

Cianobaktérium törzsek citotoxicitásának vizsgálata
CHO-K1 sejteken

Készítette:

Antal Otilia Tamara, Babeş-Bolyai Tudományegyetem,
Biológia-Geológia Kar, Biológia szak, 4. év

Témavezetők:

Gácsi Mariann, MTA – Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany

Dr. Kósa Ferenc, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Biológia-Geológia kar, Kísérleti
Biológia Tanszék

Dr. Győri János, MTA – Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany

Kolozsvár, 2008

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, célkitűzések.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése.....	3
2.2. A vízvirágzások.....	3
2.3. A cianotoxinok.....	4
2.3.1. Hepatotoxinok.....	5
2.3.1.1. Cilindrospermopszin.....	5
2.3.1.2. Mikrocisztinek és nodularinok.....	7
2.3.2. Neurotoxinok.....	9
2.3.2.1. Anatoxin-a.....	9
2.3.2.2. Homoanatoxin-a.....	10
2.3.2.3. Anatoxin-a(s).....	10
2.3.2.4. Saxitoxinok.....	10
2.3.3. Dermatotoxinok.....	11
2.3.4. Irritáló hatású toxinok – lipopoliszacharidok.....	11
2.4. A cianobakteriális produkció környezeti kockázatának elsődleges becslése.....	12
2.5. A CHO – K1 sejtek jellemzése.....	13
3. Anyag és módszer.....	13
3.1. LDH (laktát dehidrogenáz) aktivitás mérése.....	14
3.2. MTT(3-((4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) mérés.....	16
3.3. Az aktinvázon végbemenő változások vizsgálata.....	18
4. Eredmények és kiértékelésük.....	19
4.1. A toxinok és cianobaktérium-kivonatok hatása az LDH enzimaktivitásra.....	19
4.2. A CHO-K1 sejtek MTT aktivitásának változása	22
4.3. A CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerének változása.....	25
5. Következtetések.....	30
5.1. A cilindrospermopszin és mikrocisztin-LR CHO-K1 sejtekre kifejtett hatása	30
5.2. A cianobaktérium törzsek toxicitásának felmérése CHO-K1 sejteken.....	31
6. Köszönetnyilvánítás.....	31
7. Rövidítések jegyzéke.....	32
8. Ábrák forrásai.....	34
9. Irodalomjegyzék	35

1. Bevezetés, célkitűzések

A cianobaktériumok által kiváltott vízvirágzások köztudottan toxikusak lehetnek. Cianotoxinokat termelnek, melyek ha ivó vagy fürdővízben jelennek meg, többféle betegséget is előidézhetnek, például gastroenteritist, hepatomegáliát, veseelégtelenséget, gyomor- és bélgyulladást, májrákot, lép megbetegedéseket, bőr irritációt vagy allergiás reakciókat.

Ezért fontos felmérni a cianotoxinok hatását illetve, hogy mely cianobaktériumok toxikusak és melyek nem.

Egy anyag toxicitásának felmérésére többféle módszer ismeretes. A toxicitást fel lehet mérni egereken végzett tesztelésekkel, egyrészt táplálékba vagy ivóvízbe keverve, másrészt az illető anyag intraperitoneális adagolásával és az ezt követő hisztológiai vizsgálatokkal. Mivel a gerinces fajokon végzett kísérletek sok esetben engedélykötelesek illetve szabványhoz kötöttek, célszerű ezeket a tesztek gerinctelen modellszervezetekkel kiváltani, például sóférgen (*Artemia salina*) vagy mocsári csigán (*Lymnaea stagnalis*), vízibolhán (*Daphnia*) elvégezni. A sejt kultúrákon való citotoxikológiai mérések elősegítik annak tisztázását, hogy a toxinok milyen úton fejtik ki hatásukat. A cianotoxinok hathatnak a sejt vázra, megváltoztathatják a membrán permeabilitását, a különböző enzimek aktivitását, gátolhatják a fehérjesszintézist és genotoxikus hatásuk is lehet. Azt, hogy egy toxin szerv és szövetspecifikus-e, szintén sejt kultúrák segítségével lehet megállapítani.

Munkám során, melyet az MTA-Balaton Limnológiai Kutatóintézetben végeztem, édesvízi cianobaktériumok által termelt toxinok hatását teszteltem CHO – K1 (*Chinese Hamster Ovary*, kínai hörcsög petefészek sejt) sejteken, ahol vizsgáltam az tejsavdehidrogenáz (LDH) aktivitásában, a mitokondriális dehidrogenázok aktivitásában valamint az aktin váz szerkezetében bekövetkezett változásokat. A két cianobakteriális eredetű toxinon, a mikrocisztin-LR-en és a cilindrospermopszinon kívül a hét cianobaktérium-törzs kivonatának toxicitását mértem fel. Ezek közül kettő, bizonyítottan toxint termelő törzs volt: az egyik *Cylindrospermopsis raciborskii* cilindrospermopszint termelő tenyészet volt, a másik pedig az *Oscillatoria sp.* egy neurotoxint az anatoxin-a-t termelte. A többi törzs közül négy Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* volt és még egy *Aphanizomenon* vegyes tenyészet hatását vizsgáltuk. A célkitűzéseink a következők voltak:

1. Az ismertén toxikus hatású tisztított cilindrospermopszin és mikrocisztin - LR hatásának felmérése CHO-K1 sejteken.

2. A cianobaktérium törzsek toxicitásának felmérése CHO-K1 sejteken, viszonyítva a cilindrospermopszinhez és a mikrocisztin-LR-hez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése

A cianobaktériumok majdnem minden eddig vizsgált ökoszisztémában megtalálható Gram-negatív prokarióták. Sok esetben ők kolonizálják először a szabad sziklákat és földdarabokat. Előfordulhatnak meleg vízi forrásokban, Arktikus és Antarktikus tavakban, jégben és hóban.(9)

Morfológiájukat, metabolizmusukat és fiziológiájukat tekintve nagyon változatosak. (36) Diverzitásuk ellenére minden fajukra jellemző a fotoszintézisre való képesség. (8)

A citoplazma szélén tilakoid-membránrendszerekben elhelyezkedő színanyagaik segítségével fotoszintetizálnak. Színük a kékeszöldtől az ibolyás vörösig változik. Klorofill-a mellett járulékos pigmentekkel is rendelkeznek (allofikocianin, fikocianin, fikoeritrin). A növényekre is jellemző PS I és PS II rendszerük van (15) PSII rendszerük nem tartalmaz klorofill-b-t, helyette a fényenergiát elsősorban fikobiliszómákkal gyűjtik be. (36)

A cianobaktériumok aszexuálisan szaporodnak, erre az evolúciójuk folyamán háromféle szaporító képlet alakult ki: akinéta, baeocita és hormogónium. (36)

A cianobaktériumok egy része toxinokat termel, ezeket cianotoxinoknak nevezik. Ezek mennyisége vízvirágzás esetén, eutrofizálódó tavakban jelentősen megnőhet. (8) Nemcsak az állatokra, de az emberre is potenciális veszélyforrást jelenthetnek. A toxintermelésre való képesség nemcsak egy nemen belül, de ugyanazon faj különböző törzsein belül is változhat. (10) A cianotoxinokról régóta ismert, hogy ivóvízbe kerülve megbetegedést és elhullást válthatnak ki állatoknál és embereknél. (8)

2.2. A vízvirágzások

A vízvirágzások a víz elszíneződését, a foltokban megjelenő tajtékszást és erős szagot okoznak, ami a tavak és folyók eutrofizációjának jele. (19) A cianobaktériumokat tartalmazó vízvirágzások világszerte megjelenhetnek az eutróf vizekben. A vízvirágzás megjelenésének időpontja és időtartama nagy mértékben függ a régió klimatikus viszonyaitól. A mérsékelt égövön a cianobaktériumok által képzett vízvirágzások nyáron és késő ősszel a leggyakoribbak és kettő – négy hónapig tarthatnak.

A vízvirágzásokat általában a tápanyagok magas koncentrációjának, a pH-nak, a víz vezetőképességének, só és szén tartalmának bonyolult kölcsönhatása idézi elő. A cianobaktériumokat tartalmazó vízvirágzások mellett, hogy kellemetlen szaggal és ízzel

rendelkeznek, gazdasági értékükből is veszítenek: kevésbé lesznek alkalmasak halászásra és turisztikai értékük is csökken. (24)

Nemcsak a vízvirágzások hatnak károsan az ökoszisztémára, hanem a sejtek lízise során a vízbe kerülő cianotoxinok is ártalmasak lehetnek. (19) (13) A sejtek lízise elsősorban a vízvirágzások hanyatlásakor megy végbe. (10)

A cianotoxinok az állatokon és embereken kívül, a növényekre is károsan hatnak, mivel az enzimaktivitás inhibícióján keresztül gátolják azok növekedését. (4) Valahányszor cianobakteriális vízvirágzások jelennek meg, a vízben jelen levő növények száma jelentősen csökken, és a vizi növényközösség diverzitása is redukálódik. A cianobakteriális kivonatok allelopatikus hatással vannak a vizi növényekre (32).

A cianotoxinokon kívül a cianobaktériumok számos anyagcsereterméke káros lehet. A cianobaktériumok sokféle toxikus peptidet állíthatnak elő, mint például a cianpeptidolidek, mikroviridinek, aerugininok, microgininek, β -metilamino-alanin (19).

Annak megjósolása, hogy hol és mikor fognak vízvirágzások kialakulni nagyon nehéz vagy szinte lehetetlen (24). A vízvirágzások digitális képfelmérési technikával, fluorimetriával, luminometriával és immunodetektálással mérhetők fel. Ezenkívül még számítógépen is modellezik a vízvirágzások kialakulását és növekedését (8).

A cianobaktérium virágzások ellen hatásosabb a megelőzés mint a védekezés. A legjobb módja a vízvirágzás megelőzésének az esszenciális tápanyagok (foszfor és nitrogén) bekerülésének a megakadályozása (8). A toxikus vízvirágzások ellen más kezelési technikákat is alkalmaznak: a víz levegőztetése és forgatása, algicidekkel és foszforral való összerázása, olyan mikrobiális vegyületek hozzáadása amik ártalmasak a cianobaktériumokra és a tápláléklánc biomanipulálása. Az algicidek alkalmazásának a hátránya, hogy hatásukra az elpusztult cianobaktérium sejtekből kiszabadulhatnak a toxinok, és így még toxikusabb lesz a víz (8). Ugyanilyen hatással jár az is, ha az eutróf vizet klórral kezelik: a cianobaktériumok elpusztulása által az összes toxin kiszabadul a sejtekből (11).

2.3. Cianotoxinok

Az édesvízi cianobaktériumok által termelt toxinok a vízvirágzás során a víz felszínén lévő habban koncentrálnak leginkább, míg a tengeriek elsősorban a kagylókban halmozódnak fel (19).

A cianotoxinok az állatokra és az emberekre a következő utakon keresztül hathatnak: a bőrön keresztül (transzdermális út), belélegzés, haemodialízis, vagy lenyelés során (10). Azoknál a személyeknél, akik a cianobaktériumokat tartalmazó vízzel transzdermális úton

érintkeztek, a bőr felhólyagosodása, kiütések megjelenése, allergiás reakciók, valamint egyes esetekben hányás, száraz köhögés vagy az asztma tünetei mutatkoztak (10).

A cianotoxinok nem csak a nem megfelelő mértékben tisztított ivóvíz fogyasztása esetén juthatnak be a szervezetbe, hanem az ember által fogyasztott táplálékkal is: kagylókkal, halakkal és növényekkel is, mivel ezekben gyakran akkumulálódnak (10).

Hatásuk alapján a következő csoportokba sorolhatók: hepatotoxinok, neurotoxinok, dermatotoxinok és irritáló toxinok (lipopoliszacharidok).

2.3.1. Hepatotoxinok

A hepatotoxinok toxicitásukat elsődlegesen a májra fejtik ki. Sok esetben a máj elzsírosodását okozhatják. Hatásukra a májsejtek nekrotikus vagy apoptotikus úton elpusztulnak.

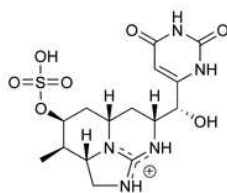
A hepatotoxinokon belül elkülönítünk alkaloid és peptid típusú hepatotoxinokat. A cilindropermopszin az alkaloid típusú hepatotoxinok közé tartozik, míg a mikrocisztinek és nodularinok peptid típusú hepatotoxinok.

2.3.1.1. Cilindropermopszin

A cilindropermopszint (CYN) elsősorban egy édesvízi fonalas cianobaktériumfaj, a *Cylindropermopsis raciborskii* termeli. A CYN-t a *Cylindropermopsis raciborskii*-n kívül más fajok is szintetizálhatják: az *Aphanizomenon ovalisporum*, az *Umezakia natans*, a *Raphidiopsis curvata*, és az *Anabaena bergii* (37).

A cilindropermopszin felelős az ausztráliai Észak Queensland-i Palm Island-i lakosoknál 1979-ben megfigyelt megbetegedések megnövekedéséért (14). 149 személy betegedett meg és többségük kórházba is került. A főbb tünetek gasztroenteritiszre, hepatomegáliára és veseelégtelenségre utaltak (13).

A biológiai aktivitását figyelembe véve a CYN egy szokatlan vegyület, mivel tartalmaz egy guanidin és egy szulfát csoportot, ezáltal pozitív és negatív töltése is van (1. ábra) (30). Az ép pirimidin gyűrű feltétlenül szükséges a CYN toxicitásához (39). A cilindropermopszinnak hepatotoxikus és nefrotoxikus hatását is kimutatták gerinceseken (37). A timuszra is toxikus hatással lehet (13).



1. ábra: A *cilindrospermopsin* kémiai szerkezete

A CYN a máj elzsírosodását okozza. Az elzsírosodott máj tünete lehet a protein szintézis leállításának, ugyanis ilyenkor felgyűlnek a trigliceridek, melyekből egyébként lipoproteinek szintetizálódnának (8), (33) Ez megfelel annak a ténynek, hogy a cilindrospermopszin emlős sejtekben erős fehérje szintézis inhibitor. (14)

A CYN centrolobuláris nekrozist is okoz a májban, ami az akut toxicitás jele (8).

A cilindrospermopszinnak a fehérjeszintézis gátlása mellett citotoxikus hatása is van és ez független a protein szintézis gátlásától. Magasabb koncentrációknál a protein szintézis gátlása gyakran megelőzi a citotoxicitás megjelenését. A fehérje szintézis leállása irreverzibilis, vagyis a toxin eltávolítása után nem lehet visszafordítani (14).

A CYN olyan koncentrációk felett, amikor a protein szintézis mértéke teljesen leállt, koncentrációfüggő LDH felszabadulást idéz elő (14). Ez a toxin hatására bekövetkező membránpermeabilitás változásnak köszönhető (18).

A CYP450-en keresztül aktivált CYN metabolitok megváltoztatják a glutation homeosztázist. Mivel a glutationnak fontos szerepe van a szabad gyökök hatástalanításában, a glutation egyensúly felborulása hozzájárulhat a cilindrospermopszin citotoxikus és genotoxikus hatásához, a redukált oxigén gyökök felhalmozódása révén (14).

Cilindrospermopszin hatására a CHO-K1 sejtek növekedése leáll, a sejtek lekerekednek és a sejtmembránon buborékok jelennek meg, a kortikális aktin hálózat leépül és a mikrotubulusok a sejtmag köré lokalizálódnak (13).

Az uracil csoport jelenléte a CYN-ben arra utalhat, hogy CYN a DNS szintézissel való interferenciát és mutációk kialakulását idézheti elő (12). A CYN-el történő kezelés DNS-töréseket idéz elő a hepatociták esetében, és ez beindíthatja a karcinogenezis folyamatát (34). A DNS szálon kialakuló töréseket a metabolikusan aktivált CYN származékok okozhatják. Nagyobb koncentrációknál (1 μ M felett) a genotoxikus hatás már nem csak a DNS szálon megjelenő törésekben, hanem a kromoszómaszám csökkenésében is megnyilvánul. Mivel a genotoxicitás olyan koncentrációnál is jelentkezik, amelynél még a citotoxikus hatás még nem észlelhető, nem tűnik a citotoxicitás másodlagos következményének (18).

A cilindropermopszin nincs hatással a protein foszfatázokra, míg a mikrocisztinek és nodularinok toxikus hatásukat elsősorban ezek gátlása révén fejtik ki (39).

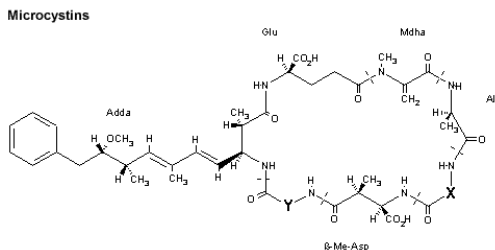
2.3.1.2. Mikrocisztinek és nodularinok

A mikrocisztinek és nodularinok a peptid típusú hepatotoxinok közé tartoznak. A mikrocisztiniket a *Microcystis*, *Anabaena*, *Hapalosiphon*, *Nodularia*, *Nostoc* és *Oscillatoria* fajok termelik (8). A mikrocisztinekhez hasonló nodularint a *Nodularia spumigena*-ból izolálták, amely egy felsős vízben élő cianobaktérium (19).

Ezek a toxinok, -különösen a mikrocisztin- világszerte megtalálhatók a vizekben (25). Számos házi- és vadon élő állat megbetegedését okozzák, sőt a rovarokra is toxikusnak bizonyultak (8).

A mikrocisztinek jelenléte az üdülő és ivóvizekben potenciális veszélyt jelent az emberek egészségére (2). Nemcsak az ivó- vagy fürdővíz tartalmazhat mikrocisztiniket: arra is volt eset, hogy az öntözővízben található mikrocisztinek felgyűltek a fejes salátában (*Lactuca sativa*) (2), (10). Gasztroenteritist, atipikus tüdőgyulladást, sárgaságot, allergiás reakciókat, a lép megbetegedését, májelégtelenséget és májrakot idézhetnek elő lenyelés esetén (2, 8, 11). 1996-ban a braziliai Caruaruban található dialízis központban 76 beteg halt meg azért, mert a dialízishez használt víz mikrocisztinikkel volt szennyezett (2).

A mikrocisztinek ciklikus vegyületek, gyűrűjünkben jelen levő Adda (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoiksav) aminosavat tartják felelősnek a toxicitásért (2. ábra) (22). A nagy számú mikrocisztin izoforma (jelenleg 70 ismert (19)) a variábilis X és Y L kiralitású aminosavaknak köszönhető. A leggyakoribb mikrocisztin izoforma a mikrocisztin-LR, mely esetében a variábilis aminosavakat a leucin (X) és az arginin (Y) képviselik (22).



2.ábra: A mikrocisztinek kémiai szerkezete

A nodularin egy ciklikus pentapeptid, melynek a szerkezete nagyon közel áll a mikrocisztinekéhez. Akárcsak a mikrocisztinekénél, a nodularin szerkezetében is megtalálható az Adda és a D-eritro- β -metil-aszparginsav (39).

Lenyelés után az epesavat szállító ABC transzporterek rögtön felveszik a mikrocisztineket és a májba szállítják őket (25). Ezért az MC-LR felvétele gátolható az epesav transzportrendszer kompetitív inhibitoraival (21), (11). A glutation és a membrán aktív antioxidánsok, mint az E vitamin és a silimarin szintén csökkenthetik a mikrocisztinek toxikus hatását (11).

A vese tubuláris epiteliális sejteitől eltekintve a májtól eltérő szervek nem rendelkeznek az ABC transzport rendszerrel (21). Ezért, a mikrocisztinek toxikus hatása hamarabb nyilvánul meg a májsejteken, mint a többi sejtípuson (25). Más sejtípusok esetén (fibroblasztok, endoteliális sejtek, promielociták, limfociták, epiteliális sejtek) százszor nagyobb koncentráció szükséges az apoptózis bekövetkezéséhez, mint a hepatocitáknál (21).

A mikrocisztinek toxicitását elsősorban az okozza, hogy specifikusan kötődnek a szerin/treonin proteinfoszfataz 1 és 2A-hoz (PP1 és PP2A) (23). Feltételezik, hogy a cianobaktériumok nem rendelkeznek PP1 és PP2A-szerű aktivitással, ezért náluk kialakulhatott a mikrocisztinre való rezisztencia (23).

A PP1 és PP2A gátlása következtében az MC-LR dózisfüggően növeli a citokeratin 8 és 18 foszforilációját a hepatocitákban. Az, hogy a citokeratin 8 és 18 a foszforiláció célfehérjéivé válnak, maga után vonja az intermedier filamentumok átrendeződését is (25).

A mikrocisztinek a sejtvázas alkotói közül nem csak az intermedier filamentumok szerkezetét befolyásolják. A mikrocisztinek toxikus hatásukat a sejtvázasra több lépésben fejtik ki: először a mikrotubulusokban mennek végbe változások, ezeket követik az intermedier filamentumok és végül a mikrofilamentumok. A mikrofilamentumok esetében először a sejtthártya melletti aktin filamentumok aggregálódnak, majd ezután a rozetta-szerű szerkezetekké sűrűsödnek és egy sűrű köteggé omlanak össze. Az aktin filamentumokat érintő változásoknak köszönhetően a normális sejt-sejt adhézió megszűnhet, valószínűleg az aktinfilamentumoknak övdezmoszómákkal való kapcsolatának felbomlása következtében. (16) Ezen kívül a sejtvázas változásai a sejtek lekerekedéséhez és összecsomósodásához, membránban kialakuló buborékok megjelenéséhez, a citoplazma vakuolizálódásához és a citoplazmatikus sejt szervecskék újraszerveződéséhez vezetnek (21).

A mikrocisztinek a sejten belüli jelátvitelre is hatással vannak: a protein foszfatazok gátlása által kiváltott citoskeleton leépülés a G proteinek és a foszfolipáz C közötti kapcsolódást akadályozhatja meg (11).

Az oxidatív stressz, amit a mikrocisztinek szintén kiválthatnak, növeli a toxikus hatásukat. Az MC-LR kötődik a glutationhoz, ezáltal glutation hiány lép fel, vagy glutation diszulfid alakul ki, ami lecsökkenti a szervezet azon képességét, hogy a MC-LR-t

detoxifikálja és így megakadályozza az oxidatív károsodást (39). A reaktív oxigén gyökök, például szuperoxid gyök vagy H_2O_2 kialakulása LDH felszabadulást és a sejtváz deformálódását idézheti elő (5). Az oxigén gyökök mennyiségének növekedése a mitokondriális permeabilitás tranzícióját idézheti elő, ami alapvető lépés az MC-LR által kiváltott apoptotikus kaszkád kialakulásában (5). Az apoptózishoz az is hozzájárulhat, hogy a MC-LR kötődik az F_0F_1 ATP szintetáz β alegységéhez (39).

Genotoxikus hatásaik miatt a mikrocisztinek kromatin kondenzációt, vagy nukleáris fragmentációt is előidézhethetnek (21).

Mindamellet, hogy a mikrocisztinek rövid távon számos betegséget kiválthatnak, hosszú távon karcinogén hatásuk is lehet a protein foszfatázok gátlása, és ezáltal a citokeratinok hiperfoszforilációja miatt (8).

A nodularinok nemcsak elősegíthetik, de elő is idézhetik a májrák kialakulását. Feltételezik, hogy Kínában az elsődlegesen kialakuló májrák gyakorisága és a mikrocisztinek vízben való jelenléte között összefüggés van (8).

2.3.2. Neurotoxinok

A neurotoxinok a toxinoknak egy olyan csoportját képezik, melyek az idegimpulzus továbbítását akadályozzák meg, és erősen specifikusan hatnak az idegrendszerre.

2.3.2.1. Anatoxin-a

A 3. ábrán látható anatoxin-a (AnTx-a) az első cianobakteriális toxin volt, amit szerkezeti felépítés szempontjából jellemeztek (38). Anatoxin-a-t találtak *Anabaena flos-aque*, *Anabaena circinalis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon sp.*, *Cylindrospermum sp.*, *Plankothrix sp.*, *Micricystis aeruginosa* fajokat tartalmazó vízvirágzáskor is (39), (8).

Az AnTx-a erős és sztereoselektív agonistája a gerinces idegvégződés acetilkolin receptorának, ahol nyolcszor erősebb hatást vált ki, mint az acetilkolin (8). Az AnTx-a-nak a nikotinerg posztszinaptikus receptorhoz való kötődése, a receptor posztszinaptikus oldalán konformációváltozást eredményez, ez pedig a neuromuszkuláris depolarizáció gátlásához vezet. A sejtek nem képesek az AnTx-a lebontására, jelenléte abnormális ideg- és izomműködéshez vezet (1).

Anatoxin-a mérgezés esetén az áldozat izomgörcsöt kap, rángatózik, majd leáll a légzése (20). Mérgezés esetén nincs kémiai ellenanyag (8).

Mivel az AnTx-a a központi idegrendszert gátolja, feltételezik, hogy hasznos lehet olyan betegségek kutatása és kezelése esetén mint az Alzheimer kór (8).

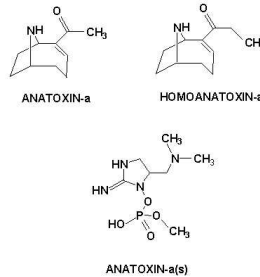
2.3.2.2. Homoanatoxin-a

A homoanatoxin-a-t, mely az AnTx-a etil-keton analógja, eredetileg *Oscillatoria*-ból izolálták (8). Elsősorban lenyelés által kerülhet a szervezetbe, de nagyobb koncentráció esetén a bőrön keresztül is bejuthat (20).

2.3.2.3. Anatoxin-a(s)

Az anatoxin-a(s) az acetilkolinészteráz erős organofoszfát inhibitora (8). Azáltal, hogy kötődik az acetilkolinészterázhoz, megakadályozza az acetilkolin hidrolízisét. Így az ioncsatorna nyitva marad, ami káros hatással van az izmokra (20).

Ritkán fordul elő és nagy a kémiai instabilitása. Az NRC 525-17-es kóddal ellátott *Anabaena flos-aque* törzs termeli (8). Az anatoxin-a-val ellentétben, az anatoxin-a(s) emlősökben megnöveli a hiperventilláció mértékét, valamint neurotoxinokra jellemző tüneteket vált ki, mint például a hasmenés és reszketés (20).



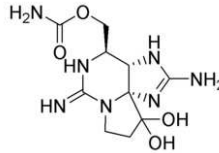
3. ábra: Az anatoxinok kémiai szerkezete (Patoockaa és Stredab, 2002)

2.3.2.4. Szaxitoxinok (STX)

A szaxitoxinok úgy is ismertek mint paralizáló kagylómérgek. Nevük a *Saxidomus giganteus* nevű puhatestűtől ered, amelynél először azonosították (39). A szaxitoxinokat elsősorban a tengeri dinoflagelláták egy része szintetizálja. Néhány cianobaktérium is termeli őket, mint az *Aphanizomenon sp.*, *Anabaena sp.*, *Lyngbya sp.* és a *Cylindrospermopsis raciborskii* (39). A szaxitoxinok az egyedüli olyan cianotoxinok, amelyek nem csak a cianobaktériumoknál fordulnak elő (10).

Mivel a kagylók gyakran akumulálják őket, védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki toxikus hatásuk ellen. Azonban az ezeket fogyasztó tengeri állatokra és az emberre nagyon toxikusak lehetnek (20).

A szaxitoxinok karbamát alkaloid neurotoxinok egyik csoportját képezik (4. ábra) (9).



4. ábra: A szaxitoxinok szerkezete (www.answers.com)

Az emberi idegsejtek különösen érzékenyek a szaxitoxinokra (20). Gátolják az idegingerület átadását, mivel a feszültségfüggő Na^+ -csatornához kötődnek. Megakadályozzák ezeknek a csatornák a kinyílását, így a nátrium beáramlást és ezáltal az akciós potenciál kialakulását gátolják (39). Súlyos esetekben gyengeség, fáradékonyság, az ajkak, száj és nyelv érzéketlensége, légzési zavarok, tudathasadás, majd bénulás léphet fel. A légzés vagy a szívverés leállása esetén halálos lehet. Nincs ellenszere, csak a tünetek kezelése lehet hatásos bizonyos esetekben (20).

2.3.3. Dermatotoxinok

A dermatotoxinok alkaloid típusú vegyületek, ide tartoznak a lyngbyatoxinok és aplysiatoxinok, melyeket tengervízi cianobaktérium fajokból (*Lyngbya*, *Oscillatoria*) izoláltak. Jelentős tumorindukáló képességgel rendelkeznek és a sejtek belső jelátviteli folyamataiban kulcsszerepet játszó enzimet, a protein kináz-C-t indukálják. A bőrrel érintkezve bőrgyulladást, lenyelés esetén pedig gyomor és bélrendszeri gyulladást válthatnak ki (9).

2.3.4. Irritáló hatású toxinok – lipopoliszacharidok

Az endotoxikus lipopoliszacharidok (LPS) a Gram-negatív baktériumok -beleértve a cianobaktériumokat is - külső sejthártyájában vannak jelen.

Az LPS lipid A-ból, törzs poliszacharidokból, és külső poliszacharid láncból áll.

A lipopoliszacharidok lázat váltanak ki az emlősöknél. Amellett, hogy az immunrendszerre hatnak, befolyásolják a különböző szervezetek detoxifikációs rendszerét (39).

2.4. A cianobakteriális produkció környezeti kockázatának elsődleges becslése

Annak felmérésére, hogy egy vízvirágzás tartalmaz-e toxint termelő cianobaktériumokat, valamint hogy ezek a cianotoxinok milyen mértékben toxikusak, ökotoxikológiai tesztek alkalmaznak.

Az egereken alkalmazott teszteleseket, amelyek tipikusan az első toxikológiai módszerek voltak a vízvirágzásból származó minta felmérésében, jelenleg más biológiai, kémiai és immunológiai módszerek váltják fel. Az egereken végzett vizsgálatoknak még mindig vannak előnyei: könnyű őket használni - ha van hozzáférhető laboratóriumi egér - a módszer olcsó és lehetővé teszi a toxin mennyiségi és minőségi kimutatását pár percen vagy órán belül (8). Egy toxin hatását egerekre többféleképpen lehet tesztelni: ivóvízbe, táplálékba keverve vagy intraperitoneális adagolással. A mérgezés jeleiből meg lehet különböztetni a hepatotoxinokat a neurotoxinoktól és még a neurotoxin típusokat is egymástól. Az egereken végzett teszteknek a hátránya, hogy nem képesek kimutatni az alacsony mennyiségben jelen levő toxinokat. A másik hátrányuk pedig az, hogy a különböző toxin homológok megkülönböztetésére nem alkalmasak.

Jelenleg az a cél, hogy lecsökkentsék, és lehetőség szerint kizárják az emlősökön végzett kísérleteket, és valószínű, hogy ezt a módszert csak akkor fogják alkalmazni, amikor más módszerek feltételei nem biztosítottak (8).

Az egereken végzett ökotoxikológiai vizsgálatok mellett a halakon, például a pontyon (*Cyprinus carpio*), a pisztrágon (*Salmo trutta*), a bodorkán (*Rutilus rutilus*) vagy a dévérkeszegen (*Abramis brama*) végzett toxikológiai felmérések is jelentősek, mivel ezek pontos mutatói annak, hogy a cianobaktériumokat tartalmazó vízvirágzások hogyan hatnak a vizek halállományára (7). Azonban, az utóbbi években a halakon végzett ökotoxikológiai vizsgálatokkal kapcsolatban is etikai problémák merültek fel (29). Az egyik módszer, amivel ki lehet váltani a kifejlett halakon való akut toxicitási tesztek, azok embrióin történő vizsgálatok. A zebrahal (*Brachydanio rerio*) embrió megfelelő modellnek bizonyul erre a célra (29).

A sóféreg (*Artemia salina*) széleskörűen használják a toxicitás méréséhez, és mind a mikrocisztinek, mind a cilindrospermopszin bizonyítottan toxikusan hatnak rá. Az sóférgen végzett toxicitás vizsgálatok sokkal érzékenyebbek, mint az egereken végzett vizsgálatok (26).

Más biológiai módszereket is kifejlesztettek a cianotoxinok kimutatására: gerincteleneken, baktérium, hal és emlős sejt kultúrákon való tesztlések, immunológiai módszerek alkalmazása és enzimaktivitásbeli változások tesztelése (például protein foszfatázok gátlásának tesztelése) (8).

A sejt kultúrákon végzett citotoxikológiai vizsgálatok fontosak annak megértéséhez, hogy a különböző vegyszerek hogyan hatnak a sejtekre és a szövetekre. Amikor egy vegyületet citotoxicitás szempontjából elemeznek, a sejt különböző tulajdonságaira való hatását lehet figyelembe venni. Vizsgálhatnak olyan mechanizmusokat, melyek minden sejtre általánosak, vagy olyanokat, melyek bizonyos sejt típusokra specifikusak, így a szerv és szövetspecifikus mechanizmusok is felderíthetők. Az *in vitro* tesztlések előnye hogy lecsökkentik az állatok felhasználásának mértékét a toxikológiai vizsgálatok során. Az elsődleges sejt kultúrák, a klónozott vagy immortalizált sejt vonalak alkalmazása lehetővé teszi a különböző vegyszerek homogén sejt tenyészeteken való vizsgálatát (31).

A sejt számot a sejt fehérjéhez vagy a sejt hártáéhoz kötődő sav-foszfatáz mennyisége alapján kenacid kék, szulfurhidamin B, és sav foszfatáz módszerrel mérik, a sejt metabolikus aktivitását és a sejt életképességet pedig MTT-vel, XTT-vel, reszazurinnal vagy neutrálvörössel. Az LDH aktivitás változásának vizsgálatát a membrán integritásának mérésére használják (31).

2.5. A CHO – K1 sejtek jellemzése

A CHO (*Chinese Hamster Oocyte*, kínai hörsög petefészek sejt) sejtek epitheliális jellegű sejtek. T. T. Puck és munkatársai 1957-ben hozták létre ezt a sejt vonalat egy felnőtt kínai hörsög petefészekéből. A CHO sejt vonalnak számos alkónját hozták létre azóta. Mi ezek közül a CHO-K1 sejteket használtuk.

A CHO sejteket gyakran használják a molekuláris biológiai vizsgálatokban, mivel morfológiájuk egyszerű és konstans genetikai állománnyal rendelkeznek (35). A CHO-K1 sejteket sokszor alkalmazzák a gének expressziójának vizsgálatára a sejtbiológiai kutatásokban, toxikológiai felmérésekben, vírusok és prionfehérjék hatásának vizsgálatában (40).

3. Anyag és módszer

A sejteket 37 °C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett inkubáltuk 5%-nyi FBS-t (fetális marha szérumot) tartalmazó F-12/Hamm médiumban, amihez 4 µl/ml gentamicint tettünk.

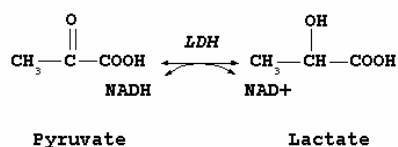
Különböző cianobaktériumfajokból, nevezetesen: *Aphanizomenon* vegyes tenyészetből (APHA), *Oscillatoria sp.* anatoxint termelő törzsből (PCC6506), *Cylindrospermopsis raciborskii* bizonyítottan cilindrospermopszint termelő törzsből (AQS), négy Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumból (ACT9502, ACT9503, ACT9504, ACT9505) kaptam kivonatokot, valamint tisztított cilindrospermopszint és mikrocisztin-LR-t. A kivonatokot Dr. Kovács Attila készítette el, majd bocsátotta rendelkezésemre.

A sejteket a kezelés előtt 24 órával 1×10^5 -en koncentrációban tettük ki a vizsgálatnak megfelelően 96 vagy 4 lyukú platekre. A 96 lyukú plateket az LDH aktivitás és a fehérjemennyiség mérésekhez, a 4 lyukú plateket aktin festéshez használtuk. A kezeléseket során az kivonatok koncentráció és időfüggő hatásait vizsgáltuk, a kontroll sejtekhez viszonyítva. A kivonatokot szérumentes médiumban oldottuk fel, mivel a szérumot tartalmazó médium lecsökkentheti a toxicitást. A kontroll sejteken a kezeléseket kezdetkor a szérumot tartalmazó médiumot szintén szérumentesre cseréltem le.

A kezeléseket után vizsgáltuk a sejtek membránpermeabilitásának változását LDH aktivitás méréssel; MTT teszttel mitokondriális dehidrogenázok aktivitását határoztuk meg, míg immuncitokémiai eljárással phalloidin-FITC-cel festettük az aktinfilamentumokat és Nikon Optiphot 2 epifluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk a végbemenő változásokat.

3.1. Az LDH (laktát dehidrogenáz) aktivitás mérése

A laktát dehidrogenáz (LDH) felszabadulás a sejthalál általános jele. Minden módszer közül az LDH felszabadulás mérése a leggyakrabban használt és legelfogadottabb módszer a sejthalál és sejtlízis mérésére. A módszer a β -NADH β -NAD⁺-á való oxidációját méri, amikor az LDH a piruvátot laktáttá alakítja. β -NADH átalakulása β -NAD⁺-á 340 nm-en mérhető spektrofotométerrel, illetve plate olvasóval (27) (5. ábra).



5. ábra: A NADH oxidációja NAD⁺-á LDH hatására

Az LDH aktivitás növekedése a membrán integritás megromlásának a jele (31).

A kezeléseket és a méréseket 96 lyukú platekben végeztük el. Kezelések előtt a sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk. *Cylindrospermopsis*szinnal való kezelés esetén a következő koncentrációkat vizsgáltuk: 0,2; 0,5; 1; 2 és 5 μ M, míg MC-LR esetén 0,5; 1; 5; 10; 20 és 50 μ M. A tisztított toxinok esetén 3 és 24 órás kezeléseket végeztünk. APHA, AQS, PCC6506,

ACT9502, ACT9503, ACT9504 és ACT9505 törzsek esetében 24 órás kezeléseket végeztünk. A méréseket három párhuzamban végeztük el minden vizsgált koncentráció esetén. A kapott cianobaktérium-kivonatokat szérum nélküli médiumban hígítottuk ki 250 µl-es végtérfogatra. Hogy a feltárt cianobaktérium-szuszpenzióból minél kevesebb sejttörmelék kerüljön a sejtekre, először lecentrifugáltuk a mintáinkat, majd sterilszűrőn átszűrtük és csak ezután hígítottuk ki a megfelelő mértékben. A kontroll sejtek egy része pozitív kontrollként szolgált: ezekre mérés előtt egy órával 5 µl Triton-X 100-at pipettáztunk, ami erős detergens lévén teljesen szétroncsolja a sejteket és így az összes LDH felszabadul. Így megkapjuk azt a maximális értéket, ami felszabadulhat a sejtekből.

A kezelési idő lejártával mindegyik mintából 40 µl felülúszót pipettáztunk egy másik platebe. A mintához, a plate minden lyukába 250µl NADH-t (0,2 mM NADH 0,1 M Tris-NaCl- pufferben oldva) és 40µl piruvátot (10 mM piruvát 0,1 M Tris-NaCl-ban oldva) pipettáztam, majd Viktor³ nevű microplate olvasó készülékkel (Perkin Elmer) mértük az abszorbanciaváltozást. A készülék minden lyukra megmérte az abszorbanciát és ezt 15-ször megismételte. Két mérés között, amíg a mérőfej újra ugyanahhoz a lyukhoz ért, 44,25 s telt el.

A kapott eredményekből minden egyes lyukra LDH aktivitást számoltunk a következő képlettel:

$$\text{LDH} = (\Delta A / \text{min} \times 10^6 \times \text{TV}) / (6,3 \times 10^3 \times L \times V).$$

Ahol: $\Delta A / \text{min}$ – abszorbanciaváltozás egy perc alatt; TV- a teljes reakcióelegy térfogata ml-ben; $6,3 \times 10^3$ – a NADH moláris abszorpciója 340 nm-en; L- a fény útja mm-ben (ez a mi esetünkben 0,7) ; V- a minta térfogata ml-ben.

Mivel a módszer fotometriai mérésen alapul és a kivonatoknak is van egy háttérabszorbanciája, ezért minden hígításnak a neki megfelelő háttér abszorbanciáját is lemértük és az erre kapott LDH aktivitás értékeket kivontuk a kezelt sejtek esetén kapott LDH aktivitás értékekből.

Az így kapott eredményeket, hogy pontosan tudjuk vonatkoztatni az egy lyukban jelen levő sejtre, a lyukakban jelen levő fehérje mennyiségre korrigáltuk. Így lecsökkent annak a valószínűsége, hogy egy lyukban azért mértünk nagyobb LDH aktivitást, mert abba több sejt került. Bár a cianotoxinok egy része gátolja a fehérjeszintézist, ez nem befolyásolja a fehérje mennyiséggel való korrekciót, mivel ezek csak specifikusan bizonyos fehérjék szintézisét gátolják és így az nem befolyásolja szignifikánsan a sejtekben jelen levő fehérje mennyiségét.

A lyukakban jelenlévő fehérje mennyiséget az M. Bradford által kidolgozott módszer segítségével határoztuk meg (6). A Coomassie Brilliant Blue G-250 nevű festéknek két

különböző színváltozata van, piros és kék. A piros változat kékké alakul, amikor a festék a fehérjéhez kötődik. A fehérje-festék komplexnek magas az extinkciós koefficiense, ami a fehérjemérésnél nagy érzékenységet jelent. A festék kötődése a proteinhez egy nagyon gyors folyamat (nagyjából két perc) és a fehérje-festék komplex relatív hosszú ideig (kb. 1 óra) oldódva marad. Ezért a módszer gyors és nincs kritikus időhatár. A szín stabilitása 5 és 20 perc között a legnagyobb (6).

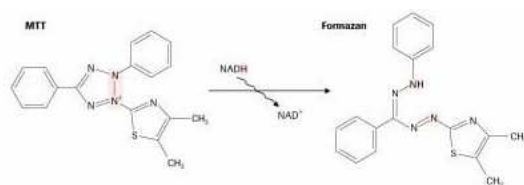
A kezelési idő leteltével a sejtekről lepipettáztuk a felülúszót, melyet az LDH aktivitás méréséhez használtunk fel, majd a sejteket egyszer öblítettük Tris-NaCl pufferrel, és 200 µl feltárápuffert (Tris- NaCl 1% Triton X-100) pipettáztunk rájuk, majd a plate-et egy éjszakán át -20 °C-on tároltam, a sejtek lízise végett. Másnap a minták felengedése után azokat 10000 rpm fordulaton 4 °C-on 8 percig centrifugáltuk. (A használt centrifuga típusa: Biofuge *fresco*, Heraeus). Ezután a felülúszóból 10 µl-t pipettáztunk át 70 µl Tris-NaCl pufferbe, amihez 60 µl Bradford reagenst adtunk a fehérjetartalom meghatározásához. A Bradford reagens hozzáadása után a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd mértük a minták abszorbanciáját a Victor³ plateolvasó készülékkel.

Az így kapott eredményeket Origin7-es programban ábráztuk. Azt, hogy az LDH aktivitás a koncentráció függvényében a kontrollhoz képest szignifikánsan változott-e vagy sem, lineáris regresszióval vizsgáltuk.

A cianobaktériumok toxicitásának összehasonlítása végett probitszám analízist alkalmaztunk a J.J. Hubert által leírt módon (17). Mindegyik esetben kiszámoltuk, hogy a kapott LDH értékek hány százalékát jelentik a pozitív kontrollnak, majd ez alapján probitanlízissel kiszámoltuk az LC50 értéket, vagyis azt az értéket amely esetén a sejtek 50%-a elpusztul és ez alapján össze tudtam hasonlítani a toxinok és a cianobaktériumkivonatok toxicitását.

3.2 MTT(3-((4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) mérés

A módszer segítségével az emlős sejtek túlélését és szaporodását lehet mérni. Az élő sejtek kimutatására alkalmas, és a kialakuló jel a sejtek aktivitásának mértékétől függ, vagyis attól hogy az elektronszállító légzési lánc dehidrogenázai mennyire aktívak (28), (31).

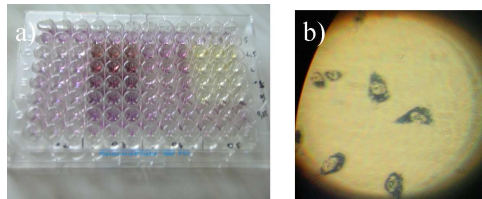


6. ábra: MTT átalakulása formazán termékké mitokondriális dehidrogenázok hatására

Az MTT egy halványsárga szubsztrátum, melyet élő sejtekkel inkubálva sötétkék formazán terméket hoz létre (28) (6. ábra).

Ez a kék só oldódik DMSO-ban és abszorbanciája 570 nm-en mérhető (18). A tetrazolium gyűrű az aktívan működő mitokondriumban hasad el, így a reakció, mely különböző mitokondriális dehidrogenáz enzimek aktivitását méri fel, csak az életképes sejtekben megy végbe. Az MTT-ből keletkező formazán mennyisége egyenesen arányos a sejtszámmal - akár széles skálán is - ha homogén sejtpopulációt használunk (28) (7. ábra).

Ez a módszer tehát arra alkalmas, hogy kimutassuk a citotoxicitást, az osztódást és az aktivációt. Az eredmények plate-olvasóval mérhetők és magas precizitásúak (28).



7. ábra: A sejtek metabolikus aktivitásának mérése MTT-vel (a) a sárga MTT átalakulása sötétkék formazán termékké a sejtek életképességének függvényében (b) a sötétkék formazán termék felgyűlése a CHO-K1 sejtek mitokondriumaiban, 67-szeres nagyítás)

A méréshez szükséges MTT-t, feloldottuk PBS-ben 5 mg/ml koncentrációban. Az így kapott oldatot 0,22 mikronos pórusátmérőjű Millipore szűrővel sterilizáltuk, hogy eltávolítsuk az oldhatatlan maradékot, ami az MTT-ből maradt. Az így kapott oldat 4 ° C-on tárolható.

1, 3 és 24 órás kezeléseket alkalmaztunk mikrocisztin-LR-rel és cilindropermopszinnal, míg a hét cianobaktérium törzssel (AQS, PCC6506, APHA, ACT9502, ACT9503, ACT9504 és ACT9505) 24 órákat. A kísérletek során minden vizsgált koncentrációból három párhuzamost készítettünk. A sejtek egy részét TrX-100-al kezeltük, ezek metabolikus aktivitása nulla lesz.

Kezelés után a 25 µl törzs MTT oldatot pipettáztunk a lyukakba majd a plateket még 3 órán keresztül inkubáltuk 37° C-on. Ezután leszívtuk a felülúszót.

Az MTT-ből keletkező formazán reakciótermék csak részben oldódik médiumban. Ahhoz, hogy a formazán só az optikai sűrűség méréséhez megfelelő módon oldódjon fel, egy alkohol használata szükséges. Erre a legmegfelelőbbnek az izopropanol tűnik (28). Ezért a felülúszó leszívása után előhívót, sav-izopropanolt (100 µl 0.04 N HCl-t tartalmazó izopropanolból) adtunk a lyukakhoz, melyet rázatás követett, hogy a sötétkék kristályok feloldódjanak. Azt, hogy az előhívót mennyi ideig érdemes rajtahagyni kalibrációval mértük,

ennek alapján 15 percig kellett a mintáinkat szobahőmérsékleten inkubálni. Majd a mintát lecentrifugáltuk, és a felülúszót áttettük 1 mérőplatebe.

Ezután 595 nm-en mértük az abszorbanciát Victor³ plateolvasó készülékkel. Mivel a TrX-100-al kezelt sejteknek is van egy abszorbanciájuk, az ezekre kapott abszorbanciaértékek átlagát kivontuk mind a kontroll sejtek abszorbanciájából, mind a kezelt sejtek abszorbanciájából.

Az így kapott értékek segítségével a tisztított toxinokkal vagy cianobaktérium-kivonatokkal kezelt sejtek életképességét százalékban fejeztem ki, úgy hogy a kontroll sejtek abszorbanciáját 100%-nak vettem.

Az eredményeket Origin7-es programban ábrázoltuk. Azt, hogy a sejtek életképessége az alkalmazott toxin vagy cianobaktériumból készített szuszpenzió hatására szignifikánsan változott-e vagy sem a koncentráció függvényében lineáris regresszióval vizsgáltuk.

3.3. Az aktinvázon végbemenő változások vizsgálata

A sejteket 24 órás szérumot tartalmazó médiumban történő inkubálás után szérummentes médiumban kezeltük a tisztított toxinokkal illetve a kivonatokkal.

Tisztított toxinokra a következő koncentrációk hatását vizsgáltuk: cilindropermopszin esetén 1, 2 és 5 μM , míg mikrocisztin-LR esetén: 5, 10, 20 és 50 μM . Mind cilindropermopszinnal, mind mikrocisztin-LR-rel 24 és 48 órás kezeléseket végeztünk. AQS, APHA, ACT9502, ACT9504 törzsekkel 24, 48 és 72 órás kezeléseket végeztünk.

A sejteket a kezelési idő lejártakor egyszer mostuk PBS-sel, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben 5 percig fixáltuk szobahőmérsékleten. Ezután kétszer mostuk PBS-sel, majd 1: 5000-szeres hígításban tettem rá a falloidinhez konjugált FITC-cet, és 3 órán át inkubáltam sötétben, szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után kétszer 5 percig öblítettük PBS-sel, majd egyszer desztillált vízzel. Ezután a kis fedőlemezeket úgy fektettem rá a tárgylemezre, hogy alá DAPI-Antifade oldatot cseppentettünk. A falloidinhez konjugált FITC-cel az aktinvázat tettük láthatóvá, míg a DAPI a sejtek DNS-éhez kötődött.

Mindegyik mintát 40x-es nagyításban vizsgáltuk Nikon Optiphot II. epifluoreszcens mikroszkóppal. Alaposan áttanulmányozva a mintákat, a tipikus sejtstruktúráról minden minta esetében legalább 10-10 fotót készítettünk, mind a DAPI-val, mind a falloidin-FITC-el való festés esetén. Az így kapott képeket egymásra helyeztük, hogy ugyanazon sejtek esetén egy képen legyenek látható az aktinváz (zöld) és a sejtmag (kék).

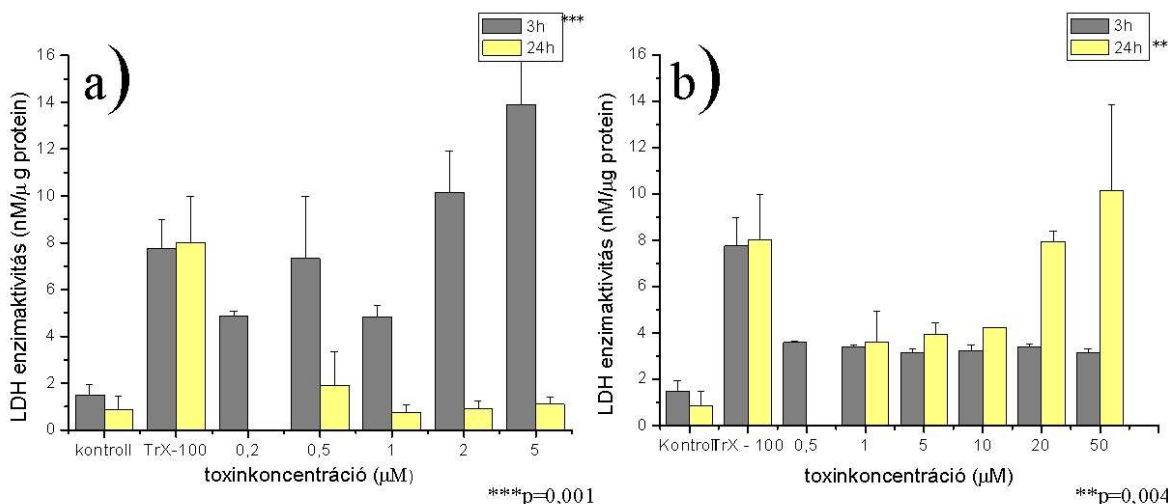
4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. A toxinok és cianobaktérium-kivonatok hatása az LDH enzimaktivitásra

Cilindropermopszin hatására három órás kezelés esetén a toxinkoncentráció növekedésével szignifikánsan nőtt az LDH aktivitás ($p=0,001$). 2 μM CYN hatására az LDH aktivitás megegyezett a TrX-100-al kezelt sejtekével.

Hepatocitáknál 18 órás kezelés esetén az 1 μM és e feletti koncentrációk 75%-os LDH felszabadulást váltottak ki (18).

Huszonnégy órás cilindropermopszinnal való kezelés után a CHO-K1 sejtek LDH aktivitása végig a kontroll körül maradt, ami azzal magyarázható hogy a már korábban, 3 óra után felszabaduló LDH az inkubátorban jelen levő magas hőmérsékleten lebomlott (8.a. ábra).



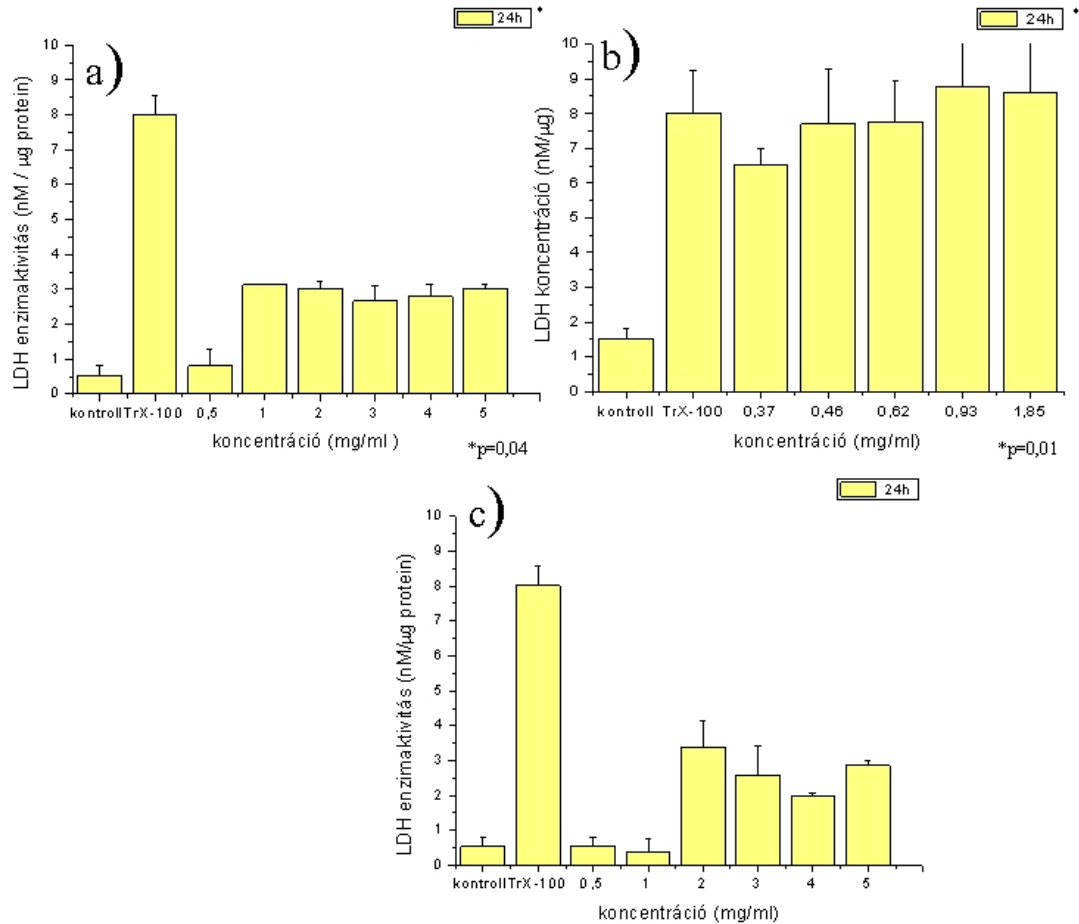
8. ábra: Cilindropermopszin (CYN) és mikrocisztin- LR (MC-LR) hatása LDH aktivitásra: **a)** CYN, **b)** MC-LR

A mikrocisztin-LR hatása a cilindropermopszinhez képest késleltetett. Három óra után a sejtek LDH aktivitása megnőtt a kontrollokhoz képest, de nem változott a koncentráció függvényében (8.b. ábra).

A CHO-K1 sejtekhez hasonlóan hepatocitáknál sem figyeltek meg 10 μM MC-LR hatására három óra után szignifikáns LDH koncentráció növekedést, pedig ekkor a sejtek egy része már elpusztult, ami arra utalhat, hogy a sejtek úgy is az apoptotikus útra léptek, hogy a membrán nem sérült és csak buborékok jelentek meg (3).

Huszonnégy órás kezelés esetén az LDH aktivitás a koncentráció függvényében szignifikánsan nőtt. ($p=0,004$) (8b. ábra) Botha és mtsai. hasonló hatásokat figyeltek meg

CaCo2 és MCF-7 sejteken 50 μ M MC-LR hatására: ők már 30 perc után megfigyelték az LDH aktivitás növekedését az MC-LR következtében felszabaduló reaktív oxigén gyökök hatására. 24, 48 és 72 órás kezelések esetén ők is az LDH aktivitás szignifikáns növekedését figyelték meg, ami a membrán permeabilitás növekedésének a következménye (5).

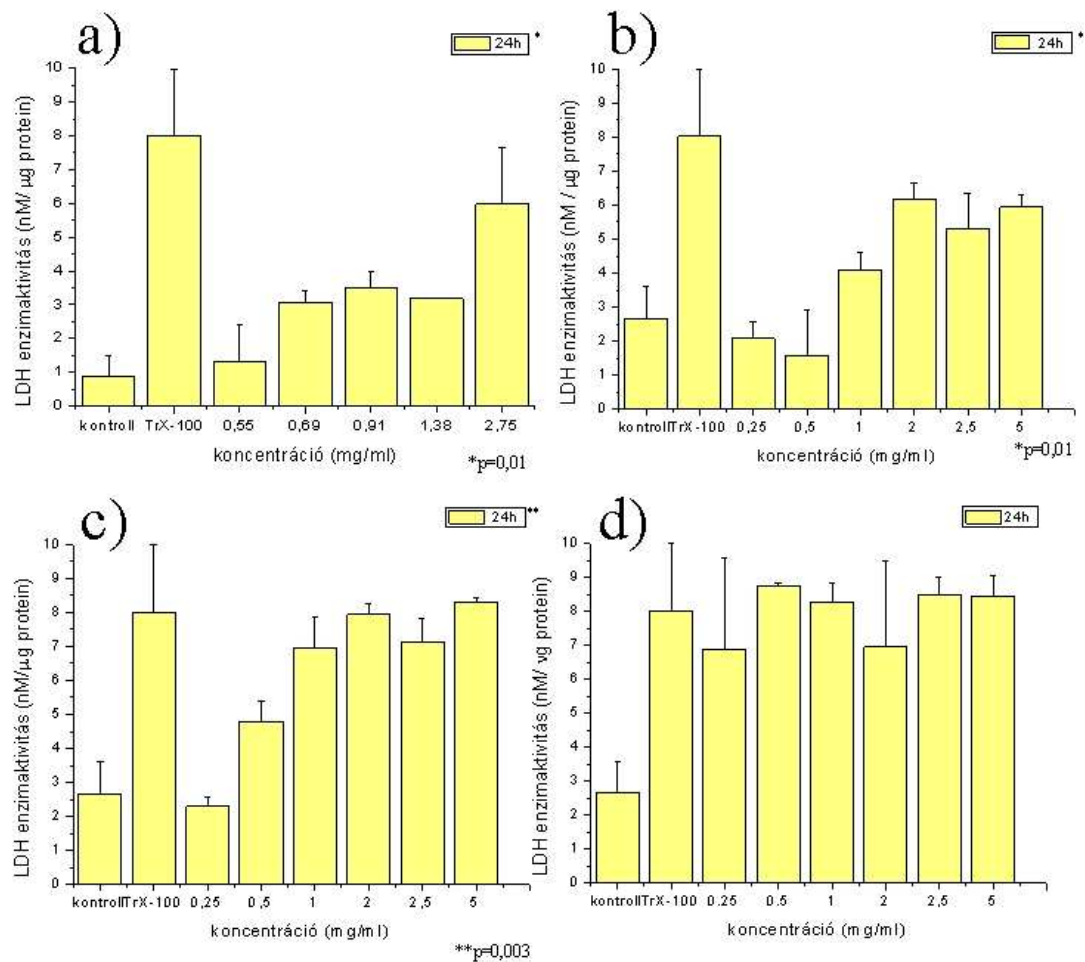


9. ábra: AQS, PCC6506 és *Aphanizomenon sp.* hatása LDH aktivitásra 24 órás kezelés esetén (a) AQS, b) PCC6506, c) APHA)

A bizonyítottan cilindropermopszint termelő AQS törzs 24 óra után szignifikáns LDH aktivitásnövekedést váltott ki a szuszpenzió koncentrációjának a függvényében. ($p < 0,05$), de a legnagyobb alkalmazott koncentráció esetén sem érte el a TrX-100-al kezelt sejtek LDH aktivitását (9a. ábra).

Az anatoxin-a-t termelő PCC6506 törzs szuszpenziójának hatására az LDH aktivitás szignifikánsan nőtt ($p < 0,05$) (9b. ábra). 0,45 mg/ml-es koncentrációtól teljesen szétroncsolta a sejteket, hasonlóan a TrX-100-zal kezelt sejtekhez, az összes LDH felszabadult.

Bár az *Aphanizomenon sp.* törzs már 2 mg/ml-es koncentrációban kiváltott LDH aktivitásnövekedést, a koncentrációfüggést nem tudtuk kimutatni ($p = 0,056$) (9c. ábra).



10. ábra: Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek hatása LDH aktivitásra (a)ACT9502, b)ACT9503, c) ACT9504, d) ACT9505)

ACT9502, ACT9503, ACT9504 törzs hatására a vizsgált koncentrációkban szignifikáns LDH aktivitásnövekedést lehetett megfigyelni ($p < 0,05$), (10. ábra). Az ACT9505 esetén a 0,25 és 5 mg közötti koncentrációtartomány túl nagynek bizonyult. Már a legkisebb - 0,25 mg/ml-es koncentrációban - is elérte a pozitív kontroll értéket a felszabaduló LDH mennyisége (10.d. ábra). Az, hogy az ACT9505 törzs hatására bizonyos koncentrációk (0,5; 1; 2,5 és 5 mg/ml) esetén nagyobb LDH aktivitás értékeket kaptunk, mint a TrX-100 esetén, ami kiindulási sejtszámban levő különbségekkel magyarázható. Annak ellenére, hogy a fehérjeméréssel erre korrigáltunk: ha a kiindulási sejtszám csak kis mértékben is különbözik, ez jelentős különbségekhez vezethet a 48 órás inkubációs idő (kezelés előtti 24 óra és kezelés utáni 24 óra) alatti sejtosztódások révén.

Probitanalízis alkalmazása során az LDH értékekből számított LC50 értékek az 1. táblázatban láthatók.

Toxin/ cianobaktérium-kivonat	LC50 mg/ml
AQS	0,011748976
PCC	0,138038426
ACT 9505	0,169824365
ACT 9504	0,251188643
CYN	0,537031796
APHA	0,588843655
ACT 9502	1,638702061
ACT 9503	1,659586907
MC-LR	2,511886432

1. táblázat: A vizsgált toxinokkal és cianobaktérium-kivonatokkal való kezelések után mért LDH értékek alapján probitanalízissel kapott LC50 értékek

A kivonatok közül a legtoxikusabbnak a cilindrospermopszint termelő AQS törzs és az anatoxin-a-t termelő PCC6506 bizonyult. A négy balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzs közül az ACT9505 és az ACT9504 LC50 értéke volt a legkisebb. Az *Aphanizomenon sp.* vegyes tenyészet LC50 értéke kisebb, mint az ACT9502 és ACT9503. Mindegyik kivonat LC50 értéke kisebb mint az MC-LR-é, és a négy toxikusabb kivonat (AQS, PCC, ACT9505, ACT9504) a CYN LC50 értékénél is kisebb. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a vizsgált cianobaktérium törzsek kivonatai toxikusabbak lennének mint a két vizsgált hepatotoxin, a CYN és az MC-LR. Ez onnan is látszik, hogy az AQS, mely egy bizonyítottan cilindrospermopszint termelő törzs LC50 értéke 50-szer kisebb, mint a CYN-é.

A nyers cianobaktérium-szuszpenziók sokszor sokkal toxikusabbak, mint a tisztított toxinok. Ez arra utal, hogy egy vízvirágzásban együtt előforduló ismert toxinok és a cianobaktériumok által termelt, eddig nem azonosított vegyületek között szinergisztikus hatás léphet fel (19).

4.2. A CHO-K1 sejtek MTT aktivitásának változása

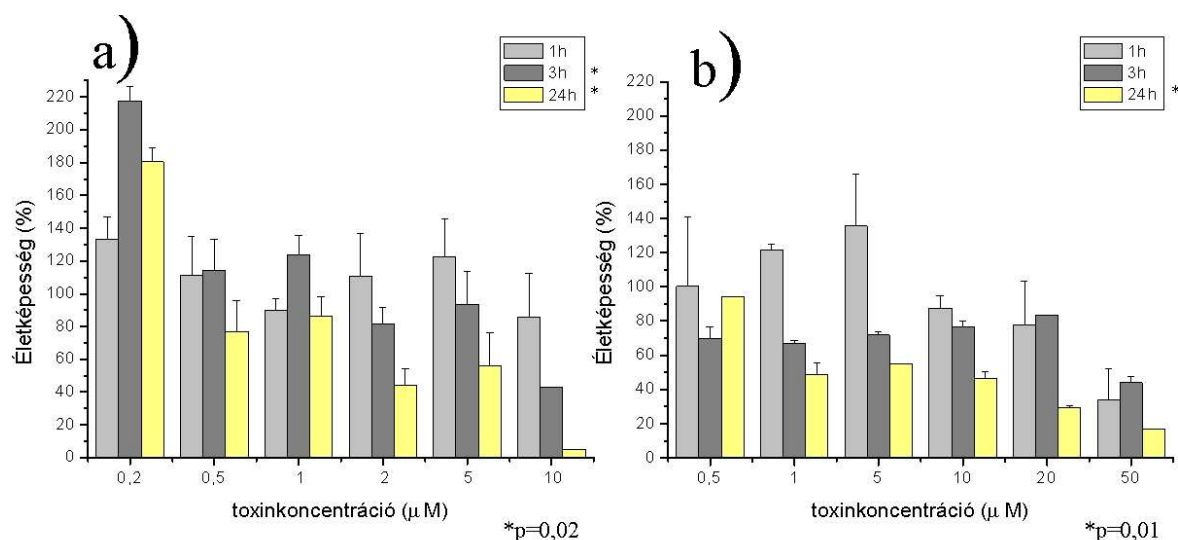
Mikrocisztin-LR-el való 3 és 24 órás kezelés esetén alacsonyabb koncentrációk alkalmazásakor (0,2; 0,5; 1 μ M) valamint 1 órás kezelés esetén minden vizsgált koncentráció hatására a sejtek életképessége nagyobb volt, mint 100%. Ez igaz volt 1 órás 0,5;1 és 5 μ M cilindrospermopszinnal való kezelés esetén is (11.a. és 11.b. ábra). A rövidebb ideig tartó és kisebb koncentráción történő kezelések hatására a sejtek metabolikus aktivitása nőtt a sejtekben beinduló detoxifikációs folyamatoknak köszönhetően. Ezek energiaigényes folyamatok, ATP használódik fel, ennek következtében az oxidatív foszforiláció felgyorsul,

ami által a NADH, és a FADH₂ NAD⁺ -á és FAD⁺-á oxidálódik. Ezáltal a NADH/NAD⁺ arány lecsökken, aminek köszönhetően a citrátciklus mitokondriális dehidrogenázai aktiválódnak, hogy a NAD⁺ -t NADH-vá redukálják.

Magasabb koncentrációk és hosszabb ideig tartó kezelés után a sejtek metabolikus aktivitása csökkent.

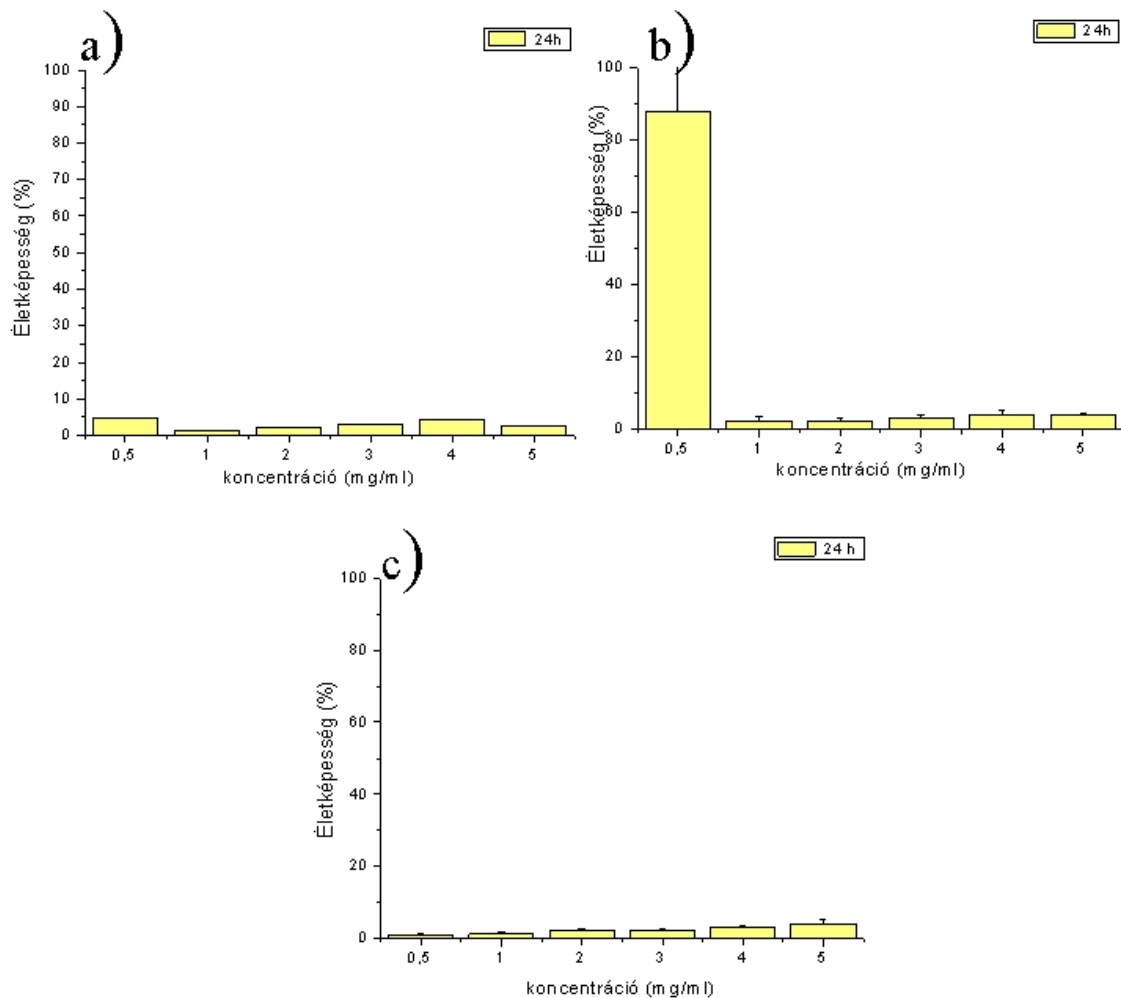
Cilindropermopszinnal való 3 és 24 órás kezelés esetén a sejtek életképessége a koncentráció függvényében szignifikánsan csökkent. (p<0,05) 2, 5 és 10 µM CYN esetén a sejtek metabolikus aktivitása a kezelés időtartamának növekedésével csökkent (11.a. ábra).

Mikrocisztin-LR esetén csak a huszonnégy órás kezelés után csökkent szignifikánsan az életképesség. (p<0,05) (11b. ábra) CaCo2 és MCF7 sejtvonalakon Botha és mtsai. is szignifikáns életképesség csökkenést figyeltek meg 10 µM MC-LR hatására 24, 48 és 72 órás inkubálás után (5). 1, 5 és 10 µM-os MC-LR el való kezelés esetén az életképesség idő függvényében történő csökkenése is megfigyelhető (11.b. ábra).



11. ábra: Cilindropermopszin (CYN) és Mikrocisztin-LR (MC-LR) hatása CHO-K1 sejtek életképességére (a) CYN, b) MC-LR)

A cilindropermopszint termelő *Cylindropermopsis raciborskii* AQS törzs hatására már 0,5 mg/ml –es koncentrációban a sejtek életképessége 5% alá csökkent (12.a. ábra). Mivel ezt az alacsony értéket a sejtek életképessége már az általunk vizsgált legkisebb koncentrációnál elérte, ezért ebben a koncentráció tartományban nem tudtuk a koncentrációfüggést kimutatni, de egyértelműen látszik, hogy már 0,5 mg/ml AQS törzsből származó szuszpenzió jelentős mértékben lecsökkentette a CHO-K1 sejtek életképességét.



12. ábra: AQS, PCC6506 és APHA törzs hatása a CHO-K1 sejtek életképességére 24 órás kezelés esetén (a) AQS, b) PCC6506, c) APHA)

A PCC6506 anatoxin-a –t termelő törzs esetén a sejtek életképessége 0,5 mg/ml-es koncentráció esetében 88% alá csökkent, majd a következő alkalmazott PCC6506 koncentrációnál (1 mg/ml) 5% alá esett. Az 1-5 mg/ml közötti koncentrációk esetén az életképesség mindig 5% alatt maradt (12.b. ábra). Ahhoz, hogy a koncentrációfüggést kimutassuk, az 1 mg/ml alatti koncentrációtartományok további vizsgálata szükséges.

APHA törzs hatására a CHO-K1 sejtek életképessége 5% alá csökkent a 0,5- 5 mg/ml-es koncentrációtartományban (12.c. ábra).

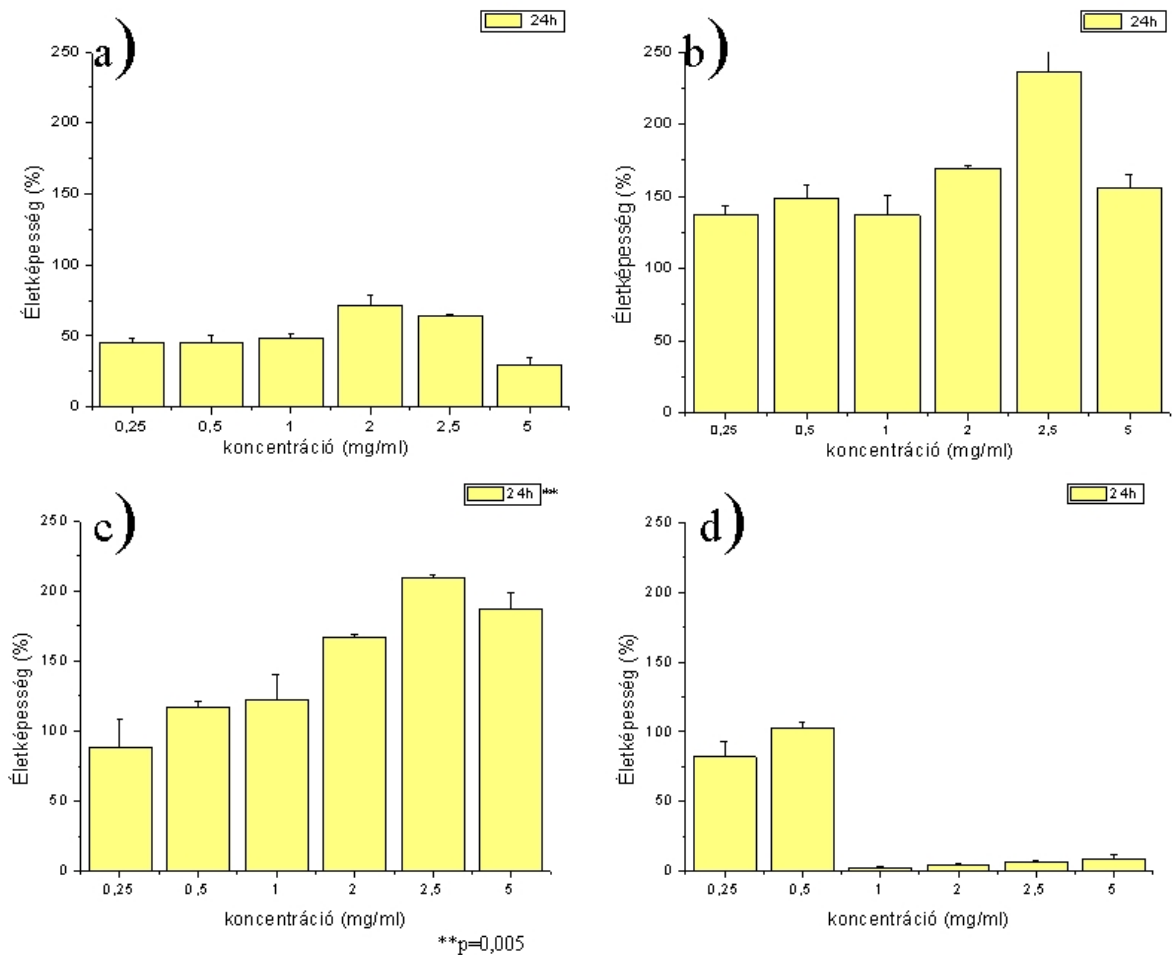
A sejtek életképessége minden vizsgált ACT9502 koncentráció esetén lecsökkent, legalább 72% alá (13.a. ábra). A koncentrációfüggést nem sikerült kimutatni, ezért további mérések szükségeltetnek ezen cianobaktérium törzs esetén.

A 13.b. ábrán látható, hogy az ACT9503 törzsszel kezelt sejtek metabolikus aktivitása minden vizsgált koncentráció esetén nagyobb volt, mint a kontroll sejteké. Ennek oka az

lehet, hogy az ACT9503 kivonat ezen koncentrációjának hatására, a sejtekben beinduló a detoxifikációs folyamatok hatására a mitokondriális dehidrogenázok aktivitása nőtt.

A CHO-K1 sejtek metabolikus aktivitása ACT9504 hatására a kontrollokhöz képest szignifikánsan nőtt, a cianobaktérium-kivonat koncentrációjának növekedésével: $p < 0,01$ (13.c. ábra). Itt is, akár az ACT9503 esetén, a detoxifikációs folyamatok megnövekedett energiaszükségletének következtében nőtt meg a sejtek metabolikus aktivitása.

ACT9505 törzs hatására 1-5 mg/ml –es koncentrációtartományban a sejtek életképessége 10% alá csökkent (13.d. ábra).

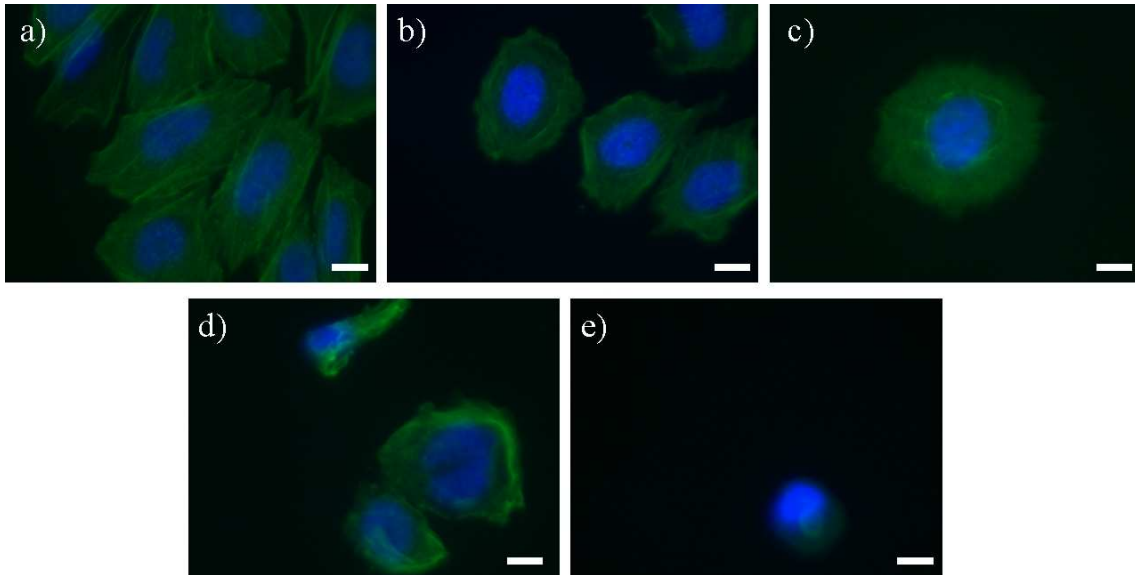


13. ábra: Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek hatása a CHO-K1 sejtek életképességére 24 órás kezelés esetén (a)ACT9502, (b)ACT9503, (c) ACT9504, (d) ACT9505)

4.3. A CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerének változása

A cianobaktériumok által termelt toxinok gyakran okozzák a sejtvezeték leépülését, ami a sejtek lekerekedését, deformálódását okozza. Ezért a mikrofilamentáris rendszeren végzett

vizsgálatok megfelelő mutatói lehetnek a cianobaktérium-kivonatok toxicitásának monitorizására.



14. ábra: 48 órás Mikrocisztin-LR –el való kezelés hatása a CHO-K1 sejtek sejtváznak mikrofilamentáris rendszerére **a)** 48 órás kontroll sejtek **b)** 5 μM MC-LR **c)** 10 μM MC-LR **d)** 20 μM MC-LR **e)** 50 μM MC-LR; lépték= 10 μM

A kontrollhoz viszonyítva 5 μM MC-LR-nél a sejtek lekerekedtek, 10 μM -nál a sejtmag körüli aktin hálózat elkezdett lebomlani, 20 μM -nál az aktin hálózat a sejtmag köré csoportosult. 50 μM -nál az aktin hálózat lebomlott, már csak egy kis foltban volt látható a sejtmag körül, ami ennél a koncentrációnál már összetömörödött, valószínűleg a genotoxikus hatásának köszönhetően (14. ábra).

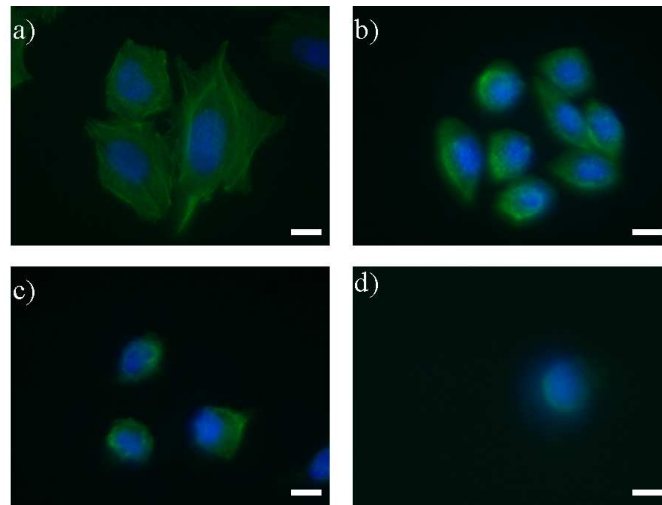
A hepatotoxikus MC-LR hatása a CHO-K1 sejtekre kevésbé kifejezett mint a hepatocitákra, melyeknél a citoskeleton felbomlása 20 perces 1 μM MC-LR-el való kezelés hatására már észlelhető (3). Ez összefüggésben áll azzal, hogy a májtól eltérő szervek nem rendelkeznek az ABC transzport rendszerrel (21).

24 órás kezelés után 1 μM és 2 μM cilindropermopszin hatására a CHO-K1 sejtek hajlamosak voltak a lekerekedésre, a sejtvázuk átalakult és a kortikális aktin hálózat leépült (13).

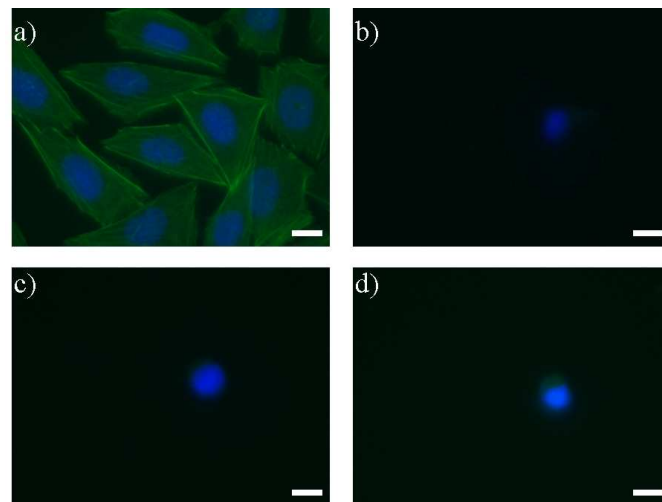
Cilindropermopszinnal való két napig tartó kezelés esetén már 1 μM -nál látható a toxikus hatás (15. ábra). A kontroll sejtek kitapadtak, aktinfilamentumaik hálózatba rendeződtek. 1 μM CYN hatására 48 óra után a sejtek lekerekedtek, aktin filamentumaik a sejtmag köré koncentráálódtak, és elkezdtek disszociálódni. A sejtmagok már 1 μM CYN hatására összetömörödtek a kontrollokhoz viszonyítva. A 15. ábrán a koncentrációfüggés is

megfigyelhető, 2 μM CYN hatására a sejtek még jobban lekerekedtek és az aktinfilamentumok disszociálásuknak köszönhetően már csak a sejtmag körüli részen voltak megfigyelhetők. Ez a hatás 5 μM esetén még inkább kifejezettebb.

3 nap alatt már 1 μM CYN hatására az aktinfilamentumok szinte teljes mértékben disszociálódtak, akár csak 2 és 5 μM esetén (16. ábra).



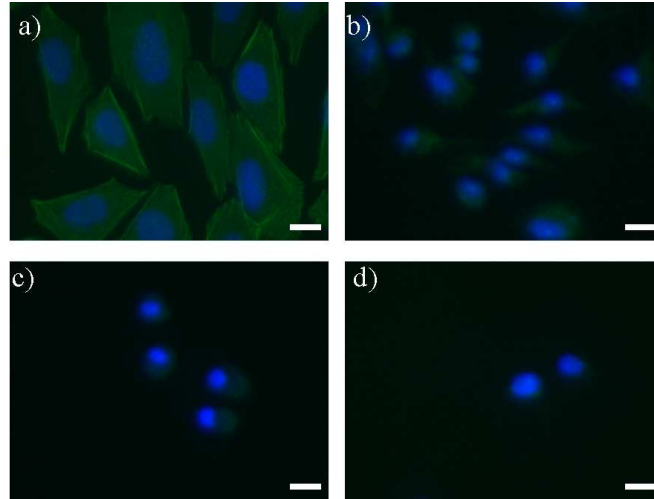
15. ábra: 48 órás Cilindrospermopszinnal való kezelés hatása a CHO-K1 sejtek sejtvázának mikrofilamentáris rendszerére **a)** 72 órás kontroll sejtek **b)** 1 μM CYN **c)** 2 μM CYN **d)** 5 μM CYN; lépték= 10 μM



16. ábra: 72 órás Cilindrospermopszinnal való kezelés hatása a CHO-K1 sejtek sejtvázának mikrofilamentáris rendszerére **a)** 72 órás kontroll sejtek **b)** 1 μM CYN **c)** 2 μM CYN **d)** 5 μM CYN; lépték= 10 μM

CYN hatására, 72 óra után a sejtekben jelen levő DNS kondenzálódott, mindhárom koncentráció esetén a DNS-hez kötődő DAPI által kibocsátott kék jel mérete kisebb, míg az

intenzitása nagyobb lett, mint a kontroll sejtek esetében. CYN-el való kezelés esetén az időfüggés is kimutatható, 1 és 2 μM esetén az aktinfilamentumok nagyobb mértékben disszociálódtak 3 nap alatt (a sejtmag körül is már alig volt aktin), mint 2 nap alatt (15., 16. ábra).

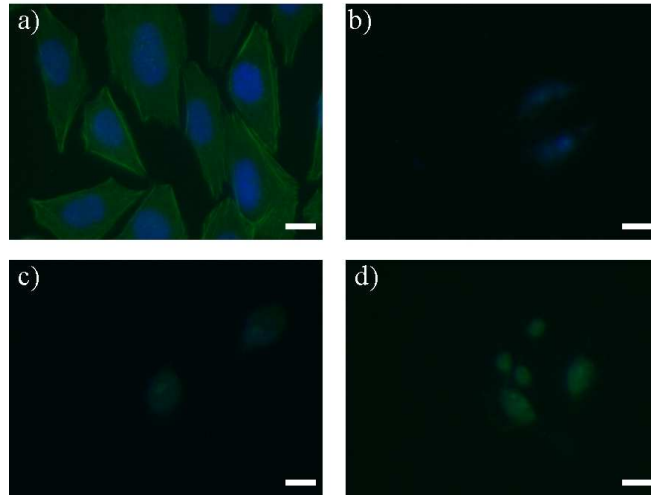


17. ábra: AQS törzs (2,45 mg/ml) hatása a CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerére **a)** 72 órás kontroll sejtek **b)** AQS 24 órás kezelés **c)** AQS 48 órás kezelés **d)** AQS 72 órás kezelés; lépték= 10 μM

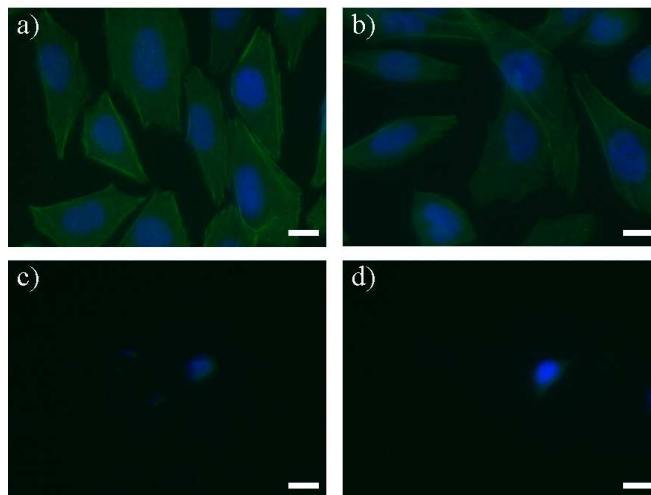
A cilindrospermopszint termelő AQS törzs 2,45 mg/ml –es koncentrációjának hatása a CHO-K1 sejtekre a 17. ábrán figyelhető meg. A 24 és 48 órás kezelések hatása hasonló a 48 órás 2 μM CYN esetén megfigyelt hatásokkal: a sejtek legömbölyödtek és az aktinhálózat elkezdett disszociálódni. A hatás erősebbnek tűnik, mint 2 μM CYN esetén, mivel az aktinhoz kötődő falloidin-FITC által kibocsátott jel a 24 és 48 órás AQS kezelések esetén gyengébb. 72 órás kezelés hatására már az aktinhálózat teljesen lebomlott. Akárcsak a CYN-nal való kezelések esetén az AQS törzs is láthatóan kifejtett genotoxikus hatást már 24 órás kezelési idő esetén.

2,85 mg/ml APHA kivonattal való kezelés 24 órás inkubációs idő leteltével a sejtek legömbölyödését és a DNS állomány felbomlását okozta, az aktin hálózat pedig a sejtmag köré tömörödött. 72 óra után a genotoxikus hatás annyira erős volt, hogy a DAPI által kibocsátott jel már alig volt látható (18. ábra).

24 óra után, 2,75 mg/ml ACT9502-es törzs hatására a sejtek elkezdtek leválni a felületről: a 19.b) ábrán megfigyelhető a fillopódiumok képződése. Ezenkívül az is látható, hogy a kortikális aktin hálózat nem látszik olyan kifejezetten, mint a kontroll sejtek esetén. 48 és 72 óra után az ACT9502-es törzs a CHO-K1 sejteken hasonló hatást váltott ki, mint 1 μM CYN 72 óra alatt: az aktinfilamentumok lebomlottak és a kromatin állomány kondenzálódott.

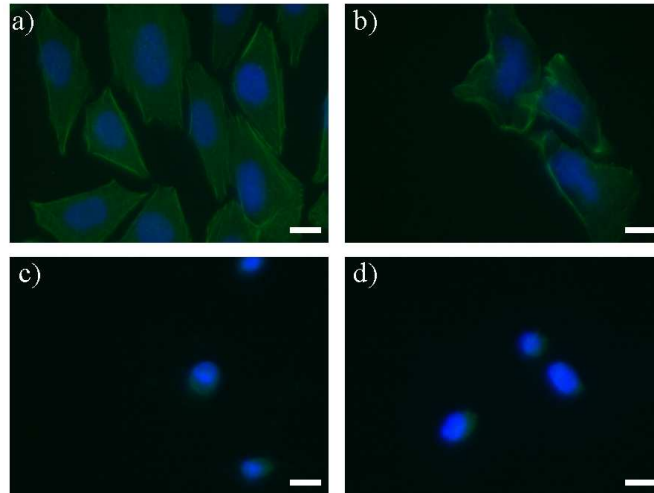


18. ábra: APHA (2,85 mg/ml) törzs hatása a CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerére **a)** 72 órás kontroll sejtek **b)** APHA 24 órás kezelés **c)** APHA 48 órás kezelés **d)** APHA 72 órás kezelés; lépték= 10 μ M



19. ábra : ACT9502 (2,75 mg/ml) törzs hatása a CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerére **a)** 72 órás kontroll sejtek **b)** ACT9502 24 órás kezelés **c)** ACT9502 48 órás kezelés **d)** ACT9502 72 órás kezelés; lépték= 10 μ M

1,85 mg/ml ACT9504-es törzs hatására 24 óra inkubáció után a CHO-K1 sejtek elkezdtek leválni a felületről, és a sejtmagvak elvesztették eredeti alakjukat, eltorzultak. Az ACT9504-es törzs az ACT9502-es törzshöz hasonlóan 48 és 72 óra után az aktinhálózat lebomlását és a kromatin kondenzációját idézte elő, tehát a hatása hasonló volt az 1 μ M CYN-el való 72 órás kezeléshez (20. ábra).



20. ábra : ACT9504 (1,85 mg/ml) törzs hatása a CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerére **a)** 72 órás kontroll sejtek **b)** ACT9504 24 órás kezelés **c)** ACT9504 48 órás kezelés **d)** ACT9504 72 órás kezelés; lépték= 10 μ M

5. Következtetések

5.1. A cilindrospermopszin és mikrocisztin-LR CHO-K1 sejtekre kifejtett hatása

Mind a cilindrospermopszin, mind a mikrocisztin-LR esetén kimutatható volt a membrán permeabilitásának megváltozása a CHO-K1 sejteken: az LDH aktivitás a koncentráció függvényében szignifikánsan nőtt, cilindrospermopszin esetén három órás kezelés hatására, mikrocisztin-LR-el való kezelés esetén pedig 24 óra után.

A CHO-K1 sejtek nem rendelkeznek a májsejtekre és vese epiteliális tubuláris sejtekre jellemző ABC transzport rendszerrel, mely a mikrocisztinek felvételéért felelős.(21) Ez megmagyarázhatja azt, hogy a mikrocisztinek hatása a cilindrospermopszinhoz képest miért késleltetett. A CYN LC50 értéke 5-ször kisebb, mint a mikrocisztin-LR-é, tehát az LDH aktivitásváltozás alapján a CYN toxikusabb, mint az MC-LR.

Három órás cilindrospermopszinnal való inkubáció nem csak a membrán permeabilitást növelte meg, hanem a CHO-K1 sejtek életképességét is szignifikánsan csökkentette. Az MC-LR 3 óra alatt sem a membrán permeabilitásra sem az életképességre nem hatott szignifikánsan. 24 óra alatt mind a mikrocisztin-LR, mind a cilindrospermopszin szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét mutató mitokondriális dehidrogenázok aktivitását.

48 óra után a mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin hatására a CHO-K1 sejtek lekerekedtek, elvesztették kapcsolatukat az extracelluláris mátrixszal, és a kortikális aktin

hálózat disszociálódott. Ezek a morfológiai változások mikrocisztin-LR esetén 5 μM -nál, míg cilindropermopszin esetén pedig már 1 μM -nál megfigyelhetőek voltak. Cilindropermopszin hatására a sejtmagok kondenzálódtak. Mikrocisztin-LR-nél ugyanez csak 50 μM -al való kezelés esetén volt megfigyelhető.

5.2. A cianobaktérium törzsek toxicitásának felmérése CHO-K1 sejteken

A cianobaktérium-kivonatok LC50 értéke 0,01 és 1,56 mg/ml között mozgott és az MC-LR LC50 értéke mindegyiket meghaladta. Vagyis az MC-LR nagyobb koncentrációban szükséges ahhoz, hogy a sejtek 50%-a az apoptózisba lépjen, mint a kivonatok. Viszont, ez annak is lehet a következménye, hogy a kivonatokban levő toxinok és lipopoliszacharidok valamint más jelen levő vegyületek között szinergisztikus kapcsolat léphet fel.(19)

A sejtek életképessége 10 % alá csökkent AQS 0,5 mg/ml, PCC6506 1 mg/ml, APHA 0,5 mg/ml és ACT9505 1 mg/ml hatására. ACT9502 5 mg/ml hatására 40% alá csökkent, míg ACT9503 és ACT9504 hatására a mitokondriális dehidrogenázok aktivitása mindegyik koncentráció esetén nőtt. Az LDH aktivitás mérésekor kapott LC50 értékek (1. táblázat) alapján a négy Balatonból izolált cilindropermopszin törzs közül az ACT9505 bizonyult legtoxikusabbnak és a sejtek életképességét is ez a csökkentette legjobban, a többi vizsgált ACT törzsek közül.

Az aktinszerkezetben végbemenő morfológiai változások a négy vizsgált törzs esetén AQS, APHA esetén már 24 óra után, míg ACT9502 és ACT9504-nél 48 óra után tapasztaltunk hasonló változást, mint 1 μM CYN-nel való kezeléskor.

Az általam vizsgált törzsek a mikrocisztin-LR-hez és a cilindropermopszinhez hasonlóan, a koncentráció függvényében citotoxikus hatást váltottak ki a CHO-K1 sejteken.

6. Köszönetnyilvánítás

A bemutatott méréseket az MTA- Balatoni Limnológiai Kutatóintézetben végeztem. A kísérleteket Gácsi Mariannal végeztük, aki mindvégig hasznos tanácsokkal és ötletekkel látott el. Ezúton szeretném megköszönni a segítséget Dr. Győri Jánosnak, aki lehetővé tette, hogy az intézetben dolgozhassak. A vizsgálatokhoz felhasznált cianobaktérium-kivonatokat Dr. Kovács Attila készítette el.

A dolgozat elkészítésében Gácsi Mariann, Dr. Kósa Ferenc, Dr. Győri János és Dr. Farkas Anna segített.

7. Rövidítések jegyzéke

AnTx - a - anatoxin a

APHA - *Aphanizomenon sp.* vegyes tenyészetből

AQS - *Cylindrospermopsis raciborskii* bizonyítottan cilindrospermopszint termelő törzs

CaCo2 – *Human Colon Carcinoma Cell Line*, humán vastagbél carcinoma sejtvonal

CHO - *Chinese Hamster Ovary*, kínai hörcsög petefészek sejt

CYN - cilindrospermopszin

ACT9502, ACT9503, ACT9504, ACT9505 – Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumok

CYP450 - citokróm P450

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO - dimetil szulfoxid

FBS – *Fetal Bovine Serum*, fetális marha szérum

FITC - fluoreszcein izotiocianát

homoAnTx-a - homoanatoxin a

LC50 – *Lethal Concentration*, az a toxikus mennyiség , amelynél a kezelt alanyok 50%-a elpusztul

LDH - laktát dehidrogenáz

LPS - lipopoliszacharid

FAD – flavin – adenin - dinukleotid

FBS - fetal bovine serum

MCF-7 – pro –human emlő adenocarcinóma sejtvonal

MC-LR - mikrocisztin-LR

MCYST- mikrocisztin

MTT - 3-((4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromid

NADH - nikotinamid adenin dinukleotid

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCC6506 - *Oscillatoria sp.* anatoxint termelő törzs

PP1 – szerin / treonin protein foszfatáz 1

PP2A – szerin / treonin protein foszfatáz 2A

PSI – *Photosystem I*, egyes fotokémiai rendszer

PSII – *Photosystem II*, kettes fotokémiai rendszer

STX – szaxitoxin

TrX-100 – TritonX-100; erős detergens hatású vegyület, mely a sejteket teljesen szétroncsolja, használata esetén megkapjuk azt az értéket, amit maximálisan kiválthat egy toxikus vegyület

8. Ábrák forrásai

1. ábra: www.biocrawler.com, GNU FDL Free Doc License 1.2., 2007.11.04.
2. ábra: TOXIC, Barriers against cyanotoxins in drinking water, www.cyanotoxic.com/analytes.html (I.R. Falconer, A. R. Humpage, 2000), 2007.11.04
3. ábra: J. Patockaa, L. Stredab : Brief review of natural nonprotein neurotoxins, The ASA Newsletter, 2002, www.asanltr.com/newsletter/02-2/articles/neurotoxins.htm
4. ábra : www.answers.com/topic/saxitoxin, GNU FDL Free Doc License ,2007.11.04
5. ábra : <http://www.doctorslounge.com/rheumatology/labs/ldh.htm> , 2008. 03. 17
- 6., 7. ábra: http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_082_084.pdf, 2008. 03. 17.

9. Irodalomjegyzék

1. Araoz R., Nghiem H. O., Rippka R., Palibroda N., De Marsac N. T. és Herdman M., 2005: *Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS*; Microbiology; vol.: 151; Pt 4; 1263-1273 oldal
2. Batista T., De Sousa G., Suput J. S., Rahmani R. és Suput D., 2003: *Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes*; Aquatic Toxicology; vol.: 65; 1; 85-91 oldal
3. Battle T., Touchard C., Moulds H. J., Dowsett B. és Stacey G. N., 1997: *New cell substrates for in vitro evaluation of microcystin hepato-cytotoxicity*; Toxicology in Vitro; vol.: 11; 5; 557-567 oldal
4. Borbely G., Máthé Cs., M.-Hamvas, M., Kós., P., 1997: *A növények és a cianotoxinok interakciója*; Hidrológiai Közlemény; vol.: 77.; 24-28 oldal
5. Botha N., Gehringer M. M., Downing T. G., Van De Venter M. és Shephard E. G., 2004: *The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells*; Toxicon; vol.: 43; 85-92 oldal
6. Bradford M. M., 1976: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*; Anal Biochem; vol.: 72; 248-254 oldal
7. Carbis R. C., Rawlin, T.G., Mitchell, G.F., Anderson, W.J. And Mccauley, I., 1996: *The histopathology of carp, Cyprinus carpio L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration*; Journal of Fish Diseases; vol.: 19; 199-207 oldal
8. Carmichael W. W., 1997: *The Cyanotoxins*; Advances in Botanical Research; vol.: 27; 211-240 oldal
9. Chorus I. és Bartram J., 1999: *Toxic Cyanobacteria in Water*; WHO E. és F. N. Spoon vol.; oldal
10. Codd G. A., Bell S. G., Kaya K., Ward C. J., Beattie K. A. és Metcalf J. S., 1999: *Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health*; European Journal of Phycology; vol.: 34; 4; 405-415 oldal
11. Dawson R. M., 1998: *The Toxicology of Microcystins*; Toxicon; vol.: 36; 7; 953-962 oldal
12. Falconer I. R. és Humpage A. R., 2001: *Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin* Environ Toxicol; vol.: 16; 192-195 oldal
13. Fessard V. és Bernard C., 2003: *Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells*; Environ Toxicol; vol.: 18; 5; 353-359 oldal

14. Froschio S. M., Humpage A. R., Burcham P. C. és Falconer I. R., 2003: *Cylindrospermopsin- Induced Protein Synthesis Inhibition and Its Dissociation from Acute Toxicity in Mouse Hepatocytes*; Environmental Toxicology; vol.: 18; 243 -251 oldal
15. Gantt E., 1994: *Supramolecular membrane organization* a The Molecular Biology of Cyanobacteria könyvben; kiadó: Bryant D. A.; 119 - 138 oldal;
16. Ghosh S., Khan S. A., Wickstrom M. és Beasley V., 1995: *Effects of microcystin-LR on actin and the actin-associated proteins alpha-actinin and talin in hepatocytes*; Nat Toxins; vol.: 3; 6; 405-414 oldal
17. Hubert J. J., 1980: *Introductory Toxicology* a Bioassay könyvben; 55-56 oldal;
18. Humpage A. R., Fontaine F., Froschio S., Burcham P. és Falconer I. R., 2005: *Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress*; Journal of Toxicology and Environmental Health A; vol.: 68; 9; 739-753 oldal
19. Ibelings B. W. és Chorus I., 2007: *Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review*; Environ Pollut; vol.; oldal
20. Jiri Patočka Ladislav Stredab, 2002: *Brief review of natural nonprotein neurotoxins*; The ASA Newsletter; vol.: 02-2; 89; oldal
21. Khan S. A., Ghosh S., Wickstrom M., Miller L. A., Hess R., Haschek W. M. és Beasley V. R., 1995: *Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells*; Nat Toxins; vol.: 3; 3; 119-128 oldal
22. Li X. Y., Wang J., Liang J. B. és Liu Y. D., 2007: *Toxicity of microcystins in the isolated hepatocytes of common carp (Cyprinus carpio L.)*; Ecotoxicology and Environmental Safety; vol.: 67; 3; 447-451 oldal
23. Mackintosh C., Beattie K. A., Klumpp S., Cohen P. és Codd G. A., 1990: *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*; Febs Letters; vol.: 264; 2; 187-192 oldal
24. Marion E. Van Apeldoorn Hans P. Van Egmond, Gerrit J. A. Speijers, Guido J. I. Bakker, 2007: *Toxins of cyanobacteria*; Mol. Nutr. Food Res; vol.; 51; 7-60 oldal
25. McDermott C. M., Nho C. W., Howard W. és Holton B., 1998: *The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types* Toxicol; vol.: 36; 1981-1996 oldal
26. Metcalf J. S., Lindsay J., Beattie K. A., Birmingham S., Saker M. L., Torokne A. K. és Codd G. A., 2002: *Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp Artemia salina: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins* Toxicol; vol.: 40; 1115-1120 oldal
27. Moran J. H. és Schnellmann R. G., 1996: *A rapid beta-NADH-linked fluorescence assay for lactate dehydrogenase in cellular death*; Journal of Pharmacological and Toxicological Methods; vol.: 36; 1; 41-44 oldal

28. Mosmann T., 1983: *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*; Journal of Immunological Methods; vol.: 65; 55-63 oldal
29. Nagel R.: *DarT: The Embryo Test with the Zebrafish Danio rerio – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology*; ALTEX; vol.: 1; 02; 38-48 oldal
30. Norris R. L., Seawright A. A., Shaw G. R., Senogles P., Eaglesham G. K., Smith M. J., Chiswell R. K. és Moore M. R., 2002: *Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse* Toxicol; vol.: 40; 471-476 oldal
31. Putnam K. P., Bombick D. W. és Doolittle D. J., 2002: *Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate*; Toxicol In Vitro; vol.: 16; 5; 599-607 oldal
32. Saqrane S., Ghazali I. E., Ouahid Y., Hassni M. E., Hadrami I. E., Bouarab L., Del Campo F. F., Oudra B. és Vasconcelos V., 2007: *Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant Lemna gibba: microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction*; Aquatic Toxicology; vol.: 83; 4; 284-294 oldal
33. Shaw G. R., Seawright A. A., Moore M. R. és Lam P. K. S., 2000: *Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity*; Therapeutic Drug Monitoring; vol.: 22; 89-92 oldal
34. Shen X., Lam P. K., Shaw G. R. és Wickramasinghe W., 2002: *Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin* Toxicol; vol.: 40; 1499-1501 oldal
35. Skryma R., Prevarskaya N., Vacher P. és Dufy B., 1994: *Voltage-dependent Ca²⁺ channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells*; Febs Letters; vol.: 349; 2; 289-294 oldal
36. Tandeau De Marsac N. és Houmard J., 1993: *Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms*; FEMS Microbiology Reviews; vol.: 104; 119 - 190 oldal
37. Torokne A., Asztalos M., Bankine M., Bickel H., Borbely G., Carmeli S., Codd G. A., Fastner J., Huang Q., Humpage A., Metcalf J. S., Rabai E., Sukenik A., Suranyi G., Vasas G. és Weiszfeiler V., 2004: *Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement* Anal Biochem; vol.: 332; 280-284 oldal
38. Vasas G., Gaspar A., Pager C., Suranyi G., Mathe C., Hamvas M. M. és Borbely G., 2004: *Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis*; Electrophoresis; vol.: 25; 1; 108-115 oldal
39. Wiegand C. és Pflugmacher S., 2005: *Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review*; Toxicology and Applied Pharmacology; vol.: 203; 3; 201-218 oldal
40. Yoo Sang-Gyun Kang; Deog-Yong Lee; Mi Lan Kang; Han Sang, 2007: *Biological characteristics of Chinese hamster ovary cells transfected with bovine Prnp*; Journal of Veterinary Science; vol.: 8; 2; 131-137 oldal

