

## Potencijalna uloga mikotoksina u etiologiji balkanske endemske nefropatije

Radovan Fuchs, Radovan Pleština i Marko Šarić

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Pregled

U D K 616.61-022

Prispjelo: 8. travnja 1988.

U radu je prikazan pregled dosadašnjih istraživanja potencijalne uloge nefrotoksičnog mikotoksina okratoksina A u etiologiji balkanske endemske nefropatije, provedenih u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu.

Navedeni su rezultati mjerenja ovog mikrotoksina u hrani i krvi ljudi s endemskog područja Brodske posavine, kao i rezultati taksikoloških istraživanja na pokusnim životinjama i u in vitro uvjetima.

**Ključne riječi:** Balkanska endemska nefropatija, etiologija, mikotoksini

Od vremena kada je balkanska endemska nefropatija prepoznata kao zasebni klinički entitet, brojna istraživanja imala su za cilj razjašnjenje njezine etiologije. Cijeli niz različitih nefrotoksičnih agensa pokušavao se dovesti u vezu s nastankom bolesti. Postupno, nakon provedenih istraživanja, brojne hipoteze o etiologiji ove bolesti nisu se mogle održati i bivale su djelomično ili u potpunosti odbačene. Jedna od rijetkih, još uvijek aktualnih hipoteza, svakako je ona o ulozi nekih otrova prirodnog porijekla u nastanku balkanske endemske nefropatije.

Moguća povezanost plijesni i njihovih metabolita s nastankom endemske nefropatije počinje se spominjati šezdesetih godina.<sup>4, 1</sup> Međutim, nakon spoznaje da su promjene na bubrezima nefropata vrlo slične promjenama kod okratoksikoze životinja, posebice svinja,<sup>10</sup> mikotoksična hipoteza u etiologiji ove bolesti dobiva sve više sljedbenika. Od tog vremena Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu bavi se istraživanjima, s ciljem da afirmira ili opovrgne mikotoksičnu hipotezu u nastanku balkanske endemske nefropatije. Ovi napori bili su usmjereni u dva smjera: a) na praćenje i procjenu izloženosti stanovništva endemskih sela Brodske posavine nefrotoksičnom mikotoksinu okratoksinu A, i b) na ispitivanje toksičnosti ovog spoja prirodnog porijekla u in vitro pokusima.

Procjena ekspozicije stanovništva endemskih sela u početku istraživanja zasnivala se uglavnom na analizi okratoksina A u hrani i epidemiološkim podacima o ishrani stanovništva. Okratoksin A određivan je u namirnicama metodom tankoslojne kromatografije koju su razradili Nesheim i suradnici.<sup>12</sup> Za određivanje okratoksina ovom metodom upotrebljava se kloroform, kao otapalo za ekstrakciju, te se nakon pročišćavanja na koloni diatomejske zemlje okratoksin dokazuje pod UV-lampom s tankog sloja.

Rezultati analiza uzoraka hrane na okratoksin A u proteklom razdoblju prikazani su na **tablici 1**.

U zasebnoj studiji, analizom 760 uzoraka kruha i cerealija iz sela s endemskom nefropatijom, okratoksin A je nađen u 9,4% uzoraka. Izmjerene količine u pozitivnim uzorcima kretale su se između 7,5 i 140 µg/kg,<sup>14, 15</sup> a broj pozitivnih uzoraka zna-

čajno je varirao od godine do godine s frekvencijskom vrijednošću od 0% do 42,9%.

Razvojem analitičkih postupaka, odnosno pojavom metode za određivanje okratoksina A u biološkom materijalu, kao što su krv i različita tkiva,<sup>9, 8</sup> pružena je mogućnost direktnijeg uvida u izloženost pojedinaca ovom toksinu. U razdoblju od 1979. do 1987. godine analizirano je 13942 uzorka humanog seruma, odnosno plazme prikupljenih u toku perlustracije stanovništva endemskih sela Brodske posavine i kontrolnih područja. Rezultati su sumirani i prikazani u **tablici 2**.

U **tablici 3**, prikazane su dobivene vrijednosti analiza krvi na sadržaj okratoksina A u pojedinim endemskim selima, od 1985. do 1987. godine.

Iz navedenih podataka je vidljivo da postoje značajne varijacije nađenih koncentracija okratoksina A od godine do godine unutar istih sela. Zanimljiv je nalaz okratoksina A u krvi stanovnika kontrolnog sela Okučanski Gređani iz 1985. godine. U ovom selu nađen je veći broj pozitivnih uzoraka, međutim, uzorci krvi u ovom selu uzimani su tijekom ljetnog perioda za razliku od ostalih sela gdje su uzorci uzimani tijekom zimskog razdoblja.<sup>17</sup> Na osnovi laboratorijskih istraživanja, utvrđeno je da je produkcija toksina, bez obzira na rast plijesni, uvjetovana s nekoliko parametara od kojih su relativna vlažnost i temperatura svakako najvažniji.<sup>11, 13</sup> Zbog velikih razlika u temperaturi i vlažnosti zraka između zimskog i ljetnog perioda može se pretpostaviti da bi vrijednosti okratoksina A i u endemskim selima bile više ili čak značajno više od dobivenih da su mjerenja provedena tijekom ljeta. Dobiveni podaci, stoga, ukazuju na nužnost prikupljanja uzoraka krvi u istom godišnjem dobu u svim ispitivanim selima, a u svrhu komparacije.

Da bi se razumjelo značenje pozitivnih nalaza okratoksina A u krvi ljudi, te pojasnio mehanizam djelovanja ovog mikotoksina, započeta su istraživanja na eksperimentalnim životinjama i u in vitro uvjetima. Nakon peroralne ili intravenske aplikacije okratoksina A u koncentraciji od 50 µg/kg ribama, prepelicama, miševima, štakorima i majmunima — utvrdili smo izuzetno brzu eliminaciju toksina iz krvi riba i ptica, dok je u majmuna bilo moguće pratiti okratoksin A u mjerljivim koncentracijama

više od dva mjeseca (Fuchs i suradnici neobjavljeni rezultati). Izgleda da se u viših vrsta životinja okratoksin dulje zadržava u cirkulaciji nego u nižih vrsta. Na osnovi ovih podataka postavlja se pitanje farmakokinetike okratoksina A u ljudi. Nađene vrijednosti, posebice niske, mogu, stoga, predstavljati ostatak ekspozicije toksinu od prije više dana ili mjeseci.

**TABLICA 1.**  
**OKRATOKSIN A U HRANI**

Uzorci	Godina					
	1972.	1973.	1974.	1975.	1976.	1977/1978.
Analizirano	37	52	357	270	42	628
N	6	5	37	18	4	109
Pozitivno %	16	10	10	7	10	17

Raspon: od tragova do 50 ppb

**TABLICA 2.**  
**BRODSKA POSAVINA (15 SELA)**  
**OKRATOKSIN A U KRVI LJUDI**

	Godina									Total
	1979.	1980.	1981.	1982.	1983.	1984.	1985.	1986.	1987.	
Broj analiziranih uzoraka	408	680	550	1321	2610	2392	1865	1887	2229	13.942
Broj pozitivnih	57	45	13	31	66	36	21	32	11	312
% pozitivnih	13.9	6.6	2.3	2.3	2.5	1.5	1.1	1.7	0.5	2.2

**TABLICA 3.**  
**REZULTATI ANALIZA UZORAKA KRVI U ENDEMSKIM I NEENDEMSKIM SELIMA OD 1985. DO 1987. GODINE**

Godina	Selo	Broj uzoraka			Okratoksin A u plazmi Raspon ng/ml
		Analiziranih	pozitivnih	% Pozitivnih	
1985.	Kaniža	457	2	0,4	10—15
	Lužani	764	0	—	—
	Dubočec	269	5	1,9	10—15
	*Ok. Gređani	375	24	6,4	10—15
	Ukupno	1865	31	1,7	10—15
1986.	Kaniža	513	12	2,3	5—35
	Bebrina	357	7	2,0	5—9
	Banovci	263	4	1,5	5—8
	Šumeće	381	6	1,6	5—10
	Štupnički Kuti	373	3	0,8	5—8
	*Pod. Podgajci	401	0	0	—
Ukupno	2288	32	1,7	5—35	
1987.	Šumeće	394	3	1,7	5—35
	Banovci	240	2	1,3	5—10
	Bebrina	312	0	—	—
	Kaniža	534	1	0,1	5
	Zbijeg	341	5	1,5	5—100
	Klakar	252	0	—	—
	Jasenovac	156	0	—	—
Total	2229	11	0,5	5—100	

\*Uzroci sakupljeni u ljetnom periodu  
. Neendemska sela

Okratoksin A se u krvi nespecifično veže za albumin,<sup>2</sup> ali i za neke druge još neidentificirane makromolekule. Ovi proteini male molekulske težine vežu okratoksin A gotovo na receptorskoj razini.<sup>18</sup> Okratoksin A vezan na ovakove makromolekule može proći kroz glomerularnu membranu, te zatim procesom pinocitoze biti uvučen u stanice proksimalnih tubula. S obzirom da okratoksin A remeti proteinsku sintezu, najvjerojatnije tako da dolazi do inhibicije fenilalanin-tRNA-sintetaze,<sup>3</sup> istraživanja smo usmjerili na iznalaženje proteina bubrega, koji bi mogli biti poremećeni u početnoj okratoksikozi i koji bi mogli poslužiti kao rani znak lezije. Ispitivanja na nekim laboratorijskim životinjama, kao i na svinjama prirodno izloženim okratoksinu, ukazala su na to da djelovanjem okratoksina A dolazi do smanjenja aktivnosti fosfoenolpiruvat karboksikinaze, dok je aktivnost drugih ispitivanih enzima (gama-glutamyl transpeptidaze, glutaminaznih izoenzima, dehidrataze-delta-aminolevulinske kiseline) ostala nepromijenjena.<sup>16</sup>

Istraživanja učinaka okratoksina A u pokusnih životinja obuhvaćala su i praćenje distribucije ovog

toksina u organizmu. Neposredni cilj ovih istraživanja bio je izučavanje sudbine malih doza okratoksina A u organizmu životinja, doza koje se mogu očekivati u prirodnoj izloženosti ljudi. Nadalje, željeli smo iznaći podesne životinjske modele za istraživanje specifičnih učinaka ovog nefrotoksina na pojedine organe i organske sustave. Nakon intravenske aplikacije <sup>14</sup>C-okratoksina A pokusnim životinjama, distribucija toksina praćena je tehnikom »Whole body autoradiography«.<sup>19</sup> U datim vremenskim intervalima životinje su usmrćivane te odmah smrznute na -75°C. Sagitalni rezovi cijele životinje, debljine 20 μm, stavljeni su na rentgenske filmove, a nakon razvijanja, očitavana je s autoradiograma distribucija radioaktivno obilježenog okratoksina A.

U pastrva nađena je specifična kumulacija toksina u bubrezima uz izuzetno brzu eliminaciju iz krvotoka i ostalih tkiva. Zbog specifične uloge bubrega u fiziologiji riba, kao ekskretornog i hematopetskog organa, riba bi mogla biti podesan model za izučavanje nefrotoksičnosti i hematotoksičnosti okratoksina A.<sup>6</sup>

Retencija radioaktivno obilježenog okratoksina A u prepelica nađena je u žumanjku jajeta. Nakupljanje <sup>14</sup>C-okratoksina A u žumanjku vidljivo je u obliku koncentričnih krugova oštro ograničenih od okoline koji upućuju na taj način na vrijeme ekspozicije životinje toksinu. Š obzirom na to da se proteini potrebni za rast žumanjka sintetiziraju u jetri, te da se specifično vežu sa okratoksinom A, ovi proteini mogli bi poslužiti kao model za izučavanje specifično vezućih proteina za okratoksin A u humanoj plazmi.<sup>5</sup>

U sisavaca, odnosno u miša, nađena je generalizirana distribucija toksina po cijelom tijelu, pri čemu je u krvi i žuči utvrđena najveća koncentracija <sup>14</sup>C-okratoksina A u odnosu na ostala tkiva. Kumulacija radioaktivno obilježenog okratoksina A u bubregu miša bila je naglašenija u dubljim slojevima korteksa i meduli.<sup>7</sup>

Da bi se utvrdila distribucija i afinitet okratoksina A za pojedine segmente i stanice bubrežnog tkiva, nužna je primjena tehnike mikroautoradiografije, odnosno elektronskomikroskopske autoradiografije. U suradnji sa kolegama iz Švedske, dio ovih istraživanja je u toku i nadamo se da ćemo uskoro doći do prvih rezultata.

#### ZAKLJUČAK

Na osnovi dosadašnjih saznanja, mikotoksinska hipoteza u etiologiji balkanske endemske nefropatije nije mogla biti potvrđena, ali niti odbačena. Okratoksin A možda nije isključivi uzročnik ove teške i fatalne bolesti. Međutim, za sada, shodno analitičkim postupcima, jedan je od rijetkih nefrotoksičnih mikotoksina pristupačan praćenju i mjerenju u biološkom materijalu. Izučavajući toksikologiju ovog toksina prirodnog porijekla, mišljenja smo da ćemo dobiti uvid u moguće opće djelovanje nefrotoksina gljivičnog porijekla.

#### LITERATURA

1. Barnes JM. Possible nephrotoxic agents. U: Wolstenholme G E W, Knight J, Eds. The Balkan Nephropathy. London: Churchill, 1967;110—3.
2. Chu FS. Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. Arch Biochem Biophys 1971;147:359—66.
3. Creppy EE, Rösenthaller R, Dirheimer G. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. Fd Chem Toxic 1984;22:883—6.
4. Dimitrov D. endemische (Balkan) Nephropathie in Bulgarien. Münch Med Wschr 1960;201—7.
5. Fuchs R, Appelgren LE, Hagelberg S, Hult K. <sup>14</sup>C-Ochratoxin A distribution in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) monitored by whole body autoradiography. Poultry Sci. (in press).
6. Fuchs R, Appelgren LE, Hult K. Distribution of <sup>14</sup>C-Ochratoxin A in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Acta Pharmacol Toxicol 1986;59:220—7.
7. Fuchs, Appelgren LE, Hult K. Distribution of <sup>14</sup>C-Ochratoxin in the mouse monitored by whole body autoradiography. Acta Pharmacol Toxicol (in press).
8. Hult K, Fuchs R, Peraica M, Pleština R, Čević S. Screening for Ochratoxin A in Blood by Flow Injection Analysis. J. Appl Toxicol 1984; 4:326—9.
9. Hult K, Gatenbeck S. A spectrophotometric procedure, using carboxypeptidase A, for the quantitative measurement of ochratoxin A. J A O A C; 59:128—9.
10. Krogh P. Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy. U: Puchlev A, ed. Endemic nephropathy. Sofia: Bulgarian Academy of Sciences, 1974;266—70.
11. Lillehoj EB, Elling F. Environmental Conditions That Facilitate Ochratoxin Contamination of Agricultural Commodities. Acta Agricol Scand 1983;33:113—28.
12. Nesheim S, Hardin NF, Francis OJ, Langham WS. Analysis of ochratoxins A and B and their esters in barley, using partition and thin layer chromatography. I Development of the method. J A O A C 1973;56:817—21.
13. Northolt MD, Van Egmond HP, Paulsch WE. Ochratoxin A Production by Some Fungal Species in Relation to Water Activity and Temperature. J Food Protect 1979;42:485—90.
14. Pavlović M. Mikotoksini i balkanska endemska nefropatija. Magistarski rad, Zagreb 1977.
15. Pavlović M, Pleština R, Krogh P. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (Endemic) Nephropathy. Acta Path Microbiol Scand Sect B 1979;87:243-6.
16. Peraica M, Fuchs R, Radić B, Hagelberg S, Hult K, Pleština R. The effect of ochratoxin A on some kidney cartical enzymes. U: Dirheimer G, Schlegel M, eds. Abstracts of the 28th Congress of the European Society of Toxicology. Strasbourg: European Society of Toxicology, 1987:42.
17. Radić B, Fuchs R, Peraica M, Čević S, Pleština R. Prevalence of ochratoxin A in human blood. U: Dirheimer G, Schlegel M, eds. Abstracts of the 28th Congress of the European Society of Toxicology. Strasbourg: European Society of Toxicology, 1987:57.
18. Stojaković R, Hult K, Gamulin S, Pleština R. High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. Biochem Intern 1984; 9:33—8.
19. Ullberg S. The technique of whole body autoradiography. Cryosectining of large specimens. The LKB Instrum J 1977.

#### Abstract

#### A POSSIBLE ROLE OF MYCOTOXINS IN THE ETIOLOGY OF BALKAN ENDEMIC NEPHROPATHY

Radovan Fuchs, Radovan Pleština and Marko Šarić  
Institute for Medical Research and Occupational Health, University of Zagreb

The paper gives an overview of the investigations aiming to prove the mycotoxin in etiology of Balkan Endemic Nephropathy. The studies have

been carried out in the past ten years by the Institute for Medical Research and Occupational Health, University of Zagreb.

Results of the field studies performed for the purpose of monitoring people in the endemic area of Brodska Posavina, of studies on experimental animals and of in vitro studies are presented.

**Key words:** Balkan endemic nephropathy, etiology, mycotoxin

**Received:** April 8, 1988