

ФАРМАКОЛОГІЯ, ФАРМАКОГНОЗІЯ І ТОКСИКОЛОГІЯ

УДК 577.1:619

ОХРАТОКСИН: ОБМІН ТА ДІЯ НА ОРГАНІЗМ ТВАРИН

Федець О.М., к.с.-г.н., доцент, olehfedets@yahoo.com

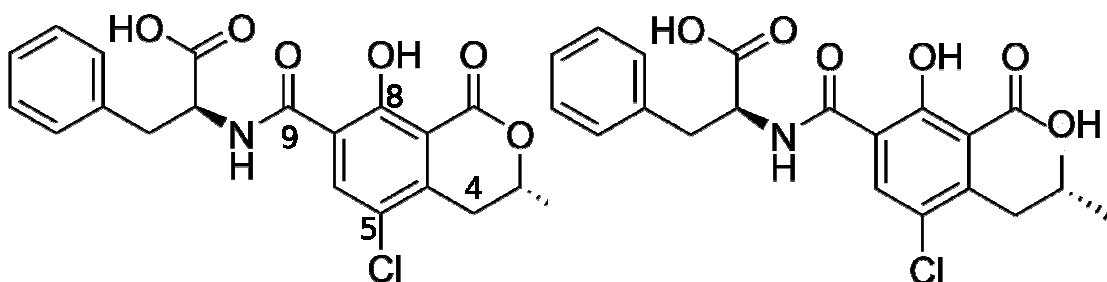
Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького, м. Львів

Анотація. В огляді узагальнені дані про будову охратоксину, його перетворення в організмі, наслідки впливу та молекулярні механізми клітинного пошкодження.

Ключові слова: охратоксин, кишки, печінка, цитотоксичність.

Актуальність проблеми. Охратоксин (ОТ) є токсичною сполукою, яку зазвичай виробляють гриби двох видів *Penicillium verrucosum* Dierckx та *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, останній зараз називають *Aspergillus alutaceus* Berkeley та Curtis [26]. Охратоксини — це родина сполук з різною токсичністю, із загальною структурою дигідроізокумарину зв'язаного в положенні 7 через карбоксильну групу амідним зв'язком з L-β-фенілаланіном [14]. Перший токсин був ідентифікований як ОТА, його менш токсичний дехлорований аналог є ОТВ та ОТС (табл.1).

Також існують інші форми ОТ які є похідними від щойно наведених (рис.1а, табл.1). ОТ виявлений в різних зернових, крупах, інших рослинних продуктах, кормах, м'ясі тварин та у тканин людини в країнах усього світу [26].



Таблиця 1

Форми охратоксину.

Загальна назва	C9	C5	C4		R
Охратоксин А [26]	Фенілаланін	Cl	H	H	H
Охратоксин В [26]	Фенілаланін	H	H	H	H
Охратоксин С [26]	Фенілаланін, етил естер	Cl	H	H	H
Охратоксин А метил естер [26]	Фенілаланін, метил естер	Cl	H	H	H
Охратоксин В метил естер [26]	Фенілаланін, метил естер	H	H	H	H
Охратоксин В етил естер [26]	Фенілаланін, етил естер	H	H	H	H

Охратоксин α [26]	ОН	Cl	H	H	H
Охратоксин β [26]	ОН	H	H	H	H
4R-Гідроксioxратоксин А [26]	Фенілаланін	Cl	H	ОН	H
4S-Гідроксioxратоксин А [26]	Фенілаланін	Cl	ОН	H	H
10-Гідроксioxратоксин А [26]	Фенілаланін	Cl	H	H	ОН
Охратоксин А тирозин [26]	Тирозин	Cl	H	H	H
Охратоксин А серин [26]	Серин	Cl	H	H	H
Охратоксин А гідроксипролін [26]	Гідроксипролін	Cl	H	H	H
Охратоксин А лізин [26]	Лізин	Cl	H	H	H
Охратоксин А етиламід [16]	Фенілаланін, етиламід	Cl	H	H	H
Охратоксин А О-метил (C8) [16]	Фенілаланін	Cl	H	H	H
Охратоксин А лактон відкритий [16]	Фенілаланін	Cl	H	H	H
Охратоксин хінон (О в C8) [41]	Фенілаланін	O	H	H	H
Охратоксин гідрохінон [41]	Фенілаланін	ОН	H	H	H

Позначення наведені у таблиці аналогічні із структурою рис.1.

В більшості видів тварин ОТА поглинається в першу чергу у шлунку [26], а потім у кишках [34]. У нирках, печінці та жирі свиней ОТА відкладається після згодовування цим тваринам корму, який забруднений токсином, тобто ОТА може бути прийнятий з харчового каналу без попередньої деградації [18]. В умовах *in vitro* у проксимальному відділі тонких кишок свині може всмоктатись 87% ОТА [3].

Після перорального введення ОТА щурам у їх сліпій та ободовій кишках виявлений лише метаболіт [12]. Це тому, що з жовчю ОТА виділяється у формі глюкуронідів та сульфатів, які гідролізуються до ОТА та ОТА мікрофлорою кишок перед реабсорбцією [26]. У моногастричних щурів перетворення ОТА у ОТА проходить в сліпій і ободовій кишках, де цей процес здійснює мікрофлора. Кислотний гідроліз ОТА в шлунку і ферментативний гідроліз в тонких кишках незначний, а гомогенати печінки взагалі не мали гідролітичної активності [24]. Нирки також не перетворюють ОТА у ОТА [38]. ОТА пасивно поглинається в шлунково-кишковому тракті у нейонізованій формі. Процес абсорбції відбувається навіть тоді, коли концентрація ОТА в плазмі крові вища, ніж у просвіті кишки. В умовах *in vitro* збільшене поглинання було при зменшенні значення рН та зростанні частки нейонізованої форми ОТА [23]. Звідси був зроблений висновок, що ОТА швидше поглинається у тих відділах де нижче значення рН [26]. У овець, яким згодовували зерно, був менший показник рН вмістимого рубця ніж у тих, яким згодовували сіно. У цих тварин був відповідно більший та менший вміст ОТА та його метаболіту ОТА (становив >97%) у сечі і калі. Було висловлене припущення, що менший показник рН сприяє прямому поглинанню ОТА в кров з рубця [45].

Мала кількість повідомлень про охратоксикоз у жуйних тварин можливо тому, що мікроорганізми рубця здатні гідролізувати ОТА у нетоксичну α -форму [26]. У худоби проходить мікробна деградація корму, яка необхідна для його поглинання. Тому, цілком можливо, що ОТА розкладається мікроорганізмами до потрапляння в кров. Початковою мікробною деградацією ОТА є гідроліз пептидного зв'язку з формуванням ОТА і фенілаланіну. ОТА нетоксичний і ця деградація дозволяє жуйним тваринам бути менш чутливими до токсикозу ОТА. У худоби мікробна деградація ОТА проходить у рубці, сітці та книжці і не відбувається у сичузі [18].

При згодовуванні коровам ОТА в молоці та сечі виявлений ОТА. Сам ОТА виявлений у молоці корів яким згодовували великі дози токсину 1,66 та 13,3 мг/кг живої маси. Ознаки токсикозу у корів проявлялись при згодовуванні ОТА в дозі 13,3 мг/кг живої маси (для щура доза 20 мг/кг живої маси є летальна), а це у 23 рази більша концентрація порівняно з можливим згодовуванням зерна в якому виявили найбільшу концентрацію токсину. Тобто мало ймовірно, що гостре отруєння буде виявлене в природних умовах. У телят ще не функціонує рубець і тому для них доза нижча, проте теж вища, ніж можливе природне згодовування ураженого зерна у 6 разів. Токсичні ефекти більш ймовірні при хронічній інтоксикації. Смертельна доза одноразового прийому для худоби є висока, можливо на кілька міліграмів більше ніж 13 мг/кг, для кози — 3 мг/кг. Аборт або загибель плода, які

спостерігаються в гризунів, маловірогідні у худоби [33]. У телят, яким згодовували ОТА, лише 10% його виділяється у незмінному вигляді з калом і сечею, а до 90% перетворюється у ОТа. При внутрішньовенному введенні ОТА його виявили в сечі та калі, тут не виявили ОТа. Тобто перетворювати ОТА у ОТа може лише мікрофлора травної системи. Перше поглинання ОТА в кров настає через ~0,5 годин і проходить у передшлунках. Другий етап настає через 12 годин і він пов'язаний з ентерогепатичною циркуляцією, тобто поглинання відбувається у кишках [35].

Період напіввиведення ОТА залежить від виду організму. Так після перорального задавання рибам цей показник становив 0,68 години, а після внутрішньовенного введення мавпам 840 годин [15].

Головною особливістю токсикозу є ураження нирок. Поряд з цим є інші зміни. Зокрема у собак виявлено запалення слизової оболонки кишок [39]. У курчат бройлерів охратоксин проявляє гепатотоксичний ефект [17]. У свиней, які отримували високі пероральні дози токсину (>5 до 10 мг/кг) поряд з ураженням нирок спостерігали зміни у печінці і кишках [40]. На щурах та мишах був показаний ембріотоксичний ефект ОТА, який проявлявся пренатальною смертністю і пороками розвитку плоду [14].

Наслідки охратоксикозу у кишках та печінці, які є характерні для моногастричних тварин детально описані у собак [39]. Катарально-геморагічний ентерит, збільшення лімфатичних вузлів і зневоднення були основними явищами, які спостерігали при розтині тварин. Зміни були найбільш суттєві в клубовій, сліпій, ободовій і прямій кишках, але аналогічні зміни відбулися в порожній кишці більшості тварин та в дванадцятипалій кишці кількох собак. Вогнищеві ерозії та виразки слизової оболонки товстої кишки і крововиливи на ній супроводжувались некрозом лімфоїдної тканини в підслизовому шарі. Некротичні зміни слизової оболонки та лімфоїдної тканини були в клубовій, сліпій і прямій кишках у всіх дослідних собак. Крововиливи слизової оболонки і некроз підслизової лімфоїдної тканини спостерігався у дванадцятипалій і голодній кишках та в проксимальній частині клубової кишки окремих собак, але ці зміни були незначними, або не були у собак, які отримали менші дози ОТ. В гепатоцитах спостерігали помірну вакуолізацію цитоплазми та нагромадження нейтральних ліпідів. Акумуляція ліпідів була більше виражена у собак, які отримали менші дози ОТ і вижили впродовж 10-14 днів. Некроз печінкових клітин був інтенсивний у всіх собак, але частіше вогнища складалися з одного чи декількох некротичних гепатоцитів. Якщо у щурів виявили як нагромадження так і виснаження глікогену в гепатоцитах, як наслідок охратоксикозу, то у собак спостерігалось майже повне виснаження глікогену [39]. Хронічний вплив малих доз ОТА при згодовуванні викликав новоутворення в печінці мишей і щурів [4].

Крім перетворення у ОТа, незначна частина ОТА мікросомами печінки щура перетворюється у 4R-гідроксиОТА та 4S-гідроксиОТА [36], а у кроля було виявлене додатково утворення 10-гідроксиОТА [37] (рис.1а, табл.1). 4R-гідроксиОТА є основний гідроксипродукт у гризунів, а 4S ізомер є основним у свиней, 10-гідроксиОТА зустрічається лише у кролів [44]. Гідроксиформи менш токсичні можливо тому, що вони швидше виводяться з калом і сечею [26]. Проте лактон відкритий продукт ОТА (рис.1б, табл.1), який виявили у гризунів, є більш токсичний ніж вихідний ОТА [44]. В організмі ОТА також піддається окисному дехлоруванню, в результаті якого утворюється окисно-відновна пара хінон-ОТ/гідрохінон-ОТ (рис.1а, табл.1). ОТА з ДНК не взаємодіє але ковалентні ДНК аддукти можливі через вплив хінонових продуктів [41]. У дослідях з використанням міченого ОТА не було показане утворення ДНК аддуктів. Проте при фотоопроміненні ОТА в присутності дезоксигуанозину показане утворення вуглець- чи кисень-зв'язаного ОТА-дезоксигуанозин аддукту [25]. Основна дія ОТА на ДНК пов'язана не з утворенням аддуктів, а окисними пошкодженнями ДНК, що може бути поштовхом до запуску канцерогенного механізму [21]. Окисне пошкодження може бути наслідком збільшення концентрації внутрішньоклітинного рівня активних форм кисню [1]. Під впливом ОТА виявлене утворення до 30 аддуктів ДНК, проте вони утворюються в незначній кількості, що підтримує припущення про дію токсину не ковалентною взаємодією реактивних метаболітів з ДНК, а іншими механізмами, зокрема окисним стресом [46]. Збільшення ендогенного окиснювального метаболізму, що індуковане ОТА, а не утворення аддуктів ДНК, було також причиною точкових мутацій [30]. Якщо на сьогодні чітко встановлено, що ОТА індукуює пошкодження ДНК [6], то з приводу існування ОТА-ДНК аддуктів ще досі триває дискусія [10]. Так, при згодовуванні мишам ОТА у нирках і сім'яниках їх потомства виявлений С-С8-дезоксигуанозин-ОТА аддукт (С-С8-dG-ОТА, зв'язок С8 гуанозину і С5 ОТА), який може відігравати роль у розвитку раку сім'яників [20]. При більшій дозі ОТА спостерігали менше число ДНК аддуктів, оскільки була більша цитотоксичність внаслідок чого знижувалась загальна кількість ДНК. Тобто хронічний вплив малих доз ОТА більш руйнівний, ніж гострий вплив високих доз. Проте це лише з огляду на утворення аддуктів з якими пов'язують розвиток раку. Існує припущення, що ОТА не хочуть розглядати як канцероген, оскільки у такому разі харчова промисловість економить значні кошти на детоксикації

мікотоксинів [31].

При згодовуванні ОТА в печінці мишей виявлене зниження концентрації ДНК, РНК та загального, кислого, основного і нейтрального білка [42]. Пероральне введення ОТ індукує структурні хромосомні аберації у клітинах кісткового мозку та сперматозоїдах мишей, а в печінці спостерігали некротичні явища [11]. ОТА інгібує в нирках і печінці активність цитозольної фосфенілпіруват-карбоксикази, яка є ключовим регулятором глюконеогенезу. Також в нирках пригнічується синтез білка на 30-40%. Ефекти ОТА зникають при видаленні з нього фенілаланінової групи [27], тобто при перетворенні в ОТА. Така дія ОТА проявляється не на рівні транскрипції, можливо на рівні післятранскрипційної модифікації і-РНК, або на рівні трансляції [28]. У гепатоцитах щурів ОТА інгібує фенілаланін-4-монооксигеназу і тим гальмує перетворення фенілаланіну в тирозин та інші метаболіти, а ОТА таку дію не проявляє. Також тут формується тирозин-ОТА (рис.1а, табл.1) [8]. У культурі гепатоцитів HepG2 ОТА регулює (вдвічі пригнічує) близько 250 генів, зокрема 13 генів, які кодують білки, що залучені в метаболізм вуглеводів і ліпідів [19].

Здатність різних форм ОТ посилювати перекисне окиснення ліпідів пов'язана з наявністю в них фенольних гідроксильних груп. Для перебігу цього процесу необхідне залізо [32]. При цьому утворюється комплекс ОТА з Fe^{3+} і проходить відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} [29]. Перекисне окиснення ліпідів супроводжується витоком Ca^{2+} з мітросом [22]. ОТА збільшує проникність клітин для Ca^{2+} , а збільшена концентрація Ca^{2+} в клітині та наявність про-окиснювача ОТА збільшують витік електронів від дихального ланцюга на виробництво O_2^- і, отже, H_2O_2 . Останній не утилізується і це, разом з підвищенням концентрації вільного заліза в клітині, стимулює виробництво $\cdot OH$ з реакції Фентона у зв'язку з мобілізацією Fe^{2+} за допомогою Ca^{2+} . Це порушує гомеостаз всередині клітини і, як наслідок, змінює метаболічні процеси та призводить до подальшого пошкодження клітин і може бути одним з механізмів, за допомогою яких ОТА проявляє свою токсичну дію [16]. Проте, згідно з іншими даними [19] у культурі гепатоцитів HepG2 ОТА пригнічує вхід у клітину кальцію, чим порушує його гомеостаз.

В мітохондріях печінки ОТА порушує транспорт електронів і окисне фосфорилування через інгібування ензимів дихального ланцюга (сукцинатдегідрогенази, цитохром с-редуктази і цитохром с-оксидази) та вплив на мембрану мітохондрій [43]. Таким чином проходить виснаження АТФ всередині мітохондрій.

Молекулярні механізми, які залучені в індуковані ОТА канцерогенез, тератогенний ефект, імуносупресію та інгібування мітозу не чітко визначені. Генотоксичні ефекти, інгібування синтезу ДНК і мітозу, а також гістопатологічні ефекти на ядрах клітин оброблених ОТА можна пояснити пошкодженням ДНК, які включають в себе утворенням ДНК аддуктів і розривами ланцюгів ДНК. Тип загибелі клітин залишається невияснений. Загибель клітин взагалі може йти через некроз або апоптоз [2]. Про індукований токсичною дією ОТА апоптоз при якому спостерігали фрагментацію ДНК є також інші повідомлення [13].

Вплив ОТА протягом двох тижнів викликає апоптоз, оскільки при загибелі клітин, який спостерігали, було характерне знаходження всіх кардинальних морфологічних особливостей від початкової конденсації хроматину до внутрішньоклітинної локалізації ацидофільних глобул, які містять ядерні фрагменти. Також відсутня запальна реакція та наявні ультраструктурні зміни характерні для апоптозу. Проте, апоптоз може просто представляти початкову відповідь клітин печінки до токсичної дії, що в кінцевому підсумку призведе до некрозу або тип клітинної загибелі залишається невиясненим. Адже будь-який токсин може викликати як апоптоз так і некроз, в залежності від дози і періоду дії [2]. В культурі клітин шлунка ОТА впливав на G2 фазу клітинного циклу, про що свідчила понижена експресія ключових для цієї фази факторів. Як наслідок такої дії спостерігався апоптоз клітин [9]. У гепатоцитах щура ОТА "звільняв" з мітохондрій апоптоз-індукуючий чинник, викликав конденсацію хроматину та його фрагментацію [7]. Тобто під впливом ОТА в клітинах спрацював мітохондрій-залежний апоптоз [5].

Література

1. Arbillaga L. et al. // *Toxicol.Appl.Pharmacol.* - 2007. - V.220, N.2. - P.216-224.
2. Atroschi F. et al. // *J.Pharm.Pharmaceut.Sci.* - 2000. - V.3, N.3. - P.281-291.
3. Avantaggiato G. et al. // *J.Agric.FoodChem.* - 2007. - V.55, N.12. - P.4810-4819.
4. Bendele A.M. et al. // *J.Natl.CancerInst.* - 1985. - V.75, N.4. - P.733-742.
5. Bouaziz C. et al. // *Environ.Toxicol.* - 2010. - V.12. - P.230-236.
6. Cavin C. et al. // *Toxicol.Sci.* - 2009. - V.110, N.1. - P.84-94.
7. Chopre M. et al. // *Cell.Biol.Toxicol.* - 2010. - V.26, N.3. - P.239-254.
8. Creppy E.E. et al. // *Arch.Toxicol.* - 1990. - V.64, N.4. - P.279-284.
9. Cui J. et al. // *Toxicol.Lett.* - 2010. - V.193, N.2. - P.152-158.
10. Duarte S.C. et al. // *Crit.Rev.Toxicol.* - 2011. - V.41, N.3. - P.187-212.

11. El-Arab A.M.E. et al. // BMC Compl.Altern.Med. - 2006. - V.6. - P.6-19.
12. Galtier P. et al. // Drug.Metab.Dispos. - 1979. - V.7, N.6. - P.429-434.
13. Golli-Bennour E.E. et al. // J.Bioch.Mol.Toxicol. - 2010. - V.24, N.1. - P.42-50.
14. Harwig J., Munro I.C. // Can.Vet.J. - 1975. - V.16, N.5. - P.125-141.
15. Hedelberg S. et al. // J.Appl.Toxicol. - 1989. - V.9, N.2. - P.91-96.
16. Hoehler D. et al. // J.Biol.Chem. -1996. - V.271, N.44. - P.27388-27394.
17. Huff W.E. et al. // Poult.Sci. - 1988. - V.67, N.8. - P.1139-1146.
18. Hult K. et al. // Appl.Environ.Microb. - 1976. - V.32, N.3. - P.443-444.
19. Hundhausen C. et al. // CancerCenom.Proteom. - 2008. - V.5.- P.319-332.
20. Jennings-Gee J.E. et al. // Toxins. - 2010. - V.2, N.6. - P.1428-1444.
21. Kamp H.G. et al. // Mol.Nutr.FoodRes. - 2005. - V.49, N.12. - P.1160-1167.
22. Khan S. et al. // Biochem.Pharmacol. - 1989. - V.38, N.1. - P.67-72.
23. Kumagai S. // FoodChem.Toxicol. - 1988. - V.26, N.9. - P.753-758.
24. Madhyastha M.S. et al. // Arch.Envir.Cont.Tox. - 1992. - V.23, N.4. - P.468-472.
25. Mally A, Dekant W. // FoodAddit.Contam. - 2005. - V.22. - P.65-74.
26. Marquardt R.R., Frohlich A.A. // J.Anim.Sci. - 1992. - V.70. - P.3968-3988.
27. Meisner H., Meisner P. // Arch.Bioch.Biophys. - 1981. - V.208, N.1. - P.146-153.
28. Meisner H., Polsinelli L. // Biochem.Pharmacol. - 1986. - V.35, N.4. - P.661-665.
29. Omar R.F. et al. // Biochem.Pharmacol. - 1990. - V.40, N.6. - P.1183-1191.
30. Palma N. et al. // Chem.Res.Toxicol. - 2007. - V.20, N.7. - P.1031-1037.
31. Pfohl-Leszkowicz A. // Arh.Hig.Rada.Toksikol. - 2009. - V.60. - P.465-483.
32. Rahimtula A.D. et al. // Biochem.Pharmacol. - 1988. - V.37, N.23. - P.4469-4477.
33. Ribelin W.E. et al. // Can.J.Comp.Med. - 1978. - V.42. - P.172-176.
34. Roth A. et al. // Toxicol. - 1988. - V.48, N.3. - P.293-308.
35. Sremannarayanna O. et al. // J.Anim.Sci. - 1988. - V.66. - P.1703-1711.
36. Storen O. et al. // Appl.Environ.Microb. - 1982. - V.44, N.4. - P.785-789.
37. Stormer F.C. et al. // Appl.Environ.Microb. - 1983. - V.45, N.4. - P.1183-1187.
38. Suzuki S. et al. // JapanJ.Pharmacol. - 1977. - V.27. - P.735-744.
39. Szscech G.M. et al. // Vet.Pathol. - 1973. - V.10. - P.219-231.
40. Szscech G.M., Hood R.D. // Amer.J.Pathol. - 1978. - V.91, N.3. - P.689-692.
41. Tozlovanu R. et al. // Chem.Res.Toxicol. - 2006. - V.19. - P.1241-1247.
42. Verma R., Chakraborty D. // Acta.Pol.Pharm. - 2008. - V.65, N.1. - P.3-9.
43. Wei Y.H. et al. // Toxicol. - 1985. - V.36, N.2-3. - P.119-30.
44. Wu Q. et al. // Curr.Drug.Metab. - 2011. - V.12, N.1. - P.1-10.
45. Xiao H. et al. // J.Anim.Sci. - 1991. - V.69. - P.3706-3714, 3715-3723.
46. Zepnik H. et al. // Toxicol.Sc. - 2001. - V.59. - P.59-67.

ОХРАТОКСИН: ОБМЕН И ДЕЙСТВИЕ НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ

Фэдэць О.М., к.с.-х.н., доцент, olehfedets@yahoo.com

Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени
С.З.Гжицького, г. Львов

Аннотация. В обзоре обобщены сведения о строении охратоксина, его превращение в организме, последствия влияния и молекулярные механизмы клеточного повреждения.

Ключевые слова: охратоксин, кишки, печень, цитотоксичность.

ОCHRATOXIN: EXCHANGE AND EFFECT ON THE BODY OF ANIMALS

Fedets O.M., olehfedets@yahoo.com

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z.Gzhytskyi, Lviv

Summary. The review has summarized data on the structure of ochratoxin, its transformation in the body, effects and molecular mechanisms of cellular damage.

Key words: ochratoxin, intestine, liver, cytotoxicity.