

NÁVRAT HOUBY, JEŽ DALA VZNIKnout JMÉNU TRICHOHECENY

MARTIN ŽABKA^a a ALEXANDR JEGOROV^b

^aZemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, ^bIVAX CR a.s., Výzkumná jednotka, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
e-mail: mزابka@centrum.cz, alexandr_jegorov@ivax-cr.com

Došlo dne 14.III.2002

Klíčová slova: mykotoxiny, trichotheceny, roseotoxiny, destruxiny

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt mykotoxinů
3. Trichotheceny
4. Roseotoxiny a destruxiny
5. Závěr

1. Úvod

Aktuálním trendem v oblasti výroby zemědělských komodit a následně potravin se stala produkce kvalitních, a především zdravotně nezávadných produktů. Tento trend do značné míry souvisí i se sledováním obsahu exogenních toxických látek, mezi nimiž důležité místo bezesporu zaujímají mykotoxiny.

Po 11. září 2001 získalo téma mykotoxinů i jinou neblahou aktuálnost v souvislosti s jejich možným zneužitím k teroristickým cílům. Jednou z doposud nejvýznamnějších skupin mykotoxinů jsou trichotheceny¹. S instrukcemi, jak se zachovat při jejich zneužití, se dnes lze setkat na webových stránkách četných amerických nebo britských úřadů. Takovéto varování rozhodně není liché, neboť z válečné historie jsou známy případy užití substance zvané „žlutý déšť“, jejíž základ byl tvořen některými trichotheceny a jež byla pravděpodobně užita při konfliktech v Laosu, Kambodži a následně i v Afghánistánu². I když jsou tyto látky předmětem mezinárodní konvence o biologických zbraních (The Biological Weapons Convention), existuje i podezření na jejich použití ve válce v Koreji a Perském zálivu³⁻⁷. Přibližně 50leté historii objevení účinku trichothecenů a speciálně houbě, jež dala vzniknout jménu této skupiny látek, je věnován tento článek.

2. Výskyt mykotoxinů

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, vyvolávající různé toxické syndromy nazývané souhrnně mykotoxikózy. Mykotoxiny se vyskytují na všech úrovních potravního řetězce⁸, ke kontaminaci

může docházet už v době pěstování na poli, stejně tak i během skladování⁹. Bennet (1987) (cit.¹⁰) definoval mykotoxiny jako přírodní produkty hub, které evokují toxickou odezvu organismu už i ve velice malých koncentracích; z tohoto důvodu je jakákoliv kontaminace toxigenními houbami potenciálně značně nebezpečná. Nejvíce známé mykotoxinogenní druhy náleží do rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*¹¹, nicméně v poslední době vystupují do popředí i další zástupci, jako jsou rody *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma* a *Trichothecium*. Všechny tyto houby se obecně vyskytují v půdě a ve formě spór pak běžně ve vzduchu¹². Mezi významné skupiny mykotoxinů jsou řazeny: aflatoxiny, trichotheceny, námelové alkaloidy, zearalenony, ochratoxiny, sterigmatocystin, cyklopiazonová a peniciliová kyselina, patulin, citrinin, rubratoxiny, fumonisiny a tremorgeny.

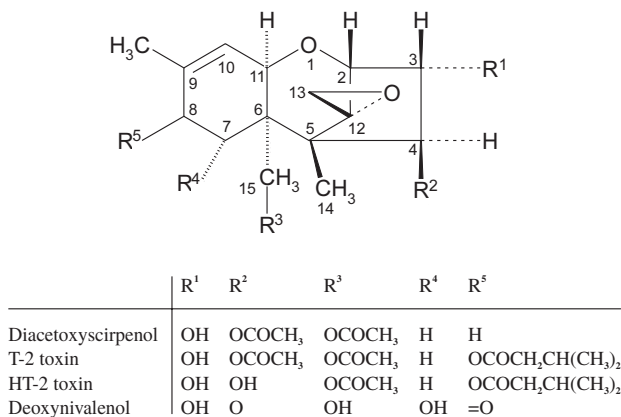
Důsledky expozice organismu mykotoxinům jsou známy u lidí i zvířat už z dávné minulosti, kdy byly některé otravy (ergotismus) živnou půdou pro šíření náboženských pověr, stejně tak z minulosti poměrně nedávné, např. úmrtí 17 000 lidí v důsledku alimentární toxické aleukie (ATA), vyvolané požitím kontaminovaného obilí za II. světové války v bývalém Sovětském svazu^{8,13}. Konečně i v dnešní době je škodlivý vliv mykotoxinů na populaci patrný⁶, a to hlavně v rozvojových zemích¹⁴.

3. Trichotheceny

Trichotheceny jsou jako skupina sekundárních metabolitů hub systematicky popisovány již od roku 1948, kdy byl na základě svých inhibičních vlastností¹⁵⁻¹⁸ objeven Freemanem a Morrissonem v houbách *Trichothecium roseum* (pers Fr.) Link¹⁹ první zástupce této skupiny nazvaný trichothecin²⁰. Producenti trichothecenů tvoří dnes již poměrně široké spektrum zástupců²¹ a od té doby bylo objeveno dalších asi 170 trichothecenů^{22,23}.

Z hlediska praktického výskytu trichothecenů v kontaminovaných potravinách je známo, že hlavním kontaminantem bývá deoxynivalenol. Jde naštěstí o jeden z méně toxických trichothecenů⁸. Hygienické limity v ČR pro tento mykotoxin jsou stanoveny pro obilí, rýži a kukuřici 2 mg.kg⁻¹ a pro mouku 1 mg.kg⁻¹. Pro jiné trichotheceny nejsou v ČR zákonné limity určeny²⁴.

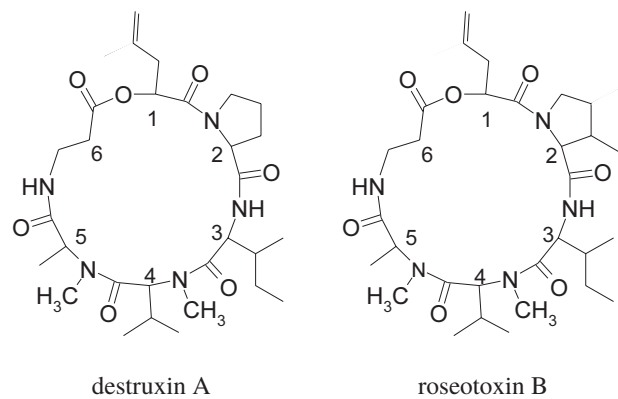
Trichotheceny jsou většinou charakterizovány jako tricyklické seskviterpeny se dvěma šestičlennými a jedním pětičlenným kruhem⁸. Většina z nich má dvojnou vazbu v poloze 9,10 a obsahuje epoxyskupinu v poloze 12,13 (cit.⁹). Mohou být rozděleny do čtyř typů (A, B, C, a D). Typ A se vyznačuje nepřítomností oxoskupiny v poloze 8 a příkladem je vysoce toxický HT-2 a T-2 toxin. Typ B je význačný přítomností oxoskupiny na C-8 a příkladem by mohl být deoxynivalenol (DON), nazývaný též vomitoxin. Skupina trichothecenů typu C je charakteristická další epoxyskupinou v poloze 7,8 nebo i 9,10 a lze sem zařadit například krotocin. Typ D obsahuje makrocycklus mezi C-4 a C-15 s několika esterovými vazbami, jehož příkladem je verukarin A (cit.^{8,9}).

Obr. 1. Struktura trichothecenů¹

Kontaminace organismu trichotheceny má za následek širokou paletu projevů. Vesměs jde o silné inhibitory syntézy proteinů a DNA (cit.¹). Při vystavení organismu účinkům trichothecenů může docházet k rozličným syndromům, například ke snížení příjmu nebo totálnímu odmítnutí potravy, k podráždění kůže až k dermálním nekrotázám, zvracení, průjmům a krvácivosti. Trichotheceny jsou popsány i jako imunopresory^{25–29}. Bez výjimky všechny trichotheceny vykazují větší či menší stupeň toxicity pro živočichy, vykazují i insekticidní efekt^{1,30}. Byla popsána i fytotoxická aktivita^{1,31}. Toxicita je vysvětlována především přítomností epoxyskupiny³². V minulosti se trichotheceny staly pro svou toxicitu předmětem zájmu vojenského výzkumu, který následně odhalil u některých zástupců (např. T-2 toxin) vlastnosti splňující předpoklady pro jejich bojové využití. Jedná se například o schopnost vyvolat poškození kůže a očí už od dávky několika ng–μg, vážné poškození nervové soustavy, respirační, gastrointestinální a hematologickou toxicitu spojenou s mnohostetností způsobů průniku do organismu^{33–35}.

Trichothecium roseum je celosvětově rozšířená patogenní houba³⁶ hojně se vyskytující na různém ovoci³⁷ i lískových ořích³⁸, v našich podmínkách pak především na jablkách³⁹. Trichotheceny izolované z hub *Trichothecium roseum* (trichothecin) nebo *Stachybotris cylindrospora*⁴⁰ vykazovaly antifungální aktivitu spojenou s inhibicí konkurenčních hub^{20,41}. Farmakologicky zajímavou fungicidní aktivitu, která není doprovázena cytotoxickými účinky, vykazují např. trichotheceny izolované z houby *Trichoderma harzianum*⁴². Trichotheceny překvapivě nevykazují žádnou nebo téměř žádnou aktivitu vůči různým bakteriím nebo kvasinkám^{42,43}. Byly u nich však zjištěny antivirální účinky, a to jak u rostlinných virů (tobacco necrosis virus, TNV)⁴⁴, tak virů účinných u člověka (Epstein-Barr virus EBV-EA, Herpes simplex virus)^{45–47}. Velmi zajímavá je i velmi vysoká aktivita některých trichothecenů na malárii⁴⁸. Na skupinu trichothecenů se tedy v celku nelze dívat pouze jako na toxiny, ale mezi různými účinky těchto látek lze nalézt i medicínsky využitelné aktivity.

Analýza trichothecenů je dnes již rutinní záležitostí. Podkladem pro většinu současných metod je metoda, kterou zavedl Scott (1970) (cit.⁴⁹). Dodnes se tato metoda v různých modifikacích uplatňuje při detekci velkého množství mykotoxinů. Jako další metodu pro stanovení lze zmínit např. detekci

Obr. 2. Struktury destruxinu A a roseotoxinu B (cit.⁶¹)

destruxin A: ¹ 2-hydroxypent-4-enová kyselina, ² Pro, ³ Ile, ⁴ MeVal, ⁵ MeAla, ⁶ β-Ala
 roseotoxin B: ¹ 2-hydroxypent-4-enová kyselina, ² 3-Me-Pro, ³ Ile, ⁴ MeVal, ⁵ MeAla, ⁶ β-Ala

pomocí kultur na agarových plotnách, kterou představil Filtenborg a Frisvad (1980) (cit.⁵⁰). Základem metod je dnes užití TLC, HPLC nebo pokročilých metod GC-MS nebo HPLC-MS. Navíc jsou komerčně používány i metody založené na kitech využívajících imunodetekci nebo afinitní chromatografii⁵¹.

4. Roseotoxiny a destruxiny

Trichothecium roseum produkuje jak již zmíněné trichotheceny, tak méně známé roseotoxiny a destruxiny⁵². Roseotoxiny a destruxiny po chemické stránce náležejí do skupiny cyklických depsipectidů⁵³. Termín cyklické depsipectidy poprvé užil Shemyakin (1960) (cit.⁵⁴) a představuje cyklické peptidy skládající se z aminokyselin a hydroxykyselin. Peptidová vazba je tudíž v místech napojení hydroxykyseliny nahrazena esterovou vazbou. O cyklických depsipectidech lze hovořit jako o široké skupině látek s mnoha různými biologickými účinky. Byly u nich objeveny například insekticidní^{55,56} nebo protivirové⁵⁷ účinky a také např. cytotoxicita k leukemickým buňkám⁵⁸.

Roseotoxiny jsou skupinou mykotoxinů originálně produkováných pouze patogenní houbou *Trichothecium roseum*⁵². Roseotoxiny jsou složeny z pěti aminokyselin a jedné hydroxykyseliny a vyznačují se přítomností neobvyklé aminokyseliny *trans*-3-methylprolinu. Popsány byly roseotoxiny A, B a C, které byly pojmenovány dle retence na silikagelu^{52,53,59}, a roseotoxin S lišící se počtem hydroxykyselin v cyklu⁶⁰.

Destruxiny jsou roseotoxinům příbuzné hexadepsipectidy^{61,62} obsahující jednu α-hydroxykyselinu. Jedinou odlišností je substituce *trans*-3-methylprolinu u roseotoxinů prolinem u destruxinů⁶³. Destruxiny jsou produkovány houbou *T. roseum* a několika dalšími většinou entomopatogenními houbami^{55,64–68}. V současnosti je známo okolo 30 destruxinů. Předpokládá se, že tato skupina metabolitů je pravděpodobně syntetizována extraribosomovým multienzymatickým systémem⁶⁹, a právě tento aspekt je zřejmě příčinou velké rozmanitosti těchto metabolitů^{55,70}.

Biologická aktivita roseotoxinů a destruxinů byla a je i dnes předmětem výzkumu. Byla u nich zjištěna nezanedbatelná insekticidní^{55,64–66,71,72}, nematocidní⁷³, imunomodulační⁷⁴ nebo fytotoxická aktivita^{67,68} a neméně zajímavá toxicita testovaná na modelech teplokrevných živočichů⁷⁵. Lze zmínit i nedávno objevený kardiostimulační účinek roseotoxinu B a destruxinů A, B (cit.⁶¹).

Biologická aktivita cyklopeptideů tedy rovněž potvrzuje, že i zde jsou nalézány zajímavé a využitelné vlastnosti, a tudíž nelze na tyto látky pohlížet jen jako na mykotoxiny. Hranice mezi užitečností a toxicitou může být však značně úzká, jako je tomu i u jiných biologicky aktivních látek.

5. Závěr

Po mnoha letech od popisu prvního trichothecenu z houby *T. roseum* si dnes připomínáme tuto skupinu látek v nových souvislostech. Sekundární produkty hub mohou působit akutní i chronické otravy a stejně tak se mohou stát významnými léčivy. Přísloví s mincí o dvou stranách nás bezpochyby nutí ke snaze hlouběji a důkladněji těmto přírodním látkám porozumět.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. GA ČR 203/02/1417) a MSM JO6/98: 122200002.

LITERATURA

- Cole R. J., Cox R. H.: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, str. 152. Academic Press, New York 1981.
- Fang Y.: *Chemical Agents Development in USSR*, překlad z čínštiny, Alexandria Va.: Defense Technical Information Center 1983.
- Heyndrickx A. (ed.): *First World Congress: New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation, Proceedings*. State University of Ghent and the National Science Foundation of Belgium, Ghent 1984.
- Marshall E.: *Science* 275, 745 (1997).
- Zilinskas R. A.: *J. Am. Med. Assoc.* 278, 418 (1997).
- Wannemacher R. W., Jr., Wiener S. L.: *Trichothecene Mycotoxins, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* (Sidell F. R., Takafuji E. T., Franz D. R., ed.), část I: *Warfare, Weapons, and the Casualty, Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* (Zajtchuk R., Bellamy R. F., ed.). Office of the Surgeon General, Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C. 1997.
- Wannemacher R. W., Bunner D. L., Neufeld N. P., v knize: *Mycotoxins and Animal Foods* (Smith J. E., ed.). CRC Press, Boca Raton 1991.
- Velíšek J.: *Chemie potravin* 3, 205 (1999).
- Krska R., Baumgartner S., Josephs R.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371, 285 (2001).
- Bennett J. W.: *Mycopathologia* 100, 3 (1987).
- Samson R. A.: *J. Med. Mycol.* 30, 9 (1992).
- Tobin R. S., Baranowski E., Gilman A. P., Kuiper-Goodman T., Miller J. D., Giddings M.: *Can. J. Public Health* 78, 1 (1987).
- Bilal V. I.: *Fuzarii*, str. 360. Naukova Dumka, Kiev 1977.
- Chasseur C., Suetens C., Michel V., Mathieu F., Begaux F., Nolard N., Haubruge E.: *Int. J. Orthopaedy* 25, 154 (2001).
- Whetzel H. H.: *Int. Nat. Sci. Bull.* 5, 3 (1909).
- Boning K.: *Phytopathology* 6, 113 (1933).
- Koch L. W.: *Sci. Agric.* 15, 80 (1934).
- Greaney F. J., Machacek J. E.: *Sci. Agric.* 15, 377 (1935).
- Seifert K. A., Seize G. L., Savard M. E.: *Mycologia* 89, 250 (1997).
- Freeman G. G., Morrison R. I.: *Nature* 162, 30 (1948).
- Betina V.: *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Grove J. F.: *Nat. Prod. Rep.* 5, 187 (1988).
- Grove J. F.: *Nat. Prod. Rep.* 10, 429 (1993).
- Vyhlaška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb.
- Miller J. D., Trenholm H. L.: *Mycotoxins in Grain*. Eagan Press, St. Paul 1994.
- Reiss J.: *Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer, Berlin 1986.
- Franck B.: *Angew. Chem.* 96, 462 (1984).
- Kidd M. T., Hagler W. M., Qureshi M. A.: *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 17, 385 (1995).
- Richard J. L., Pier A. C., Tiffany L. H.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 40, 160 (1970).
- Wright V. F., Vesonder R. F., Ciegler A., v knize: *Microbial and Viral Pesticides* (Kursak E., ed.), str. 559. Marcel Dekker, New York 1982.
- Brian P. W., Dawkins A. W., Grove J. F., Hemmig H. G., Lowe D., Norris G. L. F.: *J. Exp. Bot.* 12, 1 (1961).
- IPCS Environmental Health Criteria, Selected Mycotoxins, str. 105. WHO, Vammala 1990.
- Watson S. A., Mirocha C. J., Hayes A. W.: *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 700 (1984).
- Bunner D. L., Neufeld H. A., Brennecke L. H., Campbell Y. G., Dinterman R. E., Pelosi J. G.: *Clinical and Hematologic Effects of T-2 Toxin in Rats*. U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (DTIC ADA158874) 1985.
- Wannemacher R. W., Bunner D. L., Neufeld N. P., v knize: *Toxicity of Trichothecene and Other Related Toxins in Rabbits and Animals*, Mycotoxins and Animal Foods (Smith J. E., ed.). CRC Press, Boca Raton 1991.
- Gilman J. C.: *A Manual of Soil Fungi*. State College Press, Ames 1957.
- Hong C. X., Michailides T. J.: *Plant Dis.* 81, 112 (1997).
- Sipiahioglu H. N., Heperkan D.: *Food Microbiology* 17, 401 (2000).
- Betina V., Vaňková M.: *Biologia* 32, 943 (1977).
- Ayer W. A., Miao S.: *Can. J. Chem.* 71, 487 (1993).
- Goderedsen W. O., Vandegal S.: *Acta Chem. Scand.* 19, 1088 (1965).
- Corley D. G., Millerwideman M., Durley R. C.: *J. Nat. Prod.* 57, 422 (1994).
- Madhyastha M. S., Marquardt R. R., Masi A., Borsa J., Frohlich A. A.: *J. Food Prot.* 57, 48 (1994).
- Bawden F. C., Freeman G. G.: *J. Gen. Microbiol.* 7, 154 (1952).
- Iida A., Konishi K., Kubo H., Tomioka K., Tokuda H., Nishino H.: *Tetrahedron Lett.* 37, 9219, (1996).
- Okazaki K., Yoshizawa T., Kimura S.: *Agric. Biol. Chem.* 53, 1441 (1989).

47. Okazaki K., Yoshizawa T., Kimura S.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 56, 523 (1992).
48. Isaka M., Punya J., Lertwerawat Y., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y.: *J. Nat. Prod.* 62, 329 (1999).
49. Scot P. M., Lawrence J. W., van Walbeek W.: *Appl. Microbiol.* 20, 839 (1970).
50. Filtenborg O., Frisvad J. C.: *Lebensm. Wiss. Technol.* 13, 128 (1980).
51. Vicam: Firemní katalog „Mycotoxin Test Kits“ 2001.
52. Springer J. P., Cole R. J., Dorner J. W., Cox R. H., Richard J. L., Barnes C. L., van der Helm D.: *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2388 (1984).
53. Engstrom G. W.: *J. Agric. Food Chem.* 26, 1403 (1978).
54. Shemyakin M. M.: *Angew. Chem.* 72, 342 (1960).
55. Gupta S., Roberts D. W., Renwick J. A. A.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1989, 2347.
56. Tamura S., Takahashi N., v knize: *Naturally Occurring Insecticides* (Jacobson M., Crosby O. G., ed.), str. 499. Marcel Dekker, New York 1971.
57. Yeh S. F., Pan W., Ong G. T., Chiou A. J., Chuang C. C., Chiou S. H., Wu S. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 65 (1996).
58. Morel E., Pais M., Turpin M., Guyot M.: *Biochem. Pharmacother.* 37, 184 (1983).
59. Engstrom G. W., DeLance J. V., Richard J. L. Baetz A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 23, 244 (1975).
60. Flesh P., Stockinger G.: *Weinwissenschaft* 42, 111 (1987).
61. Tsuno A., Kamijo M., Takemoto N., Sato Y., Ajisaka K.: *J. Antibiot.* 50, 1007 (1997).
62. Jegorov A., Havlíček V., Sedmera P.: *J. Mass Spectrom.* 33, 274 (1998).
63. Suzuki A., Kuama S., Kodaira Y., Tamura S.: *Agric. Biol. Chem.* 30, 517 (1966).
64. Kodaira Y.: *Agric. Biol. Chem.* 25, 261 (1961).
65. Suzuki A., Taguchi H., Tamura S.: *Agric. Biol. Chem.* 34, 813 (1970).
66. Pais M., Das B. C., Ferron P.: *Phytochemistry* 10, 715 (1981).
67. Ayer W. A., Pena-Rodrigues L. M.: *J. Nat. Prod.* 50, 400 (1987).
68. Buchwaldt L., Jensen J. S.: *Phytochemistry* 20, 2311 (1991).
69. Peeters H., Matha V., Roberts D. W.: *Proc. Int. Conf. Biopesticides, Theory and Practice* (Jegorov A., Matha V., ed.), str. 169. ČSVTS, České Budějovice 1990.
70. Traber R., Hofman H., Loosli H. R., Ponelle M., Wartburg A.: *Helv. Chim. Acta* 70, 13 (1987).
71. Dowd P. F., Cole R. J., Vesonder R. F.: *J. Antibiot.* 41, 1868 (1988).
72. Jegorov A., Matha V., Hradec H.: *Comp. Biochem. Physiol. C* 35, 97 (1992).
73. Kawazu K., Murakami T., Ono Y., Kanzaki H., Kobayashi A., Mikawa T., Yoshikawa N.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 57, 98 (1993).
74. Huxham I. M., Lackie A. M., McCorkindale A. J.: *J. Insect Physiol.* 35, 97 (1989).
75. Richard J. L., Tiffany L. H., Pier A. C.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 38, 313 (1969).

M. Žabka^a and A. Jegorov^b (^a*Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, ^b*IVAX CR Co., Research Unit, České Budějovice*): **Comeback of the Fungus That Gave Name to Trichothecenes**

The investigation of mycotoxins is the topic of current concern in food production at present, when the food quality is often replaced by only quantitative criteria of production. Special attention attracts the potential use of mycotoxins in terrorist attacks. In contrast, some of the compounds can find interesting pharmaceutical use. The paper is dedicated to the 55th anniversary of discovery of trichothecenes, which were first found in the *Trichothecium roseum* fungus appearing as a natural contaminant in some agricultural commodities.