

МИКОТОКСИНЫ И АНТИОКСИДАНТЫ: НЕПРИМИРИМАЯ БОРЬБА. ОХРАТОКСИН А

В. ФИСИНИН, первый вице-президент, академик Россельхозакадемии, директор ВНИТИП

П. СУРАЙ, иностранный член Россельхозакадемии,

профессор биохимии питания Шотландского сельскохозяйственного колледжа и Университета Глазго

Среди значительного разнообразия микотоксинов наиболее часто встречающимися контаминантами корма являются охратоксины, Т-2 токсин, ДОН, фумонизины, зеараленон и афлатоксины. Их распространение во многом зависит от климатических условий. Например, наличие афлатоксинов характерно главным образом для стран с тропическим климатом, включая Индию, Таиланд, страны Ближнего Востока и Латинской Америки. Для стран с умеренным климатом, в том числе для России и ближнего зарубежья, проблемой являются охратоксины, ДОН и Т-2 токсин.

Микотоксины образуются на разных стадиях производства зерновых. Например, фузариевые микотоксины поражают зерновые в процессе роста, поэтому их называют полевыми микотоксинами; микотоксины, продуцируемые грибами *Aspergillus* и *Penicillium*, обычно образуются при ненадлежащем хранении зерна, их называют микотоксинами хранения.

Учитывая, что условия хранения зерна в странах на постсоветском пространстве до сих пор все еще не оптимальные, а урожаи зерновых достаточно высокие, в данном обзоре мы остановимся на **охратоксине А**, наиболее негативно влияющем на показатели животноводства. Рассмотрим его распространение, токсичность, молекулярные механизмы действия и возможные методы защиты от токсического действия этого токсина в птицеводстве и свиноводстве.

Охратоксины представляют собой группу микотоксинов, которые образуются в качестве вторичных метаболитов плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Основным производителем охратоксинов среди пенициллиновых грибов — *Penicillium verrucosum*, среди аспергилловых — *Aspergillus ochraceus* и некоторые другие виды аспергилл, включая *A. carbonarius* и *A. niger*. Грибки, продуценты охратоксинов, различаются по занимаемым экологическим нишам, по продуктам, которые они заражают, и по частоте их появления в различных географических зонах. Например, *P. verrucosum* развивается только при температурах ниже 30°C и при активности воды на уровне 0,8. Следовательно,

его можно обнаружить в зерне и зернопродуктах лишь в регионах с прохладным климатом, например в Канаде и северных регионах Европы.

Аспергилловый грибок *A. ochraceus* развивается при умеренных температурах и при активности воды выше 0,8. Он обнаруживается в хранящихся кормах, в том числе в зерновых, и продуктах питания, однако редко в высоких концентрациях. *A. carbonarius* растет при высоких температурах и поражает, как правило, созревающие фрукты, свежий виноград, продуцируя микотоксины, которые также можно обнаружить в сухофруктах, вине и кофе.

Наиболее токсичным и распространенным представителем группы охратоксинов является охратоксин А. Комплексные исследования в Европе показали, что средняя концентрация охратоксина А в зерновых культурах (проанализировано 2700 образцов), загрязненных этим токсином, колеблется в широких пределах. Так, пшеница была контаминирована охратоксином А в количестве в среднем (по странам): в Германии 40% исследованных образцов — 0,11 мкг/кг (1995 г.); в Норвегии 14% — 0,7 мкг/кг (1998 г.); в Швеции 52% — 0,37 мкг/кг (1999 г.), в Дании

30% — 0,7 мкг/кг (1986–1992 гг.). Таким образом, концентрация охратоксина А в пораженных им образцах пшеницы составила в среднем 0,38 мкг/кг. Ячмень: в Германии 86% исследованных образцов — 0,07 мкг/кг (1995–1998 гг.), в Великобритании 27% — 0,7 мкг/кг. Кукуруза: в Германии 61% исследованных образцов — 0,17 мкг/кг, в то время как в Великобритании загрязненность кукурузы этим микотоксином обнаружена только в 10% образцов.

Следует отметить, что количество исследованных образцов в каждой стране чаще всего не превышало 100–200. Тем не менее из представленного материала можно заключить, что попадание охратоксина А в корма для сельскохозяйственных животных и птицы является чаще правилом, чем исключением. Улучшение условий сбора и хранения зерновых — основной метод снижения уровня этого микотоксина в пшенице, ячмене и кукурузе.

«ТИХИЕ УБИЙЦЫ», «НЕВИДИМЫЕ ВОРЫ», «ВАЖНЕЙШИЕ КОНТАМИНАНТЫ КОРМА», «ПРИРОДНЫЕ ТОКСИНЫ» — ТАКИЕ НАЗВАНИЯ БЫЛИ ДАНЫ ГРУППЕ МЕТАБОЛИТОВ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБКОВ — МИКОТОКСИНАМ. В ПОСЛЕДНИЕ ГОДЫ В ОТЕЧЕСТВЕННОЙ И ЗАРУБЕЖНОЙ ЛИТЕРАТУРЕ МНОГО ВНИМАНИЯ УДЕЛЯЕТСЯ ОТРИЦАТЕЛЬНОМУ ВЛИЯНИЮ ЭТИХ ВЕЩЕСТВ НА ПРОДУКТИВНЫЕ И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ. НА СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ СПЕЦИАЛИСТЫ ПРИШЛИ К ЗАКЛЮЧЕНИЮ, ЧТО ПОЛНОСТЬЮ РЕШИТЬ ПРОБЛЕМУ КОНТАМИНАЦИИ КОРМОВ МИКОТОКСИНАМИ ПРАКТИЧЕСКИ НЕВОЗМОЖНО

В исследованиях, результаты которых были опубликованы в 2002 г., изучалось содержание охратоксина А в кукурузных кормах для птицы, свиней и кроликов в Аргентине. Микотоксин был обнаружен в 38% образцов кормов для птицы (с уровнем 25–30 нг/г), в 25% кормов для кроликов (от 18,5 до 25,5 нг/г) и в 13% кормов для свиней. В более поздних исследованиях (результаты опубликованы в 2005 г.) охратоксин А обнаружили в комбикормах для птицы, свиней и кроликов соответственно в 10% образцов, 15% и 12% с концентрацией 15–25 нг/г.

В опубликованных в 2006 г. результатах исследований показано, что 100% образцов корма для птицы содержали охратоксин А в количестве от 17 до 197 нг/г. В том же году появилась еще одна статья из той же лаборатории, подтверждающая 100%-ную контаминацию корма охратоксином А с уровнем от 1,3 до 80 нг/г.

О том, что охратоксин А широко распространен в кормах для животных, свидетельствуют данные по ежедневному потреблению среднестатистическим европейцем с продуктами животноводства около 1 нг этого микотоксина на 1 кг массы тела; у некоторых индивидуумов этот показатель выше в 6–8 раз. Кроме того, охратоксин А обнаруживается в материнском молоке в количестве от 2 до 13 000 нг/л: в 11% исследованных проб в Швейцарии и Германии, в 58% в Швеции, в 74–86% в Италии, в 100% в Турции.

Особенности метаболизма охратоксина А. Охратоксин А — жирорастворимое вещество, которое всасывается в неионизированной форме в тонком отделе кишечника, максимально — в верхней его части. Поглощение этого микотоксина в кишечнике происходит против градиента концентрации и зависит от pH слизистой кишечника. Интенсивность его всасывания зависит от многих факторов, но в среднем она составляет примерно 40% у цыплят, 66% у поросят, 56% у крыс и кроликов. Охратоксин А, попадая в кровь, легко связывается с сывороточным альбумином и другими макромолекулами. После однократного приема этого микотоксина его максимальная концентрация в сыворотке крови обнаруживалась: у цыплят — через 0,33 ч, у кроликов — через 1 ч, у поросят — через 10–48 ч, у телят — через 2–4 ч. В тканях максимальная концентрация наблюдалась в течение 48 ч. Отмечены существенные видовые различия в периоде полураспада данного микотоксина: у цыплят — 4,1 ч, у перепелов — 6,7 ч. В то же время у млекопитающих этот период значительно длиннее: у поросят — 72–120 ч, у телят — 77 ч, у крыс — 55–120 ч, у обезьян (макак) — 510 ч, у человека — 840 ч. Тканевое распределение охратоксина А у поросят и цыплят обычно составляет такую последовательность: почки > печень ≥ мышцы > жир.

Гидролизует он до нетоксичного альфа-охратоксина в различных частях организма. Так, у крыс этот гидролиз осуществляется микроорганизмами в слепом отростке кишечника, вырабатывающими ферменты карбоксипептидазу А и химотрипсин. Интересно отметить, что упомянутая детоксикация наблюдается как в 12-перстной, так и в подвздошной кишке, однако в печени и почках эта активность очень низкая. В экспериментах с мышами было показано, что охратоксин А из печени попадает в желчь и далее в кишечник, где и происходит его частичная детоксикация. Например, 25–27% микотоксина, введенного крысам, вы-

делялось в моче в виде нетоксичного метаболита — альфа-охратоксина. Вторыми метаболитами охратоксина А, который имеет слабую токсичность и обнаруживается в моче, являются 4-ОН-эпимеры, образуемые в печени и почках под воздействием цитохромов Р450 (CYPs). Полулетальная доза (LD50) для охратоксина А при пероральном введении имеет значительные видовые различия и составляет исходя из расчета на 1 кг живой массы: для цыплят — 3,3 мг, поросят — 1 мг, крыс — 20–30 мг, мышей — 46–58 мг.

Молекулярные механизмы токсичности охратоксина А. Наиболее важными молекулярными механизмами токсического действия охратоксина А являются:

- окислительный стресс и его последствия, включая окисление липидов, белков и ДНК;
- образование охратоксин А-ДНК-комплексов и изменение экспрессии важнейших генов;
- нарушение функции митохондрий и увеличение образования свободных радикалов и разрегулирование антиоксидантной системы за счет ингибирования экспрессии витагенов;
- нарушение обмена фенилаланина и синтеза белка.

Результаты наших исследований, проведенных за последние 15 лет, позволили прийти к выводу, что окислительный стресс — ведущий механизм токсического действия микотоксинов, в том числе охратоксина А. Анализ данных, представленных в таблице, подтверждает нашу идею и не оставляет сомнений в том, что независимо от используемой модельной системы или типа животных, попадание в организм охратоксина А нарушает баланс между антиоксидантами и прооксидантами, вызывая окислительный стресс, который в свою очередь задействует целый ряд механизмов, включая изменение в экспрессии важнейших генов и апоптоз (генетически обусловленный процесс физиологической гибели клеток, или запрограммированная клеточная смерть).

Экспрессия генов и апоптоз. В последние годы убедительно доказано, что охратоксин А вызывает апоптоз, подобно таким микотоксинам, как Т-2 токсин, ДОН, фумонизины и зеараленон. В 2010 г. исследователи из отдела урологии университета Эскисегира в Турции в опытах установили, что введение крысам охратоксина А вызывало у них окислительный стресс, приводящий к структурным повреждениям в почках, а применение антиоксидантов (мелатонин или коэнзим Q₁₀) предотвращало данные изменения. Следует иметь в виду, что окислительный стресс и последующий апоптоз авторы рассматривают в качестве ведущего механизма токсичности охратоксина А. В частности, было показано, что охратоксин А вызывает апоптоз в клетках разных типов, в том числе в клетках почек, печени, кишечника, желудка, в нервных клетках, так же, как и в лимфоцитах. В 2010 г. в немецком Институте химии и токсикологии пищи доктор Хопра и соавторы в исследованиях продемонстрировали, что обработка культуры клеток охратоксином А вызывает существенные изменения в экспрессии генов, связанных с апоптозом и с повреждением ДНК. Отмечалось подавление синтеза белка в гепатоцитах (клетки паренхимы печени), обработанных этим токсином, при этом из митохондрий выделялся фактор, индуцирующий

Влияние охратоксина А на окислительный стресс

Модельная система	Эффект микотоксина	Источник
Эпителиальные клетки почек свиней PK 15	Окислительный стресс, окисление ДНК, апоптоз, некроз и нарушение гомеостаза кальция	Klarić M.S. и соавт., 2011
Три типа клеток почечных канальцев человека (human primary, RPTEC/TERT1 и HK-2 cells)	Изменение в экспрессии 756 генов, включая гены защиты от стресса и репарации ДНК, цитоскелета, регуляции нуклеосом, трансляции, транскрипции и клеточного цикла	Jennings P. и соавт., 2011
Первичные гепатоциты крыс	Снижение жизнеспособности клеток и апоптоз, гепатопротектор силибинин оказывает защитное действие	Essid E. и Petzinger L. E., 2011
Эпителиальные клетки почек свиней PK 15 и лейкоциты человека	Окислительный стресс и окислительное повреждение ДНК	Klarić M.S. и соавт., 2010
Клетки почечных канальцев свиней LL-PK 1	Изменения в Nrf2 сигнальной трансдукции и нарушение собственной детоксикации	Boesch-Saadatmandi C. и соавт., 2009
Клетки нейробластомы человека (SH-SY5Y) и гипокампуса мышей (I HT22)	Окислительный стресс и избыточное образование свободных радикалов, снижение жизнеспособности клеток, изменение экспрессии 39 важных генов, включая белки, регулирующие редокс-статус клетки, энергетический обмен, стресс-протеины, протеины трансляции и синтеза белков	Yoon S. и соавт., 2008
Эпителиальные клетки почек свиней PK 15	Окислительный стресс, активация каспаз и апоптоз	Klarić M.S. и соавт., 2008
Клетки почечных канальцев свиней LL-PK 1	Повышение образования свободных радикалов и активности GST. Нарушение Nrf2 и AP-1. Нарушение процессов детоксикации	Boesch-Saadatmandi C. и соавт., 2008
Клетки почек свиней LLC-PK 1	Окислительный стресс и усиление образования свободных радикалов. Защитный эффект антиоксидантов (катехинов и эпикатехинов)	Costa S. и соавт., 2007
Клетки почек человека HK-2	Достоверное повышение образования свободных радикалов и окислительное повреждение ДНК	Arbillaga L. и соавт., 2007
Микросомы почек свиней, эпителиальные клетки бронхов человека	Окислительный стресс, зависящий от дозы и продолжительности обработки	Tozlovanu M. и соавт., 2006
Клетки гепатомы человека (HepG2), клетки аденокарциномы (Caco-2)	Окислительный стресс и защитная роль антиоксидантов	Guerra M.C. и соавт., 2005
Клетки гепатомы человека (HepG2)	Окислительный стресс	Hundhausen C. и соавт., 2005
Клетки фибробластов человека	Окислительный стресс, ПОЛ, нарушения ДНК и защитный эффект антиоксидантов	Russo A. и соавт., 2005
Клетки первичных проксимальных канальцев почек	Окислительный стресс, защитный эффект антиоксидантов (витамин Е и ацетилцистеин)	Schaaf G.J. и соавт., 2002
Бронхиальные эпителиальные клетки свиней	Окислительный стресс и биотрансформация охратоксина А в генотоксические метаболиты	Pinelli E. и соавт., 1999
Петушки породы леггорн	Окислительный стресс, снижение уровня витамина Е, повышение уровня малонового диальдегида (МДА) в печени. Защитный эффект витамина Е	Hoehler D. и Marquardt R.R., 1996

апоптоз. Охратоксин А индуцировал активность специфических ферментов — каспас (8,9 и 3/7) и вызывал конденсацию хроматина. Подавление активности каспас с помощью специальных реагентов привело к существенному, но не полному снижению апоптоза, вызванного охратоксином А. Под его воздействием снижается дыхание митохондрий в состоянии III и нарушается гомеостаз кальция, уменьшая его поглощение и повышая концентрацию кальция в цитозоле клетки. Таким образом, охратоксин А существенно разбалансирует эффективную работу митохондрий, в результате чего в избытке образуются свободные радикалы, регулирующие многие сигнальные факторы внутри клетки. В 2007 г. в университете Наварро (Испания) исследователи под руководством доктора Арбиллага использовали в своей работе модельную систему, основанную на культуре клеток почек человека, и показали, что после кратковременного

воздействия охратоксина и при слабой токсичности (83% живых клеток) повышалась экспрессия генов, вовлеченных в электронный транспорт в митохондриях, а после более длительного воздействия токсина (в течение 24 ч) и при повышенной токсичности (51% живых клеток) происходили изменения в экспрессии генов, вовлеченных в ответ на окислительный стресс. При этом возрастал уровень свободных радикалов в клетках, наблюдалось окислительное повреждение ДНК. В медицинском университете Инсбрука (Австрия) в прошлом году исследователи во главе с доктором Енинсом идентифицировали 756 охратоксин-зависимых генов. Так, охратоксин А вызывал дерегуляцию значительного числа метаболических путей, включая цитоскелет, регуляцию нуклеосом, трансляцию, транскрипцию и регуляцию клеточного цикла. В исследованиях, выполненных в том же году в Саудовской Аравии, было установлено: охратоксин А приводит к окислительному повреждению и некрозу тканей почек, свидетельствуя о том, что избыточное образование свободных радикалов — это ключевой механизм охратоксин А-токсичности. Так,

в сельскохозяйственном университете в Пекине доктор Ли с соавторами в 2011 г. детально изучил влияние охратоксина А на активность р53 (первый охарактеризованный протеин-супрессор опухолей), который контролирует клеточный цикл, апоптоз и починку ДНК. При этом было показано, что охратоксин А вызывает апоптоз в разных типах клеток (клетки почек обезьян и человека). В то же время активация р53 повышала устойчивость клеток к апоптозу, подавление активности р53, наоборот, усиливало апоптоз.

В исследованиях, проведенных в Индии в 2011 г., показано, что у кроликов, потреблявших охратоксин А, отмечалось изменение активности антиоксидантных ферментов супероксид дисмутазы и каталазы, увеличивалась концентрация малонового диальдегида (МДА), конечного продукта перекисного окисления липидов. При этом на клеточном уровне в печени и почках отмечалось нарушение

ние митохондриальной мембраны и вздутие эндоплазматического ретикулума. Гепатоциты характеризовались изменением структуры ядер и гетерохроматина, хроматолизом и потерей цитоплазматических органелл. В других исследованиях установлено: влияние охратоксина А на активность антиоксидантных ферментов зависит от его концентрации — при более низкой активности ферментов повышается (вероятно, через усиление экспрессии витагенов); при более высокой — снижается, как и эффективность антиоксидантной системы, так как адаптационные возможности организма исчерпываются.

Рассматривая механизмы прооксидантного действия микотоксинов, в том числе охратоксина А, следует иметь в виду, что электрофильные вещества и ксенобиотики являются источниками свободных радикалов, создающих окислительный стресс, который повреждает многие клеточные механизмы. Ферменты, способствующие снижению окислительного стресса и вовлеченные в фазу II детоксикации ксенобиотиков, включают глутатион-трансферазу, хинон-редуктазу, эпоксид-гидролазу, UDP-глюкуронозил-трансферазу и гамма-глутамил-цистеин синтетазу. Экспрессия генов этих ферментов защищает клетку от окислительного повреждения и предупреждает внутриклеточные нарушения метаболизма. Недавние исследования показали, что охратоксин А изменяет экспрессию соответствующих генов и снижает активность ферментов детоксикации ксенобиотиков. Еще один важный фактор адаптации

к охратоксину А — отсутствие ответа со стороны белка теплового шока (HSP70), то есть теоретически экспрессия генов данного белка должна была увеличиться, но на самом деле этого не происходило.

Таким образом, охратоксин А не только снижает концентрацию антиоксидантов и активность ферментов антиоксидантной защиты, но также на уровне генов приводит к тому, что система включения адаптационного ответа за счет витагенов срывается не в полной мере или же с опозданием. Кроме того, охратоксин А снижает экспрессию генов, контролируемых ядерным фактором гепатоцитов 4α (HNF4 α), что влияет на ключевые метаболические процессы и делает, например, почки более чувствительными к различным нарушениям, в том числе к карциногенезу. Еще одним из важных токсических эффектов охратоксина А является его ингибирующее действие на электронно-транспортную цепь митохондрий, когда при более высоких концентрациях происходит подавление переноса электронов в митохондриальном комплексе 1, свидетельствующем о токсичности этого вещества. Особо следует отметить ингибирующее влияние охратоксина А на активность ферментов, участвующих в починке ДНК, в частности оксигуанозин-гликозилазы. Выходит, что охратоксин А не только приводит к повреждению ДНК путем окислительного стресса, но и усиливает последствия этого повреждения, предотвращая естественную починку ДНК специфическими ферментами. ■

Продолжение в следующих номерах