

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 9 Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő
2013



T-2 MIKOTOXIN HATÁSA A MITOKONDRIUMOKRA ÉS AZ APOPTOTIKUS FOLYAMATOKRA EGÉREMBRIÓKBAN

Somoskői Bence¹, Keresztes Zsuzsanna¹, Kovács Melinda², Cseh Sándor¹

¹ Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék, 1078 Bp. István u. 2.

² Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, Élettani és Állathigiéniai Tanszék, 7600 Kaposvár Guba Sándor. u. 40.
somoskoibence@gmail.com

Összefoglalás

A T-2 a trichotecénvázas vegyületek családjába tartozó mikotoxin, amelyet főként a mérsékelt égövön igen gyakran számító *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák termelnek. A toxin káros hatásai között megemlíthető az apoptózis indukálás, a fehérjeszintézis gátlása, az immunsuppresszió, valamint a szaporodásbiológiai zavarok. Embriófejlődésre gyakorolt hatása ezidáig azonban kevésbé ismert. Vizsgálataink célja a toxin egérembriók *in vitro* fejlődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. A kísérletek során vizsgáltuk a mitokondriumok aktivitását és mintázatát, valamint a toxin apoptózist indukáló hatását. A kísérletben felhasznált embriókat szuperovulált BDF1 egerekből nyertük, és speciális táptalajon tenyésztettük. A zigóták fejlődését 5 napon keresztül, az expandált blasztociszta stádium eléréséig kísértük figyelemmel.

Vizsgálataink során 4 csoportot alakítottunk ki, attól függően, hogy a tápfolyadék milyen koncentrációban tartalmazta a T-2 toxint (0,5 ng/ml; 0,75 ng/ml; 1 ng/ml és kontroll). A kontroll csoport embrióit toxint nem tartalmazó médiumban tenyésztettük.

Eredményeink azt mutatják, hogy a 0,5 ng/ml toxinkoncentráció nem befolyásolja az embriófejlődést, a zigóták a kontroll csoportnak megfelelő arányban (>80%) érik el az expandált blasztociszta stádiumot. Kismértékű, nem szignifikáns csökkenés figyelhető meg a 0,75 ng/ml csoport esetén. Az 1 ng/ml csoportban a zigóták jelentős része 2 sejtes állapotban megreked, az expandált blasztociszta stádiumot nem érik el.

A fejlődésben megrekedt embriók blasztomereiben a normál heterogén mitokondrium mintázat helyett homogén, diffúz eloszlást figyeltünk meg. Az 1 ng/ml toxinnal kezelt embriókban kaszpáz-3 felszabadulást detektáltunk.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a T-2 mikotoxin károsíthatja a preimplantációs embriók fejlődését, gátolja a mitokondriumok megfelelő elrendeződését a sejteken belül, a kaszpáz útvonalon keresztül pedig apoptózist indukál.

Kulcsszavak: mikotoxinok, embrió, mitokondrium, apoptózis

Effects of T-2 mycotoxin on mitochondria and apoptotic pathway in mouse embryos

Abstract

T-2 is a member of the group of trichotecenes produced mainly by moulds of *Fusarium* genus. Among a lot of negative effects, T-2 can induce apoptosis, inhibits protein synthesis, has an immunosuppressive effect and may cause reproductive disorders. There are no data available



about the effect on early embryo development. The aim of the study was to assess the effect of the toxin on early embryo development until the blastocyst stage *in vitro*. We studied the effect of toxin on the activity and pattern of mitochondria and the apoptotic induction. Embryos obtained from superovulated BDF1 mice and cultured in special media for 5 days until the expanded blastocyst stage.

Four groups were created depending on the concentration of the toxin in culture medium (0.5 ng/ml; 0.75 ng/ml; 1 ng/ml and control). Embryos in control group were cultured with no toxin.

Our results show that the concentration of 0.5 ng/ml does not affect the embryo development. The zygotes developed to expanded blastocyst stage in the proportion of minimum 80%. We observed a small-scale but non-significant decrease in 0.75 ng/ml group. In the 1 ng/ml group much of the zygotes stop in the 2-cell stage and none of them develop to blastocyst stage.

Unlike the normal heterogenous pattern of mitochondria we observed homogenous (diffuse) in blastomeres of disrupted embryos. We detected caspase-3 release in embryos of 1 ng/ml group.

Our studies show that T-2 can disturb preimplantation embryo development, inhibit the normal arrangement of mitochondria and can induce apoptosis via the caspase pathway.

Keywords: mycotoxins, embryo, mitochondrium, apoptosis

Irodalmi áttekintés

A T-2 a trichotecénvázis vegyületek családjába tartozó mikotoxin, amelyet főként a *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák termelnek. Ezek a fajok mind a szántóföldi termelés, mind pedig a tárolás során szennyezhetik a gabonát (Glenn, 2007), toxinjaik többsége pedig ellenáll a hagyományos élelmiszer- és takarmány-előállítási folyamatok során alkalmazott kezeléseknek, így azok jelenléte kimutatható nemcsak állati takarmányokban, hanem alapvető emberi élelmiszerekben is (Scott, 1984).

A toxin sejtműködést károsító hatását számos kísérletben vizsgálták. Az egyik legrégebben ismert T-2 okozta jelenség a lipidperoxidáció fokozása, ezzel együtt a szabadgyökképződés indukálása (Iwahashi, 1982). A trichotecének zsírolékony vegyületek, így könnyedén bejutnak a sejtekbe, ahol a peptidil-transzferázhoz kötődnek, ezáltal gátolják a fehérje-, közvetve pedig a DNS- és az RNS-szintézist (Thomson és Wannemacher, 1990). A T-2 toxin által okozott oxidatív károsodások (oxidatív stressz) a sejtekben apoptózist indukálhatnak (Bouaziz et al, 2009). Wu és mtsai a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének fokozódását figyelték meg granulosejtekben T-2 hatására (Wu et al, 2011). Patkányokban megfigyelték az apoptózishoz kapcsolt gének expressziójának növekedését különböző szövetekben, T-2 toxinnal szennyezett takarmány etetését követően (Doi et al, 2006). A vegyület immunszuppresszív hatását *in vitro* és *in vivo* körülmények között is kimutatták (Gutleb et al, 2002).

A T-2 mikotoxin mind a női, mind pedig a hím nemi működést megzavarhatja, károsíthatja. Ezek a hatások többek között a késleltetett ovuláció és a csökkent progeszteronszint (Huszenicza et al, 2000), sárgatestérési zavarok (Ványi et al, 1995), a granulosejtek proliferációjának gátlása (Caloni et al, 2009) és romló spermaminőség formájában jelentkezhetnek (Kovács et al, 2011). Wu és mtsai kísérletei alapján elmondható, hogy a toxin a granulosejtekben indukált apoptózishatás révén képes negatívan befolyásolni a petefészek működését állatokban és emberben egyaránt (Wu et al, 2011).

A vegyület foetotoxikus hatását illetően is számos adat áll rendelkezésünkre. A T-2 toxin képes áthatolni a placentán (Lafarge-Frayssinet et al, 1990), így a fejlődő magzatot károsíthatja. Vemhes egerek szennyezett takarmánnyal történő etetését követően a thymus sorvadását észlelték



a magzatokban (Holladay et al, 1993). A toxin apoptózist indukáló hatását kimutatták a magzati idegrendszer fejlődésében is (Ishigami et al, 1999). A csontrendszer abnormális fejlődését, a csontosodás részleges hiányát, valamint egyes csontok hiányát is megfigyelték (Nelson et al, 1994). Patkányokban a vér-agy gát roncsolódását és magzati agyi léziók keletkezését tapasztalták (Sehata et al, 2004).

A T-2 toxinnal kapcsolatos több évtizedes kutatások eredményeként széles körű ismeretanyaggal rendelkezünk a mikotoxin sejtszinten és a teljes szervezet vonatkozásában kifejtett káros hatásait illetően. Ennek keveset tudunk a toxinnak a korai embrionális fejlődésre gyakorolt hatásáról. Vizsgálataink célja, hogy adatokat gyűjtsünk a T-2 toxinnak a preimplantációs egémbriók in vitro fejlődésére és a mitokondriumok aktivitására, a blastomereken belüli eloszlására, valamint a reaktív oxigéngyökök sejten belüli mennyiségére gyakorolt hatásáról.

Anyag és módszer

A 6 hetes, BDF1 törzsből származó egereket, 21 °C-on, 12h/12h világítási program mellett tartottuk. A nőstény egereken szuperovulációt végeztünk [1. nap: 7,5 NE PMSG ip., 3. nap: 7,5 NE hCG ip., (Alvetra und Werfft AG; Ausztria)], ezt követően pedig egy éjszakára hím egyedeknél helyeztük el. A zigótákat 20 órával a HCG-kezelést követően nyertük ki. A hialuronsavval megtisztított és tenyésztésre alkalmasnak ítélt embriókat ezt követően tenyésztőmédiumban (Cleavage Stage Medium, Cook Medical; Roskilde, Dánia) helyeztük el, amelyhez különböző koncentrációban T-2 toxint adagoltunk. Az így kialakított csoportok a következők voltak: 0,5 ng/ml; 0,75 ng/ml; 1 ng/ml és kontroll. Az embriók fejlődését 5 napon keresztül követtük.

A toxikológiai vizsgálatok során 4 ismétlést végeztünk, minden ismétlés alkalmával csoportonként 4-4 állat embrióival dolgoztunk.

A mitokondriumok elhelyezkedését MitoTracker CMTM Ros (Molecular Probes; USA) fluoreszcens festékekkel ellenőriztük. A caspase-3 jelölésre Biotium NucView488 Caspase-3 Assay Kit-t (USA) használtunk. A jelölt organellumokat és enzimeket konfokális lézer scanning mikroszkóppal (C1/TE2000-U Nikon) detektáltuk. A nyers adatokat az Image J (NIH; USA) szoftverrel dolgoztuk fel.

A fejlődési adatok statisztikai kiértékelését R 2.15.2-ben ANOVA-val végeztük.

Eredmények és értékelés

Az 5 napos in vitro tenyésztést követően a blasztociszták aránya a következőképpen alakult (1. táblázat):

A tenyésztési eredményeket grafikusán ábrázolva az alábbi tendencia figyelhető meg (1. ábra)

Az ANOVA analízist követően a következő eredményeket kaptuk: $p = 8.39e-06$. A páronkénti összehasonlítás (Tukey-teszt) eredményeit a 2. táblázat tartalmazza:

Az 1 ng/ml toxintartalmú csoportban megfigyelhető volt, hogy a zigóták legnagyobb hányada a kétsejtes állapotban megreked, fejlődésük 24 órát követően leáll. A 0,75 ng/ml-es csoportban a kontrolltól kismértékű, de nem szignifikáns eltérés mutatkozik a blasztociszták számát illetően.

**1. táblázat. Blasztociszták aránya az egyes csoportokban 4 ismétlést követően**

Blasztociszta arány (%) (1)	Kezelés (ng/ml) (2)
87,50	kontroll
84,37	kontroll
80,00	kontroll
91,67	kontroll
100,00	0.5
94,73	0.5
90,32	0.5
90,91	0.5
89,47	0.75
89,39	0.75
73,68	0.75
28,57	0.75
0,00	1.0
0,00	1.0
0,00	1.0
14,29	1.0

Table 1: Proportion of blastocysts in each toxin-contaminated and control group after 4 repeats (1): rate (2): treatment

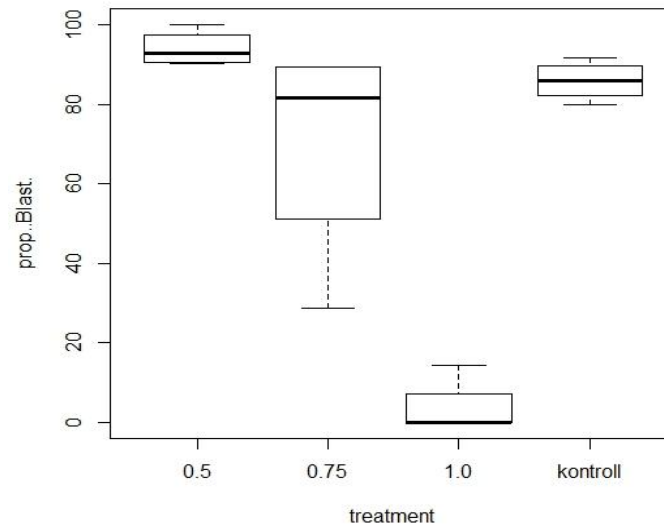
1. ábra. Blasztociszták aránya az egyes kezelési csoportokban (prop.Blast=blasztociszta %-os aránya)

Figure 1: Proportion of blastocysts in each treatment group (prop.Blast=% of blastocysts)

2. táblázat. Kezelési csoportok páronkénti összehasonlítása

Párosítás	p-érték
0.75 - 0.5	0.176
1.0 - 0.5	<0.001 ***
kontroll - 0.5	0.873
1.0 - 0.75	<0.001 ***
kontroll - 0.75	0.493
kontroll - 1.0	<0.001 ***

Table 2: Pairwise comparison of treatment groups

Az 5 napos tenyésztés után megvizsgáltuk a mitokondriumok elhelyezkedését a sejteken belül. A 2 sejtes állapotban megrekedt embriók mitokondrium mintázatát hasonlítottuk össze a kontroll csoport embrióival. A kontroll embriók blasztoméráiban a mitokondriumok perinukleáris és perikortikális elrendeződést mutattak, szemben a kezelt embriókkal, amelyekben a mitokondriumok diffúzan helyezkedtek el a citoplazmában (2. ábra).

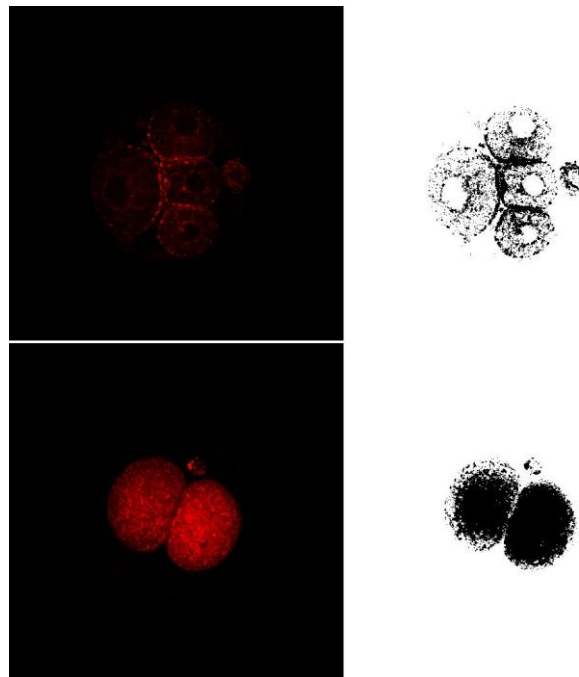
2. ábra: Mitokondriumok eloszlása a kontroll (felső kép) és a kezelt embriókban (alsó kép)

Figure 2: Mitochondrial distribution in control (top row) and in treated embryos (bottom row)



Az 1 ng/ml toxintartalmú csoport 2-sejtesen megrekedt zigótáiban kaszpáz-3 felszabadulást detektáltunk, ami azt mutatja, hogy a T-2 toxin képes apoptózist indukálni a fejlődő zigóták sejtjeiben.

Következtetések és javaslatok

Adataink azt mutatják, hogy a toxin erős negatív hatást gyakorol a korai embrionális fejlődésre, amely akár az embrió korai elhalásához, rejtett – még a beágyazódás előtt bekövetkező – embriófelszívódáshoz vezethet. Vizsgálataink tapasztalatai azt jelzik, hogy azoknál a csoportoknál, amelyeket kis T-2 toxin koncentrációjú környezetben tenyésztettünk, az embriók többsége elérte a blasztociszta stádiumot, a normál embriófejlődés során pedig a blasztomérákban a mitokondriumok heterogén mintázata figyelhető meg. A toxin képes apoptózist indukálni a sejtekben.

További terveink között szerepel a mitokondriális mintázat módosulások okainak és az apoptotikus folyamatok pontosabb feltárása.

Irodalomjegyzék

- Bouaziz, C., Martel, C. et al.*: Fusarial toxininduced toxicity in cultured cells and in isolated mitochondria involves PTPC-dependent activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. *Toxicol. Sci.*, 2009. *110*. 363–375.
- Caloni, F., Ranzenigo, G. et al.*: Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells. *Toxicol.*, 2009. *54*. 337–344.
- Doi, K., Shinozuka, J., Sehata, S.*: T-2 toxin and apoptosis. *J. Toxicol. Pathol.*, 2006. *19*. 15–27.
- Glenn, A. E.*: Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007. *137*. 213–240.
- Gutleb, A. C., Morrison, E., Albertina, J. M.*: Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2002. *11*. 309–320.
- Holladay, S. D., Blaylock, B. L. et al.*: Fetal thymic atrophy after exposure to T-2 toxin: selectivity for lymphoid progenitor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1993. *121*. 8–14.
- Huszenicza, Gy., Fekete, S., Szigeti, G., Kulcsár, M., Fébel, H., Kellems, R. O., Nagy, P., Cseh, S., Veresegyházy, T., Hullár, I.*: Ovarian consequences of low dose peroral fusarium (T-2) toxin in a ewe and heifer model. *Theriogenology*, 2000. *53*. 1631–1639.
- Ishigami, N., Shinozuka, J. et al.*: Apoptosis in the developing mouse embryos from T-2 toxin inoculated dams. *Histol. Histopathol.*, 1999. *14*. 729–733.
- Iwahashi, M.*: Mechanism of cytotoxic effect of T-2 toxin in protozoa. *Proc. Assoc. Jpn. Mycotoxin*, 1982. *4*. 23–30.
- Kovács, M., Tornyos, G., Matics, Z., Kametler, L., Rajli, V., Bodnár Z., Kulcsár, M., Huszenicza, Gy., Keresztes, Zs., Cseh, S.*: Subsequent effect of subacute T-2 toxicosis on spermatozoa, seminal plasma and testosterone production in rabbits. *Animal*, 2011. *5*. 1563–1569.
- Lafarge-Frayssinet, C., Chakor, K. et al.*: Transplacental transfer of T2 toxin: Pathological effect. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1990. *10*. 64–68.
- Nelson, P. E., Dignani, M. C., Anaissie, E. J.*: Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994. *7*. 479–504.
- Scott, P. M.*: Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Prot.*, 1984. *47*. 489–499.
- Sehata, S., Kiyosawa, N. et al.*: Morphological and microarray analysis of T-2 toxin-induced rat fetal brain lesion. *Food Chem. Toxicol.*, 2004. *42*. 1727–1736.



- Thomson, W. L., Wannemacher, R. W.:* In vivo effects of T-2 mycotoxin on synthesis of protein and DNA in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1990. *105*. 483–491.
- Ványi A., Glávits R., Molnár T.:* F-2 és T-2 toxin okozta reprodukciós zavarok nagyüzemi sertésállományokban. *Magy. Állatorv. Lapja*, 1995. *50*. 424–430.
- Wu, J., Jing, L. et al.:* T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Toxicol. Letters*, 2011. *202*. 168–177.