

Fusarium mikotoxinok sejtélettani hatásának vizsgálata ideg- és asztroglia sejtenyészeteken

Szentgyörgyi Viktória, Tagscherer-Micska Brigitta, Rátkai Anikó,
Schlett Katalin, *Tárnok Krisztián

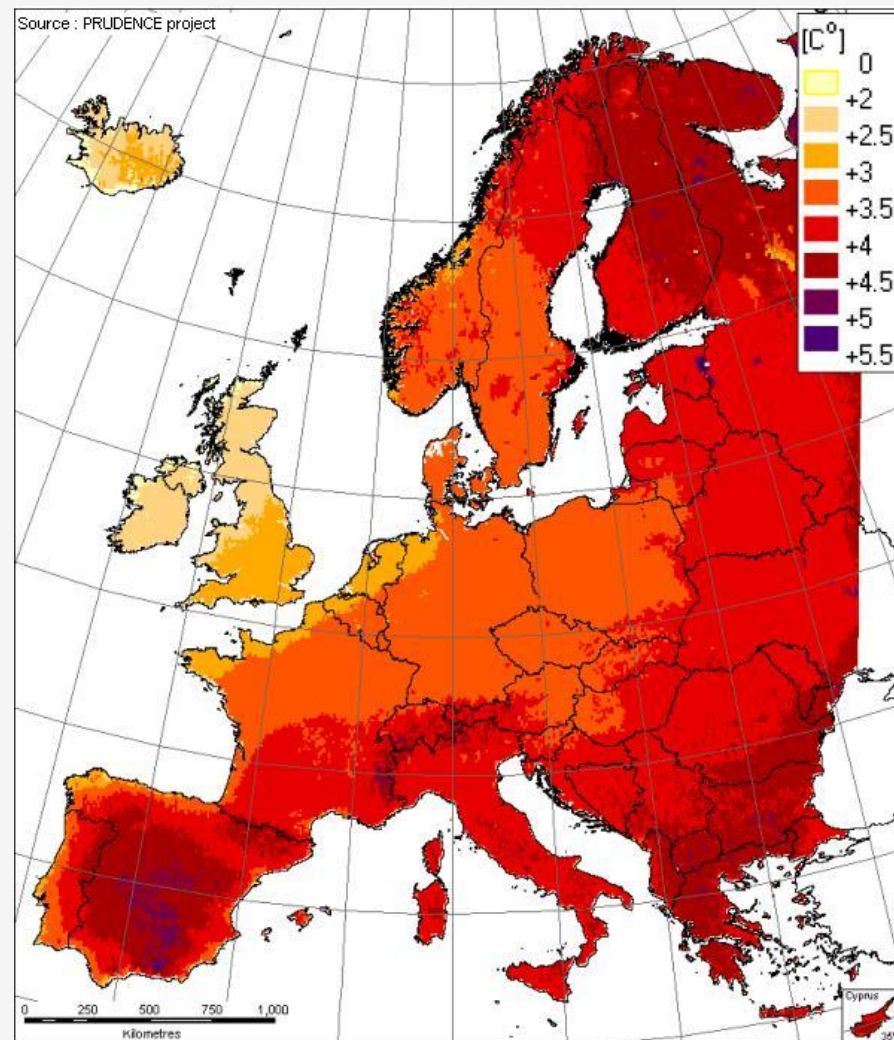
EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
BIOLÓGIAI INTÉZET, ÉLETTANI ÉS NEUROBIOLÓGIAI TANSZÉK



A mezőgazdaság kihívásai a klímaváltozás tükrében

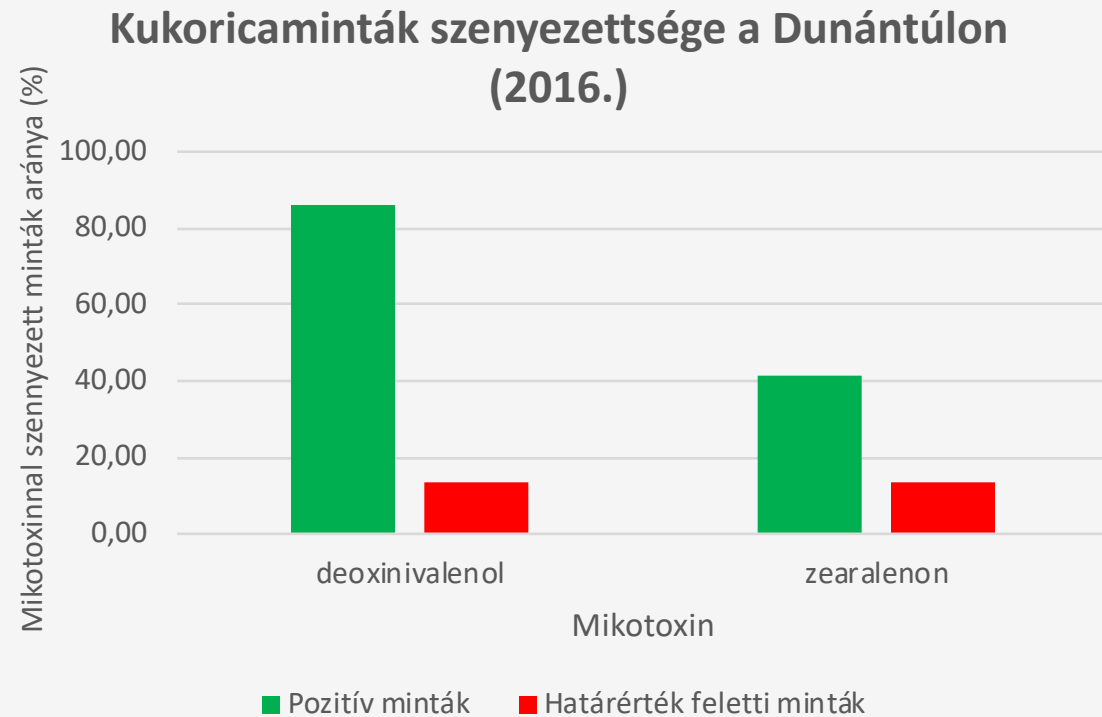


Változás az évi középhőmérsékletben a következő 100 évben (A2 scenárió)



Fusarium mikotoxinok

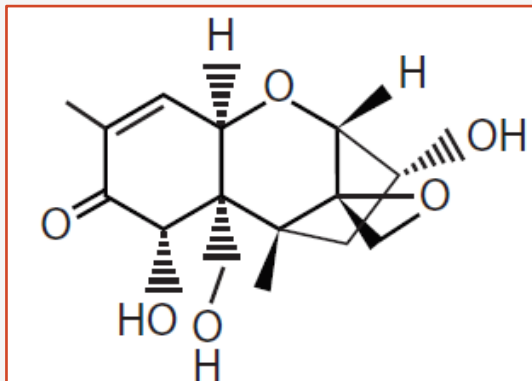
- Penészgombák másodlagos anyagcseretermékei
- Rendkívül hőstabilak



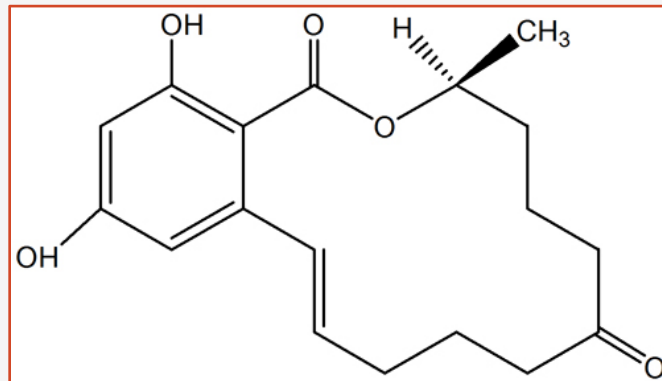
<https://bbsrc.ukri.org/>

Minták forrása: Észak- és Dél-Dunántúl.
Tima és mtsai., 2016.

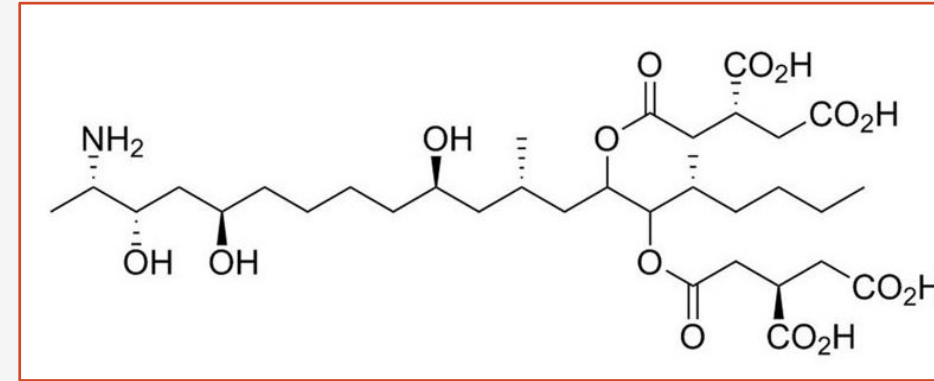
Deoxinivalenol (DON), Zearalenon (ZEA) és Fumonizin B1



- májnagyobbodás, súlyvesztés, immunotoxikus
- fehérjeszintézis gátlás
- átjut a vér-agy gáton



- képes kötődni az ösztrogén receptorokhoz (ER α és ER β)
- hormonális zavarok, korai nemi érés



- foszfolipidek bioszintézisének gátlásán keresztül hatással van a membránfunkciókra;
- különböző fajokban különböző mértékben jut át a vér-agy gáton (lovakban agylágyulás)

A mikotoxinok átjutnak a vér-agy gáton

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 72: 1395–1405, 2009
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 1528-7394 print / 1087-2620 online
DOI: 10.1080/15287390903212741



Physiologically Based Pharmacokinetics of Zearalenone

Beom Soo Shin¹, Seok Hyun Hong², Jürgen B. Bulitta³, Jong Bong Lee², Sang Wook Hwang², Hyoung Jun Kim², Seung Du Yang¹, Hae-Seong Yoon⁴, Do Jung Kim⁴, Byung Mu Lee², and Sun Dong Yoo^{2*}

¹College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan-si, Gyeongbuk, Korea, ²College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do, Korea, ³Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, USA, and ⁴Human Exposure Assessment Division, National Institute of Toxicological Research, Eunpyung-ku, Seoul, Korea

	Tmax (h)	Cmax (ng/l)	Cmin (ng/l)	Cátlag (ng/l)
Patkány	0,37	0,035	0,007	0,014
Ember*	-	0,042	0,010	0,014

*0.0312 mg/kg/nap szájon át történő krónikus behatás esetén.

Célkitűzések

- a mikotoxinok citotoxikus hatásának vizsgálata primer egér agykérgi sejttenyészeteken
- csak ideg-, illetve csak asztroglia sejteket tartalmazó tenyészetek létrehozása annak vizsgálatára, hogy mely sejtípus a fő célpontja ezen toxinoknak
- a mikotoxin expozíciós időtartam (24 v. 48 óra) hatásának vizsgálata

életképességi teszt

- a zearalenon ösztrogén receptorok expressziójára kifejtett hatásának vizsgálata

RT-qPCR

- idegi hálózati működésre kifejtett ZEA-hatás elemzése akut (15p) és krónikus (24h) kezelésben

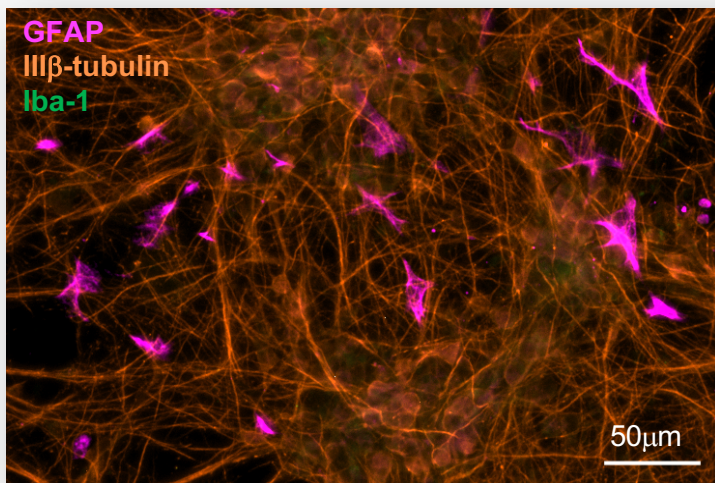
MEA

Vizsgálat menete

1 Tenyészet létrehozása

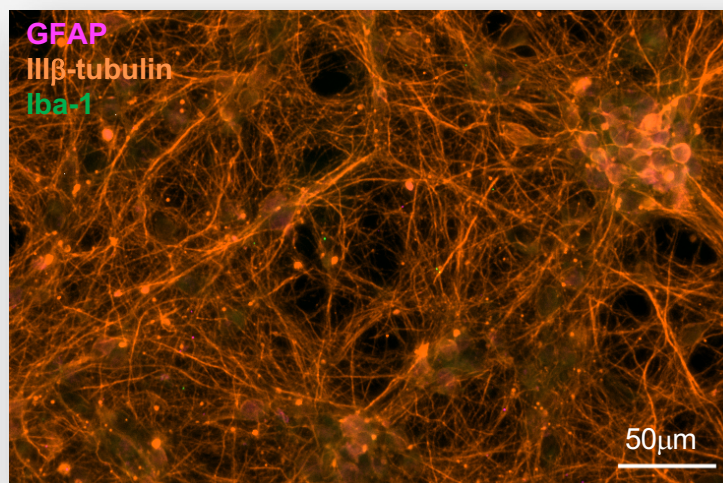
„Kevert” (idegsejt+glia)
tenyészet

- E14-15 agykéreg



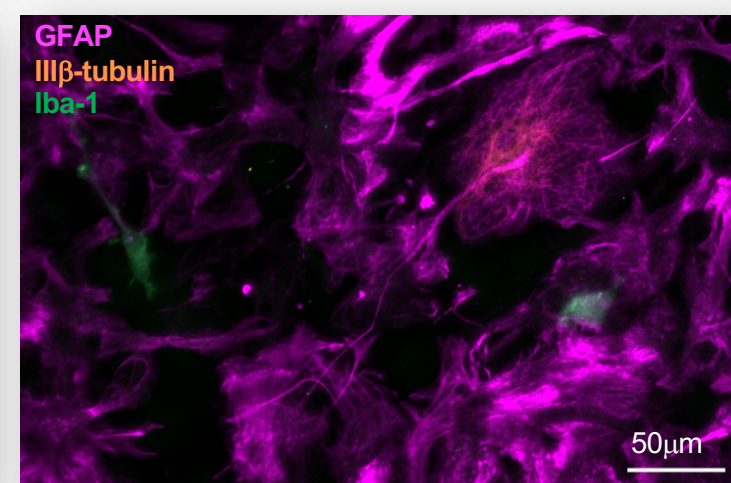
„Tiszta” (~95%) idegsejt
tenyészet

- E14-15 agykéreg
- osztódásgátlás: DIV1



Asztroglia (>98%) tenyészet

- újszülött egér előagy



asztroglia: gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP); **idegsejt:** III β -tubulin; **mikroglia:** Iba-1

Vizsgálat menete

1 Tenyészet létrehozása

„Kevert” (idegsejt+glia)
tenyészet

- E14-15 agykéreg

2 Tenyészet fenntartása

„Tiszta” (~95%) idegsejt
tenyészet

- E14-15 agykéreg
- osztódásgátlás: DIV1

3 Toxinkezelés DON, ZEA, FB1

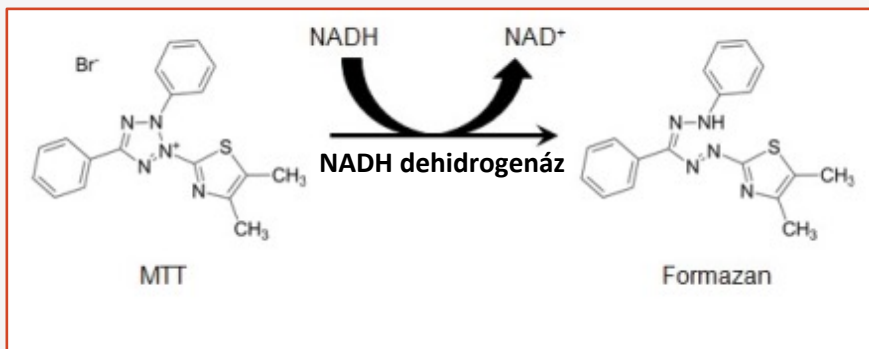
(1 μ M-50 μ M)
24h v. 48h

4 Életképesség mérés (MTT)

Asztroglia (>98%) tenyészet

- újszülött egér előagy

7 nap



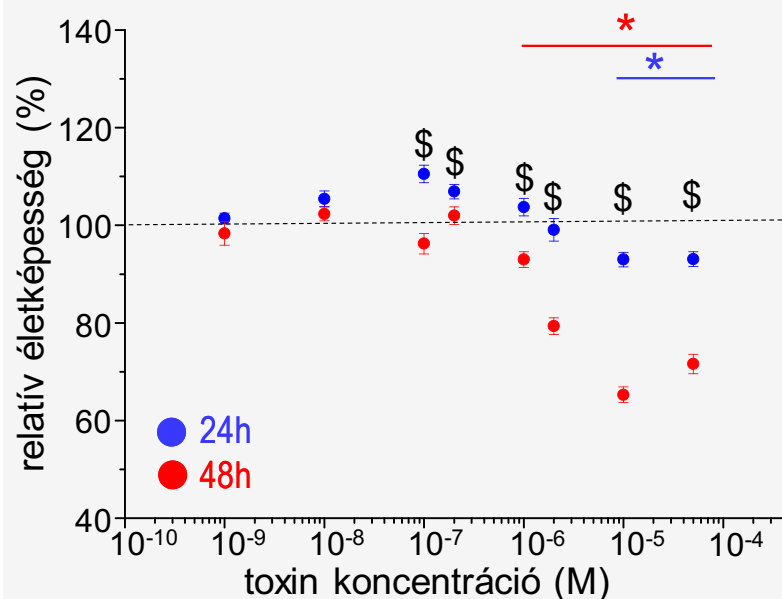
A formazán mennyisége spektrofotometriával
meghatározható

$\lambda_{\text{mérés}}=570 \text{ nm}$

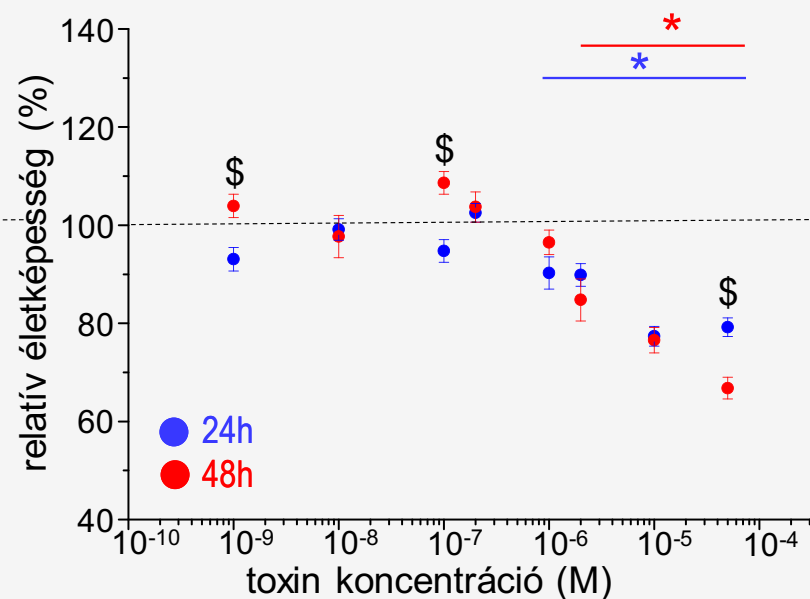
$\lambda_{\text{ref}}: 620 \text{ nm}$

A deoxinivalenol citotoxikus hatására az asztroglia sejtek a legérzékenyebbek

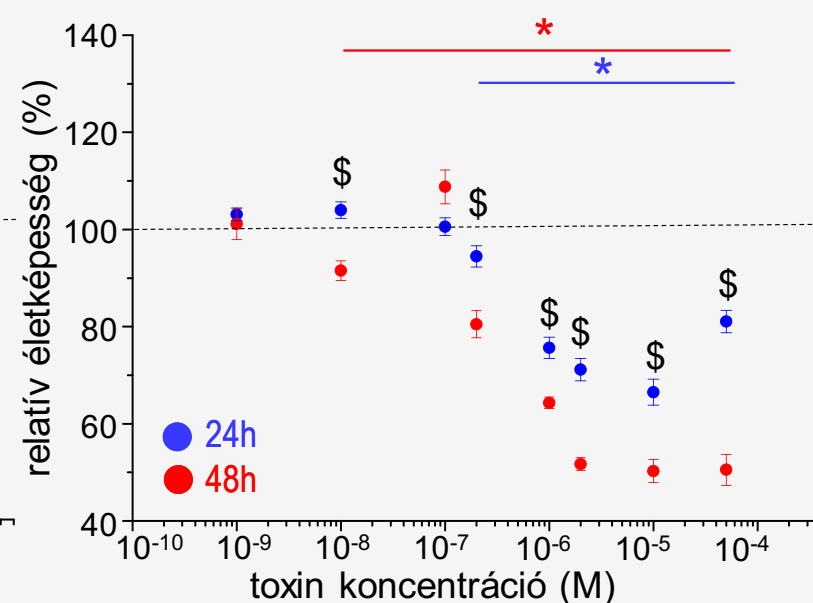
Idegsejt tenyészet



„Kevert” tenyészet



Asztroglia tenyészet



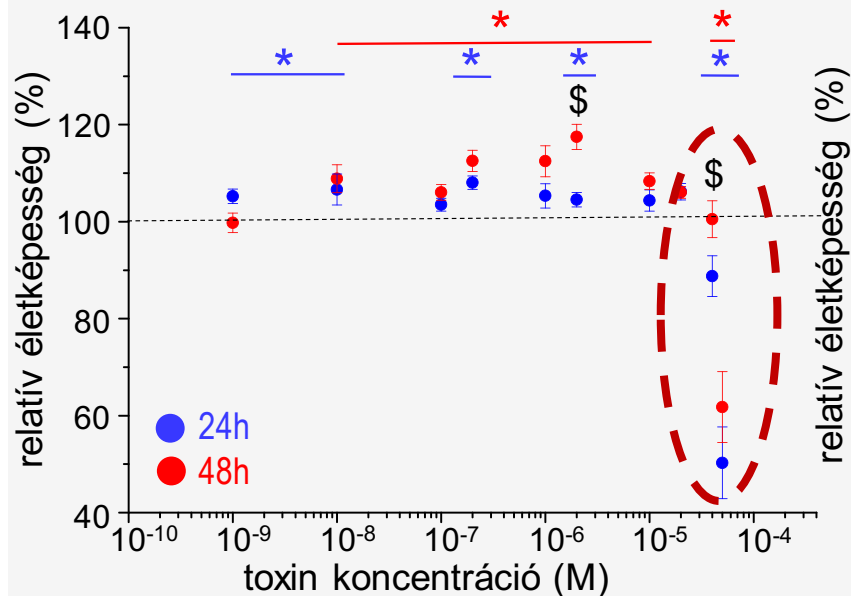
Az adatok a kontroll értékek százalékában, átlag $\pm$ SEM értékben megadva.

„\$” a 24 és 48 órás adatok közötti,

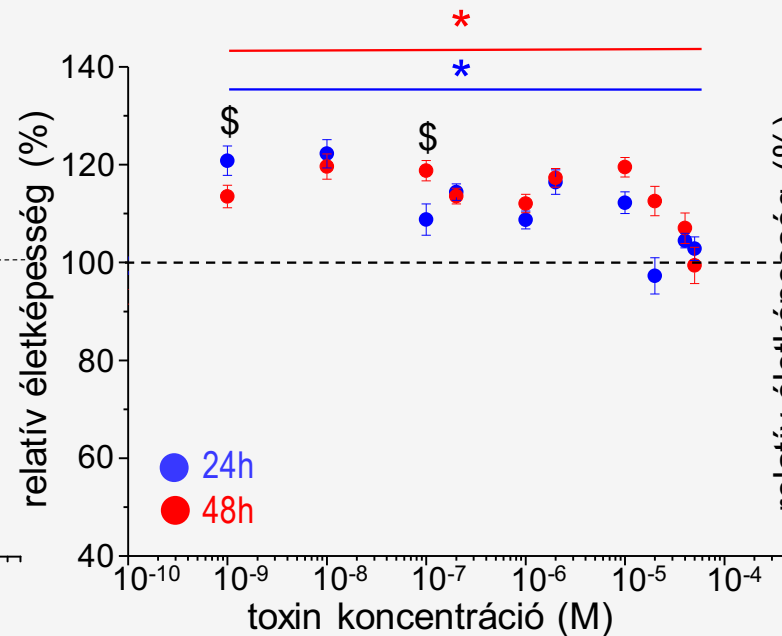
* a kontrollhoz képesti szignifikanciát jelöli (\$;*:p<0,05). n=18-36

A fumonizin B1 idegsejteken megfigyelt citotoxikus hatását az asztroglia sejtek jelenléte csökkenti

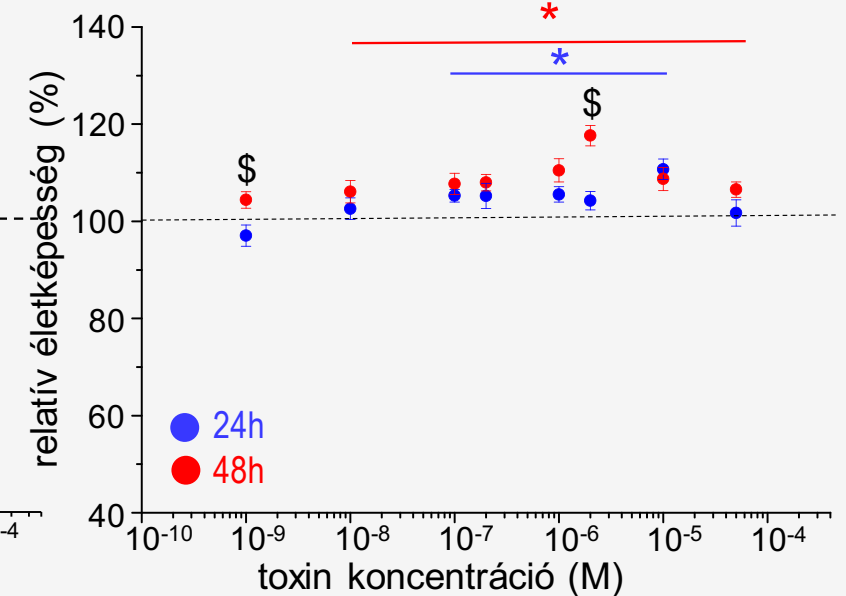
Idegsejt tenyészet



„Kevert” tenyészet



Asztroglia tenyészet



Az adatok a kontroll értékek százalékában, átlag $\pm$ SEM értékben megadva.

„\$” a 24 és 48 órás adatok közötti,

* a kontrollhoz képesti szignifikanciát jelöli (\$; *: $p < 0,05$). $n = 12-42$

A mikotoxinok átjutnak a vér-agy gáton

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 72: 1395–1405, 2009
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 1528-7394 print / 1087-2620 online
DOI: 10.1080/15287390903212741



Physiologically Based Pharmacokinetics of Zearalenone

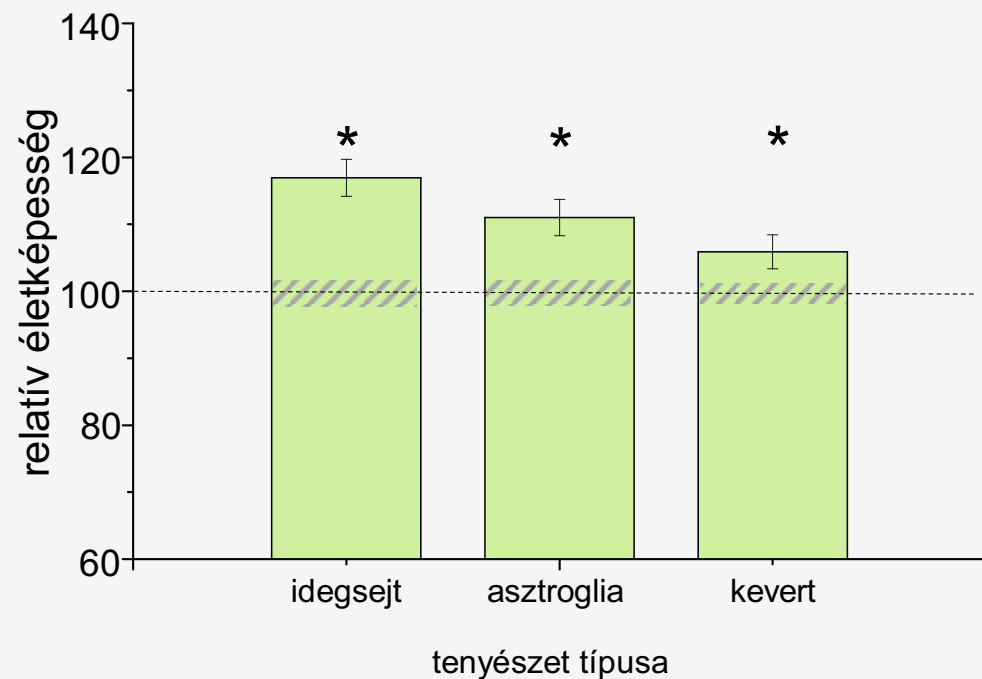
Beom Soo Shin¹, Seok Hyun Hong², Jürgen B. Bulitta³, Jong Bong Lee², Sang Wook Hwang², Hyoung Jun Kim², Seung Du Yang¹, Hae-Seong Yoon⁴, Do Jung Kim⁴, Byung Mu Lee², and Sun Dong Yoo^{2*}

¹College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan-si, Gyeongbuk, Korea, ²College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do, Korea, ³Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, USA, and ⁴Human Exposure Assessment Division, National Institute of Toxicological Research, Eunpyung-ku, Seoul, Korea

	Tmax (h)	Cmax (ng/l)	Cmin (ng/l)	Cátlag (ng/l)
Patkány	0,37	0,035	0,007	0,014
Ember*	-	0,042	0,010	0,014

*0.0312 mg/kg/nap szájon át történő krónikus behatás esetén.

A zearalenon már kis koncentrációban növeli a sejtek életképességét

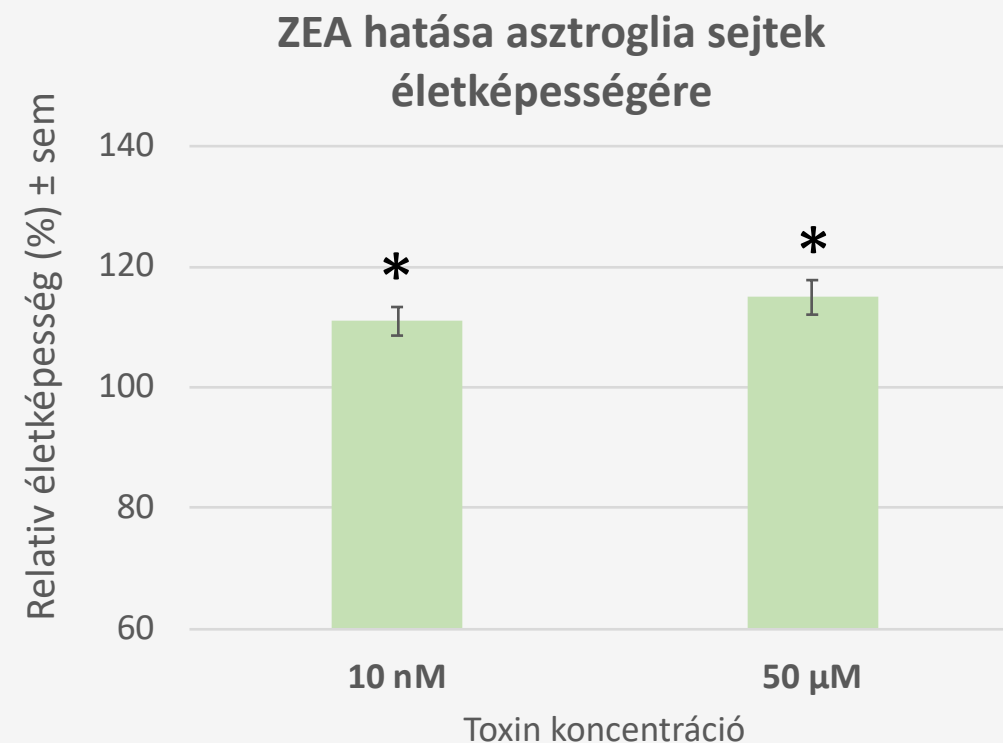


Toxinkoncentráció: 10 nM
Kezelés: 48 óra

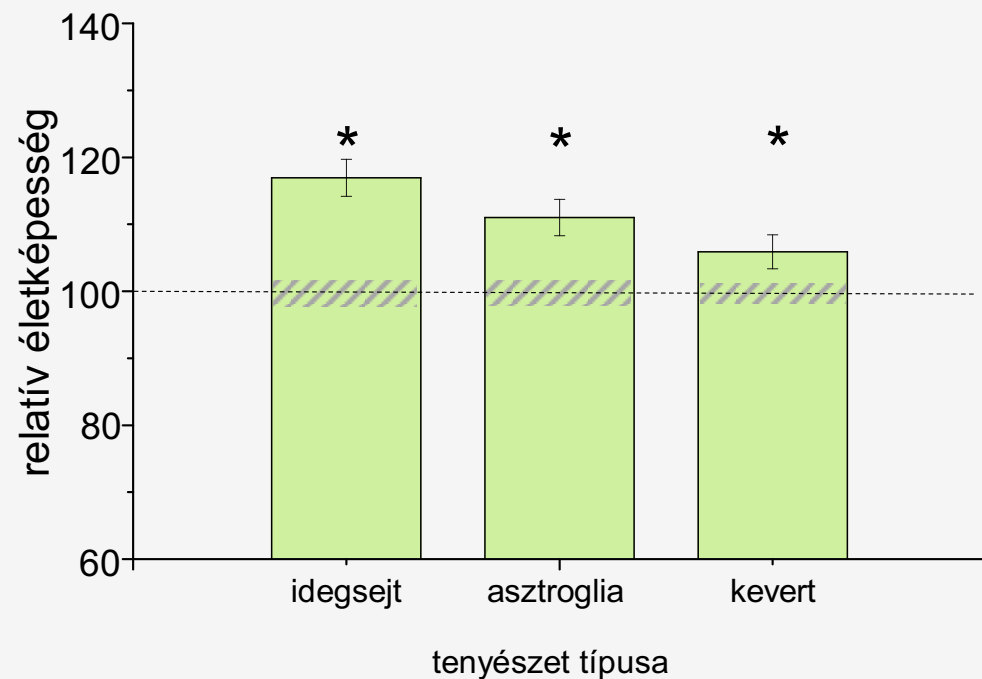
Az adatok a kontroll értékek százalékában, átlag $\pm$ SEM értékben megadva.
(n=17-35).

* a kontrollhoz képesti szignifikanciát jelöli (*:p<0.05).

A sávozott terület a kontroll értékek SEM nagyságát jelöli (100 %).



A zearalenon már kis koncentrációban növeli a sejtek életképességét



Toxinkoncentráció: 10 nM
Kezelés: 48 óra

Metabolikus aktivitás vagy
sejtszám változás?

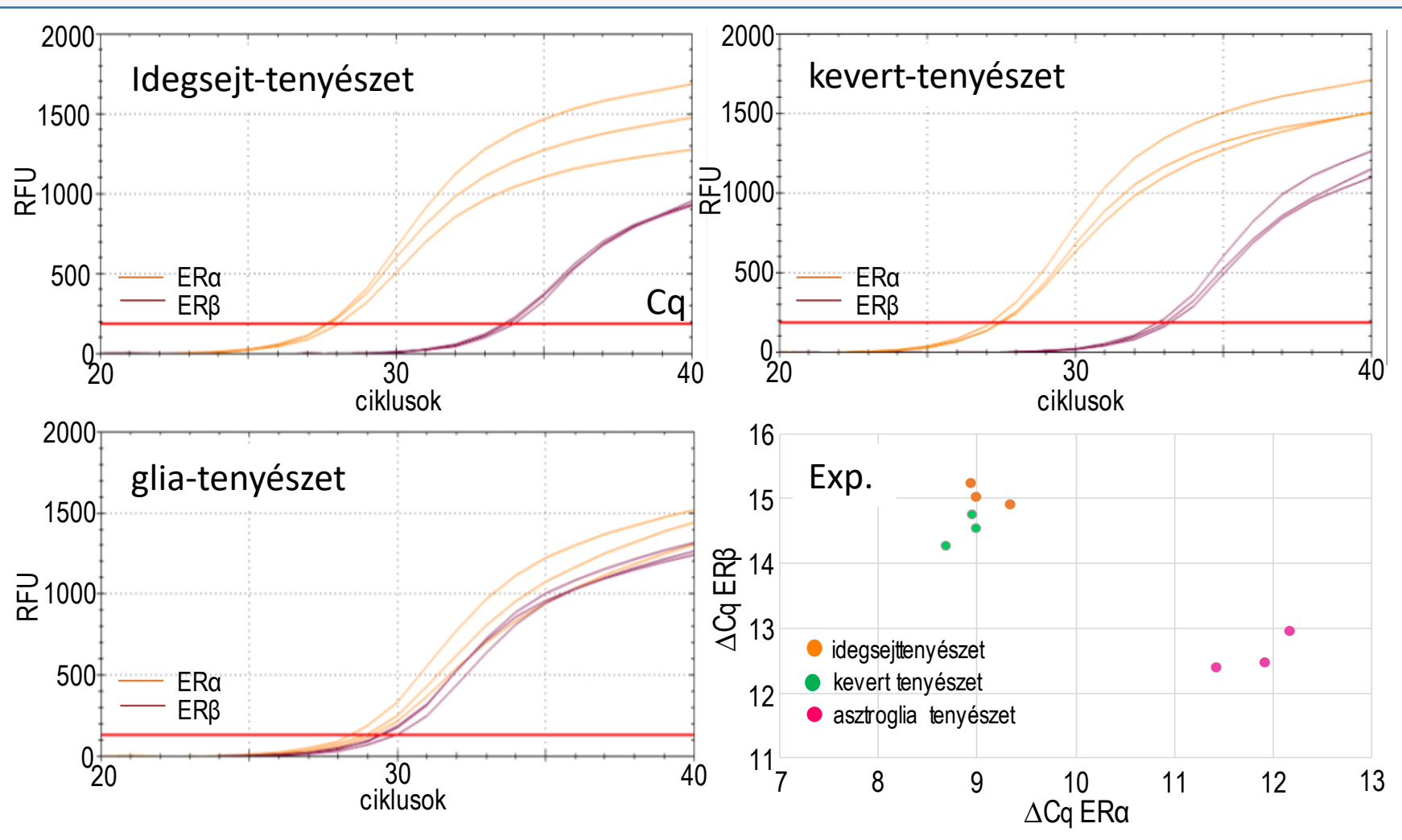
Mitokondriális funkció
változás vagy
mitokondriumok méretében,
mennyiségében változás?

Az adatok a kontroll értékek százalékában, átlag ± SEM értékben megadva.
(n=17-35).

* a kontrollhoz képesti szignifikanciát jelöli (*:p<0.05).

A sávozott terület a kontroll értékek SEM nagyságát jelöli (100 %).

Az ösztrogén receptorok expressziója sejt kultúra specifikus

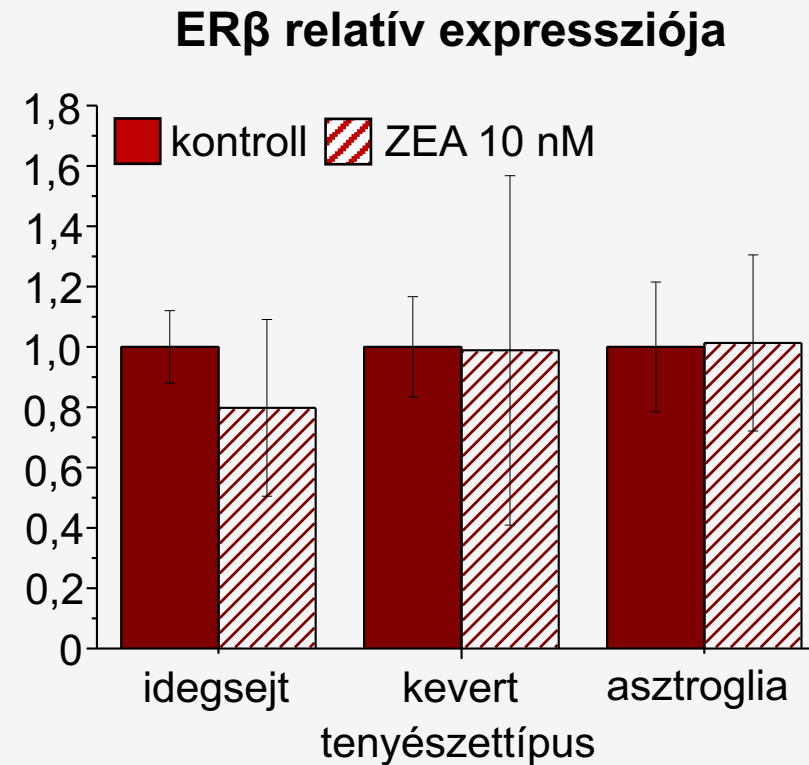
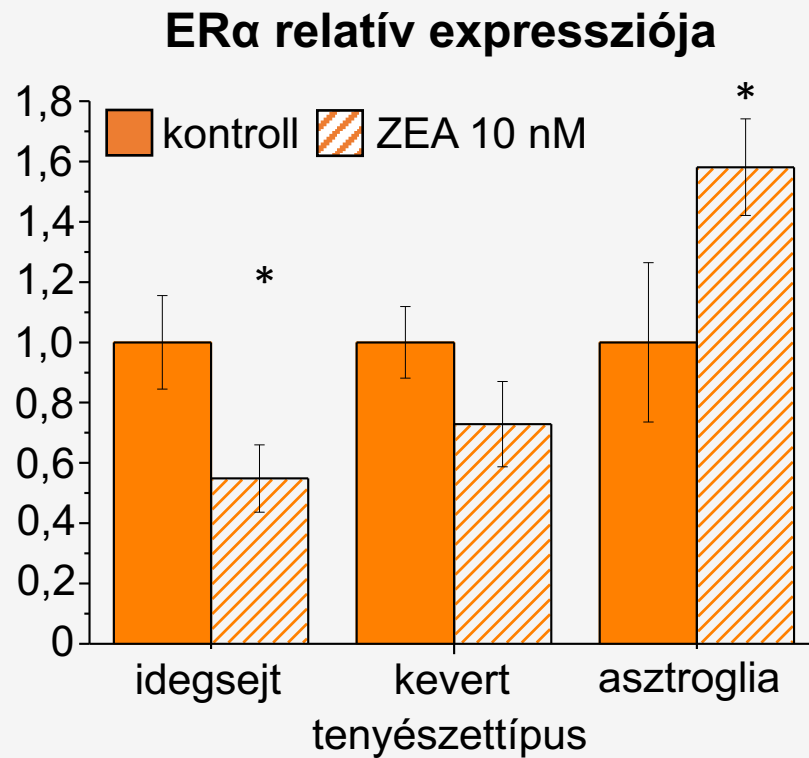


ER-α és ER-β a központi idegrendszerben is megtalálható ösztrogén receptorok.

ER-α expressziója minden tenyésztet típusban kifejezett, az ER-β az idegsejtekben kis mennyiségben fordul elő

ZEA az ösztrogén receptorok expresszióját sejtkultúra specifikusan változtatja meg

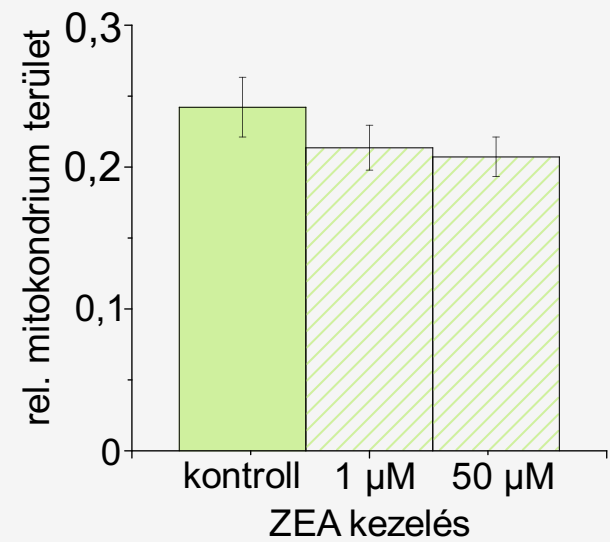
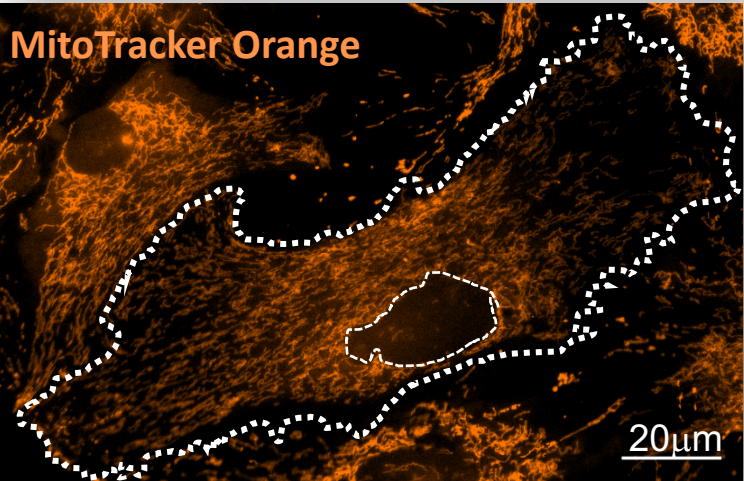
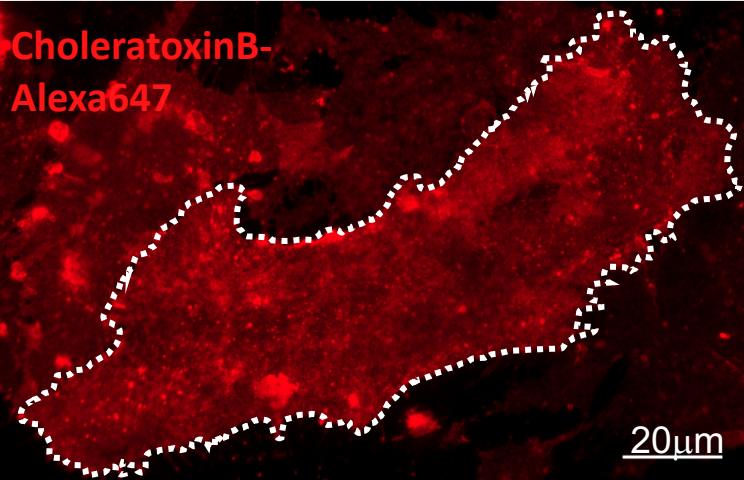
ER- α és ER- β a központi idegrendszerben is megtalálható ösztrogén receptorok.



Az adatok a kontroll értékek arányában, átlag $\pm$ szórás értékben megadva (n=3).

Háztartási gének: mRPL13a és GAPDH.

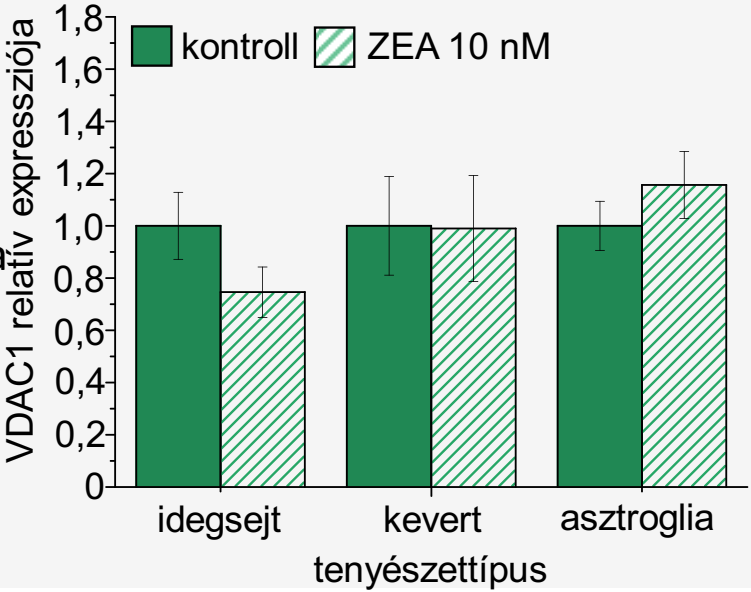
A ZEA-kezelés a mitokondriumok mennyiségét nem változtatja meg asztroglia sejtekben



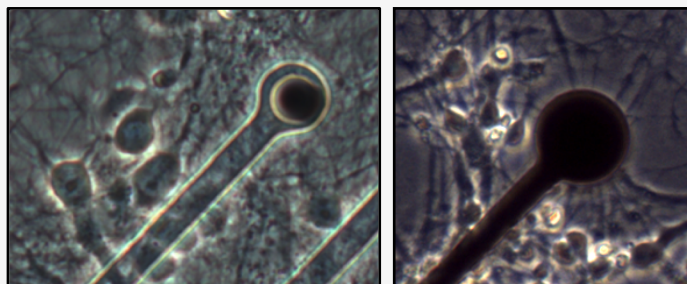
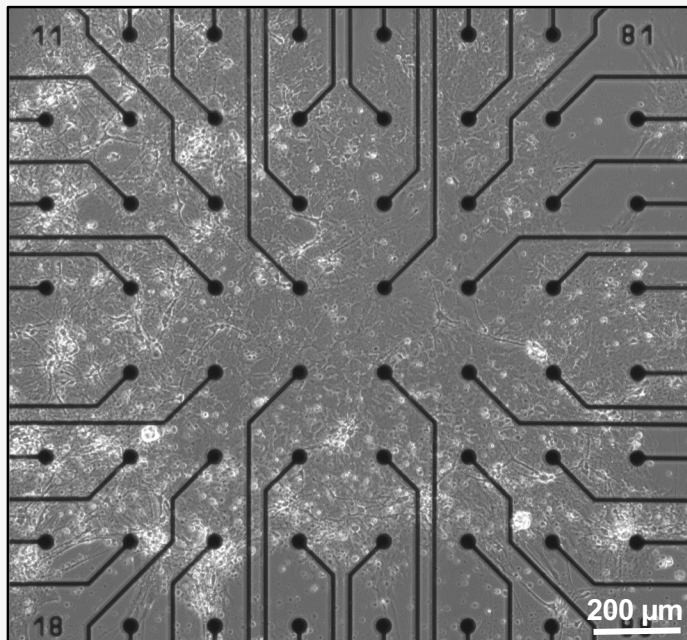
Kezelés: 48h
Az adatok a kontroll értékek százalékában, átlag ± SEM értékben megadva (n=12-15).

Kvantitatív mikroszkópia:
a mitokondriumok területarányának meghatározása sejtenként (összmitokondrium terület/ citoplazma terület)

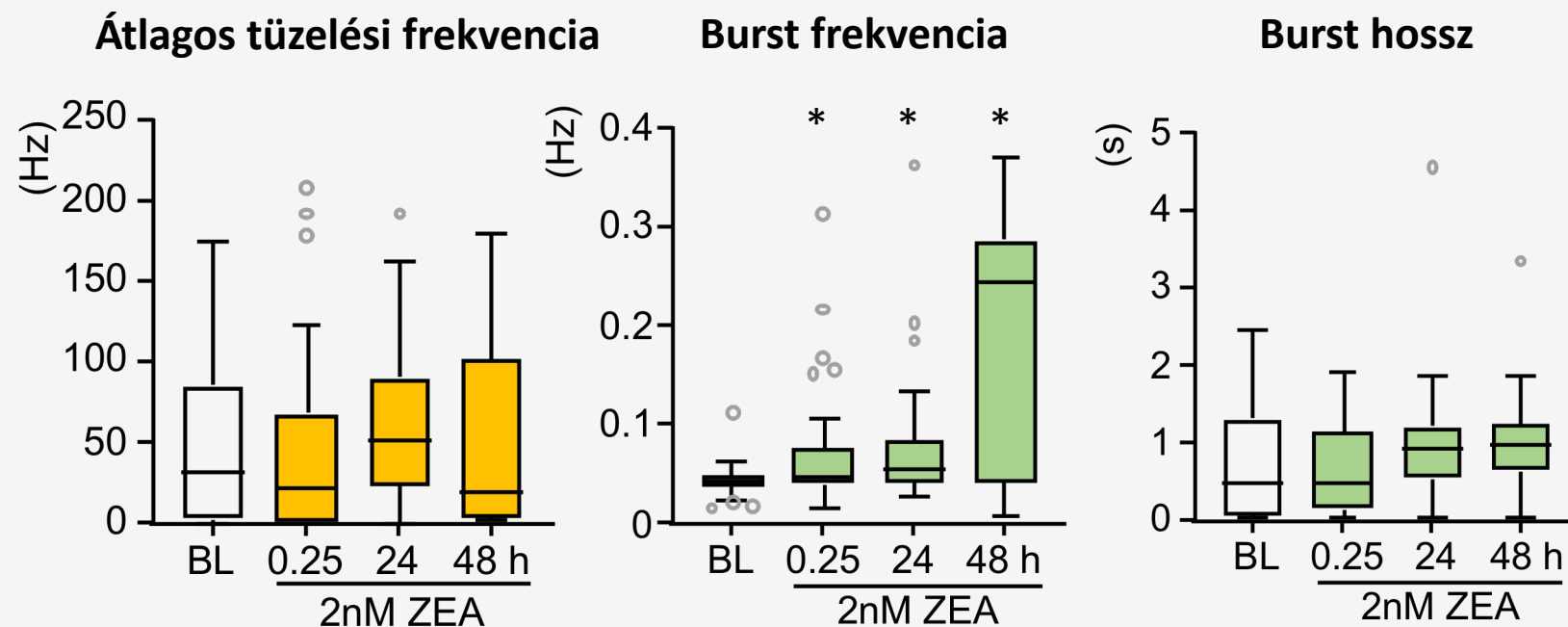
Az adatok a kontroll értékek arányában, átlag ± szórás értékben megadva. (n=3).
Háztartási gének: mRPL13a és GAPDH.



ZEA-kezelés a kevert tenyészetekben a spontán idegi aktivitást megváltoztatja



A kevert idegsejt tenyészetek aktivitása MEA módszerrel mérhető

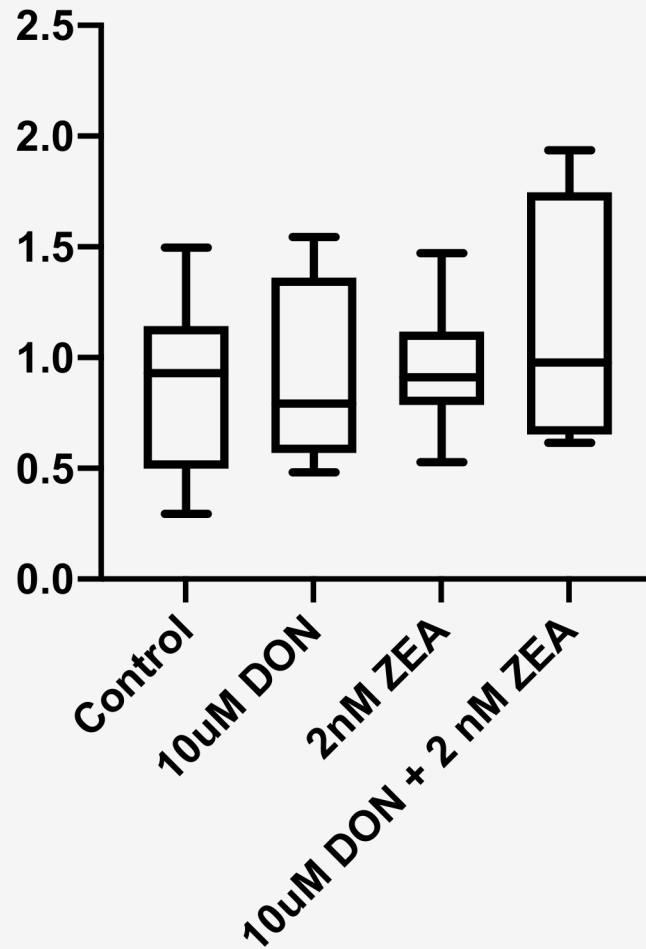


Az általános aktivitás nem változik, de a tüzelési mintázat átrendeződik.

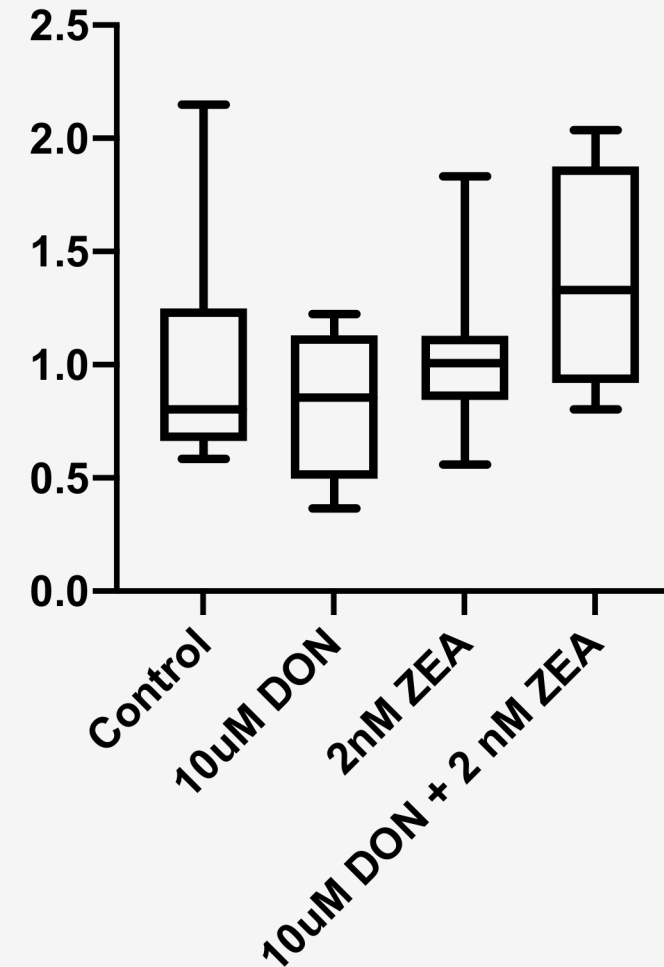
* szignifikancia a kontrollhoz képest (*:p<0.05;).

ZEA-DON kombinált kezelés a tüzelési mintázatot megváltoztatja

Burst-hossz változás

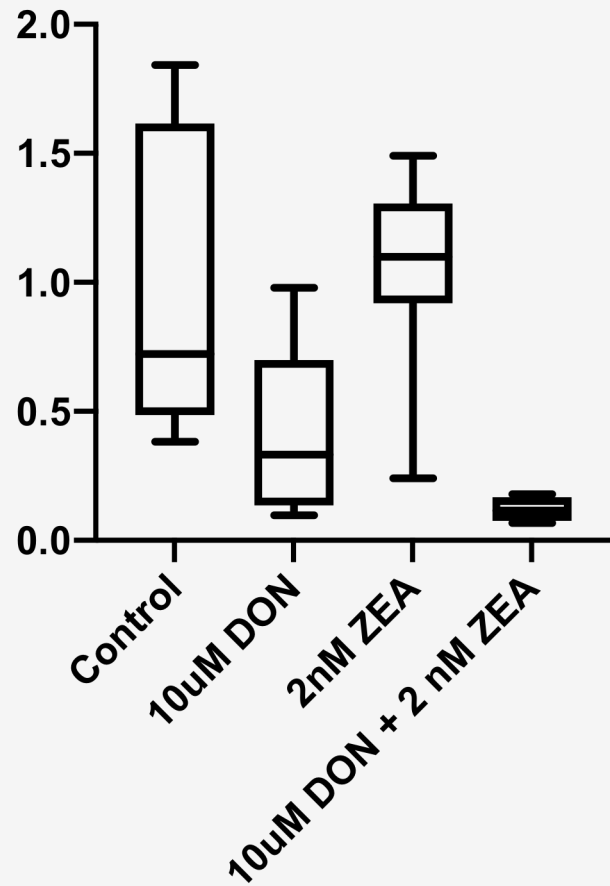


Spike-szám változása burst-önként

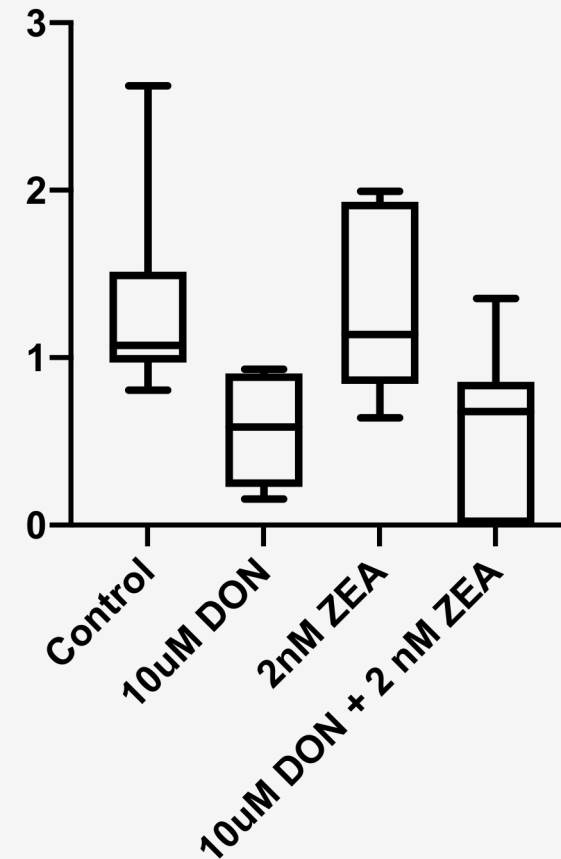


ZEA-DON kombinált kezelés a tüzelési mintázatot megváltoztatja

Burst-frekvencia változása



Burst-beli tüzelések arányának változása



Összefoglalás I.

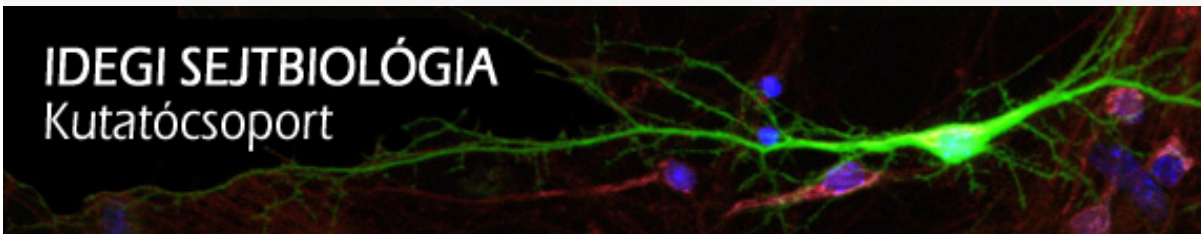
- A deoxinivalenol a sejtek életképességét koncentrációtól függően csökkentette mindhárom sejtenyészetben, hatására az asztroglia sejtek a legérzékenyebbek.
- A fumonisin B1 az alacsonyabb koncentrációkban a sejtek életképességét növelte, de 50 μM koncentrációban toxikus az idegsejt tenyészetekben. Ez a hatás asztroglia sejtek jelenlétében nem nyilvánul meg.

Összefoglalás II.

- A zearalenon már 10 nM koncentrációban is szignifikánsan növelte a sejtek életképességét.
- A ER- α expresszióját idegsejt tenyészetekben csökkentette, asztroglia tenyészetekben növelte.
- ER- β expresszióját egyik tenyésztípusban sem befolyásolta 10nM koncentrációban.
- A ZEA kezelés a mitokondriumok mennyiségi viszonyait nem változtatta meg az általunk használt mikroszkópos és VDAC1 expresszió vizsgálatán alapuló kísérletek szerint.
- Akut és krónikus kezelése is megváltoztatta a spontán idegi aktivitást, növelve az átlagos tüzelést és a burst-ök előfordulását. A burst-hosszt azonban nem változtatta meg.
- Kombinációs kezelésben DON-nal közösen alkalmazva a burst-ös tüzelési mintázat átrendezését okozta.

Köszönetnyilvánítás

IDEGI SEJTBiológIA
Kutatócsoport



Kutatócsoport vezető: Dr. Schlett Katalin



FUSARIUM MIKOTOXINOK
Konzorciális Kutatócsoport

SZÉCHENYI 2020



Konzorcium vezető: Dr. Világi Ildikó

A projektet a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal **NVKP_16-1-2016-0016** és a **VEKOP-2.3.3-15-2016-00007** pályázatai támogatták

