

# Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom mikotoksinima

---

**Bogdanović, Ella**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University North / Sveučilište Sjever**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:280732>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-04**



*Repository / Repozitorij:*

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište  
Sjever**

**Završni rad br. 80/PREH/2024**

**Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom  
nefropatijom mikotoksinima**

**Ella Bogdanović, 0336056995**

Koprivnica, rujan 2024. godine





# Sveučilište Sjever

Prehrambena tehnologija

Završni rad br. 80/PREH/2024

## Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom mikotoksinima

**Student**

Ella Bogdanović, 0336056995

**Mentor**

izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj

Koptivnica, rujan 2024. godine

# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

PRISTUPNIK ELLA BOGDANOVIĆ

MATIČNI BROJ 0336056995

DATUM 4.9.2024

KOLEGIJ PREHRAMBENA MIKROBIOLOGIJA

NASLOV RADA Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom mikotoksinima

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Exposure of population with Balkan endemic nephropathy to mycotoxins

MENTOR Bojan Šarkanj

ZVANJE izv.prof.dr.sc.

### ČLANOVI POVJERENSTVA

- izv. prof. dr. sc. Krunoslav Hajdek, predsjednik
- prof. dr. sc. Božo Smoljan, član
- izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, mentor
- Ivana Dodlek Šarkanj, pred, zamjena člana
- 

## Zadatak završnog rada

BROJ 80/PREH/2024

### OPIS

U ovom završnom radu istražena je povezanost izloženosti mikotoksinima s balkanskom endemskom nefropatijom (BEN), bubrežnom bolešću koja zahvaća specifična endemska područja na Balkanu. Glavni fokus bio je na mikotoksinima, posebno ohratoksinu A (OTA) i citrininu, koji su prepoznati kao mogući uzročnici ove bolesti. Provedena je analiza uzoraka urina stanovnika pogođenih BEN-om kako bi se utvrdila prisutnost tih mikotoksina. Izloženost je procijenjena putem analize biomarkera mikotoksina u urinu koristeći visokoosjetljiv LC-MS/MS sustav.

ZADATAK URUČEN 1.3.2024.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE  
SJEVER



Očisti obrazac

## **Predgovor**

Izrada ovog završnog rada rezultat je višegodišnjeg truda, učenja i istraživanja. Tema rada, koja se bavi mikotoksinima i balkanskom endemskom nefropatijom, odabrana je zbog mog osobnog interesa za mikrobiologiju. Proces istraživanja bio je izazovan i zahtjevan, ali iznimno koristan i zanimljiv. Kroz pripremu uzoraka i analizu rezultata primijenila sam cjelokupno znanje koje sam stekla tijekom proteklih godina studija. Zahvaljujem se svima koji su mi pružili podršku tijekom izrade ovog rada. Prije svega, zahvaljujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Bojanu Šarkanju na stručnim savjetima, smjernicama i vremenu koje je posvetio kako bi moj rad bio što kvalitetniji. Također, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i strpljenju tijekom ovog intenzivnog perioda.

## Sažetak

U ovom završnom radu istražena je povezanost izloženosti mikotoksinima s balkanskom endemskom nefropatijom (BEN), bubrežnom bolešću koja zahvaća specifična endemska područja na Balkanu. Glavni fokus bio je na mikotoksinima, posebno ohratoksinu A (OTA) i citrininu (CIT), koji su prepoznati kao mogući uzročnici ove bolesti. Provedena je analiza uzoraka urina stanovnika pogođenih BEN-om kako bi se utvrdila prisutnost biomarkera tih mikotoksina. U radu su najprije opisani mikotoksini i njihovi izvori u prehrani, detaljno su opisani ohratoksin A i citrinin. Razrađeni su i biomarkeri i procjena izloženosti za mikotoksine. Opširno je opisana balkanska endemska nefropatija, koji su mogući uzročnici te koje su posljedice na ljude. U eksperimentalnom dijelu opisana je priprema uzoraka te metoda koja se koristila u otkrivanju mikotoksina u urinu. Na kraju su dobiveni rezultati uspoređeni s drugim, sličnim istraživanjima.

**Ključne riječi:** Balkanska endemska nefropatija, mikotoksini, biomarkeri, ohratoksin A

## **Summary**

This thesis explores the relationship between exposure to mycotoxins and Balkan endemic nephropathy (BEN), a kidney disease affecting specific endemic regions in the Balkans. The main focus was on mycotoxins, particularly ochratoxin A (OTA) and citrinin (CIT), which have been recognized as potential causes of this disease. An analysis of urine samples from residents affected by BEN was conducted to determine the presence of biomarkers for these mycotoxins. The thesis first describes mycotoxins and their dietary sources, providing detailed information about ochratoxin A and citrinin. Biomarkers and exposure assessment for mycotoxins are also elaborated. The study extensively covers Balkan endemic nephropathy, its potential causes, and its effects on humans. In the experimental section, the sample preparation and method used for detecting mycotoxins in urine are explained. Finally, the results were compared with other similar studies.

**Keywords:** Balkan endemic nephropathy, mycotoxins, biomarkers, ochratoxin A



## Popis korištenih kratica

<b>AFM1</b>	aflatoksin M1
<b>AFB1</b>	aflatoksin B1
<b>BEN</b>	Balkanska endemska nefropatija
<b>CIT</b>	citritin
<b>DAS</b>	diacetoksiscirpenol
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>DON</b>	deoksinivalenol
<b>EFSA</b>	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. The European Food Safety Authority)
<b>FB</b>	fumonizini B skupine
<b>FLD-HPLC</b>	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detekcijom fluorescencije (eng. High-performance liquid chromatography with fluorescence detector)
<b>LC-MS/MS</b>	tekućinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom (eng. liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
<b>LOD</b>	limit detekcije (eng. limit of detection)
<b>LOQ</b>	limit kvantifikacije (eng. limit of quantification)
<b>NOAEL</b>	razina bez opaženog štetnog učinka (eng. no observed adverse effect level)
<b>OTA</b>	ohratoksin A
<b>PMTDI</b>	privremeni maksimalni prihvatljivi dnevni unos (eng. provisional maximum tolerable daily intake)
<b>RASFF</b>	Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (eng. Rapid Alert System for Food and Feed)
<b>TDI</b>	prihvatljivi dnevni unos (eng. Tolerable Daily Intake)
<b>t-TDI</b>	privremeni prihvatljivi dnevni unos (eng. Temporary Tolerable Daily Intake)
<b>UV</b>	ultraljubičasto (eng. ultraviolet)
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)
<b>ZEA</b>	zearalenon



# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Mikotoksini i izvor u prehrani .....	2
2.1.	Ohratoksin A .....	6
2.2.	Citrinin .....	8
2.3.	Ostali mikotoksini .....	10
2.3.1.	<i>Trihoteceni</i> .....	10
2.3.2.	<i>Aflatoksini</i> .....	10
2.3.3.	<i>Zearlaenon</i> .....	11
2.3.4.	<i>Fumonizini</i> .....	11
2.3.5.	<i>Patulin</i> .....	11
3.	Biomarkeri i procjena izloženosti .....	12
4.	Balkanska endemska nefropatija.....	14
5.	Eksperimentalni dio .....	18
5.1.	Priprema uzoraka.....	18
5.2.	Metoda.....	19
5.3.	Rezultati .....	20
6.	Usporedba rezultata.....	23
7.	Zaključak.....	24
8.	Literatura.....	25

## 1. Uvod

U današnje vrijeme ljudi sve više brinu o svom zdravlju i o hrani koju unose. Svijest potrošača o hrani koju konzumiraju svakim danom je sve veća i više nema mjesta za hranu koja može uzrokovati neke bolesti ili naštetiti zdravlju. Sve se veći fokus stavlja se na sigurnost hrane i kvalitetu prehrambenih proizvoda, ali i zdravstvene rizike povezane s hranom. Iz tog razloga mikotoksini postaju sve više istraživana tema s obzirom da mogu štetiti zdravlju. Mikotoksini su sekundarni toksični metaboliti plijesni najčešće rodova: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Claviceps purpurea*. Mikotoksini se mogu pronaći u na žitaricama, ali i u kruhu, sladu, pivu, začinima, jajima, mlijeku, kavi, voću, mesu itd. Ljudi konzumiraju žitarice svakodnevno i to u većini obroka, a u njima se najčešće pronalaze mikotoksini. Žitarice se mogu naći u različitim vrstama hrane, a najčešće su to kruh i različita peciva. Mikotoksini su izrazito opasni za ljude koji ih konzumiraju. Oni mogu izazvati različita oboljenja, a jedno od njih je balkanska endemska nefropatija. Balkanska endemska nefropatija je izrazito opasna bolest koja je povezana s bubrežima i mokraćnim putevima. Njome su zaraženi ljudi jednog određenog područja tj. područja se nalaze u više država na tzv. Balkanskom poluotoku. Osim balkanske endemske nefropatije tj. nefrotoksičnosti, mikotoksini su također i imunotoksični, razvojno toksični, toksični za probavni trakt, hepatotoksični, kancerogeni itd. Jedni od najopasnijih mikotoksina su aflatoksini i ohratoksin A.

Kako bi se ljudi zaštitili od štetnih utjecaja mikotoksina, potrebno je vršiti stalne kontrole. Europska unija ima vrlo jasne i stroge zakone kako bi zaštitila potrošače od negativnih utjecaja mikotoksina. S obzirom da su mikotoksini veoma dobro kontrolirani u Europskoj uniji, od ekonomske važnosti je da proizvodi i sirovine ne budu kontaminirani mikotoksinima. Ukoliko se otkrije da je neki proizvod na policama trgovina kontaminiran, automatski se povlači i dolazi do velikih gubitaka.

## 2. Mikotoksini i izvor u prehrani

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni koji nisu nužni za normalno funkcioniranje i rast plijesni, ali mogu biti vrlo opasni za druge vrste. Za ostale vrste mogu biti izrazito opasni zato što mogu uzrokovati različite negativne patološke, biokemijske i fiziološke promjene. Riječ mikotoksin (eng. mycotoxin) dolazi od grčke riječi „mykes“ koja ima značenje gljive i latinske riječi „toxicum“ čije je značenje toksin tj. otrov. Molekulska masa im je vrlo mala, a najčešće iznosi manje od 700 Da. Mikotoksini se mogu podijeliti prema rodu plijesni koje ih produciraju. Najznačajniji producenti mikotoksina su *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. Najpoznatiji mikotoksini su aflatoksini, ohratoksin A, citrinin, deoksinivalenol, zearalenon, toksini HT-2 i T-2 [1].

Iako neki od sekundarnih metabolita plijesni mogu biti korisni, mikotoksini su oni koji su toksični. Mikotoksini su otrovi koji mogu biti vrlo opasni za ljude i za životinje zato što imaju vrlo visoku akutnu toksičnost te su kancerogeni, teratogeni, imunotoksični, neurotoksični, nefrotoksični, hepatotoksični, probavno toksični, razvojno i reproduktivno toksični [2].

Mikotoksini se prema IARC-u ovisno o njihovoj kancerogenosti za ljude mogu podijeliti u grupe. Postoje grupa 1, 2A, 2B, 3 i grupa 4. U grupu jedan spadaju mikotoksini koji su kancerogeni za ljude, a to je su aflatoksini. Grupa 2A su vjerojatno kancerogeni za ljude, dok su u grupi 2B moguće kancerogeni za ljude. U grupu 2B spadaju OTA, FB1, FB2. U grupi 3 se nalaze mikotoksini koji nisu klasificirani kao kancerogeni za ljude, a to su DON, CIT, ZEA. U grupu 4 spadaju mikotoksini koji vjerojatno nisu kancerogeni za ljude [3-4].

Mikotoksini su široko rasprostranjeni u prehrambenim proizvodima, a o tome koliko i da li ih ima u proizvodu ovise različiti faktori. Bitan je sadržaj vlage u proizvodu i njegova aktivnost vode, temperatura, pH vrijednost, fizičko oštećenje, vlažnost zraka te da li su u proizvodu prisutne spore plijesni. Kako bi se osiguralo da mikotoksini ne budu prisutni u hrani, bitno je da se proizvodnja i skladištenje provode u pravilnim, kontroliranim uvjetima. Vrlo je bitno znati da na proizvodima ne treba biti vanjskih, vidljivih znakova plijesni, ali postoji mogućnost da je taj proizvod kontaminiran mikotoksinima. Najpogodnija sirovina za rast plijesni su žitarice. Žitarice mogu biti kontaminirane na polju, tijekom transporta ili skladištenja. Ukoliko se takve žitarice koriste za proizvodnju, sama hrana ili hrana za životinje je kontaminiran i sadrži mikotoksine. Najveći problem predstavljaju kišne godine zato što je onda povećana kontaminacija plijesnima, a samim time i mikotoksinima. Plijesni uz žitarice i uljarice vole kontaminirati i orašaste plodove i začine. Mikotoksini se također mogu pronaći i u suhomesnatim proizvodima. Oni se kontaminiraju naknadno zbog sekundarnog onečišćenja plijesnima koje proizvode mikotoksine [1].

Najčešći način izloženosti ljudi i životinja je konzumacijom kontaminirane hrane, ali postoji mogućnost respiratorne, dermalne i parenteralne izloženosti koje su vrlo rijetke. Mogućnost unošenja respiratornim putem najčešći je tijekom prerade sirovine koja je kontaminirana mikotoksinima, a najčešće su to žitarice. Izloženost dermalnim putem moguća je ako je mikotoksin topiv u mastima, a parenteralnim putem je moguće kod ovisnika o drogama. Dokazano je da ovisnici mogu direktno u krv ubrizgati neke prerađevine biljaka koje su kontaminirane mikotoksinima, a najčešće je to aflatoksin [2].

Kod ljudi postoje dva načina izloženosti mikotoksinima konzumacijom, a to su izravnom konzumacijom proizvoda biljnog podrijetla koji su kontaminirani. Druga mogućnost je konzumacija kontaminiranih proizvoda životinjskog podrijetla poput mesa i mesnih prerađevina te iznutrica ili mlijeka i jaja koji su kontaminirani na način da je životinja bila izložena mikotoksinima tj. jela je kontaminiranu hranu tijekom uzgoja. S obzirom da je izrazito bitno da se od same sadnje smanji rast plijesni, u suvremenim procesima proizvodnje počele su se koristiti prilagođene sorte za sadnju. Uz to se također koristi i prilagođeno gnojivo, pravilno navodnjavanje i redovito uklanjanje korova. Kod berbe je bitno da se ne oštete zrna tj. da se oštećenja svedu na minimum. Kad je zrno oštećeno pogodno je za sekundarnu kontaminaciju tijekom skladištenja. Iako se pridržavanjem ovih pravila kontaminacija mikotoksinima smanjuje na minimum, nije moguće potpuno izbjeći kontaminaciju. Iz tog razloga se provodi nadzor sirovina i gotovih proizvoda koji su namijenjeni za prehranu ljudi i životinja. Osim toga važna je i kontrola u proizvodnom procesu. Svaki proces mora biti nadgledan i kontroliran. U žitaricama se mogu očekivati kontaminacija plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium*, i *Fusarium*. *Aspergillus* i *Penicillium* mogu se pronaći prije i nakon berbe žitarica te su to skladišne plijesni, a za *Fusarium* je veća mogućnost da se kontaminira prije berbe i naziva se poljska plijesan. Osim u bilju, mikotoksini se mogu pronaći u mesu i mesnim proizvodima. Najčešće do kontaminacije mesa može doći preko hrane za životinje. Ukoliko se na farmama krmne smjese ne kontroliraju, životinje mogu unesti kontaminiranu hranu i tako neizravno dovesti u opasnost ljude koji će konzumirati meso životinja. Osim mesa, opasni su jaja i mlijeko te mliječni proizvodi. Kada je riječ o proizvodima od mesa, postoji mogućnost da meso nije kontaminirano, već začini koji se koriste u proizvodnji. Što se tiče tradicionalnih mesnih proizvoda poput fermentiranih kobasica i suhomesnatih proizvoda, opasnost može biti plijesan koja se stvara i prekriva površinu proizvoda. Najbitnije je da sirovina koja se koristi u proizvodnji ne bude kontaminirana zato što tehnološki procesi (termička obrada, sušenje, soljenje) ne mogu smanjiti mikotoksine u završnom proizvodu. Na površini mesnih proizvoda najčešće se nalazi AFB1 kojeg produciraju plijesni roda *Aspergillus*. Također je moguće pronaći OTA kojeg produciraju plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Mikotoksin koji se najčešće može pronaći u mesu i mesnim proizvodima je OTA.

U mesu se također može pronaći i citrinin. Mlijeko i mliječni proizvodi najčešće su kontaminirani AFM1, ali i DON, ZEA i fumonizinima B skupine (FB)[1].

Plijesni najbolje rastu u tropskim područjima, a danas se sve češće uvoze sirovine i namirnice iz tih područja pa je potrebna jako dobra kontrola kako bi koncentracije mikotoksina u hrani i hrani za životinje bile u dozvoljenim granicama [2].

Iz tog razloga Europska unija ima jako stroge zakone kako bi zaštitila zdravlje samih potrošača, ali i životinja. Europska unija se može pohvaliti jednim od najstrožih i najviših standarda za sigurnost hrane. Europska unija ima vrlo važan cilj, a to je da kontaminirana hrana ne dođe na tržište. Ukoliko se desi da ipak dođe na tržište, bitno je odmah reagirati kako bi se javnost što prije obavijestila o hrani na tržištu koja je kontaminirana mikotoksinima. Sustav koji je odgovoran za to je sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF). Preko RASFF sustava omogućeno je svim članicama Europske unije da brzo izmjenjuju informacije između sebe o potencijalnim rizicima i kontaminaciji mikotoksinima. Kontrole su ključan faktor u zaštiti potrošača. One kontroliraju proizvodnju i skladištenje hrane, ali i kontroliraju hranu i sirovinu koja dolazi izvan granica Europske unije kako bi bili sigurni da je hrana ispravna za konzumaciju i sadrži mikotoksine u dopuštenim granicama [5].

Uredba komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006 od 25. travnja 2023. godine je uredba prema kojoj se treba postupati u Europskoj uniji. U toj uredbi su navedene sve dopuštene količine mikotoksina izražene u  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u određenim proizvodima. U tablici je prikazana najveća dopuštena količina OTA u nekim prehrambenim proizvodima prema uredbi [6].

U Hrvatskoj je donesen Zakon o kontaminantima NN 39/13 i zakonom se utvrđuju nadležna tijela, zadaće nadležnih tijela, službene kontrole i načini postupanja te izvještavanje nadležnih tijela i Europske komisije kao i obveze službenih laboratorija i subjekata u poslovanju s hranom [7].

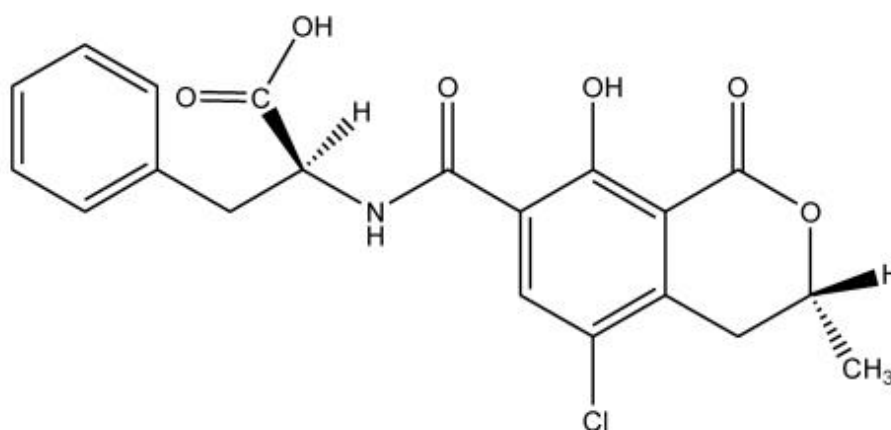
Tablica 1 Najveće dopuštene količine OTA u hrani [6]

Ohratoksin A	Najveće dopuštene količine (µg/kg)
Neprerađena zrna žitarica	5,0
Proizvodi dobiveni od neprerađenih zrna žitarica i žitarice, koji se stavljaju na tržište za krajnjeg potrošača	3,0
Groždice (sve vrste) i sušene smokve	8,0
Drugo sušeno voće	2,0
Pržena zrna kave i mljevena pržena kava	3,0
Instant kava	5,0
Vino i voćno vino	2,0
Aromatizirana vina, aromatizirana pića na bazi vina i aromatizirani kokteli na bazi vina	2,0
Sok od grožđa, rekonstituirani koncentrirani sok od grožđa, nektar od grožđa, mošt i rekonstituirani koncentrirani mošt od grožđa, za izravnu prehranu ljudi	2,0
Dječja hrana i prerađena hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu	0,50
Hrana za posebne medicinske potrebe namijenjena dojenčadi i maloj djeci	0,50



## 2.1. Ohratoksin A

Ohratoksin A (OTA) je sekundarni metabolit dvije vrste plijesni, a to su *Aspergillus* i *Penicillium* [8].



Slika 1 Kemijska struktura ohratoksina A [8]

OTA je izoliran iz plijesni *Aspergillus ochraceus* 1965. godine u Južnoj Africi [1].

OTA je slaba organska kiselina koja ima kristalnu strukturu koja se mijenja od bezbojne do bijele, a molarna masa joj iznosi 403,815 g/mol. Pod UV svjetlom, ovisi o kiselom i alkalnom mediju, ima izraženu zelenu ili plavu fluorescenciju. U pH od 1 do 7 tj. kiselom i neutralnom topljiv je u polarnim organskim otapalima, ali je u vodi slabo topljiv. U zasićenim ugljikovodicima i naftnim esterima je netopljiv. U alkalnim uvjetima je topljiv u svim alkalnim otopinama [8]. Optimalni uvjeti za biosintezu ohratoksina A su od 20 do 25 °C i vlaga od najmanje 16% [1].

OTA je poseban po tome što je vrlo stabilan tj. otporan je na kiselost i visoke temperature. Zbog svoje otpornosti izrazito ga je teško maknuti iz hrane koja je kontaminirana. Prema istraživanjima dokazano je da se tijekom standardnog kuhanja samo djelomično uništava, a čak ga ni 3 sata sterilizacije parom pod visokim tlakom ne mogu uništiti. OTA je vrlo toksičan i smatra se odgovornim za balkansku endemsku nefropatiju. Osim nefrotoksičnosti, OTA je i neurotoksičan, teratogen, imunotoksičan, kancerogen [8].

OTA je vrlo toksičan, a najviše djeluje na bubrege, jetru i kardiovaskularni sustav. Nefrotoksičnost uzrokovana ohratoksinom A dokazana je kod ptica i sisavaca, no ne i kod odraslih preživača. S obzirom da se nakuplja u tkivima, a veoma teško se može izbaciti, predstavlja veliki problem. OTA je također i teratogen. Može proći u placentu i može uzrokovati anomalije i uzrokovati oštećenje središnjeg živčanog sustava fetusa. OTA također napada i imunološki sustav te izaziva razna oštećenja. Hrana koja može sadržavati visoke količine ohratoksina A je pšenica, kukuruz, heljda, iznutrice, meso, mesni proizvodi i proizvodi od žitarica [1].

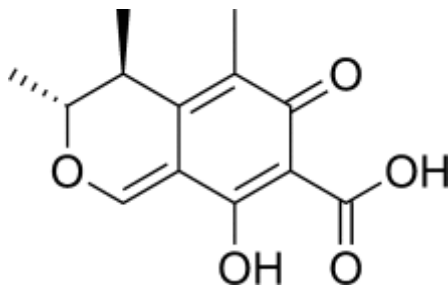
Ohratoksin A se najčešće može pojaviti kod skladištenja svježih proizvoda. Najzastupljeniji je u žitaricama i u proizvodima od žitarica, no može se pronaći i u drugim namirnicama kao što su kava, kakao, suho voće, začini i svinjetina. Također je pronađena i u grožđu koje još nije ubrano, a posljedično i u vinu. Unos je moguć i kod konzumiranja hrane čija je sirovina kontaminirana, a to mogu biti razni kolači, sokovi, sir itd. Životinje koje su hranjene kontaminiranom hranom u svom mesu, iznutricama poput bubrega i krvi imaju visoke koncentracije ohratoksina A [9].

U umjerenj klimi za proizvodnju ohratoksina A zaslužan je *Penicillium verrucosum*, u tropskim krajevima proizvode ga različite *Aspergillus* vrste, a to su *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *A. melleus*. Ohratoksinom A može biti kontaminirano i majčino mlijeko i to je vrlo često u područjima s umjerenom i hladnom klimom. Prema istraživanjima kontaminacija je pronađena u Italiji, Švicarskoj, Njemačkoj, Francuskoj i Norveškoj. U Norveškoj je kravlje mlijeko bilo izrazito kontaminirano. Osim u hladnijim krajevima, OTA u mlijeku je pronađena i u Indiji, Egiptu i Brazilu [9].

OTA se smatra jednim od uzročnika balkanske endemske nefropatije, a u svijetu oko 20.000 ljudi boluje ili sumnja na endemsku nefropatiju. OTA u ljudskom tijelu može ostati i do 35 dana nakon jednog unošenja zbog otežanog izlučivanja kroz bubrege koji ga zadržavaju u krvi zbog mimikrije sa aminokiselinom fenilalaninom. On se ne taloži niti se pohranjuje u ljudskom tijelu, no putem krvi dolazi do bubrega. Razine OTA kod svinja mogu biti vrlo visoke zato što se vrlo lako nakuplja u tkivima jer je topiv u mastima [9].

## 2.2. Citrinin

Citrinin (CIT) je mikotoksin koji produciraju plijesni iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Monascus*. Najčešće ga proizvode mikotoksini iz roda *Penicillium*. Struktura citrinina prikazana je na slici 2 [10].



Slika 2 Kemijska struktura citrinina [1]

CIT nije topljiv u hladnoj vodi, no djelomično ga je moguće otopiti u vrućoj vodi. Topljiv je u vodenoj otopini natrijevog hidroksida, natrijevom karbonatu i natrijevom acetatu. Također je topljiv u etanolu, metanolu i acetonitrilu tj. u polarnim organskim otapalima. Razgradnja citrinina u suhim uvjetima je na temperaturama većim od 175 °C, a u mokrim preko 100 °C. CIT se može eliminirati i dodavanjem kisele ili alkalne tekućine, a također će se uništiti i zagrijavanjem [10]. Optimalni uvjeti za razvoj citrinina su temperatura između 12 i 37 °C, a vlaga više od 16%. Citrinin najbolje raste na temperaturi od 30 °C, zato je vrlo bitno da se sirovine čuvaju na nižoj temperaturi te je jedan od vrlo bitnih faktora da prije skladištenja budu pravilno osušene. Do kontaminacije citrininom može doći prije, tijekom i nakon žetve žitarica [10].

CIT je mikotoksin koji se najčešće nalazi u proizvodima biljnog porijekla, no nije nemoguće da se pronade i u proizvodima životinjskog porijekla. Najčešće se pronalazi u žitaricama poput kukuruza, pšenice, raži, ječma. Osim u žitaricama nalazi se i u voću, orašastim plodovima i začinima. Osim svega navedenog, citrinin također može biti prisutan u siru i mlijeku.

U žitaricama i proizvodima od žitarica uz citrinin se često nalazi i ohratoksin A te aflatoksin B. Kod sokova od jabuka, uz CIT nalazi se i patulin. Proizvodnja citrinina ovisi o okolišnim čimbenicima i hranjivim tvarima koje su dostupne. Neki od tih čimbenika su temperatura, aktivnost vode, uvjeti skladištenja te dostupnost kisika, masnih kiselina, dušika i ugljika [10].

Citrinin ima malu molekulsku masu od samo 250,25 g/mol i jednostavna je molekula te kristalizira u obliku iglica žute boje. Ciklički je spoj i ima slobodnu karboksilnu skupinu. Do djelomične fotorazgradnje može doći pod UV svjetlosti u krutom stanju ili otopini. Također je moguća razgradnja u kiselim i lužnatim medijima uz djelovanje topline. Temperatura tališta mu iznosi

172°C, a u vodenim otopinama na temperaturama višim od 70°C se raspada i nastaju citrinin H1 i citrinin H2. Citrinin H1 je izrazito toksičan, dok citrinin H2 nije znatno toksičan [11].

Negativni učinci citrinitina na zdravlje nisu još dovoljno istraženi, no postoje podaci koji upućuju na to da je često u kombinaciji s drugim mikotoksinima. Najčešće se može pronaći u kombinaciji s ohratoksinom A u žitaricama. Također se smatra da su zajedno odgovorni za balkansku endemsku nefropatiju. Citrinin je kao i OTA hepatotoksičan, genotoksičan, teratogen, embriotoksičan i reproduktivno toksičan. Europska unija ima vrlo stroge zakone koji su već opisani u radu, a konkretno se radi o Uredba komisije (EZ) br. 1881/2006. koji se odnose i na citrinitin. Europska komisija tražila je stručno mišljenje o citrinitinu i njegovom utjecaju na zdravlje ljudi. Zbog toga je EFSA (European Food Safety Authority) donijela NOAEL (no-observed-effect level) koji iznosi 20 µg/ kg tjelesne mase/dan [11].

## **2.3. Ostali mikotoksini**

Ostali štetni mikotoksini koji se mogu naći u hrani su trihoteceni, aflatoksini, zearalenon, fumizinini i patulin.

### **2.3.1. Trihoteceni**

Iako je poznato oko 180 trihotecena, relevantnih za ljudsko zdravlje ima samo nekoliko. Osnovni producent trihotecena je *Fusarium spp.* Kad se konzumira hrana koja je kontaminirana trihotecenima, dolazi do povraćanja, mučnine, dijareje te vrtoglavice. Najpoznatiji trihoteceni su nivalenol, deoksinivalenol (DON), T-2 toksin, HT-2 toksin, diacetokscirpenol (DAS). Trihoteceni najčešće kontaminiraju pšenicu, kukuruz, rižu. Oni su na visokim temperaturama stabilni, normalnim procesiranjem hrane se ne razgrađuju i ne dolazi do njihove hidrolize u probavnom traktu [12].

### **2.3.2. Aflatoksini**

Aflatoksine proizvode plijesni roda *Aspergillus* i to *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*. Ovi mikotoksini su vrlo opasni za ljudsko zdravlje. Kancerogeni su, teratogeni, hepatotoksični, imunotoksični i kronično toksični. Najbitniji aflatoksin koji izaziva karcinom jetre je aflatoksin B1 (AFB1). AFB1 može se pronaći u najviše u kukuruzu, ali i u kikirikiju, suncokretu, začinima poput kopra, mlijeku i jajima. U proizvodima životinjskog podrijetla nalazi se zbog krmiva koje je bilo kontaminirano mikotoksinima [13].

### **2.3.3. Zearlaenon**

Zearalenon je mikotoksin kojeg produciraju plijesni roda *Fusarium*. Kod zearalenona je specifično što je po svojoj strukturi vrlo sličan hormonima estrogena. Svojim djelovanjem vezuje estrogene receptore i na taj način stvara i učinak koji je vrlo sličan učinku stvarnog estrogena. Zearalenon stvara poremećaje u urogenitalnom sustavu. Još opasnije je to što jaka i kronična trovanja ostavljaju posljedice na reproduktivne organe gdje može doći do degenerativnih promjena na testisima kod muškaraca i na jajnicima kod žena. Na kraju može dovesti do steriliteta ili pobačaja. Zearalenon se pojavljuje na žitaricama poput pšenice, kukuruzna i ječma [14].

### **2.3.4. Fumonizini**

Fumonizini su mikotoksini plijesni roda *Fusarium*. Fumonizini se često mogu pronaći u žitaricama, a najviše u kukuruzu, zatim pšenici, riži i ječmu. Glavni i najtoksičniji mikotoksin je fumonizin B1 (FB1), a uz njega postoje i FB2, FB3, FB4. Fumonizin B1 je nefrotoksičan i hepatotoksičan, a često se nalazi s drugim mikotoksinima. Kod svinja uzrokuju plućni edem [15-16].

### **2.3.5. Patulin**

Patulin je mikotoksin kojeg proizvode plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*. Prisutan je u voću i voćnim sokovima od jabuke i grožđa. Može se pronaći i u kašicama od voća. Patulin je pokazatelj kakvoće soka od jabuke. Ukoliko je patulin prisutan u jabučnom soku, kvaliteta soka je prilično loša. Patulin uzrokuje slabu genotoksičnost [17].

### 3. Biomarkeri i procjena izloženosti

Procjena izloženosti mikotoksinima za ljude provodi se tako da se analizira kontaminacija hrane i razina potrošnje te hrane. Procjena unosa mikotoksina se izražava u  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne težine/dan i uspoređuje se s TDI, t-TDI ili PMTDI svakog mikotoksina. Na taj način se procjenjuje potencijalni rizik za zdravlje. Napredna procjena izloženosti može se provoditi korištenjem pristupa biomarkera. Mjere se specifični biomarkeri u biološkim tekućinama tj. u urinu i krvi i prati se bioraspoloživost aflatoksina B1 (AFB1), ohratoksina A (OTA), zearalenona (ZEA), deoksinivalenola (DON) i fumonizina B1 (FB1). To se može provoditi i kod ljudi i kod životinja. Urin se više koristi u praćenju izloženosti mikotoksinima zato što uzimanje uzoraka urina nije invazivno kao što je vađenje krvi. Također je s urinom lakše rukovati i postoji puno manji rizik od infekcije osoba koje rukuju s njim. Iako urin sadrži sve biomarkere glavnih mikotoksina, sadrži ih u kraćem vremenskom intervalu u odnosu na krv. U prošlosti je razvijeno nekoliko kromatografskih metoda za određivanje svakog biomarkera mikotoksina u urinu, a biomarkeri su AFM1, OTA, DON, FB1, DOM-1 ZEA te  $\alpha$ -ZOL i  $\beta$ -ZOL. Istraživački i komercijalni laboratoriji rutinski koriste LC-MS/MS metodu za određivanje mikotoksina [18].

Kao što je već spomenuto, mikotoksini rade velike probleme u kontaminaciji hrane za ljude, ali i za životinje. Na taj način oni dolaze u tijelo ljudi. Kako bi se pratila takva izloženost, razvijena je metoda kojom se pomoću biomarkera prati izloženost. Prvi testovi su razvijeni kako bi se pratila izloženost aflatoksinima još između 1980. i 1990. godine. Sve do danas razvijane su različite metode i danas se procjenjuje izloženost različitim mikotoksinima.

Od 2010. godine sve više se razvijaju i primjenjuju metode LC-MS/MS za procjenu izloženosti mikotoksinima. Pozitivno je to što moderni instrumenti omogućuju sve veću osjetljivost i selektivnost, a također je pozitivno što je omogućeno sofisticirano čišćenje uzoraka. Korištenjem spomenutih metoda, mikotoksini se vrlo lako mogu kvantificirati u ljudskom urinu kao tzv. biomarkeri. Oni se mogu koristiti kako bi se opisala stvarna izloženost, toksikokinetika i bioraspoloživost toksina koji su prisutni [19],

Definirani su biomarkeri za komercijalno najvažnije mikotoksine i biomarkeri su postali mjerljivi biokemijski ili molekularni pokazatelji izloženosti ili biološkog odgovora na neki mikotoksin koji se može povezati s uzorkom. Tipični biomarkeri izloženosti su izvorni toksini, proteinski ili DNK adukti i/ili glavni metaboliti faze I i faze II. Oni se mjere u biološkim tekućinama tj. urinu i krvi, a pokazuju koliki je stvaran unos mikotoksina kroz hranu koja je kontaminirana [19].

Glavni metabolit koji se izlučuje ljudskim urinom je aflatoksin M1 (AFM1), a u prvim istraživanjima je dokazan odnos između metabolita i unosa AFB1 ovisno o dozi. Deoksinivalenol (DON) je najrasprostranjeniji mikotoksin i za njega su razvijene metode za njegovo određivanje u urinu pomoću LC-MS/MS. Za ohratoksin A također je dokazana velika povezanost između razine unosa i razine pronađene u urinu. S obzirom da ljudi mogu biti izloženi različitim mikotoksinima u isto vrijeme, razvijene su tehnike koje mogu određivati više različitih mikotoksina u jednom uzorku. Te tehnike uvelike olakšavaju rad i štede vrijeme, a sve više se koriste [20].

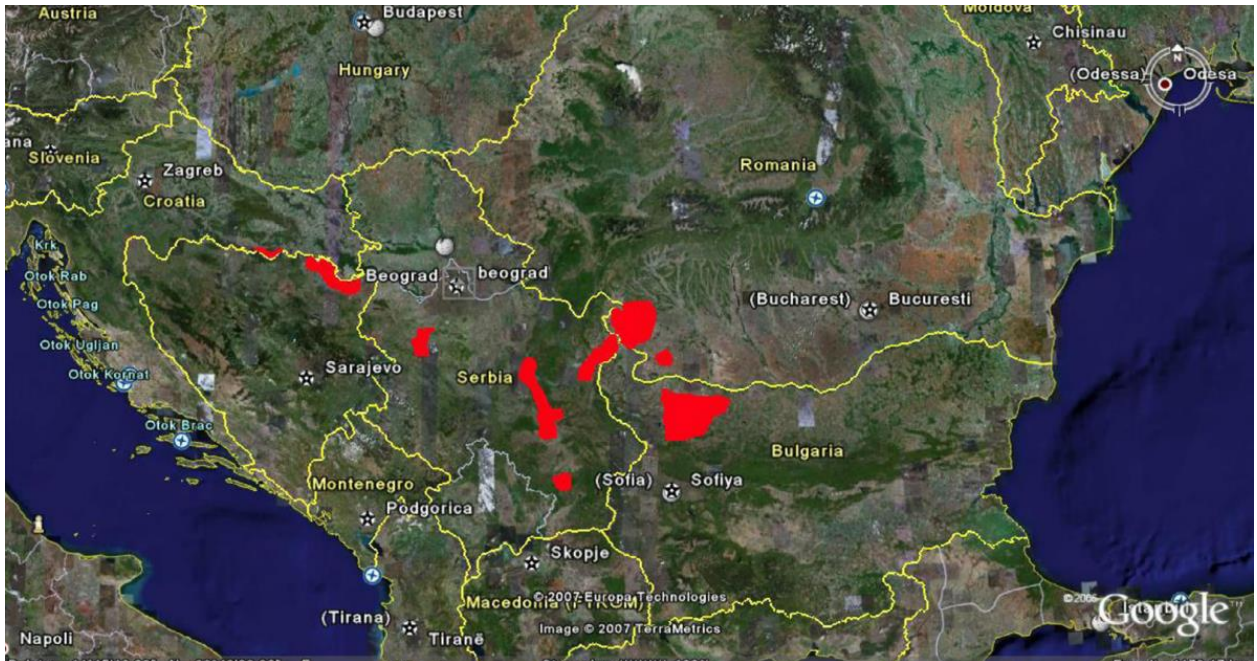


## 4. Balkanska endemska nefropatija

Balkanska endemska nefropatija (BEN) je bolest čiji uzročnik dovodi do kronične bubrežne bolesti i karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava. Tkiva koja zahvaća ova bolest su stanice proksimalnog tubula i stanice prijelaznog epitela mokraćnog sustava. Na stanicama proksimalnog tubula koje su zahvaćene dolazi do intersticijske fibroze i kroničnog zatajenja bubrega. Dok stanice koje su zahvaćene na prijelaznom epitelu mokraćnog sustava dolazi do nastanka karcinoma. Broj smrti od karcinoma u područjima gdje su ljudi zaraženi BEN-om je 55 puta veći od smrti u drugim dijelovima Hrvatske i svijeta [21].

Prisutnost BEN-a je prvi put zabilježena 1956. godine u Bugarskoj, a samo godinu dana kasnije slučaj s gotovo istim kliničkim i epidemiološkim nalazom zabilježen je u Srbiji. 1961. godine javlja se sličan slučaj i u Rumunjskoj [22].

1964. godine Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) prihvatila je naziv endemska nefropatija tj. balkanska endemska nefropatija i time to postaje službeni naziv. Prema WHO BEN je kronična tubulointersticijska nefropatija. Tipično za BEN je da ljudi obolijevaju u takozvanim žarištima. Žarišta su područja koja se nalaze u dolinama gdje se nalaze pritoci Dunava. Zahvaćene su zemlje tzv. Balkana tj. Hrvatska, Srbija, Rumunjska, Bugarska, Bosna i Hercegovina. Na slici je prikazana karta s područjima koja su zahvaćena BEN-om [21].



Slika 3 Područja zahvaćena balkanskom endemskom nefropatijom [23]

U Hrvatskoj je prvo selo gdje je primijećena zaraza Slavonski Kobal. U narodu je BEN, baš iz tog razloaga, dobio ime i kobalska bolest. BEN-om su bila zahvaćena samo neka sela, dok u okolnim selima nije bilo toliko često raširena. U takozvanim endemskim selima nije svako kućanstvo bilo zahvaćeno, no u onim zahvaćenim obolijevale su sve generacije osim djece. S obzirom da su obolijevali krvni i nekrvni srodnici, bilo je jasno da BEN nije nasljedna bolest, već da je za nju zaslužan neki vanjski čimbenik. Bitno je napomenuti da genetske predispozicije ipak imaju ulogu u zaštiti od ove bolesti zato što nisu obolijevale sve osobe koje su bile izložene vanjskom čimbeniku. Da bi se dokazalo da je krivac vanjski čimbenik i način života u području u kojem žive, proveden je tzv. pokus s Ukrajinčima. Stotinjak godina prije pojave BEN-a Ukrajinčani su naselili endemsko područje i počeli živjeti istim načinom života kao i stanovništvo koje je već ranije živjelo na tom području. Ukrajinčani koji su nastavili živjeti u Ukrajini ili su se naselili izvan endemskog područja nisu obolijevali od BEN-a, dok su oni u endemskom području obolijevali jednako kao i autohtono stanovništvo. To je bio dovoljan dokaz da BEN nije genetska bolest, već da je uzročnik neki vanjski čimbenik [21].

Prevalencija oboljelih je oko 5%, dok sumnja da se broj oboljeli zapravo kreće od 10 do 15%. Smatra se da žene obolijevaju češće, no postoji mogućnost da je to lažno pozitivan nalaz zato što muškarci umiru ranije od kardiovaskularnih bolesti te još uvijek nisu oboljeli od BEN-a. Nadalje, BEN nikada nije opisana u djece tj. osoba mlađih od 18 godina. Iz tog razloga se smatra da izloženost uzročniku mora biti poprilično duga. Također je primijećeno da svi koji počinju s liječenjem nalaze se u skupini starije životne dobi. Iako prevalencija pada i u nekim endemskim područjima više nema registriranih novih slučajeva zaraze, u svim žarištima još uvijek je BEN prisutan [21].

S pojavom bolesti pojavile su se različite mogućnosti koje bi mogle biti uzrok. Provedena su različita istraživanja kako bi se dokazalo što točno uzrokuje nefropatiju. Odbačene su sve sumnje na teške metale, nasljednost, viruse, imunološki poremećaj itd. BEN se počeo povezivati s ohratoksinom A zbog bubrežnih bolesti koje uzrokuje kod svinja. Uz ohratoksin A, sumnja se na citrinin i aristolohičnu kiselinu [21].

Osobe koje su oboljele od BEN-a su gotovo uvijek bili poljoprivrednici. Regije koje su pogođene BEN-om najčešće su ravnice koje su sklone poplavi, no u drugim državama, kao što su Srbija i Bugarska, zahvaćena su područja koja su brdovita i isušena. U Hrvatskoj je područje žarišta često bilo poplavljeno u prošlosti pa i danas te sadrži dosta podzemnih voda. Žarišno područje je odvojeno rijekom Savom na jugu, Slavonskim Brodom na istoku, Dilj gorom na sjeveru te Novom Gradiškom na zapadu. 5 žarišta u Hrvatskoj su sela Banovci, Kaniža, Bebrina, Šumeće, Brodski Varoš. Učestalost zaraze počela se ispitivati 1975. godine i od tada se svake godine vrši liječnički pregled na endemskim selima. U istraživanje je uključeno 5 endemskih sela, a na pregled je

pozvano svo stanovništvo koje je starije od 3 godine. Omjer oboljelih muškarac i žena je 1:1,65 što znači da žene oboljevaju češće. Razlozi mogu biti veća osjetljivost tijekom trudnoće i poroda ili veća sklonost korištenju zdravstvenih usluga i otkrivanju bolesti. BEN se može nazvati bolesti ruralnog stanovništva, posebno poljoprivrednika. Od posljedica bolesti u nekim obiteljima su umrli svi članovi, dok druge obitelji koje su živjele veoma blizu, nisu uopće zaražene. Zanimljivost je da su osobe koje su bile migranti također bile pogođene ovom bolesti [24].

Aristolohična kiselina nalazi se u jednoj biljci lat. *Aristolochia clematidis* koja je kod nas poznata pod nazivom vučja stopa ili šapa (Slika 3). Biljka često raste u poljima uz žito u istraživanjima na životinjama dokazano je da uzrokuje oštećenja bubrega. Životinjama su sjemenke ove biljke dodane u hranu i došlo je do oštećenja bubrega. U žarišnim selima se ova biljka može pronaći često u poljima uz druge žitarice. Također postoji poveznica s čajem koji su žene pile kako bi smršavile. U tom čaju je glavna biljka bila iz roda *Aristolochia*, a žene koje su konzumirale taj čaj dobivale su kroničnu insuficijenciju bubrega te u najgorem slučaju karcinom gornjih mokraćnih puteva. Bolest je nazvana nefropatija kineskog čaja. Istraživanjima je dokazano da je aristolohična kiselina odgovorna za nefrotoksično djelovanje i bolest kineskog čaja. Ta bolest je dobila ime aristolohična nefropatija i u usporedbi s balkanskom endemskom nefropatijom vrlo su slične. Jedina razlika je što balkanska endemska nefropatija sporije napreduje, ali se smatra da je to zbog manje količine koja se konzumira. Nagađa se da je brašno koje konzumiraju stanovnici žarišnih područja glavna namirnica koja je kontaminirana aristolohičnom kiselinom. Smatra se da se u sirovini za brašno nalaze sjemenke vučje stope i da je na taj način brašno kontaminirano, no ne toliko koliko čaj koji su konzumirale žene [25].



Slika 4 Vučja stopa (lat. *Aristolochia croatica*) [26]

Balkanska endemska nefropatija je kronična bolest koja ne počinje naglo, već neprimjetno i bez simptoma. Simptomi se javljaju tek u podmaklom stadiju bolesti te se pacijenti tek tada javljaju liječniku [25].

## 5. Eksperimentalni dio

### 5.1. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka za analizu vršila se tako da su uzorci urina najprije stavljeni da dosegnu sobnu temperaturu. Prije toga čuvani su u zamrzivaču kako ne bi došlo do promjena. Nakon što su dosegli sobnu temperaturu centrifugirani su 3 minute na 5600 x g. Pola mL supernatanta inkubirano je s 0,5 mL PBS (0,2 M, pH=7,4) koji sadrži 3 kU  $\beta$ -glukuronidaze od *E. coli* Type IX-A (Sigma-Aldrich, G7396-2MU). Inkubacija je trajala 16 sati na 37°C kako bi se omogućilo uklanjanje glukuronida mikotoksina. Nakon hidrolize 1 mL uzorka je pušten kroz kolone Oasis PRIME HLB SPE (Waters, Milford, MA), koja je prethodno pripremljena propuštanjem 1 mL MeOH nakon kojeg je propušteno 1 mL H<sub>2</sub>O. Nakon toga dva puta se ispiru s 0,5 mL H<sub>2</sub>O, a zatim su mikotoksini eluirani s 0,2 mL ACN tri puta. Ekstrakti su na kraju ispareni pod blagim mlazom dušika na sobnoj temperaturi te rekonstruirani s 470  $\mu$ L otapala za razrjeđivanje (10% ACN, 0,1% HAc) i obogaćen s 30  $\mu$ L IS smjese. Spremni uzorci su zatim analizirani pomoću LC-MS/MS metode [27].

## 5.2. Metoda

Metoda koja je korištena je LC-MS/MS. Značajni analiti odvojeni su na Acquity HSS T3 koloni ( $2.1 \times 100$  mm; Waters, Wexford, Irska) koja ima čestice od  $1,8 \mu\text{m}$ . Eluent A je  $\text{H}_2\text{O}$ , a eluent B ACN. Oba eluenta su zakiseljena s 0,1% HAc. Početni period je trajao 2 minute s 90% A, nakon njega je postotak B linearno povećan do 50% do 15. minute. Slijedi povećanje postotka eluenta B do 95% do 18. minute te nakon toga slijedi period održavanja od 4 minute. Poslije toga 3 minute ponovne ravnoteže kolone na 90% A. Brzina protoka je  $0,1 \text{ mL/min}$ . Nakon što je injektirano  $10 \mu\text{L}$ , igla je ispirana  $1/3$  minute da se minimalizira carry-over tj. prijenos uzorka. Otpad iz kolone prebačen je u maseni spektrometar od 5. do 22,5. minute ili u otpad preko ventila sa šest priključaka. Kolona je separirala na temperaturi od  $35^\circ\text{C}$ . ESI-MS/MS izveden je u načinu gdje se prate višestruke reakcije (sMRM) s prozorima detekcije od 3 minute. Za svaki analit praćena su najmanje dva pojedinačna prijelaza. Jedna kromatografska serija sastojala se od dva MS/MS eksperimenta, pri čemu su oba ionizacijska moda radila simultano uz brzo prebacivanje polariteta. Za sva mjerenja koristila se temperatura izvora od  $550^\circ\text{C}$ , plin za zavjesu 30 psi (69 kPa, dušika), plin izvora iona 1 (zaštitni plin) 80 psi (345 kPa dušika), plin izvora iona 2 (plin za sušenje) 80 psi (345 kPa dušika), plin za sudare (dušik) na visokoj razini. U negativnom načinu rada je napon ionskog raspršivanja bio  $-4,5 \text{ kV}$ , dok je u pozitivnom načinu rada bio postavljen na  $4,5 \text{ kV}$  [27].

### 5.3. Rezultati

U svrhu otkrivanja uzročnika balkanske endemske nefropatije ispitivani su uzorci populacije koja boluje od BEN-a. Osobe koje su dale svoj urin na analizu nisu bile na kontroliranoj prehrani. Istraživanje je provedeno na 126 uzoraka urina osoba iz žarišta balkanske endemske nefropatije. Ispitivani su bili i žene i muškarci, a većinom više osoba dolazi iz jedne obitelji te žive u istom kućanstvu. Ispitalo se je da li su ohratoksin A i citrinin prisutni u uzorcima. Ispitivani su biomarkeri ohratoksin A i citrinin te dodatno alternariol, zearalenon,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, dihidrocitrinon, deoksinivalenol, nivalenol, deepoksideoksinivalenol, fumonizin B1 i aflatoksin M1.

Istraživanje je pokazalo da je čak 59 od 126 uzoraka pozitivno na ohratoksin A, odnosno prevalencija iznosi 20,21%. Minimalna koncentracija koja je detektirana je 0,000698 ng/mL, dok je maksimalna koncentracija 0,05228 ng/mL. Prosjek koncentracija iznosio je 0,009613568 ng/mL što je poprilično visoko s obzirom da je LOD 0,0003 ng/mL. Citrinin, koji je također mogući uzročnik balkanske endemske nefropatije, nije pronađen niti u jednom od testiranih 126 uzoraka. Iako je citrinin također nefotoksičan, u uzorcima ljudi koji boluju od BEN-a ga nema.

Od ostalih ispitivanih biomarkera alternariol je detektiran u 3 uzorka, zearalenon je detektiran u 9 uzorka,  $\alpha$ -zearalenol nije detektiran u uzorcima, dok je  $\beta$ -zearalenol detektiran u 1 uzorku. Deoksinivalenol (DON) je detektiran u čak 56 uzoraka i prevalencija mu iznosi 19,18%. koncentracije mu variraju od 0,5254 pa sve do 38,6. S obzirom da je DON jedan od najraširenijih mikotoksina, a nije nefrotoksičan, ne postoji povezanost između DON-a i BEN-a. Nivalenol je detektiran u 4 uzorka, a deepoksideoksinivalenol, fumonizin B1 i aflatoksin M1 nisu detektirani ni u jednom uzorku. U tablicama se nalaze točni rezultati koji su dobiveni istraživanjem. Za svaki biomarker navede su već opisane, bitne informacije: LOD, minimalna i maksimalna koncentracija, prosjek koncentracija, prevalencija.

Tablica 2 Rezultati istraživanja [vlastiti izvor]

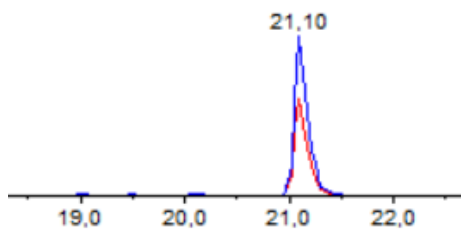
biomarker	alternariol	zearalenon	$\alpha$ -zearalenol	$\beta$ -zearalenol	ohratoksin A	citrinin
producent mikotoksina	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp./ <i>Penicillium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
LOD	0,01	0,003	0,01	0,003	0,0003	0,003
min	0,05663	0,004275	0	0,6053	0,0006977	0
max	0,2911	0,1286	0	0,6053	0,05228	0
average	0,147486667	0,046930556	0	0,6053	0,009613568	0
SD	0,125823267	0,035093851	0	0	0,011335674	0
median	0,09473	0,04149	0	0,6053	0,005708	0
IQR	0,117235	0,02049	0	0	0,00703	0
prevalencija N	3	9	0	1	59	0
prevalencija %	1,03	3,08	0,00	0,34	20,21	0,00

Tablica 3 Rezultati istraživanja [vlastiti izvor]

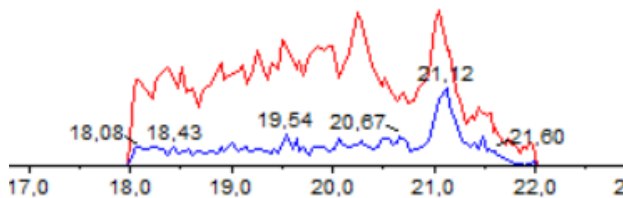
biomarker	dihidrocitrinon	deoksinivalenol	nivalenol	deepoksideoksi- nivalenol	fumonizin B1	aflatoksin M1
producent mikotoksina	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergills</i> spp.
LOD	0,003	0,05	0,05	0,3	0,001	0,0003
min	0	0,5254	0,5949	0	0	0
max	0	38,6	7,981	0	0	0
average	0	8,156653571	3,369225	0	0	0
SD	0	7,225905702	3,197503381	0	0	0
median	0	6,249	2,4505	0	0	0
IQR	0	8,37225	1,991275	0	0	0
prevalencija N	0	56	4	0	0	0
prevalencija %	0,00	19,18	1,37	0,00	0,00	0,00



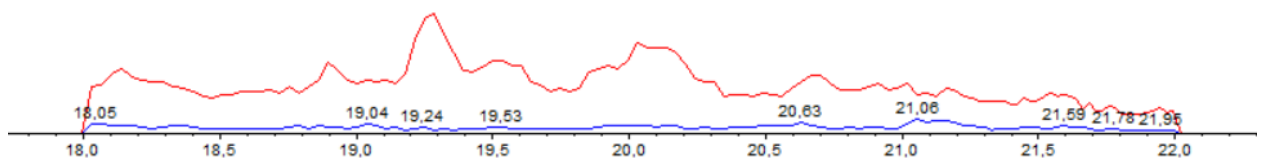
Na daljnjim slikama kromatograma prikazani su rezultati analize ohratoksina A: jedan prikazuje standard, jedan prikazuju uzorak gdje je koncentracija veća od LOD, dok je na jednom kromatogramu koncentracija ispod limita detekcije (<LOD). Na slici 5 nalazi se kromatogram internog standarda. Na njoj se može vidjeti da je pik na retencijskom vremenu od 21,10. Na slici 6 nalazi se primjer gdje se na uzorku može vidjeti da se pik nalazi na sličnom retencijskom vremenu, tj. na 21,12. U tom uzorku je koncentracija veća od LOD. Na slici nalazi se jedan primjer uzorka u kojem se koncentracija nalazi ispod limita detekcije i na retencijskom vremenu od otprilike 21,10 ne nalazi se pik za koji bi mogli reći da je iznad LOD.



Slika 5 Standard [vlastiti izvor]



Slika 6 Uzorak s koncentracijom većom od LOD [vlastiti izvor]



Slika 7 Uzorak s koncentracijom manjom od LOD [vlastiti izvor]

## 6. Usporedba rezultata

Rezultati dobiveni istraživanjem mogu se usporediti s rezultatima istraživanja koje je rađeno na trudnicama 2012. godine. U spomenutom istraživanju je sudjelovalo četrdeset zdravih trudnica tijekom trećeg tromjesečja trudnoće. Sve žene koje su sudjelovale u istraživanju su bile stanovnice grada Osijeka i okolnih mjesta. U tom istraživanju ispitivane su koncentracije ohratoksina A (OTA) i njegovog konjugata ( $OT\alpha$ ) prije i nakon enzimске obrade uzoraka. Metoda koja je korištena je FLD-HPLC analiza. Prije enzimatske hidrolize, rezultati su pokazali da je OTA bio prisutan iznad granice kvantifikacije (LOQ) u 75% uzoraka, a jedan uzorak pokazao je koncentraciju OTA iznad granice detekcije (LOD) čime su ukupni pozitivni uzorci iznosili 78%. Nakon što je provedena enzimska hidroliza konjugata, detektiran je manji broj uzoraka iznad granice kvantifikacije OTA, samo 58% uzoraka. Što se tiče  $OT\alpha$ , prije enzimске hidrolize bio je detektiran u svega dva uzorka, dok je nakon enzimске obrade prisutnost  $OT\alpha$  zabilježena u 100% uzoraka, i to u koncentracijama iznad granice kvantifikacije. [28].

U usporedbi s istraživanjem koje je provedeno na osobama koje boluju od BEN-a, u oba istraživanja otkriveno je da se ohratoksina A nalazi u značajnom broju uzoraka. U oba istraživanja mogu se usporediti mediani. Median OTA kod trudnica iznosi 0,02 ng/mL, a kod ljudi s BEN-om iznosi 0,005708 ng/mL. Rezultati ukazuju da je kod trudnica pronađena znatno veća koncentracija OTA u urinu.

Drugo istraživanje je provedeno na 65 dojenčadi u dobi od 1 do 18 mjeseci iz dvije zajednice u jugozapadnoj Nigeriji. Djeca su podijeljena u dvije skupine, djeca koja su samo dojena, dobi od 1 do 6 mjeseci (23 djece) i djeca koja su uz majčino mlijeko dobivala i komplementarnu hranu, dobi od 3 do 18 mjeseci (42 djece). Obitelji djece su se većinom hranila žitaricama poput riže, kukuruza i pšenice. Djeca koja su hranjena samo majčinim mlijekom imala su veće koncentracije ohratoksina A u urinu. Median je kod djece dojene samo majčinim mlijekom iznosio 0,013 ng/mL, a kod djece koja su dobivala i komplementarnu hranu bio je 0,007 ng/mL. Koncentracija je kod djece hranjene samo majčinim mlijekom išla čak do 0,076 ng/mL, dok je kod djece koja su dobivala komplementarnu hranu išla do 0,034 ng/mL. [29].

Ukoliko rezultate usporedimo s istraživanjem na osobama koje imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju, mediani koncentracije djece iz obje skupine su veći od mediana koncentracije osoba oboljelih od BEN-a. Medina je iznosio 0,005708 ng/mL što je znatno manje u odnosu na oba mediana kod djece.

## 7. Zaključak

Balkanska endemska nefropatija je izrazito opasna bolest čiji uzročnici mogu biti ohratoksin A (OTA) i citrinin (CIT). Istraživanjem koje je provedeno, dokazano je da se OTA nalazi u urinu osoba koje boluju od balkanske endemske nefropatije, no također je dokazano da se citrinin ne nalazi u uzorcima. Stanovnici endemskih područja konzumirali su hranu koja je bila kontaminirana ohratoksinom A. S obzirom da su žitarice najčešće kontaminirane, može se pretpostaviti da su ljudi konzumirali najviše kontaminirane žitarice. Osim žitarica može biti da su konzumirali meso životinja koje su jele kontaminirano krmivo. U endemskim područjima Hrvatske ljudi često uzgajaju žitarice za svoje potrebe i prehranu stoke. Također uzgajaju svoju stoku koju hrane tim istim žitaricama. To je također jedan od mogućih puteva kontaminacije.

## 8. Literatura

1. Pleadin J., Frece J., Markov K. Mycotoxins in food and feed. *Adv Food Nutr Res.* 2019.;89:297–345.
2. Peraica M., Domijan A. Contamination of Food with Mycotoxins and Human Health. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2001.;52(1):23-35.
3. Pitt J.I., urednik. Improving public health through mycotoxin control. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012.
4. Awuchi C.G., Ondari E.N., Nwozo S., Odongo G.A., Eseoghene I.J., Twinomuhwezi H., i sur. Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins.* 24. veljača 2022.;14(3):167.
5. Palfi M., Knežević N., Vrandečić K., Čosić J. MIKOTOKSINI U HRANI – ZAKONODAVNI OKVIR. *Glasilo biljne zaštite.* 2020.;20(4):472-483.
6. EUR-Lex <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32023R0915>, dostupno 20.9.2024.
7. Narodne Novine <https://www.zakon.hr/z/575/Zakon-o-kontaminantima>, dostupno 20.9.2024.
8. el Khoury A., Atoui A. Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins.* travanj 2010.;2(4):461–93.
9. Bhat R., Rai R.V., Karim A.A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* siječanj 2010.;9(1):57–81.
10. Kamle M., Mahato D.K., Gupta A., Pandhi S., Sharma N., Sharma B., i sur. Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies. *Toxins.* 2022.;14(2):85.
11. Pleadin J., Kudumija N., Frece J., Petrović D., Markov K. Citrinin u hrani i hrani za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2015;10(3-4):84-90.
12. Kanižai Šarić G., Milaković Z., Krstanović V. Toksičnost Fusarium toksina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2011.;6(3-4):112-116.
13. Pleadin J., Frece J., Markov K. Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2014.;9(3-4):75-82.

14. Samardžija M., Jeličić A., Mitak M., Pleadin J. Estrogeni učinci zearalenona u farmških životinja i opasnosti za zdravlje ljudi i životinja. *Veterinarska stanica*. 2017.;48(2):109-118.
15. Pleadin J., Kudumija N., Frece J., Zadavec M., Mitak M., Markov K. Pojavnost fumonizina i T-2 toksina u neprocesiranim žitaricama malog i velikog zrna u Hrvatskoj. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 201.;11(1-2):91-96.
16. Šegvić M., Pepeljnjak S. Fumonisins and their effects on animal health.. *Veterinarski arhiv*. 2001.;71(5):299-323.
17. Bevardi M., Petrović M., Markov K., Bošnjir J. How sulphur dioxide and storage temperature contribute to patulin degradation in homemade apple juice. *Arch Ind Hyg Toxicol*. 01. rujan 2018.;69(3):258–63.
18. Solfrizzo M., Gambacorta L., Warth B., White K., Srey C., Sulyok M., i sur. Comparison of single and multi-analyte methods based on LC-MS/MS for mycotoxin biomarker determination in human urine. *World Mycotoxin J*. 01. studeni 2013.;6(4):355–66.
19. Warth B., Sulyok M., Krska R. LC-MS/MS-based multibiomarker approaches for the assessment of human exposure to mycotoxins. *Anal Bioanal Chem*. srpanj 2013.;405(17):5687–95.
20. Warth B., Sulyok M., Fruhmann P., Mikula H., Berthiller F., Schuhmacher R., i sur. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 15. srpanj 2012.;26(13):1533–40.
21. Jelaković B., Dika Ž., Karanović S., Vuković L. I. ENDEMSKA NEFROPATIJA U HRVATSKOJ. *Liječnički vjesnik*. 2015.;137(3-4).
22. Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy--current status and future perspectives. *Clin Kidney J*. 01. lipanj 2013.;6(3):257–65.
23. Jelaković B., Dika Ž., Arlt V.M., Stiborova M., Pavlović N.M., Nikolić J., i sur. Balkan Endemic Nephropathy and the Causative Role of Aristolochic Acid. *Semin Nephrol*. svibanj 2019.;39(3):284–96.
24. Ceović S., Hrabar A., Sarić M. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. ožujak 1992.;30(3):183–8.
25. Djukanovic L. Endemic nephropathy: A disease that requires further research. *Med Podml*. 2016.;67(3):1–8.
26. <https://temperate.theferns.info/image/Aristolochia+clematitis>, dostupno 12.9.2024

27. Šarkanj B., Ezekiel C.N., Turner P.C., Abia W.A., Rychlik M., Krska R., i sur. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Anal Chim Acta*. 17. kolovoz 2018.;1019:84–92.

28. Klapac T., Sarkanj B., Banjari I., Strelec I. Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. prosinac 2012.;50(12):4487–92.

29. Ezekiel C.N., Abia WA., Braun D., Šarkanj B., Ayeni K.I., Oyedele O.A., i sur. Mycotoxin exposure biomonitoring in breastfed and non-exclusively breastfed Nigerian children. *Environ Int*. siječanj 2022.;158:106996.

## Popis slika

Slika 1 Kemijska struktura ohratoksina A [8] .....	6
Slika 2 Kemijska struktura citrinina [1].....	8
Slika 3 Područja zahvaćena balkanskom endemskom nefropatijom [23] .....	14
Slika 4 Vučja stopa (lat. <i>Aristolochia croatica</i> ) [26] .....	17
Slika 5 Standard [vlastiti izvor] .....	22
Slika 6 Uzorak s koncentracijom većom od LOD [vlastiti izvor] .....	22
Slika 7 Uzorak s koncentracijom manjom od LOD [vlastiti izvor] .....	22

1  
HJWON  
A118UBAINR

Sveučilište  
Sjever

1  
V&K C



1  
MME

SVEUČILIŠTE  
SJEVER

IZJAVA O AUTORSTVU  
I  
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, Ella Bogdanović pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autorica završnog rada pod naslovom „Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom mikotoksinima“ te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Studentica:  
Ella Bogdanović

Bogdanović Ella  
(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, Ella Bogdanović neopozivo izjavljujem da sam suglasana s javnom objavom završnog rada pod naslovom „Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom mikotoksinima“ čiji sam autorica.

Studentica:  
Ella Bogdanović

Bogdanović Ella  
(vlastoručni potpis)



# Završni rad, Ella Bogdanović-Izloženost populacije s utvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom mikotoksinima.docx

---

## ORIGINALITY REPORT

---

9%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

---

## MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

---

4%

★ [repozitorij.unios.hr](http://repozitorij.unios.hr)

Internet Source

---

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On