

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu-zakázka č. 2119/2012

Název projektu: Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A v séru těhotných žen v 11. týdnu těhotenství (v prvním trimestru)

Specifikace řešitelského týmu:

Odpovědný řešitel: **Doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.**

Studenti magisterského studia na PřF UHK:

Bc. Alice Urbanová, 1. r., obor Systematická biologie a ekologie

Bc. Tomáš Matys, 1. r., obor Systematická biologie a ekologie

(pro případný zástup za Bc. Alici Urbanovou)

Na projektu dále spolupracovali:

Ing. Tomáš Roubal a doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc.

1. Ing. Tomáš Roubal, vedoucí Národní referenční laboratoře pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách, Zdravotní ústav se sídlem v Hradci Králové, Centrum hygienických laboratoří, Nezvalova 958, 500 02 Hradec Králové

2. doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc., vedoucí Národního referenčního centra pro mikroskopické houby a jejich toxiny, Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum zdraví, výživy a potravin v Brně, Palackého 3a, 612 42 Brno

Celková částka požadované dotace: 163 482, - Kč

Stručný popis při řešení projektu:

Řešení projektu bylo zaměřeno do sledování mykotoxinu ochratoxinu A (OTA).

Význam a výskyt ochratoxinu A

Mykotoxin ochratoxin A je společně s mykotoxiny - deoxynivalenolem (DON), aflatoxiny, fumonisin, dále zearalenonem pokládán za zemědělsky nejvýznamnější, jako kontaminant surovin, potravin a krmiv působí významné ekonomické ztráty. Navíc však, vzhledem k významným toxickým účinkům, představuje významné riziko pro lidské a zvířecí zdraví. Do lidského organismu se dostává především přívodem potravinami- a to i přes to, že jeho obsah v potravinách v EU je legislativně regulován.

Toxicita ochratoxinu A

Významné jsou jeho toxické účinky-např. nefrotoxické, hepatotoxické, neurotoxické, genotoxické, mutagenní a karcinogenní, ale také velmi významné *embryotoxické* a *teratogenní*. Především se jedná o významný nefrotoxin s karcinogenním účinkem (zatím dle klasifikace IARC WHO 1993: skupina 2 B, možný karcinogen pro člověka). V současnosti se diskutuje problém - zda OTA není přímý genotoxin (tj.přímo reagující

s DNA za vzniku aduktů) a dokonce „kompletní karcinogen“, tj. iniciátor a promotor karcinogenního procesu.

Proto je zapotřebí, aby expozice ochratoxinu A byla co nejnižší právě u těhotných žen v prvním trimestru těhotenství, které je z hlediska vývoje plodu rizikovější. V roce 1979 Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA: Food and Drug Administration) definoval kategorie rizik v těhotenství a do skupiny C zařadil léčiva nebo i látky s teratogenními či embryocidními účinky u zvířat, i přesto, že nebyly provedeny žádné kontrolované studie u žen. Přesně do této skupiny spadá také ochratoxin A.

Hodnocení expozice OTA

Je známo, že hodnocení dietární expozice OTA a jeho možného zdravotního rizika pro člověka lze s výhodou provést pomocí sledování s využitím tzv. *biomarkerů expozice*, mezi které patří např. *stanovení OTA v krevním séru*, jako indikátoru tzv. *vnitřní dávky*, která se již dostala do organismu, proto toto stanovení bylo ve studii upřednostněno.

Odběr vzorků a jejich laboratorní zpracování

Jednalo se o projekt experimentálního charakteru. Vzorky krevních sér od těhotných žen z Vč. regionu byly získány jako zbytkové po odběru vzorků na screening Downova syndromu. Bylo s nimi pracováno naprosto anonymně, pouze jim byla přidělena čísla 1-100. V rámci této pilotní studie byly postačující informace o věku těhotných. V několika dřívějších studiích realizovaných ve světě bylo zjištěno, že množství OTA v krvi plodu je 2 x vyšší ve srovnání s mateřským sérem. Navíc bylo také jednoznačně prokázáno, že OTA přechází aktivním transportem placentou. Dvě výzkumné studie také potvrdily možná rizika plynoucí z expozice OTA v podobě možných kongenitálních defektů a zvýšených rizik spontánních potratů. Proto je nezbytné minimalizovat expozici OTA u těhotných žen všeobecně, zejména však v prvním trimestru těhotenství, které je klíčové pro rozvoj plodu. Séra těhotných žen ve věku mezi 19-40 roky byla prioritně sbírána pro screening Downova syndromu. Zbylá séra pak byla uložena do plastových kontainerů a zmrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Během letních měsíců byla séra postupně rozmrazována a bylo v nich provedeno stanovení ochratoxinu A metodou HPLC s fluorescenční detekcí - po předchozí extrakci a následném vyčištění na imunoafinitních kolonkách (OCHRAPREP®, R-Biopharm, Německo). Parametry FLD byly $\text{Ex}=333\text{ nm}$ a $\text{Em} = 465\text{ nm}$. Analýzy vzorků byly provedeny v Národní referenční laboratoři pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách, která je navíc pod č.1388 akreditována jako součást ZÚ HK u Českého institutu pro akreditaci (nyní ZÚ Ústí nad Labem, regionální pracoviště Hradec Králové).

Další vysvětlení

Pokud se týká nákladů za služby ZÚ HK, tak uvádím následující informaci, že NRL ZÚ HK si běžně normálně účtuje za provedení komplexních analýz ochratoxinu A částku 2 000,- Kč/za 1 vzorek (+ DPH), tj. celková cena ve výši 112 000 Kč + 28 000 Kč DPH byla téměř poloviční ve srovnání s ceníkovou cenou.

Cena byla významně levnější, protože řešitel chodil na uvedeném úkolu pracovat do národní referenční laboratoře /NRL/. Do NRL chodila dle časových možností, které byly

bohužel omezené, také studentka, Bc. Alice Urbanová, která po dobu řešení projektu, mívala často terénní praxi, proto se plně nezapojila a ani nemohla zapojit do řešení úkolu na separacích ochratoxinu A z lidských sér, tak do vlastních HPLC analýz ochratoxinu A v rozsahu a ani v časovém termínu, jak si řešitel původně představoval. Zde jsme byli navíc časově limitováni - jak ze strany ZÚ HK, do kdy musíme práci udělat - vzhledem k množství analýz, které se v NRL provádí, tak ze strany organizátorů World Mycotoxin Forum – a to termínem zaslání posteru do 1. srpna 2012 (viz www.WMFmeetsIUPAC.org- World Mycotoxin Forum - WMF® and IUPAC: deadline for submission 1 August 2012; notification of acceptance 15 September 2012). V červenci 2012 byla navíc studentka na zahraniční dovolené, kterou již měla zaplacenou dříve a tudíž se práce nedala v uvedenou dobu dodělat a v uvedenou dobu bylo třeba mít již podklady připraveny a poster na WFM kompletovat. *To vedlo řešitele k závěru nevyplatit studentce původně naplánované stipendium ve výši 3 000 Kč.* (Pozn.: V praxi lze při řešení jiných projektů, např. v rámci MZ ČR- IGA - Interní grantové agentury, po příslušném zdůvodnění a odsouhlasení provést změnu, navíc se nejednalo o vysokou finanční částku). Zastupující student, Bc. Tomáš Matys, se prací nakonec fyzicky nezúčastnil, i když mu na začátku studie byly zakoupeny osobní ochranné pomůcky (boty, košile, kalhoty a plášť) – a to taky z důvodu častých terénních praxí. Student nemusel být očkován proti hepatitidě, byl očkován již dříve.

Výsledky

Výsledky stanovení ochratoxinu A v krevním séru těhotných žen ve věku 19-40 let jsou sumarizovány v prvním řádku v Tab. 1.

OTA incidence n/n ⁺ (%)	Rozsah min/max (µg/l)	Průměr^b (µg/l)	Medián^b (µg/l)	90 % Percentil^b
100/96 (96 %)	0,10/0,35	0,15	0,13	0,24
67/53 (79,%)	0,10/0,70	0,17	0,10	0,30

Vysvětl.: n, počet vzorků; n+: počet pozitivních vzorků (OTA kontaminace $\geq 0,1 \mu\text{g/l}$); (%): procento pozitivních vzorků; b: koncentrace OTA $< 0,1 \mu\text{g/l}$ započítány do výsledků – jako polovina meze stanovitelnosti (LOQ) = $0,05 \mu\text{g/l}$ (dohodou – v souladu s výsledky Monitorováním ochratoxinu A v krevním séru dárců krve v ČR – v gesci SZÚ Praha). Pozn.: ve 2. řádku: kontrolní skup. krevních sér ženských dárců krve (které nebyly těhotné), získaná v rámci monitoringu, řízeného SZÚ.

Návratnost metody se pohybovala v rozsahu 82 – 86 % pro koncentrace OTA 0,5 – 1, 0 µg/l krevního séra. Průměrná relativní standardní odchylka opakovatelnosti (RSDr) činila 3,1 %. Mez stanovitelnosti (LOQ) pro OTA v krevním séru byla 0,1 µg/l. Výsledky byly statisticky zpracovány v programu EXCEL.

Závěr:

V žádném ze 100 analyzovaných vzorků nebyl prokázán pozitivní výsledek na Downův syndrom, proto nemohla být provedena ani statistická korelace.

Pokud by se prokázalo, že ochratoxin A je přímý genotoxin, který reaguje s DNA za tvorby aduktů a pokud by se skutečně definitivně potvrdilo, že ve fetálním séru je 2 x vyšší hladina OTA ve srovnání s mateřským sérem, pak uvažovaná průměrná koncentrace OTA ve

výši cca 0,30 µg/l, by mohla představovat poměrně vysokou negativní zátěž pro plod, protože zcela jistě v séru se vyskytují další mykotoxiny a jejich metabolity, případně další cizorodé kontaminanty, které by mohly na plod např. spolupůsobit synergicky (souhlasně) – ve smyslu buď součtu toxických účinků, nebo dokonce možné potenciace (zesílení) účinků, což je u těhotných žen a z hlediska rozvoje plodu naprosto nežádoucí.

Z hlediska zde prezentovaných výsledků u člověka se jednalo o první studii v bývalém Československu a v EU i celosvětově teprve o čtvrtou studii.

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení:

Již realizovaný výstup:

1) Získané výsledky výzkumu č. 219/2012 byly prezentovány (autorů František Malir, Vladimír Ostry, Tomas Roubal, Vladimír Dvorak a Alice Urbanova) ve formě posteru (P70) a dále příspěvku ve Sborníku abstraktů WFM, 2012, s.151-152 - s názvem: „The Level of Ochratoxin A in Blood Serum of Pregnant Women in the Czech Republic“ na 7. Konferenci of The World Mycotoxin Forum[®] (WFM) and XIIIth IUPAC International symposium on Mycotoxins and Phycotoxins v Rotterdamu v Holandsku, konaného ve dnech 5.- 9. 11. 2012 (Příloha č.1a). Jde o nejvýznamnější celosvětovou akci z oblasti sledování plísní a mykotoxinů, konanou vždy pouze 1x /2 roky. Konference se zúčastnilo přes 450 odborníků z více než 35 zemí světa. Z České republiky se konference a sympózia zúčastnil doc. František Malíř (Univerzita Hradec Králové), doc. Vladimír Ostrý (SZÚ, CZVP Brno) a prof. Jana Hajšlová (VŠCHT, Praha).

Mezinárodní konference měla velmi obsáhlý program, který byl kombinací přednášek, posterových prezentací, workshopů a „round table“ diskuze. Celkem bylo předneseno odborníky 107 přednášek a bylo presentováno 211 posterů.

Pozn.: Navíc účast na této odborné akci byla ještě využita i pro Projekt OP VK „Inovace studijních oborů zajišťovaných katedrami PřF UHK“, Registrační č. CZ.1.07/2.2.00/28.0118 a získané informace byly zapracovány, jako samostatná kapitola do skript autorů: F. Malíř, V. Ostrý - s názvem: Přírodní toxiny, která jsou významnou studijní podporou.

Řešitel SV 2119/2012 se obrátil na Dr. Hanse van Egmonda, jednoho z hlavních garantů a organizátorů WFM - do Holandska – zda tato velmi významná konference nebude začleněna do databáze Web of Science (jako tomu bylo v roce 2005). Dr. Van Egmond sdělil, že nebude, ale, že mají záměr publikovat v srpnu 2013 speciální číslo do časopisu World Mycotoxin Journal (s IF cca 1,4) a do kterého *však budou vzhledem k prezentovanému rozsahu (107 přednášek a 211 posterů) vybrány pouze některé příspěvky*. Řešitel projevil zájem o publikaci článku, ale to neznamená, že bude vybrán. Je pravděpodobné, že budou v časopise spíše prezentovány přednášky (korespondence doložena- viz příloha č.1b). V případě, že tomu tak nebude, tak budou výsledky a výstupy připraveny a odeslány do jiného časopisu, pravděpodobně do „Biomarkers“ s IF v rozsahu 2,1-2,3 (kde řešitel v roce 2012 úspěšně publikoval) - a to nejpozději do září 2013.

2) Navíc řešitel s kolektivem publikoval v dalším sborníku s ISBN- a to: Malir, F., Ostry, V., Roubal, T., Urbanova A. (2012). Biomonitoring of ochratoxin A in the light of international comparison. In. Sborník sdělení z Konference s mezinárodní účastí Mykotoxiny 2012 (Bratislava, 18.-19.10.2012), VŠCHT Praha, 42-59, ISBN 978-80-7080-764-4.

Společně s ing. Dvořákem, PhD řešitel provedl navíc ELISA stanovení ochratoxinu A v krevních sérech. Získané výsledky, naměřené jak HPLC, tak ELISA byly odeslány docentu Dohnalovi z KChem, Př.F včetně podrobné dokumentace a již částečně předpřipraveného článku v angličtině, společně s dalšími literárními podklady. Kolega Dohnal se zabýval jako analytik také chemometrií, proto provede porovnání výsledků, získaných oběma metodami a článek bude odeslán pravděpodobně do časopisu Analytical Letters / IF cca 1,016/- (korespondence doložena- viz příloha č.2 ze 7.9.2012) – nejdéle opět do září 2013.

Čerpání finančních prostředků v Kč

Položka	Plán	Skutečnost
Stipendia	3 000	0 * (nakonec nepřiděleno - vysvětleno v textu)
Odměny a DPP, DPČ	0	0
Zákonné zdravotní a sociální pojištění	0	0
Celkem osobní náklady	3 000	0
Spotřeba materiálu celkem	0	0
Drobný hmotný a nehmotný majetek	6 302	5 936
Služby celkem	141 080	140 509
Cestovné celkem	13 100	14 541,13
<i>Mezisoučet</i>	163 482,- Kč	160 986,13 + 199,95 = 161 186,08 - 0,25 = 161 185,83
Kancelářský materiál	0	2 611
Náklady	163 482,- Kč	163 796,83^{*vys}

**Vysvětl...: Celkové náklady byly překročeny o částku ve výši 314, 83 Kč.*

Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka (např. vyšlo, přijato, v redakčním řízení apod.
Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	1	0	
Z toho studenti	1	0	
Počet dizertačních prací	0	0	
Počet diplomových prací	1	1	
Zařazeno do kategorie excelence	-	-	* mohlo by být zařazeno do této kategorie, protože se jedná teprve o 4. studii v EU i ve světě
Jimp - výstup v impaktovaném časopisu	2	0	* bude teprve realizováno – podrobně viz text
J – ostatní odborná periodika	0	0	
B – odborná kniha	0	0	
C – kapitola v odborné knize	0	0	
D – článek ve sborníku	1	2	
+ poster na celosvětové konferenci	1	1	
F – užitný vzor aj.	0	0	

Hradec Králové, dne 3.1. 2012

doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu-zakázka č. 2119/2012

Počet příloh – celkem 5 :

Příloha č.1a:

Poster s názvem: „ The Level of Ochratoxin A in Blood Serum of Pregnant Women in the Czech Republic“ na 7. konferenci “ The World Mycotoxin Forum[®] (WFM)” v Rotterdamu
Příspěvek s názvem: „ The Level of Ochratoxin A in Blood Serum of Pregnant Women in the Czech Republic“ ve Sborníku 7. konference “ The World Mycotoxin Forum[®] (WFM)”

Příloha 1b:

Obsah komunikace z 11.12. 2012 s Dr. Hansem van Egmondem, jedním z hlavních organizátorů WFM v Holandsku - ohledně publikace do World Mycotoxin Journal (s IF cca 1,4), který by měl vyjít v srpnu 2013.

Příloha č. 2:

Obsah komunikace ze 7.9. 2012 s docentem Dohnalem, ohledně publikace do impatovaného analytického časopisu, ve kterém by měla být publikováno srovnání HPLC stanovení ochratoxinu A v séru a ELISA stanovení ochratoxinu A v séru (podrobněji-viz text nahoře)

Příloha č. 3:

Konečná výsledovka v systému MAGION

Příloha č. 4:

Žádost o změny ve struktuře rozpočtu z 31.10. 2012:

- a) žádost o neproplacení stipendia ve výši 3 000,-Kč pro Bc. Alici Urbanovovou (z důvodu podrobně vysvětleném v textu závěrečné zprávy);
- b) převod kompletní částky za ubytování na akci v Holandsku z projektu PřiFino - na projekt SV č. 2119;
- c) povolení čerpání cestovního na Workshop do Brna (problematika ochratoxinu A);
- d) žádost o zakoupení kancelářského materiálu.

Příloha č. 5:

Publikace ve sborníku VŠCHT Praha s ISBN:

Malir, F., Ostry, V., Roubal, T., Urbanova A. (2012). Biomonitoring of ochratoxin A in the light of international comparison. In. Sborník sdělení z Konference s mezinárodní účastí Mykotoxíny 2012 (Bratislava, 18.-19.10.2012), VŠCHT Praha, 42-59, ISBN 978-80-7080-764-4.

doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.