



Madárembriológiai, illetve *in vitro* ősvarsejt-vizsgálatok

Lázár Bence ^{1,2,3}, Ecker András ^{1,2}, Tóth Arnold ^{1,2}, Tóth Roland ^{1,2},
Gócza Elen ^{*1,2}

¹ Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet,
Állatbiotechnológia Tanszék, Gödöllő

² Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért Nemzeti Laboratórium

³ Nemzeti Biodiverzitás-, és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézet, Gödöllő

Összefoglalás

*A globálisan és hazánkban is évről évre egyre magasabb hőmérséklet és rendkívül aszályos nyarak kedvező feltételeket teremtenek a penészgombák megjelenésének a gabonafélék, takarmányok és élelmiszerek esetében, ami egyre magasabb mennyiségű és egyszerre többféle mikotoxin jelenlétéhez vezet. Ez nemcsak takarmányozási és élelmiszer-biztonsági kockázatot jelent, de az embrionális fejlődést is érinti. Számos felmérés azt is igazolta, hogy a szervezetünk multitoxikus hatásoknak van kitéve. Ennek az az oka, hogy bizonyos környezeti feltételek több penészgomba elszaporodásának is kedvezhetnek. Az állati takarmányok többféle alapanyagból kerülnek összeállításra, így azokba többféle toxin is bekerülhet. Számos kutatás foglalkozott már ezekkel a láthatatlan káros hatásokkal, melyek nem azonnal észlelhetők, de mivel nehezen ürülnek ki a szervezetből, nagyobb koncentrációban felhalmozódva igen komoly egészségügyi problémát okoznak minden élőlénynek. Kutatásunkban a T-2 toxin, a zearalenon (ZEN), valamint ezek együttes, úgynevezett multimikotoxikózis-hatását vizsgáltuk háztüyükembriók fejlődésére és ősvarsejt- (primordial germ cell, PGC) tenyészetek esetében. A vizsgálat középpontjában a fejlődési rendellenességek azonosítása, toxinfelhalmozódást mutató szövetek meghatározása, a génkifejeződés változásainak értékelése, valamint egy *in vitro* sejt kultúramodell-rendszer kidolgozása állt, amelynek segítségével a toxinszennyeződés sejtproliferációra és sejtciklusra gyakorolt kombinált hatásait lehetett kimutatni.*

Kulcsszavak: T-2 toxin, zearalenon, ősvarsejt

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A téma aktualitását a globális környezetváltozás, az évről évre egyre magasabb hőmérséklet és szélsőséges időjárás adja. A NASA felmérései szerint 1880 óta az átlagos hőmérséklet-emelkedés 1,1 °C volt, míg ez a tendencia 1975 óta évtizedenként 0,2 °C-kal emelkedik (LENSSEN ÉS MTSAL, 2024; NASA GISTEMP CSAPAT, 2025). Hazánkban is egyre aszályosabb nyarak és enyhébb telek figyelhetők meg, ami kedvez a szántóföldi penészgombák folyamatos terjedésének és a mikotoxinok széles spektrumú jelenlétének.

A mikotoxinok egyes penészgombák másodlagos anyagcseretermékei, jellemzőjük az alacsony molekulásúly, illetve, hogy toxikus hatást fejtenek ki emberekre és állatokra egyaránt. Jelen vannak a legtöbb élelmiszerben, legyen az növényi vagy állati eredetű. Megtalálhatók a gabonafélékben, az olajos magvakban, a gyümölcsökben, a tejtermékekben és a borban is. Előfordulási gyakoriságuk eltér a különböző földrajzi helyeken, például az afrikai országokban jellemzően magasabbak az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok által termelt mikotoxin-koncentrációk, mivel a magas hőmérséklet és a páratartalom kedvez ezen gombák szaporodásának (DRUSCH ÉS RAGAB, 2003;

KHOURY ÉS MTSAL, 2006; MARTINS ÉS MTSAL, 2007; KHOURY ÉS MTSAL, 2008; DOI ÉS UETSUKA, 2011; DARWISH ÉS MTSAL, 2014; NLEYA ÉS MTSAL, 2018; KHOURY ÉS MTSAL, 2019).

A gabonaalapú összetevők mikotoxinnal történő szennyeződése a feldolgozás előtt és után is megtörténhet, mivel az ezeket termelő gombák jelen lehetnek a növény vegetációs időszakától a betakarításon át a feldolgozásig bárhol. A gombák mennyiségének növekedését számos faktor befolyásolja, így az éghajlat, időjárás, domborzati viszonyok, a betakarítás ideje, vagy a tárolási és szállítási körülmények. A zearalenon toxin elsősorban a betakarítást megelőzően szokott képződni, de a nem megfelelő raktári tárolás során is megjelenhet. Gyakran más *Fusarium* mikotoxinokkal együtt jelenik meg, főleg dezoxinivalenol (DON) mellett (MARTINS, 2007; ROHWEDER ÉS MTSAL, 2011; GRENIER ÉS APPLGATE, 2013; MURUGESAN ÉS MTSAL, 2015).

A gabonafélék és a belőlük készült állati takarmányok a háziállatok takarmányozásának rendkívül lényeges összetevői. Nagy gondot jelent a gabonafélék etetése során azok mikotoxin-tartalma, mivel a gabonaalapú takarmányok körülbelül 70%-a szennyezett legalább egyféle mikotoxinnal (DIEKMAN ÉS GREEN, 1992; STREIT ÉS MTSAL, 2013).

A ZEN erősen citotoxikus és genotoxikus hatású, de a fő kockázati forrást hormonális hatása jelenti (DELLAFIORA ÉS MTSAL, 2017). A xenoösztrógenek közé tartozik, kémiai szerkezete hasonló a természetes ösztrogén szerkezetéhez, mint például a 17 β -ösztradiol (E2), így az ösztrogénreceptorhoz tud kötődni, ezzel képes a hormonháztartást megzavarni, ami számos szaporodásbiológiai problémához vezethet (KOWALSKA ÉS MTSAL, 2016). Ezen tulajdonságai miatt a ZEN a gazdasági haszonállatoknál ösztrogéndominanciát, szaporodásbiológiai és fertilitási problémákat tud okozni.

A baromfifajták viszonylag toleránsak a ZEN toxicitásával szemben, ami feltehetőleg a baromfi vérében található magas ösztrogén, főként E2-szintnek köszönhető. A természetesen előforduló ösztrogének magasabb receptoraftinitással rendelkeznek, mint a *Fusarium* toxinok (VÖLKE ÉS MTSAL, 2011), de a ZEN serkentő hatású lehet a petefészek fejlődésére nőivarban, továbbá hímeknél késést okozhat a here fejlődésében (ALLEN ÉS MTSAL, 1981). Alacsony dózisú ZEN-bevitel ugyan nem jelent teljesítménycsökkenést a baromfiféléknél, de folyamatos fogyasztás esetén a ZEN vagy annak metabolitjai kimutathatók lesznek a vérből, a májból és a bélrendszerből is (LIU ÉS APPLGATE, 2020).

A kísérleteinkben szintén használt T-2 mikotoxint általában a *Fusarium tricinctum*, a *F. sporotrichioides*, a *F. poae*, a *F. graminearum* és a *Trichoderma viridae* fajok termelik (CREPPY, 2002). A T-2 a gombák másodlagos metabolitjaként jelenik meg, és hasonlóan fontos megemlíteni a HT-2-t is, mely a T-2 metabolitjaként alakul ki. Leginkább a gabonaféléket (árpa, búza, rozs, zab, kukorica) károsítja. Hőmérsékleti optimuma viszonylag alacsony, 8-14 °C, így a mérsékelt övön széles körben elterjedt (RABIE ÉS MTSAL, 1986). A T-2 megjelenésének elsődleges oka a magvak nedvességnek való kitettsége lehet. Ez előfordulhat akkor, ha a termés még a szántóföldön, a betakarításkor vagy azután marad nedves környezetben, de ugyanígy megtörténhet nem megfelelő tárolási körülmények között is. Kevésbé jól tűri a hőhatásokat, a legkevésbé 37 °C-on stabil (TRUSAL, 1985).

Kémiai felépítését tekintve spiro-epoxi-szeszkviterpén vázú tetraciklusos vegyületet alkot. Metabolitjától, a HT-2-től csupán a negyedik szénatomon levő acetylcsoporthoz különbözik. A kettő hatását megkülönböztetni nem is egyszerű feladat, ugyanis az állati szervezetbe bekerülve nagy gyorsasággal alakul át a T-2 HT-2-vé (ERIKSEN ÉS PETERSSON, 2004). Toxikus hatása többféleképpen is megnyilvánulhat. Alapvetően az eukarióta sejtekben károsítja a mitokondriumot, akadályozza a DNS, RNS és fehérje szintézisét. Utóbbi kétféleképpen játszódhat le: iniciációs stoppként, vagyis a peptidkötések létrejöttének gátlásaként vagy elongációs és terminációs stoppként, azaz a riboszóma

poliszómába való belépésének gátlásaként. Jó hír viszont, hogy a toxin a májban lebomlik, az izmokban instabil állapotban van, így gyorsan ürül és nem akkumulálódik (GYONGYOSSY-ISSA ÉS MTSAL, 1985; KOLOZSVÁRI, 2009).

Az első két feljegyzés a T-2 toxin hatásairól a második világháború alatt történt Oroszországban, majd később Japánban, míg az első humán megbetegedés Kínában fordult elő (MATEO ÉS MTSAL, 2002; WANG ÉS MTSAL, 1993). A sertések rendkívül érzékenyek erre a toxinra, mégis ritkák a súlyos mérgezések, mert az állatok a fertőzött takarmányt visszautasítják. Hízóknál a súlygyarapodás visszaesik, dermatotoxikus hatások jelennek meg az orron, a szájban. Drasztikusan károsítja az immunrendszert a fehér csontvelő irreverzibilis károsításával, aminek hatására csökken a vérben a fehérvérsejtek aránya. Jellegzetes tünetei a szédülés, hidegrázás, émelygés, hasmenés, hasi fájdalmak, vetélés is (ERIKSEN, 2003; RICHARD ÉS MTSAL, 2003).

A baromfik esetében a toxin különböző tüneteket eredményezhet. Tojóállományok esetén nem tapasztalhatunk takarmány-visszautasítást, de jelentős negatív hatással van a tojástermelésre és a tojások keltethetőségére. Emellett súlyosan károsítja a májat is (disztrófia, zsírosodás). Húshasznú brojlercsirkék esetén viszont fellép a csökkent takarmányfogyasztás, ezzel párhuzamosan pedig a súlygyarapodás visszaesése is (KOLOZSVÁRI, 2009; YAZAR ÉS OMURTAG, 2008).

A fent említett két toxin együttes vizsgálatát az indokolta, hogy mindkettőnek hasonló környezeti igényei vannak, így együttes előfordulásuk gyakori. Az egyes mikotoxinok közös, egymást erősítő, úgynevezett szinergista hatásának vizsgálata fontos kutatási feladat.

2. *In vivo* vizsgálatok

2.1. *Anyag és módszer*

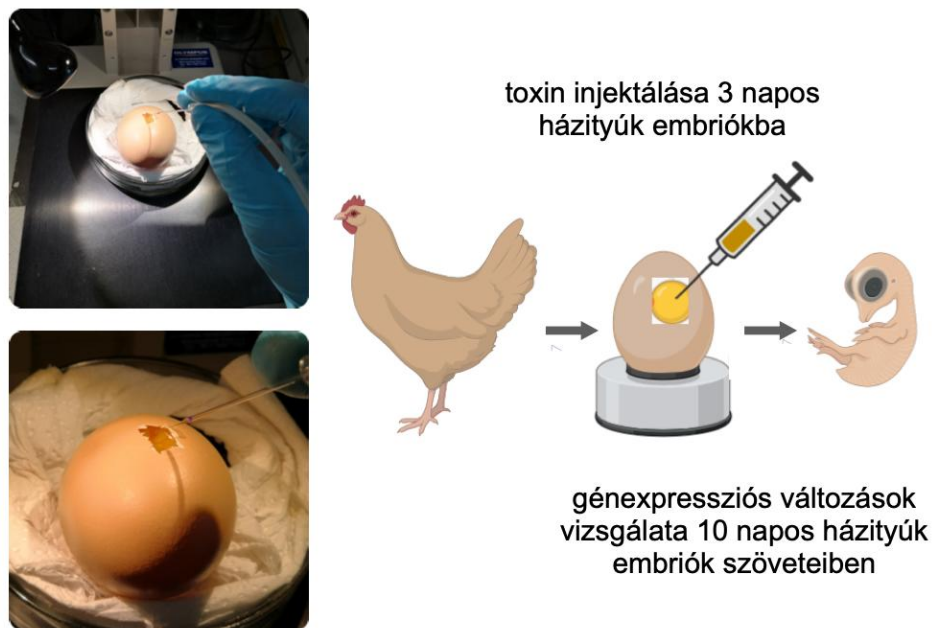
A MATE Genetika és Biotechnológia Intézetében (GBI) végzett vizsgálatainkban kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk tojásait használtunk fel. A tojásokat a NBGK Haszonállat Génmegőrzési Intézetéből kaptuk. A keltetés a GBI-ben, a kísérleti keltetőben történt 37,8 °C-on, 60%-os páratartalom mellett. A tojásokat az embrionális fejlődés 3. napjáig inkubáltuk. A tojások oldalán ablakot nyitottunk először a meszes héj, majd a sziket fedő membránok óvatos eltávolításával, így lehetővé téve az embrióba történő mikroinjektálást. A különböző koncentrációjú T-2 és ZEN mikotoxin-tartalmú oldatokat közvetlenül a háromnapos embriók szívébe injektáltuk egy üvegkapilláris segítségével (1. ábra).

A toxinoldatok hígítószere minden esetben DMEM-médium és steril víz 2:1 arányú keveréke volt, valamint a kontrollcsoport oldata 1-1%-ban tartalmaztak metanolt és etanolt is, mivel a toxintörzsoldatok is ezekben lettek feloldva. T-2-t 5ng/μl koncentrációban, ZEN-t 20ng/μl koncentrációban, valamint a két toxin kevert oldatát, ami 5ng/μl T-2-t és 20ng/μl-es ZEN-t tartalmazó oldatokat használtunk. A vizsgálat során négy kísérleti csoportot alkalmaztunk: „kontroll”, „T-2”, „ZEN”, „T-2 + ZEN”. Az injektálásokat három ismételtesben végeztük, minden esetben 10 injektált embrió/csoport volt a tervezett mintaszám. Összesen 180 tojást használtunk fel. Az injektálások után a tojásokat laboratóriumi parafilmmel zártuk le és tovább keltettük a fejlődés 10. napjáig. 10 napos korban azt vizsgáltuk, hogy látható-e fejlődési rendellenesség, illetve, hogy kimutatható-e a toxin akkumulációja különböző szervekben (máj, ivarszerv, elővese), valamint a szikben és a tojásfehérjében. Az embriók májának kis lebényéből RNS-t izoláltunk qPCR-analízishez, ezzel az injektálás sikerességét ellenőriztük. A génexpresszió alapján kiválasztott egyedek máj- és ivarszervmintáinak fixálását követően, immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk. A szövetmintákból proteináz K-t tartalmazó lízispufferben történő emésztést követően, fenol-kloroformos DNS-izolálást végeztünk, amit PCR-alapú ivarmeghatározáshoz használtunk fel (CHD1 primer). A PCR-termékek elektroforézise 1,5%-os agarózgélben történt.

A qPCR-es analízishez gyűjtött szerveket 300 µl TRIzol® oldatban, -70 °C-on tároltuk. Az izolált RNS-mintákat cDNS-íráshoz használtuk fel (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)). A qPCR-reakcióhoz SYBR Green festéket használtunk. Három párhuzamos mérést végeztünk Eppendorf Mastercycler Realplex készüléket alkalmazva. Belső kontrollként (háztartási géneként) β -aktint (ACTB) alkalmaztunk, szuperoxid-dizmutáz 1 (SOD) és a kataláz (CAT) expresszióját vizsgáltuk.

A metszet készítéshez a szerveket 24-es plate-re gyűjtöttük, steril PBS-ben, majd a fixálás előtt a májat, az ivarszervet és a mezonefroszt megtisztítottuk a rajta maradt kötőszövetektől, majd a szerveket 4%-os PFA-ban fixáltuk. Ezt követően a mintákat 10%-os, 20%-os, 30%-os szukróz oldatsorba helyeztük egy-egy hétre. A szerveket ezek után 7,5%-os zselatinoldatba ágyztuk, majd izopentánban -50 °C-on lefagyasztottuk. A fagyott zselatinkockából kriosztát segítségével met-szeteket készítettünk. A metszeteken T-2 toxin specifikus antitesttel tudtuk detektálni a mezonefroszban és az ivarszervben felhalmozódott T-2 toxint.

A szik- és fehérjeminták mikotoxin-tartalmát, valamint az állatokkal etetett takarmányt és az injektált oldatok valós toxinkoncentrációját ELISA-alapú kvantitatív immunoassayvizsgálatot alkalmazva határoztuk meg. Minden esetben a kit gyártójának ajánlása alapján végeztük az extrakciókat és a vizsgálatokat. A mérési eredményeket MS Excel program segítségével elemeztük.

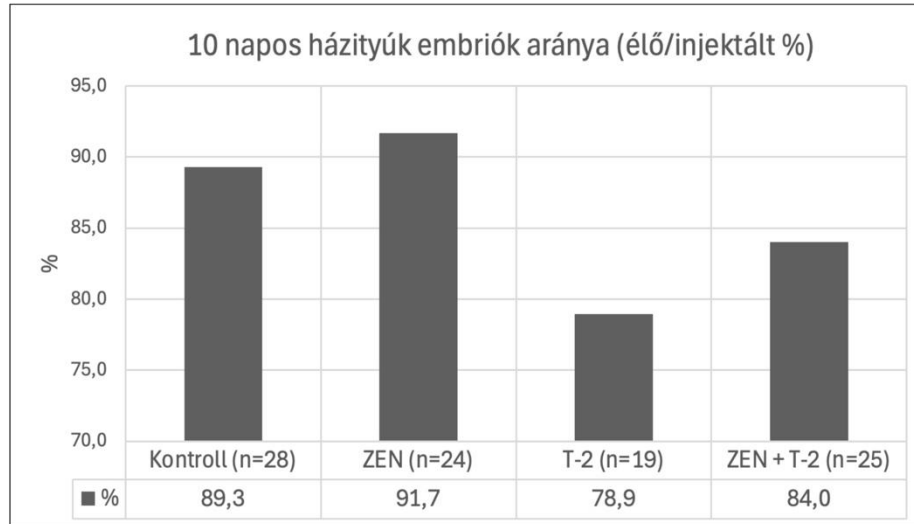


1. ábra. Toxin injektálása háromnapos embriók szívébe

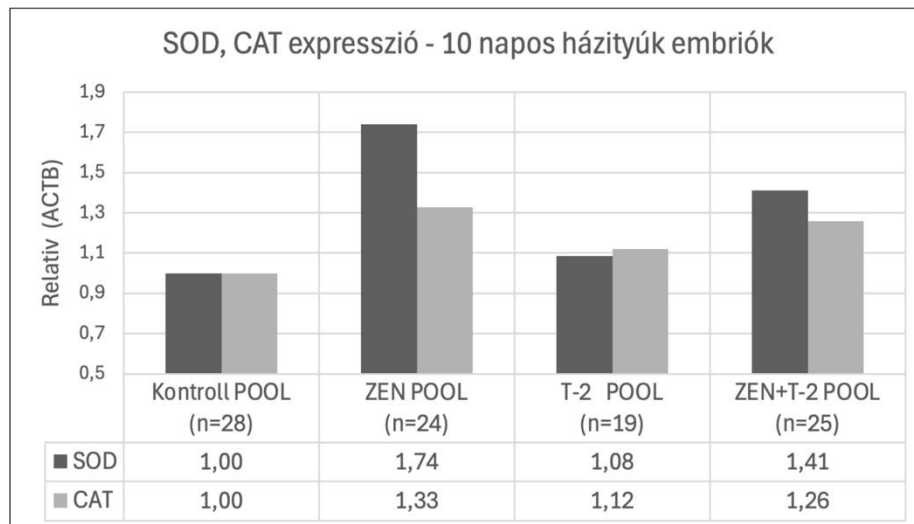
(Forrás: az ábra BioRender szoftvert alkalmazva készült)

2.2. Eredmények és értékelésük

Kísérleteink során három ismétlésben, ismétlésenként négy vizsgálati csoporttal dolgozva, összesen 121 embriót használtunk. 96 embrió esetében volt az injektálás sikeresnek tekinthető. Kizártuk azokat az embriókat, amelyek közvetlenül az injektálás után pusztultak el, mivel ezek az embriók az injektálási eljárás következtében, nem pedig a toxin hatása miatt pusztulhattak el. A keltetés 10. napján 83 élő embriót vizsgáltunk meg és készítettük elő további kísérletekhez. A kontrollegyedek 89,3%-ban maradtak életben. A toxinkezelt csoportokból ZEN esetében 91,7%, a T-2 esetében 78,9%, a kevert oldatból kapott embriók esetében pedig 84% volt a túlélési arány (2. ábra).



2. ábra. Az injektált embriók száma (n) és az injektálást túlélő embriók aránya (%)



3. ábra. A kontroll- és injektált minták esetében az azonos kezelésen átesett mintákból kinyert RNS-eket pooloztuk. Belső kontrollként β -aktint (ACTB) alkalmaztunk, a szuperoxid-dizmutáz 1 (SOD) és a kataláz (CAT) expresszióját hasonlítottuk össze a poolok esetében (n: a vizsgálatba bevont embriók száma)

A vizsgált gének expressziójának növekedése az injektálás során bevitt toxinok hatását mutatta, igazolva, hogy a mikotoxinok az embrióban oxidatív stresszt váltottak ki. A qPCR-analízis alapján a poolozott minták vizsgálatát követően a kontrollhoz viszonyítva elsősorban a SOD1 gén emelkedett expressziója volt megfigyelhető a ZEN és a ZEN + T-2 csoportban, míg a T-2-csoportban nem mutatkozott változás (3. ábra).

Jövőbeli terveink között szerepel további multitoxin-kombinációk injektálása házityúkembriókba. Ebben az esetben azt várjuk, hogy már kisebb egyedi toxinkoncentrációkat alkalmazva is látható lesz a toxinok hatása az embriók fejlődésére.

A fentebb bemutatott, előzetes eredmények alapján megállapítható, hogy bár az általunk alkalmazott koncentrációtartományban a toxinok nem voltak hatással az embriók mortalitási rátájára, de a bejuttatott toxinok hatására létrejött oxidatív stressz okozta változásokat ki lehetett

mutatni. A vizsgálatban legyűjtött minták további elemzését tervezzük, immunhisztokémiai vizsgálatokat, qPCR-analízist a tojásfehérjéből és a szikból eltett mintákban a toxinok koncentrációjának meghatározását és további genexpressziós vizsgálatokat is tervezünk.

3. *In vitro* vizsgálatok

Az *in vitro* vizsgálatainkat egy transzgénikus házityúkősisvarsejt-vonalon végeztük. A sejtvonalba bevitt FUCCI- (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) konstrukció a sejtciklus különböző stádiumaiban eltérő színű riportergént expresszál, ami a G1-G0 fázisokban piros, az S fázisban sárga, a G2 fázisban pedig zöld fluoreszcens markerként jelenik meg a sejtek citoplazmájában (SAKAUE-SAWANO ÉS MTSAL, 2008). Mivel a sejtciklus egy kifejezetten komplex folyamat, amit több külső és belső tényező is befolyásol (ISRAELS ÉS ISRAELS, 2000), egy FUCCI-hoz hasonlóan érzékeny és gyors reagálású modell jelentősen megkönnyíti a sejtciklus folyamatait irányító hatások megfigyelését.

Mivel a mikotoxinoknak jelentős hatásuk van az állatok szaporodásbiológiai folyamataira, és a sejtek proliferációs rátájára is, így az ősisvarsejtek (őscsírasejtek, PGC-k), vagyis az ivarsejtek prekursorainak *in vitro* vizsgálata fontos eredményeket szolgáltathat ezen hatások megértéséhez. Az ősisvarsejt-tenyészetek használatát az teszi lehetővé, hogy házityúk esetén a PGC-vonalak létrehozására, azok fenntartására hatékony protokollok állnak rendelkezésre (WHYTE ÉS MTSAL, 2015).

3.1. Anyag és módszer

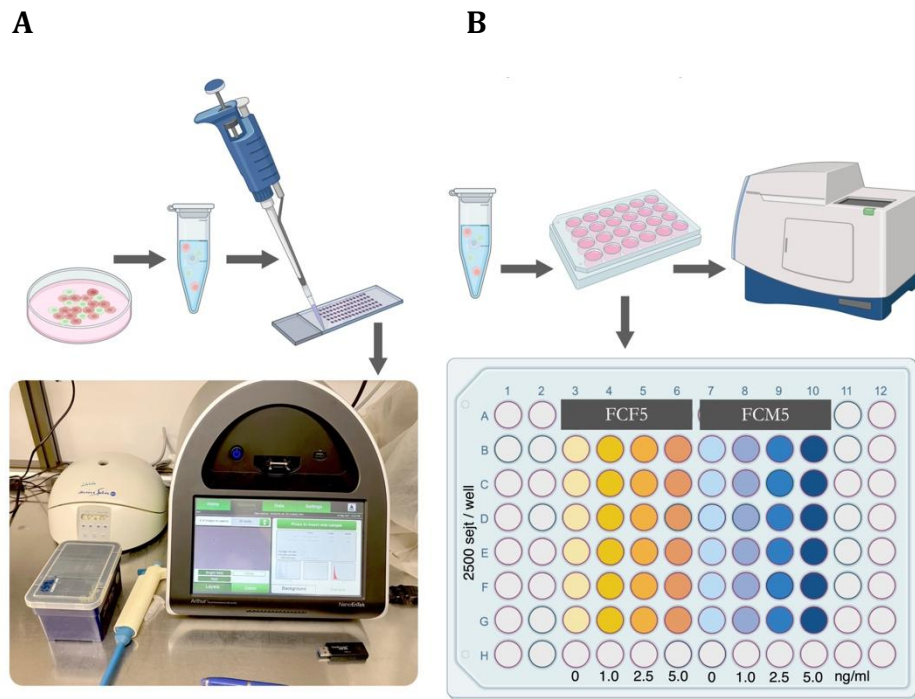
Az ősisvarsejteket fehér magyar tyúk embrióiból nyertük ki. A tojásokat 60 órán keresztül inkubáltuk 37,8 °C hőmérsékleten, majd az embriók dorzális aortájából 1-2 µl vért izoláltunk. Az embrionális fejlődés ezen stádiumában (a Hamburger-Hamilton 14–16. stádiuma) a PGC-k a vérkeringést használják a germinális félholdból az ivarlécekbe történő vándorlásukhoz, így a vérrel együtt ezeket a sejteket is izolálni lehet az embrióból. Ezek után a vért az ősisvarsejtekre specifikus tenyésztőmédiumba helyezve, a sejteket inkubátorban tenyésztettük tovább. Az említett médium az ősisvarsejtek osztódását támogatja, míg a vér egyéb sejtsejtes elemei elpusztulnak, így 3-4 hét tenyésztés után tiszta PGC-tenyészeteket hozhatunk létre.

A toxikológiai kísérleteinkhez két, általunk létrehozott, egy sejteredetű transzgénikus ősisvarsejt-vonalat használtunk. Az FCF5 (ZW) nőivarú és az FCM5 (ZZ) hímivarú tenyészetek minőségét qPCR-es, immunhisztokémiai, DNS-szekvenálási vizsgálatokkal, valamint timelapse videók készítésével validáltuk (ECKER ÉS MTSAL, 2024).

A mikotoxin kezeléshez ZEN és T-2 toxinokat használtunk. A PG-sejteket 96-well-es sejtenyésző edényekben (plate-ekben) kultiváltuk, 2500 sejt/well koncentrációban. A sejtszámolás a NanoEntek Arthur fluoreszcens sejtanalizátor segítségével történt (4.A ábra). A méréshez a ZEN esetén 5; 10; és 20ng/ml, a T-2 esetén pedig 1; 2,5; és 5ng/ml koncentrációkban vizsgáltuk a toxin hatását a sejtek duplikációs rátájára. A szinergista hatások kimutatását célzó együttes kezelésnél a ZEN koncentráció 10, illetve 20ng/ml volt, és ehhez társult a T-2 1; 2,5; vagy 5ng/ml-es koncentrációja. A méréshez az ImageXpress Pico automatizált képkövető és képelemző rendszert használtuk (4.B ábra), ami a tenyészetekről 48 órán keresztül, 4 óránként készített képeket. 3-3 párhuzamos well-ben mért sejtszámok átlagát összehasonlítva végeztük el az adatok kiértékelését. Ezekkel a mérésekkel részletes bepillantást nyerhettünk a hosszabb mikotoxin-kitettség okozta folyamatokra a házityúk ősisvarsejtek sejtciklusa esetén.

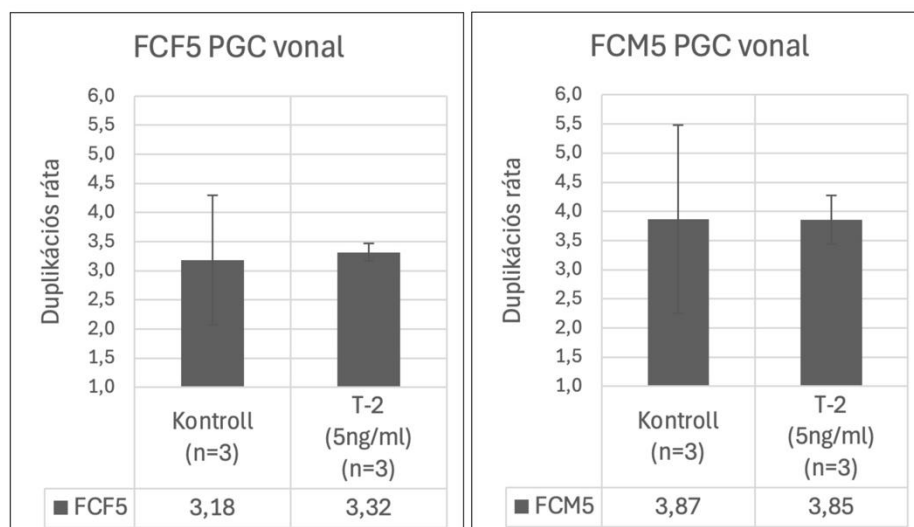
3.2. Eredmények és értékelésük

Eredményeink azt mutatták, hogy 5ng/ml T-2-koncentráció-kezelés esetében az FCF5 (ZW), és az FCM5 (ZZ) PGC-vonalaknál a duplikációs rátában nem volt szignifikáns eltérés (5. ábra), azonban a 2,5 és 5ng/ml T-2-koncentráció megemelte a G1-G0 fázisban levő piros sejtek arányát a tenyészetben. A G0 vegetatív fázis általában akkor aktiválódik a sejteknél, ha olyan negatív környezeti hatás éri őket, ami miatt felfüggesztik a sejtciklust az említett hátrányos hatás elmúlásának idejére. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a T-2 mikotoxin jelenléte érzékenyen érintette a sejtek sejtciklusát. A ZEN esetén ezt a változást nem figyeltük meg, azonban a kombinált kezelés nem csak a piros sejtek arányát emelte meg a tenyészetben (1; 2,5ng/ml T-2 + 20ng/ml ZEN), hanem bizonyos esetekben (5ng/ml T-2 + 20ng/ml ZEN) a nem fluoreszcens sejtek arányát is. A transzgénikus vonalainkban a tartósan nem fluoreszcens sejtek legtöbbször az elpusztult sejteket jelentik. Ez alapján valószínűsíthető, hogy ez a toxinkoncentráció már nem csak vegetatív stádiumba szorította a sejteket, hanem el is pusztította azokat.

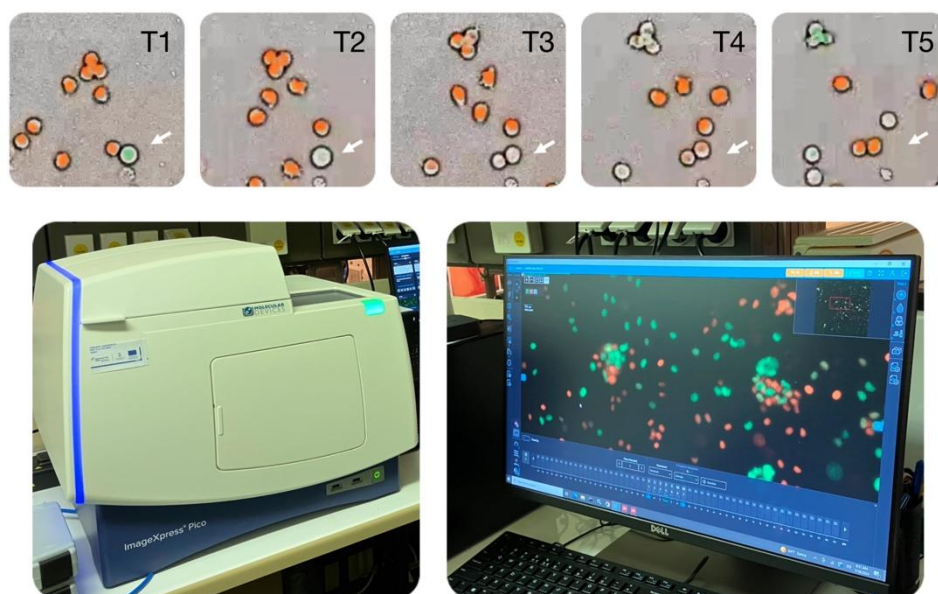


4. ábra. A PG sejtek toxin kezelésének menete. A: Sejtszám meghatározása Arthur fluoreszcens sejtanalizátort alkalmazva. B: ImageXpress Pico automatizált képalkotó és képelemző rendszer alkalmazása a sejtszám meghatározására. Az ábra alsó részében látható a mérések során alkalmazott mérési elrendezés egy 96-well-es tenyésztőedény esetében

(Forrás: az ábra BioRender szoftvert alkalmazva készült)



5. ábra. FUCCI riporter gént expresszáló FCF5 és FCM5 PGC-vonalak duplikációs rátájának összehasonlítása. A sejtszám meghatározása az ImageXpress Pico automatizált képalkotó és képelemző rendszert alkalmazva történt. Az ábrán látható, hogy az 5ng/ml T-2 koncentrációjú toxinkezelés hatására a sejtvonalak duplikációs rátája nem mutatott szignifikáns változást (n: a párhuzamos mérések számát mutatja)



6. ábra. A FUCCI riporter gént expresszáló FCF5 és FCM5 PGC-vonalak esetében a sejtciklus fázisainak elemzése az ImageXpress Pico automatizált képalkotó és képelemző rendszert alkalmazva történt. A mérés során négyóránként került meghatározásra a piros (G1), sárga (S) és zöld (G2) fluoreszcenciát mutató sejtek, illetve a nem fluoreszcens (M) fázisban található sejtek, valamint a szintén nem fluoreszkáló, elpusztult sejtek száma. A felső képsor mutatja be azt, hogy hogyan változik a PG-sejtek fluoreszcenciája a sejtciklus különböző fázisaiban, a nyíl által jelzett sejt/sejtek esetében T1, T2 (G2), T3 (M), T4, T5 (G1)

Köszönetnyilvánítás

A kutatásokat a GÉNNET21 (VEKOP-2.3.2-16-2016-00012), 2019-2.1.11-TÉT-2019-00036, NETPOULSAFE (H2020-RUR-101000728) és az „Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért” elnevezésű RRF-2.3.1-21-2022-00007 pályázatok támogatták.

Irodalom

- ALLEN, N. K., MIROCHA, C. J., WEAVER, G., AAKHUS-ALLEN, S., & BATES, F. (1981). Effects of dietary zearalenone on finishing broiler chickens and young turkey poults. *Poultry Science*, 60(1), 124–131. <https://doi.org/10.3382/ps.0600124>
- CREPPY, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127(1–3), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9)
- DARWISH, W. S., IKENAKA, Y., NAKAYAMA, S. M. M., & ISHIZUKA, M. (2014). An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *J. Vet. Med. Sci.*, 76(6), 789–797. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0563>
- DELLAFIORA, L., RUOTOLO, R., PEROTTI, A., CIRLINI, M., GALAVERNA, G., COZZINI, P., BUSCHINI, A., & DALL'ASTA, C. (2017). Molecular insights on xenoestrogenic potential of zearalenone-14-glucoside through a mixed in vitro/in silico approach. *Food Chem. Toxicol.*, 108, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.062>
- DIEKMAN, M. A., & GREEN, M. L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.*, 70(5), 1615–1627. <https://doi.org/10.2527/1992.7051615x>
- DOI, K., & UETSUKA, K. (2011). Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, 12(8), 5213–5237. <https://doi.org/10.3390/ijms12085213>
- DRUSCH, S., & RAGAB, W. (2003). Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J. Food Prot.*, 66(8), 1514–1527. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1514>
- ECKER, A., LÁZÁR, B., TÓTH, R. I., URBÁN, M., HOFFMANN, O. I., FEKETE, ZS., BARTA, E., UHER, F., MATULA, ZS., VÁRKONYI, E., & GÓCZA, E. (2024). Creating a novel method for chicken primordial germ cell health monitoring using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator reporter system. *Poult Sci*, 103(10), 104144. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104144>
- EL KHOURY, A., RIZK, T., LTEIF, R., AZOURI, H., DELIA, M. L., & LEBRIHI, A. (2006). Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *J. Agric. Food Chem.*, 54(23), 8977–8982. <https://doi.org/10.1021/jf062085e>
- EL KHOURY, A., RIZK, T., LTEIF, R., AZOURI, H., DELIA, M. L., & LEBRIHI, A. (2008). Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46(6), 2244–2250. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.026>
- ERIKSEN, G. S. (2003). Metabolism and Toxicity of Trichothecenes, *Doctoral thesis*, Uppsala, Sweden
- ERIKSEN, G. S., & PETTERSSON, H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 114(1–4), 205–239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.08.008>
- GRENIER, B., & APPLGATE, T. J. (2013). Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins (Basel)*, 5(2), 396–430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>
- GYONGYOSSY-ISSA, M. I. C., KHANNA, V., & KHACHATOURIANS, G. C. (1985). Characterisation of hemolysis induced by T-2 toxin. *Biochim. Biophys. Acta*, 838(2), 252–256. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90086-8)
- ISRAELS, E. D., & ISRAELS, L. G. (2000). The Cell Cycle. *Oncologist*, 5(6), 510–513. <https://doi.org/10.1634/the-oncologist.5-6-510>
- KHOURY, D. E., FAYJALOUN, S., NASSAR, M., SAHAKIAN, J., & AAD, P. Y. (2019). Updates on the Effect of Mycotoxins on Male Reproductive Efficiency in Mammals. *Toxins (Basel)*, 11(9), 515. <https://doi.org/10.3390/toxins11090515>
- KOLOZSVÁRI, T. (2009). A mikotoxinok szerepe a gazdasági haszonállatok takarmányozásában. *Diploma dolgozat*
- KOWALSKA, K., HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA, D. E., & PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 48, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>
- LENSSEN, N., SCHMIDT, G. A., HENDRICKSON, M., JACOBS, P., MENNE, M. J., & RUEDY, R. (2024). 'A NASA GISTEMPv4 Observational Uncertainty Ensemble', *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 129(17), <https://doi.org/10.1029/2023JD040179>
- LIU, J., & APPLGATE, T. (2020). Zearalenone (ZEN) in Livestock and Poultry: Dose, toxicokinetics, toxicity and estrogenicity. *Toxins (Basel)*, 12(6), 377. <https://doi.org/10.3390/toxins12060377>
- MARTINS, H. M., GUERRA, M. M. M., & BERNARDO, F. M. D. A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995–2004). *Rev. Iberoam. Micol.*, 24(1), 69–71. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70017-7)
- MATEO, J. J., MATEO, R., & JIMÉNEZ, M. (2002). Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 72(1–2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00625-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00625-0)

- MURUGESAN, G. R., LEDOUX, D. R., NAEHRER, K., BERTHILLER, F., APPELGATE, T. J., GRENIER, B., PHILLIPS, T. D., & SCHATZMAYR, G. (2015). Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult. Sci.*, 94(6), 1298–1315. <https://doi.org/10.3382/ps/pev075>
- NASA GISTEMP TEAM (2025). 'GISS Surface Temperature Analysis (GISTEMP) version 4', Dataset accessed 2025-05-27 at <https://data.giss.nasa.gov/gistemp/>
- NLEYA, N., ADETUNJI, M. C., & MWANZA, M. (2018). Current Status of Mycotoxin Contamination of Food Commodities in Zimbabwe. *Toxins (Basel)*, 10(5), 89. <https://doi.org/10.3390/toxins10050089>
- RABIE, C. J., SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., LÜBBEN, A., & MARASAS, W. F. O. (1986). T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(3), 594–596. <https://doi.org/10.1128/aem.52.3.594-596.1986>
- RICHARD, J., PAYNE, G., DESJARDINS, A., MARAGOS, C., NORRED, W., & PESTKA, J. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. *CAST Task Force Report*, 139. 101–103.
- ROHWEDER, D., VALENTA, H., SONDERMANN, S., SCHOLLENBERGER, M., DROCHNER, W., PAHLOW, G., DÖLL, S., & DÄNICKE, S. (2011). Effect of different storage conditions on the mycotoxin contamination of *Fusarium culmorum*-infected and non-infected wheat straw. *Mycotoxin Res.*, 27, 145–153. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0087-6>
- SAKAUE-SAWANO, A., KUROKAWA, H., MORIMURA, T., HANYU, A., HAMA, H., OSAWA, H., KASHIWAGI, S., FUKAMI, K., MIYATA, T., MIYOSHI, H., IMAMURA, T., OGAWA, M., MASAI, H., & MIYAWAKI, A. (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell*, 132(3), 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>
- STREIT, E., SCHWAB, C., SULYOK, M., NAEHRER, K., KRŠKA, R., & SCHATZMAYR, G. (2013). Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins (Basel)*, 5(3), 504–523. <https://doi.org/10.3390/toxins5030504>
- TRUSAL, L. R. (1985). Stability of T-2 mycotoxin in aqueous media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(5), 1311–1312. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1311-1312.1985>
- VÖLKE, I., SCHRÖER-MERKER, E., & CZERNY, C.-P. (2011). The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. *Food Nutr. Sci.*, 2(8), 852–867. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.28117>
- WANG, Z. G., FENG, J. N., & TONG, Z. (1993). Human toxicosis caused by moldy rice contaminated with *Fusarium* and T-2 toxin. *Biomed. Environ. Sci.*, 6, 65–70.
- WHYTE, J., GLOVER, J. D., WOODCOCK, M., BRZESZCZYŃSKA, J., TAYLOR, L., SHERMAN, A., KAISER, P., & MCGREW, M. J. (2015). FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 5(6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.008>
- YAZAR, S., & OMURTAG, G. Z. (2008). Fumonisin, trichothecenes and ralenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11), 2062–2090. <https://doi.org/10.3390/ijms9112062>

Avian embryological and *in vitro* primordial germ cell studies

Bence Lázár ^{1,2,3}, András Ecker ^{1,2}, Arnold Tóth ^{1,2}, Roland Tóth ^{1,2}, Elen Gócza  ^{*1,2}

¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences,

Institute of Genetics and Biotechnology, Animal Biotechnology Department, Gödöllő, Hungary

²Agribiotechnology and Precision Breeding for Food Security National Laboratory, Gödöllő, Hungary

³National Centre for Biodiversity and Gene Conservation, Institute for Farm Animal Gene Conservation, Gödöllő, Hungary

Summary

*Global climate change, characterized by rising temperatures and progressively drier summers, has generated optimal conditions for the proliferation of molds in cereals, animal feeds, and food products. This has led to elevated concentrations and a broader spectrum of mycotoxins worldwide, including in Hungary. Mycotoxins represent a significant risk to both food and feed safety and have been associated with the disruption of embryonic development in numerous species. A broad range of investigations indicates that exposure to multiple mycotoxins is common, as environmental factors often promote the simultaneous growth of different mold species. Furthermore, the mixed cereal composition of animal feeds increases the likelihood of simultaneous contamination by various mycotoxins. The toxic effects of these compounds are often impaired by their slow elimination rates, which allow bioaccumulation and can ultimately result in toxic concentrations capable of causing rapid and severe pathophysiological outcomes. The present study evaluates the individual and combined effects of T-2 toxin and zearalenone (ZEN)—a condition referred to as multi-mycotoxicosis—on the development of *Gallus gallus domesticus* (chicken) embryos and on chicken Primordial Germ Cell (PGC) cultures. The investigation focused on identifying developmental abnormalities, determining tissue types in which toxin accumulation occurs, assessing alterations in gene expression, and developing an *in vitro* cell culture model system to detect multiple effects of toxin contamination on cell proliferation and the cell cycle.*

Keywords: T-2 toxin, zearalenone, germ cell