

Doktori (PhD) értekezés

Angeli Cserne

Kaposvár

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Kaposvári Campus

**A fumonizin B1 toxin *N*- és *O*-palmitoil
származékainak előállítása és toxicitásuk *in vitro* és
in vivo vizsgálata**

DOI: 10.54598/004400

Angeli Cserne

Kaposvár

2023

A doktori iskola

Megnevezése: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési tudományok

Vezetője: Prof. Dr. Szabó András

az MTA doktora, egyetemi tanár, tanszékvezető

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet, Élettani és
Állategészségügyi Tanszék

Témavezető(k): Prof. Dr. Bartók Tibor

az MTA doktora, ügyvezető igazgató

Fumizol Kft., Szeged

Prof. Dr. Kovács Melinda

akadémikus, egyetemi tanár, intézetigazgató

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	6
2. Célkitűzések	8
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1 A mikotoxinok rövid jellemzése.....	9
3.2 A mikotoxinokat termelő főbb penészgomba-fajok	10
3.3 A fumonizinek felfedezése és kémiai szerkezete	12
3.4 A fumonizinek előfordulása, bioszintézise és <i>in vitro</i> termeltetése	14
3.5 A fumonizinek toxicitása és <i>in vivo</i> mechanizmusa	18
3.6 Az acilezett fumonizin-származékok.....	22
3.7 A fumonizinek egészségügyi határ- és irányértékei	24
3.8 A mikotoxinokra vonatkozó mintavételi előírások, valamint a fumonizinek kvalitatív és kvantitatív meghatározási módszerei	26
3.9 A humán szérumalbumin jellemzése	31
3.10 A zebraadánió mint toxikológiai modellállat	31
4. Anyag és módszer	33
4.1 Felhasznált vegyszerek	33
4.2 A <i>Fusarium verticillioides</i> izolátum begyűjtése és azonosítása	33
4.3 A FB1 toxin termeltetése szilárdfázisú fermentációval.....	34
4.4 A FB1 toxin kinyerése a mintákból.....	34
4.5 A FB1 toxin tisztítása a kivonatokból	35
4.6 Az izolált FB1 toxin tisztaságának meghatározása	36
4.7 Vízmentes THF előállítása	36
4.8 A FB1 toxin acilezése.....	36
4.9 Az acilezési reakció nyomonkövetése	37
4.10 Az acilezett FB1-származékok tisztítása	38
4.11 A tisztított komponensek szerkezeti azonosítása.....	38

4.12 A tisztított komponensek nagy felbontású tömegspektrométerrel (HRMS) történő vizsgálata	39
4.13 Az extrahált rizskultúra-minta adalékolási kísérlete az azonosított acilezett FB1-származékokkal	39
4.14 Spektroszkópai kísérlet.....	40
4.15 Ultracentrifugálási vizsgálatok	40
4.16 Ultraszűrési vizsgálatok.....	42
4.17 Modellezési vizsgálatok.....	42
4.18 A fumonizinek toxicitásának vizsgálata zebradánió embrió modellen	43
5. Eredmények és azok megbeszélése	45
5.1 A FB1 toxin szintetikus acilezésére irányuló kísérlet.....	45
5.1.1 A FB1 toxin acilezése palmitoil-klorid/trietil-amin reagenssel	45
5.1.2 Az <i>N</i> - és <i>O</i> - acilezett FB1 komponensek NMR vizsgálata.....	48
5.1.3 A reakciótermékek jellemzése HPLC/ESI-HRMS módszerrel	51
5.1.4 A gombakivonat adalékolása a szintetikusan előállított acilezett FB1-származékokkal.....	55
5.2 A FB1, az <i>N</i> -palmitoil-FB1, az 5- <i>O</i> -palmitoil-FB1 és a FB4 toxin humán szérumalbuminnal történő kölcsönhatására, valamint zebradánió embrió modellen történő toxicitásuk vizsgálatára irányuló kísérlet	55
5.2.1 A fumonizinek és a palmitinsav hatása a HSA emissziós spektrumára.....	55
5.2.2 A fumonizinek kölcsönhatása a HSA-val ultracentrifugálási vizsgálatok alapján	56
5.2.3 A fumonizinek és a palmitinsav hatása a „site markerek” és a HSA kölcsönhatására	57
5.2.4 Molekulamodellőzés	60
5.2.5 A fumonizinek toxikus hatásának vizsgálata zebradánió embrió modellen	61
6. Következtetések és javaslatok	66
7. Új tudományos eredmények	69
8. Összefoglalás.....	70

9. Summary	72
10. Melléklet.....	74
11. Köszönetnyilvánítás	90

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

C18	18 szénatom hosszúságú láncokat tartalmazó állófázis
CRM	„certified reference material”, hiteles anyagminta
ELEM	„equine leukoencephalomalacia”, lovak agylágyulása
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay”, enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat
ELSD	„evaporative light scattering detector”, egyetemes fényszórásos detektor
ESI	„electrospray ionization”, elektroporlasztásos ionizáció
FA	„A” típusú fumonizin analóg
FB	„B” típusú fumonizin analóg
FC	„C” típusú fumonizin analóg
FET	„Fish Embryo Toxicity Test”, halembrió toxicitás-teszt
FP	„P” típusú fumonizin analóg
GC	„gas chromatography”, gázkromatográfia
GC/MS	gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer
hpf	„hours post fertilization”, az ikra megtermékenyítése óta eltelt órák száma
HPLC	„high-performance liquid chromatography”, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPLC/ESI-MS	elektroporlasztásos ionforrással ellátott nagyhatékonyságú kromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer
HPLC/MS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer
HPLC/MSMS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfhoz kapcsolt tandem tömegspektrométer
HRMS	„high-resolution mass spectrometry”, nagy felbontású tömegspektrometria
HSA	„human serum albumin”, humán szérumalbumin
IARC	„International Agency for Research on Cancer”, Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség
i.v.	intravénás
LC	„liquid chromatography”, folyadékkromatográfia

LOD	„limit of detection”, kimutatási határ
LOQ	„limit of quantitation”, meghatározási határ
MeCN	acetonitril (metil-cianid)
MeOH	metanol
MS	„mass spectrometry”, tömegspektrometria
MSMS	tandem tömegspektrometria
MWCO	„molecular weight cut off”, (molekulatömeg) vágási érték
NMR	„nuclear magnetic resonance”, magmágneses rezonancia spektroszkópia
PBS	„phosphate-buffered saline”, foszfátpufferolt sóoldat
PDA	„potato dextrose agar”, burgonya dextróz agar
PP	polipropilén
PPE	„porcine pulmonary edema”, sertés tüdővizényő
qNMR	„quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy”, kvantitatív magmágneses rezonancia spektroszkópia
RLU	„relative light unit”, relatív lumineszcencia egység
RM	„reference material”, referenciaanyag, anyagminta
Rq	„relative quantity”, relatív mennyiség
Rt	„retention time”, retenciós idő
Sa	szfinganin
SAX	„strong anion exchange”, erős anioncserelő
SEM	„standard error of the mean”, az átlag standard hibája
SIM	„selective ion monitoring”, szelektív ion figyelés
So	szfingozin
SPE	„solid-phase extraction”, szilárdfázisú extrakció
TCA	„tricarballic acid”, trikarballilsav
TEA	trietyl-amin
THF	tetrahidrofurán
ttkg	testtömeg kilogramm
ZETA	„Zebrafish Embryo Toxicity Assay”, zebrafish embrió toxicitáspróba

1. BEVEZETÉS

A humán populációt napjainkban egyre több egészségügyi ártalom éri, melyek közül a legjelentősebbek a szervezetet ért környezeti terhelés (pl. kipufogógáz, UV-sugárzás, szálló por, pollenek, dohányfüst), élelmiszeripari termékekből a szervezetbe esetlegesen jutó káros kémiai anyagok (pl. mikotoxinok, növényvédőszer-maradványok, nehézfémek) és a felgyorsult életmóddal együtt járó stressz.

Az értekezésem tárgyát képező *N*-acil- és *O*-acil-fumonizin B1 (FB1) toxin származékok a mikotoxinok csoportjába tartoznak, mely anyagokat egyes penészgomba-fajok termelhetnek. Az acilezett FB1-származékok természetes úton fertőzött kukoricában is előfordulhatnak, emellett bizonyos élelmiszeripari eljárások alkalmazása során is megjelenhetnek a késztermékben. Az *N*-acil FB1 származékok ráadásul az FB1 toxinnál jóval toxikusabbnak bizonyultak *in vitro*. Ma már több száz mikotoxint ismerünk, melyek közül jelenlegi ismereteink alapján néhány okozhat jelentős egészségügyi problémát. A mikotoxinok számos élelmiszeripari alapanyagban, félkész- és késztermékben (pl. kalászos gabonafélék, kukorica, szőlő, mazsola, sör, bor, kávé- és kakaóbab, pisztácia, földimogyoró, fűszerpaprika, almalé, tej) előfordulhatnak.

A mikotoxinok a világon mindenütt jelentős gazdasági és élelmiszerbiztonsági károkat okoznak, a termesztés, betakarítás és tárolás szinte minden fázisában szennyezhetik a gabonamagvakat, illetve más agráripari alapanyagokat. Ebből kifolyólag ezen természetes toxikus anyagok gyakran megjelennek a táplálékláncban. Felmérések szerint a világszerte betakarított termények 25%-a, Európában pedig a betakarított termények 20%-a szennyezett mikotoxinokkal (FAO, 1997). Az újabb, nagy pontosságú multi-mikotoxin analitikai módszerekkel (HPLC/MSMS) végzett felmérések szerint a szennyezettség mértéke akár 80% is lehet, ha figyelembe vesszük a különböző mikotoxin metabolitokat is (Kovalsky et al., 2016).

A legveszélyesebbnek számító mikotoxinokra szigorú élelmezés-egészségügyi határértékek, a takarmányok esetén pedig – az aflatoxin B1 kivételével, melyre már létezik határérték – ajánlások vonatkoznak. A mikotoxinok különböző élelmiszerekben és takarmányokban történő mennyiségi és minőségi meghatározásához, a műszerek kalibrálásához tiszta referenciaanyagokra van szükség. Fontos, hogy a kalibráláshoz megfelelő bizonylattal rendelkező referenciaanyagokat (RM, CRM standard) használjanak, amely bizonylatok lehetőleg tartalmazzák a kvantitatív NMR (qNMR) eljárással történő vizsgálatot is. A HPLC eljárással történő

tisztaságvizsgálat relatív adatot ad, szemben a qNMR eljárással, amely az abszolút tisztaságát jellemzi a vizsgált referenciaanyagnak. Jelen pillanatban az *N*- és *O*-acil származékokra nem létezik a vegyszerpiacon referenciaanyag. A referenciaanyagokat kémiai szintézissel állítják elő vagy különböző fonalagombákkal *in vitro* termeltetik meg, folyadék vagy szilárdfázisú fermentációs körülmények között. A kémiai szintézis vagy a termeltetés után a referenciaanyagok megfelelő tisztaságban történő kinyerése különböző extrakciós és kromatográfias módszerek felhasználásával történik.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám során megfelelő eljárást kívántam kidolgozni a FB1 toxin szilárdfázisú fermentációjának optimalizálására *Fusarium verticillioides* izolátumok felhasználásával.
2. Céлом volt a szilárdfázisú fermentáció során termeltetett FB1 toxin tisztán történő kinyerése a tenyészetekből preparatív flash- és folyadékkromatográfias eljárások alkalmazásával.
3. Kísérleteket kívántam végezni a megfelelő tisztaságú FB1 toxin palmitoil-kloriddal történő szintetikus acilezésére, valamint az acilezett FB1-származékok tisztítására.
4. A FB1 toxin szintetikus acilezése során kapott származékok tisztaságát HPLC/MS eljárással kívántam meghatározni.
5. A szilárdfázisú fermentáció után előállított gombakivonatban található acilezett fumonizinek azonosítása céljából adalékolási kísérletet kívántam végrehajtani a FB1 toxin acilezésével előállított származékok felhasználásával.
6. Az előállított acilezett FB1 toxin származékok ellenőrzését nagyfelbontású tömegspektrometriával (HRMS) és magmágneses rezonancia spektroszkópiával (NMR) terveztem végrehajtani.
7. A témám egyik legfontosabb részét képező állatkísérlet során céлом volt az izolált/szintetizált acilezett fumonizinek toxicitásának vizsgálata, a FB1 toxint használva pozitív kontrollként.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A mikotoxinok rövid jellemzése

A mikotoxinok egyes fonalagombák – általában – extracellulárisan kiválasztódó másodlagos anyagcseretermékei (szekunder metabolitjai), vagyis a gomba elsődleges (primer) anyagcsere-folyamataiban nem vesznek részt. Maga a kifejezés (mikotoxin) a görög mykes (gomba) és a latin toxicum (méreg) szóból származik. Az első mikotoxinokat 1960-ban fedezték fel, amikor Angliában egy tömeges elhullással járó (100000 egyed) pulykavész hívta fel a figyelmet a takarmány lehetséges szennyezettségére. A betegséget – utalva annak rejtélyes voltára – „X-disease”-nek, vagyis X-betegségnek nevezték el (Wannop, 1961). A takarmányként szolgáló brazil földimogyoró-darából egy kristályos anyagot izoláltak, mely állatkísérletekben az X-betegséggel azonos tüneteket okozott (Allcroft et al., 1961). Ezzel párhuzamosan a takarmányról *Aspergillus flavus* gombát izoláltak, mely szintetikus táptalajon termelte a korábban a takarmány-tételekről izolált toxint. A toxint termelő gombafajra utalva aflatoxinnak nevezték el a méreganyagot. A ma ismert több mint 20 aflatoxin közül a legjelentősebbek az aflatoxin B1, B2, G1, G2, valamint az aflatoxin M1 és M2. Az aflatoxinok felfedezését követően a figyelem a mikotoxinokra összpontosult, melynek következtében mára már több száz mikotoxint ismerünk, melyek kémiai összetétel, szerkezet, bioszintézis és hatásmechanizmus szempontjából heterogén csoportot alkotnak.

A ma ismert mikotoxinok közül – humán- és állategészségügyi potenciális veszélyeik miatt – az aflatoxinok, az ochratoxin A, a trichotecén vázas vegyületek (T-2, HT-2, a dezoxinivalenol, nivalenol), a zearalenon (F2 toxin), a patulin és a jelen értekezés tárgyát képező fumonizinek egy része számít a legjelentősebbnek. A szervezetre káros hatást gyakorló mikotoxinok kémiai szerkezetükből adódóan citosztatikus, citotoxikus, immunszuppresszív, mutagén, ösztrogén-mimetikus, rákkeltő és teratogén hatással rendelkezhetnek, illetve a fehérjeszintézisre, az idegrendszerre és a parenchimás szervekre is káros hatást gyakorolhatnak. Egy adott toxin az említett káros hatások közül többel is rendelkezhet. A mikotoxinok jelentős része már igen kis mennyiségben is károsodást okozhat, kiürülésük lassú a szervezetből, ezért felhalmozódhatnak a szervezetben (elsősorban a májban és a vesében). Emellett maradandó károsodást, akár halált/elhullást is okozhatnak.

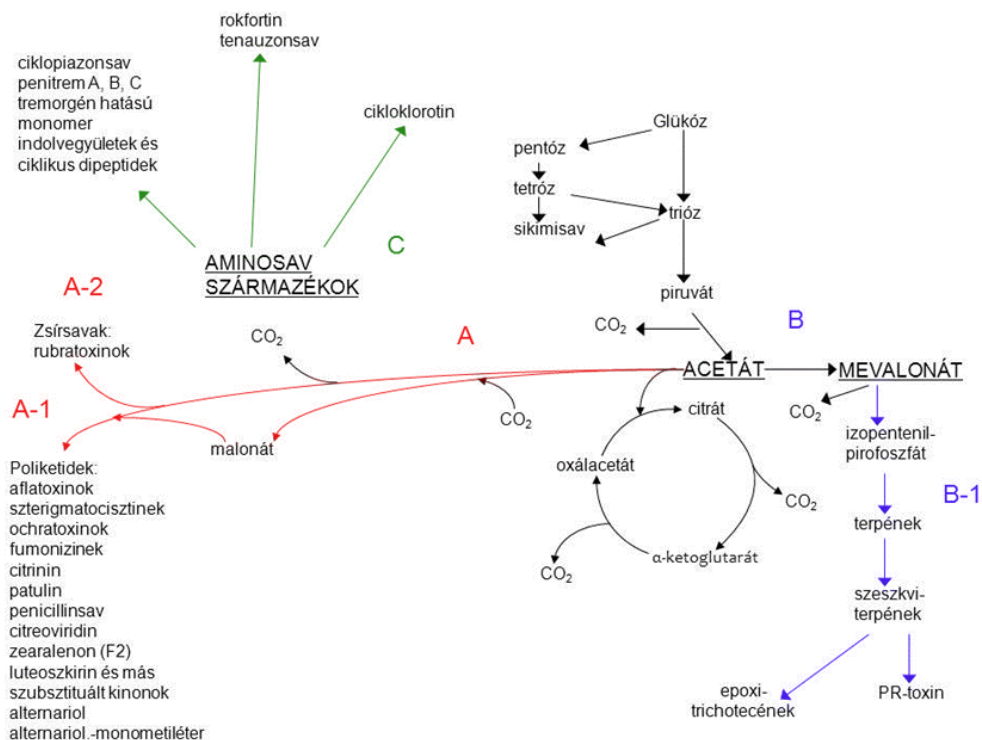
3.2 A mikotoxinokat termelő főbb penészgomba-fajok

Attól függően, hogy a növényi részeken fellelhető penészgomba a betakarítás előtt vagy azt követően kezd növekedésbe, szántóföldi és raktári penészfajokat különböztetnek meg (Christensen & Kaufmann, 1969). A szántóföldi penészgomba-fajok szaporodásához jellemzően a 20% feletti, míg a raktári fajok számára 20% alatti nedvességtartalom az ideális. A szántóföldi penészgomba-nemzetségek (pl. *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*) közül a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok bírnak a legnagyobb jelentőséggel. Ezek közül is kiemelkedőek a *F. graminearum* és *F. culmorum* fajok, melyek a gabonafélék trichotecén (pl. dezoxinivalenol) (Pestka & Smolinski, 2005) és zearalenon-szennyezését (Milićević et al., 2010) okozzák, valamint a *F. verticillioides* (korábbi néven *F. moniliforme*) és a *F. proliferatum*, melyek többek között a kukorica fumonizin-szennyezéséért felelősek (Shurtleff, 1980). A legtöbb *Aspergillus* fajt jellemzően a raktári penészek közé sorolják, közülük az *A. flavus* felelős a kukorica, a földimogyoró és más termények aflatoxin-szennyezéséért. A raktári penészek közül a legfontosabbnak az előbb említett *Aspergillus*, a *Mucor*, illetve a *Penicillium* nemzetségbe tartozó fajok számítanak. Nem minden penészgomba-faj termel azonban mikotoxinokat. Azokat a mikroszkopikus penészgomba-fajokat, melyek képesek mikotoxinok bioszintézisére, toxinogénnek nevezzük. A toxinogén fajok közül az *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* nemzetségbe tartozó fajok a legjelentősebbek. Egy gombafaj többféle mikotoxin szintetizálására is képes lehet (pl. *A. niger* fumonizineket és ochratoxinokat, az *A. flavus* aflatoxinokat és kojisavat, a *F. graminearum* trichotecéneket és zearalenont is szintetizálhat), illetve egy mikotoxint több különböző faj is termelhet (pl. ochratoxinokat egyes *Aspergillus* és *Penicillium* fajok, illetve fumonizineket egyes *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Tolyptocladium* fajok). A humán- és állategészségügyi szempontból legjelentősebb mikotoxinokat, valamint azok fő termelőit az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat A humán- és állategészségügyi szempontból legjelentősebb mikotoxinok és fő termelőik

Mikotoxin	A mikotoxint termelő fő fonalgomba-fajok
Aflatoxinok	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Ochratoxin A	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Trichotecének	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Patulin	<i>Penicillium expansum</i>
Fumonizinek	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>

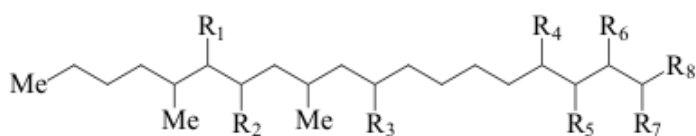
Számos mikotoxin bioszintézisének kiindulópontja az acetyl- és a malonyl-KoA kondenzációs reakciója (1. ábra „A” anyagcsereútja). A szeszkviterpén-típusú mikotoxinok a mevalonát-anyagcsereút révén képződnek (1. ábra „B” anyagcsereútja). Az aminosavakból képződő mikotoxinok csoportja heterogén, mivel ciklikus polipeptideket és *N*-heterociklusos komponenseket is tartalmaz (1. ábra „C” anyagcsereútja).



1. ábra A mikotoxinok bioszintézis-útjai (Téren és Novák, 1990, kiegészítve)

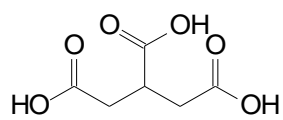
3.3 A fumonizinek felfedezése és kémiai szerkezete

A fumonizinek közül elsőként a FB1 és a FB2 toxint fedezték fel Dél-Afrikában, természetes úton gombafertőzött kukoricából izolálva és spektroszkópiás módszerekkel azonosítva (Bezuidenhout et al., 1988; Gelderblom et al., 1988). Azóta további 29 fumonizint azonosítottak szerkezetileg is. Bartók et al. (2006, 2008, 2010a, 2010b, 2013a, 2013b, 2014) ioncsapdás és repülési idő tömeganalizátorokkal felszerelt tömegspektrométerekkel 98 új fumonizint detektáltak, amelyeket 7 közleményben ismertettek. A ma ismert fumonizin analógok szerkezetük alapján négy fő csoportot alkotnak: A, B, C, P (Rheeder et al., 2002). A fumonizinek egy 20 szénatomos lineáris vázat tartalmaznak, kivéve a C típusú analógokat, melyek esetében a lánc 19 szénatom hosszúságú. A lineáris szénláncon helyezkednek el a funkciós csoportok: 3-5 darab hidroxil-csoport, 2 metil-csoport, 1 amino-, acetilamino- vagy 3-hidroxipiridínium-csoport, valamint a trikarballilsav (TCA), amely a 14-es és a 15-ös szénatomon elhelyezkedő hidroxil-csoportokból észteresíti legtöbbször mindkettőt, ritkábban csak az egyiket. Az egy TCA-val rendelkező fumonizineket részlegesen hidrolizált fumonizineknek nevezik (pl. PHFB1 – „partially hydrolyzed FB1”). A teljesen hidrolizált fumonizinek (pl. HFB1 – „hydrolyzed FB1”) szénláncán nem található TCA csoport. A „PH” típusú fumonizinek a fumonizint tartalmazó élelmiszerek feldolgozása (sütés, főzés) mellett természetes körülmények között is termelődhetnek (Shephard et al., 1996). A „H” típusú fumonizineket nixtamalizálásnak (alkalikus közegben történő főzés) alávetett kukoricamintákban találták (Hendrich et al., 1993; Stack, 1998). A legfontosabb fumonizinek szerkezetét a 2. ábra tartalmazza.

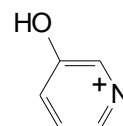


a fumonizinek alapváza

Fumonizin-csoport	Fumonizinek	Összegképlet	M _r	A fumonizin alapváz szubsztituensei							
				R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
FA	FA ₁	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₆	763	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NHCOMe	Me
	FA ₂	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747	TCA	TCA	H	OH	H	OH	NHCOMe	Me
	FA ₃	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	PHFA _{3a}	C ₃₀ H ₅₅ NO ₁₀	589	TCA	OH	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	PHFA _{3b}	C ₃₀ H ₅₅ NO ₁₀	589	OH	TCA	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	HFA ₃	C ₂₄ H ₄₉ NO ₅	431	OH	OH	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	FAK ₁	C ₃₀ H ₅₃ NO ₁₁	603	=O	TCA	OH	OH	H	OH	NHCOMe	Me
FB	FBK ₁	C ₂₈ H ₅₁ NO ₁₀	561	=O	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	<i>izo</i> -FB ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	TCA	TCA	OH	H	OH	OH	NH ₂	Me
	PHFB _{1a}	C ₂₈ H ₅₃ NO ₁₀	563	TCA	OH	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	PHFB _{1b}	C ₂₈ H ₅₃ NO ₁₀	563	OH	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	HFB ₁	C ₂₂ H ₄₇ NO ₅	405	OH	OH	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₂	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	TCA	TCA	H	OH	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₄	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	689	TCA	TCA	H	H	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₅	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₆	737	Hexahidroxiálkil alapváz, pontos szerkezete még ismeretlen							
	<i>3-epi</i> -FB ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NH ₂	Me
	<i>3-epi</i> -FB ₄	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	689	TCA	TCA	H	H	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₆	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	TCA	TCA	OH	OH	OH	H	NH ₂	Me
FC	FC ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₅	707	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	H
	<i>N</i> -acetyl-FC ₁	C ₃₅ H ₅₉ NO ₁₆	749	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NHCOMe	H
	<i>izo</i> -FC ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₅	707	TCA	TCA	OH	H	OH	OH	NH ₂	H
	<i>N</i> -acetyl- <i>izo</i> -FC ₁	C ₃₅ H ₅₉ NO ₁₆	749	TCA	TCA	OH	H	OH	OH	NHCOMe	H
	OH-FC ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₆	723	TCA	TCA	OH	OH	OH	OH	NH ₂	H
	<i>N</i> -acetyl-OH-FC ₁	C ₃₅ H ₅₉ NO ₁₇	765	TCA	TCA	OH	OH	OH	OH	NHCOMe	H
	FC ₃	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₄	691	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NH ₂	H
	FC ₄	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₃	675	TCA	TCA	H	H	H	OH	NH ₂	H
FP	FP ₁	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₆	800	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	3-HP	Me
	FP ₂	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅	784	TCA	TCA	H	OH	H	OH	3-HP	Me
	FP ₃	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅	784	TCA	TCA	OH	H	H	OH	3-HP	Me



trikarrallilsav (TCA)

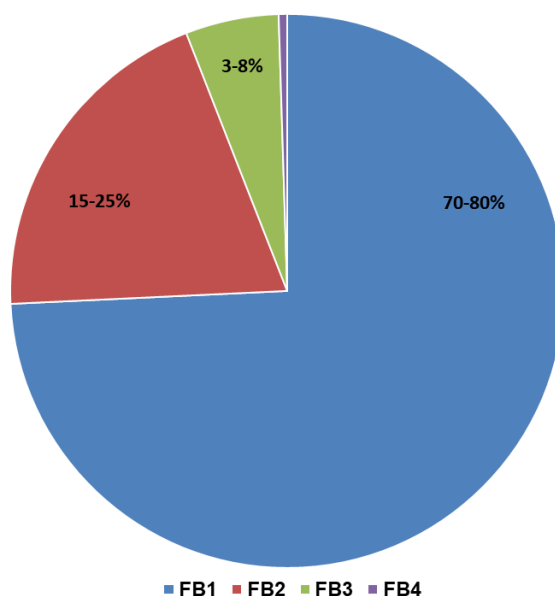


3-hidroxipiridínium (3-HP)

2. ábra. A fumonizinek szerkezete (Bartók, 2011)

3.4 A fumonizinek előfordulása, bioszintézise és *in vitro* termeltetése

A fumonizinek bioszintézisét több fonalagomba-nemzetség esetében is leírták (2. táblázat), azonban, a ma ismert legjelentősebb fumonizin-termelők a *F. verticillioides* és a *F. proliferatum*, amelyek világszerte igen elterjedtek és különösen a kukorica esetében okoznak jelentős élelmiszerbiztonsági problémát. A fumonizin-termelő *Fusarium* fajokat a gombataxonómusok a morfológiai bélyegek/törzsfá alapján több szekcióba (*Liseola*, *Dlaminia*, *Elegans*, *Arthrosporiella*) sorolták, de ma már elterjedten alkalmazzák a DNS-alapú eljárásokat is (O'Donnell et al., 2015) a fajok azonosítására. A fumonizinekkel szennyezett kukorica esetén a FB1 toxin mennyisége a legjelentősebb, az összfumonizin-tartalom kb. 70-80%-a. A FB2 toxin mennyisége 15-25%, a FB3 toxiné 3-8%, a FB4 toxiné pedig általában nem jelentős (Thiel et al., 1992; Marín et al., 1995; Musser & Plattner, 1997) (3. ábra).



3. ábra Fumonizinekkel szennyezett kukoricaminták átlagos FB1, FB2, FB3 és FB4 toxin tartalma

A fumonizinek 100-120 °C hőmérsékletig eléggé stabilak. A *F. verticillioides* gombatenyészet forralása (100 °C, 30 perc) nem (Alberts et al., 1990), és a tej pasztörözése (62 °C, 30 perc) is csak csekély mértékben csökkentette a FB1 toxin koncentrációját (Maragos & Richard, 1994). Csak magasabb hőmérsékleten történő hőkezelés esetén figyeltek meg számottevő FB1- és FB2-tartalom csökkenést. A szárított kukorica hőkezeléses kísérletében 100 °C-on 175 perces, 125 °C-on 30-38 perces és 150 °C-on 10 perces kezelést követően tudták a kezdeti FB1-tartalom felét visszamérni (Dupuy et al., 1993). Scott & Lawrence (1994) száraz és nedves

kukoricaliszten végzett hőkezeléses kísérletében 190 °C hőmérsékleten 60 perc alatt a FB1- és FB2-tartalom 60-80%-a, míg 220 °C-on 25 percig tartó sütés során szinte az összes fumonizin elbomlott és/vagy átalakult. A kutatók szerint még tisztázni kell, hogy a hőkezeléses élelmiszeripari feldolgozás során megfigyelt fumonizin-szint csökkenésért milyen arányban felelős a fumonizinek hőbomlása és az élelmiszer-mátrixban a fehérjékhez, szénhidrátokhoz és egyéb szerves vegyületekhez történő kötődése, illetve hogy a hőkezelés után miként változik az élelmiszer-alapanyagok és termékek toxicitása. Kim et al. (2003) fumonizin-tartalmú kukoricából készített kukoricapehely lúgos hidrolízise során azt találták, hogy a hidrolízis után a szabad fumonizin-tartalom 2,6-szer magasabb volt a kezelés előtti értéknél. Ez a kísérleti eredmény arra az élelmiszerbiztonsági problémára hívja fel a figyelmet, hogy a fumonizin-szennyezett kukoricából előállított élelmiszerek esetén nemcsak a szabad, hanem a mátrixhoz kötött fumonizinek mennyiségét is figyelembe kell venni.

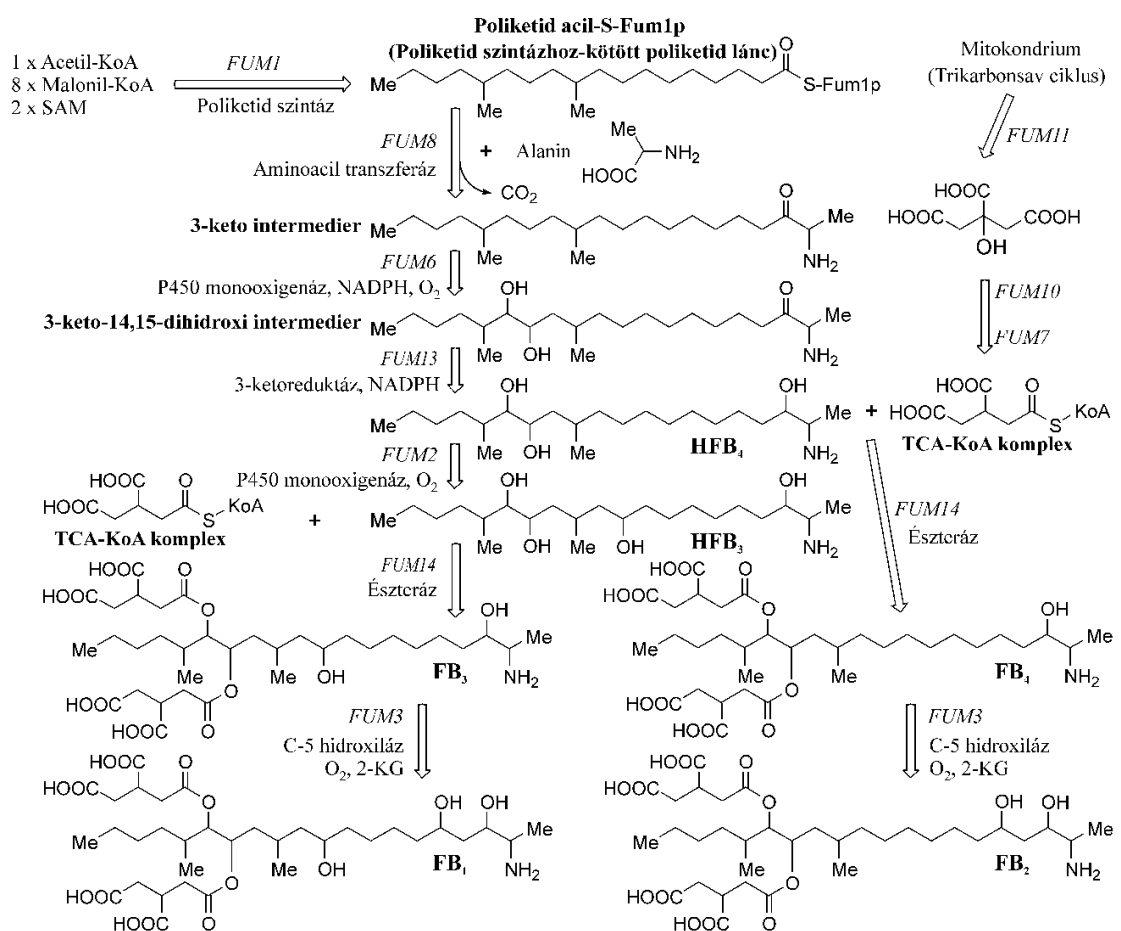
A szakirodalmi adatok szerint a szántóföldi körülmények közötti fumonizin-bioszintézishez a 30-32%-os nedvesség-tartalom és a 20-25 °C-os hőmérséklet az optimális (Le Bars et al., 1994; Nelson et al., 1994). Újabb adatok szerint egyes fekete *Aspergillus* és *Tolypocladium* fajok is képesek - elsősorban a FB2 és FB4 toxinok - szintézisére, így kimutattak már fumonizin-szennyezést pl. szemeskávében, szőlőben, mazsolában és borban is (2. táblázat).

2. táblázat Fumonizineket termelő fonalagomba-fajok (Bartók, 2011).

Fumonizin-termelő <i>Fusarium</i> fajok	Termelt fumonizinek
<i>Liseola</i> szekció	
<i>Fusarium verticillioides</i>	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , <i>izo</i> -FB ₁ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC _{1,4} , FP ₁₋₃ , PHFB _{1a-b} , 3- <i>epi</i> -FB _{3,4}
<i>Fusarium sacchari</i>	FB ₁
<i>Fusarium fujikuroi</i>	FB ₁
<i>Fusarium proliferatum</i>	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC ₁ , FP ₁₋₃ , PHFB _{1a-b}
<i>Fusarium subglutinans</i>	FB ₁
<i>Fusarium thapsinum</i>	FB ₁₋₃
<i>Fusarium anthophilum</i>	FB ₁₋₂
<i>Fusarium globosum</i>	FB ₁₋₃
<i>Dlaminia</i> szekció	
<i>Fusarium nygamai</i>	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC ₁ , FP ₁ , PHFB _{1a-b}
<i>Fusarium dlamini</i>	FB ₁
<i>Fusarium napiforme</i>	FB ₁
<i>Fusarium pseudonygamai</i>	FB ₁₋₂
<i>Fusarium andiyazi</i>	FB ₁
<i>Elegans</i> szekció	
<i>Fusarium oxysporum</i>	FC _{1,3-4} , <i>N</i> -acetyl-FC ₁ , <i>izo</i> -FC ₁ , <i>N</i> -acetyl- <i>izo</i> -FC ₁ , <i>N</i> -acetyl-OH-FC ₁
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>redolens</i>	FB ₁₋₃
<i>Arthrosporiella</i> szekció	
<i>Fusarium polyphialidicum</i>	FB ₁
Fumonizin-termelő egyéb fajok	
<i>Alternaria alternata</i>	FB ₁₋₃
<i>Aspergillus niger</i>	FB _{2,4,6}
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	FB _{2,4}
<i>Tolypocladium geodes</i>	FB _{2,4}
<i>Tolypocladium inflatum</i>	FB _{2,4}

A fumonizinek bioszintézisét főként izotóp etetési kísérletekkel tanulmányozták (Alberts et al., 1993; Branham & Plattner, 1993; Blackwell et al., 1996; Plattner & Shackelford, 1992). Megállapították, hogy a C-1 és C-2 szénatomok, valamint a primer amino-csoport alaninból, a C-3 – C-20 szénatomok az acetyl-KoA-ból és malonil-KoA-ból, továbbá a C-12 és C-16 metil-csoportok a metionintól

származnak. A kísérletek szerint a C-3 hidroxil-csoport forrása egy acetyl-KoA-ból képződött karbonil-csoport, azonban a C-5, C-10, C-14 és C-15 hidroxil-csoportokról feltételezik, hogy a molekuláris oxigénből származnak (Caldas et al., 1998). A TCA oldalláncokkal kapcsolatosan azt gondolják, hogy a citrát-ciklusból származnak (Blackwell et al., 1996). A legtöbb mikotoxin, így a fumonizinek bioszintézisének génjei is klaszterekben helyezkednek el. A *F. verticillioides* esetében az 1-es kromoszómán egy lókuszban elhelyezkedő gének közül 13 génnek tulajdonítanak jelentősebb szerepet a fumonizin-bioszintézisben (Desjardins & Proctor, 2007). A bioszintézisben szerepet játszó gének genetikai és biokémiai eljárásokkal történő tanulmányozása alapján vázolták fel a FB1-4 toxinok bioszintézis útjait (4. ábra).



4. ábra A FB₁₋₄ toxinok bioszintézisének főbb lépései *F. verticillioides*-ben (Butchko et al., 2006, Bartók, 2011). Az adott enzimatis lépést szabályozó gén neve dőlve látható (pl. *FUM1*), 2-KG = 2-ketoglutarát, SAM = S-adenozil-metionin.

A fumonizinek állatkísérletekben történő felhasználásához, a toxicitás- és metabolizmus-vizsgálatokhoz, illetve az immunanalitikai módszerfejlesztésekhez több milligrammnyi mennyiségű toxinra van szükség. A vegyszerforgalmazó cégeknél kapható fumonizinek drágák, ezért a kísérletekhez szükséges fumonizinek lehetőleg

in vitro kell a toxinogén gombafajokkal standardizált körülmények között megtermeltetni. A termeltetéshez leggyakrabban *Fusarium verticillioides* és *Fusarium proliferatum* izolátumokat alkalmaznak, amelyekkel sterilizált rizst vagy dercés kukoricaőrleményt oltanak be, de vannak adatok fermentorban, folyadékkultúrában történő fumonizin-termeltetésre is. A folyadékkultúrás termeltetés során legtöbbször természetes-eredetű tápoldat-kiegészítőt (pl. élesztőkivonat, kukorica-, cirok- vagy rizsliszt, keményítő kivonat) is adagolnak a tápoldatba (Rao et al., 2010). A tápoldat összetevőinek optimalizálásával a FB1 és FB2 toxin esetében 6,609 és 1,472 µg/ml koncentrációt sikerült elérniük. A fumonizinek termeltetéséhez a szilárdfázisú tenyésztési eljárásokat, az ún. szilárdfázisú fermentációt gyakrabban alkalmazzák, mivel ezzel a módszerrel egyszerűbb körülmények között jelentősebb mennyiségű fumonizin termeltethető. Alberts et al. (1990) szemes kukoricán 17900 mg/kg FB1 toxint tudtak termeltetni az MRC 826-os *F. verticillioides*-izolátummal.

3.5 A fumonizinek toxicitása és *in vivo* mechanizmusa

A fumonizinek okozta toxikózissal összefüggésbe hozható megbetegedéseket már a XIX. században is megfigyeltek lófélékben (Mayo, 1891), melyek a sertések mellett a legérzékenyebb állatok a fumonizinekre (EFSA, 2005). Az állatok az elhullást megelőzően idegrendszeri tüneteket mutattak: bódultság, támolygás, lehajtott tartott fej, részleges vagy teljes vakság, eszméletvesztés, önkívületi állapot. A tünetegyüttes a legtöbb esetben elhullással végződött. A toxin az állatok máját, szívét és központi idegrendszerét nagymértékben károsította. A boncolás során fény derült az agy fehérállományának elhalására. A betegség elnevezése – equine leukoencephalomalacia vagy ELEM az agyban megfigyelhető elváltozásokra utal (leuko = fehér anyag, malacia = (nekrózis következtében fellépő) lágyulás). Ez a típusú károsodás kizárólag a lóféléket érinti. Foreman et al. (2004) feltételezése szerint ennek oka, hogy az állat táplálkozásakor lehajta a fejét, mely során az agyba áramló vér mennyiségét normális esetben egy vaszkuláris mechanizmus szabályozza, a fumonizinek azonban blokkolják ezt a működést, ezáltal a nagy mennyiségű agyba áramló vér cerebrális ödémát okoz. A betegséget csak nagyon kevés állat éli túl, melyek jellemzően permanens neurológiai betegségtől szenvednek. A kór kialakulását már a XIX. században is a penészes kukorica fogyasztásával hozták összefüggésbe, azonban csak 1971-ben nyert bizonyítást, hogy a *Fusarium verticillioides* (akkori elnevezés szerint *Fusarium moniliforme*) az ELEM megjelenésének elsődleges

felelőse (Wilson & Maronpot, 1971). A kísérlet során a lovak takarmányába *F. verticillioides* gombatenyészetet kevertek, mely által elő tudták idézni a megbetegedést. Magyarországon a fumonizinek felfedezése előtt is leírtak elhullással végződő takarmány-toxikózist lovak esetén (Lacza & Lázár, 1977), amelyről a kórtani elváltozások alapján később bizonyították, hogy az elhullást feltehetően agylagyulás okozta (Fazekas & Bajmócy, 1996). A betegség időről időre járványszerűen fordul elő. Hazánk mellett (Fazekas & Bajmóczy, 1996) az USA-ban (Vesonder et al., 1989; Wilson et al., 1990), Egyiptomban (Badiali et al., 1968), Dél-Afrikában (Kellerman et al., 1972; Pienaar et al., 1981), Kínában (Xin et al., 1987), Brazíliában (Xavier et al., 1991; Sydenham et al., 1992), Olaszországban (Caramelli et al., 1993), Spanyolországban (Naranjo Cerrillo et al., 1996), Argentínában (Giannitti et al., 2011) és Szerbiában (Jovanović et al., 2015) is tapasztaltak lovaknál tömeges megbetegedést és elhullást penészes takarmány etetésével összefüggésben. Az ELEM betegségnek a tapasztalt tünetek alapján két típusát különböztetik meg: a neurotoxikus és a hepatotoxikus típust. A két eltérő lefolyású betegség külön-külön vagy együttesen is jelentkezhet egy egyednél. A magas dózisú fumonizin fogyasztása a hepatotoxikus ELEM kialakulását segíti elő, míg a hosszabb ideig fennálló, alacsonyabb dózisú toxin fogyasztása a neurotoxikus típus kialakulásával hozható összefüggésbe. Az ELEM lefolyása általában igen gyors, a tünetek megjelenését követően az elhullás órákon vagy napokon belül megtörténik. A nyelv-garat ideg, valamint az ajkak és a nyelv bénulása következtében az állat képtelen táplálkozni, lesóványodik. A hepatotoxikus forma esetében megemelkedett bilirubin és májenzim értékek mérhetőek a vérsérumban. Boncoláskor a máj gyakran kicsi és kemény, fokozott lebenyes mintázatot mutat.

Kísérleti úton lovakban, pónikban, valamint szamarokban előidézték neuro- és hepatotoxicitást természetes úton fertőződött kukorica etetésével, illetve tiszta FB1 toxin takarmányhoz adagolásával (Ross et al., 1993; Brownie & Cullen, 1987; Wilson & Maronpot, 1971; Marasas et al., 1988; Kellerman et al., 1990; Foreman et al., 2004). A kísérletek során a neuro- és hepatotoxikus forma egyidejűleg jelentkezett. A perorális fumonizin adagolás esetén az ELEM betegség kialakulása és tüneteinek megjelenése függött a kísérlet idejétől, a dózis nagyságától, az egyéni érzékenységtől, valamint a korábbi fumonizin-expozíció mértékétől (Ross et al., 1993). A FB1 toxint intravénásan adagolva, a fumonizintartalmú takarmány fogyasztása során észlelhető hasonló tüneteket és lefolyást mutatott (Foreman et al., 2004).

Smith et al. (2002) kardiotoxicitást tudtak előidézni 1 mg tiszta FB1 toxin/ttkg/nap dózis i.v. bejuttatása esetén 4-7 nap alatt. A neurológiai tünetek mellett a szív csökkent összehúzóási képessége, alacsony pulzusszám, csökkent artériás vérnyomás, és megnövekedett szisztémás érellenállás jelentkezett.

Magyarországon már az 1950-es években megfigyelték a sertések hizlalásával összefüggésbe hozott tömeges megbetegedést, mely az állatok nehezített légzését, tüdővizenyőt, végül elhullást okozott (Domán, 1952; Petrás, 1952). Ez a sertéseknél előforduló tüdővizenyővel és mellvízkórral együttjáró tünetegyüttes csak később kapta a PPE (porcine pulmonary edema) elnevezést (Kriek et al., 1981). Osweiler et al. (1992) azonosították elsőként a FB1 toxint, mint a PPE okozóját, az USA-ban több ezer sertés elpusztulását követően. Hazánkban Kakuk (1995) vetette fel annak lehetőségét, hogy a hizlalási tüdővizenyő és a PPE egyazon betegség. Feltételezését Fazekas et al. (1998) igazolták FB1 toxin tartalmú kukoricatenyészet takarmányhoz történő adagolásával. A betegségre legtöbbször a csökkent takarmányfogyasztás hívja fel elsőként a figyelmet. Jellemzően az erősen fertőzött takarmány fogyasztásának kezdetétől számított 4-7 nap múlva a sertések légzési nehézségtől szenvednek, az oxigénhiány következtében elkékülnek, végül a heveny módon kialakuló tüdővizenyő és mellvízkór következtében elpusztulnak (Haschek et al., 1992). Az elhullás általában a takarmány elutasításától számított 48 órán belül megtörténik.

A lovakhoz hasonlóan, sertésekben is elő tudtak idézni kísérleti úton PPE-t, *Fusarium verticillioides*-szel természetesen fertőzött kukorica, laboratóriumi körülmények között oltott kukorica, valamint tiszta FB1 toxin adagolásával is (Haschek et al., 1992; Colvin et al., 1993; Smith et al., 1996; Gumprecht et al., 1998; Smith et al., 2000). A kísérletekben a természetes úton történő megbetegedések során jellemző tüneteket tapasztaltak: légzési nehézség, elkékülés. A fumonizinek hatására kialakuló tüdővizenyőt semmilyen más fajban nem figyeltek meg. Boncolás során súlyos tüdőödéma és mellvízkór észlelhető. Nem halálos tüdőödémát is leírtak alacsonyabb dózissal, hosszabb időn át tartó expozíciót követően (Zomborszky-Kovács et al., 2000). Akut májkárosodás is megfigyeltek, mely a májsejtek apoptózisával, nekrozisával és mitózisával járt (Gumprecht et al., 1998; Haschek et al., 2001). Dang et al. (2019) azt is bizonyították, hogy a FB1 toxin 9 napon át, 17 mg /ttkg dózisban képes megváltoztatni a bélrendszer mikrobiótáját a vizsgált malacokban.

Kísérleti úton emelkedett szfinganin (Sa) és szfingozin (So) értéket figyeltek meg a vérben, a vesében, a májban, a tüdőben és a szívben is, mely a szfingolipid

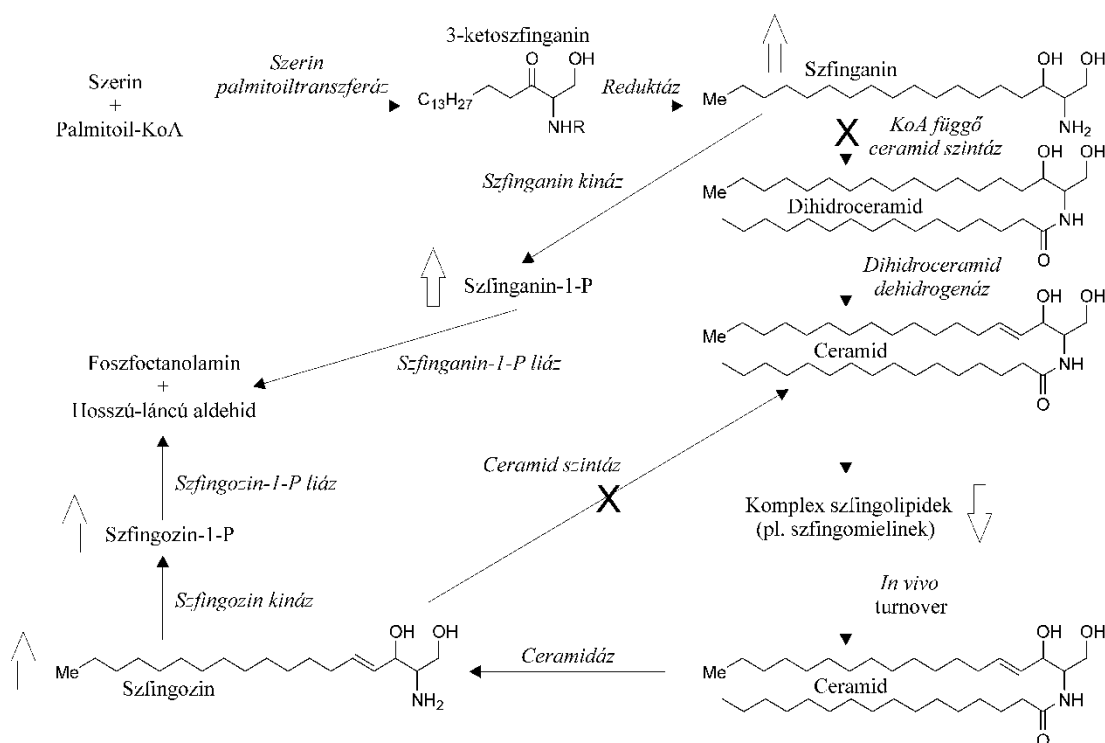
anyagcsere jelentős zavarára utal (Riley et al., 1993; Gumprecht et al., 1998; Smith et al., 1999). A FB1 toxin csökkenti a szív összehúzóó képességét, a pulzusszámot, az artériás nyomás középértékét, a perctérfogatot, emellett növeli a tüdőartériára nehezedő nyomást és a tüdő kapilláris éknyomást.

Kriek et al. (1981) bebizonyították, hogy a mesterségesen gombafertőzött kukorica etetése a rágcsálók májára és szívére erősen toxikus, később pedig bizonyítást nyert, hogy a természetes körülmények között fertőződött kukorica etetése is májrákot okoz rágcsálókban (Marasas et al., 1984, Wilson et al., 1985).

A fumonizinnel szennyezett kukorica fogyasztása és a humán nyelvcsőrák kialakulása közötti összefüggésre az 1980-as évek elejétől figyeltek fel. Először Dél-Afrikában vették észre, hogy a Transkei tartomány északi részén élő lakosok körében jóval ritkábban fordult elő a nyelvcsőrák, mint a szegényebb, déli területek lakosainál, akik gyakran kényszerültek a penészes kukoricából készült termékek fogyasztására (Jaskiewicz et al., 1987; Sydenham et al., 1990; Rheeder et al., 1992; Makaula et al., 1996; Van der Westhuizen et al., 2010). Később Kínában is tapasztaltak hasonló előfordulást: arra a következtetésre jutottak, hogy a FB1 toxin tartalmú táplálék fogyasztása hozzájárult a nyelvcsőrák előfordulásának gyakoribbá válásához (Chu & Li, 1994; Zhang et al., 1997; Wang et al., 2000; Sun et al., 2007). A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) a FB1 toxint a lehetséges karcinogének („group 2B”) közé sorolta (IARC, 2002). A FB1 toxinnak való kitettség kockázati tényező lehet az idegcsőzáródási rendellenességek kialakulásában (Marasas et al., 2004) is, mivel a ceramid szintáz gátlása (Wang et al., 1991) révén zavart okoz a folsav-transzportban (Stevens & Tang, 1997).

A 2-es szénatomon primer amino-csoportot tartalmazó fumonizinek a szfingoid bázisokhoz (Sa, So) hasonló szerkezetüknek köszönhetően kompetitív módon gátolják a ceramid szintázt, mely a szfingolipid-metabolizmus kulcsenzime és mely a Sa, So és egyéb szfingoid bázisok acilezését katalizálja (5. ábra). Az enzim gátlása következtében a szérumban, a szövetekben és a vizeletben a Sa szintje jelentős, míg a So szintje kisebb mértékben növekszik (Merrill et al., 2001; Riley et al., 2001; Riley & Voss, 2006). Végeredményként a fumonizinek gátolják a ceramid bioszintézisét és a szfingolipidek (pl. szfingomielinek, a biológiai membránok igen fontos alkotói) képződését, beindítva ezzel a fumonizinek toxikusságáért és rákkeltő hatásáért felelőssé tehető celluláris folyamatokat. A szfingomielinek bioszintézisének

gátlása a sejtek lízisét idézheti elő, és ez lehet a felelős az ELEM és a PPE kórképekért is.



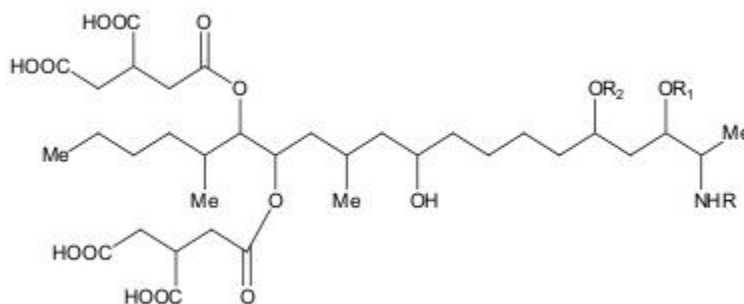
5. ábra A szfingolipid metabolizmus sémája (Pruett et al., 2008, módosítva: Bartók, 2011).

A 5. ábra a szfingolipidek metabolizmusát mutatja be. Az X-szel jelölt helyek jelzik a fumonizinek blokkolta bioszintézis-lépéseket. A felfelé mutató vastag nyilak a szérumban és a szövetekben a fumonizinek hatására emelkedő értéket mutató vegyületek, míg a lefelé mutató vastag nyíl a komplex szfingolipidek mennyiségének csökkenését jelzik.

3.6 Az acilezett fumonizin-származékok

Elsőként Bartók et al. (2010b) bizonyították, hogy a *Fusarium verticillioides* fonalgomba-faj képes zsírsavval acilezett fumonizineket is szintetizálni. Ebben a közleményben a FB1 toxin szénláncának harmadik, illetve ötödik szánatomján elhelyezkedő OH-csoport linolsavval, palmitinsavval és olajsavval történő acilezésével létrejött származékokat – 3-*O*-linoleoil-FB1, 3-*O*-palmitoil-FB1, 3-*O*-oleoil-FB1, 5-*O*-linoleoil-FB1, 5-*O*-palmitoil-FB1, 5-*O*-oleoil-FB1 – írták le. Ezeket a komponenseket a részben hidrolizált FB1 (PHFB1) (Sydenham et al., 1995) és hidrolizált FB1 (HFB1) (Poling & Plattner, 1999) korábban publikált elnevezése alapján észterezett FB1 toxinoknak (EFB1, *izo*-EFB1) nevezték el, az észterezésben

részt vevő zsírsavat (linolsav, olajsav vagy palmitinsav) a név utolsó két karakterében feltüntetve (EFB1LA, *izo*-EFB1LA, EFB1OA, *izo*-EFB1OA, EFB1PA, *izo*-EFB1PA). Később olyan fonalaszgomba-törzseket is találtak, melyek a második szénatomon elhelyezkedő NH₂-csoportot acilezik (savamid-kötést létrehozva) palmitinsavval, olajsavval, illetve linolsavval – *N*-linoleoil-FB1, *N*-palmitoil-FB1, *N*-oleoil-FB1 (Bartók et al., 2013a).



R, R₁, R₂ = R_{lin} (linoleoil), R_{pal} (palmitoil), R_{ole} (oleoil)

R_{lin} = CH₃(CH₂)₄CH=CHCH₂CH=CH(CH₂)₇-C=O

R_{pal} = CH₃(CH₂)₁₄-C=O

R_{ole} = CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇-C=O

Vegyület	R	R ₁	R ₂	Mr	Rt (min)	Rq (FB1 %-a)
3- <i>O</i> -lin-FB1	H	R _{lin}	H	983	6,38	3,72
5- <i>O</i> -lin-FB1	H	H	R _{lin}	983	6,53	1,65
<i>N</i> -lin-FB1	R _{lin}	H	H	983	7,45	0,18 ^a
3- <i>O</i> -pal-FB1	H	R _{pal}	H	959	6,68	1,01
5- <i>O</i> -pal-FB1	H	H	R _{pal}	959	6,82	0,46
<i>N</i> -pal-FB1	R _{pal}	H	H	959	7,78	0,05 ^a
3- <i>O</i> -ole-FB1	H	R _{ole}	H	985	6,79	1,49
5- <i>O</i> -ole-FB1	H	H	R _{ole}	985	6,93	0,66
<i>N</i> -ole-FB1	R _{ole}	H	H	985	7,94	0,07 ^a

6. ábra Az eddig ismert acilezett FB1-származékok. Az „a” betűk jelzik az *N*-acil-FB1 toxin származékok relatív mennyiségének feltételezett alábecslését, mivel ezen vegyületek pozitív ion módban nehezebben protonálhatóak. (Bartók et al., 2013a alapján)

Az acilezett fumonizin-származékok felfedezését követően olasz kutatók bizonyították, hogy *O*-acil-FB1-származékok (*O*-linoleoil-FB1, *O*-oleoil-FB1) a *Fusarium verticillioides*-szel természetes úton (a szántóföldön) fertőződött

kukoricából is kimutathatóak (Falavigna et al., 2013), mely rávilágított az acilezett FB1-származékok jelentőségére.

Az *N*-acil-FB1-származékok toxicitását elsőként egy német-izraeli kutatócsoport vizsgálta, mely során szintetikus körülmények között állítottak elő *N*-acil-FB1-származékokat, melyek toxicitását sejttenyészetekben vizsgálták. A tanulmány során bebizonyították, hogy az *N*-palmitoil-FB1 toxin a FB1 toxinnál jóval toxikusabb (Harrer et al., 2013).

Az acilezett FB1-származékok humán egészségügyi aggályaira hívta fel a figyelmet az a tanulmány, mely bizonyította, hogy az alapanyagként csak FB1 toxint tartalmazó kukorica alkalikus közegben történő hőkezelésével készült tortilla már tartalmazott acilezett FB1 toxinokat – *N*-linoleoil-FB1, *N*-palmitoil-FB1, *N*-oleoil-FB1, *N*-sztearil-FB1 – is (Park et al., 2013).

Pár évvel később az EFSA két közleményben hívta fel a figyelmet az acilezett FB1-származékok jelentőségére (Knutsen et al., 2018a; Knutsen et al., 2018b). A tanulmányokban kiemelik, hogy bővebben kell vizsgálni ezen anyagok előfordulását és toxicitását, valamint felhívja a figyelmet arra is, hogy referenciaanyag még nem áll rendelkezésre ezen toxinokból.

3.7 A fumonizinek egészségügyi határ- és irányértékei

Az élelmiszerekben esetlegesen előforduló egyes szennyezőanyagok (köztük a mikotoxinok) határértékét az Európai Bizottság (EU) 2023/915 számú rendelete szabályozza. A fumonizinek esetében jelenleg a két, általában legnagyobb mennyiségben előforduló fumonizin (FB1 és FB2 toxin) együttes mennyiségére vonatkozóan léteznek határértékek (3. táblázat). A legalacsonyabb határértékeket – a többi mikotoxin határértékeihez hasonlóan – a csecsemők és kisgyermekek számára készült élelmiszerekkel és bébiételekkel kapcsolatban állapították meg (200 µg/kg élelmiszer).

3. táblázat Az élelmiszerekben előforduló fumonizinek felső határértékei (EU 2023/915)

FUMONIZINEK	FB₁ és FB₂ összege (µg/kg)
Feldolgozatlan szemes kukorica	4000
A végső fogyasztók számára forgalomba hozott kukorica, a végső fogyasztók számára forgalomba hozott, kukorica őrléséből származó termékek, a végső fogyasztók számára forgalomba hozott kukoricaalapú élelmiszerek, kivéve a kukoricaalapú reggeli gabonapelyhek és kukoricaalapú „snack” termékek, valamint a kukoricát tartalmazó bébiételek, illetve csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek.	1000
Kukoricaalapú reggeli gabonapelyhek és kukoricaalapú „snack” termékek	800
Nem a végső fogyasztók számára forgalomba hozott kukoricaliszt	2000
Egyéb, kukorica őrléséből származó, nem a végső fogyasztók számára forgalomba hozott termékek	1400
Kukoricát tartalmazó bébiételek, illetve csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek	200

Míg az Európai Bizottság az élelmiszerekben előfordulható fumonizinek (B1 és B2) esetén szigorúan betartandó határértéket ír elő, addig a takarmányozásra szánt termékek esetén nem szab meg határértékeket, csupán ajánlásokat fogalmaz meg, melyek a 2006/576/EK számú rendeletben kerültek rögzítésre (4. táblázat). A Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok Osztálya az Európai Bizottság 2006/576/EK számú rendeletét is figyelembe véve alkotta meg javaslatát keveréktakarmányok maximális mikotoxin koncentrációjára vonatkozóan.

4. táblázat Az EU bizottsági ajánlása (2006/576/EK) a takarmányok fumonizin B1+B2 szennyezettségével kapcsolatban

FUMONIZINEK	FB1 és FB2 összege Irányérték $\mu\text{g}/\text{kg}^*$ -ban, 12%-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan
<i>Takarmány-alapanyagok</i>	
— kukoricafélék és kukoricakészítmények	60000
<i>Az alábbiaknak szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok:</i>	
— sertések, lovak (<i>lófélék</i>), nyulak, kedvtelésből tartott állatok	5000
— halak	10000
— baromfi, borjak (< 4 hónap), bárányok és gidák	20000
— felnőtt kérődzők (> 4 hónap) és vidra	50000

* A rendeletben mg/kg mennyiségre vonatkoztatva szerepelnek az irányértékek. Dolgozatomban a könnyebb összehasonlítás érdekében a $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ra átszámított értékeket tüntettem fel.

Fontos megjegyezni, hogy sem az acilezett, sem egyéb fumonizin-származékokra jelenleg nem létezik határérték.

3.8 A mikotoxinokra vonatkozó mintavételi előírások, valamint a fumonizinek kvalitatív és kvantitatív meghatározási módszerei

A megfelelő módon végrehajtott mintavételezés létfontosságú mind a hatósági, mind a kutatási jellegű mérések esetén, mivel a mintának reprezentatívnak és homogénnek kell lennie ahhoz, hogy megfelelő képet adjon az adott tételről. A mikotoxin-tartalom hatósági ellenőrzésénél is alkalmazandó mintavételi eljárásokat az 50 tonna feletti és alatti tételek szerint a 401/2006/EK rendelet szabályozza. A mikotoxin-tartalom meghatározásához a mintavételezés történhet szilárd vagy folyékony halmazállapotú mintából. Utóbbi esetében a homogenitás a mikotoxinok oldott állapota miatt nem szokott problémát okozni.

A szilárd halmazállapotú minták fumonizin-tartalmának analitikai vizsgálata előtt fizikai és kémiai módszerekkel történő feltárást alkalmaznak, emellett a kivonatok tisztítására is szükség lehet. A minták magas nedvességtartalma esetén az őrlemény előállítását megelőzően szárítási lépést szoktak beiktatni, amely történhet pl. ipari méretekben a silókban alkalmazott levegőáramoltatással, vagy laboratóriumi méretekben szárítószekrényben történő szárítással és liofilizálással. A fizikai előkészítés során fontos, hogy a mintákból homogén, megfelelő szemcseméretű őrleményt állítsanak elő, mivel ezen tényezők nagymértékben befolyásolják a későbbi extrakció hatékonyságát. A laboratóriumi vizsgálat előtt az aprítást leggyakrabban kalapácsos- vagy tárcsás őrlőkészülék, esetleg golyósmalom felhasználásával végzik, de kismennyiségű minta esetén a közönséges kávédaráló is eredményesen alkalmazható. Természetesen a minták esetleges átszennyeződésének elkerülése érdekében az egyes minták őrlése között az őrlőberendezéseket ki kell tisztítani.

A minták kémiai előkészítésének első lépése az őrlemények oldószeres extrakciója. A fumonizineket leggyakrabban MeCN/H₂O vagy MeOH/H₂O elegyével vonják ki az őrleményekből. A MeCN/H₂O esetében az 50/50 (v/v), míg a MeOH/H₂O esetében a 75/25 (v/v) arányú elegyeket találták a legmegfelelőbbnek (Zöllner & Mayer-Helm, 2006). Az extrakció hatékonyságát vízszintes (horizontális rázó gép) vagy függőleges (átfordulós rázó gép) rázással és késes homogenizátor alkalmazásával lehet növelni. A mikotoxinok őrleményekből történő kioldását ultrahangos kezeléssel (2-10 min) is segíteni lehet. Az extrakciót követően szűrőpapíron és/vagy membránszűrőn történő átszűréssel állítják elő a további tisztításhoz vagy a direkt analitikai vizsgálathoz szükséges fizikai szennyezéstől mentes szűrletet. A direkt analitikai vizsgálat azt jelenti, hogy a mikotoxinok vizsgálatában a legkorszerűbbnek számító gyors módszerek (pl. ELISA) és az ún. nagyműszeres eljárások (pl. HPLC/MS) jelentős részénél nem szükséges a szűrletek további kémiai tisztítása.

A HPLC oszlopra történő mintafelvitel előtt, különösen akkor, ha az elválasztás után nem MS detektálás történik (pl. UV, vagy fluoreszcenciás detektálás esetén), a detektálást zavaró mátrix komponenseket el kell távolítani a kivonatokból. Ezt a feladatot fordított fázisú C18-as, anioncserélő (SAX, Amberlite XAD-4, Dowex-1), vagy immunoaffinitáson alapuló (IAC) ún. szilárdfázisú extrakciós (SPE) oszlopokon történő tisztítással oldják meg (Zöllner & Mayer-Helm, 2006). A tisztítási folyamat költségei szempontjából fontos tényező, hogy pl. kukorica-kivonatok

tisztítása után a SAX oszlopok négy (Abramović et al., 2005), míg az IAC oszlopok két (Fazekas et al., 2000) alkalommal bizonyítottan regenerálhatóak.

A mikotoxinok, így a fumonizinek analitikájában is alkalmaznak ún. gyors módszereket és elválasztástechnikán alapuló eljárásokat is. A gyors módszerek jelentős része immunoaffinitáson (antigén-antitest reakción) alapuló analitikai eljárás, amely reakcióhoz poliklonális vagy monoklonális antitesteket használnak fel. Az antitestek állatok vérében történő termeléséhez a megfelelő antigént az állatokba oltják. A vérből tisztított poliklonális antitestek a bejuttatott antigén különböző funkciós csoportjaival reagálni képes antitestek keverékét tartalmazza. A monoklonális antitesteket az immunizált egér lépéből kinyert B-nyiroksejtek és az egér csontvelő-daganatból származó sejtek fúziójával létrehozott hibrid sejtekkel termeltetik. Egy hibrid sejt csak egyféle antitestet tud termelni, amely a mikotoxin molekulának csak egy adott csoportjához tud kötődni. Az immunkémiai meghatározáshoz leggyakrabban az ún. kompetitív ELISA eljárást alkalmazzák. Az antigén-antitest reakció szilárd hordozó felületén játszódik le, mely során a mintában lévő, meghatározni kívánt szabad antigén a jelzett antigénnel versenyben van az antitest korlátozott számú kötőhelyeiért. A kompetitív reakciót követően a nem kötődött reagenseket mosással eltávolítják, majd a megkötődött jelzett antigént fotometriásan mérik (Barna-Vetró & Solti, 2001). Az ELISA eljárás előnyei közé tartozik az, hogy nem igényel bonyolult tisztítási lépést, drága műszereket vagy szakképzett személyzetet, ugyanakkor gyorsan, nagyszámú mintát lehet vele rutinszerűen analizálni. Ezen előnyei miatt különösen az élelmiszerlánc elején, a gabona átvevő- és tárolóhelyeken valamint a malmokban a belső minőségellenőrzési rendszer (HACCP) részeként egyre gyakrabban alkalmazzák. Magyarországon is kifejlesztettek már olyan monoklonális antitestet alkalmazó ELISA rendszert, amelynek mérési tartománya gabonafélékben a FB1 toxinra 10-500 ng/g közé esik, a detektálási határ pedig 7,6 ng/g (Barna-Vetró et al., 1999, 2000; Barna-Vetró & Solti, 2001).

A fumonizinek elválasztástechnikai eljárásokon alapuló minőségi és mennyiségi meghatározásának módszerei között meg kell említeni a síkrendszerű és az oszloprendszerű eljárásokat. A síkrendszerű eljárások között említendő a vékonyréteg kromatográfia (TLC, Gelderblom et al., 1988; Nelson et al., 1993) és a magyar kutatók által kifejlesztett túlnyomásos rétegekromatográfia (OPLC) (Tyihák et al., 1979). A TLC-t első alkalommal a fumonizinek felfedezésekor Gelderblom et al. (1988)

használták fumonizinek meghatározására. Réteglapként fordított fázisú (C18) szilikagéllapot, és a mintafelvétel utáni futtatáshoz metanol/víz elegyet (75/25, v/v) alkalmaztak. A kifejlesztések után a réteglapokat származékképző reagens (ninhidrin vagy p-ánizsaldehid) oldatával fűjték le a fumonizinek láthatóvá tétele céljából (a fumonizinek nem tartalmazzak kromofór csoportot). Mindkét sík elrendezésű eljárás előnye, hogy egyszerre több minta is futtatható a réteglapokon. Az OPLC jelentős előnye viszont a TLC-hez képest az, hogy mivel az OPLC elválasztás zárt térben, nyomás alatt történik, lényegesen kisebb a komponenssavok kiszélesedése, mely alkalmassá teszi sokkomponensű mintaelegyek gyors elválasztására. A síkrendszerű elválasztási eljárások jelentős hátránya ugyanakkor az, hogy a réteglapokon elvált komponensek leggyakrabban csak ún. „off-line” módszerrel (általában denzitométerrel) detektálhatóak. Az OPLC esetében, mivel zárt térben történik a minta komponenseinek az elválasztása, már megoldották az „on-line” detektálást is, amikor a réteglapról eluálódó vegyületek egy kapillárison keresztül jutnak az UV detektorba (Mincsovcics et al., 1986, 1988) vagy a tömegspektrométerbe (OPLC/MS, Chai et al., 2003). Sőt, az OPLC kamrát összekötötték már egyszerre két detektorral (OPLC/UV/MS) is. Az elválasztás után UV és MS jelet is kaptak a réteglapon elvált komponensekről, mivel a réteglapról eluálódó komponensek egy kapillárison keresztül először az UV cellába, majd a cellából kivezető kapillárison keresztül a tömegspektrométer ionforrásába jutottak (Mincsovcics et al., 2008). Az OPLC eljárást sikeresen alkalmazták már *Fusarium*-izolátumok rizstenyészetben történő fumonizin B1-4 termelőképességének vizsgálatára is (Kátay et al., 2001), ahol a fluoreszkaminos származékképzést követően a detektálási határ a négy fumonizinre 7,3-11,9 ng/sáv volt.

Az oszloprendszerű eljárások közül a gázkromatográfiát (GC) (Pestka et al., 1994), a kapilláris elektroforézist (CE), a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) és az ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (UPLC) (Ren et al., 2011) alkalmazták már a fumonizinek mintakivonatokból történő elválasztására. Mindhárom eljárás összeköthető tömegspektrometriával is (GC/MS, CE/MS, HPLC/MS, UPLC/MS), amely ún. kapcsolt módszerek jelentik ma a bioanalitikai módszerek csúcsát.

A CE eljárást már a 90-es évek közepén több kutató alkalmazta a fumonizinek mennyiségi és minőségi meghatározására, azonban nem terjedt el (elsősorban bonyolultsága miatt) széles körben. Hines et al. (1995) a CE elválasztást

elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt tömegspektrométerrel kombinálták és kukoricamintákban 10/1 jel/zaj-viszony mellett 156 ng/g detektálási határt értek el.

Az oszloprendszerű kromatográfiai eljárások közül ma leggyakrabban a HPLC eljárást alkalmazzák a fumonizinek meghatározása során (Zöllner & Mayer-Helm, 2006). Azonban a fumonizinek TLC és OPLC meghatározásához hasonlóan, a hagyományos HPLC detektorok (pl. UV és fluoreszcens) alkalmazása esetén is származékképzési reakciót szükséges alkalmazni a fumonizinek detektálhatósága céljából. A legerjedtebben az aminosavak származékképzése során már jól bevált o-ftáldialdehid reagenst (2-merkaptóetanol jelenlétében és a borát puffer által biztosított lúgos pH érték mellett) és a 9-fluorenil-metil-kloroformátot (szintén lúgos körülmények között) alkalmazzák a fumonizinek primer amino-csoportjai ún. oszlop előtti származékképzéséhez (Shephard, 1998; Holcomb et al., 1993).

Az ún. egyetemes fényszórási detektorral (ELSD) a fumonizinek származékképzés nélküli is kimutathatók, amely detektálási eljárást először Wilkes et al. (1995) alkalmazták fumonizinek meghatározására. A HPLC/ELSD módszerrel Wang et al. (2008) injektálásként 60 ng FB1 toxint, illetve kukoricaalapú termékekben 0,25-3,13 µg/g fumonizin-szennyezést tudtak kimutatni.

A jelentős áttörést a fumonizinek minőségi és mennyiségi analízisében, továbbá az új fumonizinek azonosításában is az atmoszférikus nyomású elektroporlasztásos ionforrással (ESI) ellátott tömegspektrométerek (ESI-MS) 1980-as évek végén történő bevezetése jelentette (Zöllner & Mayer-Helm, 2006). Mivel a tömegspektrométerek csak gázfázisú és töltéssel rendelkező molekulákat, illetve fragmenseket tudnak vizsgálni, az ESI ionforrás legfontosabb feladata a fumonizinek vizsgálata során az, hogy az oldószerrel együtt eluálódó komponensek mellől eltávolítsa az oldószert és így az ionforrásban gázfázisba juttassa át a mérendő molekulákat (pozitív és negatív töltésű ionokat). Az ESI-MS esetében igen fontos, hogy az ionforrásba már töltéssel rendelkező molekulákat kell bejuttatni, amelyet leggyakrabban úgy érnek el, hogy megfelelő pH értéket biztosítanak a HPLC eluensben. A fumonizinek HPLC/ESI-MS vizsgálata során ezt úgy oldják meg, hogy valamilyen illékony szerves savat, leggyakrabban hangyasavat (HCOOH) adagolnak alacsony koncentrációban (0,05-0,1%, v/v) a HPLC oldószerhez a fumonizinek primer amino-csoportjainak protonálásához. Pozitív ion módban a fumonizinek tömegspektrumában a molekulaionok ($[M+H]^+$) mellett igen gyakran megfigyelhetők a nátrium ($[M+Na]^+$) és kálium ($[M+K]^+$) addukciók is (Zöllner & Mayer-Helm,

2006). Mivel a fumonizinek TCA oldalláncai 2-2 karboxil-csoportot is tartalmaznak, ezek a vegyületek negatív ion módban is mérhetőek, azonban Doerge et al. (1994) azt találták, hogy a primer amino-csoportot tartalmazó fumonizinek (pl. FB1 toxin) 3-szor nagyobb jelet adnak pozitív ion módban, mint negatívban.

A tömegspektrométer-gyártó cégek különféle tömeganalizátorral (pl. kvadrupol, ioncsapda, repülési idő, mágneses) felszerelt és ezek kombinálásával kialakított ún. tandem tömegspektrométereket (MSMS) is forgalmazznak. A rutin fumonizin-analitikában leggyakrabban a kvadrupol és a hármas kvadrupol MSMS készülékeket alkalmazzák ár/érték arányuk, üzemeltetési költségeik és tömeganalizátoruk lineáris dinamikus tartománya miatt, amely a hármas kvadrupol tömegspektrométerek esetében az öt nagyságrendet is elérheti. Hármas kvadrupol tömegspektrométert alkalmazva Sorensen & Elbaek (2005) tejből 0,09 és 0,04 µg/l FB1 és FB2 toxint is ki tudtak mutatni. Churchwell et al. (1997) vizsgálataik során kvadrupol MS készülékkel rágcsáló csalátokban alacsony µg/kg tartományban tudtak fumonizineket (FB1-3) kimutatni.

3.9 A humán szérumalbumin jellemzése

A szérumalbumin számos xenobiotikummal nagy affinitású komplexet képez, ezen molekulák főként albuminhoz kötött formában jelennek meg a keringésben (Fanali et al., 2012). Az albumin általi részleges visszatartás a megkötött anyagok szövetek általi lassabb felvételét és/vagy eliminációját eredményezheti, mely befolyásolja farmakokinetikai/toxikokinetikai tulajdonságaikat (Yamasaki et al., 2013). A zsírsavak a humán szérumalbumin (HSA) nagy affinitású ligandumai. A szérumalbumin legfeljebb kilenc ekvivalens hosszúságú zsírsavat képes megkötni. A kötőhelyeket a zsírsav szó angol megfelelőjéből („fatty acid”) képzett FA1-FA9 néven azonosítják (Fanali et al., 2012). A humán szérumalbuminon három gyógyszerkötő hely található, nevezetesen a Sudlow-féle osztályozás szerinti I-es (Site I) (FA7) és II-es zseb (Site II) (FA3-FA4), valamint az ún. hem-zseb (heme pocket) (FA1).

3.10 A zebradánió mint toxikológiai modellállat

A zebradánió embriója egy széles körben használt gerinces modell különböző xenobiotikumok (Kim et al., 2020; de Esch et al., 2012; Rubinstein et al., 2006), például mikotoxinok (Juan-García et al., 2020) fejlődésre gyakorolt toxicitásának tanulmányozására. A mesterségesen megtermékenyített embriók átlátszó ikrahéjon

keresztüli vizuális vizsgálata viszonylag egyszerű feladat, ezért jól alkalmazhatóak a xenobiotikumok okozta toxicitás, mortalitás, valamint a különböző lárvaállapotokban jelentkező fejlődési abnormalitások értékelésében (Scholz et al., 2008; Weigt et al., 2011). Emellett a zebradánió embriogenezise nagy hasonlóságot mutat a magasabbrendű gerincesekével (Selderslaghs et al., 2009). Korábban végeztek kísérleteket zebradánió embriókon, a FB1 toxin zearalenonnal (Yang et al., 2021), illetve aflatoxin B1 toxinnal (Di Paola, 2022) alkotott keverékében, mely során enzimindukciót és fokozott oxidatív stresszt írtak le. Emellett az aflatoxin B1 és a FB1 toxin keveréke jelentős növekedési teljesítmény csökkenést okozott afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) modellben (Thomas et al., 2018).

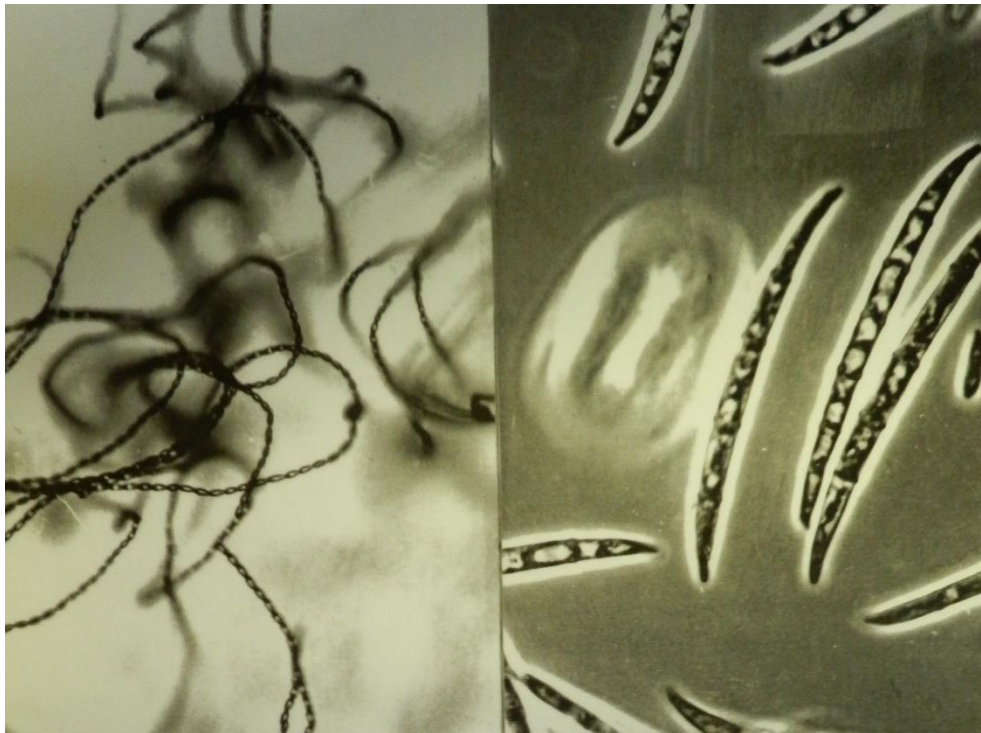
4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Felhasznált vegyszerek

A kísérletekhez felhasznált HPLC minőségű H₂O, MeOH, MeCN, valamint a HCOOH és a palmitoil-klorid (Alfa Aesar) a VWR International Kft-től (Debrecen) került beszerzésre. A PDA-táptalaj összetevőit, illetve a THF-t és TEA-t a Sigma-Aldrich Kft-től szereztük be (Merck, Budapest).

4.2 A *Fusarium verticillioides* izolátum begyűjtése és azonosítása

A FB1 toxin *in vitro* termeltetéséhez a kukoricaszemekről izolált és PDA táptalajon Szécsi & Mesterházy (1998) módszerével laboratóriumi körülmények között azonosított Fumizol 977/13-as törzsszámú izolátumot használtuk. A fajsztípus azonosítás a makro- és mikrokonídiumok mikroszkópos képe alapján Booth (1971), Nelson et al. (1983) és Leslie et al. (2006) módszere szerint történt. A 7. ábrán a *F. verticillioides*-re jellemző mikro- és makrokonídiumok láthatóak.



7. ábra A *F. verticillioides* mikro- és makrokonídiumai (Prof. Szécsi Árpád felvétele)

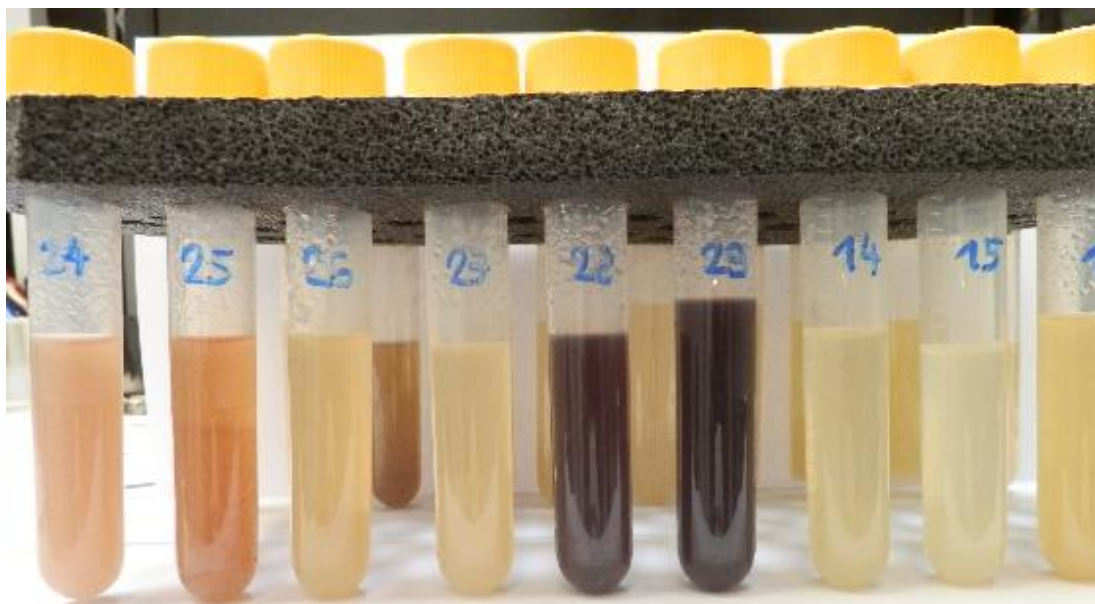
A monospóra-eredetű izolátumok tárolása kémcsövekben, ¼ erősségű ferde PDA táptalajon, 15 °C hőmérsékleten sötétben történt.

4.3 A FB1 toxin termeltetése szilárdfázisú fermentációval

A FB1 toxint ún. szilárdfázisú fermentációval termeltettük, rizs szubsztrát felhasználásával. A rizs tápközeg sterilizálása a következőképpen történt: a 300 ml-es Erlenmeyer-lombikokba mért 50 g rizs és 50 g ioncserélt víz 12 órán keresztül szobahőmérsékleten állt, majd a rizs által fel nem szívott vízmennyiség leöntése után 121 °C-os hőmérsékleten autoklávoztuk a lombikokat, melyet másnap megismételtünk. A sterilizált tápközegek kihűlését követően Fumizol 977/13-as törzsszámú izolátum 5 ml-es konídium szuszpenzióival beoltottuk azokat. A konídium-szuszenzió előállítására ferde PDA táptalaj steril vízzel történő mosásával és négyrétegű steril gézen való átmosásával valósult meg. A steril szűrletben körülbelül 10^4 konídium volt milliliterenként, melyet Bürker-kamrával határoztunk meg. A rizstenyészetek inkubálása négy hétig 28 °C-on sötétben történt. A 4. hét végén a tenyészeteket a lombikokból eltávolítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk. Ezt követően a liofilizált tenyészeteket elszívó fülke alatt kávédarálón finom porrá őröltük. Az őrleményeket az extrakcióig fagyasztoóban (-20 °C) tároltuk.

4.4 A FB1 toxin kinyerése a mintákból

A rizstenyészet-őrleményeket 100 g-os adagokban (összesen 200 g) 400 ml MeOH/H₂O 75/25 (v/v) elegyével turmixgépben 4x1 percig, majd 50 ml-es PP centrifugacsövekbe áttöltve átfordulós rázógéppel 60 fordulat/perc sebességgel egy órán keresztül extraháltuk. Ezután a kivonatokat 10 percig centrifugáltuk Heraeus X1R típusú centrifugával, 10000-es fordulatszámmon. A centrifugálás következtében kialakuló üledékeket újfent extraháltuk, centrifugacsövenként 30 ml tiszta extrahálószerrel. A két extrakció során kapott felülúszókat összeöntöttük, majd redős szűrőpapíron, illetve PTFE membránszűrőn (0,45 µm) szűrtük át. Az így kapott szűrletet használtuk fel a FB1 toxin kinyeréséhez (8. ábra).



8. ábra A szárított rizstenyészetek örleményeiből készített kivonatok

4.5 A FB1 toxin tisztítása a kivonatokból

Az anionos komponensek (pl. FB1 toxin) kinyerése céljából a membránszűrt kivonatot először SPE eljárással, üveg SPE-kád felhasználásával erős anioncserélő (SAX) oszlopon tisztítottuk meg. A SAX-tisztításhoz 20 g-os tölteteket használtunk, melyeket a mintafelvitelt megelőzően 60 ml MeOH-val, majd 100 ml MeOH/H₂O 60/40 (v/v) elegyével mostuk át. A vízzel hígított (MeOH/H₂O 60/40 (v/v) értékre) mintát lassan (20 csepp/perc sebességgel) szívattuk át az oszlopon. Az ún. mátrix komponenseket, melyek nem kötődnek meg a SAX oszlop felületén, 120 ml MeOH/H₂O 60/40 (v/v) elegyével, majd 180 ml MeOH-val mostuk le az oszlopról. Végül a mintafelvitelkor az oszlopon megkötődött anionos tulajdonságú vegyületeket, így a FB1 toxint is, 400 ml MeOH/HCOOH 98/2 (v/v) elegyével eluáltuk az oszlopról. Az így kapott eluátumot centrifugális bepárlóval szárazra pároltuk. A FB1 toxint tartalmazó kivonatot MeCN/H₂O 50/50 (v/v) elegyével visszaoldottuk, majd 150 g-os C18 típusú tölteten H₂O + 0,1% HCOOH és MeCN + 0,1% HCOOH gradiensek felhasználásával tisztítottuk tovább, CombiFlash Rf 200 típusú flash kromatográfot alkalmazva. A fumonizinek – a P típusú analógok kivételével – nem tartalmaznak ún. kromofór csoportokat, vagyis a flash kromatográf UV detektorának jelével nem lehet szabályozni a C18-as „flash” oszlopról eluálódó frakciók csúcsokra történő szedését.

Ezért a frakciókat 40 ml-enként folyamatosan gyűjtöttük a műszer automata frakciószedőjével. Az egyes frakciókból 700 µl-nyi mennyiséget a HPLC készülék automata mintaadagolójának fioláiba pipettáztuk. A frakciók fumonizin-tartalmát „off-line”, vagyis közvetett detektálási módszerrel határoztuk meg.

4.6 Az izolált FB1 toxin tisztaságának meghatározása

A „flash” kromatográfról eluálódó frakciókat ún. off-line detektálási módszerrel a HPLC/ESI-MS készülékkel vizsgáltuk tovább. Az Agilent 1100 típusú HPLC rendszer vákuumos oldószer-gáztalanítót, kvaterner oldószerpumpát és oszloptermosztátot tartalmazott. A HPLC oszlopról eluálódó komponenseket ESI-ionforrással ellátott Agilent 1946A típusú tömegspektrométerrel detektáltuk pozitív ion módban. A frakciókban lévő komponenseket Phenomenex (Torrance, CA, USA) Kinetex C18-as 50x4,6 mm, 2,6 µm típusú HPLC oszloppal választottuk el. A HPLC oszlop elé 4x3 mm-es C18-as előtét oszlopot csatlakoztattunk. Az oszloptermosztát hőmérséklete 40 °C volt. A HPLC elválasztáshoz „A” (H₂O + 0,1% HCOOH) és „B” (MeCN + 0,1% HCOOH) oldószerek gradiensét (0 percnél 24% B, 8 percnél 100% B, 12 percnél 100% B, 14 percnél 24% B) használtuk 0,8 ml/perc áramlási sebességgel. Az injektált mintatérfogat 0,2 µl volt. A pásztázó üzemmódban működtetett tömegspektrométer mérési paraméterei a következők voltak: porlasztógáz (N₂) nyomása 35 psi; szárítógáz (N₂) sebessége 12 l/perc, hőmérséklete 350 °C; ionforrás feszültség 3000 V; iontranszfer-kapilláris feszültsége 3500 V; fragmentor-feszültség 70 V.

4.7 Vízmentes THF előállítása

Vékony, megtisztított felületű nátriumdarabkákat (10 g) és benzofenont (2 g) adtunk 900-1000 ml THF-hez egy 2 literes, mágnesrúddal ellátott gömblombikban. A lombikot kétszer átöblítettük argonnal. A keverék sötétkék színűvé vált, mely színváltozás általában azonnal megtörténik. A kapott elegyet kevertük és 2 órán át ún. visszafolyató hűtő alatt forraltuk. A frissen desztillált és összegyűjtött THF-et felhasználásig 0,3 nm-es (3 Å) molekulaszitán tartottuk.

4.8 A FB1 toxin acilezése

Az *N*-palmitoil-FB1 toxin szintetikus előállításához a tiszta FB1 toxint palmitoil-kloriddal acileztük TEA jelenlétében. Az „A” reagenst (THF/TEA 95/5, v/v)

és a „B” reagenst (THF/palmitoil-klorid 95/5, v/v) közvetlenül a reakciót megelőzően készítettük el. 1 mg FB1 toxint feloldottunk 500 µl vízmentes THF-ben, és összekevertük 10,2 µl „A” reagenssel. Az acilezési reakciót 4,7 µl „B” reagens hozzáadásával indítottuk el, majd szobahőmérsékleten 30 percig rázattuk. A reakcióelegyet centrifugális bepárlással szárazra pároltuk és –20 °C-on tároltuk.

A FB1 toxin *O*-acilezését szintén palmitoil-kloriddal végeztük 2% víz jelenlétében THF-ben. Az „A” reagens (THF/TEA 90/10, v/v) és a „B” reagens (THF/palmitoil-klorid 80/20, v/v) ugyanazokat az ágenseket tartalmazta, mint az *N*-acilezési reakcióban, azonban magasabb koncentrációban. Az optimalizálás után a FB1 toxin *O*-acilezése a következő körülmények között zajlott: 1 mg FB1 toxint 490 µl THF-ben oldottunk, 10 µl vízzel összekevertük, majd 10 µl „A” reagenst és 21 µl „B” reagenst pipettáztunk a reakcióelegyhez, és 48 órán át szobahőmérsékleten rázattuk. A reakciót centrifugális bepárlással állítottuk le, és a szárított reakcióelegyet –20 °C-on tároltuk az elemzésig.

4.9 Az acilezési reakció nyomonkövetése

A reakcióelegyekből vett mintákat tízszeres MeCN-nel történő hígítás után egy elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt Agilent 1946D tömegspektrométerhez csatlakoztatott Agilent 1100 nagy teljesítményű folyadékkromatográf segítségével (Santa Clara, CA, USA) elemeztük. A tömegspektrométer pozitív ion üzemmódban működött. A HPLC rendszer egy vákuumos gáztalanítóból (degasser), egy bináris pumpából, egy well-plate mintaadagolóból és egy oszloptermosztátból állt. A gradiens elválasztást Kinetex C18-as analitikai oszlopon (50 × 3 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) végeztük. Az oszlopot 40 °C-ra termosztáltuk. A komponensek elválasztására gradiens elúciót alkalmaztunk. Mind az „A” oldószer (H₂O), mind a „B” oldószer (MeCN) 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazott. Az áramlási sebességet 800 µl/perc értékre állítottuk be. A gradiens 24% „B” oldószerrel indult, melyet 8 perc alatt lineárisan 100%-ra növeltünk, ezen az értéken tartottuk 5 percig, majd 2 perc múlva visszaállítottuk a kiindulási értékre, melyet 4 percen át tartó ekvilibrálás követett. Az analízist 1 µl minta befecskendezésével kezdtük. A tömegspektrométert a következő paraméterekkel üzemeltettük: porlasztógáz (N₂) nyomása 50 psi; szárítógáz (N₂) áramlási sebessége 12 l/min, hőmérséklete 350 °C; kapilláris feszültség 3000 V. Az MS adatokat „full-scan” módban gyűjtöttük, *m/z* 700–1050 tartományban; erősítés 1.

4.10 Az acilezett FB1-származékok tisztítása

A bepárolt reakcióelegyet MeCN/H₂O (80/20, v/v) elegyben ultrahangos kezeléssel (10 perc) oldottuk, majd 0,45 µm pórusméretű nylon fecskendőszűrőn szűrtük. A reakciótermékek preparatív HPLC tisztítását két Hanbon (Jiangsu, Kína) NP7000 típusú preparatív szivattyú, egy HTA (Brescia, Olaszország) HT300LV típusú preparatív injektor és egy Foxy R1 típusú (Teledyne Isco, St. Lincoln, NE, USA) frakciógyűjtő segítségével végeztük. A gradiens elválasztást szobahőmérsékleten Kinetex Axia típusú C18-as preparatív oszlopon (250 × 21,2 mm, 5 µm) (Phenomenex) hajtottuk végre. Az injektálás térfogata 2 ml volt, 10 ml-es mintahurokkal. Mind az „A” oldószer (H₂O), mind a „B” oldószer (MeCN) 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazott. A gradiens 50% „B”-vel indult, melyet 0,6 perc alatt 17 ml/perc áramlási sebesség mellett lineárisan 65% „B”-re növeltünk, majd ezt az értéket 11,4 percig tartottuk, végül lineárisan 1 perc alatt 85% „B”-re növeltük, mely értéket 12 percig tartottuk. Az oszlopot ezután a kiindulási oldószerrel (50% „B”) 6 perc alatt ekvilibráltuk. A frakciószedő minden percben frakciókat vett, melyeket off-line HPLC/MS-sel elemeztük, a megfelelő frakciókat összeöntöttük, majd az egyesített frakciókat szárazra pároltuk/liofilizáltuk, és felhasználásig argon alatt -20 °C-on tároltuk.

4.11 A tisztított komponensek szerkezeti azonosítása

A szerkezet azonosítására irányuló NMR-kísérleteket (1D ¹H, 2D ¹H-¹³C HSQC-CLIP-COSY és 2D ¹H-¹³C HMBC) egy Prodigy TCI cryoprobe mérőfejjel felszerelt Bruker Avance Neo 700 MHz-es NMR spektrométeren végeztük. 5 mg 3-*O*-palmitoil-FB1-et 550 µl-es D₂O/CD₃CN (20/80, v/v) elegyben oldottuk, míg az 5-*O*-palmitoil-FB1 (2,78 mg) és az *N*-palmitoil-FB1 (3,04 mg) esetén 550 µl DMSO-d₆-ot használtunk oldószereként. A hőmérsékletet 25 °C-ra állítottuk, és a kémiai eltolódásokat a maradék oldószerjelekre vonatkoztattuk ($\delta_{1H,DMSO}=2,50$ ppm, $\delta_{13C,DMSO}=39,7$ ppm; $\delta_{1H,CD3CN}=1,93$ ppm, $\delta_{13C,CD3CN}=1,3$ ppm). A 2D HSQC-CLIP-COSY adatokat az 512 lépés mindegyikénél 48 szkenneléssel értük el. Az érzékenység növelése érdekében adiabatikus ¹³C inverziós pulzusokat alkalmaztunk. A 2D HMBC kísérleteket 48 szkenneléssel végeztük, amelyek 2048 × 512 adatpont méretű adatmátrixokat vettek fel. A spektrumokat a TopSpin 3.0 szoftverrel dolgoztuk fel és értékeltük ki.

4.12 A tisztított komponensek nagy felbontású tömegspektrométerrel (HRMS) történő vizsgálata

A HPLC/HRMS méréseket Dionex Ultimate 3000 UHPLC rendszerrel (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük, egy fűtött elektroporlasztásos ionforrással (HESI) felszerelt Q Exactive Plus hibrid kvadrupól-orbitrap tömegspektrométerhez (ThermoFisher Scientific) csatlakoztatva. A tisztított komponensek (100 ng/μl) elválasztását Kinetex C18-as HPLC oszlopon (250 × 4,6 mm, 5 μm) (Phenomenex), bináris gradiens alkalmazásával, 800 μl/perc áramlási sebesség mellett hajtottuk végre. Az elválasztáshoz „A” (H₂O + 0,1% HCOOH) és „B” (MeCN + 0,1% HCOOH) oldószerek gradiensét használtuk fel. A komponensek elválasztásához először izokratikus elúciót (65% „B” 9 percig), ezt követően pedig lineáris gradienst alkalmaztunk (65% „B”-ről 85%-ra növeltük 1 perc alatt, majd utóbbi értéken tartottuk 6 percig). Az oszlopot a következő injektálás előtt 6 percig újra ekvibráltuk a kezdeti oldószer-összetétellel. A mintákat pozitív és negatív ion üzemmódban is mértük a tömegspektrométer alábbi paramétereivel: kapilláris hőmérséklet: 380 °C; porlasztó feszültsége: 3,5 kV; segéd fűtőgáz (N₂) hőmérséklete: 400 °C; S-lencse RF értéke: 50,0; készülékre jellemző áramlási értékek: köpenygáz áramlás 65; segédgáz áramlás 20. A full-scan MS-spektrumokat 70000-es felbontás mellett 100 ms maximális befecskendezési idővel és $1,00 \times 10^6$ minimális automatikus erősítésszabályozási céllal vettük fel. Az MS/MS méréseket 17500-as felbontással, $1,00 \times 10^5$ minimális automatikus erősítésszabályozási céllal és 25 normalizált ütközési energiával (NCE) végeztük. A HPLC/HRMS adatokat Trace Finder 4.0 szoftverrel szereztük be. A nyers MS adatfájlokat Thermo Xcalibur 4.0 szoftverrel dolgoztuk fel.

4.13 Az extrahált rizskultúra-minta adalékolási kísérlete az azonosított acilezett FB1-származékokkal

Az adalékolási kísérlethez *F. verticillioides*-szel oltott 4 hetes rizskultúrát használtunk liofilizálást és porrá őrlést követően, Bartók (2006) módszere alapján. 1 g porrá őrölt tenyészetet 20 ml MeCN/H₂O (80/20, v/v) keverékével extraháltuk egy 30 ml-es centrifugacsőben átfordulás rázógéppel 2 órán át, majd 8000 fordulat/perc sebességgel 5 percen át centrifugáltuk. A felülúszót egy HPLC automata mintaadagoló fiolába pipettáztuk. A tisztított és NMR-rel azonosított acilezett FB1 toxinokat (3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1) külön fiolákba helyeztük (500 pg/μl MeCN/H₂O 80/20, v/v), majd 1 μl-t használtunk a tenyészet kivonatának egyenkénti adalékolására a HPLC

készülék mintaadagolója segítségével. A mintákat a fent említett módszerrel (ld. 4.9 fejezet) elemeztük, az alábbi módosításokkal: a gradiens HPLC elválasztást Kinetex C18-as analitikai oszlopon (250 × 4,6 mm, 5 μm) 30 °C-on végeztük. A gradiens program 69% B-vel indult 7 percig, melyet ezt követően 1 perc alatt lineárisan 85%-ra növeltünk; ezt az értéket 6 percig tartottuk, majd 1 percen belül visszaálltunk a kezdeti értékre, melyet 6 percig tartottunk. MS jelbeállítások: szelektív ion figyelés (SIM) mód, m/z 961; erősítés 3.

4.14 Spektroszkópiai kísérlet

A spektrumokat F-4500 fluoriméterrel (Hitachi, Tokió, Japán) és V730 UV-Vis fotométerrel, 25 °C-on gyűjtöttük. A mikotoxinok és a palmitinsav (végső koncentráció: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 és 10,0 μl) HSA (2 μl) emissziós spektrumára gyakorolt hatását foszfátpufferben (PBS, pH 7,4) teszteltük, az emissziós jel változását 340 nm-en vizsgáltuk. A ligandum molekulák belső-szűrő hatását az ultraibolya-látható spektrum (UV/Vis) alapján korrigáltuk (Lakowicz et al., 2006; Lemli et al., 2022).

4.15 Ultracentrifugálási vizsgálatok

Az albumin és a vizsgált fumonizinek HSA-hoz kötött frakcióját ultracentrifugálással ülepítettük a korábban ismertetett módszerrel (Boulton et al., 1998; Fliszár-Nyúl et al., 2022). Ezt követően mennyiségileg meghatároztuk a ligandum molekulák szabad frakcióját (ld. következő bekezdés). Az első kísérletben a minták 10-10 μM FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxint tartalmaztak 40 g/l HSA jelenlétében. Az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 esetében a kísérletet 2, 5 és 10 μM HSA jelenlétében is elvégeztük. A FB1, *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1, valamint a FB4 toxin mennyiségét HPLC/MS műszerrel határoztuk meg, a mintákat 1100 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 1946D ESI-MS (Agilent) műszerekkel analizáltuk. A HPLC rendszer egy vákuumos gáztalanítót (degasser), egy bináris pumpát, egy well-plate mintaadagolót és egy 40 °C-ra állított oszloptermosztátot tartalmazott.

A gradiens elválasztást C18-as előtét oszlopon (Phenomenex, Torrance, CA, USA), valamint Kinetex C18-as (50 × 4,6 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) analitikai oszlopon (áramlási sebesség: 0,8 ml/min) végeztük. A komponensek elválasztására gradiens elúciót alkalmaztunk. Mind az „A” oldószer (H₂O), mind a „B” oldószer (MeCN) 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazott. A gradiens 24% „B”-vel

indult, mely 14 perc alatt lineárisan 80% „B” értéket ért el, majd újabb 1 perc alatt elérte a 100%-ot, melyet 2 percig tartott, végül 2 perc alatt visszaállt az eredeti értékre, melyet 4 percig tartott. Az analízishez injektorprogramot is alkalmaztunk, mely során a mintaadagoló minden 1 µl mintához 1 µl belső standard keveréket (1 ng FB1-¹³C34 és 1 ng *N*-C17:0-FB1 ACN-vízben (1:1 v/v⁰)) adott. A tömegspektrométert a következő paraméterekkel működtettük: porlasztógáz (N₂) nyomása 50 psi; szárítógáz (N₂) áramlási sebessége 12 l/min, hőmérséklete 350 °C; kapilláris feszültség 3000 V. Az MS adatokat pozitív ion szelektív ion figyelés (SIM) módban gyűjtöttük: 0-8 perc között a 690, 722, 756 *m/z* értékeket, 8-15 perc között a 961, 975 *m/z* értékeket figyeltük.

A kalibráláshoz használt törzsoldatok frissen készültek, a toxinok (FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4) 100-100 µg-nyi mennyiségének MeCN-H₂O (1:1 v/v%) elegyében történő feloldásával. Az így kapott oldatokat ugyanezzel az oldószerrel hígítottuk tovább. A FB1 és FB4 toxin esetén az alábbi standardokat kaptuk: 100; 50; 10; 5; 1; 0,5; 0,2; 0,1 és 0,05 ng/µl. Az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 toxinból pedig a következő standardokat állítottuk elő: 50; 25; 5; 2,5; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 és 0,025 ng/µl.

A linearitás (R^2), a detektálási határ (LOD; 3:1 jel/zaj arány) és a mennyiségi meghatározási határ (LOQ; 10:1 jel/zaj arány) a következőképpen alakult:

- FB1 (lin: 0,1-100 ng/µl, $R^2 = 0,9998$; LOD = 50 pg/µl; LOQ = 100 pg/µl);
- FB4 (lin: 0,1-100 ng/µl, $R^2 = 0,9999$; LOD = 50 pg/µl; LOQ = 100 pg/µl);
- *N*-pal-FB1 (lin: 0,025-50 ng/µl, $R^2 = 0,9989$; LOD = 10 pg/µl; LOQ = 25 pg/µl);
- 5-*O*-pal-FB1 (lin: 0,025–50 ng/µl, $R^2 = 0,9999$; LOD = 10 pg/µl; LOQ = 25 pg/µl).

A FB1–HSA és FB4–HSA kötési állandóját (K_a) az alábbi képlet alapján (Fliszár-Nyúl et al., 2022) számoltuk ki, a mikotoxin-albumin komplexek 1:1 sztöchiometriáját feltételezve:

$$K_a = \frac{[LP]}{[L] \times [P]}$$

[L] a szabad ligandum, [P] a szabad fehérje, [LP] pedig a ligandum-fehérje komplex moláris koncentrációit jelöli.

4.16 Ultraszűrési vizsgálatok

A FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxin hatását Site I (warfarin), Site II (naproxen) és az FA1 (S-kamptotecin) ligandumokkal vizsgáltuk, a korábban leírt ultraszűrési módszerekkel (Fliszár-Nyúl et al., 2019, 2022). A felülúszók warfarin, naproxen és S-kamptotecin koncentrációját HPLC-vel határoztuk meg, a korábban leírt módszerrel (Fliszár-Nyúl et al., 2019). A statisztikai különbségek kiértékelése egytényezős („one-way”) ANOVA és Tukey post-hoc tesztekkel történt, SPSS Statistics szoftverrel (21-es verzió; IBM, Armonk, NY, USA) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.17 Modellezési vizsgálatok

Az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 szerkezetét Maestro programmal rajzoltuk meg (Schrödinger Maestro Schrödinger Release 2020-4). A ligandumok energia-minimalizálását az OpenBabel segítségével végeztük (O’Boyle et al., 2011), melyet a legmeredekebb süllyedés és a konjugált gradiens minimalizálása követett. Ezután a kapott struktúrákat PM7 paraméterkészlet segítségével (Stewart et al., 2013) kvantumkémiai programcsomaggal (MOPAC) (Stewart et al., 2016) energia-minimalizáltuk. A gradiens normát 0,001-re állítottuk be. A ligandum atomokat AutoDock Tools program (Morris et al., 1998) segítségével Gasteiger–Marsili (Gasteiger & Marsili, 1980) parciális töltésekkel láttuk el. A ligandumok flexibilitása minden aktív torziós ponton engedélyezve volt. A humán szérumalbumin (PDB-kód: 1ao6) atomi koordinátáit a Protein Data Bankról (PDB) töltöttük le. A target molekulát poláris hidrogénatomokkal, valamint Gasteiger-Marsili parciális töltésekkel láttuk el az AutoDock Tools segítségével.

A ligandumok humán szérumalbuminhoz történő dokkolásához az AutoDock 4.2.6 programot (Morris et al., 1998) használtuk, a következő grid doboz beállításokkal: $100 \times 100 \times 100$ grid pont, 0,803 Å közönként. Vak („blind”) dokkolást hajtottunk végre, mely során a dokkoló doboz a célmolekula teljes felszínét borította. A globális keresés Lamarcki genetikus algoritmus segítségével történt. Száz dokkolást követően a ligandumkonformációk a számított kölcsönhatási energia értékeik alapján kerültek rangsorolásra (Zsidó et al., 2021). Ezt követően a későbbi értékelések és a kölcsönhatásban lévő aminosavak összegyűjtését végeztük el (Zsidó et al., 2020).

4.18 A fumonizinek toxicitásának vizsgálata zebraadánió embrió modellen

Az általunk vizsgált négy fumonizin-származék *in vivo* toxicitásának tanulmányozásához laboratóriumi nevelésű AB típusú zebraadánió (*Danio rerio*) vonalat használtunk. A halak elhelyezése recirkulációs akvakultúra rendszerben (Tecniplast S.p.a., Olaszország, Buguggiate), ellenőrzött mikrokörnyezeti feltételek (vízhőmérséklet: $25,5 \pm 0,5$ °C, vezetőképesség: 550 ± 50 μ S/cm, pH: $7,0 \pm 0,2$, fényprogram: 14 óra világos, 10 óra sötét) mellett történt.

Az ivatást megelőző napon a halak szaporítóedényekbe kerültek áthelyezésre, melyben a különböző ivarú egyedek válaszfalal voltak elkülönítve egymástól. Az ívás másnap, a válaszfalak eltávolítását és a lámpák felkapcsolását követően történt meg. Az ikrákat összegyűjtöttük, rendszervízzel leöblítettük, és steril E3 médiumban (5 mM NaCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,17 mM KCl, 0,33 mM MgSO₄) (Brand et al., 2002) tartottuk. A kísérletek kezdetéig $25,5 \pm 1,0$ °C-on inkubáltuk őket. Naponta egyszer eltávolítottuk a koagulált embriókat, a médiumot pedig frissítettük.

A fumonizinek toxicitásának vizsgálatához egy Zebraadánió Embrió Toxicitás Próbát (ZETA) (Haq et al., 2016) végeztünk, mely az OECD által javasolt Fish Embryo Acute Toxicity (FET) teszt kismértékben módosított változata (OECD, 2013). Az embriók a megtermékenyítést követő 96 óra múlva (96 hpf) 24 órán keresztül mindegyik vegyület esetén a következő koncentrációknak voltak kitéve: 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 és 200 μ M. A vegyületek törzsoldata (1000 mg/ml) dimetil-szulfoxid oldószerrel készült, majd a kezelő oldatokat E3 közegben történő hígítással elkészítettük el. Az embriókat egyenként 24 lyukú plate-ekbe (JET, Biofil; Kuangcsou, Kína) helyeztük át, ötös csoportokban, négy ismétlésben. Mindegyik mélyedést 2 ml kezelőoldattal, valamint E3 médium kontroll és oldószerkontrollal töltöttük fel a megfelelő koncentrációban. A lemezeket $25,5 \pm 1,0$ °C-on inkubáltuk, majd 24 óra elteltével sztereomikroszkóp alatt (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) ellenőriztük a mortalitást és a fejlődési rendellenességeket.

A túlélő embriókat 0,02%-os MS-222 (Tricaine-metán-szulfonát) oldattal elaltattuk, majd 5%-os metilcellulóz oldatot tartalmazó Petri-csészékbe helyeztük. Ezt követően az embriókról harmincszoros nagyításban oldalnézeti képeket készítettünk (Leica M205 FA sztereomikroszkóp, Leica DFC 7000T kamera, Leica Application Suite X szoftver, Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország).

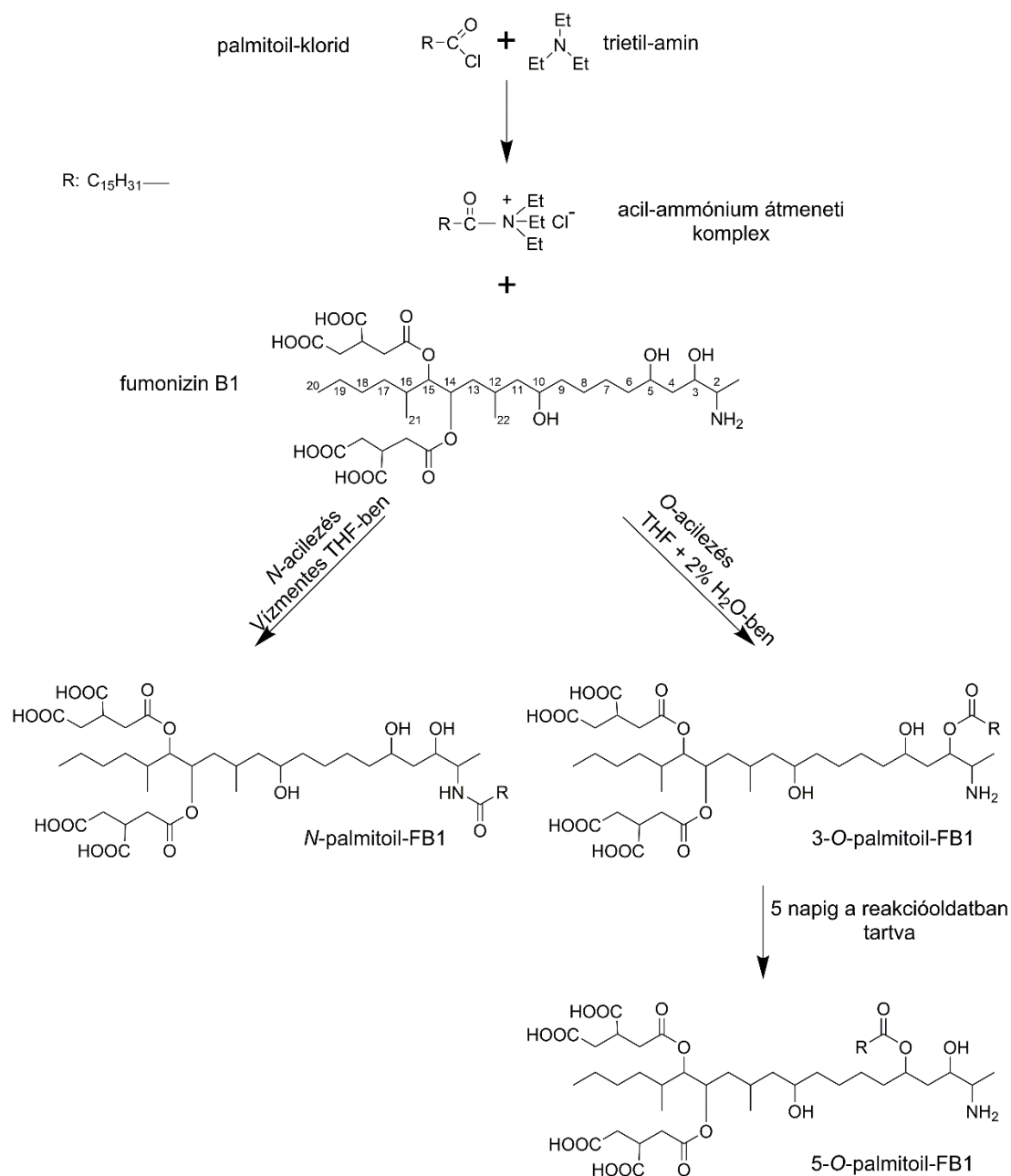
A letális és nem letális hatások statisztikai elemzésére kéttényezős varianciánalízist („two-way” ANOVA) alkalmaztunk, a többszörös összehasonlítást Tukey-féle post hoc tesztekkel végeztük el ($p < 0,0001$). Az elemzést GraphPad Prism 9 szoftver (GraphPad Software, Boston, MA, USA) segítségével hajtottuk végre.

5. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

5.1 A FB1 toxin szintetikus acilezésére irányuló kísérlet

5.1.1 A FB1 toxin acilezése palmitoil-klorid/trietil-amin reagenssel

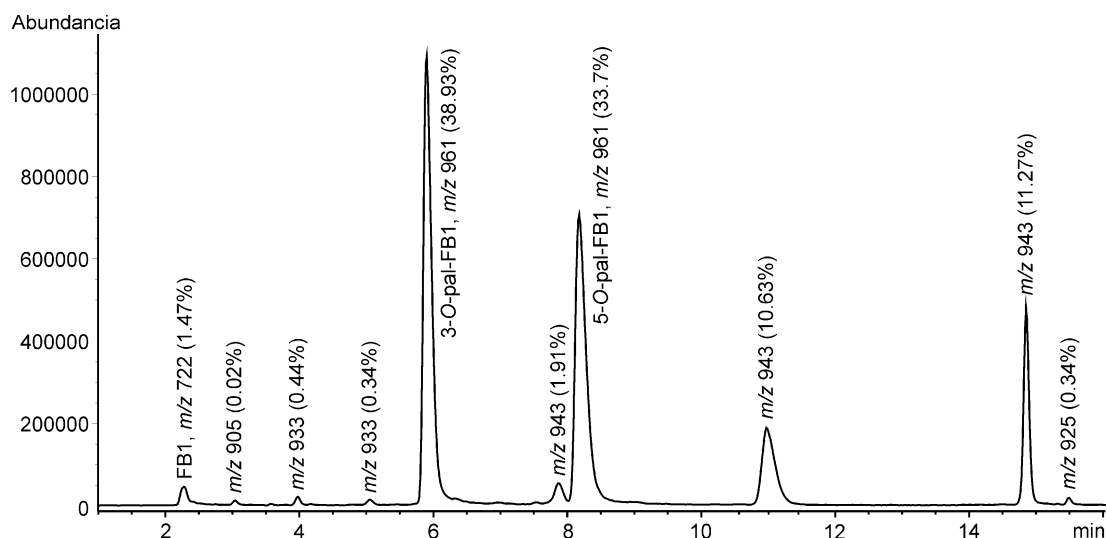
A FB1 toxin savanhidridekkel (Humpf et al., 1998) és savhalogenidekkel (savkloriddal) (Harrer et al., 2013) végzett *N*-acilezési reakcióit korábban már leírták, de a FB1 toxin *O*-acilezésével kapcsolatban azelőtt nem született egy közlemény sem. A FB1 toxin *O*-acilezett formáit elsőként laboratóriumi körülmények között *F. verticillioides*-szel beoltott rizstenyészetekből mutatták ki (Bartók et al., 2010b), később pedig szántóföldi körülmények között fertőzött kukoricaszemekben is azonosították (Falavigna et al., 2013). Egy korábbi publikációban az *N*-palmitoil-FB1 szintézisét is leírták FB1 toxinból Harrer et al. (2013) publikációi alapján (Bartók et al., 2013a), de a termék megtisztítása akkor még nem történt meg. Ez alkalommal a termék tisztítása és az azt követő nagyfelbontású HPLC/MS és 700 MHz-es NMR spektrumok felvétele miatt újra elvégeztük a FB1 toxin *N*-acilezését. Fontos megjegyezni, hogy a FB1 toxin *N*-palmitoil származékának előállításához a reakció előtt a toxint vízmentes oldószerben (tetrahidrofurán, THF) kellett feloldani. Amikor a reakcióelegyhez vizet adunk, a palmitoil-klorid feleslegének hidrolízise során sósav is keletkezik, amely protonálja a primer aminocsoportot, megakadályozva annak acilezését. 2% víz THF-hez adagolásával elértük, hogy az aminocsoport helyett a C3 és C5 atomon lévő egyik OH csoport kerüljön acilezésre, így a FB1 toxin 3-*O*- vagy 5-*O*-palmitoil származékai képződtek. A FB1 toxin acilezését palmitoil-kloriddal végeztük, amely a reakcióelegyben a trietil-aminnal (TEA) átmeneti komplexet képzett, a komplex pedig az acilcsoportot a FB1 molekula megfelelő helyére vitte (9. ábra).



9. ábra A FB1 toxin *N*- és *O*-acilezése palmitoil-klorid/trietilamin reagens alkalmazásával vízmentes tetrahydrofuranban, illetve 2%-os víztartalmú tetrahydrofuranban

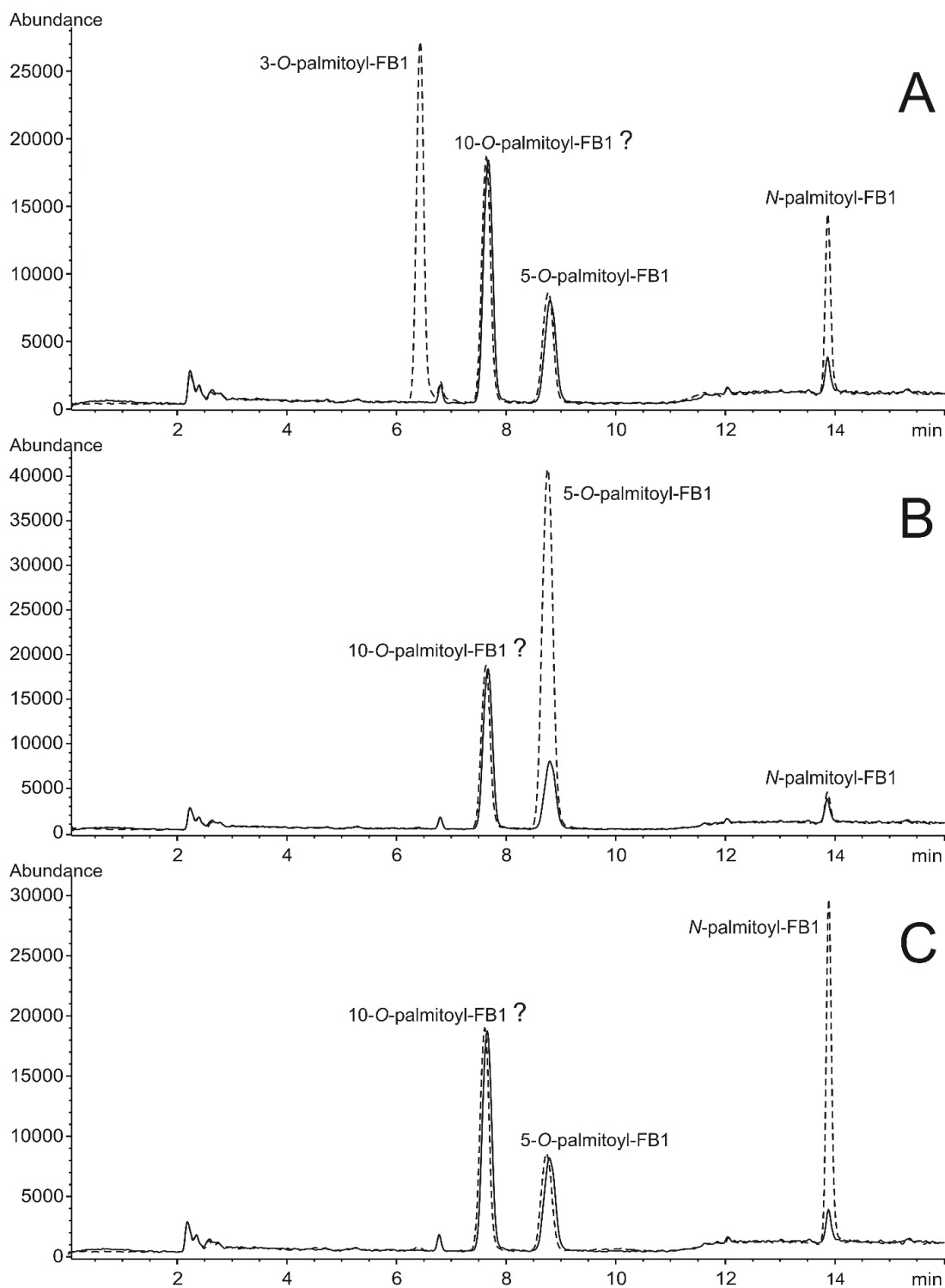
A vízmentes *N*-acilezés esetén mindkét reagens (palmitoil-klorid és TEA) 1,2-szeres moláris feleslegben volt jelen a reakcióelegyben (Bartók et al., 2013a). Az *N*-palmitoil-FB1 képződése gyorsan lezajlott (30 perc alatt) szobahőmérsékleten, 90% feletti konverzió mellett. A vizes körülmények között végzett *O*-acilezéshez 5-szörös moláris feleslegben trietil-amint és 10-szeres moláris feleslegben palmitoil-kloridot adtunk a reakcióelegyhez.

A FB1 toxin *O*-acilezése lassú folyamat volt, sok intermediert eredményezve, amelyek jól láthatóak a HPLC/ESI-MS pozitív totálion kromatogramon (10. ábra).



10. ábra A reakcióelegy HPLC/ESI-MS totálion-kromatogramja, 48 órával a FB1 toxin acilezési reakciójának elindítása után, 2% vizet tartalmazó tetrahydrofuranban. A kromatogram tartalmazza a csúcsonkénti terület százalékos kiértékelésének adatait és a molekulaionok $[M+H]^+$ m/z értékeit.

A szobahőmérsékleten végzett reakció során először a 3-*O*-palmitoil-FB1 képződött, majd lassan megjelent az 5-*O*-palmitoil-FB1 is. A 3-*O*-palmitoil-FB1 koncentrációja 48 óra alatt érte el maximális értékét. Ekkor a területszázalékos kiértékelés alapján 38,9% 3-*O*-palmitoil-FB1, 33,7% 5-*O*-palmitoil-FB1 és összesen 27,4% intermedier volt jelen a reakcióelegyben. Az idő előrehaladtával az összetétel az 5-*O*-palmitoil-FB1 képződése felé tolódott el. Öt nappal a reakció elindítását követően a 2% vizet tartalmazó reakcióelegyben 80% 5-*O*-palmitoil-FB1 toxint figyeltünk meg, 20% 3-*O*-palmitoil-FB1 mellett, azaz a 3-*O*-palmitoil-FB1 is jelen volt a rendszerben, mely ez esetben intermediernek tekintendő. A 3-*O*-palmitoil-FB1 még preparatív HPLC-vel végzett tisztítás után sem volt stabil. A preparatív HPLC oszlopról eluálódó frakciókban a bepárlás és a liofilizálás során *O*→*N*-acil-vándorlás volt megfigyelhető, ami körülbelül 10% *N*-palmitoil-FB1 képződését eredményezte a 3-*O*-palmitoil-FB1-ből, amint az a 11A. ábrán látható.

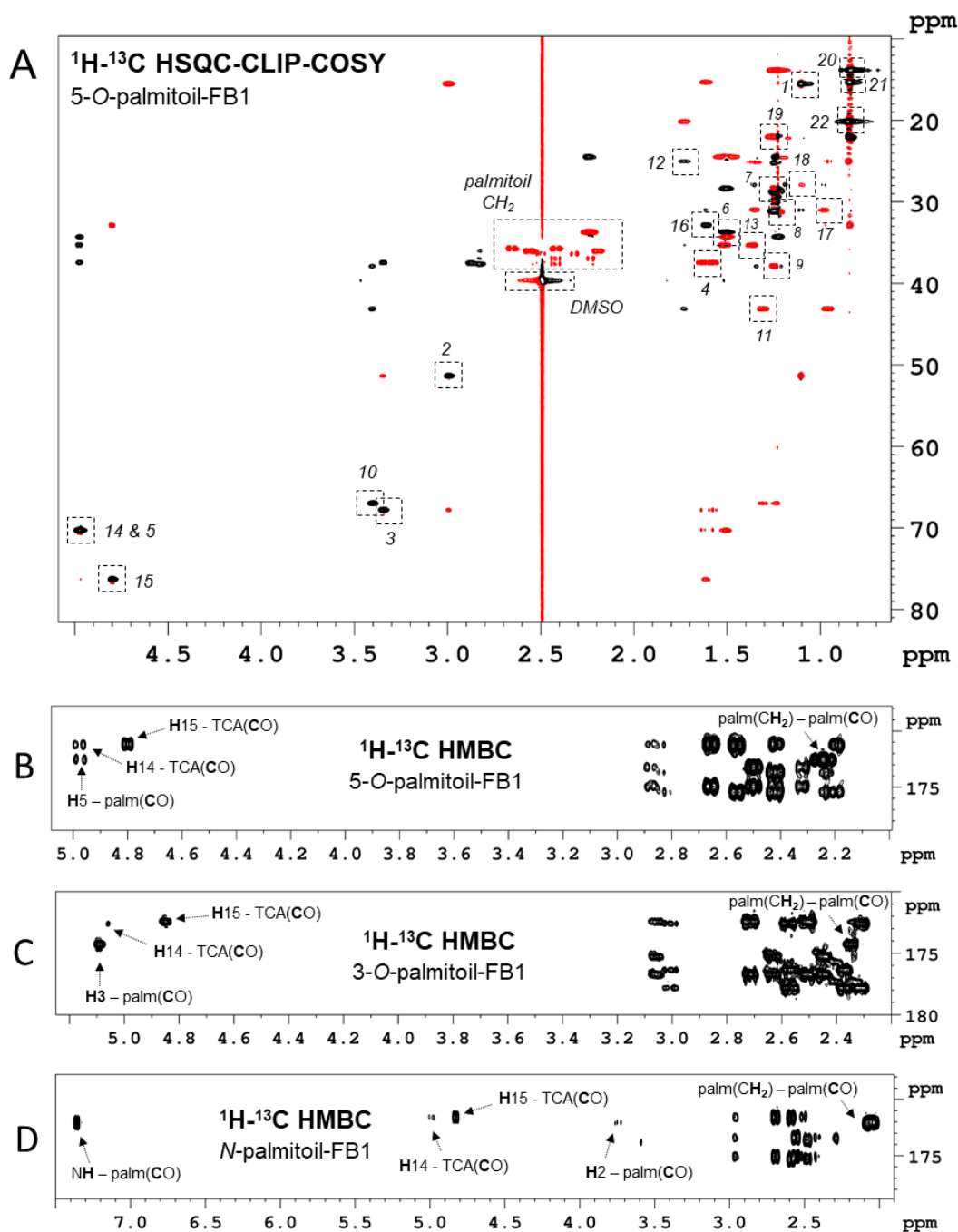


11. ábra *F. verticillioides* tenyészet kivonat (folytonos vonal) (m/z 961), valamint a szintetizált és tisztított 3-*O*-palmitoil-FB1 (A), 5-*O*-palmitoil-FB1 (B) és *N*-palmitoil-FB1 (C) toxinnal adalékolt tenyészet-kivonatok (szaggatott vonalak) HPLC/ESI-MS kromatogramjai.

5.1.2 Az *N*- és *O*- acilezett FB1 komponensek NMR vizsgálata

A 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 vegyületek szerkezetét nagyfelbontású ^1H és ^{13}C NMR spektroszkópiával 700 MHz-es NMR spektrométerrel határoztuk meg. Az

N-palmitoil-FB1 toxinról korábban csak ^1H spektrális adatokat közöltek gyengébb mágneses mezőt (400 MHz) alkalmazó NMR készüléken (Harrer et al., 2013). A rezonanciák hozzárendelése egy (1D) és kétdimenziós (2D) NMR kísérletek alapján történt. A ^{13}C -multiplicitással szerkesztett 2D ^1H - ^{13}C HSQC-CLIP-COSY spektrum különbséget tesz a CH/CH₃ és CH₂ rezonanciák között, így a különböző spinrendszereken belüli kapcsolódási pontok azonosítása megvalósítható és egyszerű (12A. ábra).



12. ábra A: ^{13}C -multiplicitással szerkesztett ^1H - ^{13}C HSQC-CLIP-COSY spektrum, amely az 5-*O*-palmitoil-FB1 rezonancia hozzárendelését mutatja. A pozitív fázisú csúcsok (fekete) a CH-csoportok közvetlen HSQC-korrelációját adják, míg a negatív

csúcsok (piros) a COZY-kapcsolatokat mutatják. A ^{13}C -multiplicitás szerkesztés miatt a CH_2 csoportok közvetlen HSQC korrelációi is negatív fázissal (piros) jelennek meg. B, C, D: kivonatok a 3-*O*-palmitoil-FB1, 5-*O*-palmitoil-FB1 és *N*-palmitoil-FB1 ^1H - ^{13}C HMBC spektrumából, kiemelve a palmitoil, a TCA oldalláncok és a főlánc atomjai közötti kulcsfontosságú hosszú távú korrelációkat.

Minden fő láncrezonancia hozzárendelésre került, azonban a palmitoil CH_2 és a trikarballil-acil (TCA) CH , CH_2 kémiai eltolódások többsége kétértelmű maradt a jelentős spektrális átfedések miatt. A palmitoil szubsztitúciók helyzetét azonban a FB1 főlánc palmitoil-karbonil és H3, H5, NH protonjai közötti háromkötéses heteronukleáris korrelációk alapján igazolni lehetett (^1H - ^{13}C HMBC spektrumok a 12. ábrán (B-D)). Ahogy az várható volt, a TCA csoportok mindhárom vegyületben a C14 és C15 pozícióban helyezkedtek el, amit a H14-H15 protonok és a TCA karbonilok közötti HMBC kapcsolatok bizonyítanak. Továbbá az ^1H és ^{13}C főlánc kémiai eltolódási értékei a 2-5 pozíciókban (5. táblázat) mutatják a komponensek eltérő palmitoil-szubsztitúciós mintázatait.

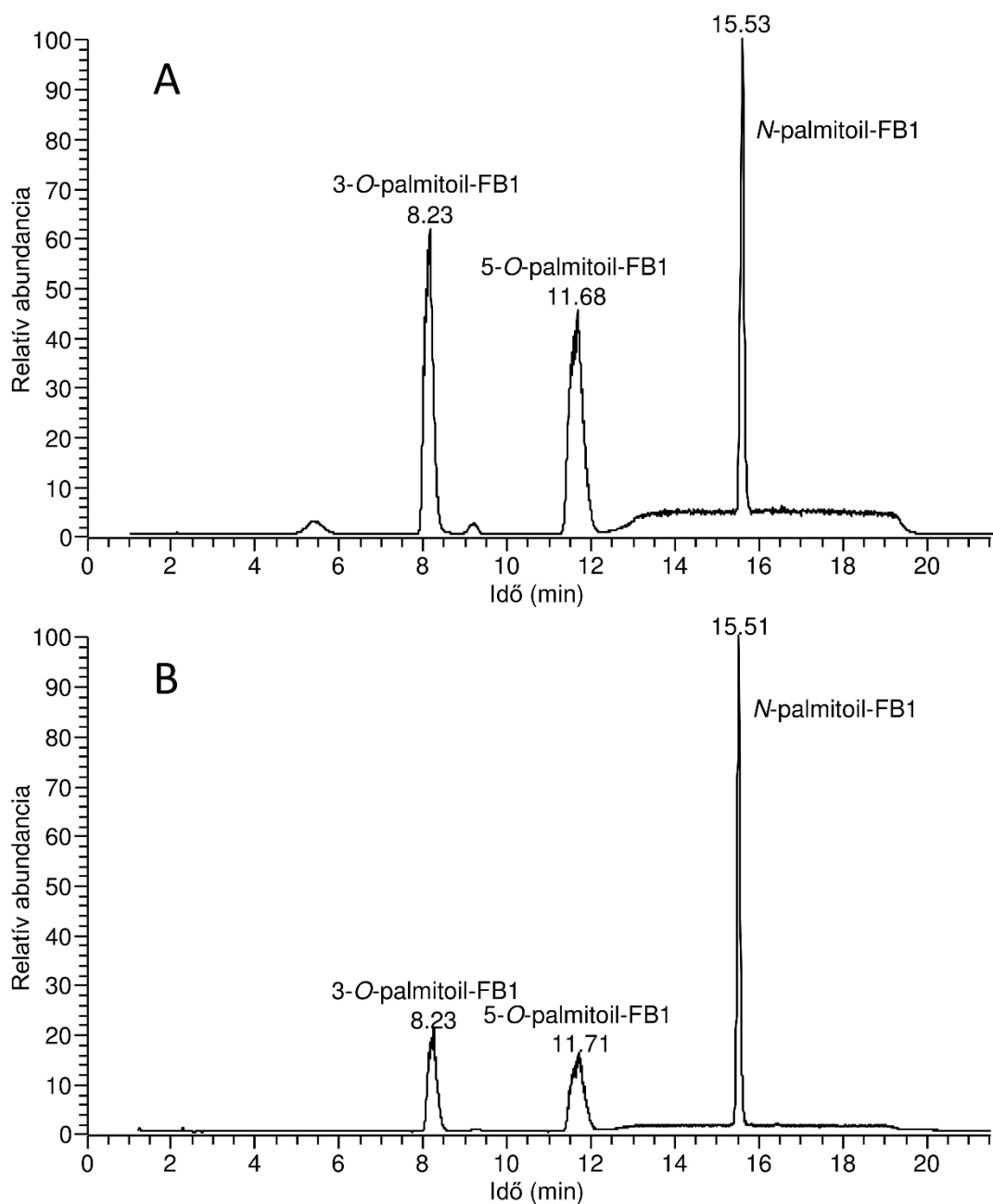
5. táblázat A 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 ^1H és ^{13}C kémiai eltolódásai. A félkövér számok az acilezési pozíciókat emelik ki. A csillag (*) a rezonanciák kétértelmű hozzárendelését jelöli a zsúfolt spektrális régiókban.

Feliratozás	3- <i>O</i> -palmitoil-FB1		5- <i>O</i> -palmitoil-FB1		<i>N</i> -palmitoil-FB1	
	$\delta_{1\text{H}}$	$\delta_{13\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$	$\delta_{13\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$	$\delta_{13\text{C}}$
	(ppm)		(ppm)		(ppm)	
1	1,04	16,72	1,10	15,52	0,99	17,41
2	3,77	49,53	2,99	51,92	3,74	49,09
3	5,08	71,31	3,34	68,37	3,62	69,38
4	1,71	37,38	1,62	38,00	1,31	41,22
5	3,47	67,12	4,97	70,85	3,57	66,94
6*	1,39	37,06	1,50	34,79	1,23	38,62
7*	1,21	24,93	1,25	28,34	1,21	25,99
8*	1,21	30,01	1,20	31,18	1,22	31,80
9	1,32	37,30	1,24	38,42	1,27	38,80
10	3,47	68,45	3,40	67,53	3,43	67,54
11	1,38	42,34	1,30	43,65	1,30	43,91
12	1,70	25,10	1,73	25,54	1,72	25,90
13	1,34	34,60	1,36	35,76	1,40	35,71
14	5,05	71,45	4,97	70,68	4,99	71,50
15	4,85	77,48	4,80	76,79	4,83	77,01
16	1,61	33,54	1,61	32,80	1,64	31,70
17	1,00	31,49	0,98	30,97	1,00	31,56
18	1,11	30,00	1,10	28,00	1,12	28,35
19	1,25	22,20	1,26	22,23	1,24	22,51
20	0,82	13,57	0,83	13,85	0,86	14,34
21	0,86	14,88	0,84	15,34	0,86	15,76
22	0,87	19,90	0,86	20,65	0,86	20,39

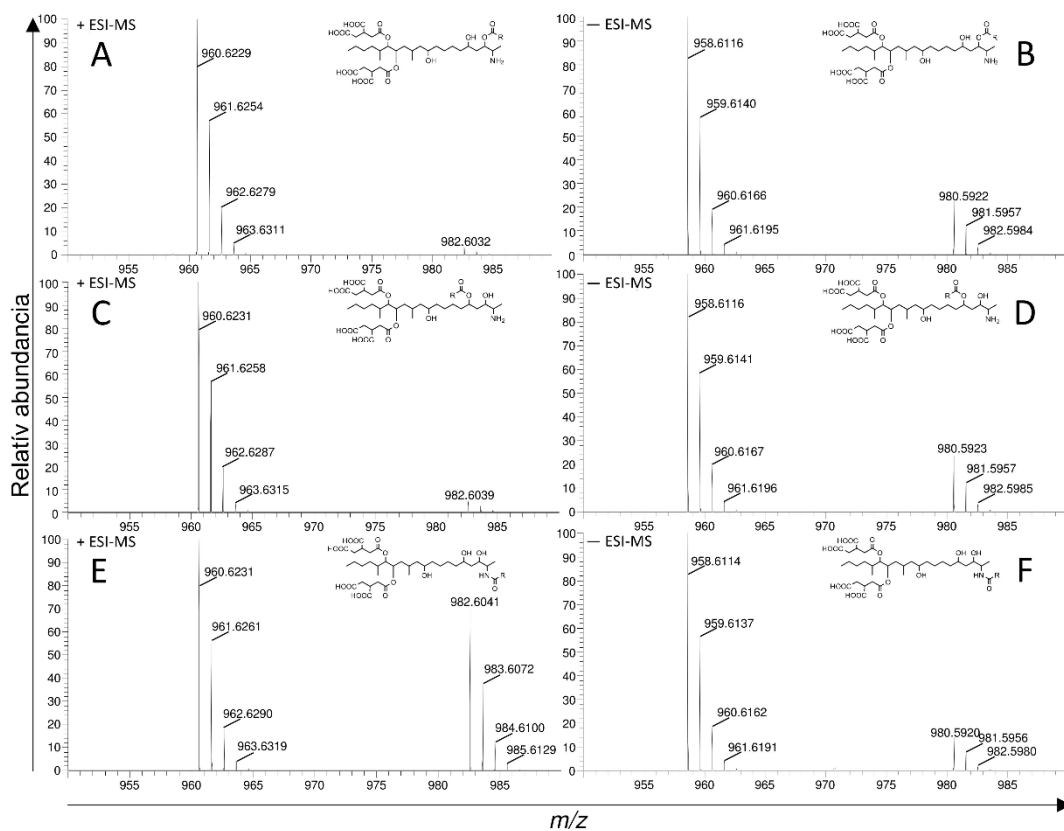
A palmitoil-karbonilok közelében lévő protonok jelentősen lefelé tolódtak el, és ez a perturbáció a szomszédos rezonanciákban is megfigyelhető volt. A 3-*O*-palmitoil-FB1 minta stabilitása oldószerfüggést mutatott: DMSO- d_6 -ban 3-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 keverékét mutattuk ki NMR-rel. A többi vegyülettől eltérően ezt a mintát CD_3CN/D_2O oldószerben oldottuk és analizáltuk, hogy megakadályozzuk a gyors *O*→*N*-acil-migrációt. Ennek eredményeként az *N*-származék spektrális nyomai minden 3-*O*-palmitoil-FB1 mérésből eltűntek.

5.1.3 A reakciótermékek jellemzése HPLC/ESI-HRMS módszerrel

Az NMR-rel azonosított FB1 toxin acilezett termékeit HPLC/ESI-HRMS módszerrel is vizsgáltuk. A FB1 toxin 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil származékait először külön-külön injektáltuk a HPLC oszlopra, hogy megbizonyosodjunk retenciós idejükről/elúciós sorrendjükről. A három komponens keverékének elkészítése után HPLC/ESI-HRMS méréseket végeztünk pozitív és negatív ion módban is. A 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 szétválasztása után kapott két totálion-kromatogram 8,2; 11,6 és 15,5 perc retenciós idővel a 13. ábrán látható, a két különböző ionmódban rögzített tömegspektrumokat pedig az 14. ábra mutatja.

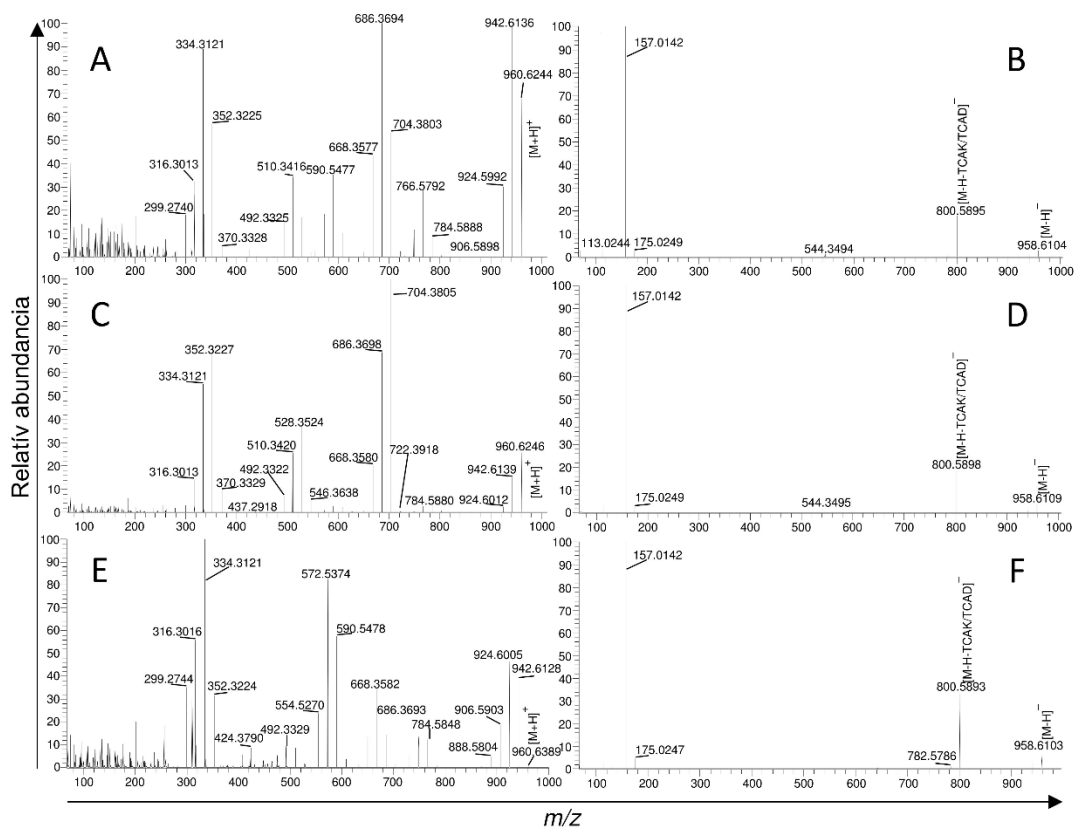


13. ábra A 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 toxin elegyének HPLC/HRMS totálion kromatogramja pozitív (A) és negatív (B) ion módban



14. ábra A 3-*O*-palmitoil-FB1 (A, B), 5-*O*-palmitoil-FB1 (C, D) és *N*-palmitoil-FB1 (E, F) toxin 11. ábrán látható totálion kromatogramjából kinyert pozitív és negatív HRMS spektrumok

A 3-*O*- és 5-*O*-palmitoil-FB1 toxin pozitív ion ún. „full-scan” ESI-HRMS spektrumában csak a protonált molekula $[M+H]^+$ volt megfigyelhető 960,623 m/z értéknél, míg az *N*-palmitoil-FB1 esetén a Na-addukción $[M+Na]^+$ szintén jelentős intenzitással jelent meg a spektrumban 982,60 m/z értéknél. A negatív ion ESI-HRMS spektrumban a deprotonált molekulát (958,611 m/z értéknél) a $[M-2H+Na]^-$ ion kísérette 980,592 m/z értékkel. A három komponens molekulaionjainak pozitív és negatív MS/MS spektruma a 15. ábrán látható.



15. ábra A 3-*O*-palmitoil-FB1 (A, B), 5-*O*-palmitoil-FB1 (C, D) és az *N*-palmitoil-FB1 toxinjaionjainak pozitív és negatív ion nagy felbontású MS/MS spektruma.

A molekulaionok pozitív ion ESI-HRMS/MS spektrumában ugyanazok a fragmensionok voltak megfigyelhetők, mint korábban a 3D ioncsapda tömeganalizátor esetében (Bartók et al., 2010b; Bartók et al., 2013a). A negatív ion HRMS/MS spektrumban a trikarballilsavból (TCA) vízkilépéssel ($[\text{TCA-H}_2\text{O-H}]^-$) képződött fragmension volt a legnagyobb mennyiségben megfigyelhető 157 m/z érték mellett. Ezek a fragmensionok a TCA anhidrid (TCAD) és/vagy ketén (TCAK) formájában jelentek meg. Ezen ionok (m/z 157) nem jelentek meg a 3D ioncsapda tömeganalizátorral korábban felvett spektrumokban, mert m/z értékük a fragmentálendő molekulaion m/z értékének 1/3-a alatt volt (a 3D ioncsapda tömeganalizátorok 1/3 szabálya). A TCAD/TCAK csoportok molekuláról történő kihasadása azonban több fragmensionban is látható volt a 3D ioncsapda tömeganalizátorral kapott tömegspektrumban (Bartók et al., 2010b; Bartók et al., 2013a).

5.1.4 A gombakivonat adalékolása a szintetikusan előállított acilezett FB1-származékokkal

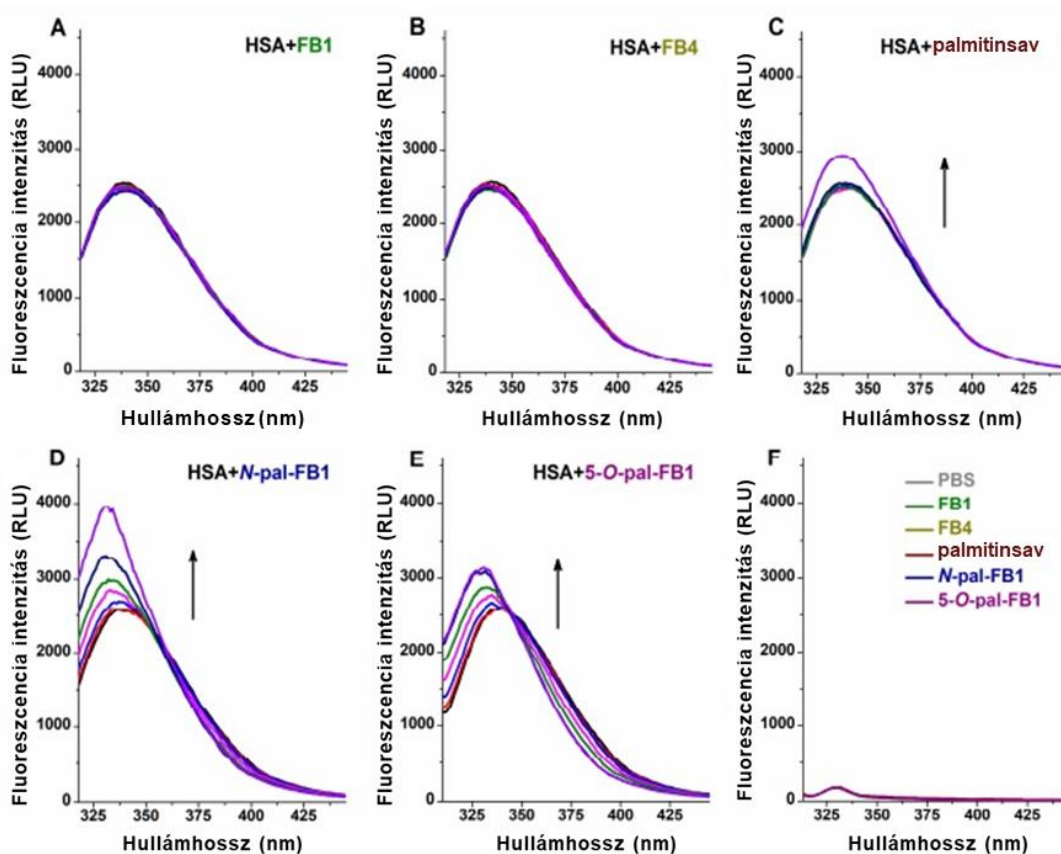
1 μ l (500 pg) 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1-származékot külön-külön hozzákevertünk 1 μ l (50 μ g/ μ l) *F. verticillioides*-szel oltott rizskultúra kivonatához a HPLC rendszer automata mintaadagolója segítségével. A 48. oldalon bemutatott 11. ábra a gombakivonatok kromatogramjait mutatja be az acilezett származékok egyedi adalékolása után. Jól látható, hogy az 5-*O*-palmitoil-FB1 vagy *N*-palmitoil-FB1 eredeti kivonathoz való hozzáadásával megnőtt a korábban feltételezett csúcsok (Bartók et al., 2013a) területe (11B. ábra). Az eredeti gombakivonat 3-*O*-palmitoil-FB1 toxinnal való adalékolása azonban nem eredményezte a korábban 3-*O*-palmitoil-FB1-nek vélt csúcs növekedését, hanem alacsonyabb retenciós időn belül jelent meg, ahol a gombakivonat nem tartalmazott mérhető komponenst (11A. ábra). Következésképpen kijelenthető, hogy a gomba nem termelt 3-*O*-palmitoil-FB1 toxint. Fontos megjegyezni, hogy a 3-*O*-palmitoil-FB1 toxinnal történő adalékolás az *N*-palmitoil-FB1 csúcsmagasságának növekedését is eredményezte, amint azt a 11A. ábra is mutatja. Ez a 3-*O*-palmitoil-FB1 toxin instabilitásával magyarázható. Mint korábban említésre került, a tiszta 3-*O*-palmitoil-FB1 frakciók centrifugális bepárlása és liofilizálása során az *O*→*N* acil migráció a kristályos végtermékben körülbelül 10% *N*-palmitoil-FB1 toxin képződését eredményezte. A gombakivonatban korábban 3-*O*-palmitoil-FB1-származéknak vélt komponens feltehetően a 10-*O*-palmitoil-FB1-származék, mivel tömegspektrumai egyértelműen a FB1 palmitoilezését jelzik (Bartók et al., 2013a). Az egyetlen szabad hely pedig, ahol az acilezés még megtörténhet, a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport. Ennek megerősítésére szilárdfázisú fermentációs mintákból kellene izolálni, majd szerkezetét ellenőrizni, hiszen a szintetikus acilezés során a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport nem preferált.

5.2 A FB1, az *N*-palmitoil-FB1, az 5-*O*-palmitoil-FB1 és a FB4 toxin humán szérumalbuminnal történő kölcsönhatására, valamint zebradánió embrió modellen történő toxicitásuk vizsgálatára irányuló kísérlet

5.2.1 A fumonizinek és a palmitinsav hatása a HSA emissziós spektrumára

Ezekben a kísérletekben a HSA (2 μ M) spektrumát a mikotoxinokkal és azok nélkül (0-10 μ M) is felvettük ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm) PBS-ben (pH 7,4). Emellett az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 hatását is összehasonlítottuk a palmitinsavéval.

A FB1 (16A. ábra) és FB4 toxin (16B. ábra) nem változtatta meg jelentős mértékben az albumin emissziós spektrumát. Csak a legmagasabb palmitinsav-koncentráció (10 μM) növelte a HSA fluoreszcenciáját (16C ábra). Azonban mind az *N*-pal-FB1 (16D ábra), mind az 5-*O*-pal-FB1 (16E ábra) fokozatosan növelte a HSA fluoreszcencia intenzitását, kékeltolódásokkal kísérve (*N*-pal-FB1: 340 nm \rightarrow 330 nm; 5-*O*-pal-FB1: 340 nm \rightarrow 329 nm) a fehérje emissziós maximumában. Fontos, hogy a mikotoxinok és a palmitinsav nem mutatott fluoreszcenciát albumin hiányában (16F ábra), valamint az alkalmazott hullámhossz-tartományban nem volt abszorpciójuk.

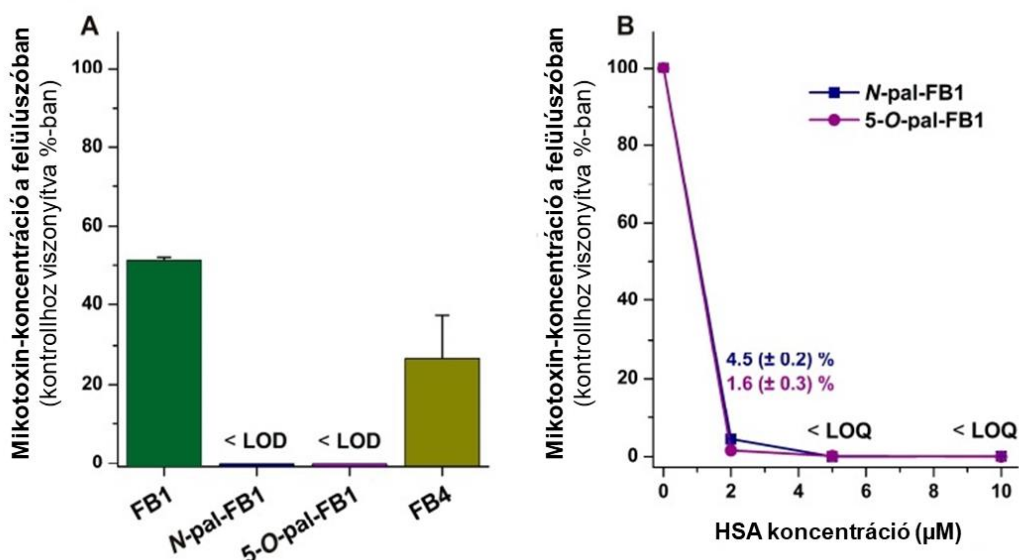


16. ábra A FB1 (A), FB4 (B), palmitinsav (C), *N*-pal-FB1 (D) és 5-*O*-pal-FB1 (E) (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 és 10,0 μM) HSA (2,0 μM) komplexeinek emissziós spektrumai PBS-ben (pH 7,4; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). A FB1, FB4, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és palmitinsav (10-10 μM) nem mutatott fluoreszcenciát a HSA hiányában (F), (RLU: relatív lumineszcencia egység), (Csenki et al., 2023).

5.2.2 A fumonizinek kölcsönhatása a HSA-val ultracentrifugálási vizsgálatok alapján

Ultracentrifugálási kísérleteket is végeztünk, mely során a minták FB1 toxint, *N*-pal-FB1 toxint, 5-*O*-pal-FB1 toxint, illetve FB4 toxint tartalmaztak (mindegyik 10 μM -t) HSA-val vagy anélkül (40 g/l \approx 600 μM közelíti a keringésben lévő albumin

koncentrációját). Ahogy a 17. ábra mutatja, az albumin a LOD alá csökkentette az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 mennyiségét, emellett a FB1 és FB4 szintjének nagyjából 50, illetve 75%-os csökkenése volt megfigyelhető (17A ábra). Ezen adatok alapján a FB1–HSA ($K = 1,6 \times 10^3$ l/mol) és a FB4–HSA ($K = 6,6 \times 10^3$ l/mol) kötési állandóit 1:1 sztöchiometriájú mikotoxin-albumin komplexek képződését feltételezve határoztuk meg (Fliszár-Nyúl et al., 2022).



17. ábra A mikotoxinok ultracentrifugálás utáni koncentrációja a felülúszókban (16 h, 170.000 g, 20 °C; PBS, pH 7,4). A 10-10 μM FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxint 40 g/l HSA-val ultracentrifugáltuk. Ezt követően a palmitoil-származékokat 2, 5 vagy 10 μM HSA-val (B) is centrifugáltuk. Miután az albumint mikotoxinok hozzáadása nélkül ultracentrifugáltuk, a felülúszókban nem volt kimutatható fumonizín. A mikotoxinok abszolút koncentrációja a kontrollmintákban (a fumonizinek albumin nélkül centrifugáltuk) a következő volt: $9,8 \pm 0,1$ μM (FB1), $10,0 \pm 0,3$ μM (FB4), $8,7 \pm 0,9$ μM (*N*-pal-FB1) és $8,2 \pm 0,2$ μM (5-*O*-pal-FB1), (Csenki et al., 2023).

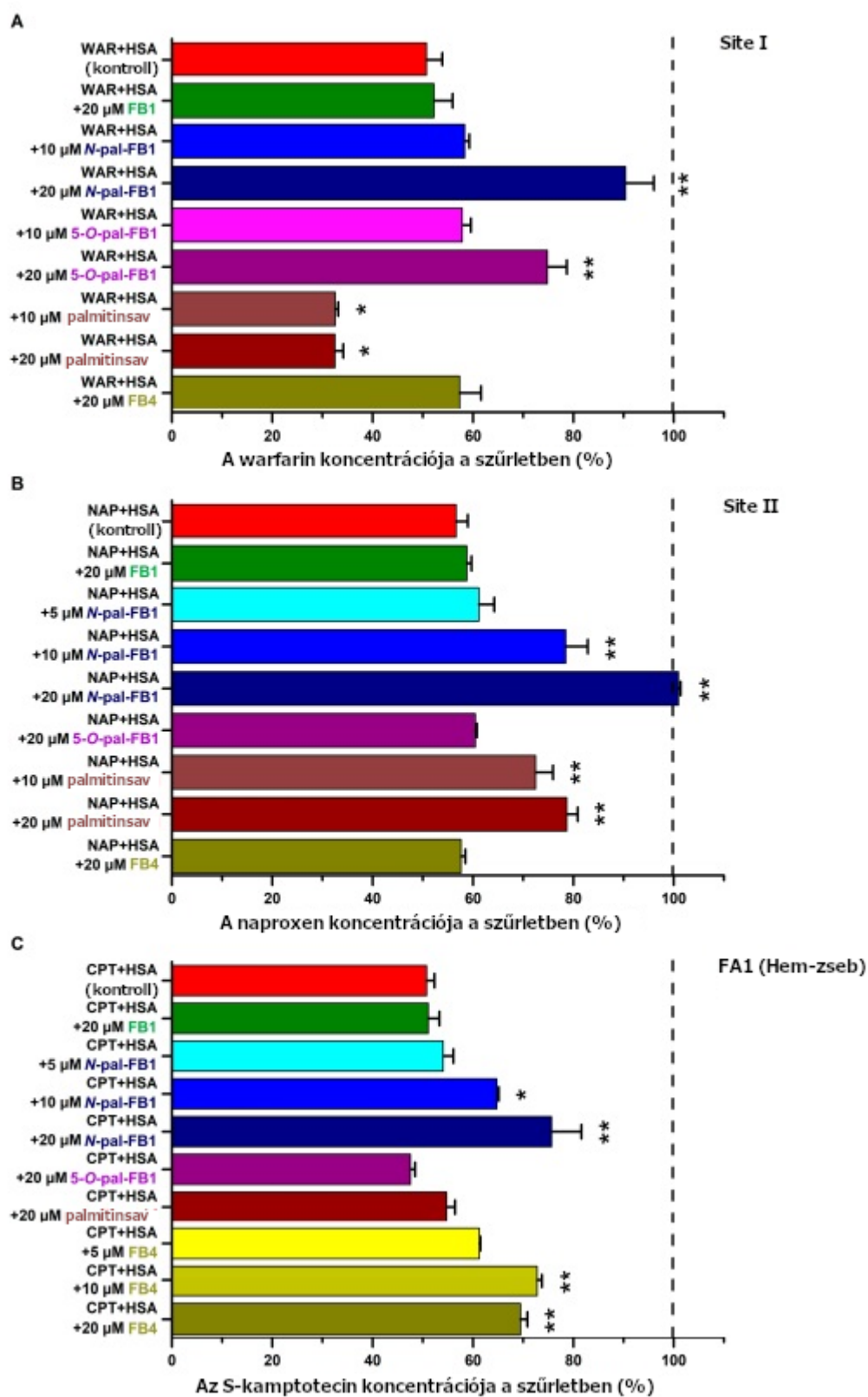
Figyelembe véve a palmitoil-FB1-származékok HSA általi erőteljes eltávolítását, a kísérleteket 2, 5 és 10 μM koncentrációjú HSA-val is elvégeztük. Érdekes módon még 2 μM koncentrációjú HSA is jelentős mértékben csökkentette az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 toxin koncentrációját a felülúszóban (17B ábra).

5.2.3 A fumonizinek és a palmitinsav hatása a „site markerek” és a HSA kölcsönhatására

A kötőhelyek vizsgálatához, valamint a fumonizinek „site marker”-HSA kölcsönhatásra gyakorolt hatásának tesztelésére ultraszűrési kísérleteket végeztünk. A

vizsgált „site markerek” (kötőhely markerek) szűrt frakcióit nem befolyásolta a FB1 toxin (18. ábra). Továbbá a warfarin és a naproxen albumin-kötődését nem befolyásolta a FB4 toxin, azonban az S-kamptotecin szintjét még alacsonyabb koncentrációban (5 és 10 μM) is mérsékelten növelte a szűrletben (18C ábra).

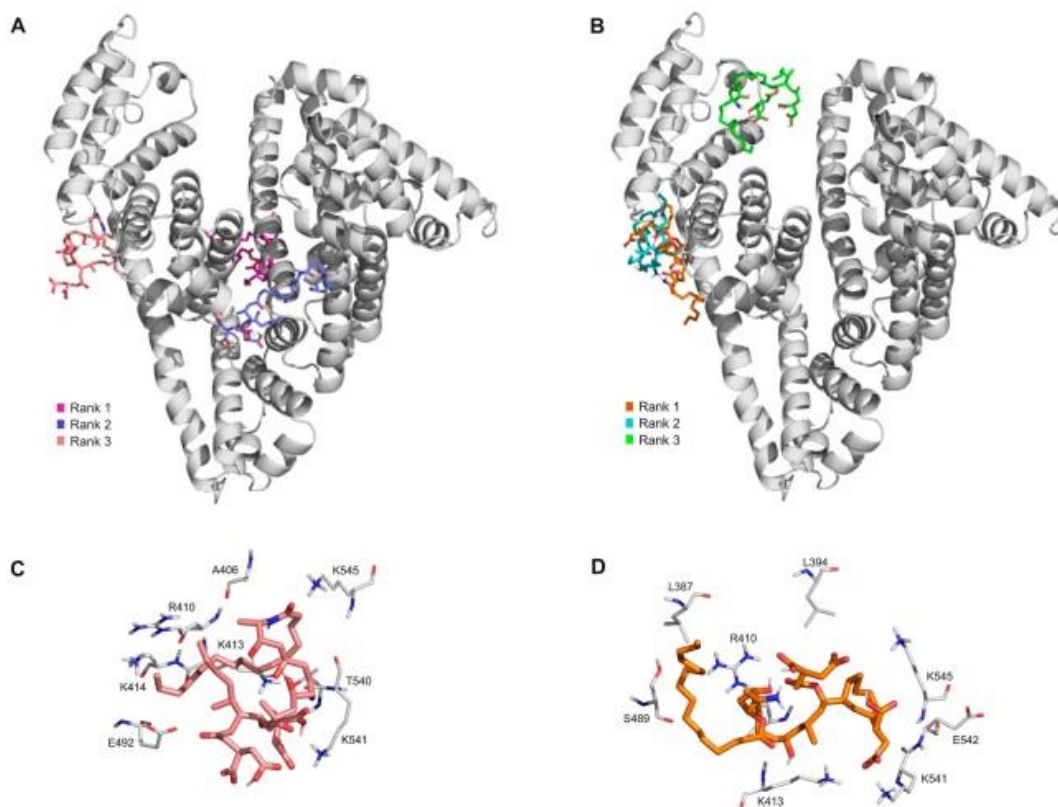
A palmitinsav csökkentette a warfarin koncentrációját a szűrletben (18A ábra). Azonban az *N*-pal-FB1 és az *5-O*-pal-FB1 toxin ellenkező hatást mutatott: magasabb koncentrációjuk (20 μM) jelentősen megemelkedett warfarinszintet eredményezett a szűrletekben (18A ábra). A palmitinsav és az *N*-pal-FB1 toxin mérsékelte, illetve nagymértékű naproxen koncentráció emelkedést okozott a szűrletben (18B ábra). Ezzel szemben az *5-O*-pal-FB1 toxin nem befolyásolta a naproxen-HSA kölcsönhatást. Ezenkívül a palmitinsav és az *5-O*-pal-FB1 toxin nem változtatta meg az S-kamptotecin albumin-kötődését, míg az *N*-pal-FB1 toxin az FA1 „site marker” koncentrációfüggő emelkedését indukálta a szűrt frakcióban (18C ábra).



18. ábra A FB1, N-pal-FB1, 5-O-pal-FB1, palmitinsav és FB4 hatása a warfarin (WAR; (A)), naproxen (NAP; (B)) és S-kamptotecin (CPT; (C)) koncentrációkra (% \pm SEM) a szűrlletben (PBS; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). A „site marker” szintje a szűrlletben minden modellben 100% (lásd fekete szaggatott vonallal) volt, amikor a „site markert” a fehérje nélkül szűrtük, (Csenki et al., 2023).

5.2.4 Molekulamodellés

A két palmitoil-FB1-származék HSA-hoz történő kötési módját vak („blind”) dokkolási számításokkal vizsgáltuk. Az egyes 100 vonalas dokkoló-futtatások alapján eredményeink arra utalnak, hogy kötőhelyeik a Site II bejáratánál találhatók (19. ábra): az első helyen az 5-*O*-pal-FB1, illetve a harmadik helyen az *N*-pal-FB1 toxin esetén. Továbbá az *N*-pal-FB1 toxin két legmagasabb rangú kötési móddal is rendelkezik a Site I közelében.

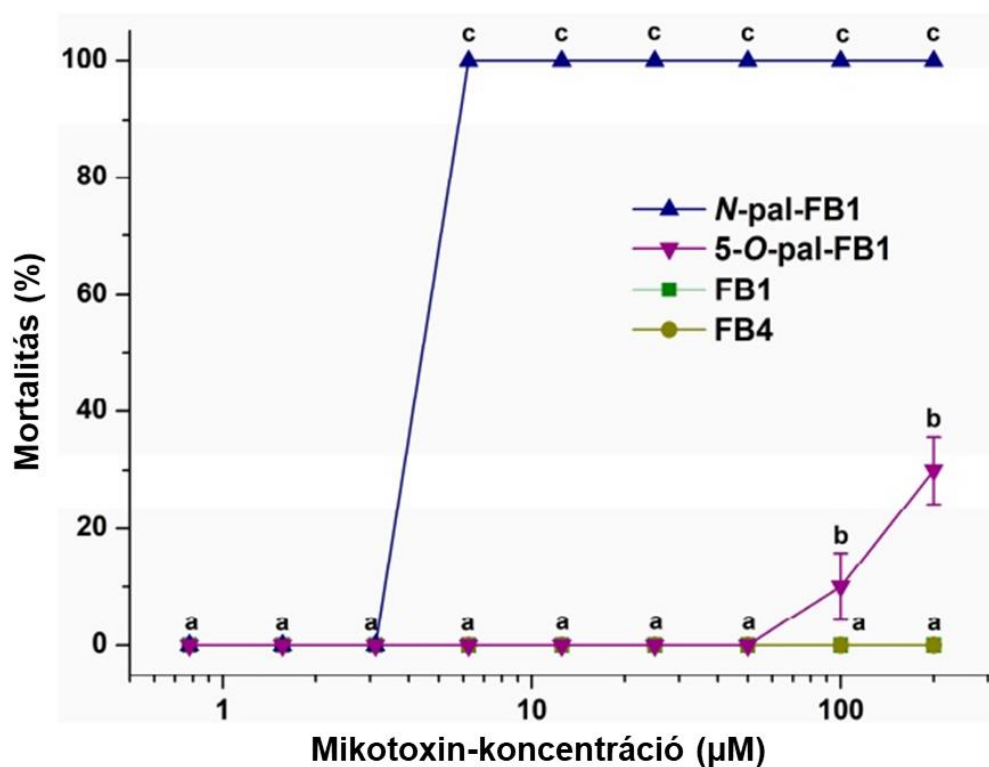


19. ábra Az *N*-pal-FB1 (A) és 5-*O*-pal-FB1 (B) első három rangsorolt kötési módja az albuminon (szürke ábra). Az *N*-pal-FB1 harmadrangú kötési módja ((C), rózsaszín pálcikák), illetve az 5-*O*-pal-FB1 első rangú kötési módja ((D), narancssárga pálcikák); a kölcsönhatásba lépő aminosavakat vastag szürke vonalak jelölik, (Csenki et al., 2023).

A Site II bejáratánál az *N*-pal-FB1 toxin kölcsönhatást alakít ki az R410, K413, K414, E492, K541 és K545 aminosavakkal (19C ábra). A vakdokkolási vizsgálatok során az 5-*O*-pal-FB1 toxin első rangsorolt kötési módját 6,2 Å-re találtuk a diazepam kísérleti kötési módjától (a Site II ismert liganduma), ahol a komplexet hidrofil (R410, E542), hidrofób (L387, L394) és ionos (K541, K545) kölcsönhatások stabilizálják (19C, 19D ábra).

5.2.5 A fumonizinek toxikus hatásának vizsgálata zebradánió embrió modellen

A zebradánió embriók 24 órás kezelése alatt (96 és 120 hpf között) sem az E3 médiumban, sem az oldószeres kontrollokban nem volt megfigyelhető elhullás. A FB1 és a FB4 toxin még 200 μM koncentrációnál sem okozott elhullást (20. ábra), ezzel szemben a 100, valamint 200 μM koncentrációjú 5-*O*-pal-FB1 toxinnal történő kezelés 10, illetve 30%-os mortalitást eredményezett. Az *N*-pal-FB1 toxin pedig már 6,25 μM koncentrációnál is 100%-os mortalitást okozott (20. ábra).



20. ábra 96–120 hpf expozíciós ablakban FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxinnal kezelt 120 hpf korú zebradánió embriók mortalitási aránya (% \pm SEM). A statisztikai elemzéshez kéttényezős variancianalízist („two-way” ANOVA) alkalmaztunk, a többszörös összehasonlítást Tukey-féle post hoc tesztekkel végeztük el (a, b, c: $p < 0,0001$), (Csenki et al., 2023).

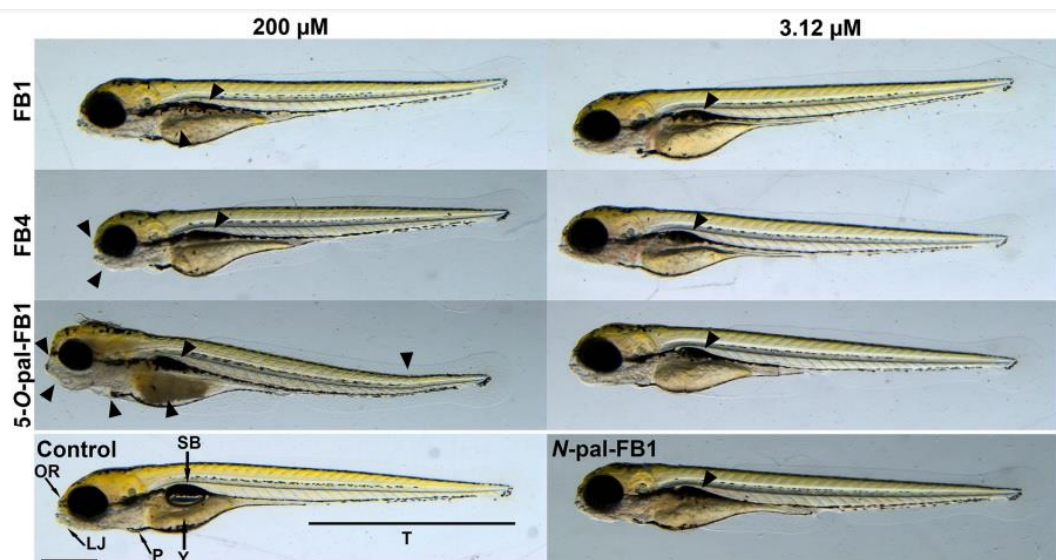
A FB1, FB4 és 5-*O*-pal-FB1 toxin szubletális hatásai 3,12 μM és 200 μM koncentrációban kerültek bemutatásra, míg az *N*-pal-FB1 toxint által kiváltott rendellenességeket 3,12 μM -on értékeltük (6. táblázat). A lapos úszóhólyag (21. ábra) volt az egyetlen, a tesztelt fumonizinek által kiváltott szubletális hatás, amelyet 3,12 μM koncentráció esetén is megfigyeltünk. Ezen hatást leggyakrabban az *N*-pal-FB1 okozta (80%), melyet az 5-*O*-pal-FB1 (50%), a FB4 (30%) és a FB1 (25%) toxin követett. 200 μM koncentrációnál az 5-*O*-pal-FB1 toxin indukálta (100%) ennek a

fenotípusnak a legnagyobb abundanciáját. A szik abnormalis elszíneződését (21. ábra) a 200 μM FB1 toxinnal (15%; statisztikailag nem szignifikáns), FB4 toxinnal (40%) és 5-*O*-pal-FB1 toxinnal (100%) történő kezelést követően figyeltük meg. Fejhibák (az alsó állkapocs és a szaglórégió deformációja; 21. ábra) azokban az embriókban fordultak elő, melyek 200 μM FB4 (30%) és 5-*O*-pal-FB1 (81,3%) hatásának voltak kitéve. A test tengelyének görbületét (71%), illetve ödémákat (15%, statisztikailag nem szignifikáns) csak az 5-*O*-pal-FB1 toxinnal történt kezelés (200 μM ; 21. ábra és 6. táblázat) váltott ki.

6. táblázat Zebradánió embriók fejlődési rendellenességei (% \pm SEM) 24 órás FB1, FB4, 5-*O*-pal-FB1 és *N*-pal-FB1 toxin expozíciót követően

	FB1		FB4		5- <i>O</i> -pal-FB1		<i>N</i> -pal-FB1	Kontroll
	200 μM	3,12 μM	200 μM	3,12 μM	200 μM	3,12 μM	3,12 μM	
Lapos úszóhólyag	85,0 \pm 5,0*	25,0 \pm 9,6*	75,0 \pm 5,0*	30,0 \pm 10,0*	100,0 \pm 0,0*	50,0 \pm 5,8*	80,0 \pm 8,2*	0,0 \pm 0,0
Szik abnormalis elszíneződése	15,0 \pm 5,0	—	40,0 \pm 8,2*	—	100,0 \pm 0,0*	—	—	0,0 \pm 0,0
Fejhibák	—	—	30,0 \pm 5,8*	—	81,3 \pm 12,0*	—	—	0,0 \pm 0,0
Testtengely-görbület	—	—	—	—	70,8 \pm 2,4*	—	—	0,0 \pm 0,0
Ödéma	—	—	—	—	14,6 \pm 8,6	—	—	0,0 \pm 0,0

* $p < 0,0001$



21. ábra Tipikus fejlődési rendellenességek (fekete nyílhegyek) 120 hpf zebradánió embriókban 24 órás FB1, FB4, 5-*O*-pal-FB1 és *N*-pal-FB1 toxin expozíciót követően (OR: szaglórégió; LJ: alsó állkapocs; P: szívburok; T: farok; SB: úszóhólyag; Y: szik; lépték: 500 μm), (Csenki et al., 2023).

Mivel a zsírsavak – így a palmitinsav is – nagy affinitással kötődnek a szérumalbuminhoz, azt feltételeztük, hogy a palmitoil-FB1-származékok is stabil komplexeket képeznek ezzel a fehérjével. Emellett a FB1 és a FB4 viszonylag hidrofíli mikotoxinok, míg az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 erősen lipofíli. Ezért a FB1, valamint a palmitoil-FB1-származékok toxikokinetikai és toxikodinamikai tulajdonságai valószínűleg különböznek egymástól.

A HSA csak egy triptofán aminosavat (Trp-214) tartalmaz, mely a fehérje által kifejtett fluoreszcencia szempontjából a legfontosabb aminosav (Callis, 2014). Mivel a mikrokörnyezetben bekövetkező változások erősen befolyásolhatják a Trp-214 emissziós jelét, a ligandum-albumin kölcsönhatások általában csökkentik a fehérje fluoreszcencia intenzitását, ami a fluoreszcencia kioltási vizsgálatok alapját képezi (Van de Weert & Stella, 2011). A FB1 és FB4 elhanyagolható hatása az albumin emissziós jelére arra utal, hogy ezen toxinok a HSA-val vagy egyáltalán nem képeznek komplexeket, vagy a képződött komplexek éppenhogy csak stabilak. Érdekes módon az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin növelte a HSA fluoreszcencia-kibocsátását (16D és 16E ábra), ezen adatok felhasználásával azonban nem tudtuk kiszámítani a fumonizin-albumin komplexek kötési állandóit a Hyperquad2006 szoftverrel (Lemli et al., 2022). Mindazonáltal feltételezhető, hogy az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin által kiváltott spektrális változások a fehérjével való kölcsönhatásuk eredménye.

Ultracentrifugálással a HSA és az albuminhoz kötött molekulák ülepidíthetők (Boulton et al., 1998; Fliszár-Nyúl et al., 2022), amely után kvantitatívan elemezhető a mikotoxinok nem kötött frakciója a felülúszóban. A fluoreszcencia kioltási vizsgálatokkal összhangban ezek az adatok megerősítették, hogy alacsony affinitású FB1–HSA ($K = 1,6 \times 10^3$ l/mol) és FB4–HSA ($K = 6,6 \times 10^3$ l/mol) komplexek képződtek. Azonban még nagyon kis mennyiségű HSA is erősen csökkentette az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin koncentrációját a felülúszókban. Az albumin bizonyos pszeudoenzimatikus aktivitással rendelkezik (Fanali et al., 2012); ezért az egyik lehetséges magyarázat a palmitoil csoportok HSA-katalizált hasítása. Ennek ellenére nem észleltünk FB1 toxint ezekben a mintákban. Ezért indokolt feltételezni, hogy az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin stabil kölcsönhatásba lép a fehérjével. Ráadásul még 2 μ M koncentrációjú HSA is a meg nem kötött palmitoil-származékok koncentrációjának nagymértékű csökkenését okozta, ami arra utal, hogy az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin több nagy affinitású kötőhelyet foglal el az albuminon. Ebből adódóan nem tudtuk kiszámítani az *N*-pal-FB1-albumin, illetve az 5-*O*-pal-FB1-

albumin komplexek kötési állandóit ezekből az adatokból. Ezekkel az eredményekkel összhangban nagy felbontású röntgenkrisztallográfiai és kétdimenziós NMR analízisek igazoltak számos palmitinsav kötőhelyet a HSA-n, köztük három nagy affinitású kötőhelyet az FA2, FA4 és FA5 helyeken (Simard et al., 2005; Krenzel et al., 2013).

Ultraszűrési technikával azt is megvizsgáltuk, hogy a fumonizinek és a palmitinsav milyen hatást gyakorol a „site marker” gyógyszerek albuminkötődésére. Mivel a HSA (a megkötött „site markerekkel”) a 30 kDa (vagy annál alacsonyabb) MWCO értékkel rendelkező szűrőegységen nem jut át, a megemelkedett „site marker” szint a szűrletben annak HSA-ról való kiszorítását vagy csökkent kötési affinitását mutatja, míg a szűrletben a „site marker” szintjének csökkenése annak HSA iránti fokozott kötési affinitását jelzi (Lemli et al., 2022; Fliszár-Nyúl et al., 2019). A spektroszkópiai és ultracentrifugálási vizsgálatokkal összhangban a warfarin és a naproxen szűrt frakcióit nem befolyásolta a FB1 és FB4 toxin, míg a FB4 toxin csak mérsékelten változtatta meg az S-kamptotecin szűrletben mért koncentrációját (18. ábra). A palmitinsav csökkentette a warfarin koncentrációját a szűrletben (18A ábra), ami összhangban van a korábbi tanulmányokkal, melyekben ugyanez a zsírsav növelte a warfarin HSA-hoz való kötési affinitását (Lemli et al., 2022; Vorum & Honoré, 1996). Továbbá a palmitinsav mérsékelten megemelte a naproxen koncentrációját a szűrletben (18B ábra). Az *N*-pal-FB1 toxin erős (warfarin és naproxen) és mérsékelt (S-kamptotecin) növekedést okozott a „site markerek” szabad frakcióiban, amely jelzi, hogy az *N*-pal-FB1 toxin gátolhatja a vizsgált kötőhelyeket (18. ábra). Másrészt az 5-*O*-pal-FB1 toxin csak a warfarin albumin-kötődését befolyásolta (18A ábra), így az 5-*O*-pal-FB1 toxin is zavarhatja a warfarin-HSA kölcsönhatást. Megfigyeléseink alapján az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 toxin megváltoztatta a gyógyszer-albumin kölcsönhatásokat. A palmitoil-FB1-származékok a FB1 toxinhoz vagy a palmitinsavhoz képest eltérő hatást mutattak, ami arra utal, hogy ezek kötőhelyei és/vagy kötési pozíciói eltérnek egymástól a HSA-n.

A vak dokkolási vizsgálatok alapján az *N*-pal-FB1 toxin harmadik rangú kötőhelye a Site II. bejáratánál található (19A, 19C ábra), amely lehetővé teszi a naproxen kiszorítását, ahogyan azt az ultraszűrési kísérletekben is megfigyeltük (18B ábra). Továbbá az *N*-pal-FB1 toxin első- és másodrangú kötőhelye a Site I közelében volt, mely magyarázatot ad a warfarin kiszorítására (18. ábra). A molekulamodellezés alapján az 5-*O*-pal-FB1 toxin legjobb kötőhelyei a Site II-n helyezkednek el, azonban

az ultraszűrési kísérletekben a naproxen szűrt frakcióját nem befolyásolta az 5-*O*-pal-FB1 toxin (18B ábra).

A korai teratogén hatások elkerülése érdekében a zebradánió embriók fumonizinnel történő kezelése 24 órás időablakban történt, 96 és 120 hpf között (Yang et al., 2009). 96 hpf-ig az összes fontosabb szerv kifejlődik, így a toxikus anyagokra adott válasz a felnőttkori fiziológiát tükrözi (Yang et al., 2007). Továbbá 96 hpf-nél az embriók szája kinyílik, ami egy másik lehetséges útvonalat biztosít arra, hogy a mérgező anyagok bejuthassanak a szervezetbe. A FB1 és FB4 toxin expozíció hatására nem figyeltünk meg mortalitást. Az 5-*O*-pal-FB1 toxin magas szintje (100 és 200 μ M) 10-30%-os mortalitáshoz vezetett, míg az *N*-pal-FB1 toxin 100%-os mortalitást eredményezett 6,25 μ M koncentrációnál (20. ábra). Ezek az adatok bizonyítják a palmitoil-FB1-származékok FB1 toxinhoz viszonyított erőteljesebb toxikus hatását, és arra is rávilágítanak, hogy az *N*-pal-FB1 toxin még az 5-*O*-pal-FB1 toxinhoz képest is jóval mérgezőbb. A mortalitási eredményekhez hasonlóan a szubletális adatok is a következő toxicitási sorrendet mutatták: *N*-pal-FB1 > 5-*O*-pal-FB1 > FB4 > FB1 (6. táblázat). A FB1 toxin számos teratogén hatást okozhat, például magzati halált, fejlődési rendellenességeket és visszamaradást a növekedésben (Gao et al., 2023). A korábbi vizsgálatok során vízfejűség, csontosodás és rövid/hullámos bordák fordultak elő egérembriók esetében, miután a vemhes anyákat 11 napig etették 100 mg/kg FB1 toxinnal (Gross et al., 1994), míg patkányoknál az embriók nem mutattak jelentős teratogén hatást a vemhes anyák 15 mg/kg FB1 toxinnal, 17 napon át történő etetését követően (Collins et al., 1998). Azman et al. (2020), az ivást követően 4 órával zebradánió embriókat FB1 toxinnal tettek ki 28 ± 2 °C-on (a legmagasabb koncentráció: 1,4 μ M volt), amely eredményeképpen gerincgörcbületet, farokfejlődési rendellenességet és szívburok ödémát figyeltek meg 96 hpf és 120 hpf korú embrióknál. Kísérletünkben ugyanezt a szubletális hatást tapasztaltuk zebradánió embriókban a 200 μ M koncentrációjú 5-*O*-pal-FB1 toxinnal történő kezelés után. Mindazonáltal kísérletünkben az embriókat 96 hpf-től 120 hpf-ig kezeltük fumonizinekkel, ami kizárja a korai fejlődési hatásokat, amelyek súlyosabbak lehetnek. Egy másik – 4 és 96 hpf között kezelt – zebradánió embriókon végzett vizsgálat során a FB1 toxin 96 órás LC₅₀ értéke 384 μ M volt (Du Plessis et al., 2019), ami egybevág a FB1 toxin alacsony akut toxicitására utaló eredményeinkkel.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A korábbi fejezetekben már említésre került, hogy a *F. verticillioides* törzsek képesek acilezett FB1-származékok bioszintézisére is. A részben hidrolizált FB1 (PHFB1) (Sydenham et al., 1995) és hidrolizált FB1 (HFB1) (Poling & Plattner, 1999) korábban publikált elnevezése alapján ezeket a komponenseket Bartók et al. (2010b) észterezett FB1 toxinoknak (EFB1, *izo*-EFB1) nevezték el, az észterezésben részt vevő zsírsavat (linolsav, olajsav vagy palmitinsav) a név utolsó két karakterében feltüntetve (EFB1LA, *izo*-EFB1LA, EFB1OA, *izo*-EFB1OA, EFB1PA, *izo*-EFB1PA). Néhány évvel később észrevették, hogy bizonyos törzsek *N*-acil-FB1-származékok bioszintézisére is képesek (Bartók et al., 2013a). Összesen hat *O*-acil- és három *N*-acil-FB1 komponenst tudtak detektálni, és 3D ioncsapdás tömegspektrométerrel rögzítették ezek MS² spektrumát, valamint repülési idő tömegspektrométerrel meghatározták pontos tömegüket. Három különböző acilcsoportot (palmitoil, linoleoil és oleoil) figyeltek meg. Norred et al. (2001) leírták az FA1 toxin *N*-acilcsoportjának (ami valójában *N*-acil-FB1) savas közegben történő *N*→*O*-acil migrációját a szénlánc 3-as és 5-ös szénatomjának OH csoportjára. Ez alapján Bartók et al. úgy vélték, hogy kromatogramjaik a 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-acil-FB1-származékokat is ebben az elúciós sorrendben mutatják. Emellett az *N*-palmitoil-FB1 toxin előállításával korábban kimutatták, hogy a *F. verticillioides* gombakivonat reakcióelegyének adagolása során az *N*-acil-FB1-származékok az *O*-acil-FB1-származékok után eluálódnak. A minták pozitív és negatív ion módban történő HPLC/ESI-MS analízisével könnyen meghatározható, hogy az elválasztott acilezett FB1-származékok *O*- vagy *N*-acilezett vegyületek-e, ugyanis az *O*-acil-származékok pozitív ion módban magasabb jel/zaj arányt adnak (a primer aminocsoportok savas környezetben könnyen protonálhatóak), míg az *N*-acil-származékok negatív ion módban adnak magasabb jel/zaj arányt (amikor a primer aminocsoport az acileződés következtében már nem képes protonálódni).

Az adalékolási kísérlet során igazoltuk, hogy a gomba 5-*O*-pal-FB1 és *N*-pal-FB1 toxint is termelt, mivel a szintetikus előállított palmitoil-származékok eredeti gombakivonathoz történő hozzáadása a korábban feltételezett csúcsok (Bartók et al., 2013a) területének növekedését eredményezte. Ezzel szemben a kivonat 3-*O*-palmitoil-FB1 toxinnal való kiegészítése nem eredményezte a korábban 3-*O*-palmitoil-FB1 toxinnak tulajdonított csúcs növekedését, hanem rövidebb retenciósi idővel jelent meg a kromatogramokon ott, ahol a gombakivonat nem tartalmazott

mérhető komponenst, vagyis a gomba nem termelt 3-*O*-palmitoil-FB1 toxint. Emellett a 3-*O*-palmitoil-FB1 adalékolási kísérlete során az *N*-palmitoil-FB1 csúcsmagassága is megnőtt. Ez annak volt köszönhető, hogy a 3-*O*-palmitoil-FB1 rendkívül instabil. Korábban említésre került, hogy a tiszta 3-*O*-palmitoil-FB1 frakciók centrifugális bepárlása és liofilizálása során az *O*→*N* acil migráció következtében körülbelül 10% *N*-palmitoil-FB1 toxin volt kimutatható a kristályos végtermékben. Mivel bebizonyosodott, hogy a gomba nem termelt 3-*O*-palmitoil-FB1 toxint, valamint az egyetlen megmaradt csoport, ahol az acilezés megtörténhet, a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport, a korábban 3-*O*-pal-FB1-származéknak vélt komponens feltehetően a 10-*O*-pal-FB1. Bartók et al. (2010b, 2013a) leírták, hogy az általuk vizsgált *F. verticillioides* törzs nemcsak palmitoil-, hanem linoleoil- és oleoil-FB1-származékokat is termel. Feltételezhető, hogy a korábban 3-*O*-linoleoil-FB1-nek és 3-*O*-oleoil-FB1-nek vélt származékok valójában 10-*O*-acil-származékok. E vegyületek azonosításához szilárdfázisú fermentációs mintákból kellene izolálni őket, majd szerkezetüket NMR-rel és tömegspektrometriával ellenőrizni, mivel a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport a szintetikus acilezés során nem preferált.

A palmitinsav-albumin komplexek nagyfokú stabilitásából (Ashbrook et al, 1975; Rose et al., 1994) kiindulva feltételeztük, hogy a FB1 toxin palmitoil-származékai is kölcsönhatásba lépnek majd a fehérjével. Így a FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxin HSA-val történő kölcsönhatását fluoreszcencia spektroszkópiái, ultracentrifugálási, ultraszűrési és modellező vizsgálatok segítségével vizsgáltuk, illetve feltételeztük, hogy az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin a FB1 és FB4 toxinnál magasabb akut toxicitást okoz. Ezenkívül a FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxin toxikus hatásának vizsgálata céljából zebradánió embriókon teszteltük ezen mikotoxinok okozta mortalitást és szubletális toxikus hatást. Kutatásunk során arra az eredményre jutottunk, hogy a FB1–HSA és FB4–HSA komplexek kötési állandói alacsonyak, ezzel szemben a palmitoil-FB1-származékok nagy affinitással kötődnek a fehérjéhez. Továbbá, az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 toxin valószínűleg több nagy affinitású kötőhelyet foglal el az albuminon. Az *N*-pal-FB1 toxin 6,25 µM koncentrációnál 100%-os mortalitást okozott, míg a többi vizsgált mikotoxin nagyon magas szintje (100 µM és 200 µM) vagy egyáltalán nem okozott mortalitást (FB1 és FB4) vagy csak alacsonyabb mértékűt (5-*O*-pal-FB1). Figyelembe véve ezen mikotoxinok zebradánió embriókra gyakorolt szubletális hatásait, a következő toxicitási sorrendet állapítottuk meg: *N*-pal-FB1 > 5-*O*-pal-FB1 > FB4 > FB1.

Eredményeink alátámasztják, hogy az *N*-pal-FB1 és *5-O*-pal-FB1 toxin sokkal nagyobb affinitással kötődik a szérumalbuminhoz, mint a FB1 toxin, ezért a palmitoil-származékok toxikokinetikai tulajdonságai nagy eltéréseket mutathatnak a FB1 toxinéhoz képest. Vizsgálataink szolgáltatják az első *in vivo* toxicitási adatokat az *N*-pal-FB1, *5-O*-pal-FB1 és FB4 toxin vonatkozásában. Eredményeink rávilágítanak az acilezett FB1-származékok toxikológiai jelentőségére.

Tekintettel arra, hogy jelenleg az Európai Unióban élelmiszerek esetén a határérték, takarmányok esetén pedig az ajánlás csak a FB1 és FB2 toxin együttes mennyiségére létezik, a jövőben feltétlenül fontos lenne az acilezett fumonizinek előfordulásának vizsgálata különböző élelmiszeripari alapanyagokban, félkész- és késztermékekben, szükség esetén pedig határértékek megállapítása az acilezett FB1-származékokra is.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A célkitűzésim mentén elvégzett vizsgálataim alapján az alábbi új eredményekre jutottam:

1. A tisztán kinyert FB1 toxint sikeresen acileztem palmitoil-klorid/trietilamin reagenssel, mely eredményeképpen *N*-pal-FB1, és *O*-pal-FB1 toxinokat állítottam elő.
2. A gombakivonatban lévő acilezett FB1-származékokat sikeresen azonosítottam adalékolási kísérletet segítségével.
3. Az előállított acilezett FB1 toxin származékok nagyfelbontású tömegspektrometriával (HRMS) és magmágneses rezonancia spektroszkópiával (NMR) sikeresen azonosítva lettek.
4. Fluoreszcencia spektroszkópiai, ultracentrifugálási, ultraszűrési és modellező vizsgálataink eredménye alapján bizonyítást nyert, hogy az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 toxin nagy affinitással kötődik a humán szérumalbuminhoz, és feltehetően több nagy affinitású kötőhelyet foglalnak el az albuminon.
5. Elsőként vizsgáltuk az *N*- és *O*-palmitoil származékok toxicitását állatkísérletben, zebradánió embriókon. A vizsgált acilezett FB1-származékok (*N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1) toxikusabbak nemcsak a FB1, hanem a FB4 toxinnál is.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A FB1 toxin a humán- és állategészségügyi szempontból legveszélyesebb mikotoxinok közé tartozik. Élelmiszerbiztonsági kockázattal főleg a kukoricából készült termékek esetén kell számolni, mivel a legjelentősebb fumonizin-termelők a (*Fusarium verticillioides* és a *Fusarium proliferatum*), elsősorban a kukoricát fertőzik. Hazánkban a kukorica ugyan nem tartozik az alapvető táplálékok közé, azonban magasabb fogyasztással számolhatunk lisztérzékenyek és kisgyermekek körében, akik humánegészségügyi szempontból eleve a nagyobb kockázatnak kitett fogyasztók körébe tartoznak. A problémát tovább súlyosbítja a tény, hogy az elmúlt évtizedben újonnan felfedezett acilezett FB1-származékok közül az *N*-palmitoil-FB1 sejttenyészetekben toxikusabbnak bizonyult a FB1 toxinnál.

Doktori munkám egyik legfontosabb részét a FB1 toxin palmitinsavval acilezett származékainak toxicitási vizsgálatait jelentették. A kísérletek elvégzéséhez megfelelő mennyiségű tiszta FB1 toxinra volt szükség. A FB1 toxin előállításához szilárdfázisú fermentációt alkalmaztunk, Fumizol 977/13-as törzsszámú *Fusarium verticillioides* izolátum felhasználásával. A FB1 toxin tisztán történő kinyerésére preparatív flash- és folyadékkromatográfiai eljárásokat alkalmaztunk.

A toxicitási vizsgálatok elvégzéséhez az acilezett FB1-származékokat a fermentációs mintákból kinyert és megtisztított FB1 toxin palmitoil-kloriddal történő szintetikus acilezésével állítottuk elő. Az így kapott komponensek azonosítására a fermentáció során előállított gombakivonatot felhasználva adalékolási kísérletet végeztünk. Vizsgálatunk eredménye arra enged következtetni, hogy a korábban 3-*O*-pal-FB1-nak vélt acilezett FB1-származék (Bartók et al., 2013a) valójában 10-*O*-pal-FB1 volt.

Kísérleteket végeztünk az acilezett FB1-származékok, valamint a FB1 és FB4 toxin humán szérumalbuminnal történő kölcsönhatására. A FB1 és FB4 toxin alacsony albumin kötődési affinitásával ellentétben a FB1 toxin palmitoil-származékai (*N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1) stabil komplexeket képeztek az albuminnal. Emellett feltételezhető, hogy az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 több nagy affinitású kötőhelyet foglal el az albuminon.

Elsőként mi vizsgáltuk az *N*-pal-FB1, az 5-*O*-pal-FB1 és a FB4 toxin *in vivo* toxicitását, mely során a FB1 toxint használtuk kontrollként. Mivel a 3-*O*-palmitoil-FB1 még preparatív HPLC-vel végzett tisztítás után sem volt stabil, valamint a

preparatív HPLC oszlopról eluáló frakciókban a bepárlás és a liofilizálás során *O*→*N*-*acil-vándorlás* volt megfigyelhető, a 3-*O*-palmitoil-FB1 toxin toxicitásának megállapítására nem végeztünk kísérletet. Az általunk vizsgált mikotoxinok zebradánió embriókra gyakorolt toxikus hatása alapján a következő toxicitási sorrendet állítottuk fel: *N*-pal-FB1 > 5-*O*-pal-FB1 > FB4 > FB1.

9. SUMMARY

The FB1 toxin is one of the most dangerous mycotoxins in terms of human and animal health. A food safety risk must be taken into account mainly in the case of products made from corn, since the most important fumonisin producers (*Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*) primarily infect corn. In our country, corn is not a staple food, but we can count on a higher consumption among people with celiac disease and children, who are already among the consumers exposed to a higher risk. The problem is further aggravated by the fact that among the newly discovered acylated FB1 derivatives, *N*-palmitoyl-FB1 proved to be more toxic than the FB1 toxin in cell cultures.

The most important part of my doctoral research was the toxicity studies of derivatives of FB1 toxin acylated with palmitic acid. Adequate amounts of pure FB1 toxin were required to perform the experiments. For the production of the FB1 toxin, solid-phase fermentation was performed, using the *Fusarium verticillioides* isolate with strain number Fumizol 977/13. After the incubation period, preparative flash and liquid chromatography procedures were used to purely extract the FB1 toxin.

To perform the toxicity tests, the acylated FB1 derivatives were prepared by the synthetic acylation of the previously extracted and purified FB1 toxin with palmitoyl chloride. In order to identify the obtained components, a spiking experiment was carried out using the fungal extract. The results of our study suggest that the acylated FB1 derivative previously hypothesized to be 3-*O*-pal-FB1 (Bartók et al., 2013a) was actually 10-*O*-pal-FB1.

Experiments were carried out to study the interaction of acylated FB1 derivatives and FB1 and FB4 toxins with human serum albumin. In contrast to the low albumin binding affinity of FB1 and FB4 toxins, the palmitoyl derivatives of FB1 toxin (*N*-pal-FB1 and 5-*O*-pal-FB1) formed stable complexes with the albumin. In addition, it is assumed that *N*-pal-FB1 and 5-*O*-pal-FB1 occupy several high-affinity binding sites on albumin.

We were the first to investigate the toxicity of *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 and FB4 toxin *in vivo*, using the FB1 toxin as a control. Since 3-*O*-palmitoyl-FB1 was not stable even after purification by preparative HPLC, and *O*→*N*-acyl migration was observed in the fractions eluting from the preparative HPLC column during evaporation and lyophilization, we did not conduct an experiment to study the toxicity

of 3-*O*-pal-FB1. Based on the toxic effects of the mycotoxins examined on zebrafish embryos, we established the following order of toxicity: *N*-pal-FB1 > 5-*O*-pal-FB1 > FB4 > FB1.

10. MELLÉKLET

IRODALOMJEGYZÉK

- Abramović, B.F., Jakšić, S.M., Mašić, Z.S. (2005): Efficiency of crude corn extract clean-up on different columns in fumonisin determination. *Proc Nat Sci Matica Srpska* 108, 95-102.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., van Schalkwyk, D.J., Behrend Y. (1990): Effects of temperature and incubation period on the production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1729-1733.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Vleggaar, R., Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P. (1993): Production of [¹⁴C] fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme* MRC 826 in corn cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2673-2677.
- Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A., Sargeant, K., O'Kelly, J. (1961): A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Veterinary Record* 73, 428-429.
- Ashbrook, J.D., Spector, A.A., Santos, E.C., Fletcher, J.E. (1975): Long chain fatty acid binding to human plasma albumin. *Journal of Biological Chemistry* 250, 2333-2338.
- Azman, N., Zainudin, N.A.I.M., Ibrahim, W.N.W. (2020): Fumonisin B1 Production by *Fusarium* Species and Mycotoxigenic Effect on Larval Zebrafish. *Tropical Life Sciences Research* 31, 91-107.
- Badiali, L., Abou-Youssef, M.H., Radwan, A.I., Hamdy, F.M., Hildebrandt, P.K. (1968): Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in Egyptian equidae. *American Journal of Veterinary Research* 29, 2029-2035.
- Barna-Vetró, I., Szabó, E., Fazekas, B., Solti, L. (1999): ELISA teszt fumonizin B1 mérésére. *Növényvédelem* 35, 609-617.
- Barna-Vetró, I., Szabó, E., Fazekas, B., Solti, L. (2000): Development of a sensitive ELISA for the determination of fumonisin B1 in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2821-2825.
- Barna-Vetró, I., Solti, L. (2001): Enzim-immunanalitikai módszerek mikotoxinok mérésére. in, *Penészgombák és mikotoxinok a táplálékláncban*, szerk. Kovács F, MTA Agrártudományok Osztálya kiadványa, 29-41.
- Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á., Bartók, M. (2006): Detection of new fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2447-2462.

Bartók, T., Szekeres, A., Szécsi, Á., Bartók, M., Mesterházy, Á. (2008): A new type of fumonisin series appeared on the scene of food and feed safety. *Cereal Research Communications* 36, 315-319.

Bartók, T., Tölgyesi, L., Szekeres, A., Varga, M., Bartha, R., Szécsi, Á., Bartók, M., Mesterházy, Á. (2010a): Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B1 (FB1) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 35-42.

Bartók, T., Tölgyesi, L., Mesterházy, Á., Bartók, M., Szécsi, Á. (2010b): Identification of the first fumonisin mycotoxins with three acyl groups by ESI-ITMS and ESI-TOFMS following RP-HPLC separation, palmitoyl, linoleoyl and oleoyl EFB1 fumonisin isomers from a solid culture of *Fusarium verticillioides*. *Food Additives & Contaminants* 27, 1714-1723.

Bartók, T. (2011): Új fumonizin mikotoxinok azonosítása HPLC/MS módszerekkel. MTA Doktori Értekezés.

Bartók, T., Szécsi, Á., Juhász, K., Bartók, M., Mesterházy, Á. (2013a): ESI-MS and MS/MS identification of the first ceramide analogues of fumonisin B1 mycotoxin from a *Fusarium verticillioides* culture following RP-HPLC separation. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30, 1651-1659.

Bartók, T., Tölgyesi, L., Szécsi, Á., Varga, J., Bartók, M., Mesterházy, Á., Gyimes, E., Véha, A. (2013b): Identification of unknown isomers of fumonisin B5 mycotoxin in a *Fusarium verticillioides* culture by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36, 1549-1561.

Bartók, T., Tölgyesi, L., Szécsi, Á., M., Mesterházy, Á., Bartók, M., Gyimes, E., Véha, A. (2014): Detection of previously unknown fumonisin P analogue mycotoxins in a *Fusarium verticillioides* culture by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 52, 508-513.

Bezuidenhout, G.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allam, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G., Vlegaar, R. (1988): Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 743-745.

Blackwell, B.A., Edwards, O.E., Fruchier, A., ApSimon, J.W., Miller, J.D. (1996): NMR structural studies of fumonisin B1 and related compounds from *Fusarium moniliforme*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 392, 75-91.

Booth, C. (1971): The Genus *Fusarium*. CMI, Eastern Press, UK. 237.

- Boulton, D.W., Walle, U.K., Walle, T. (1998): Extensive Binding of the Bioflavonoid Quercetin to Human Plasma Proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50, 243-249.
- Brand, M., Granato, M., Nüsslein-Volhard, C. (2002): Keeping and raising zebrafish. In *Zebrafish*; Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R., Eds.; Oxford University Press: Oxford, UK, Chapter 1, 7-37.
- Branham, B.E., Plattner, R.D. (1993): Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 124, 99-104.
- Brownie, C.F., Cullen, J. (1987): Characterization of experimentally induced equine leukoencephalomalacia (ELEM) in ponies (*Equus caballus*): Preliminary report. *Veterinary and Human Toxicology* 29, 34–38.
- Butchko, R.A.E., Plattner, R.D., Proctor, R.H. (2006): Deletion analysis of *FUM* genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9398-9404.
- Caldas, E.D., Sadilkova, K., Ward, B.L., Jones, A.D., Winter, C.K., Gilchrist, D.G. (1998): Biosynthetic studies of fumonisin B1 and AAL toxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4734-4743.
- Callis, P.R. (2014): Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation. *Journal of Molecular Structure* 1077, 22-29.
- Caramelli, M., Dondo, A., Cortellazzi, C.G., Visconti, A., Minervini, F., Doko, M.B., Guarda, F. (1993): Leukoencephalomalacia in the equine caused by fumonisins: first report in Italy. *Ippologia* 4, 49-56.
- Chai, W., Leteux, C., Lawson, A.M., Stoll, M.S. (2003): On-line overpressure thin-layer chromatographic separation and electrospray mass spectrometric detection of glycolipids. *Analytical Chemistry* 75, 118-125.
- Christensen, C.H., Kaufmann, H.H. (1969): Grain Storage: The role of fungi in quality loss. Minneapolis: University of Minnesota Press, 159.
- Chu, F.S., Li, G.Y. (1994): Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 847-852.
- Churchwell, M.I., Cooper, W.M., Howard, P.C., Doerge, D.R. (1997): Determination of fumonisins in rodent feed using HPLC with electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2573-2578.
- Collins, T.F.X., Shackelford, M.E., Sprando, R.L., Black, T.N., Láborde, J.B., Hansen, D.K., Eppley, R.M., Trucksess, M.W., Howard, P.C., Bryant, M.A., Ruggles, D.I.,

- Olejnik, N., Rorie, J.I. (1998): Effects of Fumonisin B1 in Pregnant Rats. *Food and Chemical Toxicology* 36, 397-408.
- Colvin, B.M., Cooley, A.J., Beaver, R.W. (1993): Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathological findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 232–241.
- Csenki, Z., Bartók, T., Bock, I., Horváth, L., Lemli, B., Zsidó, B.Z., Angeli, C., Hetényi, C., Szabó, I., Urbányi, B., Kovács, M., Poór, M. (2023): Interaction of Fumonisin B1, N-Palmitoyl-Fumonisin B1, 5-O-Palmitoyl-Fumonisin B1, and Fumonisin B4 Mycotoxins with Human Serum Albumin and Their Toxic Impacts on Zebrafish Embryos. *Biomolecules* 13, 755.
- Dang, H.A., Zsolnai, A., Kovács, M., Bóta, B., Mihucz, G., Pósa, R., Marosi, K., Kachlek, M., Szabó-Fodor, J. (2019): The effect of fumonisins producing *Fusarium verticillioides* on the microbiota in pig caecum. *Acta Veterinaria Brno* 88, 65–71.
- De Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., de Groot, D. (2012): Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. *Neurotoxicology and Teratology* 34, 545-553.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H. (2007): Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119, 47-50.
- Di Paola, D., Iaria, C., Capparucci, F., Arangia, A., Crupi, R., Cuzzocrea, S., Spano, N., Gugliandolo, E., Peritore, A.F. (2022): Impact of mycotoxin contaminations on aquatic organisms: Toxic effect of aflatoxin B1 and fumonisin B1 mixture. *Toxins* 14, 518.
- Doerge, D.R., Howard, P.C., Bajic, S., Preece, S., Games, D.E. (1994): Determination of fumonisins using on-line liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8, 603-606.
- Domán, I. (1952): Tömeges megbetegedések hízó sertések között. *Magyar Állatorvosok Lapja* 7, 202-208.
- Du Plessis, B., Regnier, T., Combrinck, S., Heinrich, P., Braunbeck, T. (2019): Effect of pH on the toxicity of fumonisins towards the RTL-W1 cell line and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicology Letters* 313, 101-107.
- Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H., Le Bars, J. (1993): Thermostability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2864-2867.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2005): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *EFSA Journal* 4(7), 235, 1-32.
- Európai Bizottság, ajánlás, 2006/576/EK, 2006.augusztus 17. A dezoxinivalenol, a zearalenon, az ochratoxin-A, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról. Elérhető: <https://eur-lex.europa.eu/legal->

[content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006H0576&qid=1706772249614](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006H0576&qid=1706772249614)

Lekérdezés időpontja: 2024. január 25.

Európai Bizottság, rendelet, 401/2006/EK, 2006. február 23. Az élelmiszerek mikotoxintartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról. Elérhető: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R0401> Lekérdezés időpontja: 2024. január 25.

Európai Bizottság, rendelet, (EU) 2023/915, 2023. április 25. Az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeiről és az 1881/2006/EK rendelet hatályon kívül helyezéséről. Elérhető: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32023R0915> Lekérdezés időpontja: 2024. január 25.

Falavigna, C., Lazzaro, I., Galaverna, G., Battilani, P., Dall'Asta, C. (2013): Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, 1606–1613.

Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., Ascenzi, P. (2012): Human Serum Albumin: From Bench to Bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 33, 209-290.

Fazekas, B., Bajmóczy, E. (1996): A lovak fumonizin B1 mikotoxin okozta agylágyulásának előfordulása Magyarországon. *Magyar Állatorvosok Lapja* 51, 484-487.

Fazekas, B., Bajmóczy, E., Glávits, R., Fenyvesi, A., Tanyi, J. (1998): Fumonisin B1 Contamination of Maize and Experimental Acute Fumonisin Toxicosis in Pigs. *Journal of Veterinary Medicine B* 45, 171-181.

Fazekas, B., Koncz-Tar, A., Tóth-Hajdú, E., Zomborszky-Kovács, M. (2000): Reusability of immunoaffinity columns for determination of fumonisins in maize. *Natural Toxins* 7, 259-263.

Fliszár-Nyúl, E., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., Dellafiora, L., Dall'Asta, C., Cruciani, G., Pethő, G., Poór, M. (2019): Interaction of Mycotoxin Alternariol with Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2352.

Fliszár-Nyúl, E., Faisal, Z., Skaper, R., Lemli, B., Bayartsetseg, B., Hetényi, C., Gömbös, P., Szabó, A., Poór, M. (2022): Interaction of the Emerging Mycotoxins Beauvericin, Cyclopiazonic Acid and Sterigmatocystin with Human Serum Albumin. *Biomolecules* 12, 1106.

Foreman, J.H., Constable, P.D., Waggoner, A.L., Levy, M., Eppley, R.M., Smith, G.W., Tumbleson, M.E., Haschek, W.M. (2004): Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B1 intravenously. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(2), 223-230.

Gao, Z., Luo, K., Zhu, Q., Peng, J., Liu, C., Wang, X., Li, S., Zhang, H. (2023): The natural occurrence, toxicity mechanisms and management strategies of Fumonisin B1: A review. *Environmental Pollution* 320, 121065.

- Gasteiger, J., Marsili, M. (1980): Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36, 3219-3228.
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vlegaar, R., Kriek, N.P.J. (1988): Fumonisin – Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1806-1811.
- Giannitti, F., Diab, S.S., Pacin, A.M., Barrandeguy, M., Larrere, C., Ortega, J., Uzal, F.A. (2011): Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31, 407–412.
- Gross, S.M., Reddy, R.V., Rottinghaus, G.E., Johnson, G., Reddy, C.S. (1994): Developmental effects of fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture extract in CD1 mice. *Mycopathologia* 128, 111-118.
- Gumprecht, L.A., Beasley, V.R., Weigel, R.M., Parker, H.M., Tumbleson, M.E., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Haschek, W.M. (1998): Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicologic Pathology* 26, 777–788.
- Haq, M., Gonzalez, N., Mintz, K., Jaja-Chimedza, A., De Jesus, C.L., Lydon, C., Welch, A.Z., Berry, J.P. (2016): Teratogenicity of Ochratoxin A and the Degradation Product, Ochratoxin α , in the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model of Vertebrate Development. *Toxins* 8, 40.
- Harrer, H., Laviad, E.L., Humpf, H.U., Futerman, A.H. (2013): Identification of *N*-acyl-fumonisin B1 as new cytotoxic metabolites of fumonisin mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research* 57, 516-522.
- Haschek, W.M., Motelin, G., Ness, D.K., Harlin, K.S., Hall, W.F., Vesonder, R.F., Peterson, R.E., Beasley, V.R. (1992): Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia* 117, 83–96.
- Haschek, W.M., Gumprecht, L.A., Smith, G., Tumbleson, M.E., Constable, P.D., (2001): Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives* 109 (Suppl. 2), 251–257.
- Hendrich, S., Miller, K.A., Wilson, T.M., Murphy, P.A. (1993): Toxicity of *Fusarium proliferatum*-fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: Effect of nutritional status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1649-1654.
- Hines, H.B., Brueggemann, E.E., Holcomb, M., Holder, C.L. (1995): Fumonisin B1 analysis with capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9, 519-524.
- Holcomb, M., Thompson, H.C., Hankins, L.J. (1993): Analysis of fumonisin B1 in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 764-767.

Humpf, H.U., Schmelz, E.M., Meredith, F.I., Vesper, H., Vales, T.R., Wang, E., Menaldino, D.S., Liotta, D.C. Merrill, A.H. (1998): Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 19060-19064.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002): Fumonisin B1. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some traditional medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. No. 82. Lyon (France), IARC; 301–366.

Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., van der Walt, F.E. (1987): Oesophageal and other main cancer patterns in four districts of Transkei, 1981-1984. *South African Medical Journal* 72, 27-30.

Jovanović, M., Trailović, D., Kukulj, V., Nešić, S., Marinković, D., Nedeljković-Trailović, J., Jakovac Strajn B., Milićević, D. (2015): An outbreak of fumonisin toxicosis in horses in Serbia. *World Mycotoxin Journal* 8(4), 387–391.

Juan-García, A., Blind, M.A., Engert, F. (2020): Larval zebrafish as an *in vitro* model for evaluating toxicological effects of mycotoxins. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 202, 110909.

Kakuk, T. (1995) A sertések sajátos hizlalási tüdőviznyőjének kóroktana napjaink mikotokinkutatásának tükrében. Egy régi kórkép új értelmezése? *Magyar Állatorvosok Lapja* 50, 405-406.

Kátay, Gy., Szécsi, Á., Tyihák, E. (2001): Separation of fumonisins by OPLC. *Journal of Planar Chromatography* 14, 53-56.

Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Pienaar, J.G., Naudé, T.W. (1972): A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon: A preliminary communication. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 39, 205-8.

Kellerman, T.S., Marasas, WFO, Thiel, P.G., Gelderblom, W.C., Cawood, M., Coetzer, J.A. (1990): Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 57, 269–275.

Kim, E.K., Scott, P.M., Lau, B.P.Y. (2003): Hidden fumonisins in corn flakes. *Food Additives & Contaminants* 20, 161-169.

Kim, W.Y., Kim, Y.H., Lee, J.Y., Kim, J.H., Min, T.J. (2020): Evaluation of the Toxicity of Sugammadex in Zebrafish Larvae. *Journal of Korean Medical Science* 35 e51.

Knutsen, H-K., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hogenboom, L., Nebbia, C.S., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Dall’Asta, C., Gutleb, A.C., Humpf, H-U., Galli, C., Metzler, M., Oswald, I.P., Parent-Massin, D., Binaglia, M., Steinkellner, H., Alexander, J. (2018a):

Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA Journal* 2018, 16:e05172. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5172.

Knutsen, H-K., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hogenboom, L., Nebbia, C.S., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Dall'Asta, C., Eriksen, G-S., Taranu, I., Altieri, A., Roldán-Torres, R., Oswald, I.P. (2018b): Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *EFSA Journal* 2018, 16:e05242 doi: 10.2903/j.efsa.2018.5242.

Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, Ch., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., Krska, R. (2016): Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize - an extensive survey. *Toxins* 8, 363 doi:10.3390/toxins8120363

Krenzel, E.S., Chen, Z., Hamilton, J.A. (2013): Correspondance of fatty acid and drug binding sites on human serum albumin: A two-dimensional nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* 52, 1559-1567.

Kriek, N.P.J., Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O. (1981): A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 48, 129-131.

Lacza, B., Lázár, I (1977): Mikotoxikózis (T2-toxin) mint a lovak súlyos megbetegedésének valószínűsített oka. *Magyar Állatorvosok Lapja* 32, 247-248.

Lakowicz, J.R. (2006): Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer: New York, NY, USA

Le Bars, J., Le Bars, P., Dupuy, J., Boudra, H., Cassini, R. (1994): Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability. *Journal of AOAC International* 77, 517-521.

Lemli, B., Lomozová, Z., Huber T., Lukács, A., Poór, M. (2022): Effects of Heme Site (FA1) Ligands Bilirubin, Biliverdin, Hemin and Methyl Orange on the Albumin Binding of Site I Marker Warfarin: Complex Allosteric Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 14007.

Leslie, J.F., Summerell, B.A., Bullock, S. (2006): The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, UK. 388.

MTA Agrártudományok Osztálya, javaslat, 2021. március 16. Javaslat a gazdasági állatok keveréktakarmányainak maximális mikotoxin koncentrációjára. Elérhető: <https://mta.hu/iv-osztaly/az-mta-agrartudomanyok-osztalya-javaslat-a-gazdasagi-allatok-keverektakarmanynainak-maximalis-mikotoxin-koncentraciojara-111285>

Lekérdezés időpontja: 2024. január 25.

Makaula, N.A., Marasas, W.F.O., Venter, F.S., Badenhorst, C.J., Bradshaw, D., Swanevelder, F. (1996): Oesophageal and other cancer patterns in four selected

districts of Transkei, southern Africa, 1985-1990. *African Journal of Health Sciences* 3, 11-15.

Maragos, C.M., Richard, J.L. (1994): Quantitation and stability of fumonisins B1 and B2 in milk. *Journal of AOAC International* 77, 1162-1167.

Marasas, W.F.O., Kriek, N.P.J., Fincham, J.E., van Rensburg, S.J. (1984): Primary liver-cancer and oesophageal basal-cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. *International Journal of Cancer* 34, 383-387.

Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G., van der Lugt, J.J. (1988): Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55, 197-203.

Marasas, W.F.O., Riley, R.T., Hendricks, K.A., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., Merrill, A.H. Jr. (2004): Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *The Journal of Nutrition* 134, 711-716.

Marín, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R., Magan, N. (1995): Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* in grain. *Letters in Applied Microbiology* 21, 298-301.

Mayo, N.S., (1891): Enzoötic Cerebritis, or „Staggers,” of Horses. *Kansas Agricultural Experiment Station*, Bulletin No. 24, 107-116.

Merrill, A.H. Jr., Sullards M.C., Wang E., Voss K.A., Riley R.T. (2001): Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives* 109, 283-289.

Milićević, D., Skrinjar, M., Baltić, T. (2010): Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins* 2, 572-592.

Mincsovcics, E., Tyihák, E., Siouffi, A.M. (1986): Characteristics of the one-dimensional on-line separation and detection in a modified CHROMPRES chamber. In *Proceedings of International Symposium on TLC with Special Emphasis on Overpressured Layer Chromatography (OPLC)*. Tyihák E (Ed). Labor MIM, Budapest, 251-264.

Mincsovcics, E., Tyihák, E., Siouffi, A.M. (1988): Comparison of off-line and on-line overpressured layer chromatography (OPLC). *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* 1, 141-145

- Mincsovics, E., Pápai, K., Ludányi, K., Dávid, Á.Z., Budai, M., Antal, I., Klebovich, I. (2008): Fully on-line hyphenation of an experimental OPLC separation unit with diode-array detection and mass-spectrometry (OPLC–DAD–MS) for analysis of xanthine compounds. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* 21, 361-366.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J. (1998): Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19, 1639-1662.
- Musser, S.M., Plattner, R.D. (1997): Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1169-1173.
- Naranjo Cerrillo, G., Soler Rodriguez, F., Gomez Gordo, L., Hermoso de Mendoza Salcedo, M., Roncero Cordero, V. (1996): Clinical and pathological aspects of an outbreak of equine leukoencephalomalacia in Spain. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 43, 467-472.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983): *Fusarium* species. *An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University, PA, USA, 193.
- Nelson, P.E., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. (1993): Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species, biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology* 31, 233-252.
- Nelson, P.E., Juba, J.H., Ross, P.F., Rice, L.G. (1994): Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. *Journal of AOAC International* 77, 522-525.
- Norred, W.P., Riley, R.T., Meredith, F.I., Poling, S.M., Plattner, R.D. (2001): Instability of *N*-acetylated fumonisin B1 (FA1) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices. *Food and Chemical Toxicology* 39, 1070-1078.
- O’Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G.R. (2011): Open Babel. *Journal of Cheminformatics* 3, 1-14.
- O’Donnell, K., Ward, T.J., Robert, V.A.R.G. et al. (2015): DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica* 43, 583-595.
- OECD (2013): Test Guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals. In *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*; OECD: Paris, France
- Osweiler, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., Witte, S.T., Carson, T.L., Rice, L.G., Nelson, H.A. (1992): Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 53–59.

- Park, J.W., Scott, P. M., Lau, B.P.Y. (2013): Analysis of *N*-fatty acyl fumonisins in alkali-processed corn foods. *Food Science and Biotechnology* 22, 147-152.
- Pestka, J.J., Azcona-Olivera, J.I., Plattner, R.D., Minervini, F., Doko, M.B., Visconti, A. (1994): Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *Journal of Food Protection* 57, 169-172.
- Pestka, J.J., Smolinski, A.T. (2005): Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part B* 8, 39-69.
- Petrás, Gy. (1952): Sertések fertőző tüdővizenyője. *Magyar Állatorvosok Lapja* 7, 374-378.
- Pienaar, J.G., Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O. (1981): Field outbreaks of leukoencephalomalacia in horses consuming maize infected by *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 52, 21-4.
- Plattner, R.D., Shackelford, D.D. (1992): Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycologia* 117, 17-22.
- Poling, S., Plattner, R. (1999): Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2344-2349.
- Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D.C., Merrill Jr., A.H. (2008): Biodiversity of sphingoid bases (sphingosines) and related amino alcohols. *Journal of Lipid Research* 49, 1621-1639.
- Rao, K.N., Reddy, B.V., Girisham, S., Reddy, S.M. (2010): Factors influencing fumonisins B1 production by *Fusarium moniliforme*. *Indian Journal of Science and Technology* 3, 213-215.
- Ren, Y.P., Zhang, Y., Han, S.Y., Han, Z., Wu, Y.N. (2011): Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 692, 138–145.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., van Schalkwyk, D.J. (1992): *Fusarium moniliforme* and Fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82, 353–357.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismar, H.F. (2002): Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2101-2105.
- Riley, R.T., An, N.H., Showker, J.L., Yoo, H.S., Norred, W.P., Chamberlain, W.J., Wang, E., Merrill, A.H. Jr., Motelin, G., Beasley, V.R., Haschek, W.M. (1993): Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker in pigs of exposure to fumonisin-containing feeds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 118, 105–112.

- Riley, R.T., Enongene, E., Voss, K.A., Norred, W.P., Meredith, F.I., Sharma, R.P., Spitsbergen, J., Williams, D.E., Carlson, D.B., Merrill, A.H. Jr. (2001): Sphingolipid perturbations as mechanism for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 109, 301-308.
- Riley, R.T., Voss, K.A. (2006): Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicological Sciences* 92, 335-345.
- Rose, H., Conventz, M., Fischer, Y., Jüngling, E., Hennecke, T., Kammermeier, H. (1994): Long-chain fatty acid-binding to albumin: Re-evaluation with directly measured concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1215, 321-326.
- Ross, P.F., Ledet, A.E., Owens, D.L., Rice, L.G., Nelson, H.A., Osweiler, G.D., Wilson, T.M. (1993): Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatosis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 69-74.
- Rubinstein, A.L. (2006): Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2, 231-240.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 394-404.
- Scott, P.M., Lawrence, G.A. (1994): Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *Journal of AOAC International* 77, 541-545.
- Selderslaghs, I.W., van Rompay, A.R., De Coen, W., Witters, H.E. (2009): Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology* 28, 308-320.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenström, S., Sydenham, E.W. (1996): Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International* 79, 671-687.
- Shephard, G.S. (1998): Chromatographic determination of fumonisin mycotoxins. *Journal of Chromatography A* 815, 31-39.
- Shurtleff, M.C. (1980): *Copendium of Corn Diseases*, 2nd ed., St Paul, Minnesota, USA, American Phytopathology Society
- Simard, J.R., Zunszain, P.A., Ha, C.E., Yang, J.S., Bhagavan, N.V., Petitpas, I., Curry, S., Hamilton, J.A. (2005): Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17958-17963.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Haschek, W.M. (1996): Cardiovascular responses to short-term fumonisin exposure in swine. *Fundamental and Applied Toxicology* 33, 140-148.

- Smith, G.W., Constable, P.D., Tumbleson, M.E., Rottinghaus, G.E., Haschek, W.M. (1999): Sequence of cardiovascular changes leading to pulmonary edema in swine fed culture material containing fumonisin. *American Journal of Veterinary Research* 60, 1292–1300.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Eppley, R.M., Tumbleson, M.E., Gumprecht, L.A., Haschek-Hock, W.M. (2000): Purified fumonisin B1 decreases cardiac function but does not alter pulmonary capillary permeability in swine. *Toxicological Sciences* 56, 240–249.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Foreman, J.H., Eppley, R.M., Waggoner, A.L., Tumbleson, M.E., Haschek, W.M. (2002): Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B1 in horses. *American Journal of Veterinary Research* 63, 538–545.
- Sorensen, L.K., Elbaek, T.H. (2005): Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 820, 183-196.
- Stack, M.E. (1998): Analysis of fumonisin B₁ and its hydrolysis product in tortillas. *Journal of AOAC International* 81, 737-740.
- Stevens V.L., Tang J. (1997): Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *Journal of Biological Chemistry* 272, 18020-18025.
- Stewart, J.J.P. (2013): Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *Journal of Molecular Modeling* 19, 1-32.
- Stewart, J.J.P. (2016): MOPAC 2016; Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA
- Sun, G., Wang, S., Hu, X., Su, J., Huang, T., Yu, J., Tang, L., Gao, W., Wang, J.S. (2007): Fumonisin B1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. *Food Additives & Contaminants*. 24, 181–185.
- Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Van Schalkwyk, D.J., Koch, K.R. (1990): Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1900–1903.
- Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Hirooka, EY. (1992): Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of animal mycotoxicoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 994-997.
- Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Shephard, G.S., Koch, K.R., Hutton, T. (1995): Preparation and isolation of the partially hydrolyzed moiety of Fumonisin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2400–2405.

- Szécsi, Á., Mesterházy, Á. (1998): A medium for selective isolation and identification of *Fusarium* spp. from cereal grains and maize kernels. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 33, 79-87.
- Téren, J., Novák, E.K. (1990): *Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok*. Magyar Élelmészéipari Tudományos Egyesület, Budapest 4.
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. (1992): The implications of naturally-occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathology* 117, 3-9.
- Thomas, A.B., Oloyede, T.L., Ogeh, A.V., Sarah, M., Joel, O. (2018): Effects of dietary mixed aflatoxin B1 and fumonisin B1 on growth performance and haematology of juvenile *Clarias gariepinus* catfish. *Aquaculture* 491, 190-196.
- Tyihák, E., Mincsovics, E., Kalász, H. (1979): New planar liquid chromatographic technique, overpressured thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography* 174, 75-81.
- Van de Weert, M., Stella, L. (2011): Fluorescence Quenching and Ligand Binding: A Critical Discussion of a Popular Methodology. *Journal of Molecular Structure* 998, 144-150.
- Van der Westhuizen, L., Shephard, G.S., Rheeder, J.P., Burger, H.-M. (2010): Individual fumonisin exposure and sphingoid base levels in rural populations consuming maize in South Africa. *Food and Chemical Toxicology* 48(6), 1698–1703.
- Vesonder, R.F., Haliburton, J., Golinski, P. (1989): Toxicity of field samples and *Fusarium moniliforme* from feed associated with equine-leukoencephalomalacia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 439-42.
- Vorum, H., Honoré, B. (1996): Influence of Fatty Acids on the Binding of Warfarin and Phenprocoumon to Human Serum Albumin with Relation to Anticoagulant Therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48, 870-875.
- Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., Merrill, A.H. Jr. (1991): Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 14486-14490.
- Wang, H., Wei, H., Ma, J., Luo, X. (2000): The fumonisin B1 content in corn from north China, a high-risk area of esophageal cancer. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 19, 139-141.
- Wang, J., Zhou, Y., Wang Q. (2008): Analysis of mycotoxin fumonisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Chemistry* 107, 970-976.
- Wannop, C.C. (1961): The histopathology of turkey „X” disease in Great Britain. *Avian Diseases* 5, 371-381.

- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011): Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281, 25-36.
- Wilkes, J.G., Sutherland, J.B., Churchwell, M.I., Williams, A.J. (1995): Determination of fumonisin B1, B2, B3 and B4 by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography A* 695, 319-323.
- Wilson, B.J., Maronpot, R.R. (1971): Causative Fungus Agent of Leucoencephalomalacia in Equine Animals. *Veterinary Research* 88, 484-486.
- Wilson, T.M., Nelson, P.E., Knepp, C.R. (1985): Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis and cholangiocarcinomas in male fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* 6, 1155-1160.
- Wilson, T.M., Nelson, P.E., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Nelson, H.A., Ross, P.F. (1990): A mycological evaluation and *in vivo* toxicity evaluation of feed from 41 farms with equine leucoencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2, 352-354.
- Xavier, J.G., Brunner, C.H.M., Sakamoto, M., Correa, B., Fernandes, W.R., Dias, J.L.C. (1991): Equine leucoencephalomalacia: Report of five cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* (Sao Paulo) 28, 185-189.
- Xin, D.Y. (1987): Study on the aetiology of equine mouldy corn poisoning. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 18, 125-128.
- Yamasaki, K., Chuang, V.T.G., Maruyama, T., Otagiri, M. (2013): Albumin-Drug Interaction and Its Clinical Implication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 5435-5443.
- Yang, G., Wang, Y., Wang, T., Wang, D., Weng, H., Wang, Q., Chen, W. (2021): Variations of enzymatic activity and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos co-exposed to zearalenone and fumonisin B1. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 222, 112533.
- Yang, L., Kemadjou, J.R., Zinsmeister, C., Bauer, M., Legradi, J., Mueller, F., Pankratz, M., Jäkel, J., Strähle, U. (2007): Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biology* 8, R227.
- Yang, L., Ho, N.Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Mueller, F., Strähle, U. (2009): Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology* 28, 245-253.
- Zhang, H., Nagashima, H., Goto, T. (1997): Natural occurrence of mycotoxins in corn, samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Mycotoxins* 44, 29-35.
- Zomborszky-Kovács, M., Vetési, F., Kovács, F., Bata, A., Tóth, A., Torniyos, G. (2000): Preliminary communication: examination of the harmful effect to fetuses of

fumonisin B1 in pregnant sows. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 20, 293–299.

Zöllner, P., Mayer-Helm, B. (2006): Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136, 123-169.

Zsidó, B.Z., Balog, M., Erős, N., Poór, M., Mohos, V., Fliszár-Nyúl, E., Hetényi, C., Nagane, M., Hideg, K., Kálai, T., Bognár, B. (2020): Synthesis of spin-labelled bergamottin: A potent CYP3A4 inhibitor with antiproliferative activity. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 508.

Zsidó, B.Z., Börzsei, R., Szél, V., Hetényi, C. (2021): Determination of Ligand Binding Modes in Hydrated Viral Ion Channels to Foster Drug Design and Repositioning. *Journal of Chemical Information and Modeling* 61, 4011-4022.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik szakmai vagy egyéb segítségükkel hozzájárultak e dolgozat elkészültéhez.

Hálás köszönet illeti témavezetőimet, Prof. Dr. Bartók Tibort és Prof. Dr. Kovács Melinda akadémikus asszonyt, akik a témaválasztásban és az azt követő munkában végig segítséget és támogatást nyújtottak, valamint közreműködtek az elméleti és gyakorlati feladatokban.

Hálával tartozom az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola vezetőségének, oktatóinak és munkatársainak a hallgatói éveim alatt tőlük kapott támogatásukért és mentorálásukért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szekeres Andrásnak és Dr. Varga Mónikának a HRMS elemzés lebonyolításában történő közreműködésükért.

Köszönettel tartozom Horváth Leventének az elválasztástechnikai vizsgálatok során nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni a Debreceni Egyetem Szerkezeti Biológiai, Molekuláris Felismerés és Kölcsönhatás Kutatócsoport tagjainak az NMR vizsgálatok során nyújtott segítségét, különösen Dr. Nagy Tamás Milánnak és Prof. Dr. E. Kövér Katalin akadémikus asszonynak, aki e dolgozat létrejöttékor sajnos már nem lehet közöttünk.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Poór Miklós adjunktus úrnak és kollégáinak a FB1-származékok humán szérumalbuminnal történő kölcsönhatását célzó vizsgálatok elvégzéséért.

Hálásan köszönöm Csenki-Bakos Zsoltnak az állatkísérletek lebonyolításában nyújtott közreműködését.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom támogatását.