

A 2024-BEN SIKERESEN MEGVÉDETT PHD DISSZERTÁCIÓK ÖSSZEFOGLALÓI - ELSŐ RÉSZ

(SUMMARIES OF PHD DISSERTATIONS IN THE YEAR OF 2024 - PART ONE)

A fumonizin B sorozat hatása a patkányokból, sertésekből és nyulakból származó specifikus szövetek biomembránjainak zsírsavösszetételére

Fumonisin B series' implications on biomembranes' fatty acid compositions of specific tissues from rats, swine and rabbits

OMER ALFAROUG Ali

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
(Hungarian University of Agriculture and Life Sciences)
Állattenyésztési tudományok Doktori Iskola
(Doctoral School of Animal Science)
Kaposvár, 2024.

Témavezető (supervisor): SZABÓ András DSc

ÖSSZEFOGLALÁS

Első tanulmány. Ebben a tanulmányban hím Wistar patkányokat ($n = 6$ állat/csoport) kezeltünk tiszta fumonizin B₁-gyel (FB₁: 0, 20, 50 és 100 mg/kg takarmány dózis ekvivalens) intraperitoneálisan, 5, illetve 10 napig, a dózis- és expozíciós időfüggő hatások vizsgálata céljából, a vese és a máj foszfatidilkolin (PC), foszfatidilinozitol (PI) és foszfatidiletanolamin (PE) frakciók esetében. A vesében a PC frakció zsírsavai közül növekedést igazoltunk a telített zsírsavakban (Σ SFA) 5 napot követően, majd pedig 10 nap után jelentős csökkenést figyeltünk meg a többszörösen telítetlen zsírsavak arányában (Σ PUFA) (összes n_3 (Σn_3), összes n_6 (Σn_6), telítetlenségi index (UI) és átlagos szénlánc hossz (ACL), a legtöbb esetben lineáris dózisválasz formájában. A vese PC frakcióban további jelentős dóziszfüggő növekedést mutatott az összes egyszeresen telítetlen zsírsav (Σ MUFA) részaránya. Hasonló mintázatokat, de enyhébb formában figyeltünk meg a vese PI zsírsavakban, amelyek csökkenést mutattak a PUFA, (dóziszfüggő formában), UI és ACL esetében, mind 5, mind pedig 10 nap alatt, míg a vese PE frakció csökkenést mutatott a Σn_6 és növekedést a Σ SFA esetekben, de ez csak 5 nap után volt megfigyelhető. A májban a PC frakció zsírsavprofilja növekedést mutatott a telítettségben (C16:0) és csökkenést a többszörösen telítetlen C20 zsírsavak arányában (C20:3 n_6 és C20:3 n_3). Hasonló eredményeket figyeltünk meg a PI zsírsavprofilban 5 nap után, azonban a PC és PI zsírsavai nem reagáltak dóziszfüggő módon az FB₁-re. A PE zsírsavprofilban aránycsökkenést mutatott a C20:3 n_6 , és a Σn_6 , míg a dóziszfüggő növekedést mutatott a Σn_3 zsírsavcsoport. Az eredmények kifejezett érzékenységet jeleznek a vese esetében, megerősítve korábban publikált eredményeinket az oxidatív stresszel és a kórszöveti változásokkal kapcsolatban.

Második tanulmány. Ebben a tanulmányban 35 napos korú választott malacokat ($n = 6$ állat/csoport), 0, 15 és 30 mg/kg FB sorozatú mikotoxinokat (FB1, FB2 és FB3) tartalmazó kísérleti takarmánnyal kezeltünk 21 napig, elsősorban toxindózis-függő módosulások jellemzésére vörösvértest membránokban. A ouabain-szenzitív Na^+/K^+ ATPáz aktivitását mértük lizált sejtek membránjaiban, valamint elemeztük a membrán zsírsavprofil, illetve az antioxidáns és a lipid-peroxidációs paramétereket. 3 hét expozíció után szignifikáns különbség ($p = 0,036$; $R^2 = 0,58$) volt megfigyelhető a nátrium pumpa aktivitásában az eritrocita membránban a kontroll csoport és a 30 mg/kg takarmány-dózist kapott csoport között, a változás pedig dóziszfüggő volt. A sejtmembrán zsírsavprofilja határozottan telített volt, a csoportok közötti eltérések nem voltak szisztematikusak, de az enzimaktivitás és zsírsavprofil adatok együttes értékelésekor negatív összefüggést figyeltünk meg a nátrium pumpa aktivitása és az összes egyedi membrán n6 zsírsav aránya között. Függetlenül az alkalmazott FB toxinok dózisától, az intracelluláris antioxidánsok (például a redukált glutation (GSH) és a glutation-peroxidáz (GPx)) és a lipid-peroxidációs mutatók (konjugált diének, triének és malondialdehid (MDA)) nem mutattak értékelhető választ. Feltételezhető, hogy a FB mikotoxinok ceramid szintézis gátló hatása a sejtmembrán összetételére hatott. Ez a hatás dóziszfüggő volt, ami növekedést eredményezett a nátrium pumpa aktivitásában, amely negatívan korrelált az n6 zsírsavakkal, viszont nem járt együtt lipid-peroxidációval.

Harmadik tanulmány. Ebben a tanulmányban választott hímivarú malacokat hatos csoportokra osztottunk, és 0, 15 vagy 30 mg/kg FB-t tartalmazó kísérleti takarmányt kaptak, háromhetes expozíció keretében. A cél az volt, hogy megvizsgáljuk a különböző membránlipid osztályok/frakciók zsírsavösszetételét, a lipid peroxidáció mértékét és a májban és a tüdőben esetlegesen bekövetkező szövettani változásokat. A malacok termelési tulajdonságai és a lipid peroxidáció szintje nem változott, azonban fokozott mértékű szövettani elváltozásokat igazoltunk a májban. Lineáris mikotoxin dózis-választ igazoltunk a máj PC frakciójában a C16:1 n7, C18:1 n9 és ΣMUFA arányok esetében, valamint a tüdő PC frakciójában a C22:6 n3, Σn3 és a Σn6 és Σn3 zsírsavak arányában. Hasonló megfigyeléseket tettünk a tüdő PS frakciójában a C20:0 és C24:0 esetében. A tüdő SM frakciójában csökkenést tapasztaltunk a ΣSFA esetében és növekedést a ΣMUFA arányban. A PC frakciójában a Σn6 csökkent, és a $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ arány növekedett a máj esetében, míg a tüdőben a ΣMUFA és a ΣPUFA arányok emelkedtek. A PS frakciójában a Σn3 csökkenését igazoltuk a májban, míg a tüdőben a ΣMUFA és a $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ arány emelkedését figyeltük meg. A máj PS növekedést mutatott a $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ arány vonatkozásban, míg a tüdő PS csökkenést mutatott a ΣSFA -ban, növekedést a ΣPUFA -ban, és növekedést a Σn6 -ban és annak arányában a Σn3 -hoz képest. A PI frakciójában a $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ csökkent a májban, és a tüdőben növekedést tapasztaltunk a C22:1 n9-ben, csökkenést a C22:6 n3-ban, csökkenést a ΣSFA -ban, és növekedést a ΣMUFA -ban. Összefoglalva, az FB expozíció nem hátráltatta növekedést és nem indukált jelentős lipid-peroxidációt. Azonban a hepatotoxicitás nyilvánvaló volt az alkalmazott expozíciós időszak és alkalmazott dózisok esetében, elsősorban az igazolt megfigyelt szövettani elváltozások alapján. A zsírsav aránymódosulások függetlenek voltak a lipid peroxidációtól, ami a zsírsav metabolizmus zavarát sugallta, megerősítve a patkányokban korábban publikált eredményeket.

Negyedik tanulmány. Ebben a vizsgálatban takarmányeredetű FB mikotoxinok

baknyulak szaporodási szervrendszerére ($n = 10$ állat/csoport) gyakorolt hatáseit elemeztük 65 napos per os adagolás és két dózis esetében (10 és 20 mg/kg takarmány dózis). Az intoxikáció nem befolyásolta a test és a here súlyát, sem a herék teljes foszfolipidjeinek zsírsavösszetételét és szövettani képet igazolható szinten, azonban a herékben az FB mikotoxinok növelték a GSH és a GPx koncentrációját és aktivitását, illetve csökkentették a lipid peroxidáció kezdeti fázisát jelző konjugált diének és triének szintjeit, dóziszfüggő módon. Feulgen- festett kenetek segítségével követtük nyomon a spermiumok morfológiáját és a kromatin kondenzációját. Nem találtunk jelentős különbségeket a kezelt csoportok és az egyes a mintavételi időpontok adatai között. A sperma élő sejtjeinek aránya, melyet áramlási citometriával értékeltünk, nem volt különböző a csoportok között az öt mintavételi időpont egyikén sem, és azonos volt a csoportokon belül is. Hasonlóképpen, a spermatozoa membránjának lipidprofilja azonos volt mindhárom csoportban a teljes expozíció után. Összefoglalva, azt tapasztaltuk, hogy még viszonylag magas (nem realiztikus) dózisokban sem gyakorolnak az FB-k súlyos káros hatást a hímivarú nyulak szaporodási szervrendszerére, de kis mértékben fokozzák az antioxidáns védelem mértékét a herékben.

Summary

First study. Graded exposure to fumonisin B1 (FB1) in rats has been demonstrated to modify hepatic membrane lipids, a fact corroborated both in vivo and in vitro. Within this study, male Wistar rats ($n = 4 \times 6$) were intraperitoneally administered pure FB1 (0, 20, 50, or 100 mg/kg dietary dose equivalent) for 5 or 10 days to evaluate the dose- and time-dependent impacts on the fatty acid profiles of renal and hepatic phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI), and phosphatidylethanolamine (PE). In the kidney, the PC fatty acid profile displayed an increase in saturation (Σ SFA) within 5 days, and after 10 days, a marked decrease in polyunsaturation (Σ PUFA) was observed (total n3 (Σ n3), total n6 (Σ n6), unsaturation index (UI), and average FA chain length (ACL)), majorly with a linear dose- response. A further marked dose-dependent increase in overall monounsaturation (Σ MUFA) was observed in renal PC. Similar patterns, to a lesser extent, were observed in the renal PI fatty acids, displaying a decrease in PUFA (provided a dose-response), UI, and ACL over both 5 and 10 days, while the renal PE fraction revealed a decrease in Σ n6 and an increase in Σ SFA, but this was observed only after 5 days. In the liver, PC displayed an increase in saturation (C16:0) and a decrease in polyunsaturation (C20:3 n6, and C20:3 n3). Similar findings were observed in the PI fatty acid profile after 5 days. However, the fatty acid compositions of PC and PI did not respond to FB1 in a dose- dependent manner. In the PE fatty acid profile, there was a decrease in C20:3 n6 and Σ n6, but a dose- dependent increase in Σ n3. The results revealed pronounced renal sensitivity (providing the most dose-dependent responses), corroborating our earlier published findings regarding oxidative stress and histopathological modifications. Notably, membrane fatty acid modifications in rat tissues occurred at a relatively low exposure to FB1 (less than 50 mg/kg diet), in contrast to the higher doses used in other studies.

Second study. The impact of fumonisins on cellular membrane compositional modification and Na⁺/K⁺ ATPase activity in rabbit erythrocytes is established,

however, such effects have not been investigated in other animal species. Within the undertaken study, weaned piglets ($n = 6$ animals/group) aged 35 days were fed a diet containing FBs (FB1, FB2, and FB3) at concentrations of 0, 15, and 30 mg/kg for 21 days to assess the potential dose-dependent modifications in erythrocyte membranes induced by the mycotoxins. The activity of Na^+/K^+ ATPase, which is ouabain-sensitive, was measured in the membranes of lysed erythrocytes. The fatty acid profile of the membrane was analyzed, along with antioxidant and lipid peroxidation endpoints. After 3 weeks of exposure, a significant difference (p -value = 0.036; $R^2 = 0.58$) in the activity of the sodium pump in the erythrocyte membrane was observed between the control group and the 30 mg/kg group, which was dose-dependent. The fatty acid profile of the membrane was highly saturated, with nonsystematic differences between groups. Upon pooling the data, a negative association was observed between the activity of the sodium pump and all individual membrane n6 fatty acids. Regardless of the applied dose of FBs, intracellular antioxidants (such as reduced glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx)) and lipid peroxidation indicators (conjugated dienes, trienes, and malondialdehyde (MDA)) showed no response. It is hypothesized that the effect of a CerS inhibitor (FBs) is exerted on the cell membrane. This effect was dose-dependent, resulting in an increase in sodium pump activity that was negatively associated with n6 fatty acids, and no lipid peroxidation was observed.

Third study. The rat model is predominantly investigated in terms of FB1-induced lipid membrane alterations, while investigations involving other species are infrequent. In the case of swine, the liver and lungs are the organs most affected by FBs. In this study, male piglets that had been weaned were divided into groups of six and fed a diet containing FBs at 0, 15, or 30 mg/kg, and the feeding period lasted for three weeks. The purpose of this study was to assess the fatty acid composition of various classes of membrane lipids, the level of lipid peroxidation, and any histomorphological changes in the liver and lungs. The growth performance of the piglets and the level of lipid peroxidation remained unaltered; however, there was an increase in the overall liver lesion score. A linear dose-response relationship was observed in the liver PC for C16:1 n7, C18:1 n9, and ΣMUFA , and in the lung PC for C22:6 n3, Σn3 , and the ratio of Σn6 to Σn3 . C20:0 and C24:0 had similar patterns in the pulmonary PS. Modifications associated with the highest dosage of FBs were observed in various lipid classes. In the lung SM, there was a decrease in ΣSFA and an increase in ΣMUFA . In PCs, Σn6 decreased and $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ increased in the liver, whereas in the lungs, ΣMUFA and ΣPUFA increased. In PSs, the decrease in Σn3 detected in the liver, while increases in ΣMUFA and $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ were observed in the lungs. The hepatic PS showed an increase in $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$, whereas the lung PS exhibited a decrease in ΣSFA , an increase in ΣPUFA , and an increase in Σn6 and its ratio to Σn3 . In the PI, $\Sigma\text{n6}:\Sigma\text{n3}$ decreased in the liver, and in the lungs, there was an increase in C22:1 n9, a decrease in C22:6 n3, a decrease in ΣSFA , and an increase in ΣMUFA . In summary, exposure to FBs did not impair growth or induce marked lipid peroxidation. However, hepatotoxicity was evident from the histopathological lesions observed over the exposure period and at the administered doses. Fatty acid modifications were independent of lipid peroxidation, suggesting a disruption in fatty acid metabolism, which corroborated previous findings in rats. This perturbation in membrane lipids was most observed in PCs.

Fourth study. Rabbits are proposed as suitable model organisms for studies in reproductive toxicology. In this trial, the effects of FBs on the reproductive system of male rabbits (n = 10 animals/group) were assessed after 65 days of oral administration of two doses (10 and 20 mg/kg diet). Neither intoxication affected the weights of the body and testicles, nor did intoxication markedly affect the fatty acid composition of the total phospholipids in the testes. These findings were consistent with the absence of a marked effect on histological traits. However, in the testicles, the FBs increased the concentration and activity of GSH and GPx, respectively, and decreased the initial phase of lipid peroxidation (conjugated dienes and trienes) in a dose-dependent manner. Using Feulgen-stained smears, the sperm morphology and chromatin condensation were monitored. No substantial differences were detected between the treatment groups or between the sampling time points. The ratio of live cells in the sperm, as assessed with flow cytometry, was not distinct among the groups at any of the five sampling time points and was also identical within the groups. Similarly, the lipid profile of the spermatozoa membrane was identical in all three groups after the total intoxication period. In summary, even at unrealistically and unjustifiably high doses, FBs do not exert any severe harmful effects on the leporine, the male reproductive system of rabbits. However, FBs slightly induced antioxidant responses in rabbit testes.

Forrás (source): https://phd.mater.uni-mate.hu/382/1/Dissertation_DOI.pdf