

616.61-008.64-036.12:616.982.21

STANOVENÍ OCHRATOXINU A (OTA) V LIDSKÝCH LEDVINÁCH

¹František MALÍŘ, ¹Tomáš ROUBAL, ¹Jan SEVERA, ²Milena ČERNÁ, ³Miroslav BRNDIAR¹Krajská hygienická stanice, oddělení xenobiochemie, Národní referenční laboratoř pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách, Hradec Králové²Státní zdravotní ústav, Centrum zdraví a životních podmínek, Praha³Katedra válečného vnitřního lékařství Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Práce věnuje pozornost toxinogenním plísním, produkujícím mykotoxin ochratoxin A. Je zmíněna jeho toxicita, způsob hodnocení expozice, zdravotního rizika a nebezpečí pro populaci. Za rizikovou skupinu jsou považováni nemocní s chronickou renální insuficiencí, kteří významně kumulují OTA v krevním séru a pravděpodobně i v ledvinách. Byla vypracována metoda stanovení OTA v ledvinách s cílem vyšetřit koncentrace OTA u běžné populace a dále u zemřelých z důvodu chronické renální insuficience.

Klíčová slova: Ochratoxin A; Ledviny; Stanovení.

Ochratoxin A (OTA) Determination in the Human Kidneys

Summary

The study pays attention to toxinogenic fungi producing mycotoxin ochratoxin A. Its toxicity, the method of exposure evaluation, health risks and the danger to the population are mentioned. Patients with chronic renal insufficiency, who in a significant way accumulate OTA in the blood serum and probably in the kidneys, are considered the risk group. The method of OTA determination in the kidneys with the aim of investigating OTA concentrations in the ordinary population and also in people who died due to chronic renal insufficiency has been worked out.

Key words: Ochratoxin A; Kidneys; Determination.

Úvod

Zájem pracovníků státních dozorových organizací a toxikologů v ČR je rovněž orientován na systematické sledování mykotoxinů (toxických sekundárních metabolitů vláknitých mikroskopických hub, tzv. mikromycet, u nás běžně známých jako plísně) v potravinách schopných ohrozit zdraví populace.

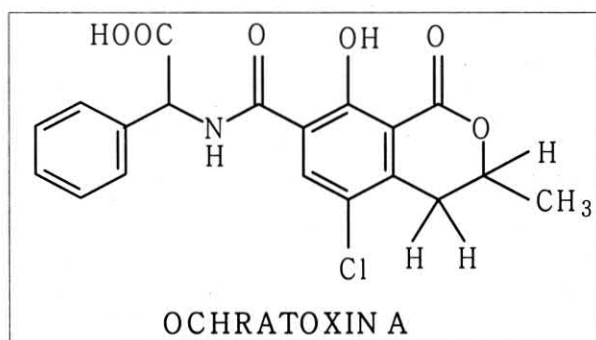
Specifická úskalí a rizika v tomto směru přináší zejména globalizace potravinového trhu s možností jejich zvýšeného výskytu, což se promítá i do klinické oblasti. V té se soustřeďuje pozornost především na mykotoxiny, u nichž bylo prokázáno, že představují zvýšené riziko ohrožení organismu, a to buď při jejich nadměrném přívodu kontaminovanou potravou, nebo při různých chorobných stavech, které narušují fyziologické degradační a detoxikační schopnosti.

Podmínky vzniku, výskyt a chemická struktura ochratoxinu A

Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří ochratoxiny, které jsou ubiquitární. Jsou produkovány mikro-mycetami rodu *Aspergillus* a *Penicillium* a za hlavní producenty jsou považovány zejména *Aspergillus alutaceus* (ochraceus), *Penicillium viridicatum* a *Penicillium verrucosum* (1). Jejich produkce závisí na teplotě a vlhkosti (1). Např. *Aspergillus ochraceus* potřebuje optimální teplotu pro tvorbu OTA přibližně 28 °C, ale produkuje OTA již při teplotě mezi 15 °C až 37 °C (1). *Penicillium viridicatum* je schopno produkovat OTA v teplotním rozsahu 4 °C až 30 °C při 22% relativní vlhkosti (1). V chladnějších oblastech je OTA produkován plísněmi rodu *Penicillium*, zatímco v teplejších oblastech plísněmi rodu *Aspergillus* (1).

Kromě OTA některé plísň produkují současně i jiné ochratoxiny, např. B a C (1). Plísň těchto rodů patří mezi významné kontaminanty krmiv a potravin. Zejména cereálie, cereální produkty, vepřové maso, krev a vnitřnosti, káva, pivo, luštěniny, koření a sušené ovoce jsou pokládány za hlavní zdroje OTA v potravě (2). V poslední době byl OTA nově nalezen v grepové šťávě (3) a červeném víně (4). Expozice obyvatelstva OTA prostřednictvím dietárního přívodu je považována za majoritní (i když byla již prokázána také inhalační expozice) a dělí se na přímou (konzumace kontaminovaných cereálií, koření, kávy, sušeného ovoce, piva atd.) a nepřímou (konzumace kontaminovaného masa, krve, vnitřností a mléka atd.) (2).

Dominantní význam ve skupině ochratoxinů zaujímá především ochratoxin A (3-metyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroizokumarin vázaný peptidickou vazbou na molekulu L- β -fenylalaninu) – viz obr. 1.



Obr. 1: Cesta vstupu do organismu, biotransformace a toxicita ochratoxinu A

V organismu je OTA vázán na plazmatické proteiny a metabolizuje se na hydroxylované deriváty. Exkrece 4-hydroxyochratoxinu po i. p. podání OTA byla prokázána již v roce 1971 (5) a v dalších výzkumech byla tvorba 4-hydroxyochratoxinu jako základního metabolitu opakovaně potvrzena v testech *in vitro* a *in vivo* (5). Metabolit se přitom vyznačuje obdobnými cytotoxickými a imunosupresivními vlastnostmi jako OTA (6).

OTA může být v organismu štěpen na fenylalanin a chlorovaný dihydroizokumarinový základ (OT α), který sice není toxický, avšak může se vyznačovat genotoxickými účinky (7). Ochratoxin α se vyskytuje v exkretech – moči, či mléce zvířat exponovaných OTA. V játrech je OTA přeměňován na glukurono- a sulfokongugáty, dochází rovněž ke kon-

jugaci s glutathionem (8). Tato cesta, považovaná obecně za detoxikační, však může vést i ke tvorbě elektrofilních sloučenin s genotoxickou schopností (9, 10).

V lidské moči byl ochratoxin A zjištěn metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, která navíc také umožnila stanovení 4-hydroxyochratoxinu A (11). U lidí byl OTA v moči nalezen nejprve pouze během studie organizované v Bulharsku (12) a později např. ve Francii (13). Změna diety před odběrem a po odběru krevních vzorků potvrdila potravinový původ kontaminace OTA (13). Poslední země, kde se podařilo stanovit ochratoxin A v moči pacientů s renálními onemocněními, byl Egypt, což bylo pravděpodobně opět zapříčiněno zvýšeným příjmem OTA prostřednictvím kontaminovaných potravin (14).

Jak již bylo zmíněno, je OTA v krvi velmi silně vázán – a to až z 95 % na plazmatické proteiny, zvláště pak na albumin (1). V lidské krevní plazmě byla potvrzena vazba na makromolekulu neznámé struktury o relativní molekulární hmotnosti 20 000 (1). Afinita této makromolekuly na OTA je 106krát vyšší než u sérového albuminu (5, 15, 16). Vazba OTA na plazmatické proteiny hraje významnou úlohu v organismu a podílí se na toxicitě OTA.

Některé práce poukazují na pomalost, s jakou koncentrace plazmatického OTA mizí po jeho orálním podání. Toxikokinetický profil se mění v závislosti na živočišném druhu (1). OTA vstupuje do enterohepatálního cyklu, který je zčásti odpovědný za dlouhý biologický poločas toxinu v organismu (17, 18). Poločas vylučování OTA činí u člověka pravděpodobně 35 dní (1). Různé výzkumy ukazují, že se OTA chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním (19, 20). Krevní cestou je pak OTA distribuován v organismu. Hlavními místy retence jsou ledviny, játra, varlata, střeva (orgány rychlé kinetiky), svaly, tuková tkáň pak tvoří rezervu (1, 21). Při studiu mechanismů účinku OTA byla prokázána inhibice syntézy proteinů, zvýšení peroxidace lipidů, poškození metabolismu cukrů a vápníku a poškození mitochondriální funkce (21). Mezi hlavní biologické účinky OTA patří nefrotoxicita, imunotoxicita, genotoxicita, mutagenita, karcinogenita (kategorie 2B, možný karcinogen pro člověka, IARC WHO, 1998), teratogenita a neurotoxicita (5, 21).

Ze souhrnu experimentálních prací o nefrotoxicitě OTA *in vitro* a také *in vivo* vyplývá, že OTA narušuje intracelulární metabolické pochody s následnou apoptózou renálních buněk, renální hemodynamiku, významně a snad i dominantně funkce proximálního tubulu (a to i při subchronické expozici), vede k poklesu glomerulární filtrace a tubulární resorpce a ovlivňuje všechny části nefronu a ledviny „in toto“ (2).

Způsob hodnocení expozice OTA, zdravotního rizika a nebezpečí pro populaci lze v zásadě provádět buď odhadem denního příjmu OTA z potravin (stanovením OTA v potravinách ve vztahu k jejich zkonsumovanému množství), nebo stanovením OTA jako významného biomarkeru v krevním séru, plazmě, moči, případně „post mortem“ v ledvinách a jiných tkáních (2, 21).

Bylo prokázáno, že rizikovou skupinu představují zejména nemocní s chronickou renální insuficiencí (CHRI), kdy dochází ke kumulaci celé řady látek z potravinového řetězce. V našich podmínkách bylo zjištěno, že se OTA významně kumuluje v séru nemocných s mírně až středně pokročilou CHRI a dále u pravidelně dialyzovaných nemocných (terminální stav CHRI). U těchto skupin nemocných lze odůvodněně předpokládat také zvýšenou kumulaci OTA v ledvinách, kterou lze proto považovat za faktor, který u těchto nemocných může akcelarovat progresi stávající nefropatie (2).

Metoda stanovení ochratoxinu A v ledvinách

K potvrzení těchto závěrů byla proto vypracována a akreditována u ČIA metoda stanovení OTA v ledvinách zemřelých (SOP/BIT č. 5).

Metoda je navíc využita pro potřeby biologického monitoringu, a to za účelem zjištění koncentrací OTA v ledvinách u běžné populace. U nemocných s CHRI nebyly dosud celosvětově vzorky lidských ledvin vyšetřovány.

Vzorky ledvin (výseč s obsahem kůry, dřeně a pánvičky) o hmotnosti cca 5 g jsou ihned po odběru zváženy a uloženy do Petriho misek, dobře uzavřeny a přehledně označeny. Vzorky tímto způsobem ošetřené jsou uloženy až do vlastní analýzy v mrazničce při -18°C . Takto uložené jsou stabilní nejméně 6 měsíců.

Pro vlastní stanovení OTA byla vypracována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Po předchozí extrakci OTA ze vzorků tkání okyseleným chloroformem a jeho následné reextrakci hydrogenuhličitánem sodným je hydrogenuhličitán prosát přes imunoafinitní kolonku Ochraprep R (Rhône-Poulenc Diagnostics), kde se OTA selektivně zachytí na bílkovinném nosiči s fixovanými specifickými protilátkami vůči OTA. Po promytí kolonky vodou (z důvodu odstranění balastních látek) je OTA z kolonky eluován okyseleným metanolem (majícím za následek rozrušení vazby OTA na protilátku a jeho následné uvolnění). Potom je OTA stanoven na HPLC s fluorescenčním detektorem (excitace 340 nm, emise 465 nm). Mobilní fáze je složena z metanolu, acetonitrilu, octanu sodného a kyseliny octové (300/300/ 400/14; v/v/v/v). Rychlost průtoku je 1,5 ml/min. Mez detekce činí 0,1 $\mu\text{g/kg}$, nejistota stanovení je menší než 10 %. Maximální stanovitelný obsah je 200 $\mu\text{g/kg}$. Současně se vzorky jsou analyzovány standardy o koncentracích OTA 0,4 $\mu\text{g/l}$, 4 $\mu\text{g/l}$ a 10 $\mu\text{g/l}$ metanolu. Potvrzení OTA ve vzorcích se provádí po předchozí metylderivaci OTA metanolovým roztokem fluoridu boritého, případně po rozkladu enzymem karboxypeptidázou, kdy vzniká z OTA ochratoxin α .

Po zavedení metody byly zatím vyšetřeny tři vzorky ledvin „běžné populace“, ve kterých byla stanovena průměrná koncentrace OTA 0,1 $\mu\text{g/kg}$, což odpovídá nálezům zjištěným v Německu v letech 1982 a 1983 (v rozsahu 0,1–0,3 $\mu\text{g/kg}$) (22).

Závěry

Ve snaze objektivizovat nálezy OTA u „běžné populace“ je metoda v současné době využita pro vyšetření 50 vzorků ledvin v rámci projektu V – biologického monitoringu vedeného Státním zdravotním ústavem Praha. Do konce července 2001 bylo takto vyšetřeno 30 vzorků lidských ledvin. U 18 vzorků byl OTA $< 0,1 \mu\text{g/kg}$, 12 vzorků ledvin bylo OTA pozitivních – v rozsahu 0,1–0,2 $\mu\text{g/kg}$, průměrná koncentrace OTA $0,117 \pm 0,039 \mu\text{g/kg}$, medián 0,1 $\mu\text{g/kg}$.

Dalším záměrem je vyšetření vzorků ledvin zemřelých z důvodu CHRI, a to s cílem potvrdit předpoklad nálezů vyšších koncentrací OTA.

Literatura

1. PFOHL-LESZKOWICZ, A., et al. *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*. Londres, New York, Lavoisier, Tec-Doc, 1999, p. 1–478.
2. MALÍŘ, F. *Studium kumulace mykotoxinu ochratoxinu A u nemocných s chronickou renální insuficiencí*. (Disertační práce). Hradec Králové, VLA JEP, 2000, 68 s.
3. ROSA, CAR., et al. *Ochratoxin A detection by immunoaffinity clean-up and HPLC in grape juice and wine samples sold in Rio de Janeiro*. Proceedings of 10th IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 21–25. 5. 2000, Brazil, p. 85.
4. CREPPY, EE. – BAUDRIMONT, I. – BETBEDER, AM.: *Ochratoxin A ve víně, ovocných šťávách a v pivu*. Mycotoxin Workshop – TECHAGRO, Brno, 4. 4. 2000 (přednáška)
5. IARC MONOGRAPHS on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans: Some naturally occurring substances: some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, IARC Scientific Publications, 1993, vol. 56, p. 489–521.
6. CREPPY, EE., et al. Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl – t RNA synthetase and in vitro protein synthesis of hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.*, 1983, vol. 47, p. 239–247.
7. FÖLLMANN, W., et al. Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Arch. Toxicol.*, 1995, vol. 69, p. 280–286.
8. JAKOBY, WB. – HABIG, WH. Glutathione transferases. In JAKOBY, WB. (ed.), ORLANDO, FL. *Enzymatic Basis of Detoxification*. Academic Press, 1980, vol. 2, p. 63–94.
9. VAN BLADEREN, PJ., et al. The role of glutathione conjugation in the mutagenicity of 1,2-dibromoethane. *Biochem. Pharmacol.*, 1980, vol. 29, p. 2975–2982.
10. DEKANT, W. – VAN VAKAS, S. Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate β -lyase. *Drug Metabolism Reviews*, 1989, vol. 20, p. 43–83.
11. CASTEGNARO, M., et al. High performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and its 4R-4-hydroxy metabolite in human urine. *Analyst*, 1990, vol. 115, p. 129–131.
12. CASTEGNARO, M., et al. Concentrations of ochratoxin A in the urine of endemic nephropathy patients and controls in Bulgaria: Lack of detection of 4-hydroxyochratoxin A. In CASTEGNARO, M., et al. (eds). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Lyon, IARC, 1991, no. 115, p. 165–169.
13. CREPPY, EE., et al. Ochratoxin A in human blood and chronic interstitial nephropathy: Cases report in France. *Eurotox* 1995, *Toxicology Letters Supplement*, 1995, 1/78, p. 25.
14. WAFA, EW., et al. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: A preliminary study. *Hum. Experim. Toxicol.*, 1998, vol. 17, p. 124.
15. PFOHL-LESZKOWICZ, A., et al. Differential DNA adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat. Res.*, 1993 a, vol. 289, p. 265–273.
16. PFOHL-LESZKOWICZ, A., et al. Ochratoxin A related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. In PHILLIPS, DH., CASTEGNARO, M., BARTSCH, H. (eds). *Postlabelling Methods for detection of DNA Adducts*. Lyon, IARC Scientific Publications, 1993 c, no. 124, p. 141–148.
17. BROWN, MH. – SZCZECK, GM. – PURMALIS, BP. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Tox. Appl. Pharmacol.*, 1976, vol. 37, p. 31–338.
18. MAYURA, K., et al. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology*, 1982, vol. 25, p. 175–185.
19. HOOD, RD. – NAUGHTON, MJ. – HAYES, AW. Teratogenic effects of ochratoxin A in hamsters. *Teratology*, 1975, vol. 11, p. 23 A (Abstract).
20. HOOD, RD. – NAUGHTON, MJ. – HAYES, AW. Prenatal effects of ochratoxin A in hamsters. *Teratology*, 1976, vol. 13, p. 11–14.
21. BAUDRIMONT, I. *Variation de la nephrotoxicité de l'ochratoxine A sous l'effet de facteurs métaboliques et non métaboliques*. (Thèse pour le Doctorat, No. 2). Bordeaux, Université II, 25. 10. 1995, p. 3–205.
22. BAUER, J. – GAREIS, M. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *J. Vet. Med.*, 1987, vol. 34, p. 613–627.

Předneseno na 6. česko-slovenské mezioborové toxikologické konferenci s mezinárodní účastí v Hradci Králové 4. 9. 2001.

Korespondence: František MALÍŘ

Krajská hygienická stanice
Oddělení xenobiochemie
Národní referenční laboratoř pro biomarkery
mykotoxinů a mykotoxinů v potravinách
Nezvalova 958
500 02 Hradec Králové

Do redakce došlo 11. 10. 2001