



Szent István Egyetem
Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Ökotoxikológus szak

T-2 toxin DNS károsító hatásának vizsgálata tyúk fajban

Szabó Rubina Tünde

Dr. Kovács-Weber Mária -PhD, egyetemi adjunktus
Állattenyésztés-tudományi Intézet

Dr. Horváth Ákos PhD, tudományos főmunkatárs
Aquakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

Kovács Róbert, tanszéki mérnök
Aquakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

Gödöllő

2014

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS	3
1.1 CÉLKITŰZÉSEK	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. MIKOTOXINOK A TAKARMÁNYBAN	6
2.1.1. T-2 mikotoxin.....	8
2.1.1.1. A T-2 toxin hatásai	9
2.2. A DNS KÁROSODÁS	14
2.2.1. DNS-hibák javítása.....	16
2.2.2. DNS károsító hatásokat vizsgáló módszerek	18
2.2.2.1. A comet módszer	19
2.3. A FOKHAGYMA.....	23
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	26
3.1. A KÍSÉRLETEK ÁLLATVÉDELMI VONATKOZÁSAI.....	26
3.2. KÍSÉRLETI ÁLLATOK.....	26
3.3. A KÍSÉRLETEK ÉS VIZSGÁLATOK HELYSZÍNEI.....	26
3.4. A KÍSÉRLETI TAKARMÁNYOK ELŐÁLLÍTÁSA.....	27
3.4.1. A kísérleti takarmányok szennyezése T-2 toxinnal.....	27
3.4.2. A kísérleti takarmányok kezelése fokhagymaolajjal	27
3.5. KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS	27
3.5.1. T-2 toxin dóziszfüggő hatásának vizsgálata.....	28
3.5.2. T-2 toxin és fokhagymaolaj hatásának önálló és együttes vizsgálata	28
3.6. A MINTAVÉTELEK RENDJE	29
3.7. A COMET MÓDSZER	29
3.7.1. Felhasznált oldatok, összetételük és elkészítésük.....	29
3.7.2. Tárgylemezek preparálása.....	30
3.7.3. Kiértékelés és az alkalmazott statisztikai módszerek	31
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	32
4.1. A T-2 TOXIN DÓZISFÜGGŐ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA	32
4.2 T-2 TOXIN ÉS FOKHAGYMAOLAJ HATÁSÁNAK ÖNÁLLÓ ÉS EGYÜTTES VIZSGÁLATA	36
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	39
6. ÖSSZEFOGLALÁS	41
7. IRODALOMJEGYZÉK	43
8. NYILATKOZAT	48
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	49

1. Bevezetés

A humán táplálkozásban és a gazdasági állatok takarmányozásában is nagy szerepet játszik a beltartalom. Azonban a makro- (pl: fehérje, rost, zsír) és mikro mennyiségben (pl: vitamin, ásványi anyag) jelenlévő táplálóanyagok mellett veszélyt jelenthetnek a különböző szennyezőanyagok. Ezek az anyagok különböző hatással bírhatnak közvetve vagy közvetlenül a takarmány-alkotókra és az állat szervezetére.

Az élelmiszer- és takarmánybiztonság, annak a biztosítása, hogy az élelmiszer vagy a takarmány nem okoz egészségártalmat, kifejezetten fontos és aktuális téma. Hiszen a különböző szennyezőanyagok nagy kártételt jelenthetnek és sok esetben egészségkárosító hatással is bírhatnak. Ilyen szennyező anyagok a mikotoxinok is.

Az állat-egészségügyi szempontból fontos mikotoxinok meghatározott körülmények között szinte kivétel nélkül termeléseszköket okoznak kisebb vagy nagyobb mértékben, illetve hozzájárulnak egyes betegségek vagy hiánytünetek kialakulásához. A gyakorlatban előforduló dózisok legtöbbször nem okoznak klinikai tüneteket, makroszkópos kórbonctani elváltozásokat, amelyek alapján egyértelműen meghatározható lenne szerepük. Azonban a szemmel nem látható kártételük különböző építőelemekre, mint például a DNS, is kiterjed. Többek között ezért is van szükség megfelelően érzékeny, pontos, alacsony detektálhatósági értéken mérő módszerekre ezen szennyezőanyagok kimutatására.

Nem szabad figyelmen kívül hagyni a toxikus anyagok táplálékláncba való bejutását, illetve áramlását. A mikotoxinok esetében a talaj szennyeződése a növényzet szennyeződését okozhatja. Ezt követően szennyezett növényi élelmiszer képződik, ami vagy közvetlenül jut az emberekhez, vagy közvetve az állati eredetű élelmiszereken keresztül, hiszen a szennyezett élelmiszer mellett a szennyezett takarmány is problémát okoz, amit a különböző gazdasági állatfajok elfogyasztanak, majd toxin felhalmozódás történhet egyes szöveteikben, szerveikben. Ezen állatokból készült állati eredetű élelmiszert elfogyasztva az emberi szervezet újabb veszélynek lehet kitéve (Kovács 2012).

Ez utóbbi történhet úgy, hogy a toxinnal való kitettség rejtve marad, mivel az állatokon kifejezett tünet nem mutatkozik és a vágóhídi minősítésben sem mutatkozik kirívó minőségbeli csökkenés. Így a toxinnal szennyezett állati eredetű élelmiszer változatlanul a fogyasztókhoz kerül. Mivel a penészgombák által termelt mikotoxinok többségében zsírban oldódóak, így a tojás képződése során a lipoproteinekkel együtt a tojásba is átkerülhetnek.

Szerencsére a tojásban való megjelenése ritkának mondható, ami a tojótyúk metabolikus rendszerével magyarázható (Mézes 2008).

A T-2 toxinnal kapcsolatos több évtizedes kutatások eredményeként széles körű ismeretanyaggal rendelkezünk e mikotoxin sejtszinten és a teljes szervezet vonatkozásában kifejtett káros hatásait illetően. Azonban nem egységes a kép a T-2 toxin DNS károsító hatásával kapcsolatban.

Genetikai anyagunk a legjobb körülmények esetében is folytonosan ki van téve káros behatásoknak. A DNS károsodásnak számos formáját ismerjük, mint az egy vagy mindkét szál törése, dimerek képződése vagy strukturális változások. Számos javító mechanizmus létezik ezen negatív folyamatok ellensúlyozására. Ám, ha a DNS károsodás felhalmozódik a javító mechanizmusok elégtelen működése következtében vagy hiányában, akkor a sejten az apoptózis folyamata játszódhat le. Néhány évtized leforgása alatt számos módszer látott napvilágot, mellyel a DNS károsodást, annak mértékét kívánják meghatározni különböző szervezetekben, szövetekben. Így érthető, hogy szükség van a meglévő módszerek tökéletesítésére, minél több mintán és tesztorganizmusra elvégezhetővé tételére, különböző detektálási módszerek kombinálására.

1.1 Célkitűzések

Számos kérdés merülhet fel a továbbiakban a T-2 toxinnal kapcsolatban, amiből egy apró szeletet igyekeztünk feltárni.

- ✓ Célunk volt megvizsgálni, hogy a comet módszer alkalmazható-e brojlercsirkék májának vizsgálatakor a T-2 toxin káros hatásainak felderítése céljából.
- ✓ Célunk volt megvizsgálni, hogy a T-2 toxin brojlercsirkék esetében okoz-e olyan mértékű és típusú sejtszintű DNS károsodást, amit comet assay módszerrel is vizsgálni lehet.
- ✓ Ezzel párhuzamosan vizsgálat tárgyát képezte, hogy a T-2 toxin dóziszfüggő módon egyre súlyosabb károsodást okoz-e és ezen károsodások milyen mértékűek.
- ✓ Vizsgáltuk továbbá, hogy a T-2 toxin okozta károsodások mértékét fokhagymaolaj adagolásával mérsékelni lehet-e, s ha igen, akkor milyen mértékben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Mikotoxinok a takarmányban

A mikotoxinok a gombák természetes termékei, melyek toxikus hatást váltanak ki magasabb rendű gerincesekben vagy más állatokban, ha azokat természetes úton felveszik (Bennett 1987). Ezek a toxinok a penészgombáknak a másodlagos anyagcseretermékei (Balogh *et al.* 2013). A másodlagos anyagcseretermékek (metabolitok) általában 1500 atomegységnél kisebb molekulatömegűek, specifikusak, kisebb-nagyobb rendszertani egységekre jellemzőek. Nem szükségesek a növekedéshez és az alapvető életfolyamatokhoz, de előnyt biztosítanak a környezetbe való beilleszkedéshez (http1, http2). Nem minden penészgomba termel mikotoxinokat, ilyenek az atotikus fajok. A toxinogén fajokat is megkülönböztetjük toxintermelés szempontjából (Balogh *et al.* 2013). A toxinok kémiaiilag eltérőek, azaz sokféle kémiai szerkezettel bírnak, stabilak, de különböző toxikológiai tulajdonsággal rendelkeznek, így hatásuk, kártételük és az okozott klinikai tünetük is szerteágazó (Weber *et al.* 2005, Horvatovich *et al.* 2013).

A penészgombák egy része a termőterületen (szántóföldi penészek), másik része a tárolás során (raktári penészek) fertőzhetik a takarmánynövényeket, a takarmány alapanyagokat és az alomanyagként felhasznált szalmákat (Mézes 2006). Ezáltal csökkentik a növényi eredetű takarmányok minőségét, tápláléértékét, ami negatív hatással van az azt fogyasztó gazdasági állatok egészségére, így teljesítőképességére. A penészgombák megjelenésével jellemzővé válik a takarmány visszautasítás, a táplálóanyagok emészthetőségének és felszívódásának csökkenése, a bélcsatorna gyulladásos folyamatai, az ellenálló-képesség csökkenése (Weber *et al.* 2005, Balogh *et al.* 2013). Az így kialakuló termelés-csökkenés lehet a mikotoxikózis egyik jele is (Balogh *et al.* 2013).

A raktárakban előforduló penészgombák, illetve azok mikotoxinjai jelentősen csökkentik a tárolt gabona táplálóanyag-tartalmát. Ez az egészségkárosító hatás mellett a másik jelentős kártételnek tekinthető (Dobolyi *et al.* 2011). A fentiek értelmében a mikotoxinok gazdasági kárt képesek eredményezni (Osselaere *et al.* 2013a).

Eddigi ismereteink szerint a mikotoxinok citotoxikusak, nephrotoxikusak, neurotoxikusak, karcinogének, mutagének, immunszuppresszívek és ösztrogénszerű hatásokkal is bírnak (Horvatovich *et al.* 2013).

A mikotoxinok általában kis mennyiségben fordulnak elő, önmagukban ritkán okoznak jól körül írható klinikai tüneteket (Wyatt 2005). Ám számos esetben okai emberi és állati betegségeknek, akár a halálnak is (Thompson – Wannemacher 1990). Több mikotoxin jelentős problémákat okozhat a toxikus hatásaik között jelentkező interakció révén (Wyatt 2005).

Ha mikotoxikózis veszélye áll fent, akkor tisztában kell lenni az állományban észlelt klinikai tünetekkel, a kórbonctani leletek eredményeivel, a szennyezett takarmány etetésének hosszával, termelési és szaporodásbiológiai adatokkal és az esetleges mikrobiológiai eredményekkel. A takarmányvizsgálat minden esetben olyan kiegészítő eszközt jelent, amely pontosíthatja, magyarázhatja a probléma meghatározását az egyéb adatokkal együtt. Ezen adatok birtokában lehet a mikotoxin, adott esetben a T-2 toxin oki szerepét felderíteni (Rafai – Kovács 2009).

A takarmányokban és élelmiszerekben található mikotoxin tartalom fetiszizálásának elkerülésének érdekében szakértőknek, gazdáknak és állatorvosoknak egyaránt tisztában kell lenni a határértékekkel és a mikotoxikózis kialakulásának előfeltételeivel. Mikotoxikózis kialakulására akkor lehet elsősorban számítani, ha az állatállománnyal etetett takarmányban egy vagy egy időben több mikotoxin is megtalálható a megfelelő koncentrációban. E mellett a szennyezett takarmányt kellően hosszú ideig etetik az adott mikotoxin(ok)ra érzékeny állatokkal. Természetesen fontos szem előtt tartani az egyedi és állomány szintű érzékenység lehetőségét és az etetés időtartamát.

Tekintettel a határérték koncentrációk kialakításának bizonytalanságaira, az ajánlásokban megfogalmazott értékeket nagyon kritikusan, fenntartásokkal kell kezelni (Rafai – Kovács 2009).

A határértékek kiemelt szerepet töltenek be az élelmiszer- és takarmánybiztonság témakörében. Az Európai Unióban már meghatároztak ajánlott maximális határértékeket élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozóan: aflatoxin B1 2 ppb, patulin 50 ppb, DON 1200 ppb, zearalenon 100 ppb, T-2 toxin 300 ppb (Weber *et al.* 2005). 2006-ban a takarmányok

mikotoxin szennyezettségére vonatkozóan az Európai Unió csak ajánlást tett közzé az 576/2006/EK rendeletben. (Mézes 2008). Az 574/2011/EK rendelet tartalmazza a takarmány alapanyagok és takarmányok maximális aflatoxin B₁ ajánlott tartalmát, amely például baromfinak szánt takarmánykeverék esetében 5 µg/kg (http12). Ezt követően a T-2 és a HT-2 gabonafélékben és gabonatermékekben való jelenlétéről 165/2013/EU rendeletben egy újabb ajánlást adott ki az Európai Bizottság. A T-2 és a HT-2 toxin együttes mennyiségét többek között a teljes értékű takarmányokban (macska kivételével) is meghatározták 250 µg/kg mennyiségben (http9).

Természetesen Magyarországon is történt állásfoglalás a mikotoxinokat érintően az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága által (Rafai – Mészáros 1998, Rafai – Kovács 2009). A takarmánykeverékekben és a takarmány alapanyagokban még megengedhető mikotoxin értékeket Magyarországon a 44/2003. (IV. 26.) FVM rendelet szabályozza (Rafai – Kovács 2009).

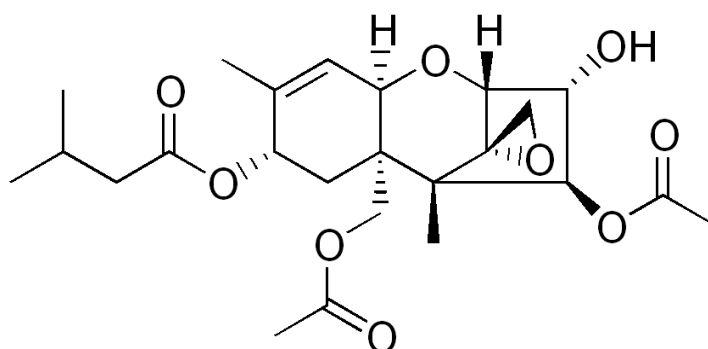
2.1.1. T-2 mikotoxin

A T-2 toxin (4 β, 15 diacetoxi – 8 α (3 metilbutiriloxi) 3 α hidroxil 12, 13 – epoxitrichitec – 9 - én) (1. kép) az A típusú trichotecénvázas vegyületek családjába tartozó mikotoxin többek között a dezoxinivalenol (DON) és a nivalenol mellett (Shokri *et al.* 2000, Weber *et al.* 2005, Somoskői *et al.* 2012, Zhuang *et al.* 2013). Ezekre a toxinokra, így a T-2 toxinra jellemző, hogy a 12,13 – epoxid gyűrű felelős elsődlegesen a toxicitásért (Varga – Tóth 2005).

A trichotecének jellemzően zsírolékony vegyületek, így könnyedén képesek bejutni a sejtbe (Somoskői *et al.* 2012). Gyakran és nagy mennyiségben találhatók meg gabonafélék magjában. Leginkább a mérsékelt égövön fellelhető *Fusarium* nemzetségbe tartozó nektrotróf polifág fitopatogén penészgombák (elsősorban az *F. sporotrichoides*, *F. poae* és *F. graminearum*) termelik a T-2 toxint (Somoskői *et al.* 2012, Balogh *et al.* 2013).

Ezek a penészgomba fajok a szántóföldön, de a tárolás során is szennyezhetik a gabonát. A toxinjaik többsége pedig ellenáll a hagyományos élelmiszer- és takarmány-előállítási folyamatok során alkalmazott kezeléseknek, így azok jelenléte kimutatható az állati takarmányokban és akár alapvető emberi élelmiszerekben is (Somoskői *et al.* 2012).

1. kép: A T-2 toxin szerkezete (http11)



Általánosságban elmondható, hogy a toxin egy része érintetlenül áthalad a bélcsövön, majd a bélsárral kiürül a szervezetből. A felszívódás elsősorban a vékonybélből történik, majd a portális keringéssel a májba jut. Onnan részben metabolizálódva az epén át visszajuthat a bélcsőbe vagy a vérkeringésbe jut. A vérkeringés által az izmokba, tejbe, tojásba kerülhet, illetve a vizeletbe a vesén keresztül (Balogh *et al.* 2013).

A T-2 toxin a legtoxikusabbnak ítélt trichotecénvázas mikotoxin, kiemelendő az akut toxikussága (Hafner *et al.* 2011, Osselaere *et al.* 2013b). A Nemzeti Rákkutató Ügynökég (IARC) 3-as kategóriába sorolta a T-2 mikotoxint, e szerint humán karcinogenitás szempontjából nem besorolható anyag (http8). Különböző állatfajokat tekintve a baromfik kevésbé érzékenyeknek mondhatóak a trichotecénnel szemben (Frankič *et al.* 2006).

Hazánkban legjellemzőbben tömeg- és abrakakarmányoknál a *Fusarium* gombák által termelt mikotoxinok közül a DON mellett a T-2 toxin jelent problémát (Mézes 2006).

2.1.1.1. A T-2 toxin hatásai

A toxinnak számos káros hatása került eddig kimutatásra. Ezek között megemlíthető az apoptózis-indukció, a sejtek növekedésének gátlása, a fehérjeszintézis gátlása, az immunsuppresszió, valamint a szaporodásbiológiai zavarok, szabadgyökképződés fokozása (Chen *et al.* 2008, Horvatovich *et al.* 2013, Zhuang *et al.* 2013). Foetotoxikus, képes áthatolni a placentán, így a fejlődő magzatot is károsíthatja, gátolja a korai fejlődését, így korai elhaláshoz vagy rejtett embriófelszívódáshoz vezet.

T-2 toxinnal szennyezett gabona fogyasztása után hányást, hasmenést és bőrirritációt figyeltek meg mind haszonállatokon, mind embereken (Horvatovich *et al.* 2013, Zhuang *et al.* 2013).

Egereken végzett vizsgálat kimutatta, hogy a toxin a *thymus* sorvadását, az idegrendszer fejlődésének visszamaradását, a csontosodás részleges hiányát, valamint egyes csontok hiányát idézi elő a magzatokban (Nelson *et al.* 1994, Somoskői *et al.* 2012).

Mint trichotecén vázas vegyület zsiroldékony, könnyen bejut a sejtbe, majd peptidil-transzferázhoz kötődik (Somoskői *et al.* 2012, Somoskői *et al.* 2014). Kimondottan nagy affinitást mutat a transzpeptidázokkal szemben, melyek a riboszóma egyik fontos alegységét alkotják. Így gátolja a fehérje-, közvetve pedig a DNS- és az RNS-szintézist (Thompson – Wannemacher 1990, Somoskői *et al.* 2012, Zhuang *et al.* 2013, Somoskői *et al.* 2014). Ám a genotoxikus voltát még teljes egészében nem igazolták, illetve kérdéses, hogy hogyan is képes DNS károsodást okozni (Frankič *et al.* 2006, Hafner *et al.* 2012, Horvatovich *et al.* 2013).

A T-2 toxinnal szennyezett takarmány etetés után Frankič és munkatársai (2006) szignifikáns különbséget mértek üstökös farkában található DNS %-kal kapcsolatban a kontroll és a kísérleti csoport között broiler csirkéknél. Ezt megelőzve már napvilágot látott az az eredmény is, miszerint a T-2 patkányokban (májukat vizsgálva) is okoz DNS károsodást (Rizzo *et al.* 1998).

Sertés limfocitákon végzett kísérletben a T-2 mikotoxin a 1 μM mennyiség esetében a 4-es kategóriába tartozó üstökösöket produált 24 óra elteltével. A 42. órát követően már a 0,1 μM koncentrációban is szignifikáns eredményeket produkált a kontroll állatok értékeihez viszonyítva. Minden esetben a dózis és az idő is meghatározó tényezőnek bizonyult, köztük lévő kapcsolat is szignifikáns volt (Horvatovich *et al.* 2013).

Egyéb kutatások szerint a T-2 toxin kártétele több módon történhet: kromoszóma aberráció, mikronukleusz-, illetve testvérkromatida-csere, nem tervezett DNS szintézis, kromoszóma száltörés, DNS-addukt képződése által (Hafner *et al.* 2011).

Tengerimalacokon meghatározott szubkután LD50 érték 1-2 mg/kg, inhalációs LC50 érték pedig 5749 mg min/m³. Megállapításra került az orális LD50 érték is: 3,06 mg/kg (Marrs *et al.* 1986).

Baknyulak esetében a T-2 0,1 és 0,2 mg/állat/nap dózisban átmeneti csökkentette a takarmányfelvételt, a csoportok közötti különbség a 4. hétre szűnt meg. Mindkét csoportban a

spermaminőségben következett be változás, főként az abnormális sejtek száma növekedett meg szignifikánsan. A már 0,1 mg T-2 toxinnal kezelt csoportnál enyhe *hyperplasia* volt megfigyelhető a Leydig-sejtekben. A 4 mg/állat/nap T-2 kezelés már a 2. napra drasztikusan csökkentette a takarmányfelvételt és ez a tendencia a toxin megvonását követően két hétig állt fenn. Ebben a csoportban lévő állatok testsúlya és spermiumainak motilitása is elmaradt a kontroll állatokéhoz viszonyítva (Rajli *et al.* 2011).

Többek között nyúlfiókákban is végeztek DNS károsodás mérésére irányuló kísérletet, amely 21 napig tartott. A kapott üstökösök képét 5 különálló kategóriába osztották. A 2 mg/kg T-2-t fogyasztott csoportban a legtöbb üstökös az 1-es kategóriába tartozott, de a skála további kategóriájába tartozó üstökösöket is megfigyeltek. Tehát már ez a mennyiség is szignifikáns különbséget mutatott a kontroll csoporthoz képest, ami a nyulak érzékenységét bizonyítja a T-2 toxinnal szemben (Hafner *et al.* 2012).

Patkányokon zajlott kísérletben a T-2 toxin szubletálisnak (0,75 mg/kg) tekintett mennyisége 9 órán belül minimum 50%-al csökkentette a patkányok 6 különböző szövetében a fehérje szintézisét. Az szennyezett takarmány etetése után vizsgálták a szövetek regenerálódását. Azt tapasztalták, hogy legrosszabban az izom és a szívizom regenerálódott 9 óra intervallum alatt, míg szembetűnő javulást a vese mutatott.

A DNS szintézis gátlás kapcsán is hasonló tendenciákat mutattak ki, bár a szövetek között nagyobb variancia volt kimutatható a fehérjeszintézis gátlásához viszonyítva. Alacsony toxin szint etetése után 9 órán belül a kontrollhoz hasonló DNS szintézis szintet lehetett kimutatni több szervnél is, tehát a regenerálódás gyorsnak mondható a fehérjékhez képest. (Thompson – Wannemacher 1990). Egérembriók esetében már 1 ng/ml mennyiség csökkenti a zigóták fejlődését, 2,5 ng/ml felett pedig a zigóták 2-sejtes állapotban rekednek meg 24 órán belül, valószínűsíthetően a mikrotubulusok felépülésének gátlásán keresztül. A mitokondriumok eloszlását a mikotoxin megváltoztatta, de a mitokondriumok aktivitása nem tért el a kontrollhoz viszonyítva. A fejlődésükben megrekedt embriókban kaspáz-3 felszabadulást detektáltak, ami apoptózis indukcióra enged következtetni (Somosköi *et al.* 2013, Somosköi *et al.* 2014).

Humán porcsejteken kísérletezve megállapították, hogy a T-2 apoptózis indukálása nagymértékű, a folyamat során több fehérjét, faktort is befolyásol, mint például a Fas fehérjét, Bcl-xL és Bax faktorokat (Chen *et al.* 2008). Egyéb *in vitro* vizsgálatok során is bebizonyosodott a toxin kaspáz-3 aktivitásának serkentése, így a T-2 toxin apoptózis indukáló hatása jobban valószínűsíthető, mint a nekrozis (Zhuang *et al.* 2013).

A spermiumokra, azok életképességére és motilitására is hat. Sertések esetében 10 μ M mennyiség felett okozhatja ezen paraméterek csökkenését (Somoskői *et al.* 2014).

A T-2 toxin képes csökkenteni az egyes gyógykezelések hatását, így fejtve ki közvetett negatív hatást (Rafai – Kovács 2009).

A T-2 mikotoxin dózisának emelésével citotoxicitása is nő, illetve az idő függvényében is nő a sejtek mortalitása. 8 óra elteltével szignifikáns elváltozásokat tapasztaltak. A Hela, Bel-7402, és Chang májsejteken megállapították LC 50 értékét, ami Hela sejteken 357 ng/ml, Bel-7402 sejteken 63 ng/ml és a Chang májsejtek esetében 412 ng/ml (Zhuang *et al.* 2013).

Az egyik legrégebben ismert tulajdonsága a lipidperoxidáció fokozása, illetve az okozott oxidatív stressz által kiváltott programozott sejthalál indukálása (Somoskői *et al.* 2012). A T-2 toxin a glutation szintet csökkenti, míg a reaktív oxigénformák mennyiségét növeli, mely tényezők szorosan összekapcsolódnak az oxidatív stressz, majd az apoptózis kialakulásával (Zhuang *et al.* 2013).

A 21 napos T-2 toxinnal történő etetés után a GSH (glutation) szint mind a vérplazmában, mind vörösvérsejt-hemolizátumban szignifikáns változást mutatott az alacsonyabb és magasabb toxin koncentráció mellett (Weber *et al.* 2009).

In vitro körülmények között kimutatták a toxin időfüggő hatását, miszerint a kontroll csoporthoz képest már 12 óra után szignifikánsan csökkentette a GSH szintjét és idővel a változás egyre nagyobb csökkenését tudták detektálni. Hasonló tendencia mutatkozott a malondialdehid (MDA) vizsgálatok is (Zhuang *et al.* 2013). Az MDA a lipidperoxidáció terméke, mely szintje megnövekszik, ha a sejtek oxidatív stressznek vannak kitéve (Mézies – Matkovics 1986).

Mindhárom sejtvonal vizsgálatok (Hela, Bel-7402 és Chang májsejtek) az idő függvényében a T-2 toxin egyre növelte az MDA mennyiségét. E toxin a JunD fehérje (az antioxidáns rendszer fontos tagja) szintjét is befolyásolja, így teszi a sejteket még sérülékenyebbé az oxidatív stresszel szemben (Zhuang *et al.* 2013).

A granulocitákra, monocitákra és eritrocitákra is kártékonyak tekintik a T-2 toxint, mint trichotecénes vegyületet (Shokri *et al.* 2000).

Az immunszuppresszív hatását kimutatták már *in vitro* és *in vivo* körülmények között is (Thompson – Wannemacher 1990). A trichotecénvázas mikotoxinok, így a T-2 is

fogékonytá teszi a betegségekkel szemben az embereket és az állatokat egyaránt. A T-2 toxinnal kezelt egerek fertőzésekkel szemben érzékenyebbek a kontroll állatokhoz viszonyítva (Tai – Pestka 1990). Ezen toxin tyúkok immunrendszerére is negatív hatással van, mivel egyebek mellett a csecsemőmirigy és a Bursa Fabricii sorvadását okozza (Marrs *et al.* 1986). Broiler csirkéknél kimutatták, hogy a T-2 toxin a T és B sejtek megjelenését csökkenti (Frankič *et al.* 2006).

A toxin negatív hatásaihoz tartozik még a májban lezajló normál metabolizmus megzavarása és a citokróm P450 enzimsalád egyes tagjának expressziójának gátlása vagy pont túlszabályozása. Ezen paramétereket egereken, patkányokon és malacokon tesztelték. Ezeken felül a multidrog rezisztens fehérjéket is alulszabályozza az mRNS expresszióján keresztül, ezt elsősorban májban mutatták ki. Hasonló eredményekről lehet beszámolni broiler csirkék májainak vizsgálatakor is. A citokróm P450 enzimsalád több tagjának mRNS expressziójának alulszabályozását mutatták ki (CYP1A4, CYP1A5 ,CYP3A37) májban. (Osselaere *et al.* 2013b).

A T-2 toxin emberekben alimentáris toxikus aleukiát okoz, ami hatással van többek között az immunrendszerre is. A toxin csökkenti az ellenanyag termelését, a T-limfocita számot és a nyirokszövetek súlyát. Ezen negatív folyamatok hátterében is az apoptózis, azaz a programozott sejthalál áll, ami fontos szerepet tölt be az immunrendszer és a homeosztázis fenntartásában (Joffe 1983).

Broiler csirkéknél a toxinnal szennyezett takarmány hatására lecsökkent a takarmány fogyasztása és a testtömeg gyarapodásuk sem érte el a kontroll csoportét, ezáltal komoly gazdasági kárt képes okozni (Osselaere *et al.* 2013b). A patológiás elváltozások közül leggyakrabban vérzéses és gyulladásos tüneteket lehet tapasztalni a broilerek vékonybelében, illetve a szájüregben és nyelven léziók jelentkeznek (Weber *et al.* 2009; Osselaere *et al.* 2013a). T-2 toxinnal való krónikus kitettség negatívan befolyásolja a tojástermelést, így növelve a kialakuló gazdasági károkat (Diaz *et al.* 1994). Kakasokkal folytatott vizsgálat során is kimutatták a DNS töredezettségét a T-2 toxin 17 napig tartó etetését követően (Hafner *et al.* 2012).

Az általánosan elfogadott NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, azaz a legnagyobb, káros hatással még nem rendelkező dózis) baromfi esetében 0,5 mg T-2 toxin/takarmány kg (Osselaere *et al.* 2013b). Csirkéknél megállapított LD₅₀ értéke 5 mg/kg

takarmány (Balogh *et al.* 2013). Összehasonlítva más állatfajokkal, elmondható, hogy a baromfi fajok kevésbé érzékenyek a mikotoxinokkal szemben.

Toxikokinetikai vizsgálatok kimutatták broiler csirkéken, hogy a T-2 toxin gyors eliminációs idővel bír ($3,9 \pm 0,98$ perc), illetve, hogy igazán gyorsan metabolizálódik és a kialakuló metabolitjai sokkal polárisabbak, mint maga a toxin (Osselaere *et al.* 2013a).

2.2. A DNS károsodás

A DNS (dezoxiribonukleinsav) nukleobázisokból (adenin, citozin, guanin, timin), cukorból (dezoxiribóz) és foszfátcsoportból áll. A DNS-molekula genetikai információját a bázisok sorrendje hordozza, míg a cukor- és foszfátrész strukturális szerepet tölt be. A DNS feladata nemcsak a genetikai információ tárolása, majd átadása, hanem a róla készült RNS másolásának irányítása a transzkripció során. A messenger (hírvivő) RNS (ribonukleinsav) a fehérjeszintézishez szükséges információt adja tovább. A DNS károsodása tehát nagymértékben befolyásolja a sejt vagy épp az egész szervezet életét (Bálint 2000a).

A DNS bár stabil, de külső hatásokra mégis változik. Ezen változások hatással lehetnek többek között a bázisokra és a cukor – foszfát gerincre (Bálint 2000b). Mutációnak nevezzük a sejt örökítőanyagának a tartós megváltozását. E változás létrejöhet spontán módon, környezeti hatásra, DNS-javító mechanizmusok hibás működése miatt vagy öröklöttek is lehetnek (http5). A spontán mutációk bekövetkezése véletlenszerű, gyakorisága alacsony, általa nő a genetikai változékonyság, a mutánsok némelyike túlélheti a változó környezeti feltételeket, így biztosítva a faj fennmaradását. Ám letális mutáció esetén a homozigóta élőlény életét veszti. Indukált mutációk esetében a kiváltó tényező lehet kémiai, fizikai vagy biológiai. Ezen tényezők jó része megtalálható a környezetben: UV sugárzás, gomba és növény anyagszere – melléktermék, mesterséges mutagén, például a vinil – klorid vagy a szafrol (Szabad 2006a).

A testidegen kémiai anyagokat mutagén hatásuk alapján két csoportba oszthatjuk. Egyik csoportjuk a primér mutagének, tehát közvetlenül hatóak. A másik csoport a szekundér mutagéneké, ezek másodlagosan, a szervezetben végbemenő metabolizáció után válnak mutagénné. A mutagén vegyületeket aszerint is lehet csoportokra osztani, hogy közvetlen vagy közvetlenül, azaz közvetetten hatnak a DNS-re.

A mutációkat különféle módon különíthetjük el. Beszélhetünk gametikus mutációról, amely csak az ivarsejtekben okoz károsodást, utódoknak továbbadódnak a rendellenességek vagy szomatikus mutációról, mely során az egyed testi sejtjeiben jön létre változás, ami nem hat ki az utódokra.

Attól függően, hogy az öröklődési anyag milyen szinten változik meg, beszélhetünk genom-, kromoszóma-, gén-, pont-, és plazmonmutációról.

A szerkezeti kromoszóma-aberráció létrejöhet törés, kicserélődés, áthelyeződés, gyűrűképződés révén és jelentkezik a kromoszóma egyik vagy mindkét karján (Lehel – Laczay 2011). A DNS – fonalak téves párosodása úgynevezett extrahelikális hurkok képződéséhez vezethet, melyek az egyik fonál törése nyomán jönnek létre. Ezen párosodás replikációkor olyan kettős spirális keletkezését eredményezi, amelyek egyikéből egy vagy néhány bázispár hiányzik, azaz deléció alakul ki. A másikba pedig egy vagy több bázispár ékelődhet be, tehát addíció alakul ki. Ezen változások következtében a genetikai információ sorrendje tolódik el (Szabad 2006a). Az egyszálú DNS – hiba bekövetkezhet továbbá bázis oxidáció, alkiláció vagy épp bázisok összekapcsolódásával. A kettősszálú DNS törése instabil szabad DNS-végek képződését okozhatja, ami eredményeként a sejtciklus megállhat, apoptózis mehet végbe vagy hibajavítás következik be (Gervai 2012).

A DNS – törésének számos következménye lehet. Ilyen az inverziók megjelenése, azaz a bázisok hosszabb szekvenciája megfordul. Transzlokáció esetében egyes DNS – szakaszok helyeződnek át tetszőleges helyekre. A reciprok transzlokációk során a kromoszómakészlet kölcsönösen kicserélődik. Az említett változások nem feltétlenül járnak az örökítő anyag mennyiségi változásával. Mennyiségi változást többek között a duplikáció (meglevő hosszabb szekvenciákkal történő bővülés) alkalmával történnek (Szabad 2006a). A számbeli változás többféle lehet. A meiotikus non – disjunctio (szét nem válás) során a normál garnitúra (euploid, $2n$) megsokszorozódhat (poliploidia, $3n$, $4n$), a mitotikus non – disjunctio esetében a garnitúra kromoszómaállománya csak néhány darabbal csökkenhet, illetve növekedhet (aneuploid, $2n+1$, $2n-1$) (Lehel – Laczay 2011, Szabad 2006a).

Az egyik DNS – fonal adenin bázisai a komplementer szál timin bázisaival, a guanin bázisok pedig a citozin bázisokkal párosodnak. Ritkán, kis időre a bázisok tautomer átrendeződésen mehetnek át. Ennek során az adenin és citozin imino, a guanin és timin enol formává alakul át. Abban az esetben, ha a tautomer átrendeződés épp replikációkor történik, szokatlan bázispárok (*mismatch* - párok) jönnek létre. Ha nem kerülnek kijavításra, akkor egy újabb replikáció következtében bázispárcsere történik (Szabad 2006a). A DNS – láncban egymás mellett lévő timidek között egy ciklobutilgyűrű által timin dimerek alakulhatnak ki,

melyek torzítják a DNS – struktúráját. A citozinok között és a citozin – timin párok között is létrejöhetnek dimerek, ám kisebb gyakorisággal. A torzító hatás végett a DNS replikációra alkalmatlanná válik. Az adenin és citozin módosulhat, dezaminálódhat akár spontán módon is. Külső hatásra a bázisok gyűrűje felnyílhat, mely változás megváltoztatja vagy megszünteti a nukleobázisok eredeti tulajdonságát. A téves bázispárosodás replikációs hiba miatt vagy abban az esetben jelentkezik, ha rekombináció során olyan DNS – darabok kerülnek egymással szembe, melyek nem mutatnak komplementaritást (Bálint 2000b).

A báziscserének a DNS – ben tárolt információ tartalmát, jelentését változtatják meg. Eredménye lehet a néma mutáció, mely nem jár következménnyel, mivel a genetikai kód degenerált. A halk mutáció során a báziscsere eredményeképp a fehérje valamely aminosava helyére egy azonos jellegű épül be. Általában a halk mutációk nem befolyásolják nagy mértékben a fehérjék funkcióját. A téves mutációk esetében a bázispárcsere olyan aminosavcserével jár, amely már jelentősen befolyásolja az adott fehérje funkcióját. Az értelmetlen mutáció egy aminosavkodont a három terminális kodon valamelyikére cseréli, ezáltal fehérjeszintézis hamarabb fejeződik be, rövidebb fehérjék alakulnak ki, így a fehérjék funkciójukat veszítik. Ennek ellentéte a lánchosszabbító mutáció, amely valamelyik STOP kódot értelmes, aminosavat kódoló kóddá változtatják, így a megszokotthoz képest hosszabb fehérjék jönnek létre. Ezek funkciójukat veszítik vagy csak minimálisan képesek feladatukat elvégezni.

A kereszteltolódással kapcsolatos mutációk következtében a szokásosnál rövidebb vagy hosszabb fehérjék képződnek. A pontmutációk esetében, mely mutáció az örökítő anyag kis, pontszerű részét érinti, a hatása egyetlen génre terjed ki. Ez az örökítő anyag minőségi változását hozza magával, míg a kromoszómamutációk örökítő anyag mennyiségi változást hoz (Szabad 2006a).

2.2.1. DNS-hibák javítása

A különféle DNS – sérülésnek ki kell javítódnia, hiszen a genetikai információ integritása függ tőle. A DNS hibajavítása természetesen sokféle módon mehet végbe, hibamentesen vagy hibára hajlamos módon. A pirimidin dimerek monomerekké történő helyreállítását a DNS – fotoliáz enzim végzi. A dimert széthasítja, majd a képződött pirimidinanion redukálódik és a DNS felszabadul. Ebben az esetben egy hibát tartalmazó

oligonukleotid kivágódik a DNS –ből endonukleáz segítségével. A módosult bázisú DNS kivágás révén javítódik, amiben a glikoziláz enzimnek van szerepe. (Bálint 2000b). Reparáció során a DNS – hibák enzimatis úton kerülnek kijavításra. A nukleotidok kivágása is egy lehetőség a hibajavításra, ezt nukleotidkivágásos reparációnak nevezik. Kivágás történhet timindimerek, szokatlan bázispárok előfordulásakor. Ezen esetekben az ép szál alapján történik a nukleotidok eredeti sorrendjének helyreállítása. Hibamentes javítás még a bázist kivágó javítás, illetve a rosszul párosodott DNS – ek javítása (Gervai 2012). A rekombinációs javításkor a már replikálódott komplementer DNS – szál válik mintává az eredeti DNS – szekvencia helyreállításában. Reverzió következtében is visszaállhat a normál állapot. Minden esetben egy második mutáció következik be. A szupresszor mutációk szintén második mutációk, helyreállítják az eredeti fenotípust vagy csökkentik a mutáns erősségét. Minél közelebb következik be a szupresszor mutáció, annál hatékonyabb lesz a helyreállítás foka (Szabad 2006a).

Több elmélet látott napvilágra a daganatképződés okairól. Egyik legrégebbi elmélet Cohnheim nevéhez fűződik, aki a daganatokat az embrionális fejlődés során fel nem használt, sejtek sarjadásából származtatta. A Virchow-féle irritációs elmélet szerint a daganatok keletkezését a hosszabb ideig tartó ingerek szövetizgató hatása okozza. A mai korszerű ismereteink szerint a sejtek rákos sejtekké válása döntően szomatikus mutációk miatt történik. Az egytalálatos elmélet szerint a daganatképződés a szomatikus mutáció „minden vagy semmi” típusú eseménye. A többtalálatos elmélet a daganat kialakulását mindig több változás eredményének tekinti, mely folyamatban az onkogén és szupresszor géneknek meghatározó szerepe van (Lehel – Laczay 2011). Vannak elképzelések, miszerint a mutagén anyagok 60-70%-a, mások szerint az összes mutagén egyben karcinogén is (Lehel – Laczay 2011, Szabad 2006b). Tény, hogy a daganatképződés alapjai a DNS – ben rejlenek, a benne kialakult mutációkban, ezáltal a sejt-kommunikáció és sejtosztódás szabályozás károsodik. Az eddigi megfigyelések bebizonyították a daganatok klonális eredetét, vagyis az adott daganat összes sejtje egyetlen sejt leszármazottja. Természetesen egy daganat kialakulásához egymás után több (3-7 darab) esemény szükséges. Ennek következtében a mutagén hatástól nem elválasztható a karcinogén hatás, egy potenciálisan mutagén anyag daganatképződés folyamatot is elindíthat, mivel a DNS szinten károsít (Szabad 2006b).

2.2.2. DNS károsító hatásokat vizsgáló módszerek

Számos módszer áll rendelkezésre a technika mai állása szerint a DNS károsodás különböző szintű vizsgálatára:

- ✓ A PCR (polimeráz láncreakció) az egyik legmegbízhatóbb technika a DNS károsodás meghatározásában. E technika nagyon érzékeny és könnyen mérhetőek a génspecifikus DNS károsodások. Ám befolyásoló tényezőként kell megemlíteni a templát kezdeti mennyiségét.
- ✓ Emellett a RIA (radio immuno assay) és
- ✓ az ELISA módszer is használható a DNS károsodásának mérésére.
- ✓ A halo assay segítségével egyedülálló sejtek vizsgálhatók és nincs szükség radioaktív jelölésre, ám fluoreszkáló festéket használnak. Korlátai az érzékenységében keresendők (Kumari *et al.* 2008).
- ✓ A tunel assay által apoptózis, egy- és kétszálú DNS töréseket detektálhatóak (Migheli *et al.* 1995). A vizsgálat során a DNS szabad végeit határozzák meg. A módszer érzékenysége és specifikussága jelenti a korlátokat (Kumari *et al.* 2008). A DNS töredezése nem csak apoptózis, hanem autolízis és nekrozis alkalmával is előfordul, ám a tunel módszer nem képes megkülönböztetni a sejthalál különböző típusait (Grasl Kraupp *et al.* 1995).
- ✓ Az áramlási citometriát (flow cytometry) ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki, mely az apoptózis detektálására nagy mennyiségű sejtet képes vizsgálni és egy időben a DNS állapotát is feltérképezi (Kumari *et al.* 2008).
- ✓ A HPLC-MS módszer specifikus és érzékeny technikának mondható, a dimerek kimutatására is van lehetőség.
- ✓ A GC-MS gyakran használt módszer, mivel képes széles körű DNS terméket detektálni. Hátránya a túlbecslés.
- ✓ A FISH (fluoreszcens in situ hibridizáció) nem izotópos módszer. A vizsgált DNS szakasz relatív helyét, illetve lemásolódását képes vizsgálni a kromoszómában.

(Murthy - Demetrick 2006). E technika használatával vizualizálhatóak és becsülhetőek a DNS károsodásai sejtenként.

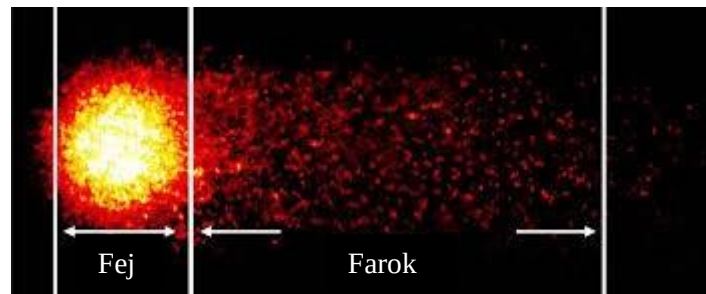
- ✓ A comet assay (üstökös módszer) kimondottan széleskörben használt módszer, mivel sokféle sejttípuson elvégezhető. Elsősorban egy – és kétszálú DNS törés és oxidatív károsodás mutatható ki általa egyetlen különálló sejtben. A comet, azaz az üstökös feje gömb alakú, a farok pedig a fejből származó sérült DNS. A módszer kivitelezése nagy precizitást igényel.
- ✓ Az immunoslot-blot assay nagyon kis mennyiségű DNS vizsgálatára alkalmas, nagyon érzékeny és specifikusnak is mondható.
- ✓ Az immuno-dot-blot assay különböző izomereket képes meghatározni emlős sejtekből.
- ✓ Az immunohisztokémiai módszer *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is alkalmazható. Az immunohisztokémiai módszer a FISH módszerrel kiválóan kombinálható.
- ✓ Az elektrokémiai módszer érzékeny, szelektív, alacsony költségű, kis mennyiségű DNS elegendő, minimizált eszköz igényű, mellyel DNS károsodást lehet vizsgálni. A citozin és a guanin a higany elektródán redukálódik, míg a guanin és az adenin szén és más szilárd elektródán oxidálódik. Ezek jelei változnak, ha a DNS szerkezetében is változás következik be (Kumari *et al.* 2008).

2.2.2.1. A comet módszer

A comet assay (módszer), más néven egyetlen sejt gélelektroforézis (SCGE) technika segítségével egy sejtben bekövetkező DNS károsodás detektálható és így megbecsülhető a károsodás eloszlása a sejtpopulációban (Kent *et al.* 1995, Augustyniak *et al.* 2014). Segítségével a környezetben jelen lévő genotoxikus anyagokra is fényt lehet deríteni, ám az ökotoxikológiában ritkán használt módszernek számít (Azqueta *et al.* 2009).

Ezt a mennyiségi meghatározásra alkalmas, közvetlen DNS károsodás becslési módszert a nyolcvanas évek végén, 1988-ban fejlesztették ki. A comet, azaz az üstökös feje gömb alakú, a farok (csóva) pedig a fejből származó sérült DNS, amit a 2. kép szemléltet (Kent *et al.* 1995, Augustyniak *et al.* 2014).

2. kép: A comet részei (http10)



Az ép DNS esetében csupán az üstökös fej részét vehetjük észre, pontszerű marad. Az egyre nagyobb károsodást szenvedett sejt DNS állománya már különböző üstökösöket produkál, mivel a fej része egyre kisebb, míg a csóva régió egyre nagyobb lesz, ami a töredezett DNS darabokból áll (Olive 1989, Gedik *et al.* 1992, Tice *et al.* 2000). Tehát a DNS töredezettségére fényt derít e módszer, de nem kapunk információt a DNS károsodás kialakulásnak háttérében lévő mechanizmusról (Horvatovich *et al.* 2013).

A comet módszer jól elkülöníthető lépésekre osztható:

- A módszer elvének alapja a sejtek agaróz gélbe való ágyazása. A minta agarózzal keveredik, majd két réteg agaróz közé ágyazódik be egy tárgylemezen.
- Ezután a sejtek lizálása következik. A lízis során a DNS-ről leemésződik a sejtfehérje. A lízis oldatból való kivétel már sötét szobában megy végbe, ahol a vörös fény engedélyezett.
- A lízist követi a kicsavarodás fázis, amely elektroforézis oldatban megy végbe.
- Az így kapott DNS az elektroforézisen esik át, mely során méretbeli különbségekből adódóan a DNS töredékek az anód felé vándorolnak. A vizsgálat során betartandó várakozási idők a mintától függően változhatnak, de az elektroforézis beállítás értékei mindig ugyanazok: 25 V és 300 mA, ideje 20 perc. A lízis, majd az elektroforézis lépése is lúgos körülmények között zajlik.
- Az elektroforézis befejeztével a semlegesítő oldattal történő átöblítés következik a lúgos körülmények megszüntetése végett.

- A megszárított és/vagy felszálló alkoholsorban (etanolban vagy metanolban) tartósított lemezeket valamilyen fluoreszcens festékkel festik. Leggyakoribb az etidium-bromid használata, de használható még SYBR zöld, YoYo festék vagy propidium jodid.

A fluoreszcens mikroszkóp segítségével láthatóvá válnak az üstökösök. Általában 200-400-szoros nagyítást érdemes használni, de ennek nagyságát befolyásolja többek között a sejtek típusa és a használt mikroszkóp is (Olive 1989, Gedik *et al.* 1992, Tice *et al.* 2000). Az így kapott üstökös képek kiértékelése történhet szubjektíven, azaz vizuálisan, avagy objektíven számítógépes megoldással. Általában 4 vagy 5 kategóriát alakítanak ki és ezekbe sorolják az adott üstökösöket az elvándorlás hossza és/vagy az üstökös csóva részében lévő DNS relatív aránya alapján (Hafner *et al.* 2012, Horvatovich *et al.* 2013).

A vizuális analízis gyorsnak mondható és nem igényel számítógépes, illetve szoftveres háttérrel, de ennek kivitelezése nagy gyakorlatot kíván (Kobayashi *et al.* 1995;). Ha a kiértékelés szoftveres úton történik, akkor több paraméter mérésére van lehetőség, mint a csóva százalékos DNS tartalma (az elvándorolt DNS százalékos hányada a sejtmagtól), a csóva hossza (a fej és az utolsó fragment távolsága), a csóva erőssége (a csóva hossz x a csóva DNS %-ával) a (http7).

Gyors, egyszerű és uniformizált rendszer. Megtalálhatóak olyan programok, amelyekbe beolvasható az adott kép, majd manuálisan kerülnek kijelölésre az üstökösök és a paraméterek számítását már a program végzi el. Ilyen a CometScore program is (Miskolczi 2007). Kidolgoztak már teljesen automatizált módszert is az üstökösök értékelésére (Böcker *et al.* 1999).

A módszer kifejlesztése és tökéletesítése kellő utat járt be ahhoz, hogy napjainkban széleskörben használatos lehessen (Olive 1989, Frankič *et al.* 2006, Dhawan *et al.* 2009, Horvatovich *et al.* 2013). Főképp egy- és kétszálú törések, illetve oxidatív DNS károsodás esetén alkalmazható. E módszer felhasználása széleskörű, mivel a toxikológiában, a molekuláris járványtanban, a takarmányozás-élettanban és az orvostudományban egyaránt alkalmazható. Nagyszerűen alkalmazható élőhelyek állapotának felmérésében, különböző környezeti szennyezések hatásának nyomon követésére. Eukarióta, de akár prokarióta szervezeten is kivitelezhető vizsgálat.

A következő előnyeit érdemes kiemelni:

- ✓ rugalmas módszer,
- ✓ viszonylag rövid idő alatt kivitelezhető,
- ✓ relatív alacsony költségű,
- ✓ mintánként alacsony sejtszám szükséges,
- ✓ kismértékű DNS károsodás is jól kimutatható,
- ✓ az elkészült tárgylemezeket lévő minta jól tartósítható.
- ✓ Ezek mellett fontos szempont, hogy nem igényel sok, bonyolult műszert (pH mérő mellett csak egy gél elektroforézis készülékre és egy fluoreszcens mikroszkópra van szükség).

Természetesen hátrányokkal is rendelkezik, melyeket fontos a vizsgálat kivitelezése előtt átgondolni:

- ✓ Több oldatot is el kell frissen készíteni, néhánynak a pH értékét is be kell állítani.
- ✓ Nagyfokú precizitást igényel.
- ✓ Mivel a tárgylemezre három különböző agaróz réteg kerül - melyeket külön-külön tárgylemezzel fednek, majd fagyos felületre helyeznek -, így fennáll a gélek szakadása, lefolyása, elvizesedése.
- ✓ Az agaróz gél nem egyenletes felszíne is problémát jelenthet a továbbiakban. Különböző tárgylemezek használhatóak a különböző minták kivitelezésénél e probléma megjelenésének csökkentésére (Klaude *et al.* 1996).
- ✓ Több munkafolyamatnál időkorlátot kell betartani. Ezek nem helyes betartása is befolyásoló tényezővé válhat.
- ✓ Ki kell emelni a sejtek koncentrációját.
 - Ha túl magas - azaz a látómezőben nem lehet tisztán elkülöníteni az üstökösöket -, akkor a lizálás nem lesz egységes és egyenletes, illetve a kiértékelés lehetetlenné válik.
- ✓ Az agaróz koncentrációja is számít, mivel a DNS migrációt befolyásolja.

2.3. A fokhagyma

A fokhagyma (*Allium sativum* L.) régóta ismert és fogyasztott hagymafaj. Őshazája Közép- és Nyugat-Ázsia. Már az ókori népek, illetve az indiaiak és kínaiak is termesztették, fogyasztották, sőt gyógyszerként is alkalmazták (Szabó 2002, Laczkó 2005). Termesztési múltja 5000 év.

Hazánkban is jól ismert és a magyar konyhában nélkülözhetetlen e zöldségnövény. Hazánkban először Lippay írta le termesztését 1664-ben. A hazai éghajlati és időjárási viszonyok kedveznek a fokhagyma termesztésének. Két változata terjedt el leginkább: *A. sativum* convar. *sativum* és az *A. sativum* convar. *ophioscordon*. A fokhagyma hagymái gerezdekből álló, összetett hagymafej (Szabó 2002).

Táplálkozási értékét magas fehérjetartalma (6-7%) adja, emellett magas szárazanyag-tartalommal (34-36%) és kiemelkedő mennyiségű C-vitamin tartalommal rendelkezik (10-20 mg/100g) (Szabó 2002, Laczkó 2005). A-, B1-, B2-, D-vitamin és ásványianyag-tartalma is jelentős (Mészáros 2001, Máthé – Romváry 1978). Csípős íze és jellegzetes illata alillszulfid tartalmának köszönhető. Illóanyagokat, szulfocián származékokat és ritka aminosavakat tartalmaz (Szabó 2002, Laczkó 2005, H. Mészáros 2001). Kimutatták, hogy a fokhagymában a prosztaglandin is megtalálható (Botos – Füstös 1987), illetve számos kén-tartalmú vegyület.

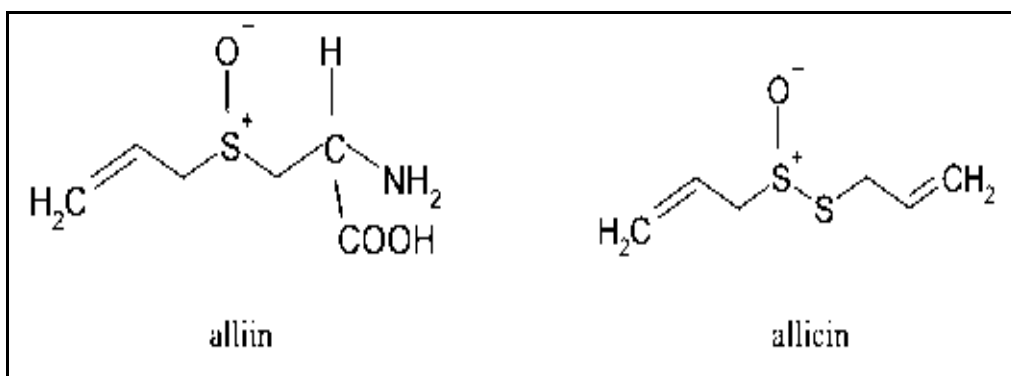
Számos kedvező hatását ismerjük a fokhagymának: fokozza az étvágyat, javítja az emésztést, megelőzi az érlesszesedést, csökkenti a magas vérnyomást és baktericid hatással is rendelkezik. Közismerten hasznos a fokhagyma fogyasztása gombafertőzések kezelésekor, csökkenti a koleszterin-, és a vércukorszintet, féregűző, bélfertőtlenítő hatású (H. Mészáros 2001, Szabó 2002, Laczkó 2005, Haase *et al.* 2012). A daganatos megbetegedések kialakulásának kockázatát is csökkenti (Oommen *et al.* 2004). Az évi egy főre jutó hazai fogyasztás minimálisnak mondható, 1-2 kg (H. Mészáros 2001, Szabó 2002, Laczkó 2005).

Az ORAC (oxygen radical absorbance capacity, azaz oxigéngyök abszorpciós kapacitás) egy nemzetközileg elfogadott mérőszám az élelmiszerek és táplálék-kiegészítők antioxidáns kapacitásának jellemzésére. Ez az érték pontosan mutatja az adott élelmiszer, táplálék kiegészítő vagy -összetevő szabadgyök pusztító és semlegesítő képességét. A

fokhagyma esetében ez az érték 1662, ami a hazai zöldségek között az egyik legmagasabbnak ítéltető. Magasabb értékkel (1770) rendelkezik a kelkáposzta, míg a vöröshagyma ORAC értéke 450 (Juhász 2012).

A fokhagyma tulajdonságait meghatározó legfontosabb hatóanyaga az alliin (3. kép), amely egy ciszteín-származék. Ennek kapcsolódó enzime az alliináza, ami szintén aktív hatóanyaga a fokhagymának, de annak teljes és töretlen állapotában egymástól elkülönülten található meg.

3. kép: Az alliin és az allicin szerkezeti képlete (Papp 2011)



Egy gerezd felaprítása vagy szétrágása során az alliináza enzim az alliin molekulával érintkezve egy kéntartalmú illóolajat, az allicint (3. kép) hozza létre, ami a fokhagyma tipikus, enyhén égető szagát adja. Az allicin instabil vegyület, gyorsan bomlik, 23°C mellett akár 16 óra alatt (http3, http4, Haase *et al.* 2012). Kimutatták eddig az allicin antibakteriális, gyulladáscsökkentő, vírusölő, parazita ellenes, makrofág stimuláló és antioxidáns, szabadgyök megkötő hatását (Oommen *et al.* 2004, Cho *et al.* 2006, Miron *et al.* 2008, Tyagi *et al.* 2014).

Az elmúlt években az allicin sejtburjánzásra gyakorolt hatását kezdték intenzíven vizsgálni. Kimutatásra került, hogy e vegyület apoptózist indukál humán, illetve egér sejtvonalakon egyaránt a DNS töredezettség és a kaspáz rendszer befolyásolása által (Tyagi *et al.* 2014). Peritoniális makrofágok esetében az allicin növekvő mennyisége negatívan hatott a kaspáz-3 aktivitására, a kontroll csoporthoz viszonyítva csökkent a programozott sejthalál kialakulása. Ezen eredményeket csekély mennyiségű (10–100 ng/mL) allicin adagolásával

kapták. A makrofágokra kifejtett pozitív hatás kiaknázása egy lehetséges terápiát lehetőséget nyújthat az immunszuppresszív betegségek ellen (Cho *et al.* 2006).

Az allicin csökkenti a szabad glutation (GSH) mennyiségét, mivel minden SH csoportot tartalmazó molekulával kapcsolatba lép, majd oxidálja azokat (Miron *et al.* 2008, Haase *et al.* 2012). Daganatos sejteken tapasztalták az allicin sejtölő tulajdonságát, így hasznos eszköze a tumorok kialakulásának gátlásában, illetve azok visszaszorításában. Már 1,0 µg/ml mennyiségben citotoxikusnak mutatkozott a sejtek 15%-ában 72 órát követően.

Az allicin koncentrációjának növelésével a DNS szintézis csökkenését észlelték (Tyagi *et al.* 2014). HeLa, illetve SW480 sejtvonalakon is kimutatták sejtpusztító hatását, mely hatás az idő múlásával (24, 48, majd 72 órát követően) egyre nagyobb mértékűnek bizonyult. Ám felmerül az a kérdés, hogy a kialakuló hatásokat csak az allicinnek köszönhetőek vagy esetleg annak metabolitjainak (Oommen *et al.* 2004, Tyagi *et al.* 2014).

Az allicin hatására morfológiai elváltozást is kimutattak, allicinnal kezelt HL60 sejtvonal esetében a sejtek 90%-a mutatott membrán hólyagosodást (blebbing) (Miron *et al.* 2008). A különböző eredmények arra engednek következtetni, hogy az allicin dózisa dönti el főképpen, hogy apoptózist indukál vagy gátol (Cho *et al.* 2006).

3. Anyag és módszer

3.1. A kísérletek állatvédelmi vonatkozásai

Az elvégzett takarmányozási kísérletek rendelkeztek állatkísérleti engedéllyel (XIV-I-001/1880-5/2012), melyet a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága adott ki. A további vizsgálatok tervezésénél a 3R szabályait kívántuk szem előtt tartani.

3.2. Kísérleti állatok

A dózisfüggő kísérletben Ócsáról származó Cobb 540 brojler kakasok vettek részt. A kísérlet során négy csoport került kialakításra. Minden csoportba öt állat tartozott. A kontroll csoportban lévő állatok átlag testtömege a kísérlet kezdetekor (14. életnap) $395,85 \pm 47,72$ g volt, a többi csoport átlag testtömege maximum $\pm 5\%$ -ban tért el.

A fokhagyma-kiegészítést vizsgáló kísérletben Kerekegyházáról származó Hy-line Brown tojó hibrid tojótyúkok vettek részt. A takarmányozási vizsgálat során öt csoportot alakítottak ki, melyeket külön termekben tartották. Minden csoportba hat állat tartozott. A kísérlet kezdetekor a tojótyúkok 58. hetesek voltak. A kísérlet kezdetén kezdő tömeg nem volt meghatározva, azonban a felnevelés során igen egyöntetű volt az állomány, így az ebből adódó különbségek minimálisak voltak.

3.3. A kísérletek és vizsgálatok helyszínei

A takarmányozási kísérletek a Szent István Egyetem Állattudományi Alapok Takarmányozástani Tanszékének kísérleti telepén, míg a genotoxicitási vizsgálatok a Szent

István Egyetem Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszék vízkémiai laboratóriumában.

3.4. A kísérleti takarmányok előállítása

A dózisfüggő kísérletben a kakasok a Vitafort Zrt. által gyártott intenzív brojler indító teljes értékű takarmánykeverékét fogyasztották dercés formában. A fokhagyma-kiegészítést és T-2 toxin terhelést együttesen vizsgáló kísérletben a tojótyúkok a Vitafort Zrt. által gyártott tojótápot fogyasztották. A takarmányozás és vízellátás *ad libitum* volt.

3.4.1. A kísérleti takarmányok szennyezése T-2 toxinnal

A toxint *Fusarium sporotrichoides* NRRL 3229 P törzsszel kukoricadarán termeltették Fodor *et al.* (2006) módszere szerint. A toxint a takarmányba por formájában bekeverten kapták az állatok.

3.4.2. A kísérleti takarmányok kezelése fokhagymaolajjal

A fokhagymaolaj napraforgóolajban került feloldásra, majd a takarmányra való kijuttatása permetezés által lett kivitelezve.

3.5. Kísérleti elrendezés

A dózisfüggő vizsgálatban a toxinterhelés a 14. életnapon kezdődött (2014. május 20.), majd az állatok exterminálása a toxinterhelés 14. napján (2014. június 03.), a 28. életnapon történt.

A fokhagyma-kiegészítést vizsgáló kísérlet 2013. május 23. és 2013. június 13. között zajlott. Az állatok exterminálása a kísérlet 21. napján történt, ekkor az állatok 61. hetesek voltak.

3.5.1. T-2 toxin dóziszfüggő hatásának vizsgálata

Kísérleti csoportjaink a következők voltak (1. táblázat):

1. táblázat: T-2 toxin dóziszfüggő vizsgálatában szereplő csoportok és kezeléseik

Csoport megnevezése	Kezelés
kontroll	brojler takarmánykeverék
T1	brojler takarmánykeverék + 0,5 mg/kg T-2 toxin
T2	brojler takarmánykeverék + 1,0 mg/kg T-2 toxin
T3	brojler takarmánykeverék + 5,0 mg/kg T-2 toxin

3.5.2. T-2 toxin és fokhagymaolaj hatásának önálló és együttes vizsgálata

A következő csoportok kerültek kialakításra (2. táblázat):

2. táblázat: T-2 toxin és fokhagymaolaj vizsgálatában szereplő csoportok és kezeléseik

Csoport megnevezése	Kezelés
abszolút kontroll	tojó takarmánykeverék + 1% napraforgóolaj
fokhagyma 1x	tojó takarmánykeverék + 0,3 g/kg fokhagymaolaj 9,7 g/kg napraforgóolajban
fokhagyma 2x	tojó takarmánykeverék + 0,6 g/kg fokhagymaolaj 9,7 g/kg napraforgóolajban
T-2 toxin	tojó takarmánykeverék + 5 mg/kg T-2 toxin + 1 % napraforgóolaj
T-2 toxin + fokhagyma 1x	tojó takarmánykeverék + 5 mg/kg T-2 toxin + 0,3 g/kg fokhagymaolaj 9,7 g/kg napraforgóolajban

3.6. A mintavételek rendje

A szövetminták *post mortem*, a kórboncolás során kerültek begyűjtésre. A minták a máj bal oldali lebenyéből származtak. Minden minta eppendorf csőbe került és a felhasználás előtt maximálisan 20 percig jégen tároltuk.

3.7. A comet módszer

3.7.1. Felhasznált oldatok, összetételük és elkészítésük

A comet módszerben a következő oldatokat használtuk fel (3. táblázat):

3. táblázat: A felhasznált oldatok és összetételük

Foszfát puffer	Ca és Mg mentes PBS tabletta
Lízis oldat (1 l mennyiség esetén)	NaCl 146,2 g + EDTA 37,2 g + Tris 1,2 g
Elektroforézis puffer	NaOH 200 g/liter (5N) ; EDTA 74,4 g/liter
Semlegesítő puffer	Tris 48.5 g/liter
Festő oldat	Ethidium bromid 10 mg/50 ml desztillált víz

A *foszfát puffer* a PBS tabletta csomagoláson látható előírás szerinti feloldásával előállítható.

A *lízis oldat* elkészítésekor a vegyszerek kimérése után kb. 800 ml desztillált víz kerül hozzáadásra ezen komponensekhez. Ezután pH-érték beállítása következik, majd a víz és vegyszerek elegyét 1 literre való feltöltése. A pH-t 10-re szükséges beállítani szemcsés nátrium-hidroxid folyamatos adagolásával. Használat előtt 1,5 ml Triton X-100-at és 15 ml DMSO kerül 135 ml lízis oldathoz.

Az *elektroforézis puffer* esetében két külön oldalt kell elkészíteni, melyeket 1-1 liter űrtartalomra kell feltölteni. 2000 ml desztillált vízbe be kell mérni 120 ml mennyiséget az 5 normális NaOH oldatból és 10 ml mennyiséget az EDTA oldatból.

A *semlegesítő puffer* pH – értékét 7,5-re kell beállítani tömény HCl segítségével.

A *festő oldat* használat előtt 1:9 arányban kerül hígításra PBS-sel, azaz 0,9 ml PBS-hez 0,1 ml ethidium bromid törzsoldat kerül. Minden etidium bromiddal érintkező eszközt

(pl.: pipettahegy, eppendorf-cső, gumikesztyű, fedőlemez) külön, veszélyes hulladékként kell gyűjteni.

3.7.2. Tárgylemezek preparálása

A fokhagyma-kiegészítést vizsgáló kísérletben a lemért májdarabok 10-szeres, a T-2 dózisfüggő kísérletben pedig 100-szoros arányban kerültek hígításra foszfát pufferrel. A szuszpenzió elkészítéséhez ollót, spatulát, majd Vortex-keverőt használtunk (2500 fordulat/perc, 30 sec.), ezek után a minták jégre kerültek. A továbbiakban a felülúszó került felhasználásra 75 µl mennyiségben. A minták egy részéhez hidrogén-peroxidot került adagolásra, így kialakítva a pozitív kontrollt. A 10 µl 3%-os hidrogén-peroxid került 75 µl mintához.

Először 0,8 %-os normál agaróz előkészítése következett (0,8 g/ 100 ml PBS-ben), ebbe az agarózba merítettük be a lemezeket. Ezt az agarózt víz forráspontjáig kell melegíteni, mivel csak a teljesen folyékony agaróz vihető fel a lemez felületére. Az egyik oldalról a gél eltávolítottuk a lemez lehúzásával, majd papírra helyezve száradtak meg. Miután a lemezek megszilárdultak 75 µl 1%-os (100 mg/10 ml) alacsony olvadáspontú agarózt cseppentettünk a lemezekre, a gél azonos mennyiségű sejtsuszpenzióval hígítottuk. Ezt követően fedőlemezt helyeztünk a tárgylemezekre és 5 percre jégakkura helyeztük őket, hogy az agaróz megkössön. Ezután eltávolítottuk a fedőlemezeket, rácseppentettük a harmadik réteg gélét, amely 90 µl 0,5%-os alacsony olvadáspontú agaróz PBS-ben feloldva. Ismét fedőlemezzel borítottuk be a harmadik gélréteget is, majd ismét 5 percre jégakkura kerültek a lemezeket, majd eltávolítottuk a fedőlemezeket.

A hűtéssel egy időben a lízisoldatot előkészítettük. Az ezt követő lépések elsötétített laborban folytak. A tárgylemezeket egymás mellé fektettünk az üvegkádban. Ezt követően a lemezekre a lízisoldatot öntöttük rá, mely oldatban minimum egy óráig voltak a tárgylemezek.

A lízisoldatban eltöltött idő után a tárgylemezeket kivettük, lecsepegtettük és egy vízszintes elektroforézis kádba helyeztük őket úgy, hogy az üres helyeket olyan lemezekkel töltöttük ki, melyeken nem volt található gél, így az esetleges elcsúszást előztük meg. Ezt követően óvatosan feltöltöttük a kádat elektroforézis oldattal úgy, hogy a lemezeket tökéletesen elfedje. A 40 perc elteltével beállítottuk a készüléken a feszültséget 20 voltra (0,74 V/cm a kád hosszától függően), az áramerősséget pedig 300 mA-re. A készülék 24 percen

keresztül volt bekapcsolt állapotban. Ezután a lemezeket kivettük a kádból, lecsepegtettük és egy fémrácsra helyeztük azokat. Semlegesítő oldattal leöntöttük le a lemezeket, mely műveletet megismételtünk 5 perc elteltével. A sötét szakasz ekkor véget ért.

A lecsepegtetett lemezekre 50 μ l ethidium bromidos oldatot került fedőlemezzel került lefedésre.

3.7.3. Kiértékelés és az alkalmazott statisztikai módszerek

Mikroszkóp alatt UV fényben vizsgáltuk a keletkezett képet. A fotók Nikon Eclipse E600 típusú mikroszkópra szerelt Nikon Coolpix 4500 digitális fényképezőgéppel készültek el. Mindkét vizsgálat során minimum 150 sejt került kiértékelésre minden csoportban.

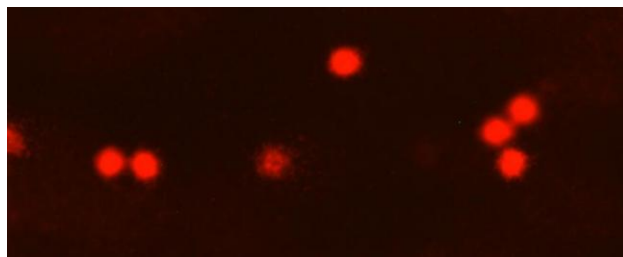
A CometScore programmal kapott nyers adatokból a %DNA in Tail eredményeket átmentettem Excel formátumba. GraphPad QuickCalcs kalkulátor (<http6>) segítségével a szignifikánsan eltérő értékek kiválogatásra kerültek, mely értékek a CometScore program manuális üstökös kijelöléseinek tévedéseiből származnak. Ezt követően a %-os értékek arcsin gyök transzformáció segítségével egy mértékegység nélküli értékekre kerültek átszámításra a statisztikai kiértékelés végett. Minden esetben a kapott eredményeket Windows Office Excel táblázatban rögzítettem. A megfelelő adatmátrix elkészítését követően az R 3.1.1 program segítségével végeztem a statisztikai elemzést. A csoportok normális eloszlását boxplot ábra és Shapiro – Wilk teszt segítségével ellenőriztem, majd egyutas varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztem $p \leq 0,05$ szignifikancia-szint mellett. Utótesztnek pedig a Tukey – tesztet választottam, mely a különböző csoportokat hasonlította össze egymással.

4. Eredmények és értékelésük

Az eredmények ismertetése annak következtében jöhetett létre, hogy vizsgálataink során tapasztalati úton eljutottunk ahhoz a sejtsűrűséghez, ami lehetővé tette a vizsgálatot.

A két részletesen ismertetett kísérletet előkísérlet előzte meg, amelyek arra irányultak, hogy az Anyag és módszer fejezetben leírt comet módszer esetében megállapíthassuk a megfelelő sejtsűrűséget. Erre azért volt szükség, mert ilyen irányú tapasztalattal még nem rendelkeztek eddig brojlercsirkék májával kapcsolatban. Emellett főként a lízis folyamatát és a kiértékelést akadályozhatja egy esetlegesen nagy sejtsűrűség. Nagy sejtsűrűség esetén az üstökösök feji vagy farki részen összeérhetnek, ezt szemlélteti a 4. kép.

4. kép: Nagy sejtsűrűséget szemléltető comet felvétel (saját fotó)



4.1. A T-2 toxin dózisfüggő hatásának vizsgálata

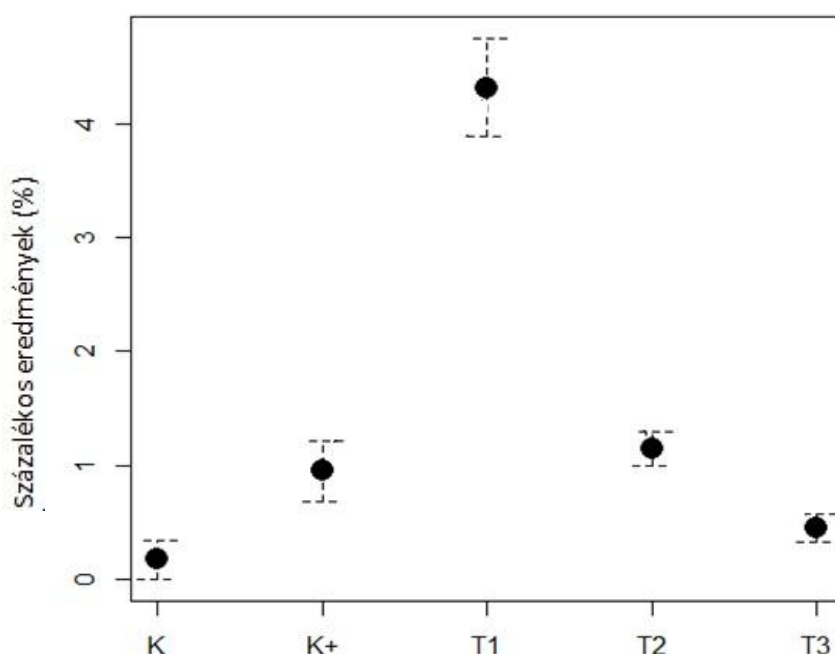
A takarmányozási kísérletben kialakított öt, illetve a comet módszerben kialakított pozitív kontroll csoport üstökös csóvájában található DNS %-os (%DNS in tail) értékeit (átlag és szórás) az 1. ábra mutatja be. A kontroll csoport átlag értéke $0,001\% \pm 0,002\%$, míg a pozitív kontrollé (K+) $0,946\% \pm 1,591\%$. A 0,5 mg T-2 toxin csoport (T1) átlag értéke $4,319\% \pm 5,396\%$, míg az 1,0 mg T-2 toxin csoport (T2) értéke $1,142\% \pm 1,194\%$ volt. Az 5 mg T-2 toxin/kg takarmány esetében (T3) az eredmények a következők: átlagosan $0,445\% (\pm 1,709\%)$ DNS töredék volt megtalálható az ebbe a csoportba tartozó üstökösök csóvaiban.

A grafikonon látható értékekből – önállóan az 1. ábrát tekintve – arra juthatunk, hogy a T1-es csoport (0,5 mg/kg) nagyobb mértékű DNS-károsodást okozott, mint a legnagyobb 5

mg/kg-os dózis a T3 csoportban. Ámde látva azok comet képeit megbizonyosodhatunk ennek ellenkezőjéről: valóban a nagyobb terheltség okozta a nagyobb mértékű károsodást. Viszont a CometScore kiértékelési módjából következően a legnagyobb károsodást okozó dózisonál az üstökös feji és farki vége nem volt elkülöníthető, ugyanis a károsodás olyan nagymértékű volt, hogy a feji rész gyakorlatilag eltűnt és csak farki rész volt látható.

Érdekes eredménynek tekinthetők az egyes dózisok között megfigyelhető távolságok, amelyek a károsodás fokára utalhatnak. Ez egyfajta telítődési görbét sejtet, azonban a bizonyossághoz azonban más értékelési módokkal történő együttes kiértékelés volna szükséges.

1. ábra: A T-2 toxin dóziszfüggő vizsgálatban szereplő csoportok átlagai



A T-2 toxinnal való kezelés szignifikáns hatással bírt ($p = < 2e-16$), tehát a csoportok átlagos értékei különböznek egymástól. A Tukey-utóteszt eredményeit az 4. táblázat szemlélteti.

Szignifikáns különbséget állapítottunk meg a kontroll (K) és a negatív kontroll (K+) csoportok között, továbbá a kontroll (K) és a 0,5 mg (T1) és 1,0 mg (T2) toxinos csoportokhoz viszonyítva. A negatív kontroll (K+) csoporthoz képest a 0,1 mg (T1) és a 5 mg (T3) toxinos csoportok különböznek szignifikánsan. A 0,5 mg (T1) toxinos csoport szignifikánsan eltér a 1,0 mg (T2) és 5 mg (T3) toxinos csoportokhoz képest. Csoportok közti

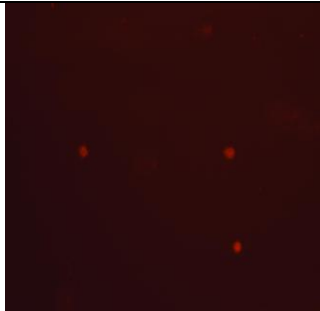
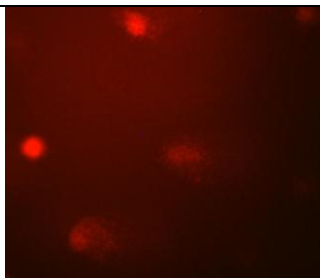
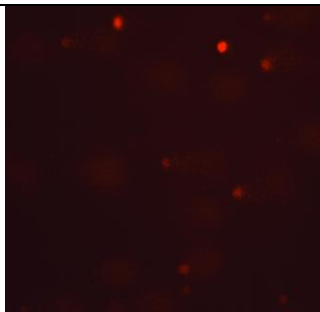
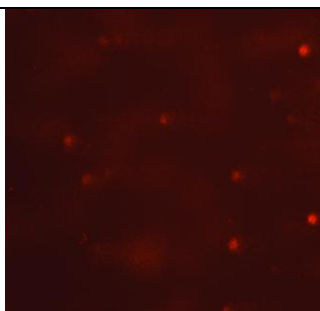
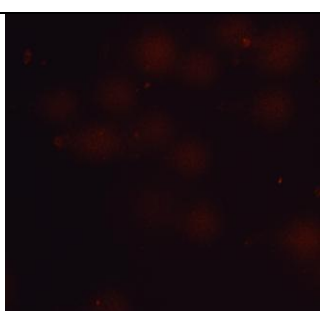
szignifikáns különbség még a 1,0 mg (T2) és 5 mg (T3) toxinos csoportok között található. Nem mutatható ki szignifikáns eltérés a kontroll (K) és 5 mg (T3) toxinos, illetve a negatív kontroll (K+) és a 1,0 mg (T2) csoportok között.

4. táblázat: A Tukey – teszt eredményei a dózisfüggő vizsgálatban

Csoport	p - érték
K – K+	0,00656
K – T1	< 1e-04
K – T2	< 1e-04
K+ - T1	< 1e-04
K+ - T3	0,4947
T1 – T2	< 1e-04
T1 – T3	< 1e-04
T2 – T3	< 1e-04
K – T3	0,59783
K+ – T2	0,97789

A dózisfüggő vizsgálat képeit és kiértékelésüket az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat: A T-2 toxin dózisfüggő vizsgálatának eredményei

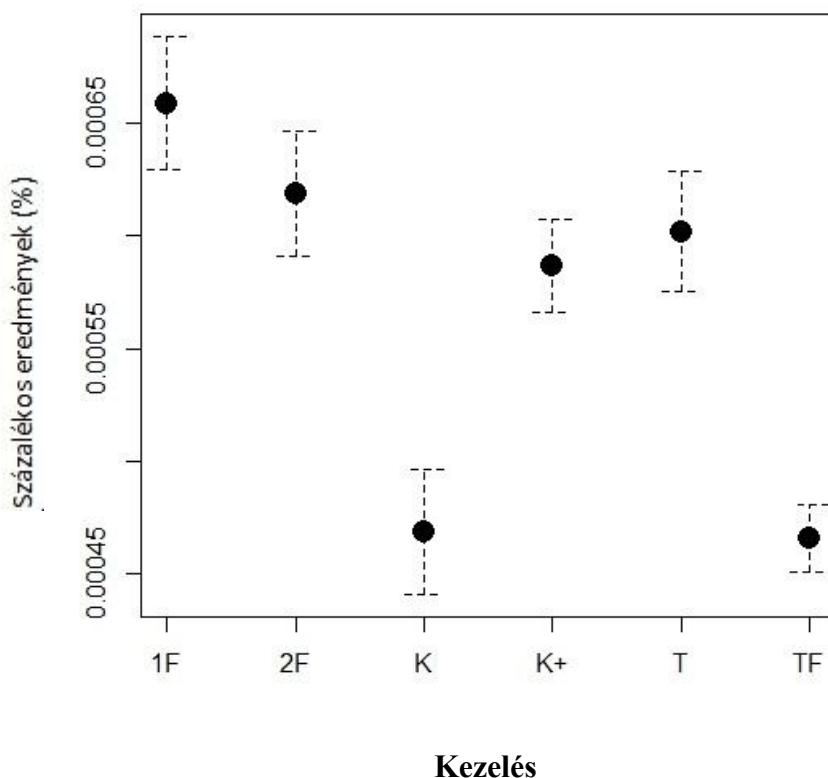
Kísérleti csoportok comet assay fotói	szöveges értékelés
	K – kontroll csoport Csak az üstökös feje egységes, DNS töredék nem látható.
	K+ - negatív kontroll csoport Az üstökös feji és farki része elkülöníthető, illetve a fej rész nem egységes, különböző mértékű DNS töredék veszi körül.
	T1 - 0,5 mg T-2 toxin csoport Az üstökös feji és farki része jól elkülöníthető.
	T2 - 1,0 mg T-2 toxin csoport Az üstökös feji és farki része jól elkülöníthető.
	T3 – 5,0 mg T-2 toxin csoport Az üstökös részei nem különíthetők el, legtöbb esetben csak a farki rész látható.

4.2 T-2 toxin és fokhagymaolaj hatásának önálló és együttes vizsgálata

A takarmányozási kísérletben szerepelt öt csoport és a kialakított negatív kontroll csoport értékeit, átlagát és szórását a 2. ábra mutatja be, melyek az üstökös csóvájában található DNS %-os (%DNS in tail) eredményeiből származnak. A kontroll csoport átlag értéke 0,00047% volt $\pm$ 0,0002%, míg a pozitív kontrollé (K+) 0,00059% $\pm$ 0,0003%. Az 1-szeres fokhagyma csoport (1F) átlag értéke 0,00066% $\pm$ 0,0003%, míg a 2-szeres fokhagyma csoport (2F) értéke 0,00062% $\pm$ 0,0003% volt. A T-2 toxin csoport (T) 0,0006 $\pm$ 0,0002%, míg a T-2 toxin csoport + 1-szeres fokhagyma 0,00047% $\pm$ 0,0002% átlag értékeket produkált.

Jelen vizsgálat során részben tapasztalható a korábbiakban leírt problematika, miszerint a nagyobb mértékű károsodás esetén nehézségekbe ütközik a feji és farki részek megkülönböztetése. Továbbá ebben a vizsgálatsorozatban nehézséget okozott a kiértékelésben az is, hogy a módszer tökéletesítése miatt más koncentrációt próbáltunk ki (10-szeres hígítás), ami miatt számtalan esetben összeérték az üstökösök egyes részei.

2. ábra: A T-2 toxin és fokhagymaolaj vizsgálatában szereplő csoportok átlagai



A fokhagymával történő kezelés szignifikáns hatással bírt, $p = 5.42e-10$, tehát a kialakított csoportok átlag DNS töredezettségére vonatkozó értékei nem egyenlőek. Az különböző csoportok közötti, utótesztel számított p – értékeket a 6. táblázat mutatja be.

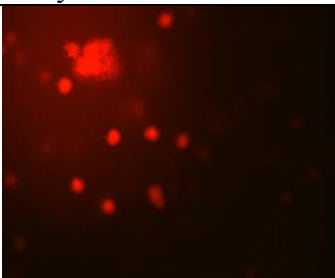
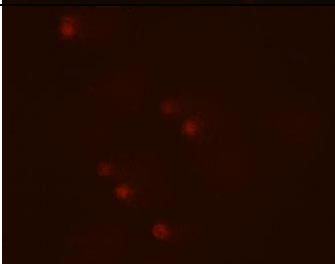
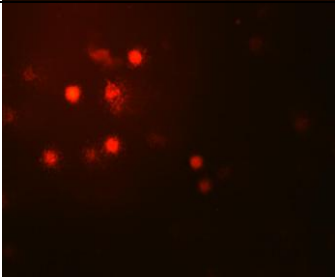
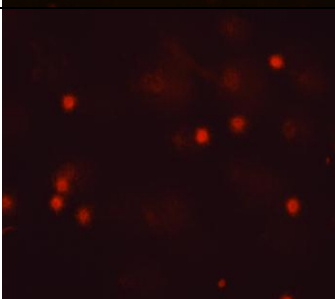
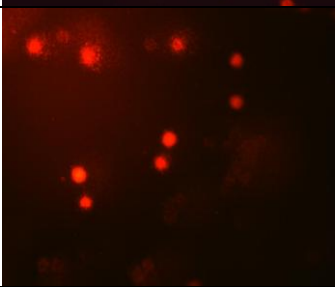
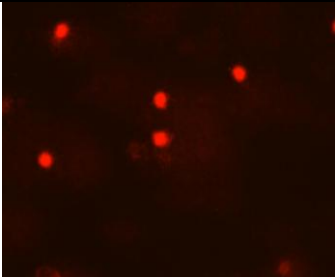
A kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan eltért az 1-szeres (1F) és 2-szeres (2F) fokhagyma csoport, illetve a T-2 toxin csoport. A T-2 toxin csoport + 1-szeres fokhagyma (TF) szintén ezek csoportokhoz (1-szeres (1F) és 2-szeres (2F) fokhagyma és T-2 toxin csoport) viszonyítva tért el szignifikánsan. A további csoportokat összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget.

6. táblázat: A Tukey – teszt eredményei

Csoport	p-érték
Kontroll – 1F	<0,001
Kontroll – 2F	0,0125
Kontroll – T	0,0419
TF – 1F	<0,001
TF – 2F	<0,001
TF – T	0,0011
TF – K+	< 0,001
TF - K	0,9999
T – 1F	0,8978
T – 2F	0,9999
T – K+	0,8981
2F - 1F	0,9109
K+ – 1F	0,1123
K+ – K	0,0991
K+ – 2F	0,7155

A toxin és a fokhagymaolaj vizsgálatából származó képeket és kiértékelésüket a 7. táblázat mutatja be.

7. táblázat: A T-2 toxin és a fokhagymaolaj együttes hatás vizsgálatának eredményei

Kísérleti csoportok comet assay fotói	szöveges értékelés
	K – kontroll csoport Az üstökös feji része látható, míg DNS töredéket tartalmazó farki rész nem.
	K+ - negatív kontroll csoport Az üstökös feji és farki része is látható, azok elkülönülnek.
	1F - 1-szeres fokhagyma csoport Az üstökösök feji és farki része is látható. A feji részt különböző mértékben DNS fragmentek veszik körül.
	2F - 2-szeres fokhagyma csoport Az üstökösök feji és farki része látható, DNS fragmentek kivehetőek.
	T - T-2 toxin csoport Az üstökösök részei láthatóak. A feji részt különböző mértékben DNS fragmentek veszik körül.
	TF - T-2 toxin + 1-szeres fokhagyma csoport Az üstökösök farki része nem figyelhető meg.

5. Következtetések

Tudomásunk szerint csirkemájon ezelőtt nem alkalmazták a comet módszert. E módszer is rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal, ám tagadhatatlan sokrétű felhasználhatósága. Hiszen számos típusa van ezen módszernek, továbbá nincs korlátja a módszer keretein belül annak, hogy milyen sejteken vagy szöveteken végezhető el. Így merülhetett fel a csirkemájra történő adaptálás lehetősége is.

Munkánk során sikeresen adaptáltuk csirkemájra a comet módszert, a megfelelő sejtsűrűséget felderítettük, miszerint az eredeti feldolgozott szövet tömegéhez képest 100-szoros hígítás szükséges a módszer elvégzéséhez. Ebből és további eredményeinkből következően a baromfi vizsgálatok során javasolható a DNS károsodásának vizsgálata comet módszerrel.

A dózisfüggő vizsgálat során bebizonyosodott, hogy a T-2 mikotoxin rendelkezik DNS károsító hatással. Ezen vizsgált hatása már a 0,5 mg toxin/ kg takarmány mennyiség esetén is jelentkezett, az üstökösök farkában több mint 4% volt a DNS töredék. Hatása a további 1,0 mg toxin/ kg takarmány dózis esetében is megnyilatkozott, ám a legnagyobb dózisonál a várt károsodás mértékét nem tudtuk kimutatni.

Több vizsgálat kimutatta, hogy az 5 mg vagy akörüli mennyiség a T-2 toxinból is már jár káros hatásokkal (Frankič *et al.* 2006, Rajli *et al.* 2011, Hafner *et al.* 2012). Az 5 mg toxin/ kg takarmány mennyiségénél problémát jelentett a kiértékelésnél, hogy nagy mértékben csak csóvákat lehetett észlelni, tehát az üstökösöknek nem lehetett megkülönböztetni a feji és farki részét (5. táblázat). Így ezeket ki kellett hagyni a értékelésből. Az üstökösök kiértékelésének több módszere lehetséges, így ebben az esetben a comet besorolást (Hafner *et al.* 2012, Horvatovich *et al.* 2013) lenne ésszerű elvégezni a jövőben és összevetni a kapott eredményeinkkel.

A fokhagymával történő kiegészítés szignifikánsan hatott a DNS károsodás mértékére. Két csoport, mely csak fokhagyma kiegészítésben részesült, illetve a T-2 toxinos csoport szignifikáns növekedést mutatott a DNS töredezettségének terén. Amennyiben a fokhagyma kiegészítés mellett T-2 toxin is került a takarmányba, a fokhagyma kifejtette jótékony hatását

és a kontroll csoporthoz hasonló eredményeket kaptunk. A fokhagyma tehát jótékony hatással bír a T-2 toxinnal való kitettség esetén, ami a fokhagyma hatóanyagainak, például az allicinnak tulajdonítható. Az allicin számos tulajdonságára már fény derült, például apoptózis indukálására, így eredményeink összeesengnek az irodalomban fellelhető tendenciákkal (Oommen *et al.* 2004, Cho *et al.* 2006, Tyagi *et al.* 2014).

A takarmányozási kísérlet során végeztek lipidperoxidációra vonatkozó méréseket is, és az már egyértelműen látszik, hogy azok eredményei a saját eredményeinkkel állnak párhuzamban, azonban ezek összevetése még folyamatban van.

6. Összefoglalás

A szervezet, legyen az állati vagy humán, jó minőségű, teljes értékű táplálékkal való ellátása elsődleges feladat. Nem csak a beltartalmi értékeket fontos szem előtt tartani, hanem a szennyezettséget is. A takarmányokat és humán táplálékokat számos anyag szennyezheti, többek között növényvédőszeres, nehézfémek vagy akár toxinok.

Az állategészségügyi szempontból fontos mikotoxinok meghatározott körülmények között szinte kivétel nélkül termeléseszköket okoznak és hozzájárulnak egyes betegségek vagy hiánytünetek kialakulásához. A gyakorlatban előforduló dózisok legtöbbször nem okoznak klinikai tüneteket, ám a szemmel nem látható kártételük kiterjed különböző építőelemekre is, mint például a DNS.

Többet beszámoltak a T-2 toxin toxiko-kinetikájáról, bomlásáról, illetve *in vivo* és *in vitro* is végeztek vizsgálatokat. Több bizonyíték is napvilágot látott arra vonatkozóan, hogy a trichotecénvázas mikotoxinok közül a T-2 toxin rendelkezik leginkább heveny toxikus hatással. Káros hatása szerteágazó, mivel többek között a termelési paramétereket (pl.: testtömeg-gyarapodást, tojástermelést), a spermaminőséget, továbbá akár az immunrendszer állapotát is negatívan befolyásolja.

Célul tűztük ki a comet módszer alkalmazhatóságának vizsgálatát csirkemájon, illetve azt, hogy ezzel a módszerrel kimutatható mértékű DNS károsodás következik-e be T-2 toxinnal való kitettség esetén. Továbbá, hogy a T-2 toxin dózisfüggő vizsgálatkor a károsodás mértéke a kitettséggel arányosan növekszik-e, illetve, hogy a T-2 toxinnal való kitettség esetén a fokhagymaolaj kedvező irányba tudja-e befolyásolni a DNS károsodását.

A comet módszert sikeresen adaptáltuk csirkemáj esetében, megállapítottuk azt a megfelelő sejtsűrűséget, amivel lehetővé vált a vizsgálat elvégzése és kiértékelése. E módszer által kimutatható volt a DNS károsodás.

A dózisfüggő vizsgálatban csak a 0,5 és 1 mg/kg takarmány dózisú csoport tért el szignifikánsan a kontroll csoporthoz viszonyítva az alkalmazott kiértékelési módszerrel. Az 5 mg toxin/kg takarmány mennyiségénél is látható károsodás, ám az általunk használt program segítségével nem kiértékelhető, így más kiértékelési móddal való kombinálása lenne indokolt.

A fokhagymaolajjal történő kiegészítés során a mindkét fokhagymaolaj-kiegészítést kapott csoport szignifikánsan eltért a kontroll csoporthoz képest. Ugyanezt mondhatjuk el a csak T-2 toxint kapott csoport értékeiről is. Abban az esetben, amikor az állatok toxint és

fokhagymaolaj -kiegészítést kaptak, az eredmények a kontroll szintjét közelítették meg. A fokhagymaolaj önmagában mutatott DNS károsító hatást, de kimondottan kedvező hatással rendelkezett toxinnal való kitettség esetében.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a comet módszer sikeresen alkalmazható csirkemájon, illetve az általunk vizsgált T-2 toxin káros hatása kimutatható e módszer segítségével. A T-2 toxin detektálható mértékű DNS károsodást okozott.

7. Irodalomjegyzék

1. Augustyniak M., Orzechowska H., Kędzierski A., Sawczyn T., Doleżych B. (2014): DNA damage in grasshoppers' larvae – Comet assay in environmental approach *Chemosphere* 96, 180–187.
2. Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A. R. (2009): DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research* 674, 101–108.
3. Bálint M. (2000a): Molekuláris biológia I. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 207 p.
4. Bálint M. (2000b): Molekuláris biológia II. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 207 p.
5. Balogh K., Balláné Erdélyi M., Mézes M. (2013): Takarmánytoxikológia Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft., Gödöllő, 130 p.
6. Botos Gy., Füstös Zs. (1987): Hagymafélék termesztése Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 335 p.
7. Böcker W., Rolf W., Bauch T., Müller W., Streffer C. (1999): Automated comet assay analysis. *Cytometry* 35: 134-14. in Miskolczi E. (2007): A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
8. Chen J-H., Cao J-L., Chu Y-L., Wang Z-L., Yang Z-T., Wang H-L. (2008): T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes *Journal of Zhejiang University Science B* 9 (6), 455-463.
9. Cho S – J., Rhee D – K., Pyo S (2006): Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state *Nutrition* 22, 1177–1184.
10. Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. (2009): Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models *Cell Biology Toxicology* 25. 5–32.
11. Diaz, G. J., Squires, E. J., Julian, R. J., Boermans, H. J. (1994): Individual and combined effects of T-2 toxin and das in laying hens. *Brit. Poultry Sci.* 35, 393–405.
12. Dobolyi Cs., Sebők F., Varga J., Kocsubé S., Szigeti Gy., Baranyi N., Szécsi A., Lustyik Gy., Micsinai A., Tóth B., Varga M., Kriszt B., Kukolya J. (2011): Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. *Növényvédelem* 47, 125-133. in Krifaton Cs., Cserhádi M., Privler Z. (2011): Az aflatoxinok környezet-egészségügyi hatásai *Biokontroll* 2. évf., 4. szám, 4-9.
13. Fodor J., Németh M., Kametler L., Pósa R., Kovács M., Horn P. (2006): Novel methods of *Fusarium* toxins' production for toxicological experiments. *Acta Agraria Kaposváriensis* 10, 277-285.
14. Frankič T., Pajk T., Rezar V., Levart A., Salobir J. (2006): The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes *Food and Chemical Toxicology* 44. 1838–1844.
15. Gedik C. M., Ewen S. W. B., Collins A. R. (1992): Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells *International Journal of Radiation Biology* 62, 313-320.
16. Grasl-Kraupp B., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W., Schulte-Hermann R. (1995): In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21 (5): 1465-8.

17. Haase H., Hieke N., Plum L. M., Gruhlke M. C. H., Slusarenko A., J., Rink L. (2012): Impact of allicin on macrophage activity *Food Chemistry* 134, 141–148.
18. Hafner D., Bodnár Zs., Horvatovich K., Berta G., Kovács M. (2012): 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 argiculturae Slovenica*, 3, 351–355.
19. H. Mészáros E. (2001): *Termeszethető gyógynövények Anno BT.*, Budapest. 240 p.
20. Horvatovich K., Hafner D., Bodnár Zs., Berta G., Hancz Cs., Dutton M., Kovács M. (2013): Dose-related genotoxic effect of T-2 toxin measured by comet assay using peripheral blood mononuclear cells of healthy pigs *Acta Veterinaria Hungarica* 61 (2), 175–186.
21. Joffe A. Z. (1983): Foodborne diseases: Alimentary toxic aleukia in *Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin* Rochcigle M. ed., CRC Press, Boca Raton, FL. 353-495. in Weber M., Kovács B., Mézes M. (2005): Mikotoxinok által okozott DNS-károsodások Állattenyésztés és Takarmányozás, 54. 4. 353-364.
22. Kent C. R., Eady J. J., Ross G. M., Steel G. G. (1995): The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay *International Journal of Radiation Biology* 67(6):655-60.
23. Klaude M., Erikson S., Nygren J. and Ahnström G. (1996): The comet assay: mechanism and technical considerationa *Mutation Research* 363, 89-96.
24. Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Sofuni T. (1995): A comparison between manual microscopic analysis and the computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay *MMS Commun* 3: 103-115. in Miskolczi E. (2007): A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
25. Kumari S., Rastogi R. P., Singh K. L., Singh S. P., Sinha R. P. (2008): DNS damage: detection strategies *EXCLI Journal* 7, 44-62.
26. Laczkó T. (2005): *Családi gazdaságokból az Unióba – Hagymafélék exportja Szaktudás Kiadó, Budapest, 180 p.*
27. Lehel J., Laczay P. (2011): *Toxikológia Szent István Egyetemi Kiadó, Budapest. 268 p.*
28. Marrs T. C., Edginton J.A.G., Price P.N., Upshall D.G. (1986): Acute toxicity of T-2 mycotoxin to the guinea-pig by inhalation and subcutaneous routes *British. Journal of Experimental Pathology* 67, 259-268
29. Máthé Á., Romváry V. (1978): *Fűszer- és gyógynövények a kiskertben és a házunk táján Mezőgazdasági Kiadó, Budapest 205 p.*
30. Mézes M. (2008): A takarmánybiztonság aktuális problémái *AWETH Különszám Vol. 4. 2. 19-26.*
31. Mézes M.- Matkovics B. (1986): A lipidperoxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése *Medicina Könyvkiadó, Budapest, 262 p.*
32. Migheli A., Attanasio A., Schiffer D. (1997): Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neuronal cells by in situ end-labelling techniques *The Journal of Pathology*, Volume 176, Issue 1, 27-35.
33. Minor T., Wilchek M., Sharp A., Nakagawa Y., Naoi M., Nozawa Y., Akao Y. (2008): Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells *Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 524–535.
34. Miskolczi E. (2007): A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.

35. Murthy S. K., Demetrick D. J. (2006): New approaches to fluorescence in situ hybridization *Methods Mol Biol* 319, 237-59.
36. Nelson P. E., Dignani M. C., Anaissie E. J. (1994): Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species *Clinical Microbiology Reviews* 7 (4), 479-504.
37. Olive P. L. (1989): Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids *Radiation Research* 117, 79-92.
38. Oommen S., Anto R. J., Srinivas G., Karunakaran D. (2004): Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells *European Journal of Pharmacology* 485, 97– 103.
39. Osselaere A., Devreese M., Goossens J., Vandenbroucke V., De Baere S., De Backer P., Croubels S. (2013a): Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens *Food and Chemical Toxicology* 51, 350–355.
40. Osselaere A., Li S. J., De Bock L., Devreese M., Goossens J., Vandenbroucke V., Van Bocxlaer J., Boussery K., Pasmans F., Martel A., De Backer P., Croubels S. (2013b): Toxic effects of dietary exposure to T-2 toxin on intestinal and hepatic biotransformation enzymes and drug transporter systems in broiler chickens *Food and Chemical Toxicology* 55, 150–155.
41. Rafai P., Kovács M. (2009): Takarmányok mikotoxin szennyezettségének igazságügyi állatorvostani vonatkozásai *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 2009. 58. 5. 427–438.
42. Rafai P., Mészáros J. (1998): A mikotoxin helyzet Magyarországon. Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottságának állásfoglalása. In: A Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok Osztályának Tájékoztatója Akadémiai Kiadó, Budapest, 128-133.
43. Rizzo A., Biese I., Veijalainen P., Antila E., Westermarck T., Atroshi F., (1998): Mycotoxins induced DNA oxidative damage in rat liver cell *Pathophysiology* 5 (Supplement 1), 81.
44. Shokri F., Heidari M., Gharagozloo S., Ghazi-Khansari M. (2000): In vitro inhibitory effects of antioxidants on cytotoxicity of T-2 toxin *Toxicology* 146, 171–176.
45. Somoskői B., Keresztes Zs., Solti L., Kovács M., Cseh S. (2012): A T-2 mikotoxin hatása egérembriók korai fejlődésére *Magyar Állatorvosok Lapja* 134. 614-619
46. Somoskői B., Keresztes Zs., Solti L., Kovács M., Cseh S. (2013): A T-2 mikotoxin hatása a mitokondriumokra és az apoptikus folyamatokra egérembriókban *AWETH Különszám Vol. 9. 3.* 328-334.
47. Szabad J. (2006a): A mutagenitás alapjai in Darvas B., Székács A. (2006): *Mezőgazdasági ökotoxikológia* L'Harmattan Kiadó, Budapest, 382 p.
48. Szabad J. (2006b): A daganatképződés molekuláris biológiája in Darvas B., Székács A. (2006): *Mezőgazdasági ökotoxikológia* L'Harmattan Kiadó, Budapest, 382 p.
49. Szabó I. (2002): *A hagymafélék termesztése* Szaktudás Kiadó Ház, Budapest, 94 p.
50. Tai J. H., Pestka J. J. (1990): T-2 toxin impairment of murine response to *Salmonella typhimurium*: A histopathologic assessment *Mycopathologia*, 109 (3) 149-155.
51. Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Mamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.

52. Tyagi G., Pradhan S., Srivastava T., Mehrotra R. (2014): Nucleic acid binding properties of allicin: Spectroscopic analysis and estimation of anti-tumor potential *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 350–356.
53. Varga, J. and Tóth, B. (2005): Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review. *Acta Vet. Hung.* 53, 189–203.
54. Weber M., Balogh K., Fodor J., Erdélyi M., Ancsin Zs., M. (2009): Különböző dózisú T-2 és HT-2 toxin adagolásának hatása a nevelési időszakban broilereknél *AWETH Special Issue Vol. 5. 4.* 418-422.
55. Weber M., Kovács B., Mézes M. (2005): Mikotoxinok által okozott DNS-károsodások Állattenyésztés és Takarmányozás, 54. 4. 353-364.
56. Wyatt R. D. (2005): Mycotoxin interactions in Mycotoxin Blue Book Ed: Diaz D., Nottingham University Press, Nottingham, 93-138.

Internetes hivatkozások:

1. Gervai J. (2012): Az E. coli RecQ helikáz kölcsönhatásainak új aspektusai Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Budapest, http://www.mk-lab.org/downloads/dolgozatok/Gervai_MSc.pdf Letöltés ideje: 2014-09-17
2. Hafner D., Horvatovich K., Bodnár Zs., Berta G., Szabó A., Kovács M. (2011): A T-2 toxin génkárosító hatásának vizsgálata comet assay-vel sertés limfociták alkalmazásával MTA - Állatorvos-tudományi Bizottsága, SZIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskola Akadémiai beszámolók (2012 jan. 16-19.) 38. füzet http://www.vmri.hu/Nagyb/allathigi_2011.pdf Letöltés ideje: 2014-08-20
3. Juhász M. (2012): Szabadgyökök és antioxidánsok – a legjobb antioxidáns növények http://www.ameganet.hu/wp-content/uploads/2012/02/Amega_2012_6_antioxidans_novenyek.pdf Letöltés ideje: 2014-08-30
4. Kovács M. (2012): Az élelmiszerbiztonság javítását szolgáló kutatások a Kaposvári Egyetemen http://www.innocropfood.hu/kepek/tartalom/20130225125400723807/31_M_Kovacs.pdf Letöltés ideje: 2014-08-28
5. Mézes M. (2006): Penészgombák és mikotoxinok a takarmányokban és az ellenük való védekezés lehetőségei *Agrárágazat* <http://www.pointernet.pds.hu/ujsagok/agraragazat/2006/09/20061011215726440000000690.html> Letöltés ideje: 2014-10-03
6. Papp N. (2011): Gyógynövények hatóanyagai és szerkezeti képletei <http://aok.pte.hu/hu/download/index/9972> Letöltés ideje: 2014-08-20.
7. Rajli V., Cseh S., Tornósy G., Matics Zs., Huszenicza Gy., Kulcsár M., Rusvai M., Mándoki M., Kovács M. (2011): A szubakut és krónikus t-2 expozíció hatásai baknyulaknál MTA - Állatorvos-tudományi Bizottsága, SZIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskola Akadémiai beszámolók (2012 jan. 16-19.) 38. füzet http://www.vmri.hu/Nagyb/allathigi_2011.pdf Letöltés ideje: 2014-08-20
8. Somoskői B., Keresztes Zs., Kovács M., Cseh S. (2014): Fumonizin B1 és T-2 mikotoxinok hatása sertés spermiumokra in vitro MTA - Állatorvos-tudományi Bizottsága, SZIE Állatorvos-tudományi Doktori

- Iskola Akadémiai beszámolók 2014. 01. 27-30. http://www.vmri.hu/Nagyb/allathigi_2013.pdf Letöltés ideje: 2014-07-22
9. Zhuang Z., Yang D., Huang Y., Wang S. (2013): Study on the Apoptosis Mechanism Induced by T-2 Toxin <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0083105> Letöltés ideje: 2014-08-17
 10. http1: http://szerves.science.unideb.hu/2012_termeszetes_szerves_vegyuletek.pdf Letöltés ideje: 2014-08-05
 11. http2: <http://adatbank.transindex.ro/vendeg/htmlk/pdf8055.pdf> Letöltés ideje: 2014-08-05
 12. http3: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/garlic/> Letöltés ideje: 2014-09-09
 13. http4: <http://hu.wikipedia.org/wiki/Allicin> Letöltés ideje: 2014-09-09
 14. http5: <http://www.mutacio.hu/mutacio> Letöltés ideje: 2014-09-07
 15. http6: <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm> Letöltés ideje: 2014-08-28
 16. http7: http://cometassay.com/index_files/Page345.htm Letöltés ideje: 2014-10-01
 17. http8: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf> Letöltés ideje: 2014-10-02
 18. http9: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX:32013H0165> Letöltés ideje: 2014-10-03
 19. http10: http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information/ Letöltés ideje: 2014-09-01
 20. http11: <http://www.internetchemie.info/naturstoffe/mykotoxine/trichothecene.htm> Letöltés ideje: 2014-10-03
 21. http12: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:159:0007:0024:HU:PDF> Letöltés ideje: 2014-10-06

8. Nyilatkozat

NYILATKOZAT

Alulírott Szabó Rubina Tünde, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Ökotoxikológus szak nappali/levelező tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy szakdolgozatom/diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet / Szak honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2014. október 15

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot/diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot/diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

témavezető aláírása

témavezető aláírása

témavezető aláírása

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezzem ki mindenkinek, aki a dolgozatom elkészítéséhez nagyban hozzájárult.

❖ Konzulenseimnek

- Dr. Kovács-Weber Máriának a szakmai támogatásért, tanácsokért, a rám, illetve munkámra szánt időért;
 - Dr. Horváth Ákosnak a comet módszerben nyújtott segítségéért és építő kritikájáért;
 - Kovács Róbertnek a comet módszer lebonyolításában nyújtott segítségéért és szakmai támogatásáért;
- ❖ Dr. Balogh Krisztián Milánnak a T-2 dózisfüggő vizsgálatból származó mintákért és dolgozatom megírása során tanúsított együttműködésért;
- ❖ Ancsin Zsoltnak és Balláné Dr. Erdélyi Mártának a T-2 és fokhagymaolaj együttes vizsgálatából származó mintákért és szakmai tanácsaikért;
- ❖ Bócsai Andreának takarmányozási kísérletekben nyújtott segítségéért;
- ❖ Bencsik Dórának a comet módszer kivitelezésében nyújtott segítségéért; tanácsaiért;
- ❖ Dr. Nagy Péternek a dolgozat készítés folyamata során nyújtott kritikai megjegyzéseiért;
- ❖ Dr. Póti Péternek, az Állattenyésztés-tudományi Intézet vezetőjének, Dr. Mézes Miklósnak, az Állattudományi Alapok Intézet igazgatójának, a Takarmányozástani Tanszék vezetőjének és Dr. Urbányi Bélának, a Halgazdálkodási Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget nyújtottak dolgozatom elkészítéséhez;
- ❖ Drobnyák Árpádnak, aki támogatást nyújtott a dolgozat elkészítése alatt;
- ❖ Barátaimnak és Családtagjaimnak segítségükért.