

## BIOCHEMICAL PROFILE OF EFFECT OF DEOXYNIVALENOL SUPPLEMENTED BY MOULDY CEREALS ON RATS

Šobrová P.<sup>1</sup>, Vašátková A.<sup>2</sup>, Křížková S.<sup>1</sup>, Zeman L.<sup>2</sup>, Adam V.<sup>1</sup>, Kizek R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: papaya1@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

### ABSTRACT

The aims of this thesis consisted of investigating the impact mouldy grain contaminated with deoxynivalenol (DON) on the health status of rats and their ability to resist oxidative stress. Rats were 28 days feeding of diet supplemented with DON and others (organic and inorganic zinc, the addition of vitamins and mycosorb). Among the factors determining the levels of defences include peptides and proteins (glutathione, metallothionein (MT)). The highest concentration of MT was found in the tissues providing detoxification of xenobiotics, such as kidney (6.69 +/- 0.05 µg/ml) and liver (6.06 +/- 0.05 µg/ml). Half concentration was detected in heart, brain, testes and muscle (app. 3.0 µg/ml). In conclusion, the MT may play an important role in the detoxification of mycotoxins. Its role is not fully understood, but this protein is most likely associated with the redistribution of ions important for transcription factors and its interaction with reactive oxygen species that can form mycotoxins.

**Key words:** metallothionein, zinc prostate cancer, magnetic particles, PC-3, PNT1A, tumor marker

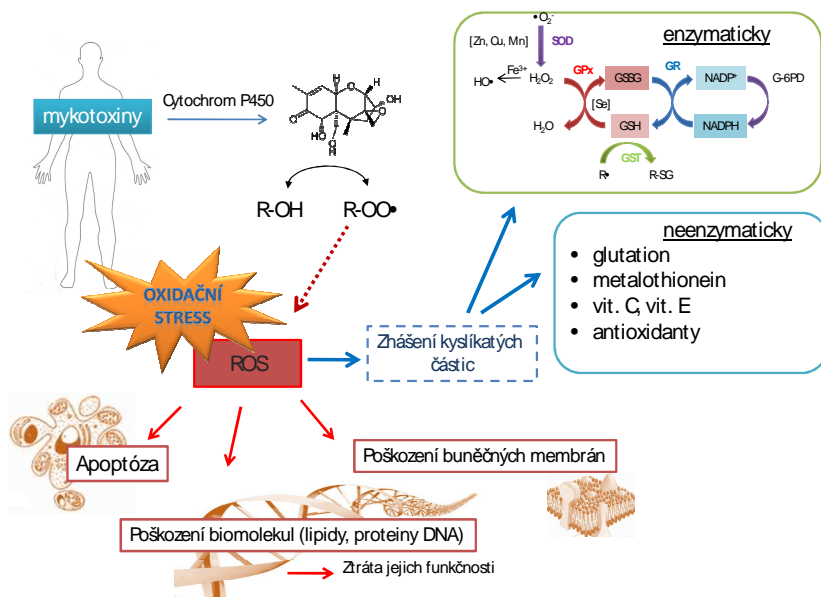
**Acknowledgments:** Financial support from the following grants GACR 301/09/P436, IGA MZ 10200-3 is highly acknowledged.

## ÚVOD

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní vyskytující se na zemědělských plodinách a následně i v konečných produktech určených k výživě lidí a zvířat (Jajic a kol., 2008). Podle údajů Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je ročně kontaminováno mykotoxiny až 25 % světových zásob (Atrosi a kol., 2002). Největší skupinou rostlinných patogenů jsou fusáriové mykotoxiny, a to zejména *Fusarium graminearum* a *F. culmorum* (Razzazi-Fazeli a kol., 2003). Oba tyto druhy jsou významnými producenty toxinu zvaného deoxynivalenol (DON) neboli vomitoxin, který vzhledem ke své vysoké toxicitě patří u nás k zdravotně nejzávažnějším mykotoxinům. DON si své jméno získal díky jeho emetickým účinkům, které byly pozorovány u krav po požití zaplísněného obilí (Kushiro, 2008; YazaraOmurtag, 2008). Další neméně významný účinek DONu vyskytující se při dlouhodobém požívání je jeho imunotoxicita týkající se především změny rezistence hostitele na humorální a buněčné přenosové odezvy, zvýšená hladina IgA, IgA spojený s nefropatií, exprese cytokininu a apoptóza lymfatických tkání (PestkaBondy, 1990; Pestka a kol., 2004). Dále se u DONu projevují reprodukční a teratogenní účinky (Debouck a kol., 2001), cytotoxicita a genotoxicita (Li a kol., 2000; Sun a kol., 2002). Karcinogenní účinky nebyly prozatím prokázány a podle IARC (The International Agency for Research on Cancer) patří do skupiny karcinogenity III, tedy nekarcinogenní pro člověka (Iverson a kol., 1995).

Při vstupu mykotoxinů do organismu se aktivuje v těle řada mechanismů za účelem snížení jejich toxicity a následného vyloučení. Jedním ze základních mechanismů je reakce cytochromu P450, který zvyšováním polaritě daného xenobiotika umožňuje jeho snadnější vylučování. Tento mechanismus však může mít i výsledek přesně opačný. Deoxynivalenol ve své struktuře obsahuje velké množství volných –OH skupin, které při jeho metabolizaci pomocí cytochromu P450 mohou být hydroxylovány za vzniku hydroperoxidů, což má za následek řetězovou reakci a tím tvorbu dalších kyslíkových radikálů (Rizzo a kol., 1994). Po expozici mnoha druhů xenobiotik vzniká oxidativní stres, který je dán následkem nerovnováhy mezi reaktivními kyslíkatými částicemi (ROS) a antioxidanty, neboli látkami pomáhajícími ROS odstranit. Při oxidativním stresu dochází k oxidativnímu poškození biomolekul, jako jsou lipidy, DNA a proteiny, což vede ke změně jejich struktury a zejména biologické funkce. Tyto změny jsou dávány do souvislosti s patogenezí celé řady procesů (Valko a kol., 2006). Pro zhasení kyslíkových radikálů slouží antioxidantní reakce, které mohou být enzymatického či neenzymatického charakteru. Mezi enzymy zabezpečující antioxidantní reakce patří zejména glutathionperoxidáza, kataláza, superoxid dismutáza aj. K neenzymatickým antioxidantům se řadí vitamín E, kyselina askorbová (vitamín C), glutathion (GSH) či metalothionein (MT) (Sobrova a kol., 2010; Vasatkova a kol., 2009).

Interakce mykotoxinů s biomolekulami byly intenzivně zkoumány a základní metabolické cesty jsou zobrazeny na obrázku 1.



Obr. 1: Základní schéma detoxifikačního metabolismu mykotoxinů v organismu. Po vstupu mykotoxiny do organismu dochází k jeho odbourávání pomocí skupiny enzymů cytochromu P450. Vlivem velkého množství volných –OH skupin u DONu dochází paradoxně ke zvýšení toxicity, a to tvorbou velkého množství hydroperoxidů, které náleží mezi ROS. Pokud jsou ROS v nadbytku, mohou způsobovat oxidační stres buňky, který má za následek poškození biomolekul, zejména lipidů, proteinů a DNA, poškození buněčných membrán, které mohou vést až k buněčné smrti. Obranným mechanismem buňky proti oxidačnímu stresu slouží řada mechanismů, které mohou být enzymatické či neenzymatické povahy. Mezi nejvýznamnější neenzymatické zhášeče patří glutathion, metalothionein a vitamíny skupiny C a E. Neenzymatické mechanismy zahrnují řadu enzymatických reakcí. ROS ve formě superoxidu je přeměňován na peroxid vodíku superoxididismutázou (SOD). Peroxid je rozkládán glutathionperoxidázou (GPX) za spotřeby redukovaného glutathionu (GSH). Obnovu z jeho oxidované formy (GSSG) na redukovanou zajišťují enzymy glutathionreduktáza (GR) a glukosa-6-fosfátdehydrogenáza. Glutathion-S-transferáza může přímo přenášet GSH na radikál a tak ho inaktivovat.

V naší práci jsme se věnovali sledování vlivu plísněmi kontaminované potravy na hladinu proteinu metalothioneinu v krvi a tkáních potkanů *Wistar albino*. V závislosti na hladině MT se pak porovnávala schopnost bránit se organismu oproti oxidačnímu stresu a to nejen z pohledu celého organismu ale i z hlediska jednotlivých orgánů. Navíc byl sledován efekt přídatku vitamínů a různých forem zinku k takto kontaminovanému krmivu.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Chemikálie*

$\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , MT a další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA). K přípravě pufrů a standardních roztoků MT byla použita voda ACS čistoty od Sigma Aldrich. Při přípravě pufrů byly pH hodnoty měřeny pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), řízeného počítačem se softwarem (MultiLab Pilot, Weilheim, Německo).

### *Bilogický materiál*

Pokus byl proveden v experimentálním zařízení Ústavu výživy zvířat a pícninářství AF MENDELU v Brně (v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb). V pokusu bylo zařazeno celkem 80 samců laboratorního potkana kmene *Wistar albino* ve věku 28 dní, kteří byli po osmi rozřazeni do 10 experimentálních skupin. První pěti skupin byl podáván nekontaminovaný ječmen a druhé pěti skupin byl podáván ječmen kontaminovaný DONem ( $80 \pm 5 \mu\text{g}$  na kilogram zaplísňeného ječmene). Obě tyto skupiny byly dále rozděleny do pěti paralelních podskupin s rozdílným složením krmných směsí s vyšším obsahem zinku (anorganická a chelátovaná forma) a vitamínu C. První, kontrolní skupina, obsahovala pouze vitamínový a minerální premix (3 g na 100 g pokusné krmné směsi) vypočítaný dle výživových požadavků u potkanů (NRC). Další čtyři skupiny byly obohaceny, kromě minerálního premixu, ještě anorganickou (12 mg/kg krmné směsi) a organickou formou zinku (12 mg/kg krmné směsi) a mycosorbem.

### *Příprava vzorku*

Pro analýzu byly použity vzorky plné krve a tkáně (játra, ledviny, slezina, srdce, stehenní sval, mozek, varle, oko) potkanů. Svalová tkáň byla nejprve homogenizována pomocí poloautomatického homogenizátoru (Schutt homogen plus, Německo) a následně převedena do roztoku pomocí fosfátového pufru o  $\text{pH} = 6,8$ . Vzorky pro stanovení MT byly nejprve denaturovány 15 min. při  $99^\circ\text{C}$ . Zde se využívá termostabilita MT, kdy dojde k zdenaturování proteinů a MT zůstává nezdenaturovaný v supernatantu (Petrlova a kol., 2006).

### *Elektroanalytické stanovení metalothioneinu*

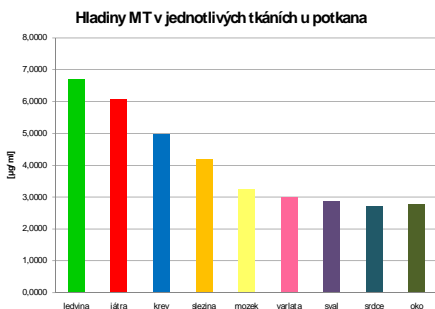
Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní

elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm<sup>2</sup>; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm<sup>-3</sup> Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> a 1 mol.dm<sup>-3</sup> amonný pufr; NH<sub>3</sub>(aq) + NH<sub>4</sub>Cl (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9,6) byl po každých 3 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, Eads = 0 V, teplota 20 °C.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky získané elektrochemickou analýzou jsme porovnávali z hlediska obsahu MT. Při porovnání hladiny MT v krevním séru v závislosti na krmné skupině je rozdíl mezi skupinou vystavenou mykotoxinu a kontrolou statisticky nevýznamný. Příjem mykotoxinu způsobil u plazmy zvýšení hladiny MT o 30 %. Z původních 4,98 µg/ml na 6,16 µg/ml. Mimo to, že se hladiny MT u jednotlivých orgánů lišily, bylo vždy zaznamenáno mírné zvýšení hladin MT u skupin, který byly krmeny ječmenem kontaminovaným oproti nekontaminovanému. Nejvyšší hladinu v každé skupině vždy vykazovali jedinci, jejichž strava byla obohacena chelátovanou formou zinku. Anorganická forma zinku také zvyšovala expresi MT, ale už nedosahovala hodnot zinku organického. Vitamíny suplementovaná strava neodrážela výrazný efekt vlivu po podání. V případě podávání mykosorbu byly hodnoty blízké kontrole dané skupiny.

Při porovnání průměrných hladin MT v jednotlivých orgánech je zřejmé, že se tyto hladiny lišily (Obr. 2). Nejvyšší množství bylo obsaženo v játrech (6,7 µg/ml) a ledvinách (6,1 µg/ml) jakožto orgánech zabezpečující detoxifikaci xenobiotik. Jejich množství bylo až dvojnásobné oproti ostatním orgánům. Zvýšenou hladinu taktéž vykazovala plazma (4,9 µg/ml) a slezina (4,2 µg/ml). Podobná hladina je nejspíše dána funkcí sleziny jako rezervoáru krve. Slezina se téže podílí na imunitní obraně organismu, a v ní detekovaná zvýšená hladina MT může být odezvou na imunosupresivní vlastnosti DONu. Hladiny MT obsaženy ve zbývajících orgánech se už příliš nelišily a pohybovaly se v rozmezí 3,0±0,1 µg/ml. Koncentrace MT v mozku se pohybovala okolo 3,1 µg/ml. Tato hladina odpovídá pouze izoformě MT-3, která se jediná vyskytuje v mozku. Hodnota MT srdečního svalu (bez krve) je blízká hodnotě MT ve svalu z důvodů jejich podobné fyziologické funkce činnosti svalové tkáně. Zajímavá je korelace výskytu DONu v tělních orgánech v porovnání s množstvím MT. Jak již bylo popsáno v mnoha pracích, dochází po expozici DONu k jeho distribuci do tělních orgánů. Bylo popsáno, že po 30 minutové expozici DONu (25mg/kg) se DON rychle rozšířil do orgánů: ledviny (5,68 µg/g) > srdce (4,53 µg/g) > krev (4,43 µg/g) > játra (3,90 µg/g) > brzlík (3,64 µg/g) > slezina (2,90 µg/g) > mozek (0,73 µg/g) [88]. Hodnoty, kde docházelo k zvýšené distribuci DON, korelovaly i se zvýšenou hladinou MT.



Obr. 2 Hladiny MT v jednotlivých orgánech a krvi potkana (krev odpovídá hodnotě  $0,73\mu M$ ).

## ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že MT může hrát důležitou roli při detoxifikaci mykotoxinů. Jeho přesná role zatím není zcela objasněna, ale tento protein je s největší pravděpodobností spojen s redistribucí důležitých iontů k transkripčním faktorům a jeho interakce s reaktivními kyslíkatými částicemi, které mykotoxiny mohou tvořit.

**Poděkování:** práce na tomto příspěvku byla podpořena projekty MSMT 6215712402 a GA AV IAA401990701

## LITERATURA

- Atroshi F., Rizzo A., Westermarck T., Ali-Vehmas T. (2002): Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology* 180(2):151-167.
- Debouck C., Haubruge E., Bollaerts P., van Bignoot D., Brostaux Y., et al. (2001): Skeletal deformities induced by the intraperitoneal administration of deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *International Orthopaedics* 25(3):194-198.
- Iverson F., Armstrong C., Nera E., Truelove J., Fernie S., et al. (1995): Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* 15(6):283-306.
- Jajic I., Juric V., Glamočić D., Abramovic B. (2008): Occurrence of Deoxynivalenol in Maize and Wheat in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences* 9(11):2114-2126.
- Kushiro M. (2008): Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 9(11):2127-2145.

- Li S.G., Ouyang Y.L., Yang G.H., Pestka J.J. (2000): Modulation of transcription factor AP-1 activity in murine EL-4 thymoma cells by vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicology and Applied Pharmacology* 163(1):17-25.
- Pestka J.J., Bondy G.S. (1990): Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 68(7):1009-1016.
- Pestka J.J., Zhou H.R., Moon Y., Chung Y.J. (2004): Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters* 153(1):61-73.
- Petrova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., et al. (2006): Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta* 51(24):5112-5119.
- Razzazi-Fazeli E., Bohm J., Adler A., Zentek J. (2003): Fusarium mycotoxins and their significance in animal husbandry. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90(8):202-210.
- Rizzo A.F., Atroshi F., Ahotupa M., Sankari S., Elovaara E. (1994): Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid-peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 41(2):81-90.
- Sobrova P., Adam V., Vasatkova A., Beklova M., Zeman L., et al. (2010): Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisc. Toxicol.* 3(3):101-106.
- Sun X.M., Zhang X.H., Wang H.Y., Cao W.J., Yan X., et al. (2002): Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G(1) on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro'. *Biomedical and Environmental Sciences* 15(2):145-152.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1):1-40.
- Vasatkova A., Krizova S., Adam V., Zeman L., Kizek R. (2009): Changes in Metallothionein Level in Rat Hepatic Tissue after Administration of Natural Mouldy Wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 10(3):1138-1160.
- Yazar S., Omurtag G. (2008): Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* 9(11):2062-2090.