

Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis

Studia Biologica 1 (2018)

DOI 10.24917/St.Biol.1.5

¹Anna Kalafova, ¹Jaroslav Kovacik, ¹Katarina Zbynovska, ¹Monika Schneidgenova,
²Lubica Chrastinova, ²Lubomír Ondruska, ²Rastislav Jurcik, ¹Marcela Capcarova,
³Agnieszka Greń

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences,
Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovak Republic

²National Agricultural and Food Centre, Research Institute of Animal Production

³Institute of Biology, Pedagogical University of Cracow, Poland

Analiza stężenia wybranych składników mineralnych w surowicy krwi królików po iniekcji patuliny i epikatechiny

Wstęp

Stwierdzono coraz częstsze występowanie patuliny w nieprawidłowo przechowywanych produktach spożywczych i karmach dla zwierząt, stąd dodawanie substancji, które byłyby w stanie ograniczyć toksyczne efekty jej stosowania może być interesujące (Pfeiffereta i in., 2005; Ayed-Boussema i in., 2013). Eliminacja występowania mykotoksyn w pokarmach i karmach jest możliwa min. dzięki dodawaniu flawonoidów. Liczne badania wskazują, że fitochemikalia chronią przed następstwami toksycznymi substancji zanieczyszczających środowisko naturalne (Celik i in., 2013; Renzulli i in., 2004). Ochronne działanie fitochemikaliów jest związane z łagodzeniem efektów stresu oksydacyjnego (Gentile i in., 2018; Takabayashi i in., 2004; Rizvi i in., 2005; Erba i in., 2005; Hsu, 2005; Greń, Formicki, 2012; Greń i in., 2012). Polifenole zielonej herbaty to najważniejsze biologicznie aktywne składniki zielonej herbaty. Doniesienia naukowe wskazują na ich właściwości antyoksydacyjne, antynowotworowe (Cooper i in., 2005; Yang i in., 2005), ochronne w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych i innych (Dreosti, 1996; Dufresnea, Farnworth, 2001; Riegsecker i in., 2013). W dostępnej literaturze nie znaleziono informacji dotyczących modyfikującego wpływ epikatechiny na toksyczne reakcje indukowane przez patulinę. W badaniu dokonano oceny stężenia wybranych minerałów w surowicy krwi królików po aplikacji patuliny oraz patuliny i epikatechiny w trzech różnych dawkach.

Materiał i metodyka

Materiał biologiczny i schemat próby

Do badania zostały włączone dorosłe samice królików ($n = 20$), w fazie estrus, matczynej linii albinos (krzyżówka nowozelandzki biały, Blanc de Bouscat, srebrny francuski) i ojcowskiej linii (krzyżówka królik kalifornijski, duży srebrny). Zwierzęta utrzymywano w klatkach hodowlanych dla królików laboratoryjnych: 1 zwierzę

na 3000 cm² przy LD 12:12. Temperatura w pomieszczeniu wahała się w zakresie 20–24°C, wilgotność 55±10%. Woda i pasza dostępne *ad libitum*. Wiek królików był wyrównany (150 dni). Zwierzęta podzielono na pięć grup: grupa kontrolna (C; sól fizjologiczna) i grupy eksperymentalne E1, E2, E3, E4. Zwierzętom w grupach eksperymentalnych E1, E2, E3 i E4 podawano dwa razy w tygodniu patulinę w dawce 10 µg.kg⁻¹ w iniekcji domięśniowej. Z kolei trzy razy w tygodniu podawano epikatechinę w grupie E2 w dawce 10 µg.kg⁻¹, E3 100 µg.kg⁻¹ i w E4 1000 µg.kg⁻¹ (tab. 2). Pobranie krwi odbyło się w 15 dniu badania. Dorosłe króliki były karmione paszą z 12,35 MJ.kg⁻¹ metabolizowanej energii, w formie granulowanego koncentratu (tab. 1).

Tabela 1. Skład karmy królików

Składnik	g.kg ⁻¹
Masa sucha	926,26
Białka	192,06
Lipidy	36,08
Włókno	135,79
Substancje bezazotowe	483,53
Popiół	78,78
Organiczna masa sucha	847,49
Wapno	9,73
Fosfor	6,84
Magnez	2,77
Sód	1,81
Potas	10,94

Tabela 2. Iniekcje patuliny i epikatechiny w grupach doświadczalnych

Grupa	liczba (n)	Patulina (µg.kg ⁻¹)	Epikatechina (µg.kg ⁻¹)
Kontrolna (C)	5	–	–
Badawcza (E1)	5	10	–
Badawcza (E2)	5	10	10
Badawcza (E3)	5	10	100
Badawcza (E4)	5	10	1000

Z próbek krwi w celu określenia profilu mineralnego pozyskano surowicę, w której oznaczano zawartość składników mineralnych: wapń, fosfor, magnez przez zastosowanie automatycznego analizatora klinicznego RX Monza (Randox, United Kingdom). Sód, potas i chlorki były analizowane przy użyciu EasyLite Plus (Medica Corporation, USA). Pozyskane dane zostały analizowane statystycznie (SAS). Obliczono średnią, odchylenie standardowe, wariancje (ANOVA). Istotność statystyczna została określona na poziomie P<0,05.

Wyniki

Podanie patuliny lub patuliny i epikatechiny nie wywołało statystycznie istotnych zmian w stężeniu analizowanych jonów (tab. 3). Statystycznie nieistotne obniżenie stężenia wapnia, fosforu, magnezu, sodu i potasu, w porównaniu z grupą kontrolną, odnotowano w grupie E1 i E2. Natomiast stężenie Cl w grupie E2 i E4 było podwyższone w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 3. Wpływ patuliny oraz patuliny i epikatechiny na profil mineralny w surowicy krwi królików

Parametr (mmol.l ⁻¹)	C	E1	E2	E3	E4
Ca	3,46±0,33	3,01±0,40	3,22±0,22	3,43±0,38	3,36±0,23
P	1,43±0,0,12	1,38±0,16	1,41±0,13	1,46±0,28	1,37±0,12
Mg	0,58±0,0,08	0,54±0,04	0,53±0,07	0,55±0,07	0,55±0,08
Na	155,27±2,40	154,87±2,15	152,47±3,05	153,80±0,26	151,17±1,76
K	4,23±0,67	3,77±0,14	4,05±0,34	3,70±0,14	3,97±0,16
Cl	95,77±2,58	96,42±2,93	94,13±2,92	95,60±2,91	97,25±2,14

C – grupa kontrolna; E1 (10 µg.kg⁻¹ patulina), E2 (10 µg.kg⁻¹patulina+10 µg.kg⁻¹epikatechinaE3 (10 µg.kg⁻¹patulina+100 µg.kg⁻¹epikatechina), E4 (10 µg.kg⁻¹patulina+1000 µg.kg⁻¹epikatechina) - grupy badawcze; średnia wartość ± odchylenie standardowe

Dyskusja

Patulina została wyizolowana w 1940 r. i sklasyfikowana jako mykotoksyna w 1960 r. Stanowi poważne ryzyko dla zdrowia (Torović i in., 2018). Z tego powodu, szczególne znaczenie ma poznanie mechanizmu toksycznego działania patuliny. Dla zrozumienia mechanizmu działania patuliny przeprowadzono liczne badania *in vivo* oraz *in vitro* (Yang i in., 2018). Działanie patuliny opiera się przede wszystkim na jej zdolności do interakcji z wieloma składnikami komórki, a przede wszystkim DNA (Kiessling, 1986).W naszym badaniu analizowaliśmy działanie patuliny i potencjalne działanie ochronne różnych dawek epikatechiny na wskaźniki profilu mineralnego w surowicy krwi królików. Interesujące jest, że w kilku badaniach stosuje się drogę doustną podania patuliny (Gc i in., 1998; Schutze i in., 2010). Podanie doustne jest najczęściej stosowaną drogą ekspozycji patuliny. Z kolei w naszym badaniu zastosowaliśmy metodę iniekcji domięśniowej (*Musculus biceps femoris*). W pracy Song i in., (2014) zastosowali dawkę patuliny 1,0 mg.kg⁻¹ masy ciała. Nasze wyniki są zbliżone z wynikami Garza i in., (1977), którzy po doustnym podaniu dawek dobowych 5, 50 i 500 µg patuliny na kg masy ciała w trakcie 4 tygodni nie odnotowali statystycznie istotnych zmian w monitorowanych parametrach (morfologia krwi, stężenie białka całkowitego, cholesterolu, glukozy w surowicy krwi, aktywności fosfatazy alkalicznej, stężenia sodu i potasu). Faixová i in., et al. (2010) stwierdzili, że podanie zwierzętom karmy zanieczyszczonej mykotoksynami prowadzi do obniżenia stężenia w osoczu: potasu, magnezu, białka całkowitego, albumin, triglicerydów, stężenia wolnego glicerolu i aktywności enzymów ALT i AST.

Podsumowanie

W badaniu analizowano działanie patuliny i potencjalne działanie ochronne różnych dawek epikatechiny na stężenie wybranych minerałów w surowicy krwi królików. Wyniki badania pokazały, że patulina nie wywoływała statystycznie istotnych zmian w wybranych wskaźnikach profilu mineralnego krwi królików. Stąd również nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków, że epikatechina wykazuje działanie ochronne. Kolejne badania są konieczne w celu weryfikacji działania różnych dawek na wewnętrzne środowisko królików.

Literatura

- Ayed-Boussema, Abassi H., Bouaziz C., Hlima W.B., Ayed Y., Bacha H. 2013. Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. *Environ., Toxicol.*, vol. 28, pp. 299–306.
- Celik A., Eke D., Ekinci S.Y., Yildirim S. 2013. The protective role of curcumin on perfluorooctane sulfonate-induced genotoxicity: single cell gel electrophoresis and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.: Int. J. Published Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 53, pp. 249–255.
- Cooper R., Morre D.J., Morre D.M. 2005. Medicinal benefits of green tea: part I. Review of noncancer health benefits. *J. Altern. Complement. Med.*, vol. 11, pp. 521–528.
- Dreosti I.E. 1996. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr. Rev.* vol. 54, pp. 51–58.
- de Melo F.T., de Oliveira I.M., Greggio S., Dacosta J.C., Guecheva T.N., Saffi J., Henriques J.A., Rosa R.M. 2012. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.: Int. J. Published Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 50, pp. 3548–3555.
- Dufresne C.J., Farnworth E.R. 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.*, 12, pp. 404–421.
- Erba D., Riso P., Bordoni A., Foti P., Biagi P.L., Testolin G. 2005. Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J. Nutr. Biochem.*, vol. 16, pp. 144–149.
- Faixová Z., Faix S., Borutová R., Leng L. 2010. Effects of feeding diets contaminated with Fusarium mycotoxins on blood biochemical parameters of broiler chickens. *Acta Vet Hung.*, vol. 58(3), pp. 275–285.
- Garza H.C., Swanson B.G., Branen A.L. 1977. Toxicological study of patulin in monkeys. *Journal of Food Science*, vol. 42(5), pp. 145–149.
- Gentile D., Fornai M., Pellegrini C., Colucci R., Blandizzi C., Antonioli L. 2018. Dietary flavonoids as a potential intervention to improve redox balance in obesity and related co-morbidities: a review. *Nutr Res Rev.* vol. 6, pp. 1–9.
- Gc L.L., McCay J.A., Brown R.D., Musgrove D.L., Butterworth L.F., Munson A.E., White Jr., K.L. 1998. Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F1 mice. *Food Chem. Toxicol.: Int. J. Published Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 36, pp. 107–1115.
- Greń A., Formicki G. 2012. Antioxidants in therapy and prevention of diabetes mellitus. *Xenobiotics: soil, food and human health interactions*. Rzeszów: Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, pp. 276–291.

- Greń A., Formicki G., Goc Z., Muchacka R., Kňazická Z., Lukáč N., Massányi P. 2012. Effects of *Trigonella foenum graecum* on the leukocytes in diabetes mice. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, vol. 2(2), pp. 467–476.
- Hsu S. 2005. Green tea and the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 52, pp. 1049–1059.
- Renzulli C., Galvano F., Pierdomenico L., Speroni E., Guerra M.C. Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Appl. Toxicol.*, vol. 24, pp. 289–296.
- Kiessling K.H. 1986. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure & Appl. Chem.*, vol. 58(2), pp. 327–338.
- Moake M.M., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W. 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 4, pp. 8–21.
- Pfeiffer E., Diwald T.T., Metzler M. 2005. Patulin reduces glutathione level and enzyme activities in rat liver slices. *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 49, pp. 329–336.
- Riegsecker S., Wiczynski D., Kaplan M.J., Ahmed S., 2013. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. *Life Sci.* 93, pp. 307–312.
- Rizvi S.I., Zaid M.A., Anis R., Mishra N. 2005. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 32, pp. 70–75.
- Schutze N., Lehmann, I., Bonisch U., Simon J.C., Polte T. 2010. Exposure to mycotoxins increases the allergic immune response in a murine asthma model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 181, pp. 1188–1199.
- Song E., Xia X., Su Ch., Dong W., Xian Y., Wang W., Song Y. 2014. Hepatotoxicity and genotoxicity of patulin in mice, and its modulation by green tea polyphenols administration. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 71, pp. 122–127.
- Takabayashi F., Tahara S., Kaneko T., Harada N. 2004. Effect of green tea catechins on oxidative DNA damage of hamster pancreas and liver induced by *N*-nitrosobis (2-oxopropyl) amine and/or oxidized soybean oil. *Biofactors*, vol. 21, pp. 335–337.
- Torović L., Dimitrov N., Lopes A., Martins C., Alvito P., Assunção R. 2018. Patulin in fruit juices: occurrence, bioaccessibility, and risk assessment for Serbian population. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* vol. 35(5), pp. 985–995.
- Williamson G., Barron D., Shimoi K., Terao J. 2005. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Rad. Res.*, vol. 39, pp. 457–469.
- Yang G., Bai Y., Wu X., Sun X., Sun M., Liu X., Yao X., Zhang C., Chu Q., Jiang L., Wang S. 2018. Patulin induced ROS-dependent autophagic cell death in Human Hepatoma G2 cells. *Chem Biol Interact.*, vol. 288, pp. 24–31.
- Yang C.S., Liao J., Yang G.Y., Lu G. 2005. Inhibitions of lung tumorigenesis by tea. *Exp. Lung Res.*, vol. 31, pp. 135–144.

Streszczenie

Patulina jest mykotoksyną powstającą na owocach zaatakowanych przez pleśń. Spożycie patuliny jest niebezpieczne, ponieważ wytwarzająca ją pleśń może wykwiatać w jelitach człowieka, powodując krwawienia i choroby układu pokarmowego. Stąd podjęto badania, których celem była ocena potencjalnie ochronnego wpływu

epikatechiny względem toksycznego działania patuliny na stężenie wybranych składników mineralnych w surowicy krwi królików. W wyniku przeprowadzonych badań nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi, czy stosowana toksyna wpływa na profil mineralny, oraz czy flawanol epikatechina może mieć działanie ochronne względem analizowanej toksyny. Stwierdzono, że patulina wywołuje wzrost stężenia Cl przy równoczesnym obniżeniu stężenia Na, K, Mg, Ca i P. Jednak uzyskane wyniki były statystycznie nieistotne. Również stosowanie epikatechiny w dawkach $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ nie wywołuje statystycznie istotnych zmian w stężeniu analizowanych minerałów w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grupy zwierząt po iniekcji patuliny. Istnieje konieczność kontynuowania badań.

Słowa kluczowe: surowica krwi, patulina, epikatechina, iniekcje, antyoksydanty

Blood mineral profile after application of patulin in rabbits and its modulation by epicatechin administration

Abstract

In the present study we investigated patulin-induced changes in rabbit's blood. The protective effect of epicatechin against patulin-induced changes was determined. Adult female rabbits (n=25) were randomly divided into five groups: control group C and experimental groups E1, E2, E3 and E4. Patulin was applied intramuscularly in groups E1, E2, E3 and E4 ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight BW) twice a week, while animals in groups E2, E3 and E4 received epicatechin three times a week for 15 days (in doses E2 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, E3 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and E4 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The blood serum was used for the analysis of following components: calcium, phosphorus, magnesium by Ecoline kits using RX Monza (United Kingdom), potassium, sodium, chloride were used by EasyLite Plus (Medica Corporation, USA) according to manufacturer conditions. We found that patulin-application had no effect on serum mineral parameters (phosphorus, magnesium, potassium, sodium, chloride) as the differences among the groups remained insignificant ($P<0.05$).

Keywords: blood serum, patulin, epicatechin, injection, antioxidants

¹Anna Kalafova, ¹Jaroslav Kovacik, ¹Katarina Zbynovska, ¹Monika Schneidgenova, ²Lubica Chrastinova, ²Lubomír Ondruska, ²Rastislav Jurcik, ¹Marcela Capcarova, ³Agnieszka Greń

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovak Republic

²National Agricultural and Food Centre, Research Institute of Animal Production, Hlohovecka 2, 949 01 Nitra, Slovak Republic

³Institute of Biology, Pedagogical University of Cracow, Poland