

WPLYW AFLATOKSYNY B1 NA STĘŻENIE CZYNNIKA JĄDROWEGO NF- κ B W WĄTROBACH SZCZURÓW

Mateusz Woźniakowski¹⁾, Nikola Woźniakowska²⁾, Tomasz Zuzak³⁾, Łukasz Świerszcz⁴⁾, Marta Wójciak-Czuła⁵⁾, Andrzej Borzęcki⁶⁾, Barbara Nieradko – Iwanicka⁶⁾

¹⁾ Klinika Urologii i Urologii Onkologicznej SP ZOZ w Puławach

²⁾ Katedra i Zakład Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³⁾ Klinika Ginekologiczno-Położnicza Wojewódzkiego Szpitala Klinicznego nr 1 im. F. Chopina w Rzeszowie

⁴⁾ Klinika Położnictwa i Perinatologii, ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin

⁵⁾ Zespół Oddziałów Okulistyki Mazowiecki Szpital Bródnowski, Warszawa

⁶⁾ Katedra i Zakład Higieny i Epidemiologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

STRESZCZENIE

Wstęp. Aflatoksyny to metabolity wytwarzane przez *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Ze względu na duże rozpowszechnienie produktów zawierających aflatoksyny są one częstym przedmiotem badań obserwacyjnych. W dotychczasowych badaniach potwierdzono hepatotoksyczne działanie aflatoksyn u ludzi. Jednak dokładne mechanizmy patogenetyczne wpływu aflatoksyny B1 na wspomnianą hepatotoksyczność nie są jeszcze znane.

Cel pracy. Celem pracy była ocena toksycznego efektu różnych dawek aflatoksyny B1. Analizę przeprowadzono przez ocenę stężenia NF- κ B w homogenatach tkanki wątroby po 7-dniowym zatruciu tą mykotoksyną.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar, które zostały wybrane losowo, zgodnie z zasadą jednoczesności dla grupy kontrolnej i grupy badawczej. Stężenie NF- κ B oznaczono immunoenzymatycznym testem ELISA w otrzymanych supernatantach wątroby pobranych od zwierząt uśmierconych metodą dekapitacji. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.3 (Statsoft, USA).

Wyniki. Stwierdzono różnice istotne statystycznie między stężeniami NF- κ B w grupie kontrolnej i badanej otrzymującej 1,0 mg/kg aflatoksyny B1 oraz między grupą kontrolną i badaną, która otrzymywała aflatoksynę B1 w dawce 2,0 mg/kg masy ciała ($p < 0,05$). Stwierdzono również istotną zależność pomiędzy poziomem dawki podawanej szczurom aflatoksyny B1 a stężeniem NF- κ B. Uzyskano korelacje ujemne. Wyższa dawka podawana szczurom powodowała niższy poziom mierzonego stężenia NF- κ B.

Wnioski. Badanie wpływu aflatoksyny B1 na poziom czynnika transkrypcyjnego NF- κ B może istotnie przyczynić się do zrozumienia mechanizmu jej działania, wpływu na procesy zapalne, apoptotyczne i nowotworowe w wątrobie oraz określenia jego bezpiecznego poziomu w żywności przeznaczony dla ludzi i zwierząt

Słowa kluczowe: aflatoksyna B1, czynnik jądrowy-NF- κ B, wątroba.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2021 Vol. 74 Issue 1 pp. 67 – 75

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.2478/phr-2021-0006

Strony: 8, rysunki: 0, tabele: 3

page **www of the periodical:** www.phr.net.pl

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

Typ artykułu: oryginalny

Termin nadesłania: 08.11.2020 r.

Termin zatwierdzenia do druku: 07.01.2021 r.



WSTĘP

Aflatoksyny są metabolitami wtórnymi wytwarzanymi głównie przez grzyby *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Głównym źródłem narażenia na aflatoksyny jest doustne spożywanie z pokarmem. Intoksykację wywołują najczęściej spożywane ziarna zbóż, orzechy, suszone owoce, przyprawy, ale także mięso i nabiał od zwierząt spożywających skontaminowaną paszę. Ze względu na duże rozpowszechnienie produktów zawierających aflatoksyny wprowadzono normy prawne określające maksymalny poziom tych mikotoksyn w żywności. Aflatoksyna B1 jest najbardziej toksyczną spośród wszystkich aflatoksyn. Wynika to z obecności pierścienia laktonowego i dwóch pierścieni furanowych, z których najbardziej zewnętrzny ma wiązanie podwójne. Ze względu na obecność tego podwójnego wiązania cząsteczka aflatoksyny B1 może ściślej związać się z cząsteczką białka lub DNA, co zaburza funkcjonowanie komórki. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zakwalifikowała aflatoksynę B1 (AFB1) do grupy I – rakotwórcza dla ludzi [1]. W badaniach na modelach zwierzęcych z użyciem aflatoksyny B1 skutki toksycznego wpływu najczęściej dotyczyły komórek wątroby.

Badania obserwacyjne wykazały również hepatotoksyczne działanie aflatoksyn u ludzi. Jednak dokładne mechanizmy patogenetyczne wpływu aflatoksyny B1 na wspomnianą hepatotoksyczność nie są jeszcze znane.

Czynnik jądrowy κB (NF- κB) reprezentuje grupę indukowalnych czynników transkrypcyjnych, które regulują wiele genów zaangażowanych w różne procesy odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Pełniąc te funkcje, odgrywa główną rolę w regulacji zapalnych szlaków sygnałowych w wielu narządach, w tym w wątrobie.

CEL

Celem pracy była ocena toksycznego wpływu różnych dawek aflatoksyny B1. Analizę przeprowadzono na podstawie oceny stężenia NF- κB w homogenatach tkanki wątroby po 7-dniowym zatruciu tą mykotoksyną.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar o masie ciała 190-200g, które zostały dobrane losowo, zgodnie z zasadą jednoczesności dla grupy kontrolnej i grupy badanej. Badane zwierzęta podzielono na 4 grupy, po 9 szczurów w każdej:

- Grupa nr 1 – zwierzęta, którym podawano dożołądkowo aflatoksynę B1 w dawce 0,5 mg/kg masy ciała przez 7 dni
- Grupa nr 2 – zwierzęta, którym podawano dożołądkowo aflatoksynę B1 w dawce 1,0 mg/kg masy ciała przez 7 dni.
- Grupa nr 3 – zwierzęta, którym podano dożołądkowo aflatoksynę B1 w dawce 2,0 mg/kg masy ciała przez 7 dni
- Grupa 4 - kontrolna - zwierzęta, którym przez 7 dni podawano dożołądkowo wodę redestylowaną.

Po 7 dniach doświadczenia zwierzęta zdekapitowano po dootrzewnowym podaniu środka nasennego. Pobrano im wątroby do dalszych badań.

Pobraną do badań tkankę zwierzęcą homogenizowano w buforze PBS w proporcjach: 0,5 g tkanki na 2 ml buforu. Homogenat wirowano przy 14 000/min. przez 15 minut w 4°C. Stężenie NF- κB w otrzymanych supernatantach oznaczono immunoenzymatycznym testem ELISA. Analizę statystyczną wyników badanych badań przeprowadzono w programie Statistica 13.3 z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka dla analizy normalności, testu U Manna-Whitneya (dla zmiennych niespełniających założeń dla testów parametrycznych), testu t-Studenta (dla zmiennych spełnianie założeń dla testów parametrycznych) oraz test ANOVA Kruskal-Wallis wg rang dla więcej niż dwóch zmiennych. Wyniki uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności $p < 0,05$.

WYNIKI

Średnie stężenie NF- κB [ng/ml] w grupie kontrolnej wyniosło $1951,68 \pm 773,07$, a w grupach badanych odpowiednio: dla grupy, której podawano aflatoksynę B1 w dawce 0,5 mg/kg – $2218,68 \pm 603,35$, aflatoksynę B1 w dawce 1,0 mg/kg – $350,53 \pm 89,09$ oraz aflatoksyny B1 w dawce 2,0 mg/kg – $224,54 \pm 134,89$. Dane te przedstawiono w Tabeli 1. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy średnimi stężeniami w grupie kontrolnej i grupie otrzymującej 0,5 mg/kg aflatoksyny B1 ($p = 0,426$).

Różnicę istotną statystycznie pomiędzy stężeniami NF- κB w grupie kontrolnej i badanej otrzymującej 1,0 mg/kg aflatoksyny wykazano za pomocą nieparametrycznego testu U-Manna-Whitneya. Wykazano istotną różnicę średnich stężeń NF- κB w tych dwóch grupach ($p = 0,000412$).

W celu porównania i sprawdzenia istotności statystycznej różnicy pomiędzy średnim stężeniem NF- κB w grupie kontrolnej i badanej, która otrzymywała aflatoksynę B1 w dawce 2,0 mg/kg masy ciała, wykonano test U-Manna-Whitneya. Wykazał on istotną różnicę średnich stężeń NF- κB między tymi dwiema grupami ($p = 0,0004$).

Do porównania różnic pomiędzy średnim stężeniem NF- κB w grupie kontrolnej i dwóch grupach (grupa badana otrzymująca 1,0 mg/kg aflatoksyny i 2,0 mg/kg aflatoksyny) zastosowano test Kruskala-Wallisa. Wynik testu wskazuje na istotną statystycznie różnicę badanych wartości ($p = 0,0001$). Na tej podstawie można stwierdzić, że wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wskazują na istotnie niższe stężenie NF- κB w ng/ml w wątrobach szczurów pod wpływem aflatoksyny B1 w dawkach wyższych niż 0,5 mg/kg masy ciała zwierzęcia (Tab. 2).

W celu dokładniejszej analizy różnic pomiędzy parami prób przeprowadzono analizę POST-HOC Dunna w modyfikacji Bonferonni. Wskutek powyższych analiz stwierdzono istotne różnice między grupą kontrolną a grupą

otrzymującą aflatoksynę B1 w dawce 1,0 mg/kg masy ciała oraz grupą kontrolną i grupą otrzymującą aflatoksynę B1 w dawce 2,0 mg/kg masy ciała. Wykazano również brak istotnych różnic pomiędzy grupami, które otrzymywały aflatoksynę B1 w dawce 1,0 mg/kg masy ciała i 2,0 mg/kg masy ciała. Wyniki przedstawiono w tabeli (Tab. 3).

W celu sprawdzenia korelacji pomiędzy stężeniami NF-κB w ng/ml a dawką aflatoksyny B1 podaną badanym grupom zastosowano korelację r Pearsona ze względu na rozkład normalny zmiennych. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy podaną dawką aflatoksyny B1 a poziomem stężenia NF-κB w ng/ml. Uzyskano korelacje ujemne. Im wyższa dawka podana szczurom, tym niższy poziom mierzonego NF-κB w ng/ml.

Wykazano również istotność statystyczną w porównaniu stężeń NF-κB w grupie kontrolnej i dwóch grupach badanych ($p = 0,0001$). Stwierdzono również istotną zależność pomiędzy poziomem dawki podawanej szczurom aflatoksyny B1 a stężeniem NF-κB. Uzyskano korelacje ujemne – większa dawka podawana szczurom przy niższym poziomie mierzonego stężenia NF-κB.

Przeprowadzono również test Kruskala-Wallisa w celu porównania różnic między średnim stężeniem w grupie kontrolnej i dwóch grupach badanych. Wynik testu wskazuje na istotność statystyczną badanych danych ($p = 0,0001$).

Tab. 1

Podstawowe statystyki badanych zmiennych ilościowych w każdej grupie zwierząt objętych doświadczeniem badającym poziom NF-κB w ng/ml w wątrobie.			
Grupa	N	Średnia	SD
Aflatoksyna B1 0,5mg/kg	9	2218,682	603,3593
Aflatoksyna B1 1mg/kg	9	350,533	89,0901
Aflatoksyna B1 2mg/kg	9	224,549	134,8872
Grupa kontrolna	9	1951,680	773,0677

Tab. 2

Test Kruskala-Wallisa porównujący pomiary: grupa kontrolna, grupa otrzymująca aflatoksynę B1 w dawce 1mg/kg i aflatoksynę B1 w dawce 2mg/kg.			
Grupa	Test Kruskala-Wallisa: H (2, N=27 =19,47443, p=0,0001		
	R:23,00	R:12,222	R: 6,7778
Grupa kontrolna		0,011912	0,000043
Aflatoksyna B1 1mg/kg	0,0119		0,43693
Aflatoksyna B1 2mg/kg	0,00004	0,4369	

Tab. 3

Test Dunna POST-HOC zmodyfikowany przez Bonferonni porównujący pomiary z grupy kontrolnej, grupy otrzymującej aflatoksynę B1 w dawce 1 mg/kg oraz aflatoksynę B1 w dawce 2 mg/kg.			
Grupy- porównywane pary grup	statystyka	Istotność	Istotność w teście Bonferonni
Aflatoksyna B1 2mg/kg - Aflatoksyna B1 1mg/kg	5,444	0,146	0,437
Aflatoksyna B1 2mg/kg - grupa kontrolna	16,222	0,000015	0,000044
Aflatoksyna B1 1mg/kg - grupa kontrolna	10,778	0,004	0,012

DYSKUSJA

Szacuje się, że aż 4,5 miliarda ludzi na całym świecie jest narażonych na aflatoksyny, w tym najważniejszą z nich aflatoksynę B1 [2]. Główną drogą narażenia na aflatoksyny jest droga doustna [3]. Spożywanie produktów skażonych tymi mikotoksynami jest powszechne ze względu na dużą różnorodność produktów potencjalnie skażonych toksynami wytwarzanymi przez grzyby. Najczęściej spotyka się je w ziarnach zbóż, orzechach, suszonych owocach, przyprawach. Celem naszych badań była ocena toksycznego działania aflatoksyny B1 na podstawie stężeń czynnika transkrypcyjnego NF-κB w wątrobach szczurów pod wpływem różnych dawek tej mikotoksyny w ng/ml. Wątroba została uznana za docelowy narząd, ponieważ jest ona najbardziej wrażliwa na toksyczność aflatoksyny B1. Ma to związek z metabolizmem tej toksyny głównie w wątrobie. Hepatotoksyczne i hepatokarcynogenne działanie aflatoksyny B1 zostało dobrze udokumentowane u różnych gatunków zwierząt [4]. Już w latach sześćdziesiątych badanie Svobody et al. [5] na temat nieprawidłowości ultrastrukturalnych i biochemicznych wywołanych aflatoksyną B1 w wątrobie szczurów ujawniło nieprawidłowości w strukturze jąder komórkowych po ekspozycji na tę mikotoksynę. Towarzyszył im spadek zawartości cytoplazmatycznego RNA i białka, a także zmniejszenie poziomu białka jądrowego.

Rotimi i wsp. wykazali, że ostre zatrucie wysokimi dawkami aflatoksyny B1 przez 7 dni indukowała uszkodzenie wątroby z towarzyszącą dyslipidemią [6].



Jako marker potencjalnego uszkodzenia wątroby wybrano czynnik jądrowy κB (NF- κB). Kluczową rolę NF- κB w wątrobie podkreśla również fakt, że ablacja genetyczna regulatorów NF- κB w modelach mysich prowadzi do samoistnego uszkodzenia wątroby, zwłóknienia i raka wątrobowokomórkowego [7].

Meki i wsp. wykazali, że zatrucie aflatoksyną B1 istotnie zwiększa poziom markera apopozy – kaspazy-3 [8]. Wyniki analizowanych badań wykazały znaczny wzrost stężenia czynników proapoptotycznych, takich jak kaspaza-3 pod wpływem zatrucia aflatoksyną B1. W badaniach własnych stwierdzono jednak istotny spadek stężenia czynnika jądrowego B (NF- κB), aktywowanego pod wpływem czynników proapoptotycznych [9]. Spadek ten był również zależny od dawki aflatoksyny B1 podanej szczurom i znacznie wyższy przy wyższych stężeniach podawanej mikotoksyny. Niskie dawki aflatoksyny B1 nie powodowały istotnych zmian w średnim stężeniu czynnika jądrowego B (NF- κB) w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak Luedde i wsp. określają rolę jądrowego czynnika κB (NF- κB) jako potencjalnego kluczowego regulatora procesów zapalnych w wątrobie [10]. Jest on niezbędny do przeżycia hepatocytów i homeostazy wątroby.

Funkcje komórek wątrobowych aktywnych w fibroogenezie i miofibroblastów są również regulowane przez NF- κB . Kluczowa rola NF- κB w regulacji śmierci komórek, stanów zapalnych i gojenia się ran sprawia, że NF- κB jest ważnym modulatorem postępu choroby wątroby i wskazuje na potencjalny związek między przewlekłym uszkodzeniem wątroby, zwłóknieniem i rakiem wątrobowokomórkowym, co może być ważne w planowaniu terapii tych stanów i ukierunkowania na ten czynnik transkrypcyjny.

Kluczową rolę NF- κB w wątrobie podkreśla również fakt, że ablacja genetyczna regulatorów NF- κB w modelach mysich prowadzi do samoistnego uszkodzenia wątroby, zwłóknienia i raka wątrobowokomórkowego [11]. Liczne badania wskazują również na udział aflatoksyny B1 w patogenezie wspomnianego raka wątrobowokomórkowego. Kontrola apoptozy jest niezwykle ważna w procesie karcynogenezy. Pikarsky i wsp. wykazali prokaryogenną rolę NF- κB u Mdr2 - myszy, u których rozwinął się rak wątrobowokomórkowy w odpowiedzi na przewlekłe żółciowe zapalenie wątroby [12]. Przedstawione wyniki badań własnych wymagają kontynuacji, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów hepatotoksycznego działania aflatoksyny B1.

Badanie wpływu aflatoksyny B1 na poziom czynnika transkrypcyjnego NF- κB może znacząco przyczynić się do zrozumienia wpływu na procesy zapalne, apoptotyczne i kancerogenne w wątrobie. Może pomóc w ustaleniu bezpiecznego poziomu tej mikotoksyny w żywności przeznaczonej dla ludzi i zwierząt. Czynnik transkrypcyjny NF- κB może być również potencjalnym celem farmakoterapeutycznym w zapobieganiu i leczeniu chorób wątroby wywołanych toksycznym działaniem aflatoksyny B1.

WNIOSEK

Badanie wpływu aflatoksyny B1 na poziom czynnika transkrypcyjnego NF- κB może istotnie przyczynić się do zrozumienia mechanizmu jego działania, wpływu na procesy zapalne, apoptotyczne i kancerogenne w wątrobie oraz ustalenia jej bezpiecznego poziomu w żywności dla ludzi i zwierząt. Czynnik transkrypcyjny NF- κB może być potencjalnym celem farmakoterapeutycznym w zapobieganiu i leczeniu chorób wątroby wywołanych toksycznym działaniem aflatoksyny B1.

LITERATURA

1. Humans IWG on the E of CR to. Toxins derived from Fusarium Moniliforme: Fomonisins B1 and B2 and Fusarin C. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1993;56:445-66;
2. Kowalska A, Walkiewicz K, Kozieł P, Muc-Wierzgoń M. Aflatoksyny – charakterystyka i wpływ na zdrowie człowieka. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2017; 71: 315-327;
3. Raad F, Nasreddine L, Hilan C, Bartosik M, Parent-Massin D. Dietary exposure to aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol from a total diet study in an adult urban Lebanese population. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. 2014 Nov;73:35-43;
4. Wogan GN. Aflatoxin as a human carcinogen. Hepatol. Baltim. Md. 1999 Aug;30(2):573-575;
5. Svoboda D, Grady HJ, Higginson J. Aflatoxin B1 injury in rat and monkey liver. Am. J. Pathol. 1966 Dec;49(6):1023-1051;
6. Rotimi OA, Rotimi SO, Duru CU, Ebebeinwe OJ, Abiodun AO, Oyeniyi BO, et al. Acute aflatoxin B1 - induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats. Toxicol. Rep. 2017;4:408-414;
7. Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. Cancer Cell. 2007 Feb;11(2):119-132;
8. Meki AR, Abdel-Ghaffar SK, El-Gibaly I. Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. Neuro Endocrinol. Lett. 2001 Dec;22(6):417-426;
9. Bours V, Bentires-Ajji M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, et al. Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. Biochem. Pharmacol. 2000 Oct 15;60(8):1085-1089;
10. Luedde T, Schwabe RF. NF- κB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2011 Feb;8(2):108-118;
11. Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. Cancer Cell. 2007 Feb;11(2):119-132;
12. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. Nature. 2004 Sep 23;431(7007):461-466.

Mateusz Woźniakowski

Klinika Urologii i Urologii Onkologicznej SP ZOZ w Puławach
Ul. Józefa Bema 1
24-100 Puławy