

## REZULTATI NEDAVNIH STUDIJA O MEHANIZMU NEUROTOKSIČNOSTI FUMONIZINA B<sub>1</sub>

### RECENT DATA ON THE MECHANISM OF FUMONIZIN B<sub>1</sub> NEUROTOXICITY

Ana-Marija Domijan

Pregledni znanstveni rad – Review scientific paper  
 Primljeno – Received: 22. ožujak – Mart 2013

#### SAŽETAK

Fumonizini su grupa mikotoksina koje proizvode plijesni roda *Fusarium*, prvenstveno plijesan *F. verticillioides* (nekada *F. moniliforme*). Od otkrića u 1980-ima do danas izolirano je više od petnaestak fumonizina te je utvrđeno da je najučestaliji od svih izoliranih fumonizina fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>). Fumonizini su nađeni širom svijeta kao zagađivači različitih namirnica, međutim najčešće zagađuju kukuruz te hranu i krmivo pripremljeno iz kukuruza. Konzumacija krmiva zagađenog fumonizinima u domaćih životinja povezana je s razvojem leukoencefalomalacije u kopitara te edemom pluća u svinja. U laboratorijskih glodavaca pokazalo se je da fumonizini imaju nefrotoksičan, hepatotoksičan i karcinogeni učinak. Također se i razvoj nekih bolesti u ljudi kao što su primarni karcinom jetre, rak jednjaka i defekt neuralne cijevi povezuju s konzumacijom hrane zagađene fumonizinima. Ipak epidemiološke studije nisu pronašle povezanost konzumacije hrane zagađene fumonizinima i razvoja navedenih bolesti u ljudi. Stoga je Međunarodna organizacija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificirala najučestaliji od fumonizina, FB<sub>1</sub> kao mogući karcinogen (grupa 2B). Na staničnoj razini proučavano je nekoliko mehanizama toksičnosti FB<sub>1</sub>, a najznačajniji od njih je remećenje metabolizma sfingolipida. Neke su studije pokazale da FB<sub>1</sub> uzrokuje i porast parametara oksidacijskog stresa, što ukazuje na oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti FB<sub>1</sub>. Naše nedavne studije na stanicama neurološkog podrijetla pokazale su da FB<sub>1</sub> uzrokuje poremećaj koncentracije kalcija u citoplazmi stanice što ukazuje da je i poremećaj homeostaze kalcija u stanici jedan od mogućih mehanizama kako neurotoksičnosti tako i toksičnosti fumonizina.

Ključne riječi: mikotoksini, fumonizin B<sub>1</sub>, neurotoksičnost, leukoencefalomalacija kopitara

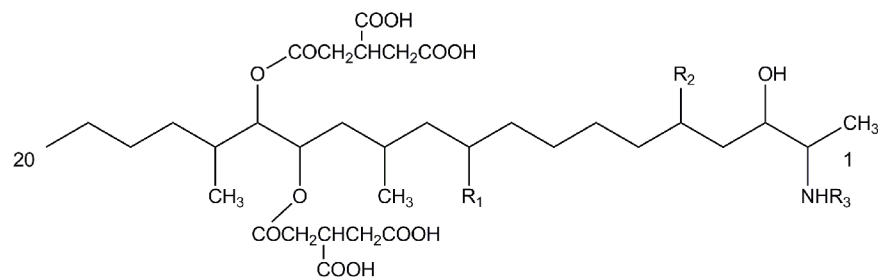
#### UVOD

Fumonizini su mikotoksini, sekundarni proizvodi plijesni roda *Fusarium*. Fumonizine prvenstveno proizvodi plijesan *F. verticillioides* (nekadašnje ime *F. moniliforme*) te u manjoj mjeri druge plijesni roda *Fusarium* kao plijesan *F. proliferatum* (IPCS, 2001.; Voss i sur., 2007.).

U usporedbi s poznatijim mikotoksinima kao što su aflatoksini ili okratoksini, fumonizini su izolirani relativno kasno. Znanstvenici iz Južnoafričke Republike tek su 1988. godine izolirali fumonizine

iz plijesni *F. verticillioides* (Gelderblom i sur., 1988.). Do danas izolirano je više od petnaestak različitih fumonizina. Neki od njih su fumonizin A<sub>1</sub> (FA<sub>1</sub>), fumonizin A<sub>2</sub> (FA<sub>2</sub>), fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), fumonizin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) i fumonizin B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) (Slika 1.). Od svih izoliranih fumonizina u prirodno zagađenoj hrani FB<sub>1</sub> je najučestaliji te je stoga njegova toksičnost i najviše proučavana (Voss i sur., 2007.).

Plijesni roda *Fusarium* i fumonizini nađeni su kao zagađivači različitih namirnica širom svijeta. Naša istraživanja provedena na različitim uzorcima kao što su kukuruz, pšenica, soja i grašak uzgojenim



|                | FA <sub>1</sub>    | FA <sub>2</sub>    | FB <sub>1</sub> | FB <sub>2</sub> | FB <sub>3</sub> | FB <sub>4</sub> | FC <sub>1</sub> |
|----------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| R <sub>1</sub> | OH                 | H                  | OH              | H               | OH              | H               | OH              |
| R <sub>2</sub> | OH                 | OH                 | OH              | OH              | H               | H               | OH              |
| R <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> CO | CH <sub>2</sub> CO | H               | H               | H               | H               | H               |

Slika 1. Kemijska struktura fumonizina. Ovisno o supstituentu (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> i R<sub>3</sub>): fumonizin A<sub>1</sub> (FA<sub>1</sub>), fumonizin A<sub>2</sub> (FA<sub>2</sub>), fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), fumonizin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), fumonizin B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>), fumonizin B<sub>4</sub> (FB<sub>4</sub>) i fumonizin C<sub>1</sub> (FC<sub>1</sub>).

Figure 1. Chemical structural formula of fumonisins. Depending on substituent (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>): fumonisin A<sub>1</sub> (FA<sub>1</sub>), fumonisin A<sub>2</sub> (FA<sub>2</sub>), fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), fumonisin B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>), fumonisin B<sub>4</sub> (FB<sub>4</sub>) and fumonisin C<sub>1</sub> (FC<sub>1</sub>).

na području Hrvatske potvrdila su prisutnost plijesni roda *Fusarium* pa tako i fumonizina i u Hrvatskoj (Tablica 1.). Iz rezultata naših studija kao i rezultata drugih znanstvenika vidljivo je da od svih namirnica plijesni roda *Fusarium* i fumonizini najčešće zagađuju kukuruz (Domijan i sur., 2005.a; Ivić i sur., 2009.a; Domijan i sur., 2005.b; Sorriano i Draggaci, 2004.). Različiti čimbenici imaju učinak na prisutnost fumonizina na kukuruзу i hrani pripremljenoj iz kukuruza (Sorriano i Draggaci, 2004.). Tako na kontaminaciju kukuruza fumonizinima utječu klimatski uvjeti u kojima je kukuruz uzgajan. Primjerice proizvodnji fumonizina pogoduju visoka temperatura (20-30 °C) i vlaga (relativna vlaga zraka iznad 98 %), ali i genotip kukuruza (određeni hibridi su otporniji na kontaminaciju fumonizinima od tradicionalnog kukuruza) te oštećenja zrna insektima (smanjenje oštećenja smanjuje i zagađenje fumonizinima). Pokazalo se da je koncentracija fumonizina niža u hrani pripremljenoj iz kukuruza namijenjenoj ljudskoj prehrani (tortilje, kokice, cornflakes) nego u kukuruзу stoga što se prilikom pripreme te hrane koriste alkalna otopina, voda i visoka temperatura koje snižavaju koncentraciju fumonizina u njoj (Peraica i sur., 2002.; Sorriano i Draggaci, 2004.).

Fumonizini pokazuju različite toksične učinke u različitim životinjskih vrsta (IPCS, 2001.). U konja, ponija i magaraca fumonizini uzrokuju leukoencefalomalaciju kopitara (*equine leukoencephalomalacia*, ELEM), a za svinje fumonizini su kardiotoksični i uzrokuju edem pluća (*porcine pulmonary edema*, PPE). U laboratorijskih glodavaca pokazan je nefrotoksičan, hepatotoksičan i karcinogeni učinak fumonizina (NTP, 2001.). Tako je u mužjaka štakora soja F344 kronična izloženost hrani koja je sadržavala FB<sub>1</sub> (150 mg/kg, kroz dvije godine) uzrokovala pojavu tumora bubrega (u 15 od 48 štakora), a u ženki miševa soja B6C3F<sub>1</sub> hrana kontaminirana s FB<sub>1</sub> (80 mg/kg, kroz dvije godine) razvoj tumora jetre (u 39 od 45 ženki miševa) (Howard i sur., 2001.; NTP, 2001.). U svih mužjaka štakora soja BD IX hranjenih hranom koja je sadržavala FB<sub>1</sub> (50 mg/kg, kroz 26 mjeseci) primijećeni su ciroza jetre i kronični intersticijalni nefritis, a u 10 od 15 životinja (66%) zabilježen je primarni hepatocelularni karcinom (Geldersblom i sur., 1991.). Kako je oštećenje jetre zapaženo u skoro svih ispitivanih životinjskih vrsta, može se zaključiti da su fumonizini ipak prvenstveno hepatotoksični. Također je zapaženo da su goveda i perad manje osjetljivi na fumonizine nego konji, svinje, zečevi i laboratorijski glodavci (Voss i sur., 2007.).

**Tablica 1. Nalaz plijesni roda *Fusarium* i fumonizina B<sub>1</sub> u našim istraživanjima provedenim na uzorcima sakupljenim u Hrvatskoj.**

**Table 1. The level of *Fusarium* spp. molds and fumonisin B<sub>1</sub> in samples collected in Croatia in our studies.**

| UZORAK/GODINA SAKUPLJANJA                                                                                                             | NALAZ                                                                                                                                              | LITERATURA            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| zrno kukuruza (n=15)<br>različite lokacije u Hrvatskoj<br>/ jesen 2002. godine                                                        | <i>Fusarium</i> plijesni - 100%<br>fumonizin B <sub>1</sub> - 100% (raspon konc.:<br>196.8-1377.6 μg/kg)                                           | Domijan i sur., 2005a |
| zrno kukuruza (n=48), pšenice (n=116),<br>soje (n=32) i grašaka (n=7)<br>različite lokacije u Hrvatskoj<br>/ od 2002. do 2008. godine | <i>Fusarium</i> plijesni % kontaminiranog<br>zrnja): kukuruz 25-100%; pšenica<br>5-69%; soja 4-17%; grašak 3-17%                                   | Ivić i sur., 2009a    |
| zrno kukuruza (n=49)<br>različite lokacije u Hrvatskoj<br>/ jesen 2002. godine                                                        | fumonizin B <sub>1</sub> - 100% (srednja konc.:<br>459.8 ± 310.7 μg/kg)<br>fumonizin B <sub>2</sub> - 6% (srednja konc.:<br>1087.2 ± 1729.4 μg/kg) | Domijan i sur., 2005b |
| zrno pšenica<br>Kutjevo / 2006. godina                                                                                                | fumonizin B <sub>1</sub> - 100% (raspon konc.:<br>182.0-446.6 μg/kg)                                                                               | Ivić i sur., 2009b    |

Ispitivanja na laboratorijskim glodavcima pokazala su da se fumonizini vrlo kratko zadržavaju u organizmu te da se značajno ne akumuliraju u tkivu (vrlo niske koncentracije fumonizina su pronađene u bubrezima i jetri) i gotovo nepromijenjeni (fumonizine ne metaboliziraju niti enzimi I niti II faze) putem fecesa izlučuju iz organizma (Voss i sur., 2007.; Müller i sur., 2012.). Međutim utvrđeno je da anaerobne bakterije crijevne mikroflore mogu potpuno ili djelomično hidrolizirati FB<sub>1</sub> u njegov hidrolizirani metabolit (HFB<sub>1</sub>), a također je detektiran i acilirani-HFB<sub>1</sub> (Müller i sur., 2012.). Toksičnost tih metabolita još se ispituje, a nedavna studija potvrdila je da HFB<sub>1</sub> nije toksičan za ženke svinja (stare 4 tjedna, koje su primale 2,8 μmola HFB<sub>1</sub>/kg tj.t. kroz 14 dana) (Grenier i sur., 2012.).

Razvoj nekih bolesti u ljudi povezuje se s konzumacijom kukuruza kontaminiranog fumonizinima. Naime, u nekim regijama svijeta (središnja Amerika ili južna Afrika) gdje osnovu ljudske prehrane predstavlja kukuruz pretpostavlja se da su bolesti u ljudi kao rak jednjaka, primarni karcinom jetre i defekt neuralne cijevi povezane s izloženošću fumonizinima. Ipak epidemiološke studije nisu pronašle povezanost konzumacije hrane zagađene fumonizinima i razvoja navedenih bolesti u ljudi. Stoga je Međunarodna organizacija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificirala najučestaliji od fumonizina, FB<sub>1</sub> kao mogući karcinogen (grupa 2B) (IARC, 2002.).

## NEUROTOKSIČNOST FUMONIZINA

Brojne studije potvrdile su povezanost konzumacije pljesnivog kukuruza s pojavom neurotoksičnog sindroma u kopitara, ELEM-a (Wilson i Maronpot, 1971.; Ross i sur., 1993.; Voss i sur., 2007.). Neurološka obilježja ELEM-a su ataksija, djelomična paraliza, sljepoća, depresija i nekoordinirano kretanje, odnosno besciljno kruženje (Voss i sur., 2007.). Paraliza jezika, usta i jednjaka onemogućuje žvakanje krmiva što rezultira smanjenjem unosa krmiva i gubitkom težine. Patološki pak nalazi u mozgu konja zahvaćenih ELEM-om pokazali su žarišne nekroze bijele tvari prvenstveno u cerebrumu koje karakteriziraju kavitacija i gubitak boje tog područja; tako je sindrom i dobio ime: leuko = distribucija u bijeloj tvari mozga + malacija = omekšanje zbog nekroze (Wilson i sur., 1990.; Voss i sur., 2007.). Na histološkim preparatima mozga konja zahvaćenih ELEM-om zabilježene su nekroza, obilje makrofaga, edem i krvarenja. Uobičajeno 5 do 10 dana nakon kliničkih sindroma nastupa smrt, a smrtnost je vrlo visoka (Ross i sur., 1991.). U konja zahvaćenih ELEM-om osim navedenih promjena u središnjem živčanom sustavu uočene su i promjene na jetri i srcu. Istraživanja pokazuju da fumonizinima izazvan poremećaj u koncentraciji sfingolipida (o učinku fumonizina na metabolizam sfingolipida bit će raspravljano u sljedećem poglavlju) uzrokuje promjene na arterijama mozga rezultirajući promjenom dotoka krvi u mozak. Stoga se može zaključiti da u konja kardi-

ovaskularne promijene prethode razvoju ELEM-a (JECFA, 2012.).

Povezanost fumonizina s razvojem ELEM-a potvrđena je pokusima u kojima su konji, poniji ili margarci hranjeni krmivom prirodno zagađenim s *F. verticilloides* ili čak tretirani čistim FB<sub>1</sub> (Wilson i Maronpot, 1971.; Marasas i sur., 1988.; Kellerman i sur., 1990.; Ross i sur., 1993.). Primjerice, konj koji je kroz 7 dana dobivao intravenozno FB<sub>1</sub> (0,125 mg/kg tj.t./danu) razvio je simptome karakteristične za ELEM (apatija, ataksija te paraliza donje usne i jezika) kao i promijene na mozgu karakteristične za ELEM (Marasas i sur., 1988.). Također, karakteristične promijene na mozgu za ELEM uočene su i kod konja koji su tretirani oralno s FB<sub>1</sub> (Kellerman i sur., 1990.). Istraživanje krmiva u Sjedinjenim Američkim Državama pokazalo je da je koncentracija FB<sub>1</sub> od 10 mg/kg stočne hrane povezana s pojavom ELEM-a (Ross i sur., 1991), odnosno izračunato je da je koncentracija FB<sub>1</sub> između 0,2 i 0,44 mg/kg tj.t./danu minimalna doza koja uzrokuje ELEM (SCF, 2000). Iz tih podataka procijenjeno je da je minimalna doza FB<sub>1</sub> koja nema učinka (*no observed adverse effect level*, NOAEL) u konja 0,2 mg/kg tj.t./danu (SCF, 2000).

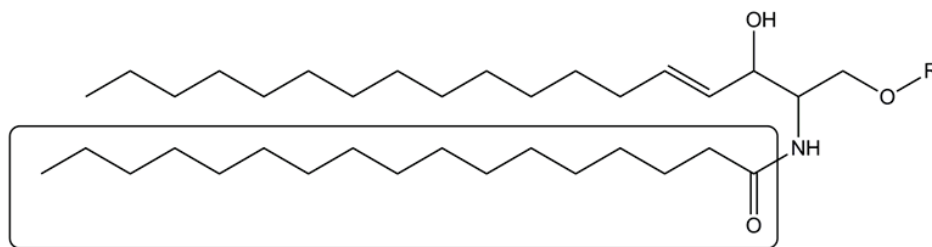
ELEM je zabilježen u zemljama širom svijeta kao što su Kina, Južnoafrička Republika, Egipat i Sjedinjene Američke Države, što ne čudi jer je pokazano da i vrlo niske koncentracije fumonizina uzrokuju nastanak ELEM-a (Ross i sur., 1991.; Voss i sur., 2007.). Ipak, važno je napomenuti da na pojedinoj farmi nisu svi konji zahvaćeni ELEM-om, niti svi konji koji razvijaju neurološke simptome razvijaju promjene na mozgu karakteristične za ELEM, što ukazuje da su osim trenutne izloženosti fumonizinima putem krmiva i drugi faktori uključeni u nastanak ELEM-a kao što su dužina izloženosti, individualna predispozicija i prijašnja izloženost fumonizinima (Voss i sur., 2007.).

Iako je ELEM poremećaj koji je karakterističan za kopitare, neke su studije pokazale da fumonizini, odnosno FB<sub>1</sub> osim u kopitara ima neurotoksični učinak i u zečeva, štakora i šarana. U ženki zečeva koje su bile tretirane oralno s FB<sub>1</sub> (1,75 mg/kg tj.t. kroz 13 dana) uočene su promjene u središnjem živčanom sustavu kao žarišna krvarenja u bijeloj tvari mozga, što je karakteristična pojava ELEM-a (Bucci i sur., 1996.). U štakora koji još nisu dosegli zrelost nakon supkutanog tretmana s FB<sub>1</sub> (0,4 i 0,8 mg/kg tj.t. kroz 10 dana, od postnatalnog dana 3 do 12) uo-

čeno je značajno smanjenje ukupne težine i težine mozga te je zabilježena hipomijelinizacija živčanih vlakana (Kwon i sur., 1997.a). Ista skupina istraživača pokazala je (na muškim, 12 dana starim štakorima koji su tretirani jednokratno, supkutano s 0,8 i 8 mg FB<sub>1</sub>/kg tj.t.) da FB<sub>1</sub> može proći krvno-moždanu barijeru, iako je koncentracija FB<sub>1</sub> koja je nađena u mozgu bila niska i zabilježena tek nakon tretmana s višom dozom FB<sub>1</sub> (Kwon i sur., 1997.b). Neurotoksični učinak FB<sub>1</sub> potvrdili su i znanstvenici iz Hrvatske. Tako je u štakora (ženke, soj Fischer) koji su bili hranjeni smjesom biomase zajedno s dva poznata patogena kukuruza, kukuruznom snijeti (*Ustilago maydis*) i FB<sub>1</sub> (maseni udio snijeti 70% + 1 mg FB<sub>1</sub>/kg hrane, tijekom 17 dana), uočena hiperemija/pojačano krvarenje u mozgu (Pepeljnjak i sur., 2005.). Također, u skupini životinja koje su dobivale FB<sub>1</sub> i kukuruznu snijet zajedno, izmjerena je niža katalitička aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE) dodatno potvrđujući neurotoksičan učinak ova dva patogena kukuruza. Neurotoksični učinak FB<sub>1</sub> praćen je i u mlađi šarana (*Cyprinus carpio* L.) koji su u hrani primali 10 ili 100 mg FB<sub>1</sub>/kg hrane tijekom 42 dana (Kovačić i sur., 2009.). U tom istraživanju pokazano je da FB<sub>1</sub> uzrokuje sporije dobivanje na težini, a zabilježene histopatološke promijene na mozgu životinja bile su ovisne o dozi te su uključivale vakuolizaciju, degeneraciju i nekrozu neurona, posebice u blizini oštećenih kapilara. I ovo je istraživanje pokazalo da FB<sub>1</sub> prolazi krvno-moždanu barijeru i mlađi šarana i tako potvrdilo prethodna zapažanja Kwon i sur. (1997.b) na štakorima. Stoga što prolazi krvno-moždanu barijeru, FB<sub>1</sub> može djelovati direktno na mozak. Navedene studije sa sigurnošću potvrđuju neurotoksičan učinak FB<sub>1</sub> i ostalih fumonizina koji nije samo specifičan za kopitare već je uočen i u drugim životinjskim vrstama.

#### ISTRAŽIVANI MEHANIZMI NEUROTOKSIČNOSTI FUMONIZINA

Dosad je nekoliko mehanizama toksičnosti pa tako i neurotoksičnosti fumonizina proučavano na staničnoj razini. Jedan od najvažnijih je remećenje normalnog metabolizma sfingolipida. Sfingolipidi su složeni lipidi građeni od sfingoidne baze (najčešće sfingozin), na koju je vezana masna kiselina, a na sfingoidnu bazu mogu biti vezani i razni supstituenti (Slika 2). Neki od poznatijih sfingolipida su ceramid, sfingomijelini i gangliozidi. Sfingolipidi imaju brojne



Slika 2. Kemijska struktura sfingolipida. Osnova sfingolipida je sfingoidna baza na koju je vezana masna kiselina (uokvireno) te razni supstituenti (R) koji definiraju vrstu sfingolipida (primjerice, R: „H“- ceramid; „fosfokolin“- sfingomijelin; „šećer“- glikosfingolipid).

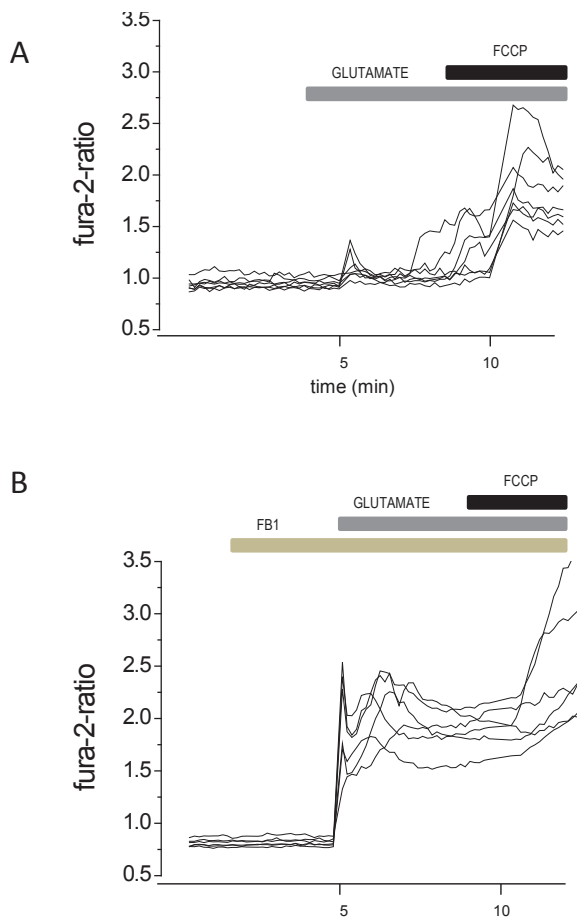
Figure 2. Chemical structural formula of sphingolipids. The backbone of sphingolipids is sphingoid base, to which is linked fatty acid “tail” (highlighted in frame) and various substituents (R) that define type of sphingolipid (for example, R: “H”- ceramide; “phosphocholine”- sphingomyelin; “sugar”- glycosphingolipid).

funkcije u stanici; osim što su građevne molekule staničnih membrana, sfingolipidi sudjeluju i u staničnoj signalizaciji kao i u staničnom prepoznavanju. Uočeno je da fumonizini remete normalan metabolizam sfingolipida stoga što sa svojom kemijskom strukturom fumonizini nalikuju kemijskoj strukturi sfingoidne baze sfinganina (Wang i sur., 1991.). Pokazalo se da svojim upletanjem u normalan metabolizam sfingolipida fumonizini dovode do akumulacije sfinganina (i u manjoj mjeri sfingozina) što dovodi do poremećaja normalne sinteze složenih sfingolipida (Wang i sur., 1991.; Voss i sur., 2007.). Studije na pokusnim životinjama kao i na staničnim kulturama potvrdile su upletanje fumonizina u metabolizam sfingolipida (Kwon i sur., 1997.b; Kwon i sur., 2000.; Osuchowski i Sharma, 2005.). Tako su u svojoj već spomenutoj studiji Kwon i sur. (1997.b) pokazali porast sfinganina u mozgu štakora koji su tretirani s FB<sub>1</sub> (jednokratno, subkutano, 8 mg/kg tj.t.) te kako su FB<sub>1</sub> detektirali i u mozgu zaključili su da FB<sub>1</sub> direktno utječe na remećenje metabolizma sfingolipida u mozgu. Također se pokazalo da se poremećaj metabolizma sfingolipida događa puno ranije nego neki drugi toksični učinci FB<sub>1</sub> (Wang i sur., 1991.), što su potvrdila i naša istraživanja (Domijan i sur., 2007.a, Domijan i sur., 2008.), a što ukazuje da je primarni učinak fumonizina remećenje metabolizma sfingolipida.

Brojna su istraživanja pokazala da FB<sub>1</sub> može uzrokovati porast bioloških pokazatelja oksidacijskog stresa. Tako je u studiji u kojoj su mužjaci štakora hranjeni 21 dan standardnom laboratorijskom hranom koja je sadržavala i FB<sub>1</sub> (0-500 mg/kg hrane) uočen porast biološkog pokazatelja ok-

sidacijskog oštećenja lipida, malondialdehida u jetri tretiranih štakora, a taj je porast ovisio o koncentraciji FB<sub>1</sub> (Abel i Gelderblom, 1998.). Druga je pak studija pokazala da u jetri i gušterači mužjaka štakora jednokratni, intravenozni tretman s FB<sub>1</sub> (1,55 mg/kg tj.t.) uzrokuje fragmentaciju DNA, međutim oštećenje DNA moglo se spriječiti kada su štakori prije tretmana s FB<sub>1</sub> tretirani antioksidansima koenzim Q, L- karnitinom,  $\alpha$ -tokoferolom i selenom, što dovodi do zaključka da je oštećenje DNA uzrokovano s FB<sub>1</sub> posljedica oksidacijskog stresa (Atroshi i sur., 1999.). Zapažanja tih znanstvenika potvrdila su i naša istraživanja u kojima smo zabilježili oksidacijska oštećenja DNA (mjerena FPG komet testom) u bubrezima mužjaka štakora tretiranih dozom FB<sub>1</sub> (200 ng/kg tj.t., kroz 5 dana) što predstavlja procijenjeni dnevni unos FB<sub>1</sub> u Europskoj prehrani (Domijan i sur., 2006, IPCS, 2001.). Naše su slijedeće studije mjerenjem različitih bioloških pokazatelja oksidacijskog stresa kao malondialdehida (oksidacijsko oštećenje lipida) i proteinskih karbonila (oksidacijsko oštećenje proteina) ili glutationa u jetri i bubrezima štakora tretiranih s FB<sub>1</sub> potvrdile oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti FB<sub>1</sub> (Domijan i sur., 2007.a, Domijan i sur., 2007.b, Rumora i sur., 2007.) Ta zapažanja potvrđena su i na staničnom modelu (Šegvić Klarić i sur., 2007.). Iako istraživanja pokazuju da se nakon tretmana štakora s FB<sub>1</sub> promjene u metabolizmu sfingolipida, nastanak apoptoze i DNA oštećenja događaju prije promjena parametara oksidacijskog stresa (Domijan i sur., 2007.a, Domijan i sur., 2008.), ipak oksidacijski stres doprinosi toksičnosti FB<sub>1</sub>. Naša nedavna istraživanja provedena na stanicama neurološkog podrijetla (primarni astrociti štakora i humani neuroblastomi)





**Grafikon 1.** Signal kalcija izmjeren na fluorescentnom mikroskopu tehnikom „live imaging“ pomoću fluorescentne boje fura-2AM koja se specifično veže za kalcij te je tako moguće pratiti pojavu kalcija (u obliku signala) u citoplazmi. (A) Signal kalcija u citoplazmi neurona izazvan glutamatom (5 μM). (B) Signal kalcija u citoplazmi neurona koji su prvo tretirani s fumonizinom B<sub>1</sub> (0,5 μM), a potom s glutamatom (5 μM) te je vidljiv porast kalcijevog signala u odnosu na tretman samo s glutamatom (5 μM).

**Graph 1.** The level of calcium monitored with “live imaging” technique on fluorescent microscope using fluorescent dye fura-2AM. (A) The level of calcium in the cytoplasm of neurons treated with glutamate (5 μM). (B) The level of calcium in the cytoplasm of neurons pre-treated with fumonisin B<sub>1</sub> (0.5 μM), and then treated with glutamate (5 μM), the increase of calcium level is easy to observe.

tretiranim s FB<sub>1</sub> (0,5 μM, 5 i 50 μM) potvrdila su da FB<sub>1</sub> i s najnižom primijenjenom koncentracijom (0,5 μM) uzrokuje povećani nastanak reaktivnih kisikovih radikala (*reactive oxygen species*, ROS) u stanici pa time i oksidacijski stres (Domijan i Abramov, 2011.).

U spomenutom istraživanju provedenom na primarnoj kulturi astrocita štakora i na humanim neuroblastomima osim koncentracije ROS-ova pratili smo i moguće izvore nastanka ROS-ova u stanici, odnosno moguće uzročnike povećanja koncentracije ROS-ova u stanici nakon tretmana s FB<sub>1</sub> (Domijan i Abramov, 2011.). U tim pokusima pomoću raznih supstrata/inhibitora (jedan od kojih je karbonil cijanid p-(trifluoromethoksi) fenilhidrazon, FCCP, tzv. „*uncoupling agent*“ staničnog disanja čijom primjenom respiracija u stanici se nastavlja bez istovremene sinteze ATP utvrdili smo da je izvor ROS-ova unutar stanice nakon tretmana s FB<sub>1</sub> (0,5 μM, 5 i 50 μM) mitohondrij. Takav rezultat i ne čudi jer je poznato da respiracijski lanac koji se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija uzrokuje povećani nastanak ROS-ova. Stoga su dobiveni rezultati ukazivali da FB<sub>1</sub> uzrokuje poremećaj staničnog disanja koje se odvija u mitohondrijima. Kako bi potvrdili tu pretpostavku proveli smo seriju pokusa mjerenjem potrošnje kisika pomoću kisikove elektrode na izoliranim stanicama tretiranim s FB<sub>1</sub> te potvrdili da FB<sub>1</sub> remeti stanično disanje. Također pomoću kisikove elektrode pokusima na izoliranim mitohondrijima utvrdili smo da FB<sub>1</sub> inhibira kompleks I respiracijskog lanca mitohondrija. Poznato je da mitohondrij osim staničnog disanja ima važnu ulogu i u skladištenju kalcija, koji služi u staničnoj signalizaciji. Stoga smo sljedećim pokusima provjerili učinak FB<sub>1</sub> kako na depolarizaciju mitohondrijske membrane, tako i na koncentraciju kalcija u citoplazmi stanice. Kako je bilo i za očekivati FB<sub>1</sub> je uzrokovao depolarizaciju mitohondrijske membrane, ali i porast kalcija u citoplazmi što ukazuje da FB<sub>1</sub> remeti i funkciju mitohondrija u skladištenju kalcija. Ovo naše istraživanje pokazalo je da FB<sub>1</sub> u stanici inhibira kompleks I respiracijskog lanca mitohondrija što rezultira smanjenjem mitohondrijske (i stanične) respiracije te depolarizacije mitohondrijske membrane. FB<sub>1</sub>, dakle, remeti normalnu funkciju mitohondrija što dovodi do stvaranja ROS-ova u mitohondriju, ali i do deregulacije kalcijevog signala. Poremećaj pak normalne homeostaze kalcija u stanicama može dovesti do stanične smrti.

Kako bi potvrdili našu pretpostavku da FB<sub>1</sub> uzrokuje depolarizaciju mitohondrijske membrane i remeti normalnu homeostazu kalcija u stanicama proveli smo još jedno istraživanje, ovaj put na primarnoj kulturi neurona štakora (Domijan i sur., 2012.). U tim istraživanjima koristili smo glutamat za kojega je poznato da dovodi do smrti neurona tako da uzrokuje povećano otpuštanje kalcija u citoplazmu stanice, odnosno da uzrokuje depolarizaciju mitohondrijske membrane i deregulaciju kalcijevog signala. Tretman primarne kulture neurona i s FB<sub>1</sub> (0,5 μM) i s glutamatom (5 μM) uzrokovao je depolarizaciju mitohondrijske membrane i značajan porast koncentracije kalcija u citoplazmi u odnosu na tretman samo s glutamatom, odnosno pokazalo se da FB<sub>1</sub> pojačava učinak glutamata na depolarizaciju stanične membrane i deregulaciju kalcija (Grafikon 1.). Ti rezultati potvrdili su rezultate našeg prethodnog istraživanja, odnosno potvrdili su pretpostavku da je mehanizam toksičnosti FB<sub>1</sub> i remećenje normalne stanične homeostaze kalcija.

## ZAKLJUČAK

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je primarni mehanizam toksičnosti fumonizina njihovo upletanje u metabolizam sfingolipida, a kako sfingolipidi imaju važnu ulogu u stanici to dovodi do brojnih poremećaja u stanici. Utvrđeno je i da je oksidacijski stres, iako se pojavljuje poslije drugih zabilježenih promjena, jedan od mehanizama toksičnosti fumonizina. Također naše su nedavne studije pokazale da fumonizini remete normalnu homeostazu kalcija u stanici i tako moguće uzrokuju staničnu smrt. Međutim, niti jedan od spomenutih mehanizama toksičnosti fumonizina ne isključuje drugoga već toksični učinak fumonizina jest splet spomenutih mehanizama. Za vjerovati je da će daljnja istraživanja ukazati i na druge mehanizme toksičnosti fumonizina.

## LITERATURA

1. Abel S., Gelderblom W.C.A. (1998): Oxidative damage and fumonisin B<sub>1</sub>-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicol* 131: 121-131.
2. Atroshi F., Rizzo A., Biese I., Veijalainen P., Saloniemi H., Sankari S., Anderson K. (1999): Fumonisin B<sub>1</sub>-induced DNA damage in rat liver and spleen: effects of pretreatment with coenzyme Q, L-carnitine, α-tocopherol and selenium. *Pharmacol Res* 40: 459-467.
3. Bucci T.J., Hansen D.K., Laborde J.B. (1996): Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with fumonisin B<sub>1</sub>. *Nat Tox* 4:51-52.
4. Domijan A-M., Peraica M., Cvjetković B., Turčin S., Jurjević Ž., Ivić D. (2005a): Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharm* 55: 349-356.
5. Domijan A-M., Peraica M., Jurjević Ž., Ivić D., Cvjetković B. (2005b): Fumonisin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>2</sub>, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Add Contam* 22: 677-681.
6. Domijan A-M., Želježić D., Kopjar N., Peraica M. (2006): Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B- treated rats. *Toxicol* 222: 53-59.
7. Domijan A-M., Želježić D., Milić M., Peraica M. (2007a): Fumonisin B<sub>1</sub>: oxidative status and DNA damage in rats. *Toxicol* 232:163-169.
8. Domijan A-M., Peraica M., Lucić Vrdoljak A., Radić B., Žlender V., Fuchs R. (2007b) The involvement of oxidative stress in ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub> toxicity in rats. *Mol Nutr Food Res* 51:1147-1151.
9. Domijan A-M., Želježić D., Peraica M., Kovačević G., Gregorović G., Krstanec Ž., Horvatin K., Kalafatić M. (2008): Early toxic effects of fumonisin B<sub>1</sub> in rat liver. *Hum Exp Toxicol* 27: 895-900.
10. Domijan A-M., Abramov A.Y. (2011): Fumonisin B<sub>1</sub> inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis - implication to mechanism of cell toxicity. *Int J Biochem & Cell Biol* 43: 897-904.
11. Domijan A-M., Kovac S., Abramov A.Y. (2012): Impact of fumonisin B<sub>1</sub> on glutamate toxicity and low magnesium induced seizure activity in neuronal co-culture. *Neurosci* 202: 10-16.
12. Grenier B., Bracarense A-P.F.L., Schwartz H.E., Trumel C., Cossalter A-M., Schatzmayr G., Kolf-Clauw M., Moll W-D., Oswald I.P. (2012): The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochem Pharmacol* 83: 1465-1473
13. Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak M.J., Vleggaar R., Kriek N.P.J. (1988): Fumonisinins – novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54: 1806-1811.
14. Gelderblom W.C., Kriek N.P., Marasas W.F., Thiel P.G. (1991): Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub>, in rats. *Carcinogen* 12: 1247-1251.

15. Howard P.C., Eppley R.M., Stack M.E., Warbritton A., Voss K.A., Lorentzen R.J., Kovach R.M., Bucci T.J. (2001): Fumonisin B<sub>1</sub> carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect* 109 (Suppl 2):277-282.
16. International Agency for Research on Cancer, IARC. (2002): Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 82. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
17. International Programme on Chemical Safety, IPCS. (2001): Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Add Series. Vol. 47. Geneva, WHO.
18. Ivić D., Domijan A-M., Miličević T., Peraica M., Cvjetković B. (2009a): *Fusarium spp.* contamination wheat, maize, soybean and pea in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol* 60: 435-442.
19. Ivić D., Domijan A-M., Peraica M., Cvjetković B. (2009b): Fumonisin B<sub>1</sub> and zearalenone contamination of wheat in Croatia and influence of fungicide treatments. *Phytoprot* 90: 31-34.
20. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA. (2012): Safety evaluation of certain food additives and contaminants: prepared by Seventy-four meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Add Series. Vol. 65. Geneva, WHO
21. Kellerman T.S., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A., Cawood M., Coetzer J.A.W. (1990): Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. *Onderspoort J Vet Res* 57:269-275.
22. Kwon O.S., Schmued L.C., Slikker Jr. W. (1997a): Fumonisin B<sub>1</sub> in developing rats alters brain sphinganine levels and myelination. *Neurotoxicol* 18: 571-580.
23. Kwon O.S., Sandberg J.S., Slikker Jr. W. (1997b): Effects of fumonisin B<sub>1</sub> treatment on blood-brain barrier transfer in developing rats. *Neurotoxicol Teratol* 19: 151-155
24. Kwon O.S., Slikker Jr. W., Davies D.L. (2000): Biochemical and morphological effects of fumonisin B<sub>1</sub> on primary cultures of rat cerebrum. *Neurotoxicol Teratol* 22: 565-572.
25. Kovačić S., Pepeljnjak S., Petrincec Z., Šegvić Klarić M. (2009): Fumonisin B<sub>1</sub> neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arh Hig Rada Toksikol* 60: 419-426.
26. 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 B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55:197-203.
27. Müller S., Dekant W., Mally A. (2012): Fumonisin B<sub>1</sub> and the kidney: Modes of action for renal tumor formation by fumonisin B<sub>1</sub> in rodents. *Food Chem Toxicol* 50: 3833-3846.
28. National Toxicology Program, NTP (2001): Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Fumonisin B<sub>1</sub> (CAS No. 116355-83-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program. [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr496.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr496.pdf)
29. Osuchowski M.F., Sharma R.P. (2005): Fumonisin B<sub>1</sub> induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2 cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant. *NeuroToxicol* 26: 981-992.
30. Pepeljnjak S., Petrik J., Šegvić Klarić M. (2005): Toxic effects of *Ustilago maydis* and fumonisin B<sub>1</sub> in rats. *Acta Pharm* 55: 339-348.
31. Peraica M., Domijan A-M., Jurjević Ž., Cvjetković B. (2002): Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arh Hig Rada Toksikol* 53: 229-237.
32. Ross P.F., Rice L.G., Reagor J.C., Osweiler G.D., Wilson T.M., Nelson H.A., Owens D.L., Plattner R.D., Harlin K.A., Richard J.L., Colvin B.M., Banton M.I. (1991): Fumonisin B<sub>1</sub> concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. *J Vet Diagn Invest* 3: 238-241.
33. 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 hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J Vet Diagn Invest* 5: 69-74.
34. Rumora L., Domijan A-M., Žanić Grubišić T., Peraica M. (2007): Mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> alters cellular redox balance and signaling pathways in rat liver and kidney. *Toxicol* 242: 31-38.
35. Sorriano J.M., Dragacci S. (2004): Occurrence of fumonisins in food. *Food Res International* 37: 985-1000.
36. Scientific Committee on Food, SCF. (2000): Opinion of the Scientific Committee on Food on fusarium toxins part 3: Fumonisin B<sub>1</sub> (FB1). Brussels, European Commission.



37. Šegvić Klarić M., Pepeljnjak S., Domijan A-M., Petrik J. (2007): Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B<sub>1</sub>, beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100: 157-164.
38. Voss K.A., Smith G.W., Haschek W.M. (2007): Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Sci Technol* 137: 299-325.
39. Wang E., Norred W.P., Bacon C.W., Riley R.T., Merrill Jr. A.H. (1991): Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem* 266: 14486-14490.
40. Wilson T.M., Ross P.F., Rice L.G., Osweiler G.D., Nelson H.A., Owens D.L., Plattner R.D., Reggiardo C., Noon T.H., Pickrell J.W. (1990): Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J Vet Diagn Invest* 2: 213-216.
41. Wilson B.J., Maronpot R.R. (1971): Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals. *Vet Res* 88: 484-486.

### SUMMARY

Fumonisins are a group of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. moulds, predominately by *F. verticilloides* (formerly *F. moniliforme*) mould. From their discovery in 1980s till now, more than 15 types of fumonisins have been isolated and from all isolated fumonisins, FB<sub>1</sub> is the most prevalent one. Fumonisins are found all around the world on various commodities, but they mostly contaminate maize and maize based food and feed. In domestic animals consumption of fumonisins-contaminated feed causes equine leukoencephalomalacia (ELEM) in horses, and pulmonary oedema in pigs. To experimental animals fumonisins are found to be nephrotoxic, hepatotoxic and carcinogenic. In certain regions of the world where maize is staple food (as Central America and South Africa) development of several human diseases, as such primary liver cancer, oesophageal cancer, and neural tube defect is connected with exposure to fumonisins. However, the link between the consumption of fumonisin-contaminated food and development of mentioned diseases is not confirmed in epidemiological studies. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified the most prevalent fumonisin, FB<sub>1</sub> as a possible carcinogen to humans (group 2B). On cellular level several mechanisms of FB<sub>1</sub> toxicity are studied and the most important one is disturbance of sphingolipid metabolism. Since FB<sub>1</sub> treatment induced changes in parameters of oxidative stress, oxidative stress was suggested as mechanism of FB<sub>1</sub> toxicity. Our recent studies on cells of neural origin indicate that FB<sub>1</sub> may cause cell death by disturbing calcium homeostasis and thus disturbance of calcium homeostasis could be one of possible mechanisms of fumonisins neurotoxicity as well as toxicity.

Key words: mycotoxins, fumonisin B<sub>1</sub>, neurotoxicity, equine leukoencephalomalacia