

лния после криотерапии слабее чем после прижигания $AgNO_3$, а процент излечений после того же числа операций выше.

Zembrzycka H. — **The effectiveness of kriotherapy in follicular conjunctivitis (conjunctivitis folliculari) in dogs.**

The kriotherapy was tested in 18 dogs of different age and sex. It was found that triple freezing of third eyelid led to complete healing without complications in most cases. The inflammation symptoms after kriotherapy were slighter than after cauterization, and the per cent of healing was higher with the same number of operations.

Zembrzycka H. — **L'efficacité de la cryothérapie au cours de la conjunctivite folliculaire chez les chiens.**

L'efficacité de la cryothérapie fut vérifiée sur 18 chiens d'un age et d'un sexe différents. On constata

que trois congélations de la troisième paupière guérissent dans complications la majorité des cas. Les symptômes inflammatoires après la cryothérapie sont moins importants qu'après la cauterisation à l'aide du cryon d'azotate d'argent et le pourcent de guérissons plus élevé après le même nombre de manipulations.

Zembrzycka H. — **Wirksamkeit der Frigothérapie in conjunctivitis follicularis bei Hunden**

Die Wirksamkeit der Frigothérapie wurde bei 18 Hunden verschiedenen Alts und Geschlechts geprüft. So ist festgestellt worden, dass eine dreimalige Einfrierung des dritten Augenlides in Mehrheit der Fälle Heilung ohne Komplikationen herbeiführt. Entzündungserscheinungen bei der Frigothérapie sind geringer als bei Benützung von $AgNO_3$ und der Prozentsatz der Heilungen höher bei der gleichen Zahl der Eingriffe.

JAN STEC

Aflatoksyny — pochodzenie i właściwości

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: doc. dr T. JUSZKIEWICZ

Z całkowitej liczby gatunków organizmów żywych na świecie szacowanych na 2 000 000, pleśnie (lub grzyby niższe) stanowią około 100 000. Większość z nich w swych procesach metabolicznych produkuje substancje nietypowe a nawet szkodliwe dla innych form życia. Nazywamy je ogólnie mikotoksynami. Nawet tak pożyteczną penicylinę można uznać za mikotoksynę gdyż jest ona bardzo toksyczna dla wielu drobnoustrojów. Inne pleśnie wytwarzają toksyny, które mogą być bardzo szkodliwe dla ludzi i zwierząt wyższych. Te właśnie mikotoksyny stały się obecnie przedmiotem żywego zainteresowania we współczesnym żywieniu i medycynie. Pobudza ku temu wzrastająca liczba przypadków świadczących o szkodliwości pasz lub żywności porażonych mikotoksynami (26, 27, 56, 57, 58).

Wśród wielu mikotoksyn jedną z bardziej specyficznych grup stanowią aflatoksyny. Ich historia, mimo że jest krótka, miała bardzo burzliwy przebieg i była związana z wprowadzeniem do żywienia zwierząt makuchu i śruty arachidowej.

W 1960 r. zaczęto w Anglii masowo dodawać śrutę arachidową do różnych pasz treściwych przeznaczonych dla żywienia zwierząt, gdyż jak wiadomo zawiera ona bardzo dużo dobrze przyswajalnego białka. Spowodowało to niespodziewanie dużą ilość zatruc śmiertelnych u drobiu, głównie u indyków. W jednym tylko roku 1960 w Anglii padło ponad 100 000 indyków. Zdarzały się wypadki, że na jednej farmie ginęło od 800 do ponad 1000 indyków. Tę nową, nieznaną do tego czasu chorobę nazwano wtedy „Chorobą X” indyków (33, 40).

Wkrótce potem pojawiły się także doniesienia o zatruciach kacząt i bażantów (9), świń (29, 37) i bydła (4, 38), gdy zastosoowano do karmienia mieszanek paszowe zawierające pewne partie śruty arachidowej. Etiologia tych zatruc była bardzo podobna.

We wszystkich orzeszkach lub śrutach, które powodowały zatrucia u zwierząt stwierdzano zawsze pewną ilość pleśni *Aspergillus flavus*. Intensywnie prowadzone badania laboratoryjne wykazały wkrótce,

że szereg szczepów *Aspergillus flavus* może wytwarzać silne toksyny; nazwano je od sków nazwy gatunkowej *A. flavus* — aflatoksynami.

Wielokrotnie stawia się pytanie skąd biorą się aflatoksyny w orzeszkach. Odpowiedź sama się nasuwa jeżeli przypomnimy sobie, że owoce orzeszków ziemnych (*Arachis hypogea*) dojrzewają w ziemi i są uprawiane przeważnie w strefach klimatu tropikalnego. Większość autorów sugeruje, że w czasie „orzyszko-wego żniwa”, podczas ich magazynowania i transportu łatwo dochodzi do uszkodzenia zewnętrznej osłonki orzeszka która stanowi przeszkodę dla wnikięcia pleśni do ziarna. Zarodniki czy grzybnie szybko dostają się do uszkodzonego ziarna i rozwijając się produkują aflatoksyny (10).

Bardzo ciekawym i ważnym jest fakt, że orzeszki z jednego zbioru a nawet z jednego worka różnią się pod względem zawartości aflatoksyn (10, 21). Ostatnie doniesienia z Nowego Orleanu (21, 27) podają, że w jednej próbce orzechów można znaleźć takie ziarna, które zawierają kilkaset a nawet ponad tysiąc mg/kg aflatoksyn oraz takie, w których wykrywa się tylko jej ślady lub nie stwierdza się aflatoksyn w ogóle. Liczba wysoko toksycznych orzechów była z reguły dużo mniejsza od liczby nisko toksycznych. Należy jednak sądzić, że po wymieszaniu całej partii arachidów wszystkie próbki będą toksyczne. Stwierdzono także, że poszczególne części orzeszka różnią się znacznie zawartością aflatoksyn, przy czym najwięcej ich znajdowało się w liścieniach (27, 52). Warto jest jeszcze dodać, że pochodzenie orzeszków również decyduje o stopniu ich toksyczności. Za najbardziej toksyczne uważane są orzeszki brazylijskie. One to spowodowały masowe zatrucia u drobiu w 1960 r. w Anglii. Za najmniej szkodliwe uważane są indyjskie. Orzeszki z Gambii, Nigerii, Afryki Zach. określane są jako średnio toksyczne (46).

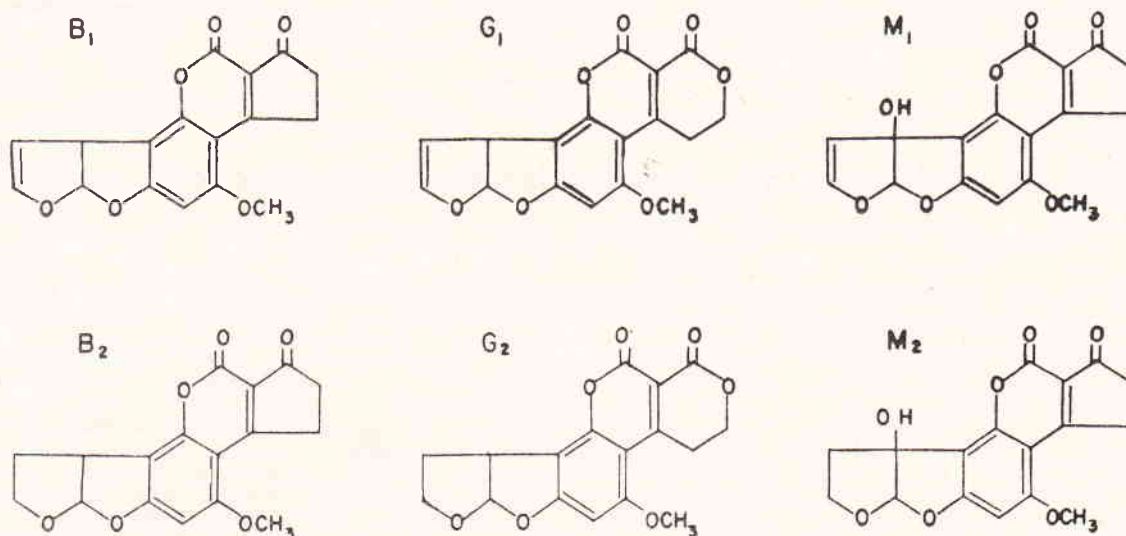
Właściwości fizyczne i chemiczne

Szczepy *Aspergillus flavus* produkują kilka związków chemicznych o podobnej budowie i właściwościach zwanych aflatoksynami lub też niekiedy dla uproszczenia — aflatoksyną. Najważniejsze z nich są 4 toksyny oznaczone symbolami B_1 i B_2 oraz G_1 i G_2 . Otrzymano je w postaci chemicznie czystej z ekstraktu metanolowego z orzeszków ziemnych

(20). Przy oczyszczaniu i rozdzielaniu mieszaniny czterech toksyn posługiwano się chromatografią cienkowarstwową oraz wykorzystano ich zdolność do silnej fluorescencji w świetle UV. Dwie z nich fluoryzujące niebiesko oznaczono literą B (od angielskiego blue), przy czym frakcję szybciej wędrującą na płycie pokrytej żelem krzemionkowym oznaczono cyfrą 1, a wolniej cyfrą 2. Dwie zaś pozostałe frakcje fluoryzujące zielono oznaczono jako G (od angielskiego green); cyfry 1 i 2 oznaczają również szybciej i wolniej wędrującą toksynę (2, 7, 14, 30).

z ekstraktów *Aspergillus flavus*. Są to aflatoksyny B_{2a} i G_{2a} różniące się od aflatoksyny B₂ i G₂ wartościami R_f oraz posiadające grupę hydroksylową w pozycji 2 pierścienia dihydrofuranowego (23, 24). W świetle UV aflatoksyny te fluoryzują bardzo podobnie, tak że można je rozróżnić na chromatogramie cienkowarstwowym jedynie przy pomocy wartości R_f, która jest nieco niższa niż dla toksyn B i G. Ważniejsze fizyko-chemiczne właściwości sześciu znanych aflatoksyn zestawiono w tabeli.

Wszystkie wymienione toksyny mają bardzo zbliżone właściwości chemiczne. Poprzez katalityczne



Wzory strukturalne aflatoksyn

Wykorzystując nowoczesne fizyko-chemiczne metody badań ustalono wzory strukturalne aflatoksyn (6, 7, 43, 46). Okazało się, że formy B₂ i G₂ są uwodnorodnionymi postaciami aflatoksyn B₁ i G₁. Zredukowane jest tylko podwójne wiązanie w zewnętrznym pierścieniu dihydrofuranowym (8). Oprócz głównych czterech aflatoksyn znane są jeszcze hydroksylowe pochodne formy B i G. Głównie spotyka się je w mleku i moczu zwierząt, którym podano toksyczną śrutę arachidową lub preparat czystych aflatoksyn B i G (3). Przyjęła się dla nich nazwa „aflatoksyny mleka” i stąd oznacza się je literami M jako M₁ i M₂ (5, 12, 33, 34); są to prawdopodobnie produkty częściowego metabolizmu formy B i G. Ostatnio doniesiono o wyizolowaniu 2 nowych form hydroksyaflatoksyn

uwodnorodnionego związku B₁ można otrzymać jako produkt reakcji związek B₂ z wydajnością ilościową (7). Silne kwasy ułatwiają katalityczne reagowanie z grupami hydroksylowymi. Traktowanie aflatoksyn kwasem trójchlorooctowym, trójchloromrówkowym lub trójfluorooctowym daje produkty, które w chromatografii cienkowarstwowej różnią się wartościami R_f lecz mają jednakową barwę fluorescencji. Obecność pierścienia laktonowego czyni aflatoksyny wrażliwymi na hydrolizę alkaliczną w wyniku czego przy traktowaniu ich alkaliami wiązanie laktonowe rozpada się z wytworzeniem grupy karboksylowej. Przy zakwaszaniu następuje reakcja odwrotna i otrzymujemy postać wyjściową danej aflatoksyny (33a). W stanie chemicznie czystym, np. na chromatogramie cienkowarstwowym, aflatoksyny są związkami wrażliwymi na niektóre czynniki otoczenia: temperaturę, światło, tlen z powietrza. Czynniki te powodują osłabienie natężenia fluorescencji, a pod wpływem długiego działania światła UV może nastąpić poważna degradacja ich struktury cząsteczkowej (33a).

Tab. 1. Fizyko-chemiczne dane aflatoksyn

Aflatoksyna	Wzór cząst.	Ciężar cząst.	Temp rozkł. °C	UV absorbcja (E)		Fluorescencja	R _f *
				265 mμ	362 mμ		
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	13400	21800	425	0,56
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	289	11000	20800	425	0,53
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	246	10000	16100	450	0,48
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240	11200	19300	450	0,46
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	11600	19000**)	425	0,40
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	300	293	10900	21000**)	—	—

* — chromatografia cienkowarstwową, żel krzemionkowy, chloroform : metanol (97:3)

** — przy 357 mμ

Aflatoksyny dobrze rozpuszczają się w tłuszczach oraz niektórych rozpuszczalnikach organicznych: chloroformie, metanolu, acetonie i octanie etylu. Nie rozpuszczają się w eterze naftowym, eterze etylowym, heksanie, pentanie i wodzie (6, 28, 50). Właściwości te wykorzystano w procesie ekstrakcji toksyn z materiału biologicznego i oczyszczania tych ekstraktów.

Analityka aflatoksyn opiera się przede wszystkim na chromatografii cienkowarstwowej oraz spektrofotometrii w nadfiolecie (14, 42).

Właściwości biochemiczne i toksykodynamika

Biochemiczne właściwości aflatoksyn badano na różnorodnych modelach biologicznych zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i roślinnego. Wśród wielu ważnych dla toksykologa właściwości aflatoksyn, na plan pierwszy wysuwa się ich wpływ na procesy biosyntezy białka w komórce.

Jak stwierdził Smith (51) aflatoksyna B₁ hamuje inkorporację leucyny znakowanej węglem C₁₄ do cząsteczki białka *in vitro* w skrawkach tkankowych z wątroby szczura i kaczki. Autor zaobserwował obniżenie o 20% szybkości inkorporacji tego aminokwasu w inkubacji zawierającym 80 mg skrawków wątroby szczura i 10 µg toksyny. Zupełne zahamowanie inkorporacji uzyskano przy dodaniu do takiego inkubatu 200 µg aflatoksyny. Gdy do doświadczenia wzięto skrawki z wątroby młodego kaczęcia znaczne obniżenie inkorporacji znakowanej leucyny uzyskano już przy dodatku do inkubatu 3,5 µg aflatoksyny B₁.

W doświadczeniu wykonanym na szczurach Shank i Wogan (48) badali *in vivo* wpływ aflatoksyn na inkorporację aminokwasów do cząsteczki białka. Po pojedynczej doustnej dawce toksyny w ilości 4.76 mg/kg początkowo obserwowano obniżenie szybkości syntezy białek potem zaś jej zwiększenie. Obniżenie było wyraźne po 30 min. od chwili podania aflatoksyn i osiągało najniższy poziom po 6 godzinach. Intensywność inkorporacji była wtedy zmniejszona o 50% w odniesieniu do wartości początkowej. Po 72 godzinach zaobserwowano podwyższenie szybkości syntezy białek w porównaniu do zwierząt, które nie otrzymały aflatoksyn.

Określony został także wpływ aflatoksyn na pewne specyficzne procesy enzymatyczne, biorące udział w syntezie białek na przykładzie tryptofanowej pyrolazy z wątroby szczura indukowanej przez hydrokortyzon i tryptofan (55). Badano zmianę aktywności tego enzymu w wątrobie dorosłych szczurów samców po 6 godzinach od dożylnego iniekcji 150 mg/kg hydrokortyzonu oraz 600 mg/kg tryptofanu. Zwierzęta otrzymujące 1 mg/kg aflatoksyny i hydrokortyzon nie wykazywały zmiany aktywności tego enzymu. Natomiast większe dawki toksyny, 3 i 5 mg/kg powodowały hamowanie aktywności pyrolazy tryptofanowej, utrzymujące się przynajmniej przez 10 dni. Z doświadczenia tego wynika, że aflatoksyna może hamować syntezę białek w niektórych specyficznych stadiach metabolicznych.

Wiele prac poświęcono także działaniu aflatoksyn na inne procesy biochemiczne, związane z biosyntezą białek a szczególnie na układ RNA i DNA (17, 18, 19). Aflatoksyny silnie hamują inkorporację cystydyny do

RNA w jądrze komórkowym raz obniżają aktywność RNA polymerazy prowadząc w sumie do poważnego obniżenia poziomu jądrowego RNA. Obniżenie aktywności RNA polymerazy uzyskano nawet na modelu *in vivo*. Ponadto zaobserwowano silne powinowactwo aflatoksyn do wiązania DNA.

Są to oczywiście niewystarczające dane aby poznać dokładnie mechanizm działania aflatoksyn na procesy biosyntezy białek, lecz jednocześnie jest to dosyć dużo, aby stwierdzić, że taki wpływ istnieje i jest bardzo niebezpieczny dla każdego organizmu żywego. Prawdopodobnie między innymi i tym należy tłumaczyć znaczne obniżenie ciężaru ciała zwierząt (szczególnie młodych) żywionych paszą zawierającą nawet małe stężenie aflatoksyn (12, 22, 36). Foy i wsp. (25) stwierdzali bardzo szybkie powstawanie zwyrodnienia wątroby u małych pawianów otrzymujących pokarm bez witamin B₂ i B₆, lecz zawierający aflatoksyny. Autorzy ci zaobserwowali również obniżenie poziomu witaminy B₁₂ we krwi zwierząt otrzymujących aflatoksyny obok pełnowartościowego pokarmu, co zostało również potwierdzone przez Juszkiewicza i wsp. (36). Zaburzenia tego typu mogą mieć związek z przemianą białek, gdyż witaminy z grupy B znane są jako niezbędne kofaktory wielu procesów metabolicznych w żywej komórce.

U zwierząt zatrutych aflatoksynami stwierdzono także obniżenie poziomu witaminy A z równoczesnym podwyższeniem zawartości tłuszczu w wątrobie (15, 29). W doświadczeniu nad wpływem aflatoksyn na niektóre biochemiczne wskaźniki u młodych kaczek stwierdzono znaczne zmiany w zawartości kwasu askorbinowego w wątrobie oraz w mniejszym stopniu we krwi. Zmianom tym towarzyszył, statystycznie znamienny spadek zawartości glikogenu w wątrobie oraz zaburzenia w aktywności esterazy cholinowej w krwinkach i zawartości niektórych elektrolitów w surowicy (36).

Warto tutaj dodać, że aflatoksyny mogą powodować także zaburzenia w procesach biochemicznych u roślin. Shoental i White (49) wykazali, że aflatoksyna B₁ w stężeniu 25 µg/ml hamuje wzrost sadzonek rzeżuchy (*Lepidum sativum*). Mniejsze stężenie (nawet 10 µg/ml) powodowały zanikanie syntezy chlorofilu i rośliny były barwy białej. Black i Astchul (11) donoszą, że w sadzonkach bawełny aflatoksyny hamują aktywność lipazy i α-amylazy, enzymów indukowanych przez kwas giberelinowy. Wpływ ten można porównać z opisanym powyżej hamowaniem tryptofanowym pyrolazy u zwierząt. Mechanizm obu tych procesów jest prawdopodobnie analogiczny, lecz na razie nie jest jeszcze wystarczająco wyjaśniony.

Brak jest danych na temat kumulacji aflatoksyn w tkankach, natomiast są interesujące wiadomości o wydalaniu aflatoksyn z organizmów żywych. Adye i Mateles (1) badali roz-

pad i wydalanie aflatoksyn z organizmów zwierzęcych stosując związki znakowane węglem C^{14} . Stosowano dwa typy aflatoksyn znaczone tym izotopem; jeden posiadał węgiel C^{14} w grupie metoksylowej (dołączona do pierścienia aflatoksyny) a drugi zawierał węgiel radioaktywny w pierścieniu. Po dootrzewnym wprowadzeniu takich związków badano ich rozpad i wydalanie. W pierwszym przypadku radioaktywność była wydalana w 75%: 25% z moczem, 25% z wydychanym powietrzem w postaci CO_2 , 25% z kałem i treścią jelit; w wątrobie pozostawało tylko 6–9% radio-

aktywności. W drugim przypadku węgiel znakowany był wydalany tylko z kałem i moczem. Nie stwierdzono go w wydychanym CO_2 . Wątroba gromadziła również około 8% aflatoksyny radioaktywnej. Wynikałoby z tego, że zwierzęta mogą przeprowadzać częściową demetylację aflatoksyn, lecz pierścień prawdopodobnie nie jest rozkładany. Jego wydalanie następuje poprzez żółć z kałem i moczem w postaci hydroksylowej pochodnej.

Wykaz cytowanego piśmiennictwa znajduje się u autora.

Adres autora: mgr Jan Stec, Puławy, Instytut Weterynarii.

TADEUSZ SOBOLEWSKI, STANISŁAW KMIĘCIAK
Gdynia

W sprawie artykułu „Toksyczność aflatoksyny dla zwierząt”

Artykuł M. Bohosiewicza i Z. Bubienia „Toksyczność aflatoksyny dla zwierząt” (Medycyna Weterynaryjna, 23, 12, 1967) w sposób interesujący omawia dotychczasowe wyniki badań nad toksycznym działaniem aflatoksyny dla zwierząt. Zawiera on jednak pewne nieścisłości, które wymagają sprostowania i uzupełnienia.

Przypuszczalnie wskutek długotrwałego okresu dzielącego złożenie artykułu od wydrukowania autorzy podają nieobowiązujące aktualnie normy dopuszczalnego udziału śruty zawierającej aflatoksyny w paszy dla poszczególnych gatunków zwierząt. Cytowana przez nich instrukcja Min. Rolnictwa z r. 1966 została zastąpiona szerszą, bardziej racjonalną, uwzględniającą postępy badań (załącznik do pisma Min. Rolnictwa do Min. Przemysłu Spoż. i Skupu z dnia 24.IV.1967). Wg nowych ustaleń nie dopuszcza się produktów arachidowych jako składników przemysłowych mieszanek pasz treściwych dla cieląt do 12 tygodni życia, prosiąt, kurcząt do 30 dnia życia, indyków, pstrągów, troci i zwierząt laboratoryjnych. Dla pozostałych grup zwierząt dopuszczalny procentowy udział produktów arachidowych w zależności od zawartości aflatoksyn i udziału innych składników zawierających toksyny podaje tabela 1.

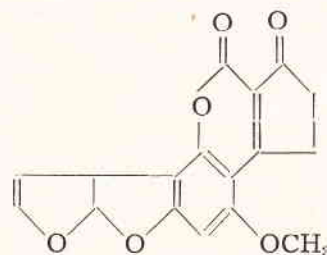
Nietrudno spostrzec, że ustalenia zawarte w powyższej tabeli różnią się znacznie od poprzednich z r. 1966: są od nich bardziej tolerancyjne. Te właśnie aktualnie obowiązujące normy są zbliżone do odpowiednich zaleceń angielskich (Code of Practice for Feeding-stuffs Industry).

Autorzy artykułu podają, że „w Polsce nie wykonywano dotychczas rutynowych oznaczeń aflatoksyny w śrudzie i makuchu arachidowym”. Pragniemy poinformować, że zagadnieniem oznaczania aflatoksyn zajmujemy się od kwietnia 1965 roku. Do chwili obecnej w Centralnym Laboratorium Chemicznym P.P. POLCARGO w Gdyni przebadaliśmy kilkaset partii śrut i makuchów arachidowych. Badanie na

zawartość aflatoksyn przeprowadzamy na zlecenie importera, którym jest C.H.Z. ROLIMPEX, w każdej partii na próbkach pobieranych bądź w porcie załadunku bądź przy wyładunku śrut. Ponieważ przed objęciem naszą kontrolą całego importu śrut arachidowej istniały w mieszalnicach podległych C.R.S. Samopomoc Chłopska pewne ilości śrut nie przebadanej na zawartość aflatoksyny, mieszalnice otrzymały polecenie (pismo CRS z dnia 20.01.1967) pobrania z tych partii średnich urzędowych prób i przekazania nam ich do badania.

Oznaczenia zawartości aflatoksyn przeprowadzamy wg metody Tropical Products Institute w Londynie (1) z modyfikacją polegającą na porównywaniu fluorescencji plamek z plamkami uzyskanymi przy zastosowaniu roztworu wzorcowego aflatoksyny oraz metodą uproszczonej ekstrakcji W. V. Lee (2). Nasze obserwacje na temat oznaczania aflatoksyn w arachidach i makuchach arachidowych przesłaliśmy do Przemysłu Spożywczego do wykorzystania.

Częściowego sprostowania i uzupełnienia wymaga także wzmianka artykułu Bohosiewicza i Bubienia na temat zachowania się aflatoksyn pod wpływem działania kwasów, zasad, naświetlania i temperatury oraz wzór chemiczny aflatoksyny B_1 , który przedstawia się następująco:



Aflatoksyna B_1

W podanym przez autorów wzorze pominięta została omyłkowo grupa metoksylowa — OCH_3 . Aflatoksyny B_2 i G_2 są dihydro-pochodnymi aflatoksyn B_1 i G_1 . We wszystkich tych związkach występują pierścienie laktonowe. W środowisku alkalicznym pierścień laktonowy związku organicznego otwiera się z utworzeniem grup karboksylowej i hydroksylowej. Rozkład ten nie jest trwały, gdyż pod wpływem kwasów pierścień laktonowy zostaje spowrotem zamknięty. W licznych pracach