



A fumonizin B₁ mikotoxin hatása humán és házinyúl vörösvérsejtek membrán-fluiditására

Hafner¹ D., Bogner¹ P., Rajli^{1,2} V., Tornyos¹ G., Pósa¹ R., Horn^{1,2} P.,
Kovács^{1,2} M.

¹Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.
²MTA-KE Állattenyésztési és Állathigiéniai Kutatócsoport, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők fumonizin B₁ (FB₁) mikotoxin membránkárosító, illetve membránműködést befolyásoló hatását vizsgálták. Első lépésben egészséges nyúl vörösvértestekből izolált szellemsejteket vizsgáltak, melyeket emelkedő koncentrációjú (10, 50 és 100 μM) tisztított FB₁-el inkubáltak, majd DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrién) fluoreszcens festékkel jelölték, ezt követően meghatározták a fluoreszcens anizotrópiát. Második lépésben intakt humán vörösvértestekben megvizsgálták, hogy azokat 7 illetve 24 órán át tisztított, 50 μM illetve 1 mM FB₁-el inkubálva emelkedik-e a K-ion kiáramlása, ami a vörösvértestek membránkárosodásának érzékeny mutatója. A kísérletsorozat harmadik lépéseként 5 mg/nap/állat FB₁ toxinnal 10 napon át kezelt nyulakból származó vörösvértesteket vizsgáltak. A kísérleti állatokból származó vörösvérsejt szellemsejteket DPH-val jelölték, majd megmérték azok fluoreszcens anizotrópiáját. A növekvő (10–50–100 μM) koncentrációjú FB₁ nem okozott változást a szellemsejtek fluoreszcens anizotrópia értékeiben 1 és 4 órás kezelést követően. Az 50 μM FB₁-el 7 órán keresztül tartó inkubáció hatására az extracelluláris tér Na-ion koncentrációja 147,5–149,2 mmol/L, míg K-ion koncentrációja 0,04–1,64 mmol/L között változott. A mért koncentrációk sem a referenciaként használt oldattól, sem pedig a kiindulási 0 órás értékektől nem különböztek jelentősen és szignifikánsan. Ehhez képest a 24 órás, 1 mM FB₁-el való inkubáció kismértékű Na-kiáramlás emelkedést eredményezett (182,4–190,6 mmol/L), míg a K-kiáramlás nem emelkedett a fiziológiás határérték fölé (a maximális koncentráció 3,8 mmol/L volt). A toxinnal kezelt nyulak vörösvérsejtjeiből készült szellemsejtek anizotrópiája 4 órás inkubációt követően hasonló értékeket mutatott, mint az egészséges nyulakból származóké. A FB₁ in vitro és in vivo körülmények között tehát, az alkalmazott dózisokban, nem volt hatással az ember és a nyúl vörösvérsejtjeinek vizsgált fiziko-kémiai tulajdonságaira.

(Kulcsszavak: fumonizin B₁, membránfluiditás, vörösvérsejt, nyúl, sertés)

ABSTRACT

Effect of fumonisin B₁ mycotoxin on membrane fluidity of human and rabbit erythrocytes

D. Hafner¹, P. Bogner¹, V. Rajli^{1,2}, G. Tornyos¹, R. Pósa¹, P. Horn^{1,2}, M. Kovács^{1,2}

¹University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, H-7400, Kaposvár, Guba S. 40.

²MTA-KE Research Group of Animal Breeding and Animal Hygiene, H-7400, Kaposvár, Guba S. 40.

The authors examined the membrane damaging effect of fumonisin B₁ (FB₁). First, Hb-free ghosts of erythrocytes were isolated from healthy rabbits, incubated with purified FB₁ (10,

50 and 100 μM) for 1 and 4 hours, labelled with DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene), for determining the fluorescent anisotropy. Secondly, intact human red blood cells were incubated with purified FB₁ (50 μM and 1 mM) for 7 and 24 hours, and extracellular (EC) K⁻ ion concentration as a sensitive indicator of membrane damage was determined. Finally, rabbits were treated with 5 mg FB₁/day/animal for 10 days. Ghost cells isolated from the treated animals were labelled with DPH, and the fluorescent anisotropy was determined. Increasing concentration of FB₁ (10–50–100 μM) did not cause change in the fluorescent anisotropy of the ghosts isolated from healthy rabbits. After incubation of the intact human erythrocytes with 50 μM FB₁ for 7 hrs, the EC Na⁺ and K⁺ concentrations were 147.5–149.2 mmol/L and 0.04–1.64 mmol/L, respectively. No significant difference attributable to the toxin was detected. Incubation with the same concentration of FB₁ for 24 hrs resulted in a slight increase in the EC Na⁺ level (182.4–190.6 mmol/L), while the K⁺ level remained unchanged. Ghosts of the rabbits treated with FB₁ showed similar anisotropy to those of untreated animals. It could be concluded that FB₁ in the applied concentrations did not cause changes in the different physical-chemical parameters examined in human and rabbit erythrocytes' membranes.

(Keywords: fumonisin B₁, membrane fluidity, erythrocytes, rabbit, pig)

BEVEZETÉS

A fumonizin B₁ (FB₁) a *Fusarium verticillioides* penészgomba másodlagos anyagcsere terméke. A toxin pontos hatásmechanizmusa még ma sem teljesen ismert. Molekulaszerkezete nagyon hasonló a szfingolipidekéhez (Shier, 1992), specifikus támadáspontja a szfinganin-N-acetiltransferáz enzim. Így egyrészt gátolja a szfingolipidek bioszintézisét, másrészt a komplex szfingolipidek lebomlásakor keletkező szfingozin ismételt belépését a szfingolipid szintézis körforgásába. Ennek eredményeként a fumonizin hatást követően a szfinganin (SA) és szfingozin (SO) aránya (SA/SO) megnövekszik, amely érzékeny és specifikus biomarker az állatok fumonizin felvételének igazolására (Riley és mtsai., 1993, 1994; Wang és mtsai., 1992).

A szfingolipidek többnyire a sejtmembránban, lipoproteinekben, és más lipidben gazdag képletekben találhatóak. Különösen fontosak a plazmamembrán kaveoláinak kialakításában, jelentősen befolyásolják a membránok tulajdonságait (Blumberg és mtsai., 1995). Az egyes állatfajokban FB₁ hatására bekövetkező nagyon eltérő kórképek (lovak agylágyulása, sertések tüdőödémája) oka feltehetően az, hogy a sejtek eltérő módon reagálnak a megváltozott szfingolipid metabolizmusra.

Az egyes állatfajokban FB₁ hatására kialakuló kórképek hátterét vizsgálva Ramasamy és mtsai. (1995) sertések tüdőartériájából izolált endothel sejtekben megváltozott barrier funkciót, fokozott albumin transzportot tapasztaltak. Gumprecht és mtsai. (2001) szintén számos sejtet vizsgáltak sertésben, juhban, nyúlban és patkányban, de FB₁ hatására csak a sertésben és csak az endothel sejtekben találtak transzport folyamat változást. Bouhet és mtsai. (2004) sertés bélhám- és vesehámsajt vonalakban vizsgálva a FB₁ hatását a toxint nem találta citotoxikusnak, de gátolta a proliferációt és befolyásolta a barrier funkciót. Csirke peritonealis makrofág sejteket FB₁-el inkubálva a citotoxikus hatás mellett megváltozott membránműködés miatt a toxin csökkent fagocitáló képességet eredményezett (Qureshi és Hagler, 1992). Minervini és mtsai. (2004) vizsgálatában 70 μM FB₁ apoptózist indukált humán erythroleukémia sejtekben. Szerintük a FB₁ citotoxikus hatása biztosan nem a membránkárosodásra volt visszavezethető. Véleményük szerint a humán vérsejtek érzékenyek mikotoxinokra, így alkalmasak azok sejttoxikus hatásának *in vitro* vizsgálatára.

A fluiditás (mikroviszkozitás) a sejtmembrán fiziko-kémiai jellemzői közé tartozik, amely befolyásolja a sejt működését (pl. transzport folyamatait), életképességét, növekedését, osztódását, a membránenzimek aktivitását, a sejt-sejt közötti kommunikációt stb. A membrán szerkezetének megváltozása kihat a mikroviszkozításra, amely befolyásolja az egyértékű ionok (pl. kálium) kiáramlását, azaz a membrán permeabilitását. A sejtmembrán permeabilitásának kialakításában jelentős szerepet kapnak annak lipid komponensei, így a szfingolipidek, foszfolipidek, a szabad koleszterin, a telített és a telítetlen zsírsavak aránya (*Chesney és mtsai.*, 1986; *Nelson*, 1972). A szfingolipideknek a membrán tulajdonságainak kialakításában betöltött szerepe, valamint a FB₁ hatásmechanizmusa ismeretében vált indokoltá annak vizsgálata, vajon a toxin hatására a szfingolipidek metabolizmusában bekövetkező változás kihat-e a membrán-fluiditásra, befolyásol-e bizonyos transzport folyamatokat.

Az FB₁ dózisének megválasztásakor az alábbi szakirodalmi adatokra hagyatkoztunk: citotoxikus és apoptózist indukáló hatás *in vitro* kimutatása (0,1–100 µM koncentrációban) humán nyelőcső hámsejtekben (*Myburg és mtsai.*, 2002), pulyka limfocitákban (*Dombrink-Kurtzman*, 2003), humán colon hámsejt tenyészetben (*Schmelz és mtsai.*, 1998), apoptózis és proliferáció gátlás humán fibroblast, nyelőcső hámsejt és hepatocarcinoma sejtben (*Tolleson és mtsai.*, 1996), megváltozott barrier funkció, fokozott albumin transzport (*Ramasami és mtsai.*, 1995).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti minták

Az FB₁ toxin sejtmembránra, illetve annak fluoreszcens anizotrópiájára gyakorolt hatását több lépésben vizsgáltuk, melyhez humán és nyúl vörösvértesteket és azokból izolált szellemsejteket használtunk.

Egészséges nyúlból származó vörösvértest szellemsejtek („ghost”) vizsgálata

Első lépésben nyúl vörösvértestekből izolált szellemsejteket vizsgáltunk, melyeket emelkedő koncentrációjú (10, 50 és 100 µM) tisztított (98%-os tisztaságú) fumonizin B₁ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) toxinnal inkubáltunk 37 °C-on egy órán át. Az inkubáció után a mintákat 20 percig 20.000 g-n centrifugáltuk, a ghostokat izotóniás „A” oldatban (Na-foszfát puffer, pH: 7,2) reszuszpendáltuk, majd a reszuszpendált szellemsejteket a későbbiekben leírt metodika szerint DPH fluoreszcens festékkel kijelöltük. A fluoreszcens anizotrópia méréseket három párhuzamosban végeztük. A fenti vizsgálatokat a negatív eredmény miatt megismételtük, 50 µM fumonizin B₁-el való 4 órás inkubációt követően.

Humán intakt vörösvérsejtek vizsgálata

A vörösvértestek membránkárosodásának érzékeny mutatója a sejtekben lévő egyértékű ionok passzív kiáramlása, ezért intakt vörösvértestekben megvizsgáltuk, hogy azokat 7 órán át tisztított 50 µM FB₁-el (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) inkubálva emelkedik-e a kálium-ion kiáramlása.

Ezt a kísérletet szintén megismételtük, de magasabb toxinkoncentrációt (1 mM) és hosszabb inkubációs időt (24 h) alkalmazva. A hosszú inkubáció miatt az „A” oldatot 5 mM glukózzal egészítettük ki a sejtek életképességének megtartása érdekében.

FB₁-el etetett nyulakból származó vörösvértest szellemsejtek vizsgálata

A kísérletsorozat harmadik lépéseként FB₁ toxinnal kezelt állatokból származó vörösvértesteket vizsgáltuk. A folyamatos toxinetetés 10. napján vért vettünk a

fülvénából, az alvadásában heparinnal gátolt vérből vörösvérsejt szellemsejteket készítettünk, és megmértük azok fluoreszcens anizotrópiáját.

Állatkísérlet

A kísérletben nyolc (négy kísérleti, T1–4 és négy kontroll, K1–4) Pannon Fehér kifejlett nyúl vett részt. A kísérleti állatok kukoricán elszaporított 500 mg/kg FB₁-et tartalmazó *Fusarium verticillioides* gombatenyészet szuszpenzióját kapták, nyelőcsőszondán keresztül, 10 napon át. Az állatok napi toxinterhelése 5 mg volt (napi kétszeri, egyenlő adagban elosztva). A kontroll állatok ugyanolyan mennyiségű toxinmentes darált kukorica szuszpenzióját kapták, ugyancsak nyelőcsőszondán keresztül. Az állatok az esti órákban *ad libitum* fogyaszthatták a termelésnek és életkornak megfelelő összetételű, kereskedelmi forgalomban kapható nyúltápot.

A 10. napon vért vettünk a fülvénából, az alvadásában heparinnal gátolt vérből vörösvérsejt szellemsejteket készítettünk. A vérplazmában meghatároztuk a vérszérum szabad SA és SO koncentrációját és kiszámítottuk azok arányát (SA/SO érték). A vérvételt követően az állatokat CO₂-os túllattatást követően elvégeztettük, majd elvégeztük kórboncolásukat. A makroszkóposan kóros elváltozást mutató szervekből vett mintákat 4%-os pufferolt formaldehid-oldatban rögzítettük, majd a paraffinba ágyazott szövetekből készített metszeteket hematoxinil-eozin festés után vizsgáltuk.

Laboratóriumi vizsgálatok

Vörösvértest szellemsejt („ghost”) preparátum készítése

A vörösvértest szellemsejteket (hemoglobinmentes sejtek) Dodge és mtsai. (1962) szerinti eljárással izoláltuk. Ehhez a heparinnal (100 IU/ml) alvadásgátolt vért 5 percig 3000 g-n centrifugáltuk (SORVALL RC-5), majd a felülúszót (plazmát) és a fehérvérsejtek alkotta „buffy coat-ot” pipettával leszívtuk. Ezután a vörösvértesteket háromszor izotóniás Na-foszfát pufferben (pH=7,2) mostuk, és a mosások alkalmával a sejteket 10 percig 3000 g fordulaton centrifugáltuk. A mosott vörösvértesteket ezután hipotóniás (20 mOsm) foszfát-pufferben (pH=7,2) 25 °C-on 10 percig lizáltuk, majd az így kapott preparátumot 20 percig 20.000 g-n centrifugáltuk. A kiülepitett szellemsejteket mindaddig a hipotóniás foszfát-pufferben mostuk tovább (általában ez 2–3 mosást jelentett), míg a szellemsejtek hemoglobin mentesekké, azaz „fehérré” váltak. A hemoglobinmentes szellemsejteket ezután izotóniás NaCl-oldatban (pH 7,2) szuszpendáltuk.

Fluoreszcens emissziós anizotrópia mérések

Az izotóniás NaCl-oldatban szuszpendált szellemsejteket fluoreszcens festékekkel, 100 μM DPH-val, 60 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Irodalmi adatokból ismert, hogy a DPH molekula hidrofób karaktere miatt a membránt alkotó kettős lipidréteg hidrofób magjába (domain) épül be. A DPH-val jelölt membránok fluoreszcens anizotrópia mérése a membrán fluiditásáról – mikroviszkozitásáról – illetve a DPH molekulák mozgási szabadságáról ad felvilágosítást.

A méréseket MPF-4 spectrofluorimeter (Hitachi, Japan) segítségével végeztük, 360 nm-es és 425 nm-es hullámhosszokat használva a gerjesztésre, illetőleg a detektálásra. A fluoreszcens anizotrópia értékeket a következő egyenlet alapján számoltuk: $r = (I_{vv} - GI_{vh}) / (I_{vv} + 2GI_{vh})$, ahol I_w és I_{vh} a vertikális polarizátorral és a vertikálisan vagy horizontálisan elhelyezett analízátorral mért fluoreszcencia intenzitásokat jelölik (Donner és Stoltz, 1985). Az optikai rendszer számára szükséges korrekciós faktort (G) az egyes anizotrópia mérések előtt meghatároztuk ($G = I_{hv} / I_{hh}$). A mintákból eredő zajt fluoreszcens festékekkel nem jelölt ghostok szuszpenziójával mértük.

Az intracelluláris kálium kiáramlásának mérése

A mosott intakt vörösvértesteket izotóniás A-oldatban 10%-os hematokrit mellett reszuszpendáltuk. A kontroll és kezelt sejteket ezután 37 °C-on inkubáltuk különböző időtartamban. Az egyes időpontokban a sejtuszpenzióból 200 µl mintát vettük, melyet 13000 g-vel centrifugáltunk (Eppendorf, Németország), majd a felülúszóból meghatároztuk az egyértékű ionkoncentrációt. Az egyértékű ionok mérését lángfotometriás módszerrel végeztük (EFOX-025, Eppendorf, Németország). Az ionkoncentrációt mmol/l mértékegységben fejeztük ki.

A szabad szfinganin és szfingozin meghatározása

Lezárható centrifugacsőben 1 ml vérszérumhoz 1,5 ml 0,8%-os KCl- és 50 µl 1 M KOH-oldatot mérünk, és 1 percig Vortex-szel keverjük. Utána 5 ml etil-acetáttal 30 percig extrahálunk. A csöveket centrifugába téve a szerves és vizes fázisokat elválasztjuk. A felső, etil-acetátos fázisból 4 ml-t mintatartó üvegcsébe pipetázunk, majd 60 °C-on, nitrogén gázáramban szárazra pároljuk. 100 µl MeOH-víz 9:1 elegyben visszaoldjuk, majd 50 µl OPA (orto-ftáldialdehid) oldatot adunk hozzá. Egy óra állás után injektálunk a HPLC kromatográfiás oszlopra. Az elválasztás izokratikus összetételű MeOH-víz 89:11 eluenssel történik. A szérum szfingozin és szfinganin tartalmát standard oldatok segítségével meghatározott kromatográfiás jellemzők felhasználásával állapítjuk meg. A mérést Shimadzu (Japán) HPLC rendszerrel, fluoreszcens detektorral végeztük (excitáció: 340 nm, emisszió: 455 nm), LiChrosorb RP 18 (Merck, Darmstadt, Németország) oszlopon (5 µm, 250x4 mm).

Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez az SPSS v.10.0 programcsomagot használtuk, a kezelések közötti eltérést páros t-próbával, illetve varianciaanalízissel igazoltuk.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Égészséges nyúlból származó vörösvértest szellemsejtek fluoreszcens anizotrópiája

A fluoreszcens anizotrópia mérések célja a vörösvérsejt membrán fiziko-kémiai jellemzése volt, annak vizsgálata, hogy a FB₁ hatására megváltozik-e a sejt felszíni fluiditás (ill. mikroviszkozitás). A fluoreszcens DPH festék a membrán belső hidrofób rétegébe (internal core) épül be. A mérés a festék molekula mozgásáról ad információt, amelyet számos tényező befolyásol. Így pl. alacsony koncentrációjú nem-ionos detergensnek megváltoztatják a membrán permeabilitását, nő a mikroviszkozitás, amit fokozott IC K-kiáramlás kísér. A változást a DPH anizotrópia értékek megfelelően jelzik (*Miseta és mtsai.*, 1995).

Az 1. táblázat adataiból kitűnik, hogy a növekvő (10–50–100 µM) koncentrációjú FB₁ nem okozott változást a szellemsejtek fluoreszcens anizotrópia értékeiben (r-értékek) 1 órás kezelést követően. Korábbi vizsgálatokban, ugyancsak egészséges nyulak vörösvérsejtjeiből készített szellemsejtjei esetében 0,189±0,001 átlag értéket mértek (*Kunszt*, 1998).

A negatív eredmény ismeretében újabb ghost-okat készítettünk, és a korábban alkalmazott 50 µM mennyiségű FB₁-gyel ismét inkubáltuk azokat, de hosszabb ideig, 4 órán keresztül. Látható, hogy az r-értékek kis mértékben ugyan (0,017–0,02), de szignifikánsan emelkedtek, még a FB₁-gyel nem kezelt csoport esetében is. A toxin négy órás inkubációt követően sem okozott változást az anizotrópia értékekben, a kontrollhoz (0 FB₁) képest. Az eredményekből az látszik, hogy az alkalmazott toxinkezelésnek nem volt szignifikáns hatása a szellemsejtek anizotrópia értékeire.

1. táblázat

Egészséges nyúlból származó szellemsejtek fluoreszcens anizotrópia értékei 1 és 4 órás, eltérő koncentrációjú FB₁-es kezelés után

Inkubációs idő (óra)	1		4		
FB ₁ (μM)	10	50	100	0	50
átlag	0.195 ^a	0.196 ^a	0.194 ^a	0.214 ^b	0.213 ^b
±SD	0.003	0.006	0.008	0.005	0.006

n=9 minden vizsgálatban (*n=9 in all trials*); ^{a,b} P<0,05 szinten szignifikáns különbség (^{a,b} significant difference at the level of P<0,05)

Fluorescence anisotropy values of ghost cells from healthy rabbits after treatment with FB₁ of different concentrations for 1 or 4 hours

Humán intakt vörösvérsejtek vizsgálata

Az egyértékű ionok sejten belüli koncentrációja szigorúan szabályozott és állandó. A humán vörösvérsejtek a nyúléhoz hasonlóan HK (high potassium type) típusúak, azaz intracellulárisan (IC) magas K- és alacsony Na-szinteket találunk, szemben pl. a kérődzőkben és a ragadozóknak is fellelhető LK („low potassium type”) vörösvérsejtekkel. Az ion polimorfizmus – a K és Na különbözősége – fajok között és fajokon belül is megfigyelhető, de a plazma K és Na értékeiben ez nem jelent eltérést (*Wheatley és mtsai.*, 1994) azaz, a plazmában LK típusú fajok esetében is alacsony a K- és magas a Na-koncentráció.

Miután a szfingolipidek a sejtmembrán alkotói, és befolyásolják a transzport folyamatokat, feltételeztük, hogy a FB₁ hatására megváltozott szfingolipid metabolizmus mérhetően csökkenti, vagy emeli az egyértékű anionok kiáramlását.

A fumonizin B₁-gyel kezelt humán intakt vörösvérsejtekből való egyértékű ionkiáramlás mértékének változását az extracellulárisan mért Na- és K-ion koncentrációk alapján vizsgáltuk. Az 1. vizsgálatban, 50 μM FB₁-el 7 órán keresztül tartó inkubáció hatására az EC tér Na-ion koncentrációja 147,5–149,2 mmol/L, míg K-ion koncentrációja 0,04–1,64 mmol/L között változott. A mért koncentrációk sem a referenciaként használt A-oldattól, sem pedig a kiindulási nulla óras értékektől nem különböztek jelentősen és szignifikánsan.

Az eredmény ismeretében, magasabb toxinkezelést és hosszabb inkubációs időt követően megismételtük a vizsgálatot. Ez mindkét ion koncentrációja esetében kismértékű emelkedést eredményezett az EC térben, azonban ezek változása ugyancsak nem tekinthető számottevőnek és nem volt szignifikáns.

Az EC tér fiziológiás Na- és K-koncentrációja 135–155, illetve 3,5–5,5 mmol/L között változik (*Gál*, 1999). Ehhez képest a 24 órás, 1 mM FB₁-el való inkubáció eredményezett kis mértékű Na-kiáramlás emelkedést (182,4–190,6 mmol/L), míg a K-kiáramlás nem emelkedett a fiziológiás határérték fölé (max. konc.: 3,8 mmol/L).

Fumonizin B₁ expozíció hatása nyulakban

Klinikai tünetek

A kísérlet alatt egy állat (T1) nem vagy csak kevés takarmányt fogyasztott, a 8. napon bekövetkező elhullást megelőző időszakban már bágyadt volt. Egy másik állat (T2) a kísérlet utolsó napján (10. nap) mutatott tüneteket (bágyadt volt, ingerekre nem reagált).

Kórbonctani, kórszövettani elváltozások

Boncoláskor a toxinnal etetett nyulakban talált elváltozások alátámasztották azokat az irodalmi adatokat, amelyek szerint nyúlban a toxin célszerve a máj és a vese. Jellemző elváltozás volt a máj megnagyobbodása, fakó színe, esetenként szakadékonysága, valamint a vese fakóvá válása. Kórszövettanilag a májban elfajulás, zsíros infiltráció és magános májsejt elhalás, a vesében pedig a tubulusok elhalása volt megfigyelhető.

A szérum SA/SO értéke

A szérum szabad szfinganin koncentrációjának megemelkedése a szabad szfinganin és szfingozin arányának (SA/SO) emelkedését eredményezi. Ez a paraméter a FB₁ toxikózis legérzékenyebb és legspecifikusabb biomarkereként ismert, ami már korán, a toxinhatás kezdetét követően néhány napon (5–8 nap) belül jelzi a károsító hatást (Riley és mtsai., 1993). Egészséges állatokban a szfingozin mennyisége nagyobb, amit a <1 SA/SO értéke jelez. FB₁ hatására a szfinganin felhalmozódása miatt emelkedik a SA/SO, értéke >1 lesz.

Kísérletünkben a 10 napos FB₁ etetést követően, az állatok elvezetésével vett vérmintában mértük a szabad szfingoid bázisok koncentrációját. A toxin hatását egyértelműen jelezte a szfinganin koncentrációjának többszörösre való emelkedése, a kezelt nyulak (1,72±0,22) vérplazmájának kontrollhoz (0,38±0,10) képest szignifikánsan (P<0,5) nagyobb SA/SO értéke.

A szellemsejtek fluoreszcens anizotrópiája

A toxinnal kezelt nyulak vörösvérsejtjeiből készült szellemsejtek anizotrópiája hasonló értékeket mutatott, mint az egészséges nyulakból származóké 4 órás inkubációt követően (2. táblázat). A kísérleti állatokban a membrán mikroviszkozitására utaló paraméterben láthatóan nem volt eltérés a kontrollhoz viszonyítva. Megállapítható tehát, hogy a FB₁ 10 napos *in vivo* kezelés hatására sem okozott változást a vizsgált paraméterben.

2. táblázat

A kontroll és a kezelt nyulakból származó szellemsejtek fluoreszcens anizotrópiája (n=4, átlag±SD)

	Kontroll (n=4)	Kezelt (n=4)
Anizotrópia (r)	0,213±0,007	0,212±0,009

Table 2: Fluorescence anisotropy of ghost cells from control and experimental rabbits (n=4, mean±SD)

KÖVETKEZTETÉSEK

A plazmamembrán fiziko-kémiai tulajdonságai szorosan összefüggnek a K-ionok permeabilitásával. Így nem meglepő, hogy a FB₁ hatására változást nem mutató DPH anizotrópia mellett az egyértékű kationok kiáramlásában sem találtunk toxinhatásra kialakuló változást.

Az *in vitro* kísérletek negatív eredményei felvetették azt, hogy a toxinnak a szfingolipidek forgalmát megzavaró hatása *in vivo* zajlik le, és a káros hatás kialakulásához hosszabb időre (napok) van szükség. Ezért végeztük el az állatetelési kísérletet, amelynek során a 10 napos magas dózisú (5 mg/nap/állat) toxin bevitellel előidézünk nyúlban a FB₁ toxikózist. A toxinhatást a kórbonctani és kórszövettani vizsgálat, valamint a biomarker (SA/SO) jellemző változása megerősítette. A FB₁

kifejtette hatását a szfingolipidek metabolizmusára, megnőtt a szabad szfinganin mennyisége, amit a SA/SO emelkedése jelzett. Ez a változás azonban nem hatott ki a vörösvérsejtek membránjának a vizsgált paraméterekben mérhető működésére.

Összefoglalva megállapítható, hogy a FB₁, *in vitro* és *in vivo* körülmények között vizsgálva, az alkalmazott dózisokban nem volt hatással az ember és a nyúl vörösvérsejtjeinek fiziko-kémiai tulajdonságaira. A toxinhatásra *in vivo* a szfingolipid metabolizmusban kialakult a jellemző károsodás, amit a szignifikánsan megemelkedett SA/SO értékek jeleztek. Mindennek azonban nem volt hatása a vörösvérsejtek membránjának vizsgált tulajdonságaira.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatást támogató projektek: Oktatási Minisztérium (NKFP 4/024/2004), TÉT Alapítvány (ZA-28/2006).

IRODALOM

- Blumberg, P.M., Ács, G., Ács, P. (1995): Protein kinase C in cell signaling: strategies for the development of selective inhibitors. *Inflammation: mechanism and therapeutics*. Birkhauser Verlag, Basel, 87-100.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., Oswald, I.P. (2004): The mycotoxin FB₁ alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol. Sci.*, 77. 1. 165-171.
- Chesney, R.W., Gusowski, N., Zelikovi, I. (1986): Membrane fluidity and phospholipid composition in relation to sulfur amino acid intake in brush border membranes of rat kidney. *Pediatr. Res.*, 20. 1305-1309.
- Dodge, J.T., Mitchel, M., Hanahan, D.J. (1962): The preparation and chemical characteristics of Hb-free ghosts of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 34. 119-130.
- Dombrink-Kurtzman, M.A. (2003): Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathol.*, 156. 4. 357-364.
- Donner, M., Stoltz, J.F. (1985): Comparative study on fluorescent probes distributed in human erythrocytes and platelets. *Biorheology*, 22. 385-397.
- Gaál T. szerk. (1999): Állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztika. Sík Kiadó : Budapest, 1-490.
- Gumprecht, L.A., Smith, G.W., Constable, P.C., Haschek, W.M. (2001): Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alteration: potential role in porcine pulmonary edema. *Toxicol.*, 160. 71-79.
- Kunszt G. (1998): Egyértékű kationok transzport mechanizmusai és azok fiziko-kémiai háttere emlős erythrocytáknak. *Rektori Pályamunka, PTE, Pécs*, 1-36.
- Minervini, F., Fornelli, F., Flynn, K.M. (2004): Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B₁ in a human erythro-leukemia cell line. *Toxicol. In Vitro*, 18. 1. 21-28.
- Miseta, A., Bogner, P., Szarka, Á., Kellermayer, M., Galambos, Cs., Wheatley, D.N., Cameron, I.L. (1995): Effect of non-lytic concentrations of brij series detergents on the metabolism-independent ion permeability properties of human erythrocytes. *Biophys. J.*, 69. 2563-2568.
- Myburg, R.B., Dutton, M.F., Chuturgoon, A.A. (2002): Cytotoxicity of fumonisin B₁, diethylnitrosamine and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. *Environ. Health Persp.*, 8. 813-815.

- Nelson, G.J. ed. (1972): Lipid composition and metabolism of erythrocytes, blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition and metabolism. John Wiley and Sons Inc., 318-348.
- Qureshi, M.A. and Hagler, W.M. (1992): Effect of fumonisin B₁ exposure on chicken macrophage functions in vitro. *Poult. Sci.*, 71. 104-112.
- Ramasamy, S., Wang, E., Henning, B., Merrill, A.H. (1995): Fumonisin B₁ alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133. 343-348.
- Riley, R.T., An, N.H., Showker, J.L., Yoo, H.S., Norred, W.P., Chamberlain, W.J., Wang, E., Merrill, A.H., Motelin, G., Beasley, V.R., Haschek, W.M. (1993): Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118. 105-112.
- Riley, R.T., Wang E., Merrill, A.H. Jr. (1994): Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: Use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J. Assoc. Off Anal. Chem. Int.*, 77. 533-540.
- Schmelz, E.M., Dombrink-Kurtzman, M.A., Roberts, P.C., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Merrill, A.H. Jr. (1998): Induction of apoptosis by fumonisin B₁ in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free shingoid bases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 148. 2. 252-260.
- Shier, W.T. (1992): Sphingosine analogues: an emerging new class of toxins that includes the fumonisins. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, 11. 241-257.
- SPSS Inc 1996. SPSS for Windows, Version 7.5, Chicago, IL.
- Tolleson, W.H., Melchior, W.B.Jr., Morris, S.M., McGarrity, L.J., Doman, O.E., Muskhelishvili, L., James, S.J., Howard, P.C. (1996): Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B₁ in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma. *Carcinogenesis*, 17. 2. 239-249.
- Wang, E., Ross, P.F., Wilson, T.M., Riley, R.T., Merrill, A.H. Jr. (1992): Increases in serum sphingosine and sphinganine, and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.*, 122. 1706-1716.
- Wheatley, D.N., Miseta, A., Kellermayer, M., Galambos, Cs., Bogner, P., Berényi, E., Cameron, I.L. (1994): Cation distribution in mammalian red blood cells: interspecies and intraspecies relationships between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations. *Physiol. Chem. Phys. and Med.*, 26. 111-118.

Levelezési cím (*Corresponding author*):

Kovács Melinda

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar

7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

University of Kaposvár, Faculty of Animal Sciences

H-7401 Kaposvár, P.O.Box 16.

Tel.: 36-82-505-970, Fax: 36-82-82-505-970

e-mail: kovacs.melinda@ke.hu