

THE EFFECT OF T-2 TOXIN, HT-2 TOXIN AND DEOXYNIVALENOL ON THE SECRETION ACTIVITY OF PORCINE OVARIAN GRANULOSA CELLS

Maruniakova N., Medvedova M., Kolesarova A., Capcarova M., Sirotkin A.V., Bulla J.

Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia

E-mail: noramaruniakova@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to examine the secretion of progesterone by porcine ovarian granulosa cells after T-2 toxin, HT-2 toxin and deoxynivalenol addition *in vitro*. Ovarian granulosa cells were incubated with T-2, HT-2 toxin and deoxynivalenol for 24h: 10, 100 and 1000 ng.ml⁻¹, while the control group received no trichothecenes. Progesterone was determined by RIA. Progesterone release was stimulated by T-2 toxin and deoxynivalenol (at 1000 ng.ml⁻¹ but not at 10 and 100 ng.ml⁻¹). After addition of HT-2 toxin the release of progesterone was stimulated (at 100 and 1000 ng.ml⁻¹ but not at 10 ng.ml⁻¹). Our *in vitro* results represent, that T-2 toxin, HT-2 toxin and deoxynivalenol have a dose-dependent effect on the secretion activity of porcine ovarian granulosa cells.

Key words: T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol, progesterone

Acknowledgments: The authors are thankful to Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria for provided mycotoxin and colleagues from the Institute for Genetics and Reproduction of Farm Animals, Animal Production Research Centre Nitra, particularly to Mrs. Katarina Tothova and Ing. Zofia Kuklova for their skillful technical assistance. This work was financially supported by the Slovak Research and Development Agency project no. 0299-06, the Ministry of Education of the Slovak Republic project no. 1/0696/08 and no. 1/0834/08.

ÚVOD

Mikroskopické huby z rodu *Fusarium* sú častými producentmi mykotoxínov zo skupiny trichotecénov (Eriksen a Alexander, 1998). Trichotecény sú klasifikované do štyroch skupín (typ A, B, C, D) na základe ich chemickej štruktúry ako aj ich producentov. Diacetoxyscirpenol (DAS) a T-2 toxín patriace do skupiny A trichotecénov a deoxynivalenol (DON) a nivalenol (NIV) zo skupiny B trichotecénov, sú známe ako najčastejšie sa vyskytujúce a silné trichotecény (Ueno, 1985, Rocha et al., 2005). Trichotecény sú skupinou štrukturálne príbuzných mykotoxínov vzájomne sa odlišujúcich silou cytotoxického účinku (WHO, 1990). Vyznačujú sa karcinogénnymi, genotoxickými, mutagénymi, cytotoxickými, antibiotickými, protívírusovými, insekticídnymi, antileukemickými, imunosupresívnymi a kancerostatickými účinkami (Betina, 1990).

T-2 toxín je ľahko metabolizovaný na HT-2 toxín a rozdiel v štruktúre je len vo funkčnej skupine v polohe C4 (Canady et al., 2010). Výskumy preukazujú výskyt T-2 a HT-2 toxínu v obilninách (pšenica, kukurica, ovos, jačmeň, ryža, fazuľa) ako aj v niektorých produktoch z obilnín (Creppy, 2002). Vystavenie T-2 toxínu spôsobuje precitlivenosť pokožky, svrbenie, začervenanie, pľuzgieriky, šupanie pokožky, nauzeu, stratu telesnej hmotnosti, zvracanie a hnačku. Pri ťažších otravách dochádza ku kolapsom, slabosti, ataxii, k zníženej srdcovej činnosti, šoku a k smrti (WHO, 2001). T-2 toxín je silným inhibítorom syntézy proteínov *in vivo* aj *in vitro* podmienkach (Creppy, 2002). Orálne podanie 10 mg.kg⁻¹ T-2 toxínu u myši viedlo k apoptóze lymfocytov v tkanive týmusu, lymfatických uzlinách a v Peyerových plakoch (Nagata et al., 2001). Leukopénia, granulopénia, strata kostnej drene, progresívna lymfocytóza sú patologickými symptómami otravy T-2 toxínom (Islam et al., 1998). Deoxynivalenol je odolný voči mechanickému spracovaniu obilnín, zvýšenej teplote a rýchlo vstupuje do potravinového reťazca (Fink-Gremmels, 1999). DON je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich mykotoxínov v obilninách (Rotter et al., 1996), dominantne sa vyskytuje v pšenici, jačmeni, kukurici a menej často v ovsi, ryži, čiroku a tritikale (Creppy, 2002). Vyznačuje sa silným akútnym aj chronickým účinkom v závislosti od použitej dávky. Je rýchlo absorbovaný po orálnom podaní, pasívne je absorbovaný v celom tráviacom trakte a aktívne v obličkách (Marquardt and Frohlich, 1992), pečeni, svaloch, tukovom tkanive (Gareis and Scheuer, 2000) a v tkanivách reprodukčnej sústavy (Ranzenigo et al., 2008). DON spôsobuje ochorenia a smrť u hospodárskych aj experimentálnych zvierat inhibíciou syntézy proteínov (Rotter et al., 1996). Ošipané sú obzvlášť citlivé na pôsobenie deoxynivalenolu (Rotter et al., 1996). Prvotne zasiahnutý účinkom DON-u je imunitný systém (monocyty, makrofágy ako aj T a B lymfocyty) (Pestka et al., 2004).

Steroidný hormón progesterón je hlavným ovariálnym hormónom (Arnhold et al., 2009, Kolesárová et al., 2008), ktorý je popisovaný v granulóznych bunkách vaječníkov prasičiek (Kolesárová et al., 2008), v ovariálnych folikuloch ošipáných (Skarzynski et al., 2008) a v žltom teliesku (Gregoraszczuk, 1997). Mykotoxíny spôsobujú zmeny granulóznych buniek, ovplyvňujú produkciu steroidných hormónov, vývoj oocytov (Alm et al., 2002; Minervini et al., 2001), ovuláciu (Kumagai and Shimizu, 1982), funkciu reprodukčnej sústavy a priebeh gravidity (D'mello et al., 1999; Alm et al., 2002). Cieľom *in vitro* štúdie bolo skúmať vplyv vybraných trichotecénov T-2, HT-2 a DON na sekréciu steroidného hormónu progesterónu ovariálnymi granulóznymi bunkami prasičiek.

MATERIÁL A METODIKA

Vaječníky získané pri zabití zvierat od necyklujúcich pubertálnych prasičiek plemena biela ušľachtilá sme individuálne uskladnili v termoske s fyziologickým roztokom pri izbovej teplote a spracovali maximálne do 6 hodín od zabitia zvierat. Ovariálne granulózne bunky sme izolovali metódou aspirácie zo stredne veľkých folikulov (3-5 mm). Suspenziu granulóznych buniek sme odstreďovali (1500 ot. min⁻¹, 10 minút) za účelom oddelenia od folikulovej tekutiny s následným premývaním pomocou sterilného kultivačného média DMEM/F12 1:1 (BioWhittakerTM, Verviers, Belgium) doplneného 10 % fetálnym tel'acím sérom (BioWhittakerTM) a antibiotikom – antimykotikom (Sigma, St. Louis, MO, USA). Pomocou hemocytometra sme počítali bunky a upravili koncentráciu buniek na potrebnú (10⁶ buniek.ml⁻¹ média). Bunkovú suspenziu riedenú kultivačným médiom sme kultivovali (37 °C, 5 % CO₂) v kultivačných platničkách (1 ml.kultúra⁻¹). Po 5-7 dňoch kultivácie, keď bunky vytvorili na 75 % súvislú monovrstvu, sme médium nahradili čerstvým médiom s 10 % fetálnym tel'acím sérom, bez prítomnosti antibiotík a bez (kontrola)/s prídavkom vybraných trichotecénov: T-2, HT-2, DON (Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Rakúsko) v rôznych koncentráciách 10, 100 a 1000 ng.ml⁻¹. Po 24 h kultivácii sme injekčnou striekačkou odobrali médium z kultivačných platničiek a uskladnili pri teplote -70 °C až do doby rádioimunoanalýzy (RIA). Koncentrácie progesterónu boli stanovené metódou RIA v 25-100 µl inkubačného média. Tieto látky boli naviazané použitím RIA kitov (Immunotech SAS, Marseille Cedex, France) podľa inštrukcií výrobcu (Makarevich a Sirotkin, 1999). Všetky RIA súpravy boli určené pre použitie vzoriek kultivačného média. Štatistické rozdiely medzi kontrolnou skupinou (bez pôsobenia T-2/HT-2 toxínu a DON) a experimentálnou skupinou vystavenou pôsobeniu T 2/HT-2/deoxynivalenolu boli hodnotené Two Way ANOVA test, použitím štatistického programu Sigma Plot 11.0 (Jandel, Corte Madera, USA). Hodnoty predstavujú priemer ± SEM. Signifikantnosť rozdielov medzi skupinami bola určená na úrovni p<0,05.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej *in vitro* štúdii sme skúmali sekrečnú schopnosť ovariálnych granulóznych buniek so zameraním na uvoľnenie progesterónu po experimentálnom podaní vybraných mykotoxínov T-2, HT-2 toxínu a deoxynivalenolu. Po aplikácii rôznych dávok T-2, HT-2 toxínu a DON sme

zaznamenali diferencie v sekrécii steroidného hormónu progesterónu medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami.

Vplyv T-2 a HT-2 toxínu na sekréciu progesterónu.

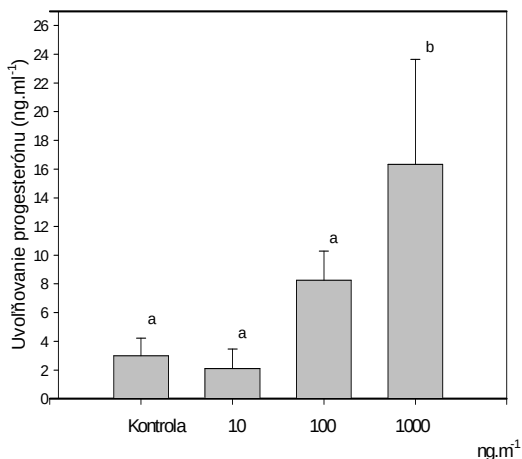
T-2 toxín v dávke 1000 ng.ml⁻¹ signifikantne zvyšoval ($p < 0,05$) sekréciu progesterónu v porovnaní s kontrolnou skupinou, pričom po podaní dávok 10 a 100 ng.ml⁻¹ neboli zaznamenané signifikantné rozdiely (Obr. 1). T-2 toxín má priamy účinok na steroidogézu a proliferáciu granulóznych buniek ošipaných v závislosti od použitej dávky (Caloni et al., 2009), čo je v súlade s našou štúdiou. U samičiek králikov boli zaznamenané nízke koncentrácie progesterónu v krvnej plazme a poruchy funkcií vaječníkov vplyvom T-2 toxínu (Fekete et al., 1992). Podobne Glavits et al. (1983) uvádzajú, že T-2 toxín spôsobuje zmeny v reprodukčnej sústave a možné aberácie reprodukčnej sústavy prasničiek. K zastaveniu dozrievania folikulov vo vaječníkoch husí a degenerácii folikulov došlo po podávaní T-2 toxínu (Vanyi et al., 1994). U prasničiek T-2 toxín môže vyvolávať neplodnosť a po parenterálnom podávaní počas posledného trimestra gravidity je schopný vyvolať potraty v priebehu 48 hodín (Weaver et al., 1986). Miller-Patric et al. (1988) uvádzajú, že podávanie T-2 toxínu *in vivo* signifikantne redukovalo koncentráciu proteínov v ovariálnych granulóznych bunkách potkanov.

HT-2 toxín v dávke 100 a 1000 ng.ml⁻¹ signifikantne stimuloval ($p < 0,05$) sekréciu progesterónu v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 2). Nesignifikantné diferencie ($p < 0,05$) boli sledované vplyvom HT-2 toxínu v dávke 10 ng.ml⁻¹. Caloni et al. (2009) popisujú inhibíciu produkcie progesterónu o 30 % po podaní T-2 toxínu v dávke (1 ng.ml⁻¹). Naše výsledky poukazujú na možný dávkovo-závislý účinok A-trichotecénov.

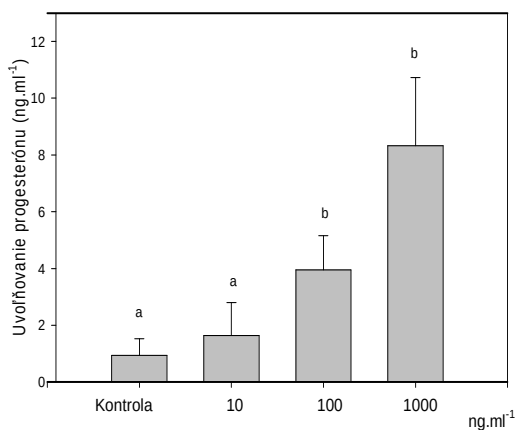
Vplyv deoxynivalenolu na sekréciu progesterónu

Deoxynivalenol v dávke 1000 ng.ml⁻¹ signifikantne stimuloval uvoľňovanie progesterónu ovariálnymi granulóznymi bunkami prasničiek. Po podaní 10 a 100 ng.ml⁻¹ DON neboli zaznamenané signifikantné zmeny medzi pozorovanými skupinami (Obr. 3). Účinky deoxynivalenolu na reprodukčnú sústavu samcov potkanov skúmali Sprando et al. (2005), ktorí zaznamenali zvýšené koncentrácie folikulostimulačného (FSH) a luteinizačného hormónu (LH), a zároveň zaznamenali znížené koncentrácie testosterónu v sére v závislosti od použitých koncentrácií daného toxínu. Podobne aj v prípade zearalenonu, patriaceho do skupiny trichotecénov, boli zaznamenané hormonálne zmeny v koncentracii progesterónu v závislosti od použitej dávky (Gajacka et al., 2008). Podľa Ranzenigo et al. (2008) ktorí po podávaní DON-u zaznamenali odlišné výsledky, kedy DON inhiboval produkciu progesterónu pri 100 a 1000 ng.ml⁻¹. Pri aplikácii 10 ng.ml⁻¹ autori nezaznamenali preukazné rozdiely, čo je v súlade s naším zistením. DON negatívne ovplyvňoval graviditu ošipaných v smere inhibície dozrievania oocytov a následne funkciu reprodukčnej sústavy (Alm et al., 2002, 2006). Naše výsledky poukazujú na možný dávkovo-závislý účinok B-trichotecénov na ovariálne bunky.

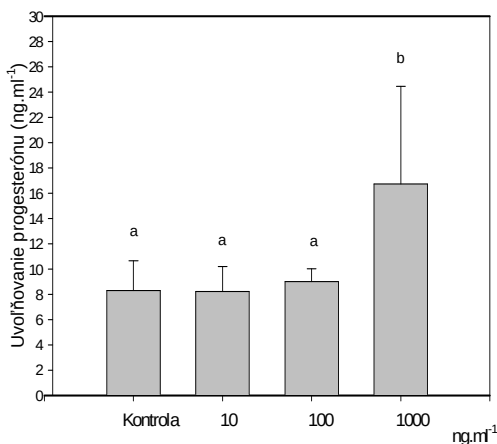
Graf 1 Vplyv T-2 toxínu na uvoľňovanie progesterónu granulóznymi bunkami vaječníkov (ng.ml^{-1}), a,a- nesignifikantné rozdiely ($p>0,05$), a,b - signifikantné rozdiely ($p<0,05$)



Graf 2 Vplyv HT-2 toxínu na uvoľňovanie progesterónu granulóznymi bunkami vaječníkov (ng.ml^{-1}), a,a- nesignifikantné rozdiely ($p>0,05$), a,b - signifikantné rozdiely ($p<0,05$)



Graf 3 Vplyv DON na uvoľňovanie progesterónu granulóznymi bunkami vaječníkov (ng.ml^{-1}), a, a - nesignifikantné rozdiely ($p > 0,05$), a,b - signifikantné rozdiely ($p < 0,05$)



ZÁVER

Naše zistenia poukazujú na možný účinok prírodných toxínov T-2, HT-2 toxínu a deoxynivalenolu na sekrečnú schopnosť granulóznych buniek vaječníkov prasničiek v závislosti od použitej dávky, a preto sú nevyhnutné ďalšie štúdie pre bližšie objasnenie účinku trichotecénov na granulózne bunky prasničiek.

LITERATÚRA

Alm H., et al. (2002): The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicol in vitro.*, 16 (6): 643–648.

Alm H. et al. (2006): Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reproductive Toxicology.*, 22: 44–50.

Arnhold I.J, Lofrano-Porto A., Latronico A.C. (2009): Inactivating mutations of lutetizing hormone beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligomenorrhea and infertility in women. *Hormone Research*, 71: 75-82.

Betina, V. (1990): Mykotoxíny, chémia – biológia-ekológia. Bratislava: ALFA, 1990. 288 s. ISBN 80-05-00631-4.

Caloni F. et al. (2009): Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells. *Toxicon*: 337-344.

Canady A. R. et al. (2010): T-2 and HT-2 toxins. IPCS Inchem home. [online], b. v., 2010. [cit. 2010-09-04]. Dostupné na: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm>>.

Creppy E.E. (2002): Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. In *Toxicology Letters*, 127: 19-28.

D'mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald, A.M.C. (1999): Fusarium mycotoxins, a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 80: 183–205.

Eriksen G.S. – Alexander J. (1998): Fusarium toxins in cereals – a risk assessment. Nordic Council of Ministers, Tema Nord 1998, 502, Copenhagen.

Fekete S. et al. (1992): Effect of long-term feeding of sublethal quantities of T-2 toxin upon the ovarian activity of the rabbit. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 583-593.

Fink-Gremmels J. et al. (1999): Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet. Q.*, 21: 115-120.

Gajecka M. et al. (2008): Influence of long-term zearalenone intoxication on the concentration of progesterone and 17 β -oestradiol in blood plasma in bitches. *Bull. Vet. Ins. Pulawy*, 52: 405-409.

Gareis M., Scheuer, R. (2000): Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51: 102–104.

Glavits R. (1983): Reproductive disorders caused by trichothecene mycotoxins in a large-scale pig herd. *Acta Veterinaria Hungarica*. 31: 173-180.

Gregoraszcuk E.L. (1997): Progesterone, androgen and estradiol production by porcine luteal cell subpopulations: dependence on cell composition and periods of luteal phase. *Endocrine Regulation*, 31: 41–46.

Islam Z. et al. (1998): T-2 toxin induces thamic apoptosis in vivo in mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 148: 205-214.

Kolesárová A., Sirotkin A., Kováčík J. (2008): Endokrinné a vnútrobunkové mechanizmy pohlavného dospievania prasničiek. Vedecká monografia. Nitra : SPU, 131 s. ISBN 978-80-552-0109-2.

Kumagai S., Shimizu T. (1982): Neonatal exposure to zearalenone causes persistent anovulatory estrus in the rat. *Arch. Toxicol.*, 50: 279–286.

Makarevich A., Sirotkin A. (1999): Development of sensitive radioimmunoassay for IGF-I determination in samples from blood plasma and cell-conditioned medium. *Veterinarna Medicina*, 44: 71–78.

Marquardt R.R., Frohlich, A.A. (1992): A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*. 70: 3968–3988.

Miller-Patrick K. et al. (1988): Cytophotometric assessment of granulosa cell protein and nucleic acid levels during they estrous cycle in rats treated with T-2 toxin. *Life Sci.*, 43: 2231-2239.

Minervini F. (2001): Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol in vitro.*, 15: 489–495.

Nagata T. et al. (2001): Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 53: 309–315.

Pestka J.J. et al. (2004): Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes : unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.*, 153: 61-73.

Ranzenigo G. et al. (2008): Effects of Fusarium mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 107 (1–2): 115–130.

Rocha O. et al. (2005): Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells. *Food Addit. Contam.*, 22: 369-378.

Rotter B.A. et al. (1996): Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health.*, 48: 1-34.

Skarzynski D.J. et al. (2008): In vitro Assessment of Progesterone and Prostaglandin E (2) production by the Corpus Luteum in Cattle Following Pharmacological Synchronization of Estrus. *The Journal of Reproduction and Development*, 29. [Epub ahead of print].

Sprando, R. et al. (2005): Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food and Chemical Toxicology*. 43: 623–635.

Vanyi A. et al. (1994): Pathomorphological changes caused by T-2 trichothecene fusariotoxin in geese. *Acta Vet. Hung.*, 42: 447-457.

Weaver G.A. et al. (1986): Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1395-1397.

World Health Organization (2001): Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, Presented at the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO, Geneva, p. 557.

World Health Organization, I.P.C.S., (1990): Trichothecenes. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. World Health Organization, Geneva.

Ueno Y. (1985): The toxicology of mycotoxins. *Crit. Rev. Toxicol.*, 14: 99-132.