

Cianotoxinok idegéletti hatásainak vizsgálata egy gerinctelen modellrendszer segítségével

Dr. Pirger Zsolt

Ökofiziológiai és Környezettoxikológiai Kutatócsoport
Balatoni Limnológiai Kutatóintézet
Tihany

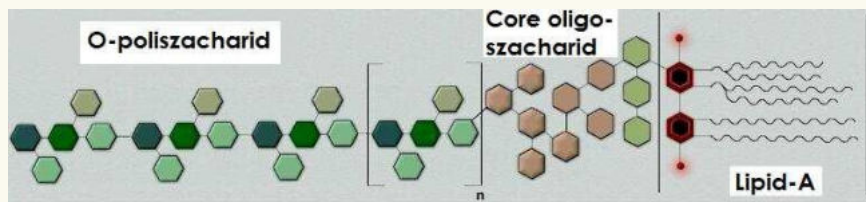


ALGAVIRÁGZÁS – Harmful Algal Blooms (HABs)

Globális probléma. Általában **cianobaktériumok** (kékalgák) dominanciájával kialakuló, erősen időjárás és hőmérséklet függő tömegprodukció, amely a sós- és édesvizekben egyaránt előforduló jelenség.

Miért nem örülünk ennek:

- 1) többségében „**toxin**”**termelő fajok** – részben még ismeretlen idegrendszeri (neurális) és gyomor-bélrendszeri (gastrointestinalis) hatásokkal
- 2) fotoszintetizáló prokarióta szervezetek, a Gram-negatív baktériumokhoz hasonlóan **lipopoliszacharid** (LPS, endotoxin) tartalmuk van – bőr- és nyálkahártya irritációt okozhatnak

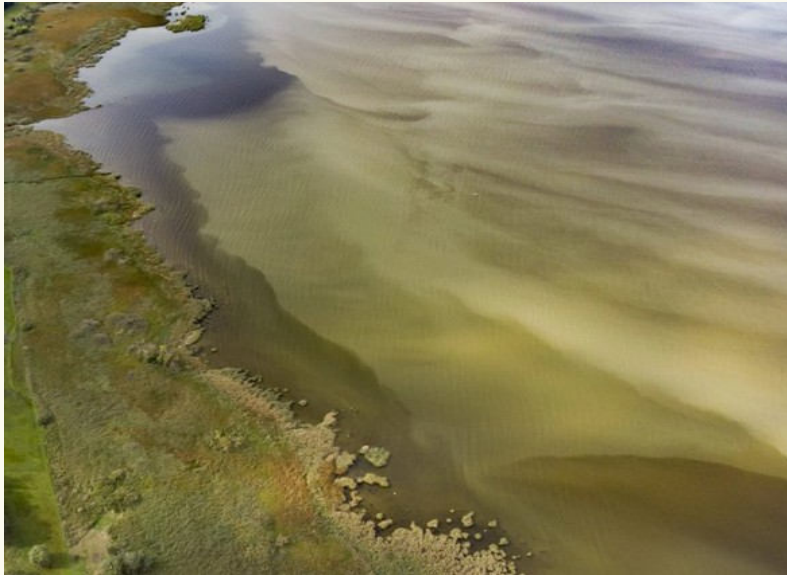


LPS strukturális felépítése



ALGAVIRÁGZÁS – Harmful Algal Blooms (HABs)

A globális klímaváltozással, a vizek átlaghőmérsékletének és antropogén tápanyagterhelésének emelkedésével az egyre gyakoribb **cianobaktérium** **dominanciájú algavirágzás** nemcsak a Balatonban, hanem világszerte az édesvízi tavakban és az óceánokban, tengerekben is rendszeresen előforduló **potenciálisan kockázatos** jelenség, eddig ismeretlen, vagy csak részben ismert idegrendszerre gyakorolt hatásaik okán.

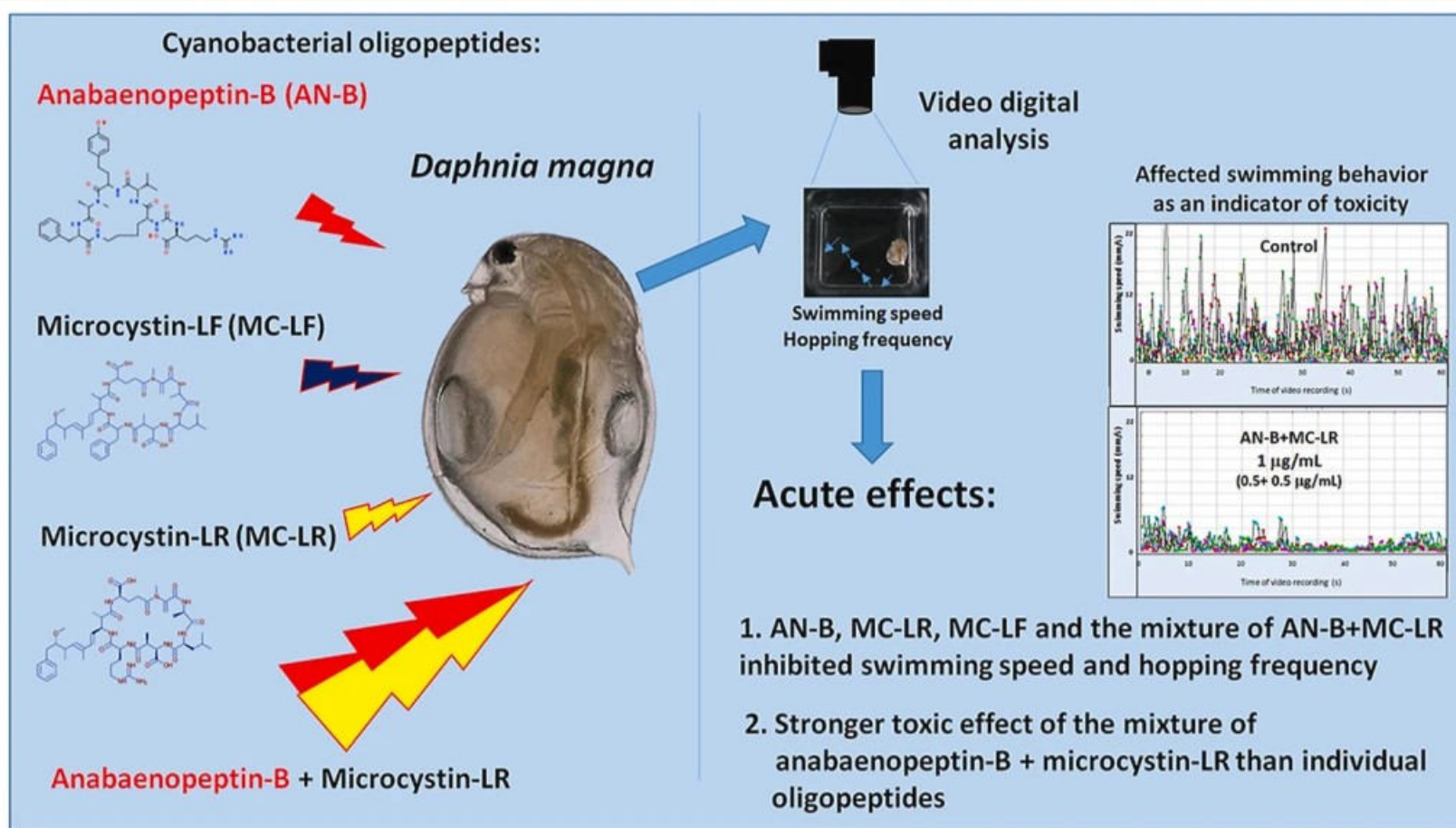


2022, Balaton



2022, Erie-tó (Észak-Amerika)

Cianotoxinok és gerinctelen modellek



B. Pawlik-Skowrońska and A. Bownik, *Toxicon*, 198, 1-11, 2021

Egyed szintű viselkedési mintázatok – közvetlen idegi hatások nem vizsgálhatók!

Hipotézis:

- a **cianotoxinok** befolyásolhatják az idegrendszer működését
- a **cianotoxinok** hasonló hatással bír a gerinctelen és gerinces idegrendszerben, beleértve az embert is

A cianobakteriális toxinok **idegrendszerre gyakorolt potenciális hatásait** egy több célból használható édesvízi gerinctelen modellállat, a **nagy mocsári csiga** (*Lymnaea stagnalis*), jól ismert és részleteiben jellemzett egyszerűbb idegrendszerének segítségével viszonylag könnyedén fel tudjuk tárni, meg tudjuk ismerni.

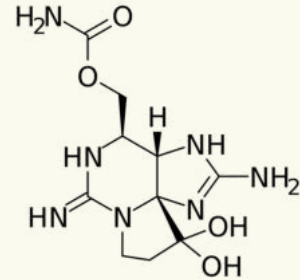


Megválaszolandó kérdésünk:

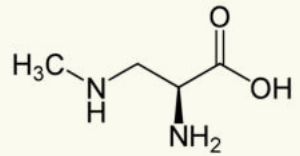
Hogyan hatnak az olyan már ismert, algavirágzásokban előforduló algatoxinok, mint a saxitoxin (STX), a β -N-metilamino-L-alanin (BMAA), a cianopeptidek, az anatoxin és/vagy akár újonnan izolált algatoxinok a vízi élőlényekre (pl. a nagy mocsári csigára) a 1) viselkedési mintázatok, 2) az idegi hálózatok, 3) az azonosított kulcs idegsejtek és 4) a jelátvitelben résztvevő molekulák, molekuláris útvonalak szintjén?

Cianobaktérium toxinok ismert neurobiológiai hatásokkal

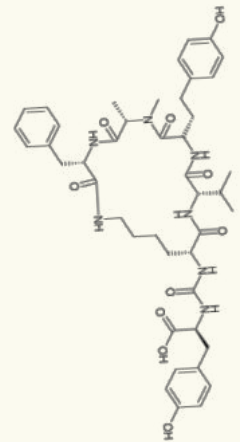
STX – feszültségfüggő Na^+ -csatorna blokkoló + kölcsönhatásba lép a csatorna alegységeivel és szinergikus módon meghosszabbítja az érzéstelenítés időtartamát, ha más helyi érzéstelenítőkkel (pl. lidokain) kombinálják azt



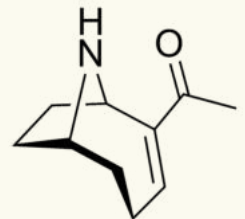
BMAA – nem proteinogén aminosav, átjut a vér-agy gáton, kapcsolatba hozható olyan emberi neurodegeneratív kórképekkel, mint az amyotroph lateral sclerosis (ALS), Alzheimer kór (AD), vagy a Parkinson kór (PD).



Cianopeptidek – nem riboszomális peptidek, melyeket a peptid-szintetázok készítenek. A **mikrogininek** lineáris peptidek, amelyek oktánsav, vagy dekánsav α -hidroxi- β -amino-származékai. Ezek a peptidek a cink metalloproteázok és aminoproteinázok inhibitorai. A cirkuláris hexapeptid **anabaenopeptinek** a proteáz enzimek (pl. tripszin, kimotripszin, karboxipeptidáz) inhibitorai → befolyásolják a protein-foszfatázt, az agyi foszfodiészterázt és a plazmamembrán típusú Ca^{2+} -ATPázt is (pl. a 2022-es *Microcystis* algavirágzásban leginkább ezek a cianopeptidek voltak a jellemzőek)



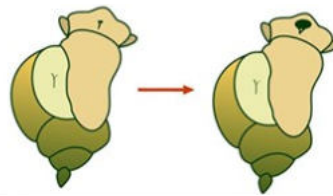
Anatoxin- α (VFDF) – kompetitív agonistája a nikotinos acetilkolin-receptornak → mimikálja az ACh kötődését + blokkolja az idegsejtekben a Ca^{2+} -csatornákat.



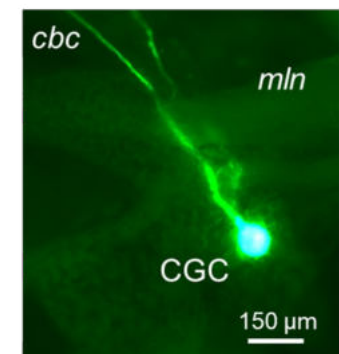
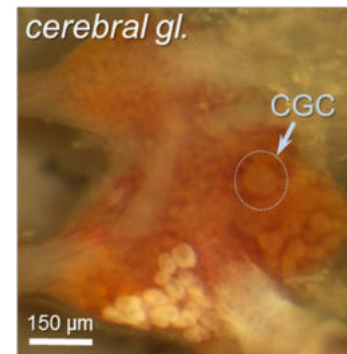
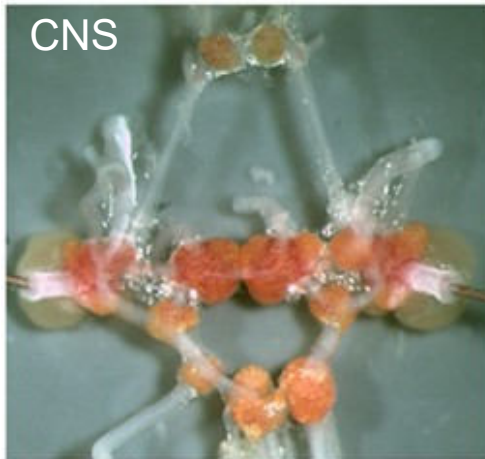
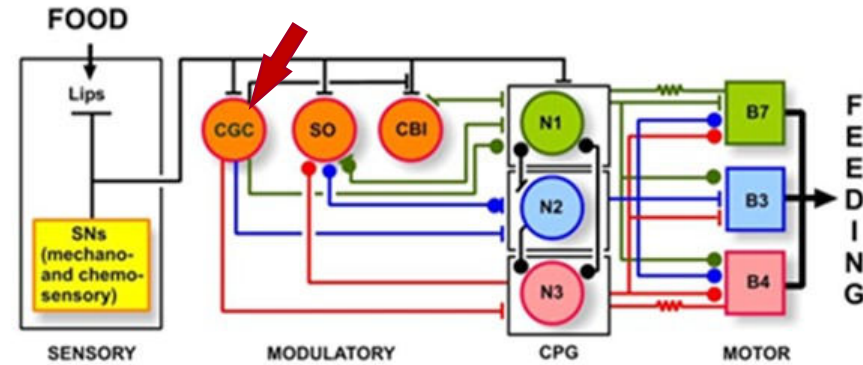
Lymnaea, mint gerinctelen modellállat a neurotoxinok vizsgálatában



pl. Táplálkozás



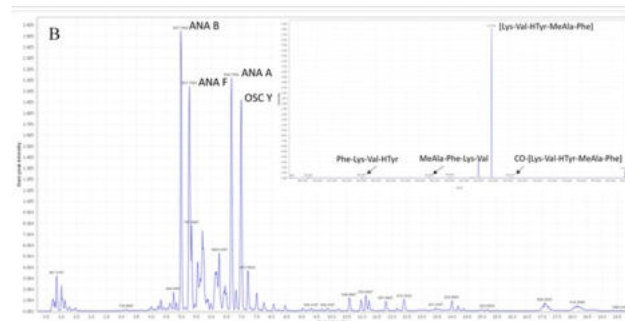
Táplálkozási neurális hálózat



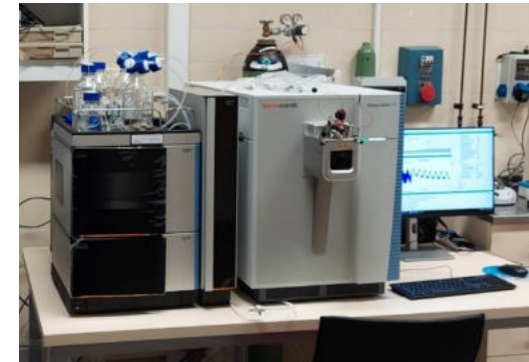
- 1970-es évektől - neurobiológiai, neuroendokrinológiai és ökotoxikológiai modellállat
- egyszerűbb idegrendszer – felszínen elhelyezkedő, narancsosan pigmentált, kisszámú (~25 ezer), általában nagyméretű (30-60 μ m, akár 150 μ m) idegsejtek
- gerincesekhez hasonló viselkedési mintázatok (pl. táplálkozás), ezek háttérben álló ismert neurális hálózatok, azonosított kulcsneuronok, evolúciósan konzervált szignáltranszdukciós útvonalak

Kísérleti paradigma

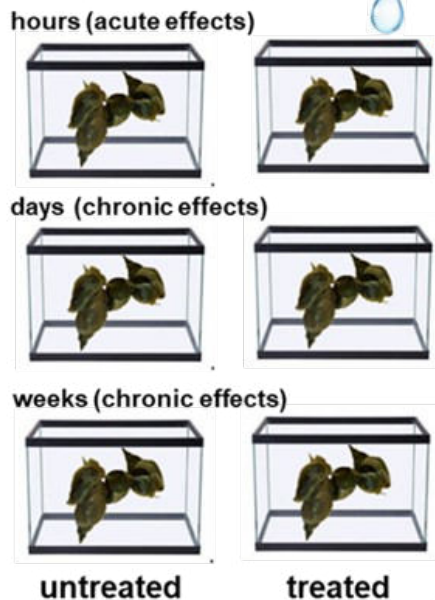
Teszteljük a cianotoxinok (mind a **nyers kivonatok**, mind az azokból **tisztított toxinok**) különböző koncentrációinak **akut** és **krónikus hatását** fiatal (3-4 hónap) és felnőtt (6-7 hónap) állatokon (12 állat/csoport). A vizsgálandó koncentrációkat irodalmi adatok alapján édesvizekre jellemző toxinkoncentrációk alapján állítjuk be – analitikai és metabolomikai vizsgálatok a **BLKI laborjában is** történnek **Vasas Gábor** (DE, Növényteni Tanszék) irányításával és **Riba Milán** (DE, Növényteni Tanszék) segítségével.



izolált anabaenopeptinek



BLKI, biokémiai labor



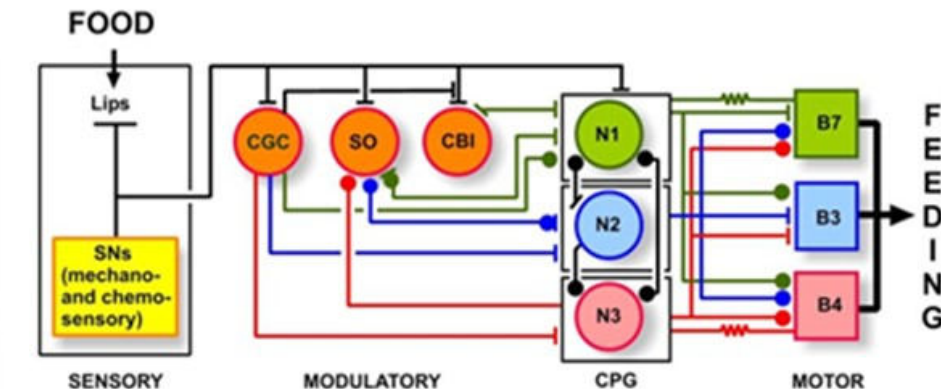
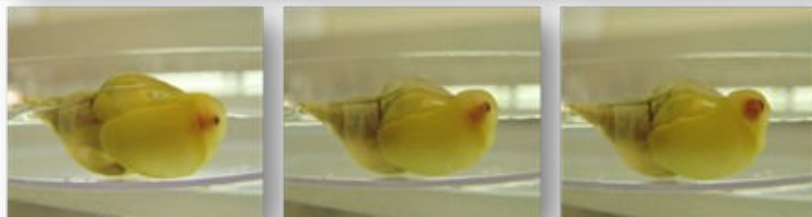
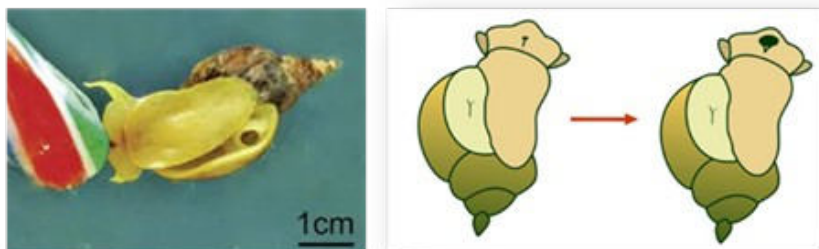
1) Egyed szint (táplálkozás, tanulás és memória)

2) Sejtszint (pl. CGC, B3, PeD1, VD1)

3) Molekuláris szint

1) Cianotoxin hatására megváltozó egyed szintű viselkedési mintázatok

Táplálkozási magatartás – a reszelő nyelv (radula) öltögetésében megvalósuló, az idegrendszer táplálkozási hálózatának azonosított sejtjei által szabályozott viselkedési mintázat



A kísérletek során számoljuk az adott időegység (pl. 2 perc) alatt megvalósuló harapások számát, mind a kontroll (kezeletlen), mind a (toxin) kezelt csoportok egyedeiben.

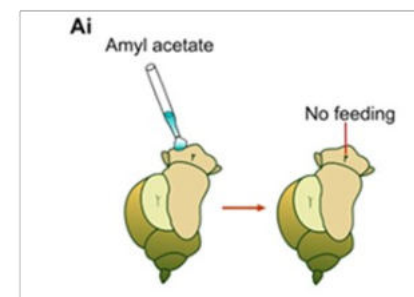
1) Cianotoxin hatására megváltozó egyed szintű viselkedési mintázatok

Tanulás és memória – a táplálkozási viselkedésre épülő, egyszeri társításos, jutalmazásos kondicionálás után lejátszódó ismert molekuláris folyamatok összessége, mely az idegrendszer plaszticitása alapján új sejt-sejt kapcsolatok kialakulását is generálja. Eredményeként kialakul az emléknymom (memória), amely bizonyos kémiai stimulusokkal (pl. amil-acetát) előhívható.



Pre-training test

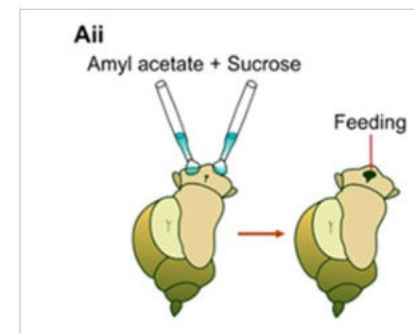
10 min



Training

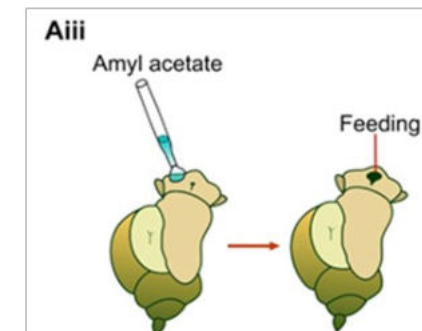
24 h

LTM

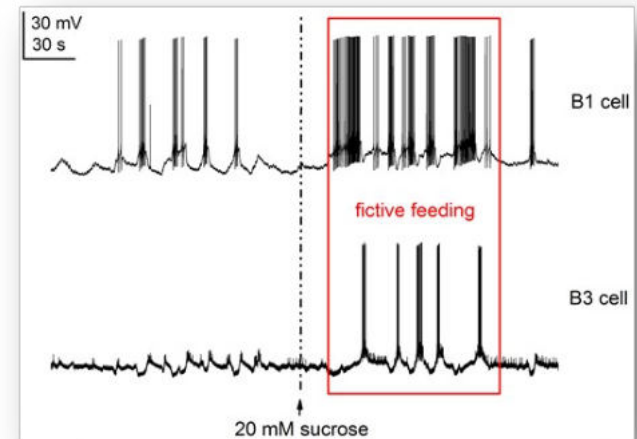
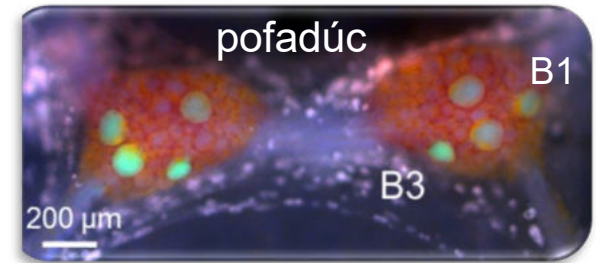
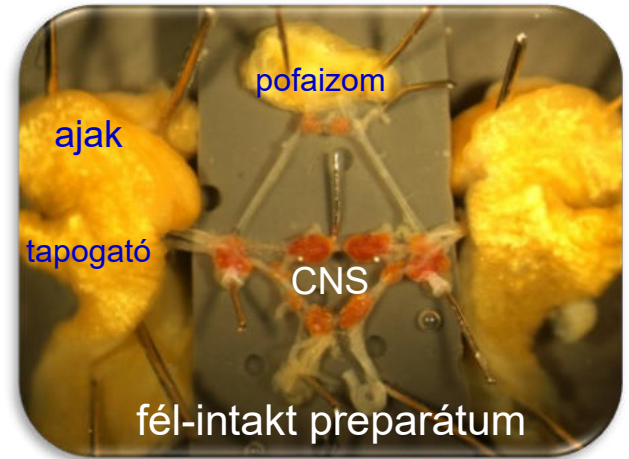
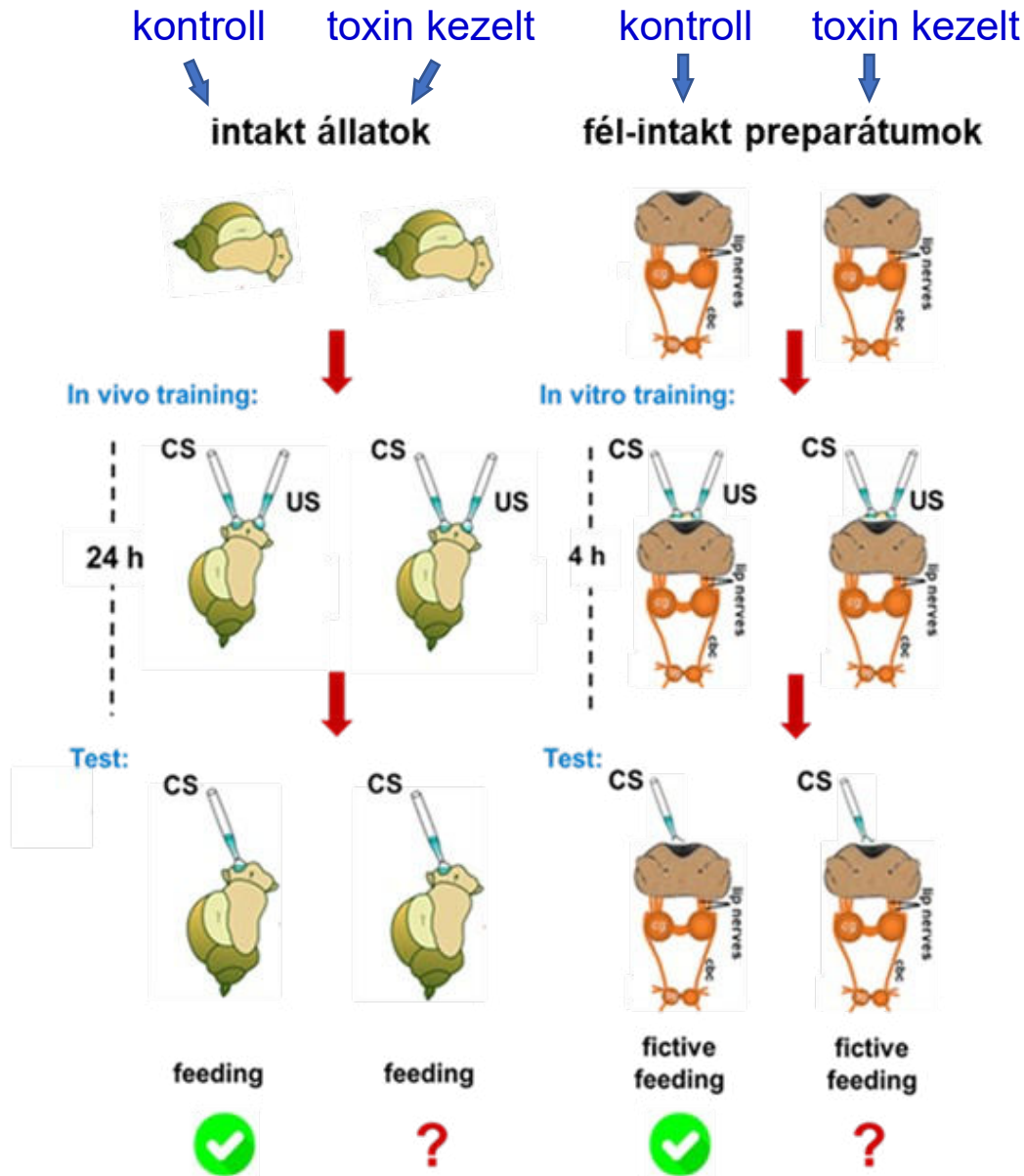


Post-training test

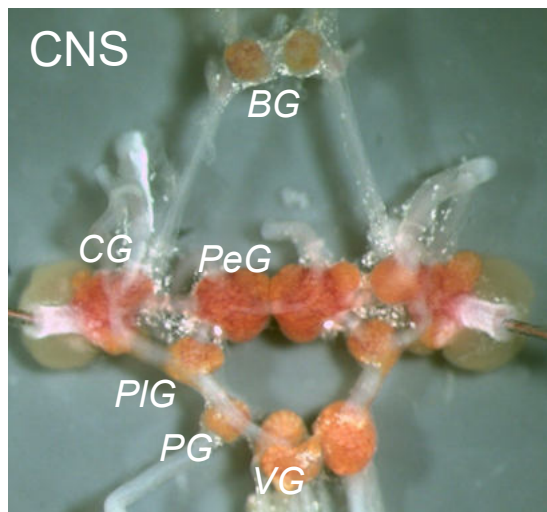
CS: AA
US: cukor



Viselkedési és hálózat szintű indukált változások vizsgálata

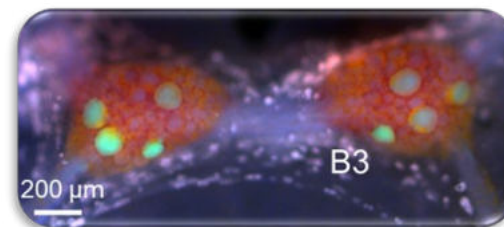
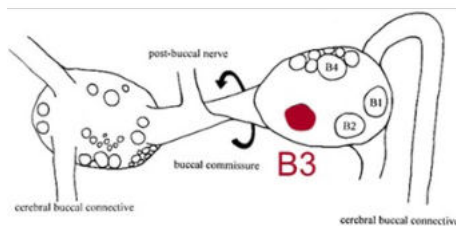


2) Cianotoxin hatására bekövetkező sejt szintű változások

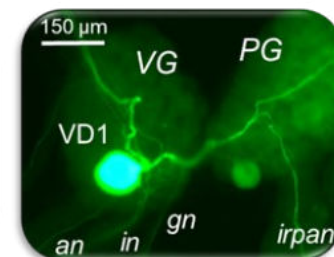
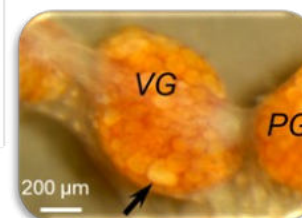
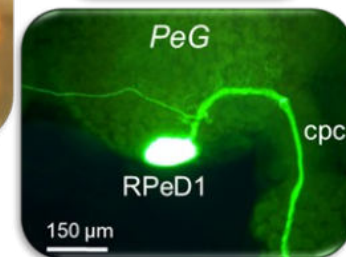
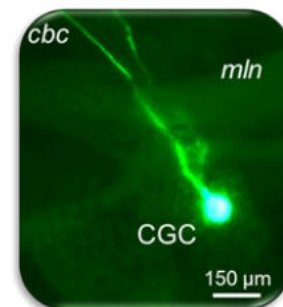
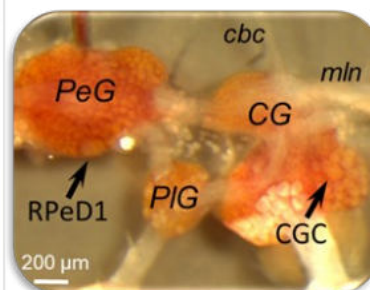
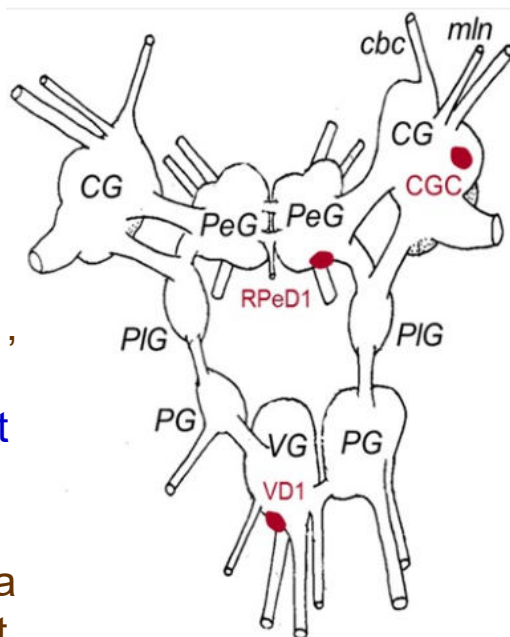


A *Lymnaea* 11 idegdúcából (ganglionból) álló központi idegrendszere.

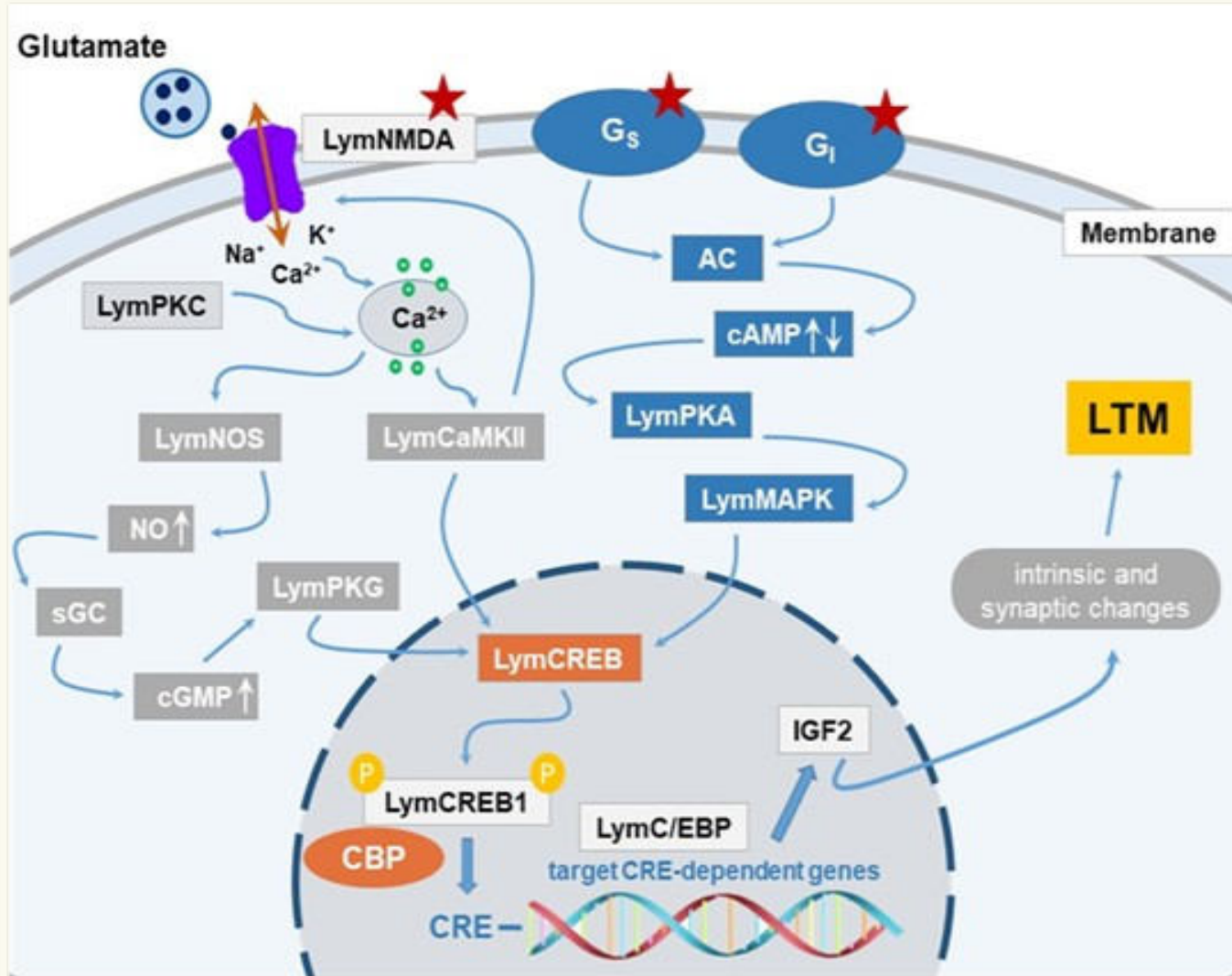
Ezekben az azonosított idegsejtben (B3, CGC, RPeD1, VD1) elemi idegjelenségeket, feszültség-vezérelt ion áramokat illetve sejt-sejt kapcsolatokat vizsgálhatunk elektrofiziológiai módszerekkel, összehasonlítva a kezeletlen és a cianotoxin kezelt egyedek idegsejtjének működéseit.



A *Lymnaea* pofadúca (BG) a B3 motoros idegsejtekkel.

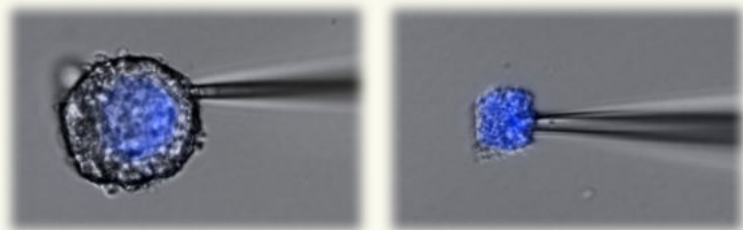


3) Cianotoxin hatására bekövetkező molekuláris változások

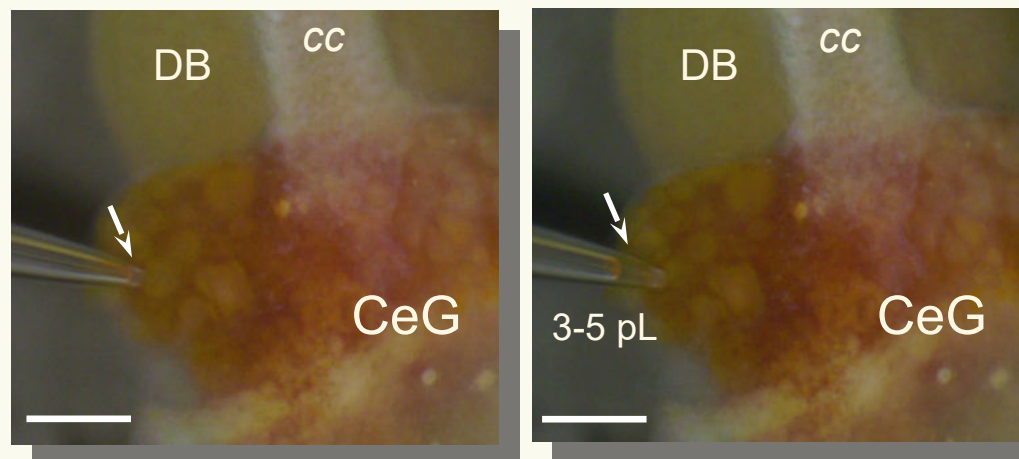


A CGC-ben a tanulás és memóriefolyamatok evolúciósan konzervált molekuláris kaszkádja. A piros csillagok jelölik azokat a feltételezett támadáspontokat, ahol a cianotoxinok (pl. BMAA) kifejthetik hatásukat a tanulás és memória molekuláris kaszkádjában.

A cianotoxin kezelés hatására kialakuló molekuláris szintű változások vizsgálati lehetősége azonosított idegsejtekben: egy-sejt mintavételezéssel kapcsolt MS

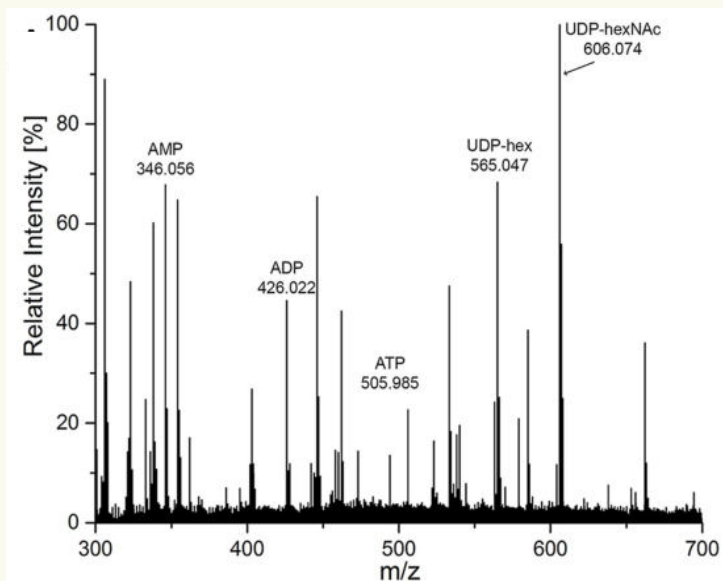


Zhang et al., (2018) *Sci Rep*



CGC-ből történő mintavételezés

Metabolit-peptid profil összehasonlítása kontroll és kezelt állatok azonosított sejtjeiből



Az egy-sejt mintavételezéssel kapcsolat tömegspektrometria (MS) eljárást The George Washington Egyetemről, a módszert kifejlesztő Vértes Ákos professzortól vette át a tihanyi laborunk (MTA Vendégprofesszori támogatás, 3 hónap, Tihany)

Mire jó mindez? – végszó helyett

A gerinctelen modellrendszerünk segítségével, az említett idegéletteni, mikroelektrofiziológiai, tömegspektrometriai módszerek használatával relatív könnyen vizsgálni tudjuk a **toxinok lehetséges komplex idegrendszeri hatásait** egyed, sejt és molekuláris szinteken.

Eredményeink ismeretében **ajánlásokat, prognózisokat** tudunk megfogalmazni a döntéshozók felé, amelyek egy lokális algavirágzás esetében segítik őket a szükséges intézkedések meghozásában.

A NAP3.0 projektben együttműködő intézetek és kutatók:



Debrecen
University of Debrecen
Prof. Vasas Gábor, **Dr. Riba Milán**



Tihany
Balaton Limnological Research Institute
Dr. Fodor István, Dr. Svigruha Réka,
László Zita, Prof. Elekes Károly, Prof. Kiss
Tibor, Dr. Molnár László



Brighton, UK
University of Sussex
Prof. George Kemenes
Prof. Ildikó Kemenes



Pécs
University of Pécs
Schmidt János