
DIZERTAČNÍ PRÁCE - TEZE

616.61-008.64-036.12

STUDIUM KUMULACE MYKOTOXINU OCHRATOXINU A U NEMOCNÝCH S CHRONICKOU RENÁLNÍ INSUFICIENCÍ

František MALÍŘ

Krajská hygienická stanice, Hradec Králové

Souhrn

Práce shrnuje výsledky monitoringu ochratoxinu A v krevním séru dospělých dárců krve získané v letech 1994, 1995 a 1997 a dále výsledky grantového projektu IGA MZ ČR NK/ 4576-2: „Studium kumulace ochratoxinu A u nemocných chronickou renální insuficiencí“.

Bylo prokázáno, že u stabilizované chronické renální insuficience na podkladě chronického poškození ledvin a dále u nemocných v pravidelném dialyzačním léčení, terminálním stadiu chronické renální insuficience dochází v porovnání s kontrolní skupinou dárců krve k významné retenci mykotoxinu ochratoxinu A. Dále bylo zjištěno, že standardně provedená dialýza nevede ke snížení sérových koncentrací ochratoxinu A.

Klíčová slova: Mykotoxiny; Ochratoxin A; Renální insuficience; Pravidelné dialyzační léčení.

A Study of Mycotoxin Ochratoxin A Accumulation in Patients with Chronic Renal Insufficiency

Summary

This article summarizes the results obtained by monitoring ochratoxin A in the blood serum of blood donors in 1994, 1995 and 1997 and the results of the IGA MZ Č NK/4576-2 grant project „Study of Ochratoxin A Accumulation in Patients with Chronic Renal Insufficiency“.

It has been shown that, unlike in the control group of blood donors, the retention of mycotoxin ochratoxin A is significant in patients with stabilized chronic renal insufficiency on the grounds of chronic renal lesion and in those in the terminal stage of chronic renal insufficiency who are regularly treated by dialysis. It has also been found that a standard dialysis does not lead to the decrease of ochratoxin A serum levels.

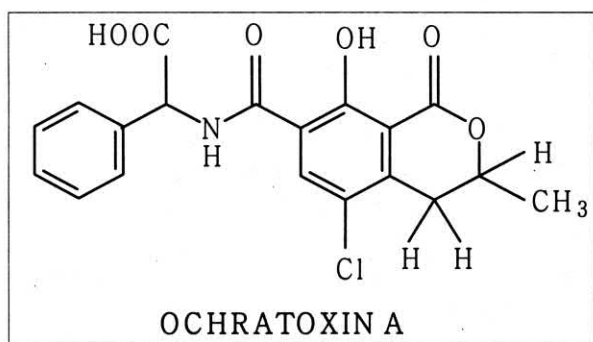
Key words: Mycotoxin; Ochratoxin A; Renal insufficiency; Regular dialysis treatment.

Úvod

Zájem pracovníků státních dozorových organizací a toxikologů je orientován na systematické sledování cizorodých látek v potravinách schopných ohrozit zdraví populace, tedy i mykotoxinů (toxických sekundárních metabolitů vláknitých mikroskopických hub, tzv. plísní, mikromycet). Specifická úskalí a rizika v tomto směru přináší i globalizace potravinového trhu nesoucí s sebou možnost zvýšeného výskytu mykotoxinů. To se přirozeně promítá i do klinické oblasti. V té se soustřeďuje pozornost především na ty mykotoxiny, u nichž

bylo prokázáno, že představují zvýšené riziko ohrožení organismu (celkové či převážně orgánové), a to buď při jejich nadměrném přívodu kontaminovanou potravou, nebo při různých chorobných stavech, které narušují fyziologické degradační a detoxikační schopnosti.

Mezi cizorodé látky v potravinách patří např. mykotoxiny typu ochratoxinů, z nichž dominantní úlohu zaujímá ochratoxin A (dále OTA), objevený skupinou jihoafrických badatelů (8). Chemicky se jedná o 3-metyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroizokumarin vázaný peptidickou vazbou na molekulu L-β-fenylalaninu (1) - viz obr. 1.



Obr. 1

Ochratoxiny jsou produkovány plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium* v závislosti na teplotě a vlhkosti (1). OTA se může vyskytovat v řadě komodit jak rostlinného, tak živočišného původu. Za hlavní zdroje OTA v potravinách jsou pokládány cereálie, cereální produkty, vepřové maso, krev a vnitřnosti (játra, ledviny, výrobky z krve), dále káva, pivo, luštěniny a koření. Mezi jeho další zdroje patří i sušené ovoce, jako např. fíky, hrozinky, a také grepová šťáva a červené víno (1, 5).

Expozici člověka dokládají nálezy OTA v krvi a tkáních. Člověk je exponován ochratoxinu A především prostřednictvím potravinového řetězce - a to buď přímo (např. konzumací kontaminovaných cereálií a olejnin), nebo nepřímo (např. konzumací kontaminovaného masa a mléka) (1).

- Je známo, že OTA inhibuje syntézu proteinů, zvyšuje peroxidaci lipidů *in vitro* a *in vivo*, že poškozuje mitochondriální funkce, metabolismus cukrů a narušuje metabolismus vápníku. Mezi hlavní biologické účinky ochratoxinu A patří:

- nefrotoxicita,
- imunotoxicita,
- genotoxicita,
- mutagenita,
- karcinogenita,
- teratogenita,
- neurotoxicita.

Podle IARC/WHO je OTA zařazen mezi možné karcinogeny pro člověka kategorie 2B (1, 2, 5).

Ze souhrnu experimentálních prací o nefrotoxicitě OTA *in vitro* a také *in vivo* vyplývá, že OTA narušuje intracelulární metabolické pochody s následnou apoptózou renálních buněk, renální hemodynamiku, významně a snad i dominantně narušuje funkce proximálního tubulu (a to i při subchronické expozici), vede k poklesu glomerulární filtrace a tubulární resorpce a ovlivňuje všechny části nefronu a ledviny *in toto* (2, 5). Zájem o nefrotoxicitu

ochratoxinu A byl vyvolán nálezy vyšších sérových koncentrací OTA u nemocných s balkánskou endemickou nefropatií BEN, podtypu tubulointersticiální nefritidy.

Ochratoxin A byl prokázán ve vzorcích lidské krve v mnoha zemích na celém světě. V Evropě se koncentrace OTA pohybovaly v rozsahu 0,1-14,4 µg/l séra, případně plazmy. Na Balkáně byl OTA zjištěn např. v krvi obyvatel bývalé Jugoslávie a v Bulharsku. Dále byl OTA nalezen v krevním séru u obyvatel Dánska, Francie, Itálie, Německa a Polska. Ve Švédsku byl OTA prokázán ve vzorcích lidské plazmy (1, 2). Ochratoxin A byl také prokázán v krevním séru obyvatel České republiky (3, 6, 7).

Od roku 1994 je OTA systematicky sledován v krevním séru dárců krve okresů Benešov, Plzeň, Ústí nad Labem a Žďár nad Sázavou metodou HPLC s fluorescenční detekcí. V 1620 zanalyzovaných vzorcích byl zjištěn aritmetický průměr 0,25 µg OTA/l séra, geometrický průměr 0,19 µg/l, medián 0,20 µg/l, minimální naměřená koncentrace byla 0,1 µg/l a maximální 13,70 µg/l (4). Udává se, že koncentrace OTA ≥ 10 µg/l séra vyvolávají nefropatie (1).

OTA patří do skupiny naturálních toxinů a jeho výskyt se může měnit každoročně. Vzhledem k jeho závažným biologickým účinkům je třeba ho sledovat a zabývat se tím, zda i nalezené relativně nízké koncentrace OTA při jeho chronickém či dlouhodobém příjmu se nekumulují u nemocných s chronickou renální insuficiencí (CHRI) a zda tudíž vlivem OTA nemůže docházet k akceleraci onemocnění, a to i při příjmu potravin, které odpovídají povoleným hygienickým limitům podle vyhlášky MZD č. 298/1997 Sb.

Cílem další části práce bylo proto zjistit, zda a do jaké míry dochází k retenci OTA v séru nemocných se sníženými renálními funkcemi (bez nutnosti pravidelného dialyzačního léčení) a v séru nemocných, kteří jsou v pravidelném dialyzačním léčení.

Materiál a metody

S cílem blíže definovat potenciální nefrotoxicitu OTA za různých okolností a podmínek byl soubor nedialyzovaných nemocných rozdělen do tří základních podskupin na:

- Skupinu hospitalizovaných nemocných bez prokazatelné preexistující nefropatie.

- Skupinu hospitalizovaných nemocných, u nichž byla již dříve prokázána CHRI na podkladě chronické nefropatie.
- Skupinu nemocných se stabilizovanou CHRI sledovaných ambulantně.

U souboru dialyzovaných nemocných bylo zjišťováno, zda dochází ke kumulaci OTA u pacientů zařazených do pravidelného dialyzačního léčení (PDL), zda dialýza ovlivňuje kumulaci OTA v séru nemocných, dále jestli dialýza ovlivňuje kumulaci OTA v séru nemocných s dříve prokázanou zvýšenou koncentrací OTA a zda se OTA vyskytuje v dialyzačním roztoku.

Všechna ostatní pomocná a laboratorní vyšetření umožňující upřesnit klinické diagnózy a tím i

rozdělení nemocných do jednotlivých studovaných souborů byla prováděna podle standardizovaných metod.

U všech pacientů byl na základě zpracovaného dotazníku posuzován jejich dietní režim (který by mohl ovlivnit hladiny OTA v séru). Hodnoty OTA v séru byly porovnávány s nálezy u populace osob zdravých, respektive osob s normální kreatininémií. Stanovení ochratoxinu A v séru a moči se prováděla vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční detekcí, metodou podle Bauera a Gareise v modifikaci podle Creppyho (1).

Výsledky

Získané výsledky udávají tabulky 1, 2 a 3.

Tabulka 1

Nedialyzovaní pacienti

Skupina	Počet pacientů	Věk (roky)	Kreatininémie (μmol/l)	Sérová koncentrace OTA (μg/l)	Trvání RI (roky)	GF průměr (ml/s)	TR průměr
1	25 (M:Ž) (14:11)	65,5 (23-78)	193,6 (127-434)	0,2 (0,05-3,20)	--	--	--
2	17 (M:Ž) (15:2)	66,5 (51-78)	340,9 (130-760)	0,2 (0,05-0,40)	10 (4-20)	0,32	0,955
3	103 (M:Ž) (64:39)	60,8 (21-79)	275,1 (127-780)	0,4 (0,05-3,10)	2 (1-6)	0,5	0,921

Pozn.:

1 - hospitalizovaní nemocní bez prokazatelné CHRI (s přechodnou RI)

2 - hospitalizovaní nemocní s preexistující CHRI na podkladě chronické nefropatie

3 - nemocní se stabilizovanou CHRI ambulantně sledovaní

Trvání RI (roky) - trvání renální insuficience

GF - prům. (ml/s) - průměrná hodnota glomerulární filtrace

TR - prům. - průměrná hodnota tubulární resorpce

Tabulka 2

Nedialyzovaní pacienti - diagnózy a koncentrace OTA

Skupina	Pacienti	Diagnózy (počet pacientů)	Sérová koncentrace OTA (μg/l)
2	17	TIN (5)	0,1 (0,05-0,3)
		GN (3)	0,3 (0,10-0,4)
		J (9)	0,2 (0,05-0,4)
3	103	TIN (56)	0,4 (0,05-3,1)
		GN (15)	0,4 (0,05-2,2)
		J (32)	0,5 (0,05-2,3)

Pozn.:

TIN - tubulointersticiální (chronická) nefritida

GN - glomerulonefritida (chronická)

J - jiné onemocnění ledvin ve fázi CHRI

Tabulka 3

Nemocní v pravidelném dialyzačním léčení (PDL)

Skupina	Počet pacientů	Věk (roky)	Doba PDL (měsíc)	Kreatininémie před dialýzou (μmol/l)	Kreatininémie po dialýze (μmol/l)	Sérová koncentrace OTA před dialýzou (μg/l)	Sérová koncentrace OTA po dialýze (μg/l)	Úbytek hmotnosti (kg)
4	99 (M:Ž) (67:32)	62,0	35,5 (1-237)	874,9 (396-1408)	--	0,8 (0,05-0,40)	--	--
5	10 (M:Ž) (4:6)	69,3	26,3 (8-37)	812,5 (457-1187)	--	0,7 (0,20-1,90)	0,8 (0,20-2,20)	-1,9
6	20 (M:Ž) (15:5)	63,9	37,9 (5-180)	819,6 (545-1172)	346,7 (187-553)	1,8 (0,20-5,40)	1,7 (0,20-5,20)	-1,9

Pozn.:

4 - nemocní v PDL celkem, stav před dialýzou

5 - nemocní v PDL, náhodně vybraní - s předem neznámou koncentrací OTA

6 - nemocní v PDL - cíleně vybraní - s dříve prokázanou zvýšenou koncentrací OTA

Závěr

- 1) Při přechodné RI, která se rozvinula u nemocných na podkladě jiného základního onemocnění, bez preexistující nefropatie, nebyla prokázána patologická retence OTA v porovnání se zdravou populací (dárce krve).
- 2) U nemocných s preexistující nefropatií ve fázi CHRI, která byla komplikována a akcentována jiným závažným onemocněním vyžadujícím hospitalizaci, ale nedosahovala stupně indikovaného k dialyzační léčbě, nebyla rovněž prokázána patologická retence OTA.
- 3) U stabilizované CHRI, mírně až středně pokročilá byla zjištěna signifikantně zvýšená sérová koncentrace OTA v porovnání se skupinou zdravé populace ($p < 0,001$).
- 4) U nemocných v PDL byly nalezeny signifikantně zvýšené sérové koncentrace OTA v porovnání s populací zdravých ($p < 0,001$) - a to ve třech definovaných sestavách. U těchto nemocných nebyl prokázán signifikantně významný pokles sérových koncentrací OTA po standardně provedené dialýze.
- 5) Příčinu tendence ke kumulaci OTA u protrahované CHRI lze spatřovat buď v neadekvátním, tj. nadměrném příjmu OTA potravinami, nebo v poruchách biotransformace OTA při CHRI, či se jedná o kombinaci těchto příčin. Kumulaci OTA lze považovat za faktor, který u části ne-

mocných může akcelarovat progresi stávající nefropatie. Úprava dietního režimu nemocných se stabilizovanou CHRI a v PDL, kteří retinují OTA, by mohla být ekonomicky nejméně náročným, ale vysoce efektivním opatřením.

- 6) V experimentu *in vivo* bylo prokázáno, že ochratoxin A vázaný na bílkoviny krevní plazmy přes diacetátcelulózovou dialyzační membránu neprochází. Naopak v experimentu *in vitro* bylo potvrzeno, že volný OTA přes tutéž dialyzační membránu prochází.

Poděkování

Za cenné rady, připomínky a pomoc děkuji panu prof. MUDr. J. Kačerovskému, CSc., doc. Ing. J. Severovi, CSc., MUDr. P. Fixovi, CSc., MUDr. J. Zahradníkovi, MUDr. J. Österreicherovi, Ph.D. a Ing. P. Moučkovi. Za pomoc při statistickém zpracování výsledků děkuji panu Ing. J. Knížkovi, CSc.

Tato studie byla finančně podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR NK/4576-2.

Literatura

1. BAUDRIMONT, I.: Variation de la nephrotoxicité de l'ochratoxine A sous l'effet de facteurs métaboliques et non métaboliques. Thèse pour le Doctorat (No. 2), Bordeaux, Université II, 1995. 250 s.

2. CREPPY, EE. - CASTEGNARO, M. - DIRHEIMER, G.: Human ochratoxycosis and its Pathologies. Montrouge, John Libbey Eurotext, 1993, vol. 231, p. 1-303.
 3. FUKAL, L. - REISNEROVÁ, H.: Monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in Czechoslovak human sera by immunoassay. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1990, vol. 44, p. 345-349.
 4. MALÍŘ, F. - JERGEOVÁ, Z. - SEVERA, J., et al.: The level of ochratoxin A in blood serum of adults in the Czech Republic. Revue Méd. Vét., 1998, vol. 149, no. 6, p. 710.
 5. PFOHL-LESKOWICZ, A. et col.: Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Londres, New York : Lavoisier, Tec-Doc, 1999. 478 s.
 6. RUPRICH, J. - OSTRÝ, V.: Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. Cent. Eur. J. Public Health, 1993, vol. 1, no. 1, p. 46-48.
 7. RUPRICH, J. - OSTRÝ, V.: Health risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A to humans : Czech Republic - Brno - 1991/92. Cent. Eur. J. Public Health, 1993, vol. 1, no. 2, p. 86-93.
 8. VAN DER MERWE, KJ. - STEYN, PS. - FOURIE, L.: Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C metabolites of *Aspergillus ochraceus*. Wilh. J. Chem. Soc., 1965 a, p. 7083-7088.
- Dizertační práce obhájená 6. 9. 2000 před komisí pro obhajoby dizertačních prací v oboru toxikologie doktor-ského studijního programu na VLA JEP v Hradci Králové.*
- Korespondence: RNDr. František Malíř, Ph.D.
Krajská hygienická stanice
Národní referenční laboratoř pro biomarkery
mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách
Nezvalova 958
500 02 Hradec Králové
e-mail: xeno-khs_hrk@telecom.cz
- Do redakce došlo 2. 10. 2000
-