

MIKOTOKSINI I »ŽUTA KIŠA«

T. Beritić

Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb

Primljeno 4. I. 1988.

Mikotoksikologija intenzivno razvija se. No, ne smotri na značajniji progress, v nej ostaetsja, po-vidimomu, vse že boljše nerešenjih voprosov, čem rešenjih.

V.A.Tuteljan i L.V. Kravčenko, 1985. (1).

At the present, false allegations cannot be disproven; true allegations cannot be verified particularly if the agent in question happens to be a substance which may or may not occur naturally.

H.B.Schiefer i R.G.Sutherland, 1984. (2).

Iznosi se kratki povijesni prikaz uloge mikotoksina u humanoj patologiji i doprinosa hrvatskih znanstvenika na području mikotoksikologije. Prikazani su oprečni stavovi u svjetlu tehničkih mogućnosti i etičke odgovornosti za zlorabu mikotoksina kao biološkog oružja s naročitim osvrtom na navodnu primjenu kao dijela nedavnog kemijskog ratovanja u borbama na Srednjem i Dalekom istoku. Opisana je »Žuta kiša« kao prirodni fenomen.

Mikotoksini su odavno poznati čovjeku. Treba se samo podsjetiti ergotizma ili »vatre Sv. Antuna«, »ignis sacera« (zbog žarećih parestezija i zavjeta svecu), najstarije poznate vrlo teške mikotoksikoze koja je Evropom poput pošasti harala u srednjem vijeku (3) posebno u desetom i jedanaestom stoljeću, a u SSSR-u 1926/1927. g. izazvala epidemiju s oko 11.000 oboljelih (4), pa čak još i u »naše vrijeme« (1951) dovela do masovnog obolijevanja u Pont St. Espritu u Francuskoj (5). Kada se već na ražinu plijesan *Claviceps purpurea* i na njezin trajan micelij *Secale cornutum* počelo zaboravljati kao na izvor prirodnih otrovanja, došlo je iznenada 1960. g. do spoznaje da su stotine tisuća purana, pačića i druge peradi uginule zbog hranjenja dopunskim krmivom od brašna dobivenog od brazilskog kikirikija kontaminiranog inače dugo poznatom plijesni *Aspergillus flavus*.

Perad je bila smrtonosno otrovana toksičkim metabolitom, tek tada izoliranim aflatoksinom (a-fla-toksin). Ta se saznanja »mogu smatrati fitiljem koji je zapalio eksploziju istraživanja« aflatoksina (6), ali i drugih mikotoksina. Otada se »promijenila kontrolna strategija u čitavom opsegu mikotoksina« (7): s područja veterinarske medicine i poljoprivrede mikotoksikologija je prodrila i u humanu patologiju, javno zdravstvo i preventivnu medicinu, o čemu svjedoči nepregledni broj tekućih publikacija.

Iz velikog broja mikotoksina danas treba posebno izdvojiti uglavnom tri njihova predstavnika: aflatoksine zbog njihove hepatotoksičnosti i hepatokarcinogenosti, okratoksine (iz *Aspergillus ochraceus*) zbog sumnje na njihovu povezanost s balkanskom endemskom nefropatijom i trihotecene, mikotoksine što ih stvaraju plijesni roda *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* i dr. (8) zbog povremenih epizootija i epidemija, ali naročito zbog spornih tvrdnji oko njihove zloupotrebe u kemijsko-biološkom ratovanju.

Aflatoksini se kao opasni metaboliti plijesni i kod nas — zahvaljujući radovima *Durakovića i suradnika* (6, 9–15) — vrlo intenzivno proučavaju, naročito s obzirom na različite uvjete njihove biosinteze, pa i varijabilnosti toksičkog i mutagenog potencijala. Posebno je pak za našu zemlju zanimljivo proučavanje okratoksina u okviru mikotoksinske etiologije endemske nefropatije (16–18).

S obzirom na biološke učinke vrlo su značajni a manje poznati trihoteceni, koji su, čini se, najbolje proučeni u SSSR-u i Japanu. Prema navodima *Tuteljana i Kravčenkina* (1) na području SSSR-a je već 1882. g. zabilježena »toksikoza ot pijanog hleba« među domaćim životinjama, ali i među ljudima. Slična je i tzv. Akababi-toksikoza, prvi put opisana u Japanu 1890. g. Klinička slika obih tih mikotoksikoza je slika otrovanja hranom (kratka anamneza, povraćanje, proljevi, jake glavobolje itd.). Mnogo je teža pa i bolje upoznata »alimentarna toksična aleukija« koja se javila u SSSR-u u više epidemija (1932–1934, 1944–1945, 1952, 1953, 1955), a nastaje uzimanjem hrane pripremljene od ozimog zrna pšenice (1). Kod te mikotoksikoze dominiraju patološke promjene u usnoj šupljini, jednjaku, želucu, popraćene napadnom leukopenijom pa i krvarenjima. Trihotecenima su uzrokovane i stahibotriotoksikoza također preko kruha infestiranog plijesni *Fusarium graminearum*, *F. poae* i *F. sporotrichoides* te dendrodohiotoksikoza (*Dendrodochium toxicum*).

S obzirom na to da su trihoteceni vrlo otrovni mikotoksini potrebno ih je, za razumijevanje problema, nešto pobliže upoznati. To je danas već moguće jer su znatno proučeni: zbog snažnih bioaktivnih potencijala metaboliti plijesni su uopće (osobito nakon otkrića penicilina) postali vrlo privlačni za različita terapijska, onkološka, toksikološka, veterinarska i agrikulturna mikološka ispitivanja. Trihoteceni su kemijski seskviterpenoidi s karakterističnim 12,13-epoksi-trihotecenskim jezgrama, svrstani u četiri kategorije (A–D) već prema sličnosti funkcionalnih grupa i fungalnog porijeklu (8). Otkriveno ih je već preko 60 jer su oni metabolički produkt, dakle metaboliti posve obične, gotovo ubikvitarne plijesni, već spomenutih vrsta fuzarija. Ipak sve te plijesni ne proizvode trihotecene (20), pogotovo ne iste, a niti u istim količinama (19), niti pod istim uvjetima. One se, međutim, mogu na to »prisiliti«: kao i za sve gljive i gljivice tako je i za njihove mikroskopske predstavnike — funge ili plijesni — za rast i metabolizam potreban optimalni odnos vlage i temperature. Kada se još k tome odabere i prikladan hranidbeni

medij ili supstrat, moguće je smišljenim selekcijama podloge ili pak genetskom mutacijom ravnati, gotovo »diktirati« proizvodnjom metabolita, a to znači i mikotoksina. Primjer zato su upravo trihoteceni: ako su prisutni u nekom prirodnom miljeu, nađe ih se u nanogramima na gram količinama, dok se u laboratoriju relativno lako proizvedu u gramima na litru. No tako su otrovni da im je za većinu sisavaca smrtonosna doza u miligramima pa i u mikrogramima na kilogram tjelesne težine. Razumije se, dakle, da su nesmrtonosna obolijevanja uzrokovana mnogo manjim dozama. Nema velikih razlika u otrovnosti prema putu apsorpcije, makar se tvrdi (8) da je jednom od najotrovnijih trihotecena (T–2 toksin, predstavnik kategorije A zajedno s HT–2 toksinom, diacetoksiscirpenolom DAS i dr.) otrovnost osobito visoka kada se apsorbira preko kože i respiratornih sluznica. Mikotoksini nivalenol, deoksinivalenol (EDON, vomitoksin) i njihovi derivati (pripadnici kategorije B) često se otkriju u ječmu, pšenici, u kukuruzu i drugim žitaricama (*F. graminearum*). *Stachybotrys atra* se često otkrije u celulozom bogatom supstratu kao što je sijeno i slama a stvara satratoksin (H i G) te druge makrocikličke trihotecene koji se smatraju apsolutno najtoksičnijima (kategorija D) (8).

Sredinom prošlog desetljeća počele su kolati priče, većinom iz izbjegličkih krugova i nepouzdanih izvora, da se u Jugoistočnoj Aziji upotrebljavaju mikotoksini kao oružje terora i metoda kemijskog ratovanja. To su bile neproverene informacije unutar međusobnih optužbi iz »hladnog rata«, pa je problem zapravo imao više političke nego medicinske implikacije. Međutim, na konferenciji za tisak održanoj 13. rujna 1981. u Berlinu, tadašnji američki ministar vanjskih poslova Alexander Haig rekao je doslovce: »Sada imamo čvrsti dokaz da se takvo oružje upotrebljava u Jugoistočnoj Aziji« (19). »Čvrsti dokaz« je bio nalaz mikotoksina trihotecena u uzorcima »žute kiše« što su ih iz Laosa donijeli bjegunci tvrdeći da od te »žute kiše« naglo obolijevaju borci i pučanstvo koje pruža otpor vijetnamskim agresorima.

Ondonda su se oblikovala dva oprečna stava pa i dva suprotna tabora. Polemika se vodila (i još se uvijek vodi) na stranicama dvaju poznatih, ekskluzivno znanstvenih tjednika »Science« i »Nature«, ali ne, kako bi se očekivalo, među političkim i vojnim protivnicima, nego unutar jedne strane, samo na Zapadu. Jedni tvrde i dokazuju da je pojava mikotoksina u fenomenu »žute kiše« prirodna, dok drugi pridonose dijelom i dramske dokaze da je riječ o bojnim otrovima.

Naziv »žute kiše« («Yellow rain« i »la Pluie Jaune« u francuskom jezičnom području »Indokine«) potječe od kmerskih izbjeglica koji tako nazivaju vlažnu ljepljivu tvar koja se navodno sipa iz aviona nad selima poput kiše. Prvi su, međutim, opisali »žutu kišu« Kinezi (21,22) u dolini rijeke Yang, pa su oni postavili teoriju da je žuta kiša masa pčelinjih fekalija. U Jiangsu je 1976. g. pojava »žute kiše« trajala nekoliko minuta, a pokrila je područje od 0,5 do 20 hektara. Kapi odnosno mrvice su ostavljale žute pjege veličine 2–6 mm. Kineski autori smatraju da je to zapravo pelud iz pčelinjih fekalija. Ne zna se točno zašto ali u umjerenim klimatskim pojasima pčele poduzimlju te masovne defekacijske letove koje neki autori nazivaju »cleansing runs«, dakle purgativni pohodi, prvih toplih dana proljeća vjerojatno da se očiste ili riješe fecesa stvaranog za vrijeme hibernacije. Činjenica je, međutim, da sinkronizirano defeciraju. Takvi su masovni defekacijski letovi pčela bili opisani već u njemačkoj literaturi prije 30 godina (23, 24). I mrljice »žute kiše« i pčelinje fekalije sadrže uglavnom pelud, ali ni na istom listu stabla dvije mrlje

nemaju isti sastav peludi (22). Rosen (25) je, izvršio analizu »žute kiše« na trihotecene koju su sakupili kmerski borci kao uzorak, pa je našao relativno visoke količine: 48 ppm T-2 toksina, 42 ppm DAS, 58 ppm DON i 265 ppm zearalenona. U istom uzorku je, međutim, našao i sintetski spoj polietilenglikol (PEG) koji se, između ostalog, upotrebljava za raspršivanje insekticida iz aviona te za sintezu emulzifikatora za inkorporiranje u vodi netopljivih materijala (kao što su trihoteceni) u akvatičke medije (kad bi se za to, naime, upotrijebila organska otapala moglo bi doći do eksplozije aviona).

Glavni američki oponent teorije »žute kiše« kao kemijskog oružja, biokemičar s Harvarda M. Meselson je sa dva entomologa, specijalizirana za pčele, boravio u džunglama Tajlanda u rano proljeće 1984. g. pa je i sam doživio »žutu kišu«. Na konferenciji za tisak 28. ožujka 1984.g. opisao je taj doživljaj i ponovio svoje uvjerenje da je riječ o posve prirodnoj pojavi — pčelinjem defekacijskom letu (»cleansing flight«). Pčelinje su fekalije, po njihovu opisu, također vlažne i ljepljive točno onako kako se to opisuje za »žutu kišu« (26—28). Od sedam uzoraka tri su bila pozitivna na trihotecene, ali četiri nisu, pa *Meselson i Seeley* (27) zaključuju da su pozitivni uzorci mogli biti i prirodno kontaminirani. I za Rosenov nalaz (25) polietilenglikola (PEG) također pretpostavljaju da je posljedica kemijske kontaminacije prilikom transporta odnosno opreme uzorka.

Jedan od najjačih dokaza za trihotecene bio bi njihov nalaz u krvi, mokraći i fecesu otrovanih ljudi. *Pauser i suradnici* (29) su u Beču liječili 10 bolesnika prebačenih iz Teterana zbog otrovanja bojnim otrovima i sumnje da je riječ o binarnim (dvostrukim) otrovanjima. Za te je bolesnike analize vršio prof. Heyndrickx iz Ghenta (Belgija) pa njegov nalaz autori citiraju: »Rezultati analize krvi, mokraće i fecesa potvrđuju da su otrovni kombinacijom od najmanje dva bojna otrova, iperitom i mikotoksinima (sastojcima »žute kiše«). Nađene količine su vrlo visoke i smrtonosne, a poznato je da su ti otrovi i u vrlo malim količinama izvanredno otrovni za čovjeka«.

Kolikogod su zbog nalaza PEG u »žutoj kiši« mogli trijumfirati pobornici teorije da »žute kiše« kriju bojne otrove, toliko su protivnici trijumfirali pozitivnim nalazom trihotecena u krvi boraca: budući da trihoteceni imaju vrlo kratki (nekoliko sati) biološki poluživot (28) pozitivan nalaz još i mnogo dana nakon navodne primjene bojnog otrova govori o nekoj drugoj vrsti ekspozicije, vjerojatno o dugotrajnijoj prirodnoj kontaminaciji — makar time još nije isključena i neka artificialna trajna kontaminacija okoliša.

Kada se odvagnu svi dokazi i protudokazi moglo bi se — po mojem mišljenju — pretpostaviti ove mogućnosti otrovanja: a) da se otrovani truju prirodno kontaminiranim pčelinjim fecesom (trihoteceni u fecesu pčela) bez »neprijateljske ruke«; b) da se otrovani truju neovisno o bilo kakvoj »žutoj kiši« tj. inače prirodno kontaminiranom hranom (trihoteceni u ljudskom biološkom materijalu); c) da je pčelinja »žuta kiša« na neki način umjetno infestirani pčelinji feces (polietilenglikol u uzorcima »žute kiše«), i d) da je »žuta kiša« umjetno infestirana pelud bačena iz aviona, bombom, artiljerijskim ili drugim oružjem (dakle neovisno o pčelama). Međutim, ostaje još niz otvorenih pitanja koja su ne samo od medicinske važnosti nego i od strateške, npr. kako se »neprijatelj« štiti od mogućnosti otrovanja vlastitih boraca, što je, posebno u partizanskom načinu ratovanja, jedva moguće.

Zbog razmimoilaženja i nedoumica, a pogotovo zbog sve češćih upozoravanja, optužbi pa i dokazivanja o upotrebi bojnih otrova u ratu u Jugoistočnoj Aziji, u Perzijskom zaljevu, pa čak i u Afganistanu, sazvan je »Prvi svjetski kongres o novim spojevima u biološkom i kemijskom ratovanju i o njihovoj toksikološkoj ocjeni« koji je održan od 21. do 23. svibnja 1984. g. u Ghentu. Nedavno objavljeni Zbornik s tog kongresa (30) sadrži sve te zanimljive priloge a većina se, naime, referata odnosi na trihotecene odnosno na binarne bojne otrove (kombinirane dvije vrste otrova, npr. tabun i trihoteceni) upotrijebljene u iračko-iranskom ratu. Kongres je organizirao, otvorio i zbornik uredio prof. A. Heyndrickx uz pomoć sveučilišta u Beču, Münchenu, Hamburgu, Essenu i Lausanni. Održavanje tog kongresa upravo u Belgiji je — po njegovim riječima — neka vrsta počasti zemlji koja je najteže stradala od bojnih otrova u prvom svjetskom ratu (30). Sličnu je misao izrazio na početku svog znanstvenog izlaganja i Kanađanin Schiefer (2) podsjetivši da su pukim slučajem upravo kanadski vojnici 1915. g. pretrpjeli najteže gubitke kao prvi na udaru bojnih plinova. Treba naročito istaknuti da su Kongresu prisustvovali »najači« predstavnici »obaju tabora« kao i evropski kliničari koji su liječili otrovane borce iz iransko-iračkog rata. Svi su oni očito bili svjesni upozorenja što ga je Schiefer uputio u jednom pismu tjedniku »Science« (31), da dvojbe oko žute kiše i mikotoksina neće riješiti »ni retorika ni skepticizam... već samo striktno-znanstvene činjenice« (»... hard scientific facts...«).

Da završim: ako je doista moguće ubaciti mikotoksine na bilo koji način, a osobito na takav koji posve uvjerljivo oponaša prirodne fenomene, onda je čovjek pronašao jedno od najpodmuklijih i najopasnijih sredstava kemijsko- biološkog ratovanja, o kojem — zlu ne trebalo — mora i službena toksikologija našoj medicini općenito, a javnom zdravlju posebno, dati bar neke osnovne podatke. Ne bi bilo, naime, dostojno ni naših pregnuća ni naših dostignuća da nam medicina, kao mnogo puta dosada, bude upućena na manje ili više neuka izlaganja iz dnevnog tiska.

LITERATURA

1. Tuteljan VA, Kravčenkov LV. Mikotoksini (ruski). Medicina, Moskva, 1985.
2. Schiefer HB, Sutherland RG. Problems associated with verification of alleged CBW use in Southeast Asia, Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.
3. Gloag D. Contamination of food: mycotoxins and metals. Brit Med J 1981;282:879–82.
4. Wirth W, Hecht G, Gloxhuber Ch. Toxikologie Fibel, Stuttgart: Thieme, 1972.
5. Medicinska enciklopedija: Ergotizam. Zagreb: Leksikografski zavod 1967.
6. Duraković S, Duraković Z, Duraković A, Beritić T, Pospisil O, Delaš F. Effect of temperature and moisture on growth and aflatoxin formation by fungi cultivated on corn, Period Biol 1987;89:45–52.
7. World Health Organization. Mycotoxins. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization 1979.
8. Ueno Y, Muto A, Kobayashi J. Toxicological properties of T–2 toxin and related trichotecenes. Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.

9. Duraković S, Duraković Z, Pospišil O. Aflatoksin i jetra. Arh hig rada 1975;26:283–95.
10. Duraković S. Utjecaj mješovitih kultura plijesni s površine žitarica na biosintezu aflatoksina s pomoću plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1981.
11. Duraković S, Beritić T, Velikonja J. Biosynthesis and Biodegradation of Aflatoxin B1 and G1 on Maize Contaminated with Common Field and Storage Fungi. Acta Biologica Jugoslavica, Mikrobiologija, 1984;21:23–37.
12. Duraković S, Pospišil O, Velikonja J. Biosinteza aflatoksina B1 i G1 tijekom rasta plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 u čistoj i mješovitoj kulturi pri različitim temperaturama. Arh hig rada toksikol 1984;35:159–66.
13. Duraković S, Duraković Z, Beritić T, Radić B, Lalić LjM, Delaš F. Biosynthesis of Aflatoxins by *Aspergillus parasiticus* on roasted coffee beans. Period Biol 1985;87:503–9.
14. Duraković S, Beritić T, Duraković Z, Pospišil O, Delaš F, Radić B. The Relationship between Mold Biomass and the Biosynthesis of Aflatoxins in Pure and Mixed Culture, Prehrambeno-tehnol rev 1985;23:81–6.
15. Duraković S, Radić B, Duraković Z, Brečević Lj, Pospišil O. The Relationship between *Trichothecium roseum* and *Aspergillus parasiticus* and the Production of Aflatoxins. Arh hig rada toksikol 1986;37:3–17.
16. Pavlović M, Pleština R, Krogh P. Balkan (Endemic) Nephropathy and Foodborn Ochratoxins A: A Survey of Foodstuffs. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B 1979;87:243–6.
17. Pleština R, Pavlović M, Radić B. Incidence of contamination of Food Samples by Ochratoxin A in Endemic Region. U: »Endemic« (Balkan) Nephropathy, Niš: Univerzitet u Nišu 1981.
18. Fuchs R, Hult K, Peraica M, Radić B, Pleština R. Conversion of Ochratoxin C into Ochratoxin A *in vivo*. Appl Environ Microbiol 1984;48:41–2.
19. Wade N. Toxin Warfare Charges May Be Premature, Science 1981;214:34.
20. Greenhalgh R, Miller JD, Neish G, Schiefer HB. Mycotoxin production by thirteen fusarium isolates from Thailand, Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.
21. Chang Chung Ying, Chen Yu-ming, Chou-Shu, Li Ming. Kexue Tongbao 1977;22:409–12.(cit.22).
22. Nowicke JW, Meselson M. Yellow rain – a palynological analysis. Nature 1984;309:205–6.
23. Nitschmann J. Deutsche entomologische Z 1957;4:143–71. (cit.22).
24. Riemann G. Bienenzucht 1958;11:121. (cit.22).
25. Rosen JD. Presence of mycotoxins and a man-made material in a »Yellow rain« sample, Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.
26. Meselson M. Yellow rain: chemical warfare or natural phenomenon? Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.
27. Meselson M, Seeley TD. Press release dated 28 March 1984. Science 1984;224:138–9, Nature 1984;308:485.
28. Ashton P, Meselson M, Robinson JPP, Seeley TD. Origin of Yellow rain. Science 1983;222:366–8.
29. Pauser G, Aloy A, Carvana M. et al. Lethal intoxication by wargases in Iranian soldiers. Therapeutic interventions on survivors of mustard gas and mycotoxin immersion.Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.
30. Heyndrickx A. Editorial.Proc First World Congress New Comp in Biol and Chem Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent 1987.
31. Schiefer H.B. Facts, not rethoric on yellow rain. Nature 1983;304:10.

Summary

MYCOTOXINS AND »THE YELLOW RAIN«

A review is given of mycotoxins with a brief history of the role of these natural poisons in human pathology. Contributions of Croatian scientists to the field of research in mycotocixology are recorded. Opposite views and arguments are presented considering the technical possibilities and ethical responsibilities for abuse of mycotoxins as a war weapon especially with regard to their alleged use in the recent chemical warfare in the Middle and Far East. »Yellow Rain« is described as a natural phenomenon.

*Yugoslav Academy of Arts
and Sciences, Zagreb*