

**Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i
Toksykologii Klinicznej
Akademii Medycznej w Gdańsku**

Marek Wiśniewski

**Badanie toksycznego działania gąski zielonki
(*Tricholoma equestre*) na mięśnie poprzecznie
prążkowane myszy**

Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. med. Zygmunt Chodorowski

Gdańsk 2008

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Zygmuntowi Chodorowskiemu
za wsparcie przy realizacji pracy
Dziękuję Pani Profesor Małgorzacie Sznitowskiej
za życzliwość i pomoc okazaną mi podczas przeprowadzania doświadczeń*

Pracę dedykuję mojej Rodzinie

SPIS TREŚCI

I. Wstęp	5
1. Wprowadzenie.....	5
2. Rys historyczny.....	5
3. Patofizjologia rabdomiolizy.....	7
4. Charakterystyka gąski zielonki.....	11
II. Cel pracy.....	14
III. Materiały i metody.....	15
1. Zbiór grzybów oraz przygotowanie ekstraktów.....	15
2. Opis procedur doświadczalnych	16
3. Przebieg doświadczeń.....	17
4. Analiza statystyczna.....	18
IV. Wyniki.....	19
V. Dyskusja.....	25
VI. Wnioski.....	31
VII. Bibliografia.....	32
VIII. Streszczenie.....	35

Skróty stosowane w tekście:

AST – aminotransferaza asparaginianowa

ADP - kwas adenozynodifosforowy

ATP – kwas adenozynotrifosforowy

barwienie H-E – barwienie hematoksyliną i eozyną

CK-MB - izoenzym sercowy kinazy kreatynowej

CPK – kinaza kreatynowa

G₆P – glukoza-6-fosforan

HK – heksokinaza

IU/l – międzynarodowe jednostki na litr

NADH – zredukowana forma dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NO – tlenek azotu

s.l. – sensu lato

T. auratum – gąska złota (*Tricholome dore*), *Tricholoma auratum* (Fr.) Gill.

T. equestre – gąska zielonka, *Tricholoma equestre* (L.) Kummer, synonim *Tricholoma flavovirens* (Pers.: Fr.) Lund. et Nannf.

I. Wstęp

1. Wprowadzenie

Na świecie występuje prawdopodobnie ponad 300 000 gatunków grzybów, w większości mikroskopijnych. Około 5000 gatunków to tak zwane grzyby owocnikowe, spośród których około 50-100 gatunków jest toksycznych dla człowieka, a około 200-300 jest uznawanych za jadalne. W owocnikach grzybów zawarte są stosunkowo duże ilości białek i aminokwasów, natomiast niewielkie są ilości tłuszczów i cholesterolu. Działanie wielu substancji zawartych w grzybach na organizm człowieka jest w dużym stopniu nieznane^{1,2}.

W ostatnich latach stwierdzono obecność w niektórych gatunkach grzybów (m.in. występująca w Azji *Tricholoma matsutake*) substancji wpływających na działanie układu immunologicznego, krzepnięcia, krwionośnego oraz obniżających stężenie cholesterolu we krwi a także substancji stymulujących proliferację osteoblastów. Obecnie trwają prace nad izolacją związków chemicznych odpowiedzialnych za te korzystne działania^{3,4}.

Zarówno w Polsce jak i na świecie zatrucia grzybami stanowią stosunkowo niewielki odsetek wszystkich zatruc. W większości przypadków czynnikiem toksycznym są substancje o działaniu drażniącym na przewód pokarmowy, natomiast zatrucia śmiertelne są najczęściej związane ze spożyciem grzybów zawierających amatoksyny^{1,5}.

2. Rys historyczny

Obyczaj zbierania i spożywania znalezionych w lesie grzybów jest głęboko zakorzeniony w kulturze europejskiej. Wzmianki o spożywaniu grzybów i o zatruciach nimi znajdujemy już w tekstach z okresu Cesarstwa Rzymskiego. Seneca przypisywane jest zdanie „**fungus, qualiscumque sit, semper malignus est**” (grzyb, jaki by nie był, zawsze jest szkodliwy) odzwierciedlające obawy przed spożywaniem potraw grzybowych. Przysmakiem cesarzy rzymskich był muchomor

cesarski, jeden z niewielu jadalnych przedstawicieli rodzaju *Amanita*. Niektórzy autorzy postulują, że najprawdopodobniej zamierzona błędna identyfikacja owocników tego grzyba przyczyniła się do śmierci cesarza rzymskiego Klaudiusza ⁶.

Znajomość wartości kulinarnych i działania toksycznego grzybów opiera się w znacznej mierze na tradycji i opisanych przypadkach zatruc, skutkiem czego co jakiś czas pojawiają się opisy nowych gatunków grzybów trujących, a także ujawniane są przypadki toksycznego działania grzybów uważanych za jadalne. Dane o toksyczności zasłonaków (*Cortinarius sp.*) znane są szeroko od lat 50-tych XX wieku, gdy doszło do wielu przypadków zatruc w Wielkopolsce ^{3, 7}. Także krowiak podwinięty (*Paxillus involutus*), nazywany popularnie olszówką, był do lat 60-tych uważany za grzyb jadalny, do czasu opisanego przypadków ciężkich ostrych i przewlekłych zatruc ^{5, 8}. Tylko od 1990 roku opisano kilka nowych rodzajów zatruc grzybami: w tym rabdomiolizę związaną ze spożyciem gąski zielonki, ostrą niewydolność nerek wywoływaną przez *Amanita proxima* i *Amanita smithiana* oraz erytromelalgię po zjedzeniu *Clitocybe amoenolens* ^{1, 9-11}.

Pierwsze doniesienie o toksycznym wpływie gąski zielonki na mięśnie poprzecznie prążkowane zostało opublikowane przez Bedry i wsp. w formie abstraktu w 1998. Autorzy opisali wówczas 8 przypadków rabdomiolizy po spożyciu dużych ilości grzyba określanego jako „tricholome equestre” (*Tricholoma flavovirens*) – nazwy tożsame z występującą w Polsce gąską zieloną ¹². W 2001 roku w *New England Journal of Medicine* ukazała się praca Bedry i wsp. zawierająca poza opisem 11 przypadków rabdomiolizy (w tym trzy przypadki śmiertelne) także badanie toksyczności na modelu zwierzęcym. Autorzy wykazali istotny wzrost aktywności kinazy kreatynowej (CPK), markera martwicy mięśni szkieletowych, przy zastosowaniu łącznej dawki liofilizatu grzyba 6g/kg masy ciała myszy przez trzy kolejne dni. Także w tej publikacji autorzy określili grzyby wywołujące rabdomiolizę jako *Tricholoma equestre/Tricholoma flavovirens* ¹³. Wyniki tej pracy spowodowały, iż w latach 2002-2006 we Francji, Włoszech i Hiszpanii wprowadzono zakaz skupu, sprzedaży oraz importu gąski zielonki ¹⁴⁻¹⁶.

Jesienią 2001 roku w Klinice Chorób Wewnętrznych i Ostrych Zatrucí AMG hospitalizowano dwoje chorych z umiarkowanie nasiloną rabdomiolizą. Pomimo rozszerzonej diagnostyki nie stwierdzono innego czynnika etiologicznego uszkodzenia mięśni poza spożyciem przez okres około tygodnia bardzo dużych ilości gąski zielonki¹⁷. Pozostałości grzybów zostały dostarczone do szpitala przez rodzinę chorych, a identyfikacja została potwierdzona przez mikologów z Instytutu Botaniki PAN w Krakowie. Przeprowadzone następnie na myszach badanie toksyczności z użyciem liofilizatu oraz ekstraktów wodnego i chloroformowo-metanolowego uzyskanych z grzybów w dawkach całkowitych do 12g suchej masy/kg nie wykazało podwyższenia aktywności CPK. Autorzy zinterpretowali wynik ujemny jako skutek rozpadu toksyny podczas przechowywania grzybów w temperaturze -20°C przez 12 miesięcy¹⁸.

W 2005 roku ukazało się badanie Nieminena i wsp., w którym stwierdzono efekt toksyczny gąski zielonki, ale dopiero przy użyciu dawek całkowitych 45g suchej masy grzyba na kg masy ciała myszy. Podobny wzrost kinazy kreatynowej wystąpił także w grupie myszy otrzymującej liofilizat borowika szlachetnego (*Boletus edulis*) w tej samej dawce¹⁹. W 2006 roku autorzy fińscy opublikowali kolejne wyniki wskazujące na toksyczne działanie na mięśnie poprzecznie prążkowane także innych grzybów uważanych za jadalne: pieprznika jadalnego (*Cantharellus cibarius*), koźlarza pomarańczowożółtego (*Leccinum versipelle*) i gołąbków (*Russula sp.*) w dawce całkowitej 45g/kg masy ciała myszy²⁰.

3. Patofizjologia rabdomiolizy

Rabdomioliza jest zespołem chorobowym związanym z uszkodzeniem i martwicą mięśni poprzecznie prążkowanych, co powoduje uwolnienie do krwi m.in. mioglobiny, elektrolitów i innych białek cytoplazmatycznych. Do uszkodzenia miocytów dochodzi wskutek zaburzeń funkcjonowania lub przerwania ciągłości błony komórkowej. W procesie rabdomiolizy kluczową rolę odgrywa stężenie jonów wapnia w cytoplazmie miocytów. Komórki mięśni poprzecznie prążkowanych utrzymują stały poziom wapnia w cytoplazmie dzięki zachowaniu

ciągłości błony komórkowej oraz poprzez czynny transport jonów wapniowych zarówno do płynu pozakomórkowego, jak też do cystern retikulum endoplazmatycznego gładkiego. Do niekontrolowanego wzrostu stężenia jonów wapnia dochodzi najczęściej w dwóch mechanizmach: bezpośredniego uszkodzenia błony komórkowej lub wyczerpania rezerw energetycznych komórki powodującego zahamowanie procesów transportu. Nagły wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie wyzwała kolejne mechanizmy uszkadzające komórkę mięśniową: aktywację fosfolipazy A2 i innych proteaz, ciągły skurcz miocyta powodujący gwałtowne wyczerpywanie rezerw energetycznych, zwiększenie zawartości wapnia w mitochondriach i zahamowanie produkcji ATP. Do uszkodzenia dochodzi także na poziomie tkankowym, bowiem uwolnienie z uszkodzonych komórek toksycznych metabolitów wywołuje reakcję zapalną. W wyniku zwiększenia przepuszczalności naczyń włosowatych rozwija się obrzęk i miejscowe niedokrwienie, co prowadzi do dalszego zmniejszenia produkcji energii^{21, 22}.

Najczęstsze czynniki wyzwalające rabdomiolizę to: bezpośrednio uszkodzenie mięśni w czasie urazów, czynniki toksyczne oraz nadmierne obciążenie mięśni. Omówienie wszystkich znanych czynników wykracza poza ramy niniejszej pracy. Wybrane toksyczne czynniki wywołujące rabdomiolizę, opisywane w literaturze medycznej, przedstawiono w tabeli 1^{12, 13, 17, 21-28}.

Rozpoznanie rabdomiolizy oparte jest na objawach klinicznych i stwierdzeniu biochemicznych wskaźników martwicy komórek mięśniowych. Objawy takie jak ból, obrzęk, niedowład lub obniżenie siły mięśniowej stwierdza się zaledwie u około 50% chorych. Proces chorobowy najczęściej obejmuje grupy mięśni poddawane największym obciążeniom – mięśnie ud, pośladkowe, rzadziej mięśnie obręczy barkowej i kończyn górnych. Charakterystyczna jest zmiana zabarwienia moczu na czerwono-brązowe, związana z obecnością w nim mioglobiny. W ciężkich przypadkach mogą wystąpić objawy ogólnoustrojowej reakcji zapalnej: wstrząs, dreszcze, wzmożona potliwość, nudności, wymioty^{21, 22}.

Tabela 1. Wybrane toksyczne czynniki wywołujące rabdomiolizę

Leki	kwas gammahydroksymasłowy (GHB)
statyny	Alkohole i rozpuszczalniki organiczne
fibraty	etanol
metadon	glikol etylenowy
benzodiazepiny	izopropanol
barbiturany	toluen
leki przeciwdepresyjne	Toksyny roślinne i zwierzęce
neuroleptyki	jady węży
leki antyhistaminowe	jady błonkoskrzydłych
amfoterycyna B	jady pajaków
paracetamol	choroba Haff
diuretyki	bieluń dziędzierzawa (<i>Datura stramonium</i>)
glikokortykosteroidy	szczwół plamisty (<i>Conium maculatum</i>) –
azatiopryna	bezpośrednio lub przez spożywanie
salicylany	przepiórek (<i>Coturnix coturnix</i>)
teofilina	<i>Coutarea latiflora</i>
wazopresyna	Grzyby
fenytoina	<i>Russula subnigricans</i>
chinidyna	<i>Psilocybe sp.</i>
retinoidy	gąska zielonka <i>T. equestre/T. auratum?</i>
Narkotyki	Inne
amfetamina i pochodne	parafenylenodiamina
heroina	tlenek węgla
kokaina	
fencyklidyna (PCP)	

Najczęściej wykorzystywanym do wykrywania rabdomiolizy markerem biochemicznym jest oznaczenie aktywności CPK w surowicy. Parametr ten zaczyna narastać po około 3 godzinach od momentu uszkodzenia komórek mięśniowych,

osiąga najwyższy poziom w ciągu 24-48 godzin i powoli obniża się w czasie 3-5 dni. Nie określono granicznej wartości CPK dla rozpoznania rhabdomyolizy, jednak większość autorów wykorzystuje wartość pięciokrotną powyżej normy (około 1000 IU/l). Poziom CPK słabo koreluje z częstością występowania ostrej niewydolności nerek, niemniej uważa się, że ryzyko jej wystąpienia u pacjentów z poziomem CPK poniżej 3000 IU/l jest bardzo niskie²².

W przebiegu rhabdomyolizy dochodzi także do gwałtownego wzrostu mioglobiny w surowicy i w moczu. W surowicy mioglobina pojawia się po 1 do 3 godzin od uszkodzenia mięśni, osiąga szczyt w 8-12 godzin i powraca do normy w ciągu 24 godzin. Ze względu na krótki czas półtrwania w surowicy wynoszący 2-3 godziny, mniejszą dostępność i wyższy koszt oznaczenia mioglobiny w surowicy, jest ona mniej użyteczna w praktyce klinicznej niż CPK. Mioglobinę można także oznaczać w moczu, jednakże najczęściej wystarczające jest stwierdzenie produktów rozpadu erytrocytów w badaniu ogólnym moczu wynikające z obecności hemu w cząsteczce mioglobiny, któremu nie towarzyszy obecność krwinek czerwonych w osadzie moczu^{21,22}.

Do zlokalizowania grup mięśni objętych procesem rhabdomyolizy mogą być wykorzystane badania obrazowe. Najlepsze wyniki uzyskuje się przy użyciu rezonansu magnetycznego, nieco niższe są czułość i specyficzność tomografii komputerowej i ultrasonografii^{21,22}.

Najczęściej obserwowanym powikłaniem rhabdomyolizy jest ostra niewydolność nerek. W ciężkich przypadkach może dojść także do niewydolności oddechowej (przy zajęciu mięśni oddechowych), zaburzeń rytmu serca w przebiegu znacznej hiperkaliemii, zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, hipertermii i wstrząsu ciepłego^{21,22}.

Do uszkodzenia nerek w przebiegu rhabdomyolizy dochodzi głównie wskutek nadmiernego stężenia mioglobiny we krwi. W warunkach fizjologicznych mioglobina jest filtrowana w kłębuszkach nerkowych a następnie ulega całkowitej resorpcji w cewkach proksymalnych, po czym jest rozkładana do globiny i hemu. O ile nie zostanie przekroczony próg nerkowy wynoszący około 100 mg/l, mioglobina nie jest obecna w moczu ostatecznym. W sytuacji zniszczenia więcej niż 100 g

tkanki mięśniowej dochodzi do przekroczenia progu nerkowego i obecna w moczu ostatecznym mioglobina odkłada się w świetle cewek zbiorczych powodując ograniczenie, a nawet zablokowanie odpływu. Proces ten może być ograniczony przez podniesienie pH moczu oraz zwiększenie przepływu w cewkach zbiorczych. Ponadto dochodzi także do odkładania dużych ilości hemu i jonów żelaza w kłębuszkach, co prowadzi do zmniejszenia stężenia tlenku azotu (NO) i niedokrwienia. Proces rozpadu hemu zachodzi wolniej w wyższym pH. Leczenie opiera się na podawaniu dużych ilości płynów dożylnie (nawet do 12 litrów ciągu 12 godzin) celem zapewnienia odpowiedniej perfuzji nerkowej i diurezy wynoszącej co najmniej 2 ml/kg masy ciała/godzinę. Wskazane jest osiągnięcie pH krwi w zakresie 7,40-7,45 oraz moczu powyżej 6,5 poprzez podawanie dożylnie wodorowęglanu sodu. Zwiększenie diurezy i zmniejszenie obrzęku mięśni można osiągnąć podając dożylnie mannitol²².

Rokowanie w rabdomiolizie jest stosunkowo dobre o ile zostanie szybko zastosowane odpowiednie leczenie. Śmiertelność wynosi około 8-10%. Rzadko obserwuje się trwałe uszkodzenie mięśni. Pacjenci, u których dochodzi do rozległego uszkodzenia mięśni mogą odzyskać pełną sprawność ruchową dzięki rehabilitacji²².

4. Charakterystyka gąski zielonki

Gąska zielonka [*Tricholoma equestre* (L.) Kummer, synonim *Tricholoma flavovirens* (Pers.: Fr.) Lund. et Nannf.] jest najbardziej znanym w Polsce przedstawicielem liczącego ponad 60 gatunków rodzaju *Tricholoma*. Kapelusz jest barwy żółto-zielonkawej, czasem brązowawej, ma średnicę od 4 do 8 cm. Powierzchnia kapelusza jest włóknista, u starszych okazów może być popękana, a w warunkach wilgotnych powierzchnia może być nieco lepka. Brzegi kapelusza są u młodszych okazów podwinięte, u starszych zaś pofalowane. Od spodu kapelusza widoczne są blaszki koloru żółtego, wąsko przyrośnięte lub wykrojone ząbkami. Trzon jest podobnego koloru jak blaszki, nieco od nich jaśniejszy, długości 3-9 cm i średnicy 1-3 cm. Kształt trzonu jest walcowaty, powierzchnia gładka lub drobno

kosmkowata. Miąższ jest białawy lub bladożółty, nie zmienia zabarwienia. Smak miąższu jest łagodny, zapach podobny jak świeżej mąki. Zarodniki są kształtu elipsoidalnego, koloru białego, mają wymiary 6-8 x 3,5-5 μm (ryc.1 i 2)^{2, 29, 30}.



Rycina 1. Gąska zielonka *Tricholoma equestre* (L.) Kummer - grzyby zebrane we Wdzydzkim Parku Krajobrazowym

Gąska zielonka jest grzybem pospolitym, występującym na całym świecie w strefie klimatu umiarkowanego. W Polsce wyrasta w okresie od końca września do późnej jesieni, częściej na nizinach niż w górach. Najczęściej znajdowana jest w lasach iglastych na podłożu piaszczystym². Do niedawna była powszechnie uznawana za grzyb jadalny, ceniony szczególnie za swój wyjątkowy smak i aromat. Pomimo doniesień w prasie naukowej, a także popularnej, o jej potencjalnym działaniu toksycznym w dalszym ciągu jest w naszym kraju zbierana i skupowana. Wydaje się, że ograniczenia w obrocie gąską we Włoszech, Francji i Hiszpanii nie miały większego wpływu na obrót gąską zielonką na terenie Polski. Drugim często

zbieranym w Polsce gatunkiem gąski jest gąska niekształtna (*Tricholoma portentosum*), popularnie nazywana gąską siwą.



Rycina 2. Przekrój owocnika gąski zielonki

Niektórzy autorzy francuscy wyróżniają w obrębie gatunku *Tricholoma equestre* odmianę lub podgatunek *Tricholoma auratum* (Fr.) Gill.. Różnice pomiędzy jedną a drugą odmianą są bardzo niewielkie. *T. auratum* ma bardziej śluzowaty kapelusz w porównaniu z *T. equestre* i występuje wyłącznie w nadmorskich lasach sosnowych na podłożu piaszczystym. Nie wiadomo czy w Polsce występuje tylko jeden z powyższych, czy być może oba rodzaje gąski zielonki³⁰.

Wysyłki autora poniższej pracy skierowane na pozyskanie owocników *Tricholoma auratum* z Francji celem porównania ich z polską gąską zielonką nie przyniosły rezultatów. Z punktu widzenia szeregowego grzybiarza, pod względem morfologicznym grzyby te są praktycznie nie do odróżnienia³⁰.

II. Cel pracy

Celem pracy było rozstrzygnięcie kontrowersyjnego problemu toksyczności gąski zielonki występującej w Polsce. Ze względu na powszechność spożywania gąsek w naszym kraju oraz znikomą ilość zarejestrowanych ostrych zatruć wydaje się, że za działanie toksyczne może odpowiadać odmiana *T. equestre*, bardzo rzadko występująca na terenie naszego kraju lub też warunki wegetacji w Polsce skutkują występowaniem mniejszej ilości substancji toksycznych w owocnikach. Możliwe jest też, że do istotnego klinicznie uszkodzenia mięśni dochodzi tylko przy spożywaniu wyjątkowo dużych ilości grzyba. Ze względu na wątpliwości, co do obecności w Polsce jednej lub dwóch odmian gąski zielonki, różniących się głównie miejscem występowania, dokonano porównania grzybów zebranych w dwóch różnych siedliskach: w nadmorskich borach sosnowych w okolicach Łeby oraz w borach świeżych we Wdzydzkim Parku Krajobrazowym w pobliżu miejscowości Wiele.

III. Materiały i metody

1. Zbiór grzybów i przygotowanie ekstraktów

Grzyby zbierano w październiku 2004 roku. Grzyby oznaczone jako A zebrano w borach świeżych (las mieszany z przewagą sosny) w okolicach miejscowości Wiele we Wdzydzkim Parku Krajobrazowym (2 wyjazdy terenowe), natomiast grzyby B w sosnowych borach nadmorskich w pobliżu Łeby (1 wyjazd). Owocniki były identyfikowane w czasie zbiorów przez doświadczonego mikologa. Wstępna identyfikacja została następnie potwierdzona badaniem mikroskopowym grzybów i ich zarodników. Nie stwierdzono istotnych morfologicznie różnic między owocnikami zbieranymi w dwóch różnych siedliskach tzn. grzyby A nie różniły się od grzybów B bardziej niż między sobą w ramach grupy.

Po identyfikacji grzyby były rozdrobnione i przechowywane w zamrożeniu w temperaturze -20°C przez okres do 30 dni. Następnie grzyby poddano liofilizacji. Uzyskana sucha masa została utarta w moździerzu i przesiana przez sito celem oddzielenia cząstek mniejszych niż $80\ \mu\text{m}$, które zostały wykorzystane do podania myszom w dwóch grupach o najmniejszym dawkowaniu.

Ze względu na niewielką objętość żołądka zwierząt celem podawania większych dawek konieczne było zastosowanie ekstraktów. Ponieważ w pracy Bedry i wsp. nie stwierdzono różnic toksyczności pomiędzy ekstraktem wodnym a chloroformowo-metanolowym, ze względu na łatwość podawania zdecydowano się zastosować wyłącznie ekstrakty wodne¹³. Liofilizat grzybów gotowano w temperaturze 95°C przez 1 godzinę, następnie filtrowano i poddano ponownej liofilizacji. Tym sposobem z 50 g liofilizatu grzybów A otrzymano 20 g suchego wodnego ekstraktu, natomiast z 50 g liofilizatu grzybów B 19 g suchego wodnego ekstraktu.

Jako kontrolę dodatnią wykorzystano parafenylenodiaminę (CAS: 106-50-30), pochodną benzenu o znanym działaniu toksycznym na mięśnie poprzecznie prążkowane u myszy³¹. Parafenylenodiaminę zakupiono bezpośrednio od producenta - Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. (nr kat. cz-414960427).

Liofilizat, ekstrakty i parafenylenodiaminę rozpuszczano w wodzie do wstrzyknięć (Aqua pro injectione, BAXTER TERPOL).

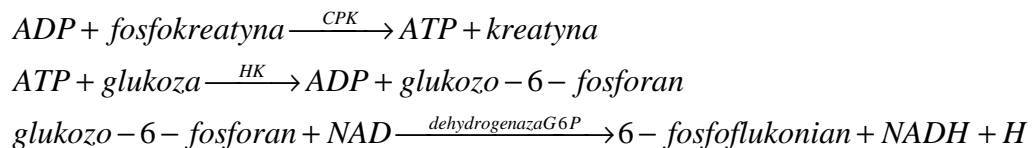
2. Opis procedur doświadczalnych

Doświadczenia przeprowadzono w Zwierzętarńi Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Na realizację projektu uzyskano zgodę nr 29/03 z dnia 16.06.2003 Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Badań nad Zwierzętami przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Badania przeprowadzono na dorosłych samcach myszy szczepu BALB/c o wadze 24-30 g, sprowadzonych ze Zwierzętarńi Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. Zwierzęta przebywały w warunkach kontrolowanej temperatury i wilgotności, w całym okresie badań miały swobodny dostęp do standardowej paszy oraz wody.

Badane liofilizaty i ekstrakty grzybów, wodę i roztwór wodny parafenylenodiaminy podawano raz dziennie przez zgłębnik dożołądkowy przez 5 kolejnych dni. W 8 dniu doświadczenia (72 godziny od ostatniej dawki badanych roztworów) w znieczuleniu wziewnym sewofluranem pobierano krew na skrzep metodą swobodnego wypływu poprzez odcięcie końca ogona.

Oznaczenia aktywności kinazy kreatynowej dokonywano w surowicy po odwirowaniu metodą kinetyczną przy użyciu odczynników POINTE SCIENTIFIC (nr katalogowy C 7512). Metoda wykorzystuje następujący szereg reakcji:



Kinaza kreatynowa (CPK) przenosi grupę fosforanową z fosfokreatyny na ADP, produkując ATP i kreatynę. Enzym pomocniczy, heksokinaza (HK), wykorzystuje powstałe w pierwszej reakcji ATP do tworzenia glukozy-6-fosforanu (G₆P), który jest utleniany przez dehydrogenazę G₆P do 6-fosfoglukonianu z wytworzeniem zredukowanej formy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH). Produkcja

NADH, mierzona z wykorzystaniem światła o długości fali 340 nm, jest wprost proporcjonalna do aktywności CPK³².

Następnie myszy uśmiercano metodą dyslokacji kręgów szyjnych. Od co drugiego zwierzęcia z każdej grupy pobierano wycinki z mięśnia czworogłowego prawej kończyny tylnej celem wykonania badania histopatologicznego.

Wycinki mięśni po utrwaleniu zostały poddane barwieniu hematoksyliną i eozyną (H-E). Badanie histopatologiczne zostało przeprowadzone przez wykwalifikowanego patomorfologa.

3. Przebieg doświadczeń

Myszy podzielono na 9 grup po 10 zwierząt w każdej grupie. Dawki ekstraktu wodnego gąski podano w przeliczeniu na ilość liofilizatu grzyba użytą do uzyskania ekstraktu. Wszystkie zwierzęta otrzymywały badane roztwory przez zgłębnik dożołądkowy raz dziennie przez 5 kolejnych dni:

grupa 1 – 0,1 ml wody do wstrzyknięć - kontrola ujemna

grupa 2 – roztwór wodny parafenylenodiaminy w dawce 35mg/kg/dzień – kontrola dodatnia 1

grupa 3 – roztwór wodny parafenylenodiaminy w dawce 70 mg/kg/dzień – kontrola dodatnia 2

grupa 4 – zawiesina wodna liofilizatu gąski A w dawce 3g/kg/dzień

grupa 5 - zawiesina wodna liofilizatu gąski B w dawce 3g/kg/dzień

grupa 6 – ekstrakt wodny gąski A w dawce 6g/kg/dzień

grupa 7 - ekstrakt wodny gąski B w dawce 6g/kg/dzień

grupa 8 – ekstrakt wodny gąski A w dawce 12g/kg/dzień

grupa 9 - ekstrakt wodny gąski B w dawce 12g/kg/dzień.

Myszy były ważone przed każdym podaniem badanych roztworów, a także przed pobraniem krwi.

W grupie 3 siedem zwierząt padło przed zakończeniem doświadczenia. W pozostałych grupach w czasie prowadzonych badań nie obserwowano istotnych zmian w zachowaniu myszy i przyjmowaniu przez nie paszy i wody.

4. Analiza statystyczna

Uzyskane wartości aktywności CPK w surowicy myszy przedstawiono w jednostkach międzynarodowych (IU/l) \pm błąd standardowy średniej (SEM). Uzyskane dane poddano analizie statystycznej metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroniego zastosowanym po teście ANOVA (post-ANOVA Bonferroni test).

Porównania wagi ciała myszy na początku i na końcu doświadczenia dokonano testem t dla zmiennych zależnych.

Wyniki oceniano jako statystycznie znamienne dla p mniejszego od 0,05 ($p < 0,05$).

Do obliczeń wykorzystano pakiet statystyczny STATISTICA 6.0.

IV. Wyniki

Zmiany aktywności CPK w badanych grupach

Porównanie aktywności CPK w badanych grupach przedstawiono w tabeli 2 oraz na wykresie 1. W tabeli 3 przedstawiono porównanie początkowej i końcowej wagi myszy, natomiast w tabeli 4 porównanie pomiędzy grzybami A i B w dawkach 3, 6 i 12 g/kg/dzień.

Tabela 2. Porównanie aktywności CPK w badanych grupach

Grupa	Liczba zwierząt w grupie	Średnia aktywność CPK \pm SEM (IU/l)	p vs grupa 1 (ANOVA Bonferroni test)
1.woda	10	259,3 \pm 11,6	-
2.parafenylenodiamina 35mg/kg/dzień	10	512,9 \pm 14,2	<0,0001
3.parafenylenodiamina 70mg/kg/dzień*	3	689,9 \pm 187,3	-
4.gąska A 3g/kg/dzień	10	315,4 \pm 31,7	1,0
5.gąska B 3g/kg/dzień	10	287,4 \pm 27,7	1,0
6.gąska A 6g/kg/dzień	10	351 \pm 24,3	0,366
7.gąska B 6 g/kg/dzień	10	372,3 \pm 32,2	0,077
8.gąska A 12g/kg/dzień	10	497,7 \pm 23,6	<0,0001
9. gąska B 12 g kg/dzień	10	472,7 \pm 31,7	<0,0001
*grupa wyłączona z analizy wariacji (ANOVA) ze względu na małą liczebność			

W grupie 1 (kontrola ujemna) otrzymującej wodę do wstrzyknięć aktywność CPK wynosiła średnio 259,3 \pm 11,6 IU/l. Średnia waga myszy na początku doświadczenia - 25,7 \pm 1,3 g nie różniła się istotnie od wagi końcowej 25,3 \pm 2 g.

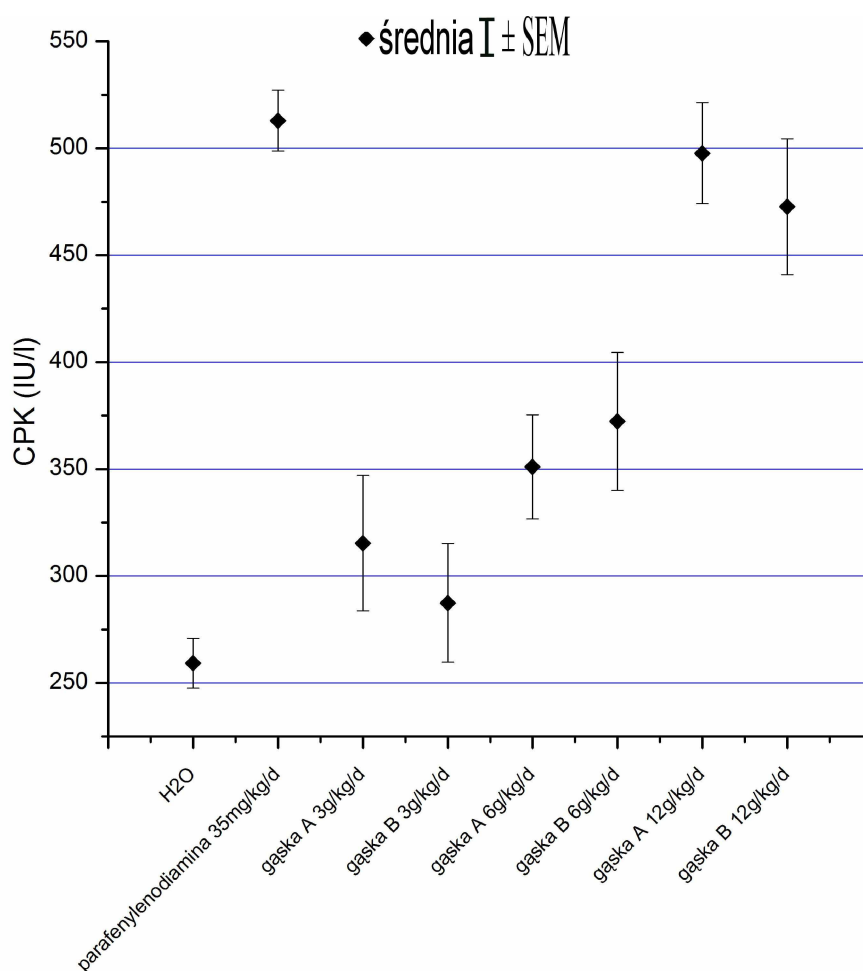
W grupie 2 (kontrola dodatnia) otrzymującej roztwór parafenylenodiaminy w dawce 35mg/kg/dzień aktywność CPK wynosiła średnio 512,9 \pm 14,2 IU/l i była

znamiennie wyższa niż w grupie 1 ($p < 0,01$; ANOVA Bonferroni test). Średnia waga myszy na początku doświadczenia - $27,4 \pm 1,4$ g nie różniła się istotnie od wagi końcowej $26,9 \pm 1,6$ g.

W grupie 3 otrzymującej parafenylenodiaminę w dawce 70 mg/kg/dzień siedem myszy zginęło przed zakończeniem doświadczenia. Aktywność CPK w tej grupie wynosiła średnio $689,9 \pm 187,3$ IU/l. Ze względu na małą liczebność grupę tę wyłączono z analizy statystycznej.

Wykres 1

Porównanie średniej aktywności CPK w badanych grupach



Myszy w grupach 4 i 5 otrzymywały zawiesinę wodną liofilizatu odpowiednio gaśki zielonki A i B w dawce 3 g/kg/dzień . Średnia aktywność CPK w tych grupach wynosiła odpowiednio $315,4 \pm 31,7$ IU/l i $287,4 \pm 27,7$ IU/l i nie różniła

się istotnie od aktywności CPK w grupie 1. Nie stwierdzono także różnicy pomiędzy grupą 4 a 5 w zakresie aktywności CPK. W grupie 4 końcowa waga myszy ($25,6 \pm 1,3$ g) była znamienne niższa od wagi początkowej ($26,7 \pm 1,6$ g) ($p < 0,05$, test t Studenta). W grupie 5 różnica między wagą końcową ($24,9 \pm 1,4$) a początkową ($26,1 \pm 1,4$ g) nie była istotna statystycznie.

Grupy 6 i 7 otrzymywały ekstrakt wodny gąsek A i B w dawce 6g/kg/dzień. Aktywność CPK wyniosła odpowiednio $351 \pm 24,3$ i $372,3 \pm 32,2$ IU/l i nie różniła się znamienne od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej ujemnej. Nie stwierdzono także istotnej statystycznie różnicy między grupą 6 a grupą 7. Waga myszy na początku (odpowiednio $25,3 \pm 1,3$ i $25,8 \pm 1,1$ g) i na końcu doświadczeń ($25,3 \pm 1,3$ i $26,9 \pm 1$ g) nie różniła się znamienne.

Tabela 3. Porównanie wagi ciała myszy badanych grupach

Grupa (N)	Waga początkowa średnia \pm SEM (g)	Waga końcowa średnia \pm SEM (g)	p (test t)
1.woda (10)	$25,7 \pm 1,3$	$25,3 \pm 2$	0,625
2.parafenylenodiamina 35mg/kg/dzień (10)	$27,4 \pm 1,4$	$26,9 \pm 1,6$	0,51
3.parafenylenodiamina 70mg/kg/dzień (3)*	$27,3 \pm 0,57$	$28,7 \pm 0,57$	-
4.gąska A 3g/kg/dzień (10)	$26,7 \pm 1,6$	$25,6 \pm 1,3$	<0,01
5.gąska B 3g/kg/dzień (10)	$26,1 \pm 1,4$	$24,9 \pm 1,4$	0,066
6.gąska A 6g/kg/dzień (10)	$25,3 \pm 1,3$	$25,3 \pm 1,3$	1
7.gąska B 6 g/kg/dzień (10)	$25,8 \pm 1,1$	$26,9 \pm 1$	0,066
8.gąska A 12g/kg/dzień (10)	$26,9 \pm 1$	$26,1 \pm 1,4$	0,103
9. gąska B 12 g kg/dzień (10)	$26,4 \pm 1$	$26,1 \pm 1,3$	0,434
*grupa wyłączona z analizy ze względu na małą liczebność			

Myszy w grupach 8 i 9 otrzymały najwyższe dawki ekstraktu z gąsek, wynoszące w przeliczeniu na liofilizat (suchą masę grzyba) 12g/kg/dzień, czyli łączną dawkę 60g/kg. Aktywność CPK w tych grupach wyniosła odpowiednio

497,7±23,6 i 472,7±31,7 IU/l i była znamienne wyższa niż w grupie 1 ($p < 0,01$; ANOVA Bonferroni test). Nie stwierdzono istotnej różnicy aktywności CPK pomiędzy grupami otrzymującymi ekstrakty grzybi A i B. Waga końcowa myszy wynosiła odpowiednio 26,1±1,4 i 26,1±1,3 g i nie różniła się znamienne od wagi początkowej (26,9±1 i 26,4±1g).

Tabela 4. Porównanie aktywności CPK pomiędzy grupami otrzymującymi grzyby zbierane w różnych siedliskach

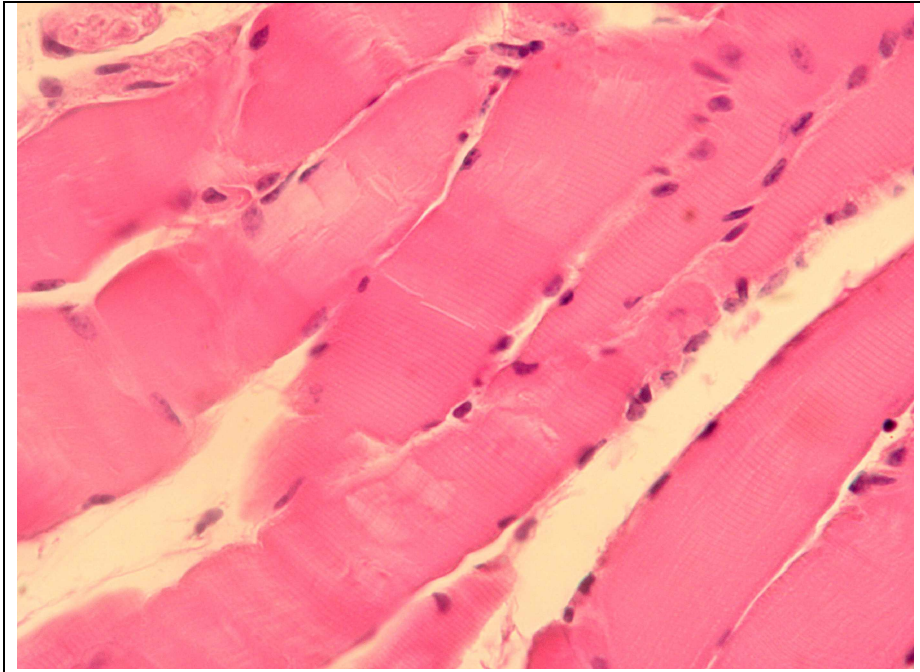
dawka (liofilizat)	Aktywność CPK średnia±SEM (IU/l)		p A vs B (ANOVA Bonferroni test)
	Grzyby A	Grzyby B	
3 g/kg/dzień	315,4±31,7	287,4±27,7	1
6 g/kg/dzień	351±24,3	372,3±32,2	1
12 g/kg/dzień	497,7±23,6	472,7±31,7	1

Wyniki badania histopatologicznego

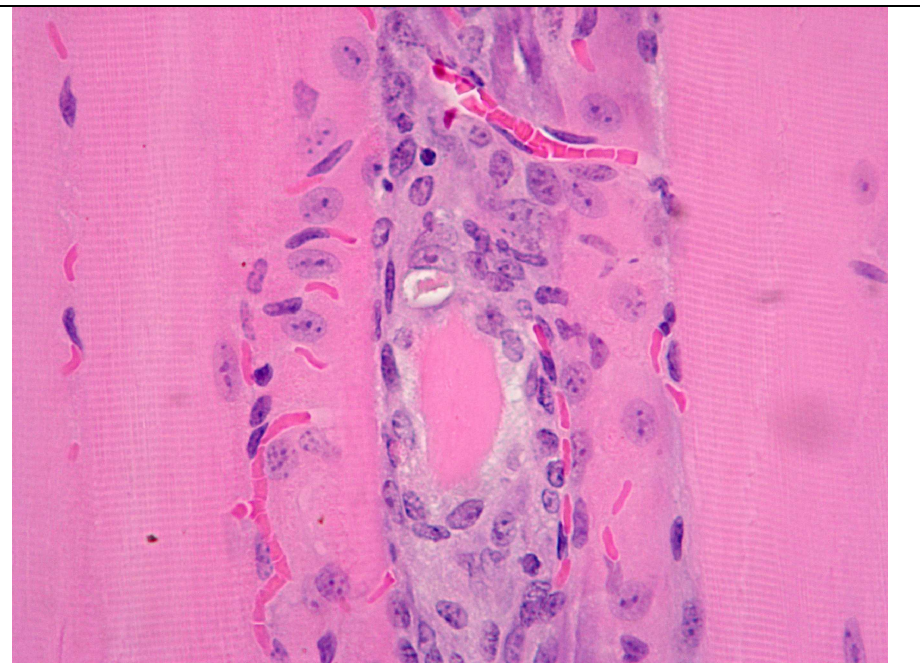
Badanie histopatologiczne wykonano wyłącznie w wycinkach mięśni myszy w grupie 1 (kontrolnej ujemnej), grupie 2 (kontrolnej dodatniej) oraz w grupach badanych, w których stwierdzono znamienne wzrost aktywności CPK (grupy 8 i 9).

W grupie kontrolnej ujemnej nie stwierdzono cech uszkodzenia mięśni. Struktura komórek była zachowana, układ włókien, prążkowanie i jądra komórkowe były prawidłowe (ryc. 3).

W grupie kontrolnej dodatniej stwierdzono umiarkowanie nasiloną rabdomiolizę obejmującą stosunkowo duże obszary preparatu, z widocznymi naciekami zapalnymi i zaburzoną strukturą włókien mięśniowych (ryc. 4).

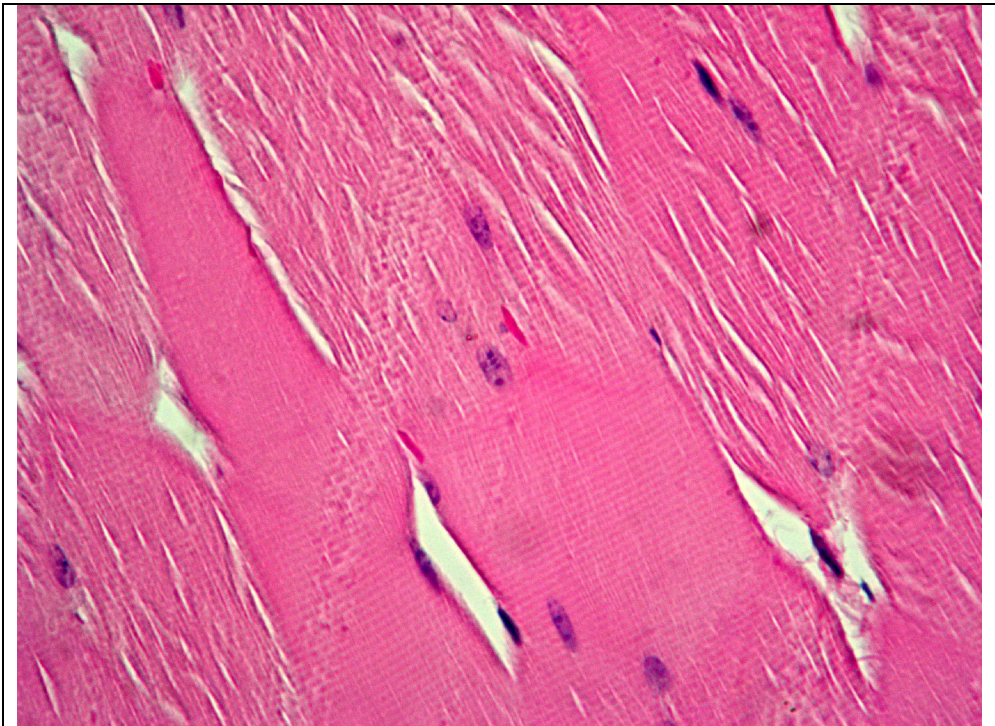


Rycina 3 Mięsień poprzecznie prążkowany. Grupa kontrolna ujemna. Barwienie H-E. Powiększenie 400x.



Rycina 4 Mięsień poprzecznie prążkowany. Grupa kontrolna dodatnia. Barwienie H-E. Powiększenie 400x.

W grupach otrzymujących ekstrakty z gąski zielonki (8 i 9) stwierdzono przeważnie zachowaną strukturę włókien. Obserwowano słabo nasilone zmiany pod postacią pofałdowania pojedynczych włókien, ogniskowego wzmożenia kwasochłonności, uszkodzenia pojedynczych włókien mięśniowych odpowiadające ogniskowej rabdomiolizie (ryc. 5).



Rycina 5 Mięsień poprzecznie prążkowany. Grupa 8 (gąska A 12g/kg/dzień). Barwienie H-E. Powiększenie 400x.

V. Dyskusja

Taksonomia gąski zielonki stanowi szczególne wyzwanie dla badacza, szczególnie nie mikologa. Nawet podstawowa nazwa gatunku jest podawana przez różnych autorów jako *Tricholoma equestre* i *Tricholoma flavovirens*, chociaż ze względów chronologicznych ta pierwsza jest prawidłowa²⁹. Niektórzy autorzy wyróżniają także podobną morfologicznie odmianę *Tricholoma auratum* (Fr.) Gill. występującą m.in. w lasach nadmorskich południowo-wschodniej Francji. Część autorów podaje, że *T. auratum* jest odrębnym gatunkiem⁴. Częściej jednak jest zaliczana wraz z *T. equestre* do jednego taksonu. W pracy porównującej okazy gąski zielonki z terenów Skandynawii i krajów nadbałtyckich Kalamees opisuje takson *Tricholoma equestre* jako grupę, w której skład wchodzi: *T. equestre*, *T. auratum* oraz dwa nowe gatunki *Tricholoma ulvinenii* Kalamees i *Tricholoma frondosae* Kalamees et Shtshukin. Autor podkreśla brak różnicy pomiędzy zarodnikami grzybów oznaczanych jako *T. auratum* i *T. equestre* oraz fakt, że grzyby o morfologii obu odmian występują często w naturze obok siebie, w związku z czym proponuje traktowanie ich jako jeden gatunek *T. equestre*³⁰.

Pomimo wielokrotnych prób autorowi nie udało się pozyskać okazów obu odmian z Francji do celów porównania z gąskami występującymi w Polsce, bowiem także we Francji *T. auratum* występuje stosunkowo rzadko i nie na całym terytorium. Obecnie niemożliwe jest rozstrzygnięcie czy występujące w Polsce gąski należą do jednego z wymienionych typów czy też w naszym kraju występują oba rodzaje.

Ze względu na duże podobieństwo pomiędzy odmianami, dla szeregowego grzybiarza jedyną w sposób pewny odróżniającą je cechą będzie miejsce, w którym grzyby są zbierane^{14-16, 30, 33}. Ze względu na wątpliwości taksonomiczne i możliwość występowania w Polsce dwóch rodzajów gąski zielonki potencjalnie różniących się toksycznością, w badaniach wykorzystano grzyby zbierane w dwóch siedliskach – nadmorskim odpowiadającym *T. auratum* oraz na Pojezierzu Kaszubskim, siedlisku typowym dla *T. equestre*. Badanie mikologiczne grzybów z

obu siedlisk nie wykazało istotnych różnic morfologicznych pomiędzy gąskami zebranymi w obu miejscach.

Do chwili obecnej kwestia taksonomii pozostaje nierozstrzygnięta. Wzięto to pod uwagę, gdy wprowadzano ograniczenia obrotu gąską zieloną we Francji, Hiszpanii i Włoszech, niemniej ze względu na trudności klasyfikacyjne zakaz objął także *T. equestre*¹⁴⁻¹⁶. Z uwagi na istniejące kontrowersje wydaje się, że do momentu rozstrzygnięcia tego problemu poprzez dalsze badania mikologiczne i molekularne, wykorzystane w pracy a występujące na terenie województwa pomorskiego gąski zielonki należy traktować jako *T. equestre* sensu lato (s.l.).

Pionierskie prace w oparte na analizie DNA są prowadzone przez prof. Przemysława Myjaka w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni. W dotychczas przeprowadzonych badaniach stwierdzono kilka typów sekwencyjnych *T. equestre* s.l., które jednak nie są powiązane z miejscem występowania grzybów. Zarówno w siedliskach nadmorskich jak i pozostałych występują dwa najczęstsze dla naszego kraju typy sekwencyjne *T. equestre* s.l. Sekwencje te różnią się od większości sekwencji *T. equestre/T.flavovirens* zamieszczonych w Banku Genów większą zazwyczaj liczbą kolejnych zasad adeninowych (ponad 8) we fragmencie ITS1. Z kolei polskie sekwencje *T. equestre* s.l., pomimo dużego podobieństwa w liczbie takich samych nukleotydów, różnią się wyraźnie we fragmencie ITS1 i ITS2 od pięciu sekwencji *T. auratum* z terenu Japonii podanych w Banku Genów (Myjak i wsp. 2008, w przygotowaniu).

Za istnieniem dwóch odmian gąski zielonki przemawia fakt, że do uzyskania efektu toksycznego konieczne były w badaniach prowadzonych na terenie Polski i Finlandii dużo wyższe dawki grzybów niż w badaniach Bedry i wsp.. Zastosowana w pracy dawka całkowita 60g/kg jest dziesięciokrotnie wyższa niż dawka zastosowana przez badaczy francuskich (6g/kg)¹³. Nieminen i wsp. stwierdzili istotny statystycznie wzrost aktywności CPK przy łącznej dawce 45 g/kg¹⁹.

W porównaniu z poprzednimi doniesieniami stwierdzono nieco niższe średnie oraz mniejszy błąd standardowy aktywności CPK we wszystkich badanych grupach. Najprawdopodobniej wynika to z wykorzystania w pracy myszy balb/c (szczep inbred), cechujących się większą jednorodnością genotypu oraz nieco

mniejszą masą ciała. Badacze francuscy przeprowadzili eksperyment na myszach Swiss (typu outbred), zaś fińscy na myszach hodowli własnej określanych jako *Mus musculus* (najprawdopodobniej fenotypu dzikiego)^{13, 19}.

Zmiany stwierdzone w badaniu histopatologicznym mięśni myszy są podobne do opisywanych przez Bedry i wsp.. W wycinkach mięśnia czworogłowego kończyny tylnej u myszy otrzymujących ekstrakty gąski zaobserwowano uszkodzenia pojedynczych komórek bez zaburzenia globalnej struktury mięśnia¹³.

Rabdomioliza wywołana spożywaniem grzybów stanowi rzadki problem kliniczny. Poza doniesieniami związanymi ze spożywaniem gąski zielonki opisano pojedyncze zatrucia *Russula sugnigricans*, grzybami halucynogennymi rodzaju *Psilocybe* a także muchomorem sromotnikowym (*Amanita phalloides*), którym towarzyszyło uszkodzenie mięśni. Przypadki te miały inny przebieg kliniczny, a objawy występowały w ciągu kilku do kilkunastu godzin od spożycia grzybów. W przypadku grzybów halucynogennych i muchomora sromotnikowego obserwowano także uszkodzenia innych narządów, zaś czynnikiem wywołującym rabdomiolizę mógł być również ciężki ogólny stan chorych^{23, 27, 34}.

Pierwsze doniesienie o toksycznym działaniu gąski na mięśnie szkieletowe zostało zaprezentowane w formie abstraktu przez Bedry i wsp. w 1998 roku. Autorzy opisali wtedy 8 przypadków (5 mężczyzn i 3 kobiety) rabdomiolizy po spożyciu *Tricholoma flavovirens*. Objawy pod postacią bólu, obrzęku i obniżenia siły mięśniowej występowały w 2-3 dobie od ostatniego posiłku zawierającego gąski. Wszyscy pacjenci spożywali grzyby przez co najmniej 3 dni. Ponieważ w moczu jednego z chorych stwierdzono obecność orellaniny autorzy nie mogli wykluczyć możliwości pomylenia przez zbieraczy gąsek z zasłonakami (*Cortinarius sp.*)^{12, 35}. W kolejnej pracy z 2001 roku autorzy opisali 4 dalsze przypadki (2 mężczyzn i 2 kobiety), przedstawili także wyniki badania histopatologicznego wycinków z mięśni, w których stwierdzono obrzęk oraz cechy uszkodzenia pojedynczych miocytów z zachowaniem układu włókien mięśniowych. U jednego z pacjentów, który zmarł stwierdzono także podobne zmiany w mięśniu sercowym¹³. Kolejne 2 przypadki rabdomiolizy związane ze spożywaniem gąski zielonki zostały

opisane przez Chodorowskiego i wsp. w 2002 roku. Pacjenci, matka i syn w wieku odpowiednio 48 i 20 lat, spożywali gąskę zielonką (zbieraną w okolicach Chojnic) przez 4-5 dni (co najmniej 9 posiłków) w ilościach 100-300 g grzyba na posiłek, wykorzystując grzyby jako podstawowy element diety. Objawy pod postacią bólu i obniżenia siły mięśniowej u syna oraz osłabienia u matki wystąpiły po około 48 godzinach od ostatniego posiłku zawierającego grzyby. W badaniach biochemicznych stwierdzono znaczny wzrost aktywności CPK – 18150 IU/l u matki i 48136 IU/l u syna. W porównaniu z przypadkami z Francji przebieg kliniczny był stosunkowo łagodny; po zastosowaniu leczenia zachowawczego celem zmniejszenia ryzyka wystąpienia ostrej niewydolności nerek uzyskano w ciągu 14 dni całkowite ustąpienie objawów oraz normalizację parametrów biochemicznych. Przeprowadzona szeroka diagnostyka w kierunku toksycznych i infekcyjnych przyczyn uszkodzenia mięśni nie pozwoliła na stwierdzenie etiologii rhabdmiolizy u chorych. Na podstawie wywiadu oraz doniesień z Francji postawiono rozpoznanie uszkodzenia mięśni wywołanego spożyciem dużych ilości gąski zielonki¹⁷.

Częstość występowania rhabdmiolizy wywołanej spożyciem grzybów może być większa niż mogłoby się wydawać na podstawie niewielkiej liczby opublikowanych przypadków. Kinaza kreatynowa (CPK) nie należy do badań standardowo wykonywanych w wielu oddziałach, zaś duża część chorych ze znacznie podwyższoną aktywnością CPK nie prezentuje objawów klinicznych uszkodzenia mięśni. U chorych prawidłowo leczonych ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań w tym ostrej niewydolności nerek jest stosunkowo niewielkie. Gąska zielonka nie jest powszechnie traktowana jako potencjalny czynnik miotoksyczny, więc przypadki wywołanej przez nią rhabdmiolizy mogą być przypisane innym przyczynom np. spożyciu etanolu.

W przeprowadzonym badaniu na modelu zwierzęcym wzrost aktywności CPK stwierdzono wyłącznie przy najwyższej stosowanej dawce ekstraktów grzyba, wynoszącej łącznie 60 g liofilizatu gąski na kg masy ciała myszy, co odpowiadałoby spożyciu przez dorosłego człowieka ważącego 70 kg 4,2 kg liofilizatu, czyli około 16-25 kg świeżych grzybów w ciągu 5 dni. Spożycie takich ilości gąski zielonki jest mało prawdopodobne o ile nie będzie ona

wykorzystywana jako podstawowy składnik pożywienia. Nie można jednak wykluczyć występowania w populacji osób o szczególnej podatności, u których do uszkodzenia mięśni może dojść przy niższych dawkach. Dodatkowe zagrożenie może wynikać z jednoczesnego działania środowiskowych czynników miotoksycznych czy też interakcji z przyjmowanymi lekami.

Dotychczasowe badania nie doprowadziły do dokładnej identyfikacji czynnika toksycznego zawartego w gąsce zielonce. Bedry i wsp. nie stwierdzili różnicy efektu działania toksycznego pomiędzy ekstraktami gąski uzyskanymi różnymi metodami¹³. Nieminen i wsp. dzięki zastosowaniu innej metody podawania grzybów myszom wykorzystali w badaniach duże dawki liofilizatu¹⁹.

Szczególnie interesujące jest stwierdzenie przez autorów fińskich wzrostu aktywności CPK u myszy otrzymujących borowika szlachetnego (*Boletus edulis*), pieprznika jadalnego (*Cantharellus cibarius*), koźlarza pomarańczowożółtego (*Leccinum versipelle*) i gołąbków (*Russula sp.*) w łącznej dawce 45g/kg^{19, 20}. Wskazuje to na potencjalne działanie miotoksyczne wielu grzybów jadalnych, o ile będą spożywane w bardzo dużych ilościach. Powyższe stwierdzenie nie odnosi się do gąsek występujących we Francji, które wykazywały efekt toksyczny przy dużo mniejszych dawkach. Dalsze badania w tym zakresie powinny być skierowane na rozstrzygnięcie kwestii taksonomicznych oraz identyfikację toksyny obecnej w *T. auratum*. Wyniki prowadzonych przez autorów francuskich badań mających na celu izolację czynnika toksycznego z owocników do tej pory nie zostały opublikowane.

Uzyskane wyniki badań na modelu zwierzęcym można odnieść wyłącznie do ostrej i podostrej toksyczności gąski zielonki. Opublikowane w 2008 roku wyniki Nieminen i wsp. wskazują na potencjalnie niekorzystny wpływ także mniejszych dawek *T. equestre* podawanych codziennie przez okres 28 dni w dawce 12 g świeżego grzyba/kg/dzień, co odpowiada około 1,5-3 g liofilizatu. Autorzy stwierdzili nieznacznie podwyższoną aktywność CPK, jej izoenzymu sercowego (CK-MB), aminotransferazy asparaginianowej (AST) oraz całkowitej bilirubiny w surowicy myszy otrzymujących gąskę. W badaniu patomorfologicznym stwierdzono zwiększoną częstość występowania nacieków zapalnych w osierdziu. Dawka zastosowana w tym badaniu odpowiada codziennemu spożywaniu przez ważącego

70 kg człowieka 840 g świeżych grzybów. Badanie przewlekłej toksyczności nie objęło innych poza *T. equestre* grzybów jadalnych³³.

Budowa chemiczna oraz działanie na organizm człowieka substancji zawartych w grzybach jadalnych pozostają w dalszym ciągu w znacznym stopniu nieznane. W nadchodzących latach kolejne prace wykażą najprawdopodobniej niekorzystne efekty spożywania także innych grzybów jadalnych w dużych, powtarzanych dawkach. W związku z tym jedząc potrawy grzybowe należy kierować się przede wszystkim rozsądkiem.

Kwestię toksyczności gąski zielonki zapewne najtrafniej podsumowuje stwierdzenie przypisywane mikologom francuskim: „najlepsze grzyby jadalne to te, które zawierają mniej toksyn niż pozostałe”.

VI. Wnioski

1. Przeprowadzone badanie na modelu zwierzęcym wykazało istotny statystycznie wzrost aktywności kinazy kreatynowej (CPK) w surowicy oraz obecność mikroskopowych cech uszkodzenia mięśni poprzecznie prążkowanych myszy otrzymujących gąskę zielonką w całkowitej dawce 60g liofilizatu na kg masy ciała. Tym samym potwierdzono potencjalny efekt miotoksyczny spożywania dużych ilości *Tricholoma. equestre* występującej na terenie województwa pomorskiego.
2. Nie stwierdzono różnic morfologicznych pomiędzy grzybami zbieranymi w dwóch różnych siedliskach na terenie województwa pomorskiego: w borze świeżym we Wdzydzkim Parku Krajobrazowym oraz w lasach nadmorskich w okolicach Łeby. Średnie aktywności CPK w surowicy myszy otrzymujących ekstrakty grzybów pochodzących z obu siedlisk były podobne, co świadczy o podobnej sile efektu toksycznego.
3. Wysokość dawki koniecznej do wykazania toksyczności wskazuje na małe prawdopodobieństwo wystąpienia uszkodzenia mięśni szkieletowych u ludzi spożywających umiarkowane ilości gąski zielonki. Odpowiednikiem całkowitej dawki 60g/kg byłoby spożycie przez ważącego 70 kg człowieka od 16 do 25 kg świeżych grzybów, co jest mało prawdopodobne. W związku z tym, nie jest konieczne wprowadzenie wzorem krajów południowej Europy ograniczeń obrotu gąską zielonką.

VII. Bibliografia

1. Diaz JH. Evolving global epidemiology, syndromic classification, general management, and prevention of unknown mushroom poisonings. *Crit Care Med* 2005;33(2):419-26.
2. Gumińska B, Wojewoda W. Grzyby i ich oznaczanie. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne; 1985.
3. Berger KJ, Guss DA. Mycotoxins revisited: Part I. *J Emerg Med* 2005;28(1):53-62.
4. Hata K, Sugawara F, Ohisa N, Takahashi S, Hori K. Stimulative effects of (22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3beta,5alpha,6beta-triol from fruiting bodies of *Tricholoma auratum*, on a mouse osteoblastic cell line, MC3T3-E1. *Biol Pharm Bull* 2002;25(8):1040-4.
5. Burda PR. Zatrucia ostre grzybami i roślinami wyższymi. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1998.
6. Valente WA, Talbert RJ, Hallett JP, Mackowiak PA. Caveat cenans! *Am J Med* 2002;112(5):392-8.
7. Grzymała S. Massenvergiftung durch den Orangefüchsisigen Hautkopf. *Zeitschr für Pilzkunde* 1957;23:139-42.
8. Bschor F, Mallach HJ. Vergiftungen durch den Kahlen Krempling (*Paxillus involutus*), eine geniessbare Pilzart *Archives of Toxicology* 1963;20(2):82-95.
9. Saviuc PF, Danel VC, Moreau PA, et al. Erythromelalgia and mushroom poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 2001;39(4):403-7.
10. Leathem AM, Purssell RA, Chan VR, Kroeger PD. Renal failure caused by mushroom poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1997;35(1):67-75.
11. Warden CR, Benjamin DR. Acute renal failure associated with suspected *Amanita smithiana* mushroom ingestions: a case series. *Acad Emerg Med* 1998;5(8):808-12.
12. Bedry R, Neau D, Dupon M, et al. Intoxication par les champignons: une nouvelle etiologie de rhabdomyolyse? *Rev Med Interne* 1998;19(Suppl1):s84.

13. Bedry R, Baudrimont I, Deffieux G, et al. Wild-mushroom intoxication as a cause of rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 2001;345(11):798-802.
14. Ministero della Salute. Ordinanza 20 agosto 2002. Divieto di raccolta, commercializzazione e conservazione del fungo epigeo denominato *Tricholoma equestre*. *Gazzetta Ufficiale* 2002:8.
15. Ministère de la Santé et des Solidarités Arrêté du 16 juin 2004 portant suspension d'importation et de mise sur la marché du *tricholoma équestre* et ordonnant son retrait NOR: ECOC0400035A. *Journal Officiel* 2004;142:11099.
16. Ministerio de Sanidad y Consumo. ORDEN SCO/3303/2006, de 23 de octubre, por la que se prohíbe cautelarmente la comercialización de la seta *Tricholoma equestre*. *Boletín Oficial del Estado* 2006;258:37607-8.
17. Chodorowski Z, Waldman W, Sein Anand J. Acute poisoning with *Tricholoma equestre*. *Przegl Lek* 2002;59(4-5):386-7.
18. Chodorowski Z, Sznitowska M, Wiśniewski M, Sein Anand J, Waldman W, Ronikier A. Toksyczność gąski zielonej – badania na modelu zwierzęcym. *Przegl Lek* 2004;61(4):351-2.
19. Nieminen P, Mustonen AM, Kirsi M. Increased plasma creatine kinase activities triggered by edible wild mushrooms. *Food Chem Toxicol* 2005;43(1):133-8.
20. Nieminen P, Kirsi M, Mustonen AM. Suspected myotoxicity of edible wild mushrooms. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(2):221-8.
21. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med* 2007;18(2):90-100.
22. Bagley WH, Yang H, Shah KH. Rhabdomyolysis. *Intern Emerg Med* 2007.
23. Bickel M, Ditting T, Watz H, et al. Severe rhabdomyolysis, acute renal failure and posterior encephalopathy after 'magic mushroom' abuse. *Eur J Emerg Med* 2005;12(6):306-8.
24. Buchholz U, Mouzin E, Dickey R, Moolenaar R, Sass N, Mascola L. Haff disease: from the Baltic Sea to the U.S. shore. *Emerg Infect Dis* 2000;6(2):192-5.

25. Guttman-Yassky E, Hayek T, Muchnik L, Bergman R. Acute rhabdomyolysis and myoglobinuria associated with isotretinoin treatment. *Int J Dermatol* 2003;42(6):499-500.
26. Kao KC, Tsai YH, Lin MC, Huang CC, Tsao CY, Chen YC. Hypokalemic muscular paralysis causing acute respiratory failure due to rhabdomyolysis with renal tubular acidosis in a chronic glue sniffer. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000;38(6):679-81.
27. Lee PT, Wu ML, Tsai WJ, Ger J, Deng JF, Chung HM. Rhabdomyolysis: an unusual feature with mushroom poisoning. *Am J Kidney Dis* 2001;38(4):E17.
28. Roca B. Rhabdomyolysis and hemolysis after use of *Coutarea latiflora*. *Am J Med* 2003;115(8):677.
29. Deng H, Yao YJ. *Tricholoma equestre*, the correct name for *T. flavovirens* (Agaricales). *Mycotaxon* 2005;94:325-9.
30. Kalamees. Taxonomy and ecology of the species of the *Tricholoma equestre* group in the Nordic and Baltic countries. *Folia Cryptog Estonica* 2001;38:13-23.
31. Averbukh Z, Modai D, Leonov Y, et al. Rhabdomyolysis and acute renal failure induced by paraphenylenediamine. *Hum Toxicol* 1989;8(5):345-8.
32. Horder M, Magid E, Pitkanen E, et al. Recommended method for the determination of creatine kinase in blood modified by the inclusion of EDTA. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology (SCE). *Scand J Clin Lab Invest* 1979;39(1):1-5.
33. Nieminen P, Karja V, Mustonen AM. Indications of hepatic and cardiac toxicity caused by subchronic *Tricholoma flavovirens* consumption. *Food Chem Toxicol* 2008;46(2):781-6.
34. Gonzalez J, Lacomis D, Kramer DJ. Mushroom myopathy. *Muscle Nerve* 1996;19(6):790-2.
35. Vannacci A, Baronti R. Mushroom-induced rhabdomyolysis. *Cortinarius* or *Tricholoma*? *Toxicon* 2002;40(7):1063.

VIII. Streszczenie

Gąska zielonka [*Tricholoma equestre* (L.) Kummer, synonim *Tricholoma flavovirens* (Pers.: Fr.) Lund. et Nannf.] jest najbardziej znanym w Polsce przedstawicielem liczącego ponad 60 gatunków rodzaju *Tricholoma*. Występuje powszechnie w strefie klimatu umiarkowanego i jest chętnie zbierana i spożywana. W 2001 roku po raz pierwszy w piśmiennictwie światowym opisano przypadki ciężkiej rabdomiolizy spowodowanej spożyciem dużych ilości gąski zielonki zbieranej w południowej Francji, co spowodowało wprowadzenie we Francji, Hiszpanii i Włoszech zakazów obrotu tym gatunkiem grzyba.

Celem pracy było rozstrzygnięcie problemu toksyczności gąski zielonki występującej na terenie Polski. Ze względu na postulowane przez niektórych autorów istnienie odmiany gąski zielonki występującej w lasach nadmorskich i charakteryzującej się wyższą toksycznością, dokonano porównania grzybów zebranych w dwóch różnych siedliskach: w nadmorskich borach sosnowych w okolicach Łeby oraz w borach świeżych we Wdzydzkim Parku Krajobrazowym.

Nie stwierdzono różnic morfologii owocników i zarodników grzybów zbieranych w różnych siedliskach. Liofilizat grzybów oraz uzyskane z nich ekstrakty podawano przez pięć dni dorosłym myszom BALB/c w dawkach całkowitych 15, 30 i 60 g liofilizatu na kilogram masy ciała. Zwierzęta w grupie kontrolnej dodatkowo otrzymywały parafenylenodiaminę w dawce 35mg/kg/dzień, zaś w grupie kontrolnej ujemnej wodę do wstrzyknięć. Uszkodzenie mięśni stwierdzano w oparciu o oznaczenie aktywności kinazy kreatynowej CPK w surowicy oraz badanie histopatologiczne wycinków mięśnia.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroniego zastosowanym po teście ANOVA.

Wykazano istotny statystycznie wzrost aktywności kinazy kreatynowej (CPK) w surowicy myszy otrzymujących gąskę zielonkę zbieraną w obu siedliskach w całkowitej dawce 60g/kg masy ciała ($497,7 \pm 23,6$ IU/l i $472,7 \pm 31,7$ IU/l; $p < 0,0001$) oraz w grupie kontrolnej dodatniej ($512,9 \pm 14,2$ IU/l; $p < 0,0001$) w porównaniu z grupą otrzymującą wodę ($259,3 \pm 11,6$ IU/l). Nie stwierdzono różnic

aktywności CPK pomiędzy grupami otrzymującymi grzyby pochodzące z różnych siedlisk. W wycinkach mięśni pobranych w grupach o podwyższonej aktywności CPK zaobserwowano obecność mikroskopowych cech rabdomiolizy.

Wysokość dawki koniecznej do wykazania toksyczności wskazuje na małe prawdopodobieństwo wystąpienia uszkodzenia mięśni szkieletowych u ludzi spożywających umiarkowane ilości gąski zielonki. Odpowiednikiem całkowitej dawki 60g/kg masy ciała u myszy byłoby spożycie przez ważącego 70 kg człowieka od 16 do 25 kg świeżych grzybów, wydaje się wręcz niemożliwe. W związku z tym, nie jest konieczne wprowadzenie w Polsce wzorem krajów południowej Europy ograniczeń obrotu gąską zielonką.