

# Zmiany neuropatologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym kurcząt po zatruciu ochratoksyną A

ZENON SOŁTYSIAK, KAMEL ROUIBAH

Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Sołtysiak Z., Rouibah K.

## Neuropathological changes in the central nervous system of broilers after poisoning by ochratoxin A

### Summary

The aim of this study was to analyze the influence and present possible neuropathological changes during dietary experimental OTA poisoning at doses of 6 ppm for 10 and 20 days in twelve Coob 500 chicken broilers, aged 2 weeks. Six birds were used for a control group, fed a standard diet free of ochratoxin. All examined chicken brains were anemic, swollen, and ischemic, and white and gray matter of brain and cerebellum was swollen and spongy changes (status spongiosus) were present. Probably OTA evoked cytotoxic brain oedema, especially in the neurons of the brain cortex, mesencephalon and cerebellum, as well as perivascular oedema. The severe perivascular oedema was also found in the white matter of the cerebellum. The cerebellum Purkinje cells were damaged and suffered losses.

**Keywords:** ochratoxin A, neuropathology changes, chickens

Ochratoksyny A, B, C (chlorodwuhydroizokumaryna – OTA) są mikotoksynami syntetyzowanymi przez grzyb *Aspergillus ochraceus* występujący w zepsutej, skażonej nim żywności. Zdolność produkcji OTA wykazują także inne gatunki grzybów *Aspergillus* i *Penicillium*. Zwierzęta metabolizują mikotoksyny na różnych szlakach metabolicznych. U świń ochratoksyna A przenoszona z jelit do wątroby jest bardzo wolno eliminowana, w przeciwieństwie do drobiu, u którego usuwana jest znacznie szybciej (15). OTA zawarte w karmie są toksyczne dla brojlerów (11, 12). Są trzykrotnie bardziej toksyczne od aflatoksyny, szczególnie u zwierząt młodych i wywierają pierwotny wpływ nefrotoksyczny (13). W przebiegu ochratoksykozy kurcząt nerki są początkowo obrzękłe, blade, odbarwione (ostra faza zatrucia), a w fazie przewlekłej są brunatne. W badaniu histopatologicznym stwierdza się obrzęk i zmiany martwicze kanalików bliższych, zwyrodnienie i zgrubienie błon podstawnych kłębuszków Malpighiego (10). OTA indukuje kanalikowo-śródmiażdżową nefropatię ssaków (15), a w następstwie wywołuje enzymurię, podobnie jak w bałkańskiej endemicznej nefropatii u ludzi, uszkadza metabolizm glukozy, działa immunosupresyjnie (17), teratogennie, genotoksycznie (22) i rakotwórczo, wywołując złośliwe guzy wątroby i układu moczowego (2). OTA jest również odpowiedzialna za koagulopatię (6, 13), obniża fosforylację glikogenu, wywołuje chorobę spichrzeniową glikogenu, indukując anemię z niedoboru żelaza (14), powoduje kruchość ścian je-

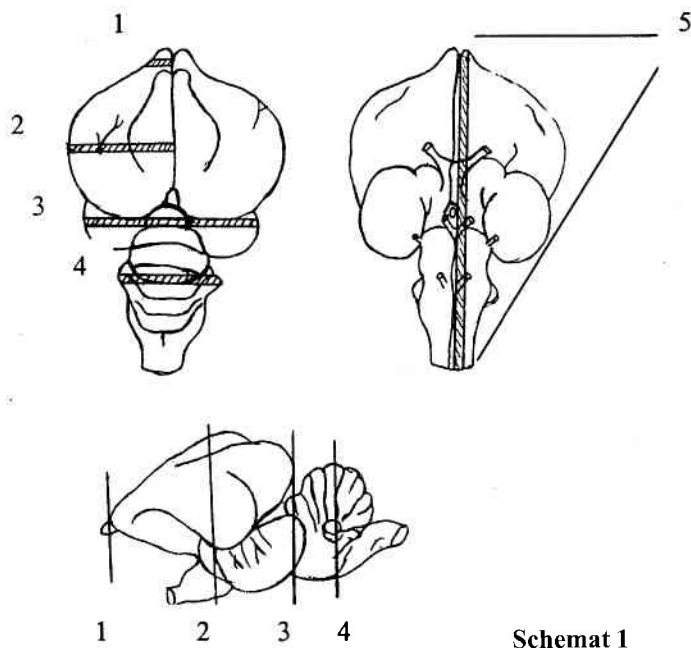
lit (24), upośledza fagocytozę (3). W badaniach prowadzonych przez Hamiltona i wsp. (10) u kurcząt, których pasza zawierała ochratoksynę, w 2. miesiącu życia ptaków jej zużycie wzrastało od 1,91 do 1,96 na kg masy ciała, a przyrost masy ciała kurcząt obniżał się od 1,86 do 1,74 kg. Odsetek zapaleń worków powietrznych wzrastał z 25% do 55% (12).

Wykazano, że łączne działanie toksyn grzybiczych aflatoksyny i OTA wywiera szkodliwy wpływ na wątrobę i nerki kurcząt, a także powoduje uszkodzenie układu immunologicznego, upośledza fagocytozę przez neutrofile (20), uszkadza układ krzepnięcia krwi szczurów i myszy (8, 9), wywołuje syndrom krwotoczny u szczurów (8), zaburza pigmentację, wywołuje zmiany wsteczne w torbie Fabrycjusza kurcząt (12) i grasicy indyków (4), a także osteoporozę.

Mikotoksyny i ich metabolity są wykrywane w mięśniach, narządach mięsnych, mleku i jajach. Koncentracja toksyn w produktach zwierzęcych jest odpowiednio niższa w porównaniu ze zjadaną karmą z miktotoksynami. U ludzi spożywających produkty z miktotoksynami może spowodować ostrą intoksykację. Obecne w produktach zwierzęcych kancerogenne miktotoksyny, takie jak aflatoksyna B1, M1 i ochratoksyna A winny być określane i kontrolowane, a ich poziom monitorowany. Dane piśmiennictwa na temat neurotoksyczności OTA są nieliczne. Celem badań było określenie ewentualnego wpływu neurotoksycznego na ośrodkowy układ nerwowy kurcząt oraz jakie struktury ośrodkowego układu nerwowego są uszkodzone.

## Materiał i metody

Do badań użyto 18 kurcząt brojlerów w wieku 2 tygodni, krzyżówek Cob-500, odchowanych w warunkach fermowych. Sześć kurcząt grupy I przez kolejne 10 dni otrzymywało paszę zawierającą ochratoksynę A w dawce 6 mg/kg. Kurczętom grupy II w ilości 6 sztuk przedłużono podawanie paszy z dodatkiem ochratoksyny A do 20 dni. Sześć ptaków stanowiło grupę kontrolną (K), otrzymywało standardową paszę wolną od mikotoksyn. Oceniano stan kliniczny kurcząt, a następnie je uśmiercano. Wykonywano badania sekcyjne, a mózgowia w całości pobierano do 10 min. po śmierci. Mózgowia utrwalano w 10% formalinie, a bloczki rutynowo zatapiano w parafinie. Do badań neuropatologicznych pobierano skrawki półkuli lewej, dokonując poprzecznych cięć i podłużnych półkuli prawej wg schematu nr 1 na wysokości: 1) opuszki węchowej, przez komorę boczną, 2) skrzyżowania nerwów wzrokowych przez hipokamp, prążkowie, ciało kolankowate boczne, jądra podwzgórza, 3) na wysokości odejścia nerwów poruszających gałką oczną przez płat centralny, jądra śródmózgowia, 4) na wysokości ciała trapezowego przez korę mózdku, piramidy, jądro grzbietowe ciała trapezowego. Półkulę prawą odwadniano i zatapiano w parafinie w całości i uzyskano przekrój 5, podłużny mózgowia (18). Preparaty barwiono metodami: hematoksyliną-eozyną (H-E), Nissla, Heidenhaina na osłonki mielinowe.



Schemat 1

## Wyniki i omówienie

Doświadczalne podanie OTA w paszy kurczętom spowodowało ich zachorowanie. Przeprowadzone badania kliniczne kurcząt wykazało ich anemię, senność, niechęć w poruszaniu. Chore ptaki zwykle stały lub siedziały skulone z przymkniętymi oczami i nastroszonymi piórami. Przy prawie zupełnej utracie apetytu wykazywały nieco zwiększone pragnienie na skutek odwodnienia organizmu spowodowanego biegunką. Skóra powłok ciała, grzebień, dzwonek, kończyny były kredowobiałe.

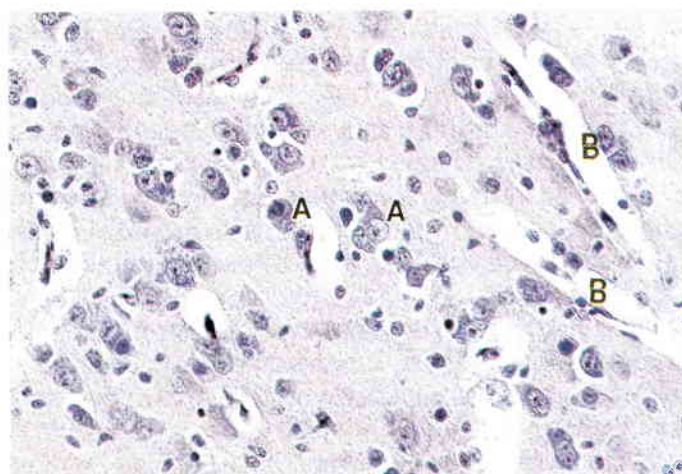
Tab. 1. Masa mózgowia (g) kurcząt kontrolnych i doświadczalnych po zatruciu OTA

Grupa kontrolna K	Grupa doświadczalna I (okres 10 dni)	Grupa doświadczalna II (okres 20 dni)
2,170	1,870	2,230
2,150	1,660	2,540
2,120	2,110	2,410
2,450	2,140	2,350
2,620	2,120	2,550
2,670	2,240	2,290
śr. 2,363	2,021	2,395

Mózgowie kurcząt doświadczalnych było również blade, obrzękłe. Masa mózgowia kurcząt I grupy doświadczalnej była niższa w stosunku do grupy kontrolnej kurcząt, a kurcząt II grupy doświadczalnej była nieznacznie wyższa w stosunku do kontroli (tab. 1).

Obrzęk mózgu był najbardziej nasilony w istocie białej, ale również dotyczył istoty szarej mózgu. Wokół naczyń tętniczych i żylnych spotykano drobne krwinkotoki i drobne wylewy krwawe wychodzące poza obręb przestrzeni okołonaczyniowych.

W poprzecznych polach przekroju mózgowia badaniem histopatologicznym stwierdzono obecność okołonaczyniowych wynaczynień erytrocytów zlokalizowanych podoponowo w istocie szarej i białej kory czołowej mózgu. Zmiany obrzękowe dotyczyły istoty białej kory czołowej, ciemieniowej, skroniowej kurcząt. W korze mózgu obserwowano obrzęk neurocytów, powiększenie ich jąder, rozpad chromatyny jądrowej, przemawiający za obrzękiem cytotoksycznym, a poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych, obecność obrzęku okołowłóscinkowego świadczy o obrzęku odnaczyniowym (ryc. 1). W mózdkach kurcząt grupy II w porównaniu z grupą I stwierdzono silniejszy okołonaczyniowy i okołokomórkowy obrzęk, tworze-



Ryc. 1. Zmiany obrzękowe kory skroniowej mózgu. A – obrzęk cytotoksyczny neurocytów, B – obrzęk odnaczyniowy mózgu u kurczęcia doświadczalnego grupy II, H-E, pow. 400 ×

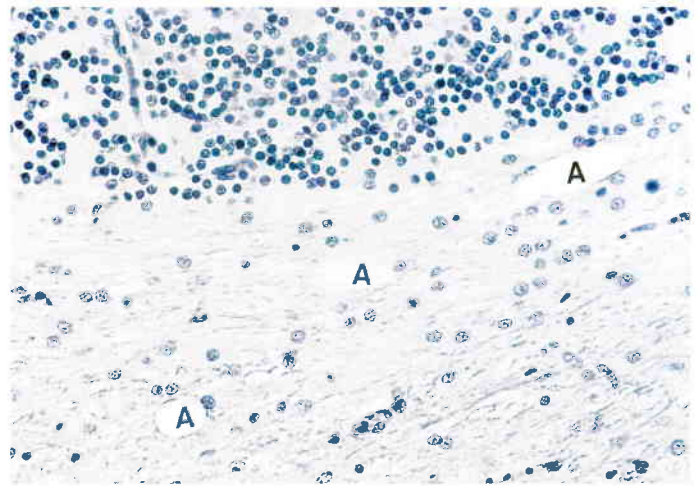


nie się drobnych wakuoli w istocie białej (ryc. 2). W obrębie jąder podstawy mózdzku i rdzeniu przedłużonym wykazano w obu dwóch grupach kurcząt zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych o typie schorzenia ischemicznego i rozplywnego wg Nissla. Zmiany zwyrodnieniowe komórek Purkiniego mózdzku głównie o typie schorzenia: ischemicznego, homogenizacyjnego i rozplywnego wg Nissla, ogniskowe ubytki komórek warstwy ziarnistej, a rzadziej komórek warstwy molekularnej były szczególnie dobrze widoczne u kurcząt grupy II (ryc. 3). U 5 kurcząt I grupy i czterech grupy II stwierdzono obrzęk istoty białej płacików mózdzku z rozsunięciem włókien nerwowych (ryc. 4), bez rozpadu osłonek mielinowych w metodzie Heidenhaina. Uzyskane wyniki są zbieżne z wynikami badań Stoeva i wsp. (21) wykonanych na kurczętach brojlerach, których pasza zawierała OTA w dawce 2-4 ppm. Autorzy wykazali zmiany obrzękowe w płacie wzrokowym i istocie białej mózdzku.

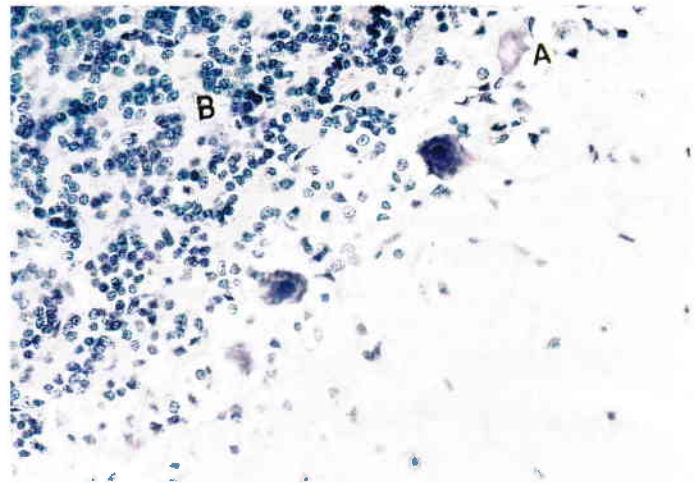
Zmiany neuropatologiczne w oun są prawdopodobnie skutkiem niedokrwienia, niedotlenienia mózgu i uszkodzenia nerek przez OTA. W niniejszych badaniach niedokrwienie i niedotlenienie tkanki nerwowej wywołało obrzęk cytotoksyczny i naczyniopochodny. Rozgraniczenie obrzęku odnaczyniowego i cytotoksycznego mózgu nie było w pełni możliwe. Zmiany te występowały łącznie. Obrzęk cytotoksyczny może stanowić wstępną fazę obrzęku po niedotlenieniu. Przyczyny gromadzenia się płynu obrzękowego w elementach komórkowych oun w różnych odmianach obrzęku cytotoksycznego nie są dostatecznie wyjaśnione. U jego podłoża leżą zaburzenia metabolizmu, prowadzące do zmian przepuszczalności błon komórkowych, a także śródkomórkowego ciśnienia osmotycznego i onkotycznego, w konsekwencji powodują ich zwiększoną wodochłonność.

W obrazie mikroskopowym ostry obrzęk wyrażał się poruszaniem pasm włókien nerwowych i ostrym obrzmieniem międzypęczkowego oligodendrogleju. Zblednięcie osłonek mielinowych w tym okresie było raczej następstwem rozluźnienia utkania niż rzeczywistego uszkodzenia mieliny. W istocie szarej i białej uległy poszerzeniu przestrzenie okołonaczyniowe. W korze mózgu występowały nieswoiste, uogólnione uszkodzenia komórek nerwowych. Długotrwałemu obrzękowi towarzyszy z reguły zanik komórek gleju skąpowypustkowego, rozplem astrocytów o typie astrogleju odczynowego ze wzmożoną produkcją włókien glejowych, uszkodzenie osłonek mielinowych i ich rozpad (21, 23).

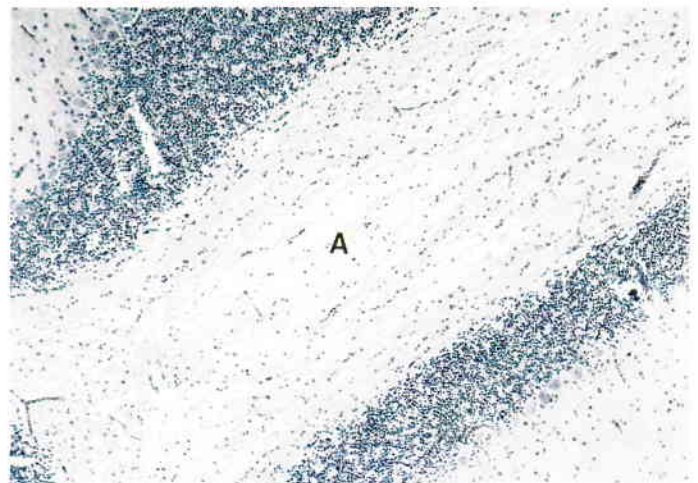
Odczyn glejowy zarówno ze strony astrocytów, jak i mikrogleju jest zależny od czasu trwania procesu chorobowego, a w przypadkach o przebiegu ostrym (przypadek własny) stwierdzono słabo zaznaczony rozplem okołonaczyniowy ograniczony do istoty białej półkul mózgu i mózdzku, który dotyczył zarówno elementów pochodzenia neuroektodermalnego, jak i mezo-dermalnego.



Ryc. 2. Wakuolizacja istoty białej mózdzku kurczęcia I grupy doświadczalnej, H-E, pow. 200 ×



Ryc. 3. Przekrój przez korę mózdzku kurczęcia grupy I. A – obrzęk warstwy komórek Purkiniego i schorzenie ischemiczne homogenizacyjne i rozplywne komórek Purkiniego mózdzku wg Nissla, B – ogniskowe ubytki komórek warstwy ziarnistej mózdzku, H-E, pow. 200 ×



Ryc. 4. Obrzęk istoty białej mózdzku u kurczęcia grupy II. A – rozsunięcie włókien nerwowych istoty białej. H-E, pow. 100 ×

Badania Belmadani i wsp. (1) po dożołądkowym podaniu OTA szczurom wykazały jej obecność w róż-

nych strukturach oun: 34,4% mózdzku, 5,1%, śródmózgowiu brzuszynym, 3,3% prązkowiu i 2,9% rogu Ammona, a w pozostałych częściach mózgu 50,3% całkowitego poziomu OTA w mózgowiu. Cytotoksyczność OTA polegała na uwolnieniu do przestrzeni pozakomórkowej dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i dotyczyła śródmózgowia brzuszynego, rogu Ammona, prązkowia i mózdzku, podczas gdy w innych strukturach oun jej obecności nie wykazano. Wzrost poziomu LDH w śródmózgowiu w porównaniu z innymi strukturami mózgu wskazuje, że ta struktura jest szczególnie celem OTA. Aktywność enzymu dwuhydroksybonukleazy (DN-aza) wzrastała w śródmózgowiu i mózdzku. U szczurów rasy Wistar po doustnym podaniu OTA w dawce 290 mg/kg co 2 dni przez okres 1-6 tygodni mykotoksyna odkładała się w mózgu (100 ng/g po 6 tygodniach), wywołując zmiany koncentracji aminokwasów i uszkodzenia struktur hipokampa (1).

OTA podana domacicznie u myszy i szczurów, między 10.-15. dniem ciąży indukuje zmiany martwicowe mózgu płodów, wywołuje małowzgowie, ponieważ przenika przez barierę łożyska i kumuluje się w tkankach płodu (23). W obwodowym układzie nerwowym młodych, dorosłych szczurów OTA redukuje przewodnictwo kanałowe jonów K<sup>+</sup>, powoduje proliferację komórek i wywiera negatywny wpływ na mielinogenezę (5, 7).

Reasumując należy stwierdzić, że OTA wywiera neurotoksyczny wpływ na mózgowie kurcząt, wywołując obrzęk cytotoksyczny neuronów, obrzęk odnaczyniowy mózgu i mózdzku, wybroczynowość, zwyrodnienia komórek nerwowych o typie uszkodzenia ischemicznego, homogenizacyjnego i rozplywnego wg Nissla.

### Piśmiennictwo

1. Belmadani A., Tramu G., Betbeder A. M., Styen P. S., Creppy E. E.: Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Arch. Toxicol.* 1998, 72, 656-662.
2. Castegnaro M., Bartsch M., Chernozemsky I. N.: Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. *Cancer Res.* 1987, 47, 3608-3609.
3. Chang C. F., Hamilton P. B.: Impairment of phagocytosis by heterophils from chicken during ochratoxicosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 39, 572-575.
4. Chang C. F., Doen J. A., Hamilton P. B.: Experimental ochratoxicosis in turkey poult. *Poultry Sci.* 1981, 60, 114-119.
5. Chiu S. Y., Wilson G. F.: The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. *Physiol.* 1989, 408, 199-222.
6. Doerr J. A., Huff W. E., Tung H. T., Wyatt R. D., Hamilton P. B.: A survey of T-2 toxin, ochratoxin, and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chicken. *Poultry Sci.* 1974, 53, 1728-1734.
7. Dubois B. R., Dubois J. M.: A quantitative analysis of the role of K<sup>+</sup> channels in mitogenesis of neuroblastoma cells. *Cell. Signal.* 1991, 3, 333-339.
8. Galtier P., Bonen B., Charpentier J. L., Bodin G., Salvinerie M., More J.: Physiopathology of haemorrhagic syndrome related to ochratoxin A intoxication in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 1979, 17, 49-50.
9. Gupta M., Bandyopadhyay S., Paul B., Majumder S. K.: Haematological changes produced in mice by ochratoxin A. *Toxicology.* 1979, 14, 95-98.
10. Hamilton P. B., Huff W. E., Harris Ray J., Wyatt R. D.: Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Sci.* 1982, 61, 1832-1841.
11. Hamilton P. B., Garlich J. D.: Aflatoxin as possible cause of fatty liver syndrome in laying hens. *Poultry Sci.* 1971, 50, 800-804.
12. Huff W. E., Wyatt R. D., Tucker T. L., Hamilton P. B.: Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Sci.* 1974, 53, 1585-1591.
13. Huff W. E., Wyatt R. D., Hamilton P. B.: Nephrotoxicity of dietary ochratoxin in broiler chicken. *Appl. Microbiol.* 1975, 38, 48-51.
14. Huff W. E., Chang C. F., Warren M. F., Hamilton P. B.: Ochratoxin A-induced iron deficiency anemia. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37, 601-604.
15. Krogh P., Axelsen N. H., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B., Hyldgaard-Jensen J., Larsen A. E., Madsen A., Mortensen H. P., Moller T., Petersen O. K., Ravnskov U., Rostgaard M., Aalund O.: Experimental porcine nephropathy changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A Suppl.* 1974, 246, 1-21.
16. Krogh P.: Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.* 1992, 30, 213-224.
17. Lea T., Steien K., Stomer F. C.: Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologie* 1989, 107, 153-159.
18. *Musashi-Fuchu*: Atlas of the brains of domestic animals. University of Tokyo Press, Tokyo 1969.
19. Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N., Castegnaro M.: Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan epidemic nephropathy and urinary system tumors in Bulgaria. *Food Addit. Contam.* 1988, 5, 299-301.
20. Smith J. W., Hamilton P. B.: Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Sci.* 1970, 49, 207-215.
21. Stoev S. D., Daskalov H., Radic B., Domijan A. M., Peraica M.: Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Vet. Res.* 2002, 33, 83-93.
22. Schaaf G. J., Najmeijer S. M., Maas R. F. M., Roestenberg P., de Groene E. M., Fink-Gremmels J.: The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1588, 149-158.
23. Summers B. A., Cummings J. F., De Lahunta A.: *Veterinary Neuropathology*, Mosby St. Luis 1995.
24. Szczech G. M.: Brain necrosis in mouse fetuses transplacentally exposed to the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981, 57, 127-137.
25. Warren M. F., Hamilton P. B.: Intestinal fragility during ochratoxicosis and aflatoxicosis in broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 40, 641-645.

Adres autora: dr hab. Zenon Soltysiak, ul. Sowińskiego 3/5, 51-685 Wrocław; e-mail: zenon @ozl.ar.wroc.pl

**DREW T. W., GRIERSON S. S., KING D. P., HICKS D., DONE S., NESER J. A., EVANS D. P. B., GRIMBEEK P., BANKS M.: Genetyczne podobieństwo pomiędzy cirkowirusem prosiąt typ 2 wyobnionym z pierwszego przypadku PMWS w Afryce Południowej i izolatami z Ameryki Północnej. (Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates). *Vet. Rec.* 155, 149-151, 2004 (5)**

Poodsadzeniowy wielonarządowy zespół wyniszczający (PMWS) wywołany przez cirkowirusu typu 2 (PCV-2) wystąpił po raz pierwszy w Południowej Afryce w czerwcu 2001 r. Początkowo chorobę, na którą chorowały warchlaki w wieku 2-3 mies. rozpoznano jako zapalenie skóry i zespół neuropatii. W listopadzie 2001 r. objawy kliniczne PMWS się nasiliły, a zachorowalność wynosiła 30-40% przy śmiertelności 10%. Obecność wirusa PCV-2 wykazano metodą immunohistochemiczną w tkankach 2 prosiąt wieku 12 i 15 tyg. Identyfikację wirusa potwierdzono testem PCR. Analiza fragmentu 501 nukleotydu wykazała identyczność izolatu z Afryki Południowej z izolatami pochodzącymi z Iowa, USA. Różnice, jak wykazała analiza całego genomu, dotyczyły tylko mutacji w ORF1 oraz zastąpienia leucyny przez walinę w ORF2. Istniała możliwość przeniesienia wirusa PCV-2 za pośrednictwem nasienia knurów z USA do Południowej Afryki.