



A *FUSARIUM* GOMBÁK ÁLTAL TERMELT MIKOTOXIN, A FUMONIZIN B1 AKUT IDEGRENDSZERI HATÁSÁNAK ELEMZÉSE

Világi Ildikó, Varró Petra, Bódi Veronika, Tóth Attila, Détári László, Csikós Vivien, Dobolyi Árpád, Micska Brigitta, Schlett Katalin



ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszék, Budapest

Témafelvetés

A fumonizin B1 (FB1) a gabonanövényeket fertőző, szántóföldi mikroszkopikus gombák (főleg *Fusarium* fajok) által termelt toxin. A gomba maga, és a toxin is gátolhatja a növény fejlődését, de a fertőzött termés takarmánként vagy táplálékként való fogyasztása veszélyes hatással lehet az állatokra vagy az emberekre is. Az ismert, hogy az FB1 befolyásolja a sejthártyában található szfingolipidek bioszintézisét, így hosszabb távú neuronális elváltozások hátterében állhat. Vannak adatok arra vonatkozóan, hogy a krónikus FB1 hatás miatt az idegi hálózati aktivitás gátódik, esetlegesen rendellenességek alakulnak ki a fejlődő idegrendszerben, a rövid távú hatások mechanizmusa azonban még kevésbé feltárt. Újabb vizsgálatok idegi sejttényeszetekben akut serkentő FB1 hatást igazoltak Ca^{2+} -imaging eljárást alkalmazva. Ezen megfigyelések ismeretében terveztük meg kísérleteinket, arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen idegi sejtfejeségen fejti ki a hatását elsősorban a toxin, illetve hogy elektromos aktivitás mérésekkel kimutatható-e idegsejtekre érintő akut működésbeli változás *ex vivo* ill. *in vivo* rendszerekben.

Módszerek és anyagok

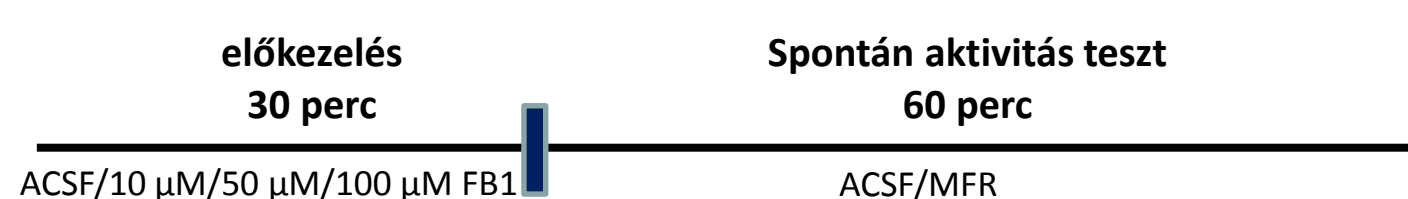
Életképességi vizsgálatok szövettanyszerben

- Tiszta agykérgi neuron tenyészet (14-15 napos egér embrióból)
- Tiszta asztrocita tenyészet (2-3 napos egérből)
- 10^{-9} – 5×10^{-5} M FB1 koncentráció
- 24 és 48 órás FB1 kezelés
- MTT alapú életképesség teszt

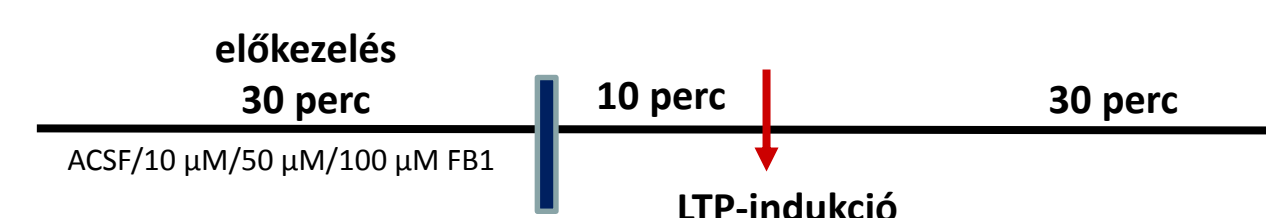


Ex vivo elektrofiziológia

- Hím Wistar patkányok (1.5 – 3 hónap között)
- 400 μ m vastag horizontális vagy koronális szeletek
- Előkezelés: 30 percig 10, 50 vagy 100 μ M FB1 tartalmú ACSF-fel (artificial cerebro-spinal fluid)
- Spontán epileptikus aktivitás regisztrálása kérgi szeletben magnéziummentes oldatban (MFR)



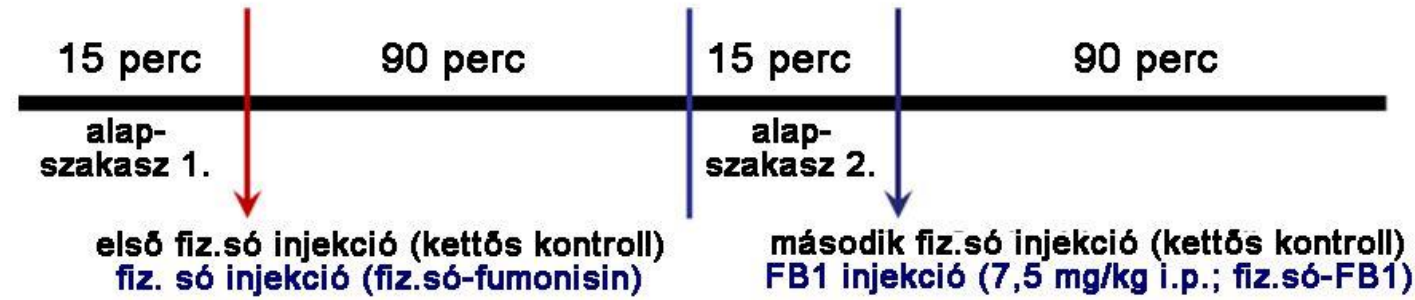
- LTP indukálhatóság vizsgálata hippokampális szeletben



- Statistikai analízis: egyutas ANOVA Student-Newman-Keuls post hoc teszt
 - $p < 0,05$ *
 - $p < 0,01$ **
 - $p < 0,001$ ***

In vivo elektrofiziológia

- hím Wistar patkányok (300-465 g; n=12)
- uretán anesztézia (1,2 g/kg i.p.)
- Két kísérleti állatcsoport: két fiziológiai sóoldat injekció (kettős kontroll; n=6) és fiz.só majd fumonisin injekció (n=6)
- kiváltott potenciálok (KP) regisztrálása a primer szomatoszenzoros kéreg hátsó láb reprezentációs területéről a nervus ischiadicus elektromos ingerlése után (ingerlési frekvencia: 0,1 Hz)
- 210 perc hosszú regisztrálás
- KP analízis: amplitúdó, latencia, meredekség (a válaszok első 3,5 ms-os szakasza alapján), integrál (görbe alatti terület a KP-k első 21 ms hosszú szakaszánál)
- statiszitika: egyutas ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc teszt



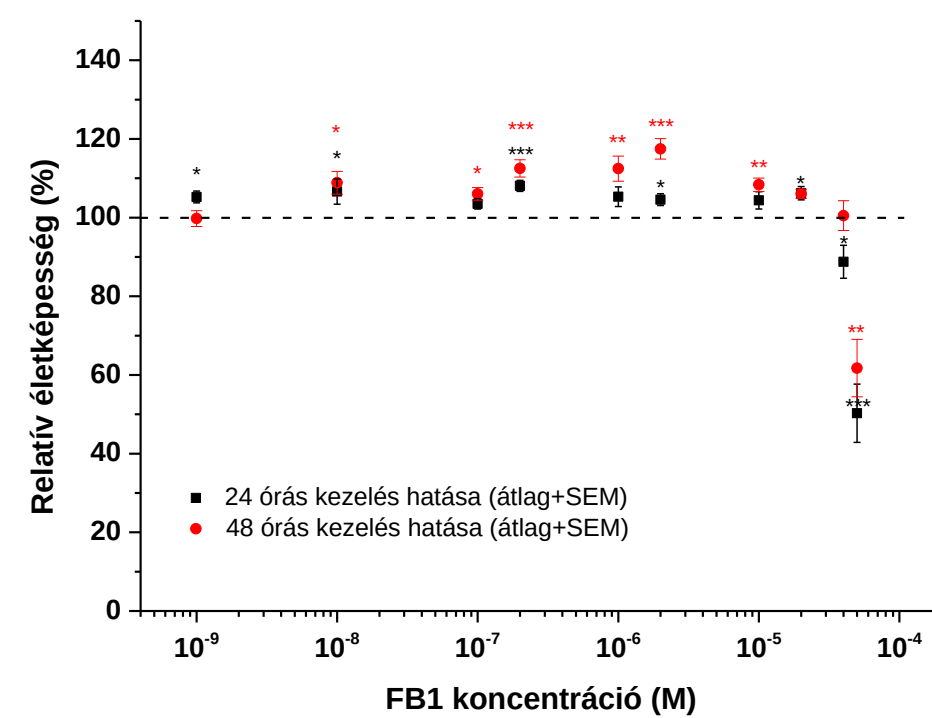
Immunhisztokémia

- hím patkányok (310-340 g ; n= 14)
- i.p. 7,5 mg/kg FB1 vagy fiziológiai sóoldatot kaptak
- Két óra múlva transzkardialis perfúziós fixálás
- 50 μ m vastag metszetek az agyból
- immunhisztokémiai festés c-fos aktivitás kimutatásához nikkel-DAB peroxidáz technikával.
- 2,12 mm²-nyi területekről fénykép készítése a szomatoszenzoros kéreg, a hippokampusz és az arcuatus mag területén.
- A c-fos-pozitív sejtek számolása ImageJ programmal

Eredmények

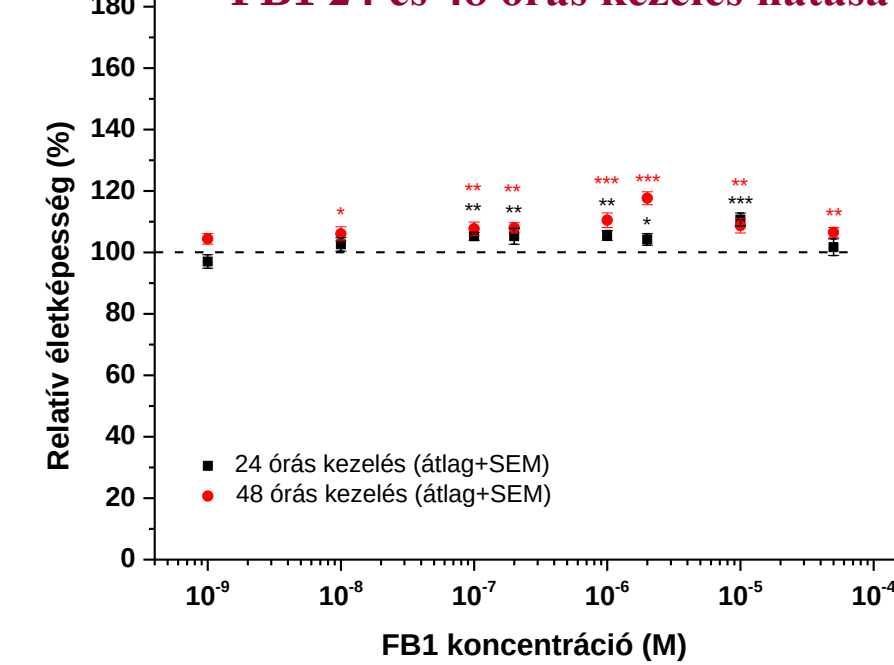
Életképességi vizsgálatok szövettanyszerben

Kortikális neuron tenyészeten az FB1 24 és 48 órás kezelése hatására



A kérgi neuron tenyészetekben 5×10^{-5} M koncentrációtól jelentős életképesség csökkenést tapasztaltunk. A több mint 95%-ban embrionális agykérgi neuront tartalmazó tenyészetekben az FB1 10^{-6} M koncentráció alatt az életképességben szignifikáns emelkedést okozott, 5×10^{-6} M koncentrációban alkalmazva viszont már jelentős sejtpusztulást váltott ki.

Kortikális asztrocita tenyészeten az FB1 24 és 48 órás kezelése hatására



A >98%-os tisztaságú primer asztrocita tenyészetekben az FB1 10^{-7} és 10^{-5} M tartományban már 24h után fokozta a sejtek életképességét. 48h után már a 10^{-8} és 5×10^{-4} M esetén is kimutatható volt az életképesség fokozódása. Toxikus hatást egyik alkalmazott FB1 koncentráció esetében sem tapasztaltunk. Az eredmények azt mutatják, hogy az FB1-nek az asztrocita sejtekre nincs toxikus hatása.

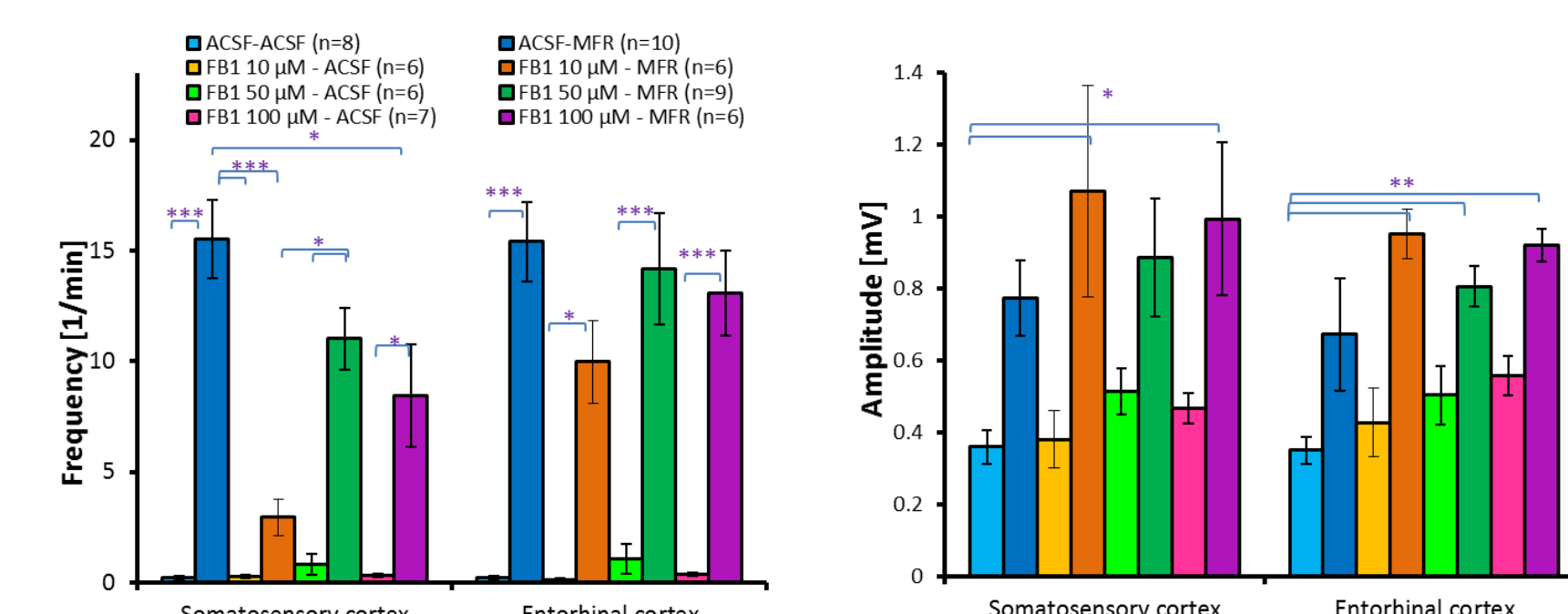
24, illetve 48 órás FB1-kezelés hatása kortikális neuron, illetve asztrocita sejtek relatív életképességére. Az FB1 koncentrációt logaritmikus skálán tüntetjük fel, az adatok az átlag $\pm$ s.e.m. értékeket jelzik. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, a csak oldószerez (0,5% DMSO) kezelt tenyészetekben mért értékekhez viszonyítva.

Ex vivo elektrofiziológia

Spontán aktivitás a szomatoszenzoros és az entorhinális kéreg 2/3. rétegében



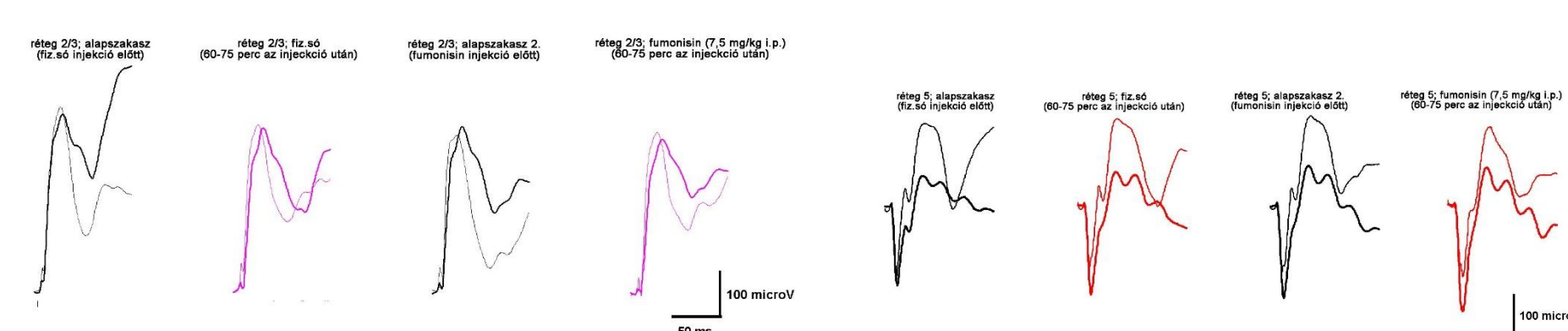
A mérőelektrodok pozíciója



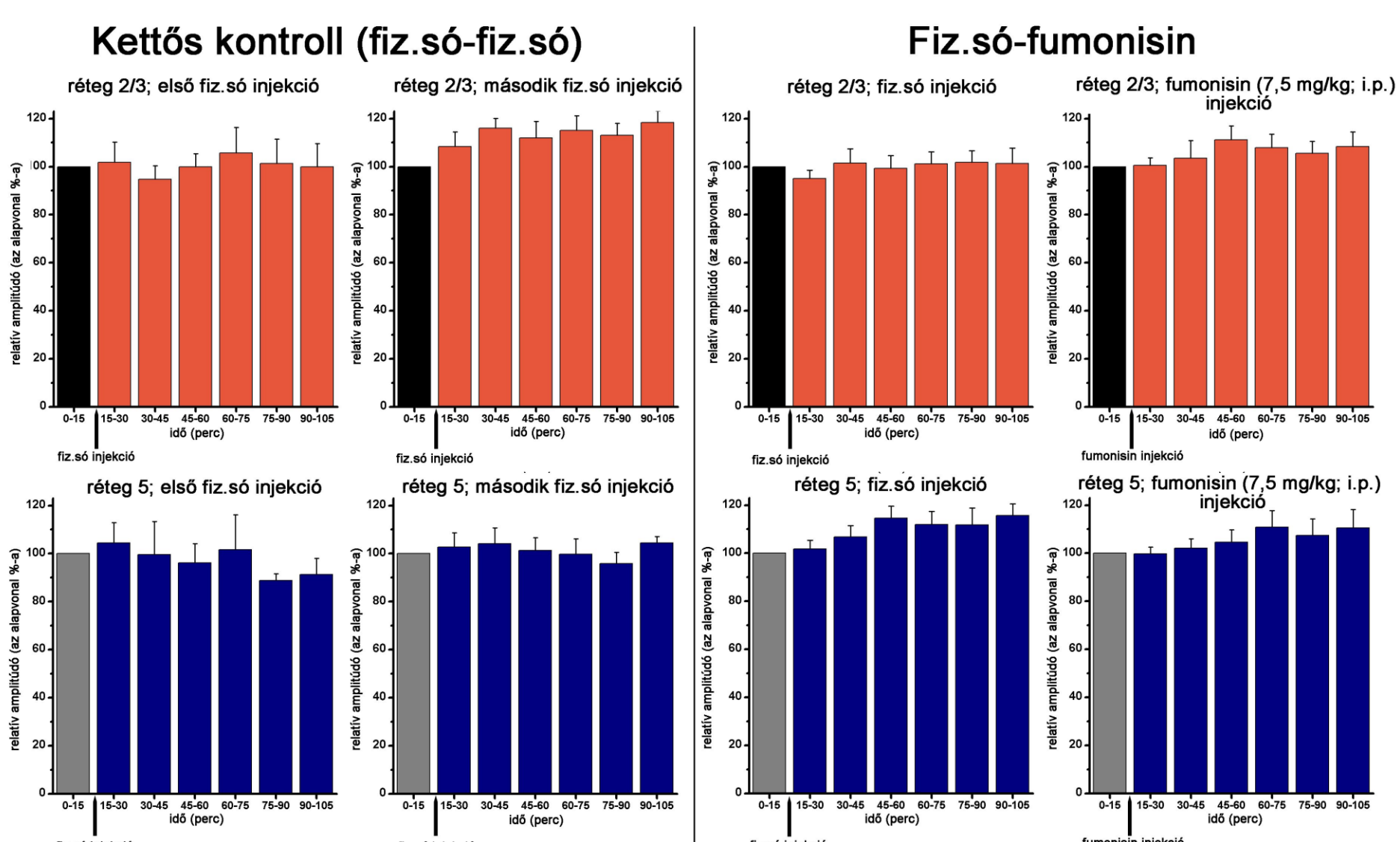
Az MFR-ben megnőtt a spontán aktivitás frekvenciája és amplitúdója. Az FB1 jelentősen megváltoztatta az MFR hatását. Kisebb frekvenciával, hosszabb burst-ök jelentkeztek, az amplitúdóértékek növekedtek, a megjelenési latenciák rövidebb lettek.

In vivo elektrofiziológia

A KP amplitúdók relatív változásai fiziológiai sóoldat illetve fumonisin beadás után

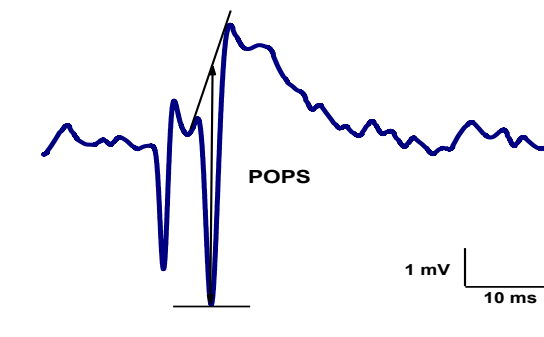
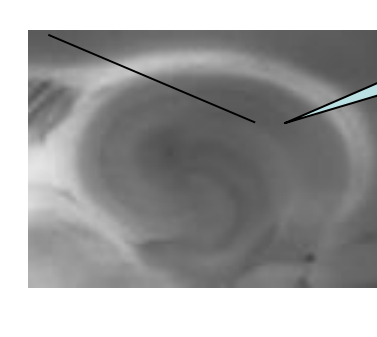


Reprezentatív válaszok a 2-es/3-as rétegből és az 5-ös rétegből az alapszakasz alatt illetve 60-75 perccel a fiz.só illetve fumonisin injekciók után

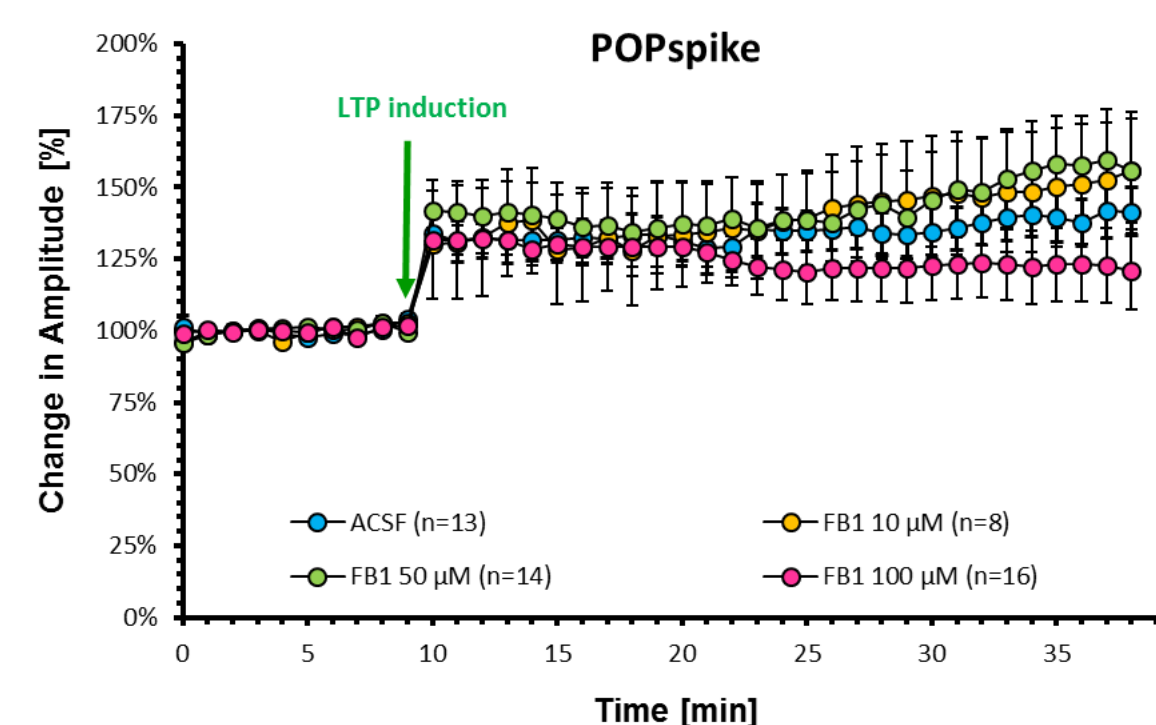


A fiziológiai sóoldat és a fumonisin (7,5 mg/kg i.p.) injekciók után a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok egyik elemzett paraméterében (amplitúdó, latencia, meredekség, integrál) sem találtunk szignifikáns változást a megfelelő alapszakasz (az injekciókat megelőző időszak) értékeihez viszonyítva. A kiváltott potenciálok paramétereinek értékeiben látott kismértékű ingadozások annak tulajdoníthatóak, hogy az altatás mélysége időben folyamatosan változik.

Hippokampális LTP indukálhatóság

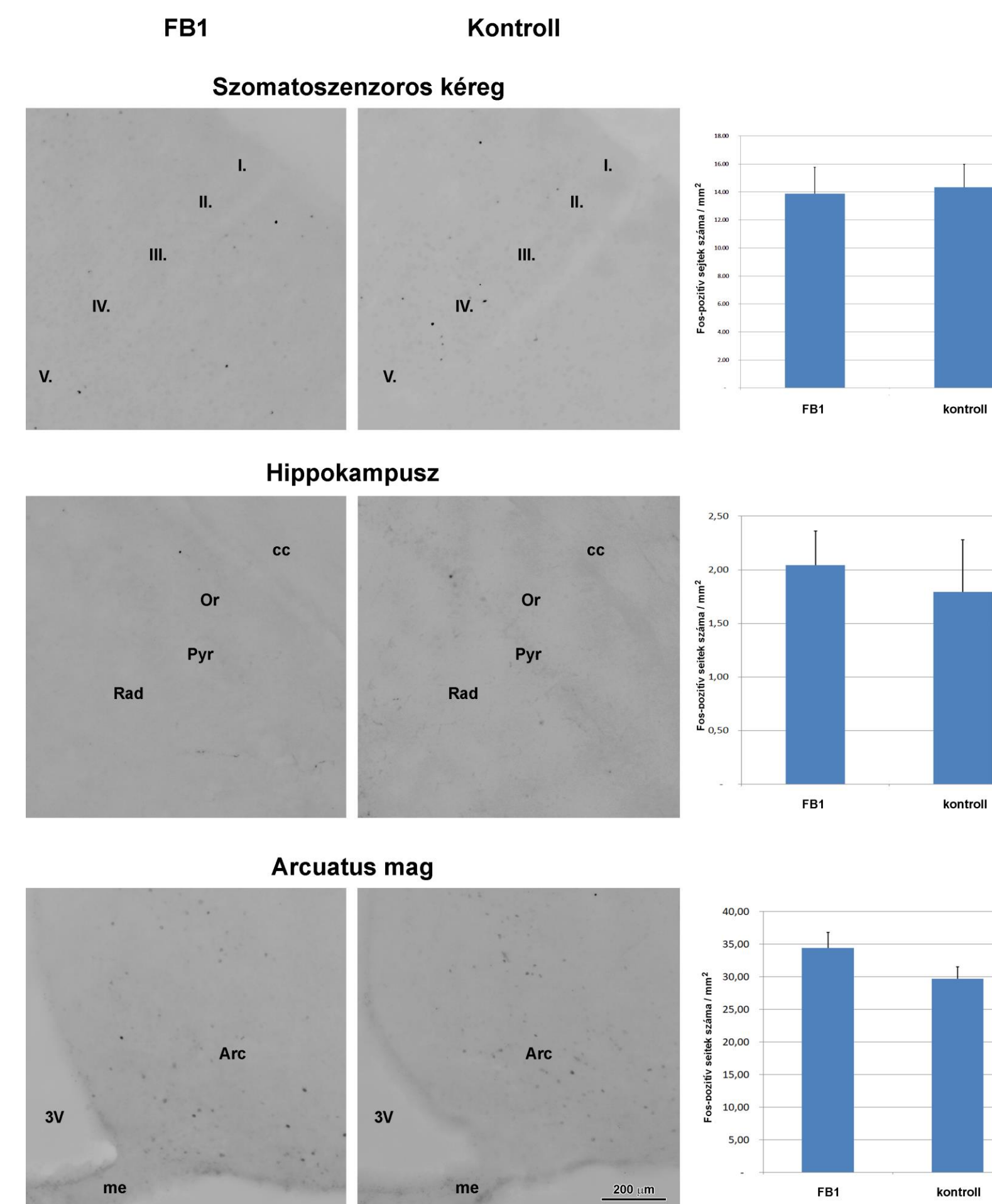


A mérőelektrod pozíciója



Az FB1 kezelés hatására koncentrációfüggően nőtt a kiváltott válaszok amplitúdója. Kisebb koncentrációban az FB1 növelte az LTP-indukálhatóságot, azonban nagyobb koncentrációban azonban gátolta azt.

Immunhisztokémia



Intraperitoneálisan beadott FB1 hatása az idegrendszeri sejtek aktivitására. A bal oldalon 3 agyterületről származó Fos-immunfestett metszetek láthatóak, az immunreaktivitás a sejtmagban lokalizálódik. A jobb oldali grafikonok a sejtszámolások kvantitatív eredményeit mutatják, melyek szerint egyik agyterületen sem volt változás az aktív idegsejtek számában. A rövidítések jelentése: I.-V.: az agykéreg megfelelő rétegei, Or: stratum oriens, Pyr: stratum pyramidale, Rad: stratum radiatum, cc: corpus callosum, Arc: nucleus arcuatus, 3V: harmadik agykamra, me: eminentia mediana.

Megvitatás

Igazoltuk *in vitro* rendszerekben az FB1 jelentős idegsejtre gyakorolt hatását. Életképességi vizsgálatokban kimutattuk, hogy az asztrociták aktivitására nincs hatással az FB1, de az idegsejtek túlélését koncentrációfüggően befolyásolja. Kisebb koncentrációban kissé fokozta a túlélést, de nagyobb koncentrációban már káros hatásúnak bizonyult. Ezzel összecseng a túlélő agyszelet vizsgálatok eredménye, mind az LTP indukálhatósága, mind a görcskészség fokozódott a kisebb dózisú kezelés hatására, a nagyobb dózisú kezelés azonban túlaktivációt eredményezett. Bár a jelen kísérletek az FB1 pontos akut hatásaira nem adnak felvilágosítást, irodalmi adatok alapján feltehető, hogy a túlaktiváció hátterében az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése áll. Ezt a hatást a következőkben patch clamp vizsgálatokban tervezzük tisztázni.

Akut beadás után *in vivo* mérésekben is teszteltük az FB1 hatását. Uretán-altatott patkányokban nem tudtunk hatást igazolni a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok paramétereit illetően. Az immunhisztokémiai vizsgálatok sem mutattak c-fos válaszreakció növekedést egyik vizsgált agyterületen sem. A hatás hiánya többféle módon is magyarázható. A mérések alapján valószínűsíthető, hogy az egyszerű, akár nagyobb dózis beadás után sem jut át az FB1 a vér-agy gáton, legalábbis olyan mértékben, amely elegendő lenne hatásos koncentráció kialakulásához a központi idegrendszerben *in vivo*. Az *ex vivo* látott, FB1 kiváltotta neuronális hatások tehát csak akkor jelenhetnek meg *in vivo* is, ha különböző patológiai szituációkban a vér-agy gát működése zavart szenved.

kapcsolat: vilagildi@ttk.elte.hu, honlap: physiology.elte.hu/fusarium

