előállítása során főként a nagyobb víztartalmat igénylő szántóföldi penészgombák, a tárolás alatt pedig a kisebb nedvességtartalom mellett is a raktári penészgombák szaporodnak el. A szántóföldi penészgombák elszaporodásáért elsősorban a köztermesztésben elterjedt hibridek rezisztencia hiánya, agrotechnikai hibák, a talajsavanyodás, növénytáplálási és növényvédelmi anomáliák valamint a monokultúras

termesztés okolható. A raktári penészgombák előfordulása pedig szinte kizárólag tárolástechnikai hiányosságokat jelez (Kovács, 2010).

A *Fusarium* nemzetség gazdasági jelentősége

A szántóföldi penészgombák tipikus képviselői a *Fusarium* nemzetség fajai, amelyek az élet- és szaporodáshoz szükséges feltételeket a termőhelyen találják meg. Fejlődésükhöz nagy nedvességtartalmú (20-23 %) és vízaktivitású (a_w : 0,85-0,90) szubsztrátot igényelnek. Az egész világon széles körben elterjedtek, többségük toxintermelő és fitopatogén. A levelek mellett bejutnak a terméskezdeménybe, valamint a magba is, és ezekkel a növényi részekkel együtt kerülnek a takarmányba illetve élelmiszerekbe. Legfőbb általuk okozott fertőzések a kalász-fuzáriózis (1. kép) valamint a kukorica-csőpenész (2. kép) (Parry és mtsai, 1995)



1. kép Kalász-fuzáriózis búzában
(forrás: www.apsnet.org)



2. kép Kukorica csőpenész
(forrás: www.ipm.iastate.edu)

A *Fusarium* fajok által termelt fő mikotoxinok a trichotecének, fumonisinek és a zearalenon. Ezekon kívül azonban számos más toxikus vegyület előállításáért is felelősek (Glenn, 2007). Valamennyi fajra jellemző, hogy az általa legnagyobb mennyiségben termelt mikotoxinon kívül még egyéb gombatoxinokat is termel, melyek kémiaiilag, és ezáltal biológiai hatás tekintetében is jelentősen eltérhetnek egymástól (Edwards, 2004) (1. táblázat).

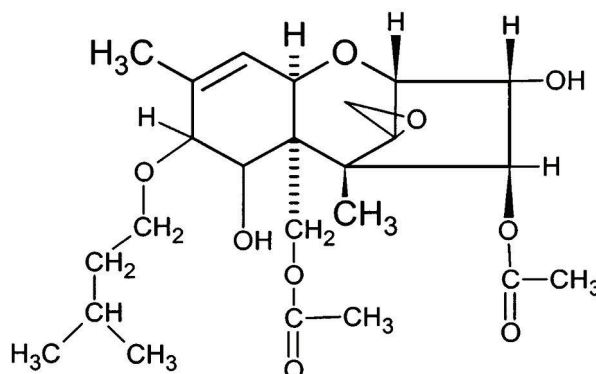
Fajnév	Előfordulás	Mikotoxin
<i>F. avenaceum</i>	világszerte	MON, BEA, FUS
<i>F. crookwellense</i>	világszerte	NIV, ZEA, FUS
<i>F. culmorum</i>	világszerte	DON, ZEA, NIV, FUS
<i>F. fujikuroi</i>	világszerte	GB, MON, BEA, FB
<i>F. globosum</i>	Afrika	FB, BEA, FP
<i>F. graminearum</i>	világszerte	DON, ZEA, NIV, FUS
<i>F. kyushuense</i>	Japán	NIV, T2, DAS
<i>F. langsethiae</i>	Európa	DAS, T2, HT2, BEA
<i>F. napiforme</i>	Afrika, Argentína	FB, MON
<i>F. nygamai</i>	Afrika, Ausztrália	FB, MON, BEA
<i>F. poae</i>	világszerte	DAS, NIV, BEA, FUS, T2, HT2
<i>F. proliferatum</i>	Világszerte	FB, MON, BEA, FP
<i>F. pseudoanthophilum</i>	Afrika	BEA
<i>F. pseudograminearum</i>	Afrika, Ausztrália, É- Amerika	DON, ZEA
<i>F. pseudonygamai</i>	Afrika	MON, FP
<i>F. sporotrichioides</i>	világszerte	T2, HT2, DAS, BEA, FUS
<i>F. subglutinans</i>	világszerte	MON, BEA, FP
<i>F. thapsinum</i>	világszerte	MON
<i>F. verticillioides</i>	világszerte	FB, FUS, MON

1. táblázat. *Fusarium* fajok elterjedése és az általuk termelt mikotoxinok. Az elsőként felsorolt vegyület az adott faj által legnagyobb mennyiségben előállított toxin. (BEA, beauvericin; DAS, diacetoxiszkirpenol; DON, deoxinivalenol; FB, fumonisin B1, B2 és B3; FP, fusaproliferin; FUS, fusarin C; GB, gibberellinek; HT2, HT-2 toxin; MON, moniliformin; NIV, nivalenol; T2, T-2 toxin; ZEA, zearalenon.) (Glenn, 2007 alapján)

T-2 toxin

Munkánk során a trichotecén vázas mikotoxinok csoportjába tartozó T-2 toxin hatását vizsgáltuk. A trichotecének csoportjába olyan vegyületek tartoznak, amelyek szeszkviterpén alapvázal rendelkeznek. A leggyakrabban előforduló trichotecének a deoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiszkirpenol, T-2 valamint metabolitja, a HT-2 (Hussein és Basel, 2001). Ezekon kívül napjainkig kb. 180 különböző trichotecén vázas vegyületet izoláltak és írtak le, amelyeket 4 alcsoportba (A-D) sorolnak be. A T-2 az A-típusú trichotecének családjába tartozó vegyület (Desjardins és mtsai, 1993). A trichotecének elsősorban a *Fusarium* fajokban termelődnek, de megtalálhatók más nemzetségekben is, mint a *Myrothecium* (Tamm és Breitenstein, 1984) és *Trichotecium* (Jones és Lowe, 1960).

A T-2 elsődleges termelője a *F. sporotrichoides* és a *F. poae*, amelyeket a mérsékelt övi országokban, így hazánkban is a leggyakoribb *Fusarium* fajok között tartanak számon. Így elmondható, hogy régióinkban a trichotecének közül a T-2 (1. ábra) valamint a deoxinivalenol (DON) fordulnak elő legnagyobb mennyiségben (Placinta és mtsai 1999).



T-2 Toxin

1. ábra. A T-2 toxin kémiai szerkezete

Az Európai Unió országaiban a T-2 toxin koncentráció határértéke a takarmány alapanyagokban és takarmányokban kötelező érvénnyel nincs megadva, csak ajánlati szintek léteznek erre vonatkozóan. Jelenleg a világban csak két országban (Izrael és Oroszország) van érvényben szabályozás a T-2 maximális megengedett koncentrációjára, mindkét államban 0,1 mg/kg minden állatfaj esetében. Magyarországon az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága 2003-ban fogalmazott meg javaslati értéket takarmánykeverékekre, különböző állatfajonként 0,25 - 0,8 mg/kg értékben (MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, 2003).

A T-2 élettani hatásai

A *Fusarium* nemzetség által termelt mikotoxinok közül a T-2 toxin bizonyult a legtoxikusabbnak. Számos kísérlet bizonyítja sejtkárosító hatását. Egyik legrégebben ismert T-2-indukálta jelenség a lipidperoxidáció fokozása, ezzel együtt a szabadgyök-képződés indukálása (*Iwahashi, 1982*). A T-2 toxin által okozott oxidatív károsodások (oxidatív stressz) a sejtekben apoptózist indukálhatnak (*Atroschi és mtsai, 1997*). A trichotecének zsírolékony vegyületek, így könnyedén bejutnak a sejtekbe, ahol a peptidil-transzferázhoz kötődnek, ezáltal gátolják a DNS- és RNS-, közvetve pedig a fehérje-szintézist (*Thompson és Wannemacher, 1990*), mindezek mellett a T-2 gátolja a mitokondriális elektrontranszportot (*Koshinsky és mtsai, 1988; Pace, 1983*) valamint a mitokondriális protein szintézist (*Pace és mtsai, 1988*). Emlős sejt-tenyészetekben az apoptózis mitokondriális útjának indukálását tapasztalták (*Bouaziz és mtsai, 2009*). *Wu és mtsai (2011)* patkány granulosa sejtekben vizsgálták a toxin hatását. A kísérlet során rámutattak arra, hogy a vegyület az apoptózis ROS-mediált mitokondriális útját indítja el (ROS jelentős növekedése a sejtben). A toxin apoptózis-indukáló hatását *in vivo* körülmények között is sikerült bizonyítani. Patkányokban megfigyelték az apoptózis-kapcsolt gének expressziójának növekedését különböző szövetekben, T-2 toxinnal szennyezett takarmány etetését követően (*Doi és mtsai., 2006*). A toxin immunszuppresszív hatását is vizsgálták *in vivo* és *in vitro* körülmények között egyaránt (*Gutleb és mtsai, 2002*). A T-2 citotoxikusnak bizonyult mind a T- (MOLT-4) mind pedig a B-limfocita sejtvonalak (IM-9) esetében (*Minervini és mtsai, 2005*).

Napjainkig számos vizsgálatot végeztek T-2 toxin haszonállatokra gyakorolt hatásának kimutatására. Ezek a tanulmányok azt mutatják, hogy a toxinra legérzékenyebb állatok a sertések, míg a legkevésbé a kérődzők reagálnak a takarmányban lévő toxikus vegyületekre (*Hussein és Brasel, 2001*). Ennek oka a kérődzők bendőjében élő szimbionta mikroorganizmusok (protozoonok és baktériumok), amelyek a toxin nagy százalékát átalakítják, így biológiai hatásukat semlegesítik.

A T-2 mikotoxin mind a női- mind pedig a hím nemi működést károsíthatja. Az eddigi kutatások elsősorban nőivarú állatok nemi működésének változására irányultak. Ezzel kapcsolatban főként etetési kísérleteket végeztek. *Huszenicza és mtsai (2000)* zavart nemi működést (a domináns tüszőérés és az ovuláció késleltetése, csökkent progeszteron termelés) tapasztaltak juhban és szarvasmarhában. A sárgatest érésének zavarát megfigyelték sertések esetében is (*Ványi és mtsai, 1995*). Nőivarú állatokon végzett *in vivo* kísérletek során kimutatták, hogy a toxin gátolja a granulosa sejtek proliferációját és a szteroidgenézist. Már

alacsony koncentráció esetén is (3 ng/ml) az ösztradiol-termelés 40 %-os visszaesését tapasztalták sertésekben (*Caloni és mtsai, 2009*). Bikákban, gombával erősen fertőzött, T-2 és származékát, a HT-2 toxint tartalmazó takarmány hatására a sperma minőségének erőteljes romlását figyelték meg, ami elsősorban a motilitás visszaesésében és a mozgó spermiumok arányának csökkenésében nyilvánult meg (*Alm és mtsai, 2002*).

Vemhes állatokon is végeztek vizsgálatokat, ezek elsősorban a fejlődő magzaton lezajló változásokra fókuszáltak. A T-2 toxin képes áthatolni a placentán (*Lafarge-Frayssinet és mtsai, 1990*), így a fejlődő magzatot károsíthatja. Vemhes egerek szennyezett takarmánnyal történő etetését követően a thymus sorvadását észlelték a magzatokban (*Holladay és mtsai, 1993*). A toxin apoptózist indukáló hatását kimutatták magzati idegrendszer fejlődése esetében is (*Ishigami és mtsai, 1999*). A csontrendszer abnormális fejlődését, a csontosodás részleges hiányát valamint egyes csontok hiányát is megfigyelték (*Rousseaux és mtsai, 1987*). Patkányokban a vér-agy gát roncsolódását és magzati agyi léziók keletkezését tapasztalták (*Sehata és mtsai, 2004*).

A toxin jól ismert reprodukciós és magzatkárosító hatásával ellentétben azonban eddig nem készültek tanulmányok a toxin korai embrionális fejlődésre gyakorolt hatásával kapcsolatban.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatást gyakorol a T-2 Fusarium-toxin egérembriók korai embrionális fejlődésére *in vitro* körülmények között. A kísérletek a következők voltak:

- Morfológiai vizsgálatok: A különböző toxinkoncentrációk mellett a zigóták milyen arányban érik el az expandált blasztociszta stádiumot?
- Sejtteni vizsgálatok: A toxin jelenléte a tápfolyadékban hogyan befolyásolja a blasztomérákban található aktív mitokondriumok számát, valamint a reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyiségét?

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleti állatok elhelyezése és takarmányozása

A kísérlet során C57Bl/6 törzsből származó egereket használtunk, amelyeket az Országos Onkológiai Intézettől vásároltunk (Budapest). Az egereket légkondicionált helyiségben, 21 °C-os hőmérsékleten, 65%-os páratartalom, speciális világítási program (12 óra és 12 óra sötét) és ad libitum biztosított takarmány mellett tartottuk.

A nőivarú egyedeket 10-es csoportokban, a hímeket egyedileg, külön-külön helyeztük el.

Szuperovuláció

Az alkalmanként nagyobb számban történő embrió kinyerése érdekében az állatokat gonadotrop hormonnal szuperovuláltattuk. A módszer előnye, hogy a természetesnél (6-7/egyed) jóval nagyobb számú petesejt indul érésnek az ösztrusz ciklusban, amelynek köszönhetően a természetesnél lényegesen nagyobb számú embrió kinyerése válik lehetővé (akár 25-30 embrió egyedenként).

A szuperovuláció során a nőstény egereket az első kezelési napon 12.00 órakor 7,5 NE PMSG-vel (Pregnant Mare Serum Gonadotroph hormon, Alvetra und Werfft AG, Ausztria) oltottuk intraperitoneálisan. A hormon injekció után, a kezelt egereket elkülönítettük a nem kezelt egyedektől.

A PMSG beadása után 48 órával az állatokat hCG kezelésben részesítettük (Human Chorionic Gonadotroph hormon, Alvetra und Werfft AG, Ausztria). A hCG kezelés célja a fejlődésnek indult tüszők (petesejtek) ovulációjának kiváltása volt. Ebből a hormomból szintén 7,5 NE-t adtunk mindegyik egyednek, intraperitoneálisan.

A hCG injekció után a nőstény állatokat egy-egy hím állat ketrecében helyeztük el. A pázás a hajnali órákban történt.

Az embriók kinyerése

Az embriókinyerés a hCG kezelés után kb. 20-22 órával történt. A műtét során az egerek hasüregének felnyitása után mindkét petevezetőt, a petefészkekkel együtt, eltávolítottuk.

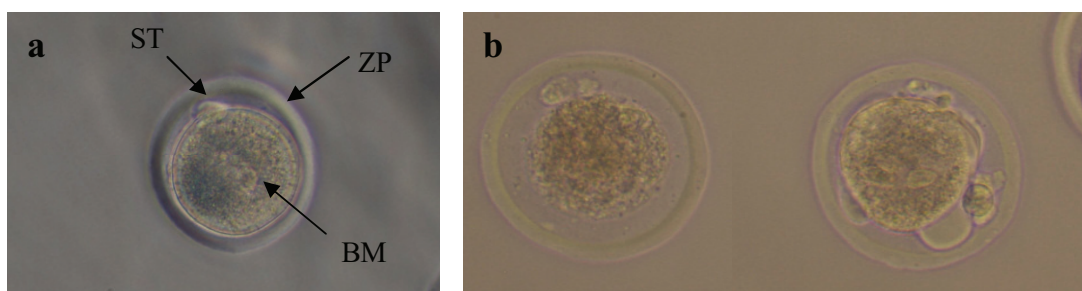
A zigóták petevezetőből történő kinyerését Petri-csészében végeztük. A csészéket borjúsavó (SIGMA, Németország) és PBS (Phosphate buffered saline, SIGMA, Németország) 1:10 arányú keverékével töltöttük fel. A borjúsavó megakadályozza az embriók letapadását a Petri-csésze aljára, így megkönnyíti azok mozgását.

A megtermékenyítés utáni órákban a zigóták a petevezető ampulláris szakaszában helyezkednek el, így ezt a területet kell felnyitni. Az ampulla átszúrásakor a kumulusz sejtekkel körülvett zigóták, a petevezetőben uralkodó magasabb nyomás következtében, kiáramlanak az ampullából a Petri-csészébe.

A zigóták kinyerése után a médiumhoz folyamatosan hialuronidázt adagoltunk. A hialuronidáz alkalmazásának célja, hogy leoldja a kumulusz sejteket a zigótákról. A megtisztított, és minőségvizsgálaton átesett zigótákat - a hosszú ideig (5 nap) tartó *in vitro* tenyésztésre - áthelyeztük a tartós *in vitro* tenyésztésre használt speciális (Cleavage Medium, Cook Medical, Roskilde, Dánia) médiumot tartalmazó, négy-vájatú egyszer használatos műanyag tálcába (NUNC, Dánia).

Az embriók kiválogatásának szempontjai

Az embriók minőségét a tartós *in vitro* tenyésztés előtt elbíráltuk. Tenyésztésre csak azokat az embriókat jelöltük ki, amelyek állománya ép volt, egy vagy kettő sarki testtel rendelkeztek, alakjuk megfelelő volt (3/a kép). A roncsolt vagy összezsugorodott állománnyal rendelkező sejteket, továbbá a kétsejtes állapotú, vagy kettőnél több sarki testtel bíró, deformált képleteket nem használtuk fel (3/b kép).



3. kép. *In vitro* tenyésztésre alkalmas (a) és alkalmatlan (b) zigóták (ST: sarki test; ZP: zona pellucida; BM: blasztoméra)

Az embriók elhelyezése

Az embriókat négy-vájatú edényekben tenyésztettük. Táptalajként Cleavage Mediumot (COOK Medical, Ausztrália) használtunk. A vizsgálat során a T-2 mikotoxin több koncentrációját alkalmaztuk a tartós *in vitro* tenyésztéshez, amelyet a tápfolyadékhoz adagoltunk. A toxint tartalmazó csoportok mellett egy kontroll csoportot is kialakítottunk. Minden tenyésztés alkalmával az egyik vájat a kontroll csoport embrióit tartalmazta. A kontroll embriókat toxint nem tartalmazó tápfolyadékban helyeztük el. A vizsgált koncentrációk a következők voltak (ng/ml): 0,1; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3; kontroll (0 ng/ml). A toxint a Kaposvári Egyetem Élettani Tanszékén keverték a tápfolyadékhoz, amelyet mi szükség szerint hígítottunk tovább.

Mitokondriális- és ROS festés

Vizsgálataink során kíváncsiak voltunk arra, hogy a T-2 toxin hogyan hat a blasztomérák mitokondriumainak működésére, valamint a reaktív oxigén gyökök mennyiségére. Ennek felmérésére 4 csoportot vizsgáltunk:

1. magas (2,5 ng/ml) toxinkoncentrációjú tápfolyadékban tenyésztett, kétsejtes stádiumban megrekedt embriók
2. gyári tápfolyadékban tenyésztett zigóták, 4 sejtes stádiumig
3. alacsony (0,5 ng/ml) mennyiségű toxint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztett embriók, amelyek elérték a blasztociszta stádiumot
4. csoport elemei a kontroll csoport blasztocisztái voltak

A kísérlet elvégzéséhez fluoreszcens festékeket használtunk, amelyek a MitoTracker® Orange CMTM Ros (Molecular Probes M-7510, Oregon, USA) és 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát (DCDHF DA) voltak.

A MitoTracker® Orange CMTMRos hatásmechanizmusának a lényege az, hogy a festék átdiffundál a sejtmembránon, és az aktív mitokondriumokban halmozódik fel. Így megállapítható, hogy a sejt hány működő mitokondriummal rendelkezik.

A DCDHFDA festés segítségével a sejtben található reaktív oxigén gyökök (ROS) jelenlétére vonatkozóan kaphatunk információt. A vegyület könnyedén behatol a sejtekbe, ahol a H₂O₂ hatására oxidálódik, és a vegyület oxidált formája (2',7'-diklorofluoreszcein

[DCF]) fluoreszkál. A DCF mennyisége egyenes arányosságban van a sejtben jelen lévő peroxid-gyökök mennyiségével.

A mitokondriumok és a reaktív oxigén gyökök festése négy-vájtú edényben történt. Az első vájat 400 µl PBS-t tartalmazott, 3 % BSA-val. Az embriókat 3-szor mostuk át az oldatban, majd a második vájatba helyeztük őket, amelybe ugyanezt az oldatot tettük, hozzáadva 0,9 µl MitoTracker® Orange CMTMRos festéket. Ezután 30 percig inkubáltuk az embriókat 37 °C-on, 6,5 % CO₂ tartalom mellett. Az inkubációs idő lejártá után az embriókat a harmadik vájatba helyeztük át, amely 400 µl PBS-t tartalmazott, 0,3 %-os BSA-val. Itt szintén 3-szoros mosást alkalmaztunk, majd áthelyeztük őket a negyedik vájatba, amely ugyanezt az oldatot tartalmazta, 1 µl DCFDA hozzáadásával. Az embriókat ezt követően 15 percig inkubáltuk. Az inkubációt követően tiszta PBS-ben mostuk át őket, majd Eppendorf-csőben, 2 %-os paraformaldehidben fixáltuk a vizsgálni kívánt embriókat.

A megfestett embriókat hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltuk.

A festés kiértékelése

A megfestett mitokondriumok és reaktív oxigén gyökök detektálása konfokális lézer scanning mikroszkóppal (C1/TE2000-U Nikon) történt, amelyet a Bari Egyetem Állattenyésztési Intézetének (Bari, Olaszország) munkatársai végeztek. A fényképek 600 X-os nagyításon készültek, olaj immerzió alatt. A Mitotracker Orange CMTM Ros detektálásához 543 nm hullámhosszú hélium neon/lézer sugarat használtak, G-2 A szűrővel. A DCF méréséhez 488 nm hullámhosszú argon-ion lézer sugarat alkalmaztak, B-2 A szűrővel. Minden embrióról 25, egyenként 0,45 µm vastagságú szelet készült függőleges irányban.

A fényképek kiértékelése Image J (National Institutes of Health, USA) képanalizáló szoftverrel történt. Minden embrió esetében a 13. szeletről készült fényképpel dolgoztunk. Mind a mitokondrium-, mind pedig a ROS festésről készült képeket először 8-bit színösszeállításra alakítottuk át, majd a vizsgálandó terület kijelölését követően megmértük a sötét területek arányát (Mean Grey Value).

Statisztikai analízis

Az *in vitro* tenyésztés eredményeinek kielemezéséhez Khi-négyzet próbát végeztünk először függetlenségvizsgálatra, majd páronkénti összehasonlítással. Az aktív mitokondriumok és a ROS sejten belüli mennyiségének összehasonlítására kétmintás T-próbát alkalmaztunk,

kétoldali ellenhipotézissel. Szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ eredményt tekintettük. A tesztet az R 2.12.0 verziójával végeztük.

EREDMÉNYEK

Morfológiai vizsgálatok

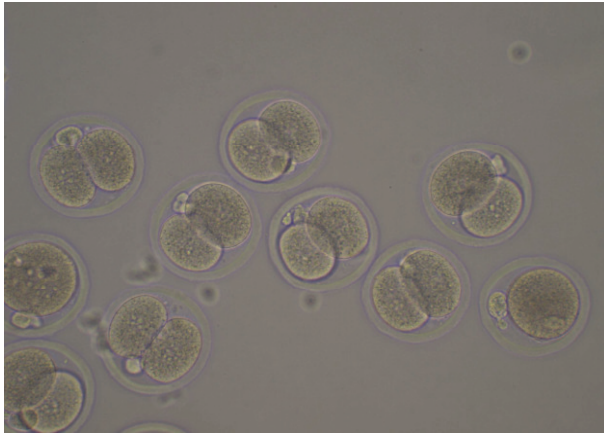
Az *in vitro* embriótenyésztés eredményeinek kiértékelése során a következőképpen jártunk el: csak azoknak a csoportoknak az eredményeit vettük figyelembe és elemeztük, amelyek esetében az azonos időpontban indított kontroll csoport zigótái legalább 80 %-ban elérték az expandált blasztociszta stádiumot. Ha ez nem valósult meg, abban az esetben akkor is elvetettük az adatokat, ha a toxinos csoportok továbbfejlődése korábbi eredményeinknek megfelelték.

A tenyésztések során kapott eredmények a 10 csoportban a következők voltak:

Koncentráció	Összes zigóta	Blasztociszta	Túlélés (%)
0	66	55	83,33
0,1	36	28	77,78
0,5	41	32	78,05
1	73	39	53,42
1,25	33	13	39,39
1,5	21	11	52,38
1,75	16	5	31,25
2	26	3	11,54
2,5	50	0	0
3	19	0	0

A táblázat alapján látható, hogy a 2 ng/ml-nél nagyobb mennyiségű toxint tartalmazó csoportokban a zigóták fejlődése megreked, vagy 24 óra elteltével, a kétsejtes állapot elérése után már nem osztódnak tovább (4. kép). Az expandált blasztociszta stádiumot (5. kép) csak a toxint ennél kisebb koncentrációban tartalmazó tápfolyadékban tenyésztett zigóták érték el, változó arányban. A kontroll csoportban megfigyelt 83,33 %-os továbbfejlődési arány megfelel a gyári tápfolyadékkal szemben támasztott követelményeknek (minimum 80 %).

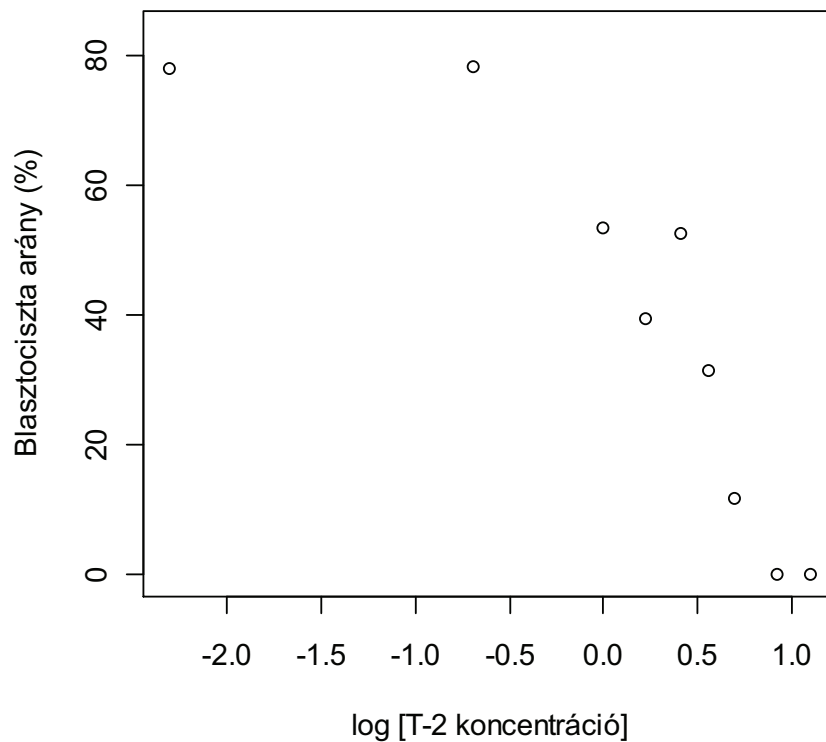
A táblázat alapján készített pontdiagram (1. ábra) jól mutatja, hogy az első két, alacsony toxintartalmú csoport blasztociszta aránya nem tér el számottevően a kontroll csoportnál tapasztaltaktól. A koncentráció növekedésével azonban már kis különbségekre is rendkívül érzékenyen reagál a rendszer.



4. kép. Egysejtes és kétsejtes stádiumban megrekedt embriók



5. kép. Normál fejlődésű expandált blasztociszta (ICM: embriócsomó; TE: trophoblast; BC: blasztocöl; ZP: zona pellucida)



1. ábra. A tartós *in vitro* tenyésztés végén tapasztalt túlélési arány a toxin-koncentráció függvényében

Az eredmények statisztikai értékeléséhez Khi-négyzet próbát végeztünk függetlenségvizsgálatra majd páronkénti összehasonlítással. A próba eredménye alapján megállapítható, hogy a toxinkezelés hatással van az embriók továbbfejlődésére (p-érték < 2,2e-16). A kezelt csoportok eredményeit összevetve a kontroll (kezeletlen) embriókéval megállapítható, hogy a két legkisebb toxintartalmú (0,1 ng/ml és 0,5 ng/ml) tápfolyadékban tenyésztett csoport esetén tapasztalt túlélési arány nem különbözik szignifikánsan a kontroll embriókétól. A nagyobb toxintartalmú csoportoknál azonban minden esetben szignifikáns különbség mutatkozott (2. táblázat).

Párosítás	p-érték
Kontroll – 0,1 ng/ ml	0,6726
Kontroll – 0,5 ng/ml	0,6696
Kontroll – 1 ng/ml	0,0003413
Kontroll – 1,25 ng/ml	2,508e-05
Kontroll – 1,5 ng/ml	0,009478
Kontroll – 1,75 ng/ml	9,463e-05
Kontroll – 2 ng/ml	6,251e-10
Kontroll – 2,5 ng/ml	2,2e-16
Kontroll – 3 ng/ml	1,315e-10

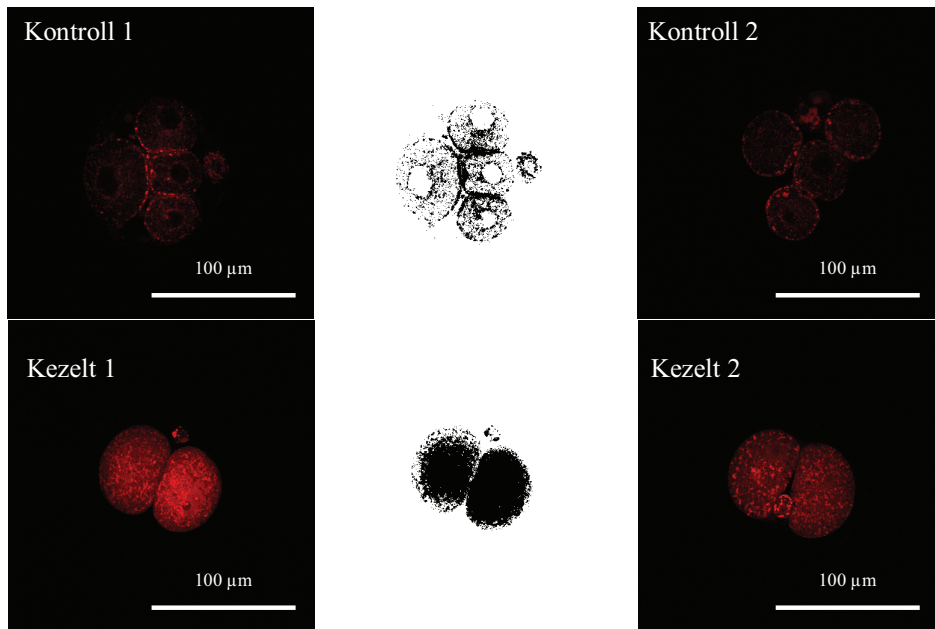
2. táblázat. Khi-négyzet próba páronkénti összehasonlítás eredményei

Sejttani vizsgálatok

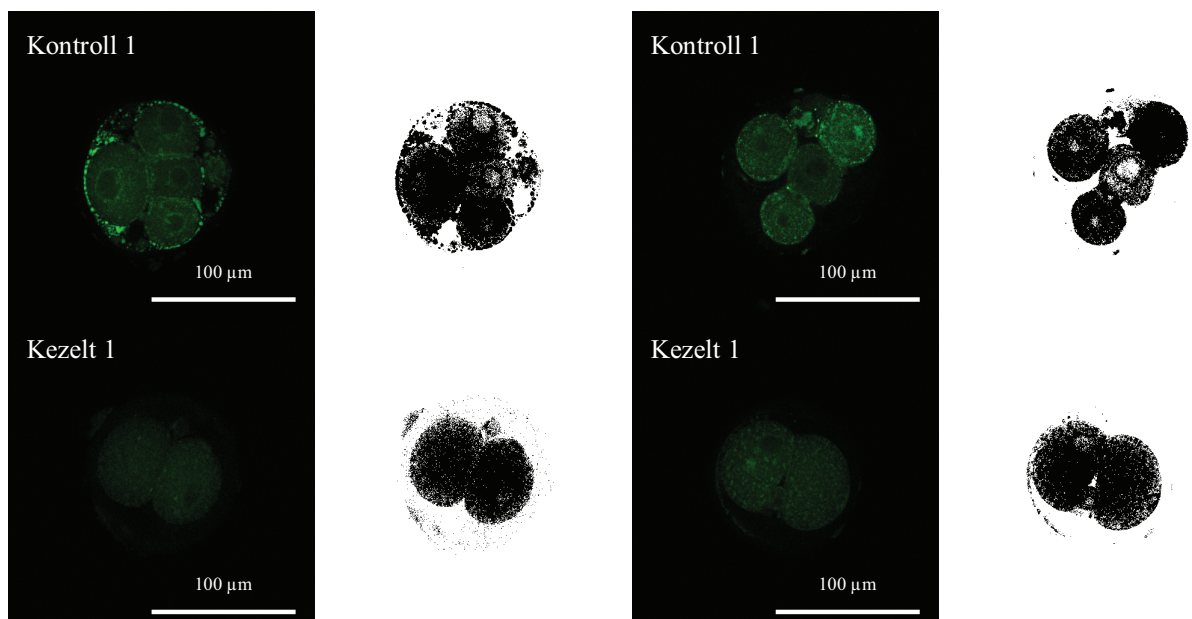
A sejttani vizsgálatok során először a 2 sejtes stádiumban megrekedt embriókat (n=7) hasonlítottuk össze a kontroll, gyári tápfolyadékban tenyésztett embriókkal (n=5), amelyek 2-4 sejtes stádiumban voltak. Az összehasonlítás alapja a mitokondriumok és a reaktív oxigén gyökök (ROS) citoplazmán belüli elhelyezkedése volt.

A képek alapján látható, hogy a toxint nem tartalmazó tápfolyadékban tenyésztett embriókban a mitokondriumok perinukleárisan és perikortikálisan rendeződnek (2. ábra, Kontroll 1; Kontroll 2). Ezzel szemben a kezelt embriók blasztoméráiban ugyanez a szabályos eloszlás nem figyelhető meg, bennük a mitokondriumok diffúzan helyezkednek el (2. ábra,

Kezelt 1; Kezelt 2). A ROS citoplazmán belüli elrendeződése esetében azonban nem találtunk különbséget a két csoport között. Mind a kezelt, mind pedig a kontroll embriók blasztoméráin belül homogén eloszlás látszik (3. ábra).



2. ábra. Toxinmentes és magas toxintartalmú tápfolyadékban tenyésztett embriók MitoTracker Orange CMTM Ros festés után. A mitokondriumok eloszlásbeli különbsége jól látszik a fekete-fehér (Threshold) képeken.



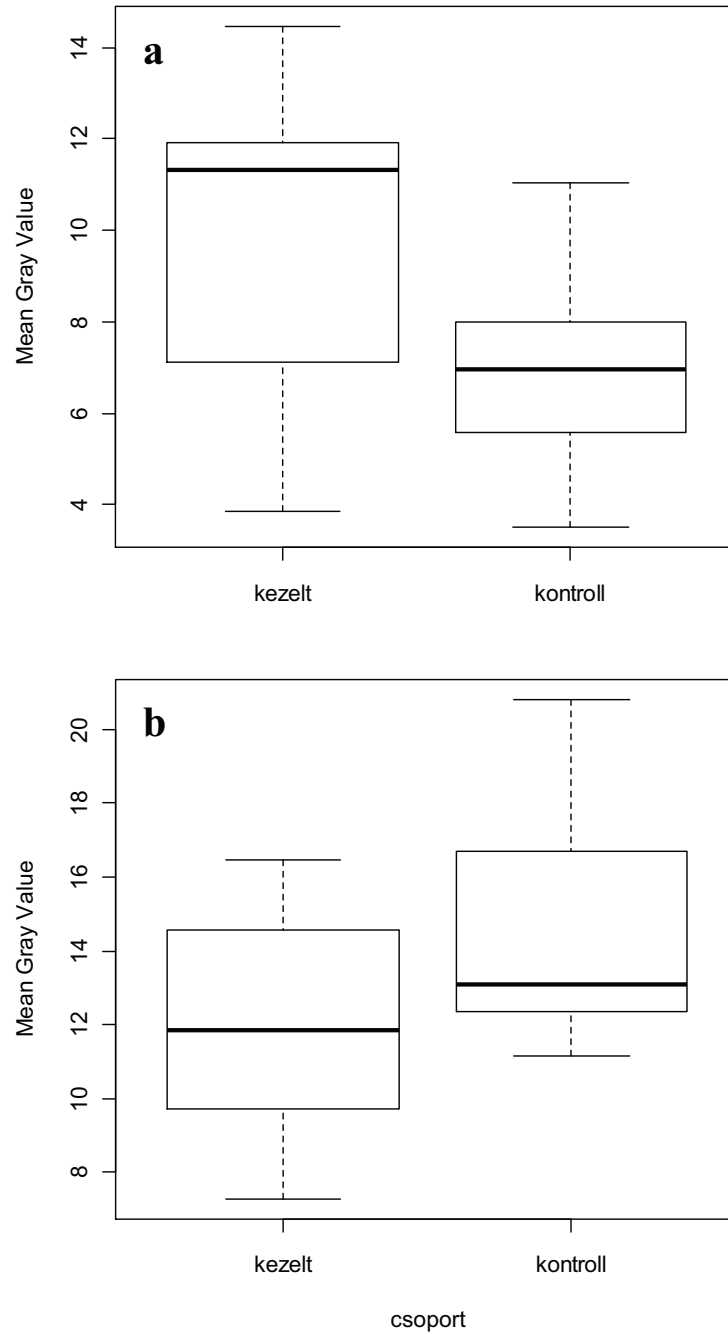
3. ábra. Toxinmentes és magas toxintartalmú tápfolyadékban tenyésztett embriók DCDHFDA festés után. Mindkét csoportban jól látható a ROS diffúz eloszlása.

Az *in vitro* tenyésztési eredmények kiértékelését követően kiválasztottunk egy olyan toxin-kezelt csoportot is, amelyben a túlélési arány nem különbözött szignifikánsan a kontroll embrióktól. Ez a két legkisebb T-2-tartalmú csoport volt, amelyek közül a 0,5 ng/ml töménységű médiumban tenyésztett embriókat vizsgáltuk meg. A kezelt blasztociszták (n=7) fluoreszcencia-intenzitás értékeit összevetettük a kontroll csoport blasztocisztáinak (n=9) eredményeivel. A vizsgálat során a következő értékeket kaptuk (3. táblázat):

Embrió azonosító	Csoport	Mean Grey Value	
		MitoTracker	DCDHFDA
E1	0,5 ng/ml	7,726	7,287
E2		12,21	7,971
E3		3,837	11,84
E4		6,512	15,632
E5		11,621	11,482
E6		14,453	13,458
E7		11,33	16,445
	átlag	9,67	12,016
	szórás	3,73	3,507
EK1	kontroll	7,194	20,553
EK2		6,84	12,962
EK3		5,573	20,801
EK4		11,028	11,898
EK5		7,999	12,368
EK6		4,687	15,43
EK7		10,807	16,701
EK8		3,518	11,151
EK9		6,944	13,071
	átlag	7,176	14,992
	szórás	2,525	3,654

3. táblázat. A kétféle fluoreszcens festés intenzitás-értékei.

Az egyes csoportok intenzitás értékeit boxploton ábrázolva az alábbi eredményt kaptuk (4. ábra) :



4. ábra. Fluoreszcens festék-intenzitások (Mean Gray Value értékek) az egyes csoportokban. a) MitoTracker; b) DCDHFDA

A két csoport eredményeinek összehasonlítására kétmintás T-próbát végeztünk. A teszt elvégzésével a következő eredményeket kaptunk:

Sejtfestés	P-érték
MitoTracker	0.1600
DCDHFDA	0.1217

A táblázat alapján látható, hogy sem a mitokondriális-, sem pedig a ROS-festés esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között.

MEGBESZÉLÉS

Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a T-2 mikotoxin milyen hatást gyakorol C57/Bl6 egerek korai embrionális fejlődésére *in vitro* körülmények között, milyen mértékű dózisfüggés mutatható ki, valamint milyen sejtleletani változások zajlanak le az osztódó sejtekben a toxin hatására.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a toxin már nagyon alacsony koncentrációban is súlyosan károsítja a korai embriókat és 2,5 ng/ml T-2 toxin tartalom felett a zigóták fejlődése megreked; nem indul el vagy 24 órán belül, a kétsejtes állapot elérését követően megáll. Tapasztalataink szerint már a toxint 1 ng/ml töménységben tartalmazó tápfolyadékban is szignifikánsan csökken az expandált blasztociszta stádiumot elérő zigóták aránya a kontroll csoporthoz képest.

Az eddigi vizsgálatok adatai azt bizonyítják, hogy a toxin a beágyazódás után, valamint a placenta kialakulását követően károsíthatja a magzatot. A mi kísérleteink újdonságtartalma abban áll, hogy azt jelzi, a toxin már a korai osztódási stádiumú embriók fejlődését is megzavarhatja, leállíthatja. A mikotoxinok többségéhez hasonlóan a T-2 toxin is rendkívül stabil vegyület, amely a legtöbb élelmiszer- és takarmány-előállítási folyamatnak ellenáll. Így a toxikus vegyületek jelen lehetnek a különféle takarmányokban és alapvető emberi élelmiszerekben egyaránt. Ugyanakkor adataink azt jelzik, hogy a toxint már viszonylag kis mennyiségben tartalmazó takarmány vagy élelmiszer tartós fogyasztása az embrió korai elhalásához (rejtett vetélésekhez) vezethet, jóval a beágyazódás előtt. A kísérleteink során alkalmazott toxinmennyiségek az emberi vérben kimutatható koncentráció-tartományba (0,2-1800 ng/ml) esnek (*Berek és mtsai, 2001*).

Mind a humán- mind pedig az állat-reprodukciós vizsgálatoknál és eljárásoknál gyakori gondot okoz a morfológiailag megfelelő, viszont sejtleletani szempontból abnormális embriók jelenléte (*Nagai és mtsai, 2006*). Ennek oka elsősorban a mitokondriumok nem megfelelő működésében keresendő. A kísérletünk során megvizsgáltuk egy olyan embrió csoport mitokondrium- és ROS mintázatát is, amelyben a tápfolyadék toxintartalma alacsony volt és ennek következtében a zigóták elérték az expandált blasztociszta stádiumot (morfológiailag normálisak voltak). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az alacsony toxintartalmú (0,5 ng/ml) és a kontroll csoport embrióinak mitokondrium-aktivitása és ROS-tartalma nem különbözik. A boxplot alapján látható különbség - miszerint a kontroll csoport blasztomérái kevesebb aktív mitokondriumot tartalmaznak - valószínűleg az alacsony

mintaelemszámnak tudható be. Az eredmények pontosítása érdekében ezért a kísérlet megismétlését tervezzük.

Sun és mtsai (2001) sertések esetében vizsgálták a mitokondriumok korai embrionális fejlődés során kirajzolódó mintázatát. A kísérleteik során azt találták, hogy a mitokondriumok perikortikálisan és perinukleárisan rendeződnek a blasztomérákban, amelynek oka az osztódáshoz szükséges nagy mennyiségű energia megfelelő lokalizálása a sejtekben (mag és blasztomérák határa). Ezt az elrendeződést sikerült kimutatnunk a kontroll 4 sejtes embriókban C57/Bl6 egerekben. Az idézett munkában megvizsgálták, hogy a mitokondriumok sejten belüli mozgásában milyen szerepet játszanak a mikrotubulusok illetve a mikrofilamentumok. A mikrotubulusok összeépülését gátló vegyület (nocodazol) hatására a mitokondriumok a sejtben homogén eloszlást mutattak. Ezzel szemben a mikrofilamentumok gátlásakor (cytochalasin B) nem alakult ki diffúz eloszlás, a blasztomérák mitokondriumai megtartották a perinukleáris és perikortikális elrendeződést. *Schoevers és mtsai* (2010) szintén sertés petesejtben vizsgálták a T-2 rokon vegyülete, az ugyancsak trichotecén vázas DON (deoxinivalenol) hatását. A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a DON gátolja az osztódási orsó (mikrotubulusok) kialakulását, a fertilizációt követően pedig az embrió fejlődését.

Eredményeink és a fenti irodalmi adatok alapján tehát kijelenthetjük, hogy a T-2 - számos sejtkárosító hatása mellett - a mikrotubulusok polimerizációjában zavart okoz, ennek következtében a sejtosztódás megáll, a zigóták nem fejlődnek tovább.

Vizsgálatunkban arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy az általunk alkalmazott toxinkoncentrációk hogyan hatnak a sejtek (blasztomérák) reaktív oxigén gyök termelésére. A reaktív oxigén gyökök (ROS) felszaporodása a citoplazmában az apoptózis egyik jellemző kísérő jelensége (*Jacobson, 1996*). Ennek vizsgálatával tehát megállapítható, hogy az embriók blasztoméráiban apoptózis játszódik-e le a toxin hatására. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a kétsejtes, sem pedig a blasztociszta stádiumban lévő toxin-kezelt embriók ROS-tartalma nem különbözik a kontroll csoportban mért mennyiségektől. Az általunk vizsgált T-2 koncentrációk tehát nem indukálnak apoptózist az embriók blasztoméráiban.

SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of microscopic molds that can be found in all levels of food chain. More than 400 types have been isolated, many of them have cytotoxic effects. Several species of *Fusarium* (*F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. sporotrichoides*, *F. graminearum*) genus produce trichotecene-type toxins. These molds can grow on all types of grain and because of their high resistance their toxins can be isolated from a lot of food and feed which cause significant problem both in the developing and developed countries. *Fusarium* mycotoxins can cause reproductive disorders and has negative effect both on the female and male reproductive tract and on the developing fetus.

The aim of our study was to assess the effect of T-2 mycotoxin on *in vitro* development of mouse embryos.

Embryos were recovered from six weeks old, superovulated female C57/BL6 mice. During our experiments 10 groups were created depending on the T-2 toxin concentration of the culture medium (0,1; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5 and 3 ng/ml). Zygotes of the control group were cultured in the same medium with no toxin. After the cleavage we assessed the proportion of the blastocyst stage embryos in each group. Furthermore, in two groups (0,5 ng/ml and 2,5 ng/ml toxincontent) we estimated the effect of the T-2 toxin on the distribution and amount of mitochondria and reactive oxygen species (ROS) in the blastomers.

Our results show that in media containing higher concentration than 2.5 ng/ml the development of embryos disturbed or they stopped in two-cell stage within 24 hours. We suggest that the toxin inhibits the assembly of microtubules. At lower concentration depending on the amount of the T-2 toxin present in the medium the embryos developed further in different ratios during the *in vitro* culture. The amount of mitochondria and ROS in the 0,5 ng/ml toxin-content group does not show difference comparison with controll embryos.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Cseh Sándornak és Dr. Kovács Melindának a témám feldolgozásában nyújtott segítséget valamint a módszerek betanítását. Köszönettel tartozom Keresztes Zsuzsannának a laboratóriumi munka során nyújtott segítségéért. Továbbá szeretném megköszönni Csata Tündének a támogatást, valamint azt, hogy dolgozatom összeállításakor jó tanácsokkal látott el.

IRODALOMJEGYZÉK

- Alm, K., M. Dahlboma, M. Säynäjärvi, M.A. Andersson, M.S Salkinoja-Salonenc, and M.C Andersson. "Impaired semen quality of AI bulls fed with moldy hay: a case report." *Theriogenology* 58 (2002): 1497-1502.
- Atroshi, F., A. Rizzo, I. Biese, P. Veijalainen, E. Antila, and T. Westermark. "T-2 induced DNA damage in mouse liver: the effect of pretreatment with coenzyme Q10 and alpha-tocopherol." *Mol. Aspects. Med.* 18 (1997): 255-258.
- Berek, L., I.B. Petri, Á. Mesterházy, J. Téren, and J. Molnár. "Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*." *Toxicology in Vitro* 15 (2001): 25-30.
- Bouaziz, C., O. Sharaf el dein, E. El Gollia, S. Abid-Essefia, C. Brennerb, C. Lemaireb, and H. Bacha. "Fusarial toxin-induced toxicity in cultured cells and in isolated mitochondria involves PTPC-dependent activation of the mitochondrial pathway of apoptosis." *Toxicological Sciences* 110(2) (2009): 363-375.
- Caloni, F., G. Ranzenigo, F. Cremonesi, and L.J. Spicer. "Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells." *Toxicon* 54 (2009): 337-344.
- Desjardins, A.E., T.M. Hohn, and S.P. McCormick. "Trichotecenes biosynthesis in *Fusarium* spp: chemistry, genetics and significance." *Microbiol Rev* 57 (1993): 595-604.
- D'Mello, J.P.F., and A.M.C. Macdonald. "Mycotoxins." *Animal Feed Technology* 69 (1997): 155-166.
- Doi, K., J. Shinozuka, and S. Sehata. "T-2 toxin and apoptosis." *J Toxicol Pathol* 19 (2006): 15-27.
- Edwards, S.G. "Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichotecene mycotoxins." *Toxicology Letters* 153 (2004): 29-35.
- Glenn, A.E. "Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed." *Animal Feed Science and Technology* 137 (2007): 213-240.
- Gutleb, A.C., E. Morrison, and J.M. Albertina. "Cytotoxicity Assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review." *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11 (2002): 309-320.
- Holladay, S.D., B.L. Blaylock, C.E. Comment, J.J. Heindel, and M.I. Luster. "Fetal Thymic Atrophy after Exposure to T-2 Toxin: Selectivity for Lymphoid Progenitor Cells." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121 (1993): 8-14.
- Hussein, H.S., and J.M. Brasel. "Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals." *Toxicology* 167 (2001): 101-134.

- Huszenicza, Gy., S. Fekete, G. Szigeti, M. Kulcsár, H. Fébel, R.O. Kellems, P. Nagy, S. Cseh, T. Veresegyházy, and I. Hullár. "Ovarian consequences of low dose peroral fusarium (T-2) toxin in a ewe and heifer model." *Theriogenology* 53 (2000): 1631-1639.
- Ishigami, N., J. Shinozuka, K. Katayama, K. Uetsuka, H. Nakayama, and K. Doi. "Apoptosis in the Developing Mouse Embryos from T-2 Toxin-inoculated Dams." *Histol. Histopathol.* 14 (1999): 729-733.
- Iwahashi, M. "Mechanism of cytotoxic effect of T-2 toxin in protozoa." *Proc. Assoc. Jpn. Mycotoxin* 4 (1982): 23-30.
- Jacobson, M. D. "Ractive oxygene species and programmed cell death." *Biochemical Sciences* 21 (1996): 83-86.
- Jones, E.R.H., and G. Lowe. "The biogenesis of trichotecenes." *Chem. Soc. J.* 63 (1960): 3959-3962.
- Koshinsky, H., S. Honour, and G. Khachatourians. "T-2 toxin inhibits mitochondrial function in yeast." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151 (1988): 809-814.
- Kovács, F. "Agrártermelés-Tápláléklánc-Mikotoxinok." In *Aktualitások a mikotoxin kutatásban*, 9-10. Kaposvár: Agroinform Kiadó, 2010.
- Lafarge-Frayssinet, C., K. Chakor, P. Lafont, and C. Frayssinet. "Transplacental Transfer of T2 Toxin: Pathological Effect." *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10 (1990): 64- 68.
- Minervini, F., F. Fornelli, G. Lucivero, C. Romano, and A. Visconti. "T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines." *Toxicology* 210 (2005): 81-91.
- Moss, M.O. "The nvironmental factors controlling mycotoxin formation." In *Mycotoxins and Animal Foods*, edited by J.E. Smith and R.A. Anderson, 37-56. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.
- MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága. "Mikotoxin határértékek takarmány-keverékekben." *Állatteny. Takarm.* 52 (2003): 393-396.
- Nagai, S., T. Mabuchi, S. Hirata, T. Shoda, T. Kasai, S. Yokota, and Et Al. "Porcine oocytes are most vulnerable to the mycotoxin deoxynivalenol during formation of the meiotic spindle." *Tohuko J. Exp. Med.* 210 (2006): 137-144.
- Pace, J.G. "Effect of T-2 mycotoxin on rat liver mitochondria electron transport system." *Toxicon* 21 (1983): 675-680.
- Pace, J.G., M.R. Watts, and W.J. Canterbury. "T-2 mycotoxin inhibits mitochondrial protein synthesis." *Toxicon* 26 (1988): 77-85.
- Parry, D.W., P. Jenkinson, and L. McLeod. "Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review." *Plant Pathology* 44 (1995): 207-238.

- Placinta, C.M., J.P.F. Mello, and A.M.C. Macdonald. "A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins." *Animal Feed Science and Technology* 78 (1999): 21-37.
- Rai, M., and A. Varma. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Edited by M. Rai and A. Varma. Berlin: Springer-Verlag, 2010.
- Rousseaux, C.G., and H.B. Schiefer. "Maternal Toxicity, Embryoletality and Abnormal Fetal Development in CD-1 Mice Following One Oral Dose of T-2 Toxin." *J. Appl. Toxicol.* 7 (1987): 281-288.
- Schoevers, E. J., J. Fink-Gremmels, B. Colenbrander, and B. A. J. Roelen. "Porcine oocytes are most vulnerable to the mycotoxin deoxynivalenol during formation of the meiotic spindle." *Theriogenology* 74 (2010): 968-978.
- Scott, P.M. "Effects of food processing on mycotoxins." *J. Food Prot.* 47 (1984): 489-499.
- Sehata, S., N. Kiyosawa, T. Makino, F. Atsumi, K. Ito, T. Yamoto, M. Teranishi, et al. "Morphological and microarray analysis of T-2 toxin-induced rat fetal brain lesion." *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004): 1727-1736.
- Sun, Q.Y., G.M. Wu, L. Lai, K.W. Park, R. Cabot, H.T. Cheong, B.N. Day, R.S. Prather, and H. Schatten. "Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro." *Reproduction* 122 (2001): 155-163.
- Tamm, C., and W. Breitenstein. "The biosynthesis of mycotoxins." In *Mycotoxins: A study in secondary metabolism*, edited by P.S. Steyn, 69-91. New York: Academic Press, 1984.
- Thompson, W.L., and R.W. Wannemacher. "In vivo effects of T-2 mycotoxin on synthesis of protein and DNA in rat tissues." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105 (1990): 483-491.
- Toumi, T., K. Reijula, T. Johnsson, K. Hemminki, E-L. Hintikka, O. Lindroos, S. Kalso, P. Koukila-Kähkölä, H. Mussalo-Ranhamaa, and T. Haahtela. "Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings." *Appl. Envir. Microbiol.* 66 (2000): 1899-1904.
- Ványi, A., R. Glávits, and T. Molnár. "Reproductive disorders due to F-2 and T-2 toxins in large-scale pig farms." *Magyar Állatorvosok Lapja* 50 (1995): 424-430.
- Wu, J., L. Jing, H. Yuan, and S. Peng. "T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells on rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway." *Toxicology Letters* 202 (2011): 168-177.

NYILATKOZAT

a szakdolgozatról

Alulírott(név)
.....(évf.,szak megnevezése)

kijelentem, hogy

.....
.....
.....
című szakdolgozatom saját kutató munkám eredménye. Hozzájárulok, hogy a szerzői jogok tiszteletben tartása mellett a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban és az egyetemi adattárban elhelyezett nyomtatott és elektronikus példányokat az érdeklődők felhasználják az alábbi feltételekkel: (Kérjük aláhúzással jelölni)

Nyomtatott másolható: részben / egészben

Elektronikus megjeleníthető: belső hálózaton / szabad hozzáféréssel, interneten

aláírás

Budapest,