

Włodzimierz Bulikowski<sup>1</sup>

Andrzej Borzęcki<sup>2</sup>

Ryszard Skorupski<sup>3</sup>

Katarzyna Trocka<sup>1</sup>

Wiesław Lingas<sup>1</sup>

## ZAWARTOŚĆ WAPNIA W SKÓRZE SAMCÓW SZCZURZYCH EKSPONOWANYCH NA WYSOKIE STĘŻENIA OCHRATOKSYNY A (OTA)

CALCIUM CONCENTRATION IN THE SKIN OF MALE RATS EXPOSED TO HIGH DOSES OF OCHRATOXIN A (OTA)

<sup>1</sup> Z Centrum Medycyny Pracy w Gnieźnie

<sup>2</sup> Z Katedry i Zakładu Higieny  
Akademii Medycznej w Lublinie

<sup>3</sup> Z Poradni Medycyny Pracy w Kole

### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Ochratoksyna A (OTA) jest jedną z mikotoksyn stwarzających najczęściej ryzyko zawodowe. Celem badań była obserwacja stężenia wapnia w skórze zwierząt pod wpływem wysokich dawek ochratoksyny A (OTA). **Materiał i metody.** Badanie przeprowadzono na samcach szczurzych w dwóch grupach eksponowanych na wysokie dawki OTA (1 mg/kg<sup>-1</sup> m.c.) przez 30 dni. Jednej z grup podawano dodatkowo MgCl<sub>2</sub> w dawce 5 mg/kg<sup>-1</sup> m.c. Wyniki porównano z grupą kontrolną. Po przeprowadzeniu doświadczenia zwierzęta dekapitowano a otrzymane skóry były odtłuszczone i mineralizowane. Pierwiastki oznaczono metodą AAS na aparacie AAS-3. **Wyniki.** Po przeprowadzeniu doświadczeń stwierdzono istotny ( $p < 0,001$ ) wzrost zawartości wapnia w skórze w obu badanych grupach, w stosunku do grupy kontrolnej. Zespół, który otrzymywał równocześnie OTA i MgCl<sub>2</sub> miał znamienne niższe ( $p < 0,001$ ) stężenie wapnia w skórze, niż grupa narażona wyłącznie na OTA. **Wnioski.** Podawanie wysokich dawek OTA powoduje znamienne wzrost stężenia wapnia w skórze zwierząt. Równoczesne podawanie wysokich dawek OTA i małych dawek chlorku magnezu powoduje także istotny wzrost zawartości wapnia w skórze zwierząt. Słowa kluczowe. Ochratoksyna A, zawartość wapnia w skórze, ekspozycja, interakcje, chlorek magnezu. Med. Pr., 2005;56(5):363–366

Słowa kluczowe: ochratoksyna A, stężenie wapnia, skóra, ekspozycja, interakcje, chlorek magnezu

### ABSTRACT

**Background:** Ochratoxin A (OTA) is one of mycotoxines that most frequently creates occupational hazards. The aim of the study was to observe calcium concentration in the skin of test animals exposed to high doses of ochratoxin A (OTA). **Materials and methods:** Tests were carried out in two groups of male rats exposed to high doses of OTA (1 mg/kg<sup>-1</sup>) for 30 days. One of these groups was additionally administered MgCl<sub>2</sub> in a dose of 5 mg/kg<sup>-1</sup>. The results were compared with the control group. The animals were decapitated and the obtained skins were degreased and mineralized. The element was marked by AAS method on AAS-3 apparatus. **Results:** After completing the experiment, a significant ( $p < 0.001$ ) rise in calcium concentration was found in the skin of animals in both tested groups compared with the control one. The group given at the same time OTA and MgCl<sub>2</sub> had a significantly lower ( $p < 0.001$ ) calcium concentration in the skin than that exposed to OTA only. **Conclusions:** Administration of high doses of OTA characteristically increases calcium concentration in animal skin. Simultaneous administration of OTA in high doses and magnesium chloride in low doses also significantly increases calcium concentration in animal skin. Med Pr 2005;56(5):363–366

Key words: ochratoxin A, calcium concentration, skin, exposure, interaction, magnesium chloride

Adres 1. autora: Wrzesińska 56, 62-300 Gniezno, e-mail: pksplezia@op.pl

Nadesłano: 23.08.2005

Zatwierdzono: 5.09.2005

© 2005, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera w Łodzi

## WSTĘP

Wpływ ekspozycji na mikotoksyny w miejscu pracy i wiedza o możliwości szkodliwego działania grzybów toksynotwórczych jest stosunkowo mało rozpowszechniona wśród lekarzy medycyny pracy. Być może jest tak dlatego, iż niewiele ośrodków naukowych prowadzi takie badania. Przykładem istnienia realnego niebezpieczeństwa było wykrycie w jednym z zakładów garbarskich 12 gatunków grzybów toksynotwórczych, w tym produku-

jących ochratoksynę A (OTA). Przychodnia zakładowa nawiązała współpracę z Katedrą Mikrobiologii Akademii Rolniczej w Krakowie i pracownią WHO w Hamburgu. Po przeprowadzeniu badań toksykologicznych przeprowadzono zabiegi chemiczne, które doprowadziły do zniszczenia chorobotwórczej mikroflory (1).

Pozytywnym efektem tych procedur była także poprawa jakości skór garbowanych metodą chromową.

Należy zaznaczyć, że czynniki szkodliwe środowiska zarówno fizyczne i chemiczne, jak i biologiczne mogą prowadzić do zmiany metabolizmu grzybów saprofitycznych i wytwarzania mikotoksyn (2).

W innych obserwacjach (3) w stosunkowo nowoczesnym, pięcioletnim zakładzie pracy, produkującym baterie elektryczne, wykryto w pomieszczeniach grzyba toksycznego *Penicillium oxalicum* Thom, produkującego kwas sekalonikowy, mający właściwości rakotwórcze, mutagenne i nefrotoksyczne.

Jedną z najczęściej występujących mikotoksyn jest OTA produkowana m.in. przez *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium viridicatum*. Gatunki tych grzybów wykryto w czasie wspomnianych badań mikrobiologicznych w garbarni (1). Ochratoksyna A jest produkowana przez mikroflorę podczas składowania zbóż i ich produktów, a także ziół, przypraw korzennych i winogron (4). Ponadto występuje w tłoczniach paszowych, rzeźniach przy produkcji wieprzowiny, a zwłaszcza podrobów i kiełbas (5); jak również przy produkcji kawy i oleju rycynowego (6). Ochratoksyna A może się znajdować także w kawie, piwie i winach (6,7).

OTA ma właściwości nefrotoksyczne, rakotwórcze i immunotoksyczne (2,5). Podczas prac rozbiórkowych jednego z lotnisk stwierdzono wysokie stężenie zarodników z gatunku *Penicillium* produkujących mikotoksyny, a wynosiło ono 4000 kolonii na m<sup>3</sup> powietrza (6). Jednym z narządów dostępnych badaniu jest skóra, która pełni wielorakie funkcje jako narząd wydzielający i wydalający, posiada zdolności resorpcyjne, a także ma zdolność obronnego działania poprzez odczyn zapalny. Skóra jest też narządem wytwarzającym odporność. W praktyce prowadzi się proste próby oporności skóry na działanie zasad wg metody Burckhardta, mające zastosowanie w pracy lekarza przemysłowego (8).

Kontynuując wcześniej prowadzone prace (9–13), wyznaczono, jako cel niniejszych badań, przeprowadzenie obserwacji nad zachowaniem się stężenia wapnia w skórze zwierząt, którym podano wysoką dawkę OTA.

## MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na szczurach samcach rasy Wistar, których waga wahała się w granicach 150–170 g. Doświadczenia na trzech grupach zwierząt, z których pierwsza była kontrolną, druga otrzymywała dożołądkowo OTA w dawce 1 mg/kg<sup>-1</sup> m.c., trzeciej podawano OTA w tej samej dawce i oprócz tego MgCl<sub>2</sub> w dawce

5 mg/kg<sup>-1</sup>. Wszystkie badane grupy były jednakowo żywione karmą LSM, a zwierzęta do picia otrzymywały wodę bidestylowaną. Eksperyment prowadzono przez 30 dni. Po tym okresie szczury usypiano ketaminą i przy okazji pobierania narządów wewnętrznych uzyskiwano skóry, które stanowiły materiał do dalszych badań.

Skóry przechowywano w temp. 0–4°C, a następnie suszono w temp. 22°C przy wilgotności względnej 56% przez 24 godz. W kolejnym etapie skóry przepłukiwano w bębnach typu Wacker w wodzie podwójnie destylowanej o temp. 25°C. Następnie skóry poddawano suszeniu przez 24 godz. w 25°C przy ruchu powietrza 0,2–0,8 m/s. Po suszeniu skóry cięto na kawałki i spielano w temp. 550°C przez 2 godz. Uzyskany biały popiół rozpuszczano w 25 ml HCl o stężeniu 0,2 mol/dm<sup>3</sup> i dokonywano oznaczeń pierwiastków metodą AAS (14) wykorzystując spektrofotometr absorpcji atomowej AAS3. Wapń oznaczano w obecności buforu korygującego chlorku strontu przy długości fali 422,7 nm i szczeliny 0,5 mm. Wyniki analizowano z wykorzystaniem testu t- Studenta.

**Tabela 1.** Stężenie wapnia w skórze pod wpływem wysokich dawek ochratoksyny A (OTA)

**Table 1.** Calcium concentration in the skin as the effect of ochratoxin A (OTA)

Eksperyment 30-dniowy 30-day experiment	Badanie grupy szczurów Tested groups of rats		
	grupa I Group I	grupa II Group II	grupa III Group III
Aplikacja Application	kontrolna control	OTA	OTA + mgCl <sub>2</sub>
Dawki dziennie/m.c Day doses/b.m.	0	1 mg/kg <sup>-1</sup>	1 mg/kg <sup>-1</sup> + 5 mg/kg <sup>-1</sup>
Stężenie Ca w skórze Ca concentration in the skin µg/g <sup>-1</sup>	182,2 ± 7,41	242,9 ± 10,04	208,02 ± 8,62
Liczba prób (n) No. of samples (n)	12	12	16
Istotność statystyczna Vs do kontroli* Grupa II vs III* Statistical significance Vs. control* Group II vs. III*	–	p < 0,001***	p p < 0,001***

\* Różnica istotnie statystyczna między grupami badanymi a grupą kontrolną;  
Statistical significance difference between the study and control groups;

\*\* Różnica istotnie statystyczna między grupą II a III.  
Statistical significance difference between groups I and III.

OTA – ochratoksyna A.  
ochratoxin A.

## WYNIKI

Rezultaty przeprowadzonego eksperymentu zawarto w tabeli 1. Jak wynika z przeprowadzonych obserwacji w grupie II ekspozowanej na wysokie stężenie OTA  $1 \text{ mg/kg}^{-1}$  stężenie wapnia w skórze szczurów wzrosło istotnie w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ) i wynosiło  $242,9 \pm 10,04 \mu\text{g/g}^{-1}$ . Równoczesne podanie OTA w tej samej dawce oraz chlorku magnezu w roztworze niewielkiej koncentracji- tj.  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$  spowodowało wzrost zawartości wapnia w skórze zwierząt do wartości  $208,0 \pm 8,62 \mu\text{g/g}^{-1}$ . Była ona istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej I ( $p < 0,001$ ), w której stężenie wapnia wynosiło  $182,2 \pm 7,41 \mu\text{g/g}^{-1}$ . Podanie chlorku magnezu w niewielkiej dawce  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  wywołało istotnie niższy wzrost stężenia wapnia w skórze szczurów ( $p < 0,001$ ) w grupie III, w stosunku do grupy II ekspozowanej wyłącznie na ochratoksynę A.

## OMÓWIENIE

Rozważania nad przeprowadzonymi obserwacjami można odnieść nie tylko w stosunku do problemów patologii doświadczalnej, ale i przywołania praktycznej perspektywy narażenia pracowników na OTA.

Przy ekspozycji na czynniki szkodliwe u ludzi często dokonywane są oznaczenia biopierwiastków jak i czynników toksycznych w surowicy, erytrocytach i innych komórkach, a także w moczu. Do określenia zawartości pierwiastków często są używane włosy zaliczane do tzw. przydatków skóry. Obserwacje takie prowadzono od lat 90. (15). U zwierząt atomopilogramy mogą określać koncentrację mikro- i makroelementów w sierści zwierząt (12). Materiałem, który wydaje się najodpowiedniejszy do określenia zawartości tkankowej pierwiastków, a jednocześnie obserwacji interakcji między chemicznymi czynnikami toksycznymi, biotoksynami i biopierwiastkami jest w patologii doświadczalnej skóra zwierząt (9,11,13).

Z uprzednio przeprowadzonych badań w podobnym przedziale czasowym wynika, iż podanie OTA w niskiej dawce  $25 \mu\text{g/g}^{-1}$  powodowało istotny wzrost wapnia w skórze. Równocześnie podanie  $\text{MgCl}_2$  w dawce  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$  – jako stężenia standardowego (16), istotnie wpływało na obniżenie wapnia w skórze (10).

W innych obserwacjach stwierdzono, iż podawanie wysokich dawek OTA ( $50 \mu\text{g/g}^{-1}$ ) przy równocześnie dużych dawkach magnezu, obniża zawartość wapnia w tkance. Podobne działanie wykazuje witamina E w dawce  $100 \text{ mg/kg}^{-1}$  (10).

Przesłanki te skłaniają do rozważenia hipotezy, iż zwiększenie zawartości wapnia w skórze jest swoistą

reakcją obronną. Jest to istota zjawiska opisana przez Hansa Selye'a pod nazwą kalcifilaksji (17). Etymologia tego określenia *calx-calcis* (łac) oraz *phylaxis* – czuwanie, zwraca uwagę na stan pewnego pogotowia organizmu, a reakcja powstaje pod wpływem swoistego uczulenia (17). Jest to typowa reakcja obronna (17), a może ona następować drogą bezpośredniego podania challengeera (tu – wyzwalacza). Podanie np. miejscowo podskórnie wapnia może powodować inkrustację włókien kolagenu tymi solami (18). Działanie jednak może nastąpić także drogą pośrednią, np. uszkodzenie nerek może zwiększyć kalcyfikację innych narządów. W przypadku ekspozycji na OTA należy się liczyć z takim wpływem. Działanie challengeera stanowi podstawę do określenia jego, jako rodzaju „witalnego nadżerania” – „vital mordanting” (17).

Oprócz opisanego procesu z udziałem uczulacza i mastocytów, już samo uszkodzenie nerek może prowadzić do zatrzymania wapnia i hyperkalcemii. Mechanizmy hormonalne utrzymują stały poziom wapnia i fosforu w wąskich granicach (19). Jest to ważne gdyż w innym razie wytrącanie fosforanu wapnia może także następować w częściach miękkich, jako tzw. zwapnienia przerzutowe (19). Znane są jeszcze uwapnienia tkanek (kalcergia) po podaniu uwapniaczy (kalcergenów) np. soli Pb (18). Zjawisko to obserwowano w skórze szczurów, gdy po podaniu soli ołowiu wzrastało stężenie Ca (20). Podobne zjawisko zaobserwowano w sierści szczurów, u których wyższe dawki dichromianu potasu powodowały wyższe stężenie wapnia w badanym materiale (12).

Skóra jest narządem, w którym stosunkowo prosto można przeprowadzać obserwacje nad interakcjami między zawartymi w niej biopierwiastkami a pierwiastkami toksycznymi (11).

Jest więc celowe prowadzenie podobnych obserwacji przy ekspozycji na OTA. Podawanie witaminy E w eksperymencie wydaje się działać antytoksycznie zarówno przy ekspozycji na OTA jak i ekspozycji na metale toksyczne (10). Podawanie magnezu, jako  $\text{MgCl}_2$  ma podobne działanie np. w stosunku do  $\text{Cr}^{6+}$ , powodując obniżenie jego stężenia w skórze (11). Związki magnezu z innym anionem nie mają takiego działania (12).

W przeprowadzonych obserwacjach okazało się, iż podanie  $\text{MgCl}_2$  nawet w niewielkich dawkach przy ekspozycji na OTA obniżało stężenie wapnia w skórze, a więc wykazywało działanie antytoksyczne (10).

Niniejsze badania laboratoryjne zwracają uwagę, jak wiele mechanizmów może być uruchomionych w organizmie na skutek działania OTA. Stanowią one fragment wiedzy, która powinna nasunąć refleksje lekarzowi prak-

tykowi – rejonu przemysłowego. Nie ma pewnego środka neutralizującego OTA. Działanie takie ma wykazywać aspartam *in vivo* oraz *in vitro* (7). W związku z tym zapobieganie powinno polegać na wzmacnianiu mechanizmów antyoksydacyjnych. U garbarzy narażonych na wysokie stężenie chromu stwierdzono obniżone stężenie seleniu w surowicy, erytrocytach oraz podwyższone stężenie nadtlenków lipidów (21). Biorąc pod uwagę fakt, że w pyłe pomieszczeń stwierdzono także grzyby, należy pamiętać, że zwiększa to znacznie ryzyko zawodowe u tych osób jeśli chodzi o powstawanie nowotworów (1). Współistnienie mikroorganizmów, m.in. produkujących OTA, i chromu jest prawdopodobnym powodem występowania u pracowników tzw. gorączki poniedziałkowej, co obserwowali w innych warunkach różni autorzy (6,8).

Większość prowadzonych współcześnie badań ma charakter laboratoryjny. Ich celem jest zbadanie przyczyn i mechanizmu choroby. Mniej uwagi poświęca się badaniom dotyczącym procesu podejmowania decyzji medycznych (22). Przemyślenie i ocena badań doświadczalnych jak i własne obserwacje stanowią podstawę do racjonalnej diagnozy i decyzji klinicznej. Są też przesłankami do wdrożenia właściwego programu profilaktycznego w danym środowisku pracy.

## WNIOSKI

1. Podawanie wysokich dawek OTA powoduje znamienny wzrost stężenia wapnia w skórze zwierząt.

2. Równoczesne podawanie wysokich dawek OTA i małych dawek chlorku magnezu powoduje także istotny wzrost zawartości wapnia w skórze zwierząt.

3. Stężenie wapnia w skórze po podaniu OTA i chlorku magnezu jest istotnie niższe w skórze zwierząt niż w przypadku podawania wyłącznie OTA.

## PIŚMIENNICTWO

- Smyk B., Tholl D., Bulikowski W.: Grzyby toksynotwórcze w Gnieźnieńskich Zakładach Garbarskich. *Aura*, 1990;17(7):3–5
- Smyk B.: Występowanie i ekotoksykologia grzybów. W: Dobrowolski J.W., Vohora S.B. [red.]. *Ekologizm w ochronie zdrowia*. Ossolineum PAN, Wrocław, Gdańsk, Warszawa, Kraków 1989, ss. 213–231
- Bulikowski W., Barabasz W., Bultrowicz A., Lingas W.: Wstępne obserwacje dotyczące występowania grzybów toksynotwórczych przy produkcji baterii elektrycznych. *Probl. Hig. Pr.*, 2001;11(10):29–32
- Petersen H., Kiessling K.H.: Mycotoxin in Swedish grains and mixed feeds. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1992;11(2):105–107
- Petzinger E., Zielgler K.: Ochratoxin A from toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2000;23:91–98
- Crook B., Swam J.R.M. Bacteria and other bioaerosols in industrial work places. In: Flannigan B. [red.]. *Microorganisms in*

- home and indoor work environments. Taylor and Francis, London, New York 2002, ss. 69–82
- Creppy E.E., Baudrimont I., How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin. *Am. J. Toxicol. Sci.*, 1998;23 suppl. 2:165–172
- Bulikowski W., Tyras H.: Pilotstudie zum Gesundheitszustand von Gebereiarbeitern, die chromiumgeerbtetes Leder polieren. *Z. Ges. Hyg.*, 1985;31(2):114–115
- Bulikowski W., Borzęcki A., Lingas W., Borzęcka H.: Wpływ ochratoksyny A na stężenie cynku i miedzi w skórze zwierząt doświadczalnych w okresie ciąży i porodu. *Biul. Magn.*, 1999;4(2):293–296
- Bulikowski W., Borzęcki A., Lingas W., Borzęcka H., Trocki M.: Wpływ ochratoksyny A na stężenia wapnia i magnezu w skórze zwierząt doświadczalnych. *Materiały II Międzynarodowej Konferencji „Obieg pierwiastków w przyrodzie”*. 27–29 października 1997, Warszawa. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 1997, s. 33–37
- Bulikowski W., Pietrzak I., Borzęcki A., Lingas W.: Investigation on chromium antagonism in the skin of experimental animals. *Magn. Research*, 1999;12(1):115–121
- Bulikowski W., Woźniak F., Borzęcki Z., Radomska K., Kaliszuk K., Święs Z.: Wpływ dichromianu potasu na zmiany histopatologiczne w jądrach szczurów białych i wyniki atomopilogramów sierści. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska (Lublin)*, 1991;5(46):69–73
- Bulikowski W., Lingas W.: Magnez – chrom, antagonizm czy synergizm, garbowanie a wydalanie chromu z moczem u narażonych. *Materiały pokonferencyjne Międzynarodowej Konferencji Uniwersytetu Paisley w Wielkiej Brytanii „Chrom w środowisku”*. 23–24 czerwca 1994, Radom. Wyższa Szkoła Inżynierska, Radom 1994, ss. 168–170
- Marczenko Z., Balcerzak M.: Spektrofotometryczne metody oznaczania w analizie nieorganicznej. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1998
- Aleksandrowicz J., Radomska K., Graczyk A., Konarski J.: Badania zawartości magnezu w populacji polskiej na podstawie analizy włosów. *Biul. Magn.* 1991;2(2):23–25
- Durlach J., Durlach V., Bac P., Rayssiguier V., Bara M., Guiet-Bara A.: Magnesium and ageing. II. Clinical data: aetiological mechanisms and pathophysiological consequences of magnesium deficit in the elderly. *Magn. Res.*, 1993;6(4):379–394
- Selye H.: *Calciphylaxis*. The University of Chicago Press, Chicago 1962
- Gumińska M.: Wapń i jego rola w metabolizmie człowieka. W: Dobrowolski J.W., Vohora S.B. [red.]. *Ekologizm w ochronie zdrowia*. Polska Akademia Nauk, Wrocław 1989, ss. 213–231
- Törring O.: Hyperkalcemia w przebiegu nowotworów złośliwych i innych stanach chorobowych. *Accurat of Information AB*, Uppsala 2005
- Pasternak K., Bielak E., Bulikowski W., Lingas W.: Wpływ podawania ołowiu w pożywieniu na stężenia wybranych metali w skórze szczurów. *Biul. Magn.* 2000;5(1): 56–61
- Gromadzińska J., Wąsowicz W., Skłodowska M., Bulikowski W., Rydzynski K.: The influence of atmospheric chromium on selenium content and glutathione peroxidase activity In blond of tannery workers. *Env. Health Perspect.*, 1996;12:1312–1316
- Wulf H.J.: Racjonalna diagnoza i leczenie. Wprowadzenie do teorii decyzji klinicznej. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1991