

Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici koji imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju

Pilica, Paula

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:122:389283>

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. 81/PREH/2024

**Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici koji
imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju**

Paula Pilica, 0336056911

Koprivnica, rujan 2024. godine



Sveučilište Sjever

Odjel za prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 81/PREH/2024

Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici koji imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju

Student

Paula Pilica 0336056911

Mentor

izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj

Koprivnica, rujan 2024. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

PRISTUPNIK PAULA PILICA

MATIČNI BROJ 0336056911

DATUM 4.9.2024.

KOLEGIJ PREHRAMBENA MIKROBIOLOGIJA

NASLOV RADA Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici koji imaju utvr enu balkansku endemsku nefropatiju

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Exposure to mycotoxins in hospitalized patients with diagnosed balkan endemic nephropathy

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 81/PREH/2024

OPIS

Kronične bubrežne bolesti predstavljaju značajan izazov za javno zdravlje širom svijeta, a posebno u određenim regijama s visokom prevalencijom specifičnih oblika ove bolesti. Balkanska endemska nefropatija (BEN) je jedno od takvih stanja koje pogađa ljude u specifičnim dijelovima Balkana, uključujući određene regije Hrvatske. Cilj ovog završnog je utvrditi izloženost mikotoksinima osobama koje su oboljele od enemske balkanske nefropatije, trenutno su na liječenju u bolnici s bolničkom prehranom. Pacijentu obično uz bolničku prehranu konzumiraju i hranu koju dobivaju od posjetitelja koja nije strogo kontrolirana. Očekuje se manja izloženost pogotovo ohratksinu A i citrininu kada su pacijenti na bolničkoj prehrani.

ZADATAK URUČEN 1.3.2024.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SIEVER



Očisti obrazac

Predgovor

Ovaj završni rad rezultat je višemjesečnog istraživanja i truda koji su uloženi u proučavanje balkanske endemske nefropatije koja me posebno zanimala zbog istraživanja utjecaja mikotoksina na ljudsko zdravlje. Tijekom istraživanja koristila sam različite izvore, uključujući knjige, znanstvene članke i online resurse, kako bih dobila što širu perspektivu na temu. Želim izraziti zahvalnost svom mentoru, izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj, na nesebičnoj podršci, strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog rada. Njegove smjernice bile su od neprocjenjive važnosti za oblikovanje konačne verzije ovog rada. Također zahvaljujem svim profesorima i kolegama na fakultetu, kao i svojoj obitelji i prijateljima, koji su mi pružili podršku tijekom mog obrazovanja i izrade ovog završnog rada.

Sažetak

Balkanska endemska nefropatija (BEN) je kronična bubrežna bolest koja se javlja u specifičnim regijama Balkana, uključujući određene dijelove Hrvatske, i povezana je s izloženošću mikotoksinima. Mikotoksini, toksini koje proizvode određene vrste gljiva, igraju ključnu ulogu u razvoju i progresiji ove bolesti. Istraživanje je usmjereno na analizu prisutnosti mikotoksina, uključujući ochratoksin A (OTA), citrinin (CIT), deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), i zearalenon (ZEN) u uzorcima urina pacijenata oboljelih od BEN-a. Analiza uzoraka provedena je korištenjem Sciex QTrap®6500+ LC-MS/MS sustava, opremljenog Turbo V elektrosprej ionizacijskim izvorom, i UHPLC sustava Agilent 1290 serije. Metode pripreme uzoraka uključivale su centrifugiranje, deglukuronidaciju s β -glukuronidazom, i ekstrakciju pomoću SPE kolona. Analitički uzorci su analizirani na Acquity HSS T3 koloni uz korištenje metoda višestrukog praćenja reakcija u ESI-MS/MS režimu. U istraživanju je analizirano 126 uzoraka urina pacijenata oboljelih od BEN-a. Rezultati su pokazali prisutnost OTA u 14,38% uzoraka, dok CIT nije otkriven. Ostali mikotoksini također su detektirani: DON u 10,27%, NIV u 4,11%, i ZEN u 1,03%. Ovi nalazi ukazuju na značajnu izloženost OTA, dok prisutnost drugih mikotoksina naglašava potrebu za daljnjim istraživanjima o njihovom utjecaju na zdravlje pacijenata s BEN-om. Pored toga, usporedba s prethodnim istraživanjima, uključujući analize uzoraka urina trudnica, pokazuje različite razine detekcije OTA ovisno o metodi obrade uzoraka. Rezultati sugeriraju da se veći postotak uzoraka kod trudnica pokazuje pozitivan na OTA u usporedbi s istraživanjem na pacijentima s BEN-om.

Ključne riječi; balkanska endemska nefropatija, biomarkeri izloženosti mikotoksinima, ochratoksin A, citrinin, LC-MS/MS

Summary

Balkan endemic nephropathy (BEN) is a chronic kidney disease that occurs in specific regions of the Balkans, including certain parts of Croatia, and is associated with exposure to mycotoxins. Mycotoxins, toxins produced by certain types of fungi, play a key role in the development and progression of this disease. The research focuses on analyzing the presence of mycotoxins, including ochratoxin A (OTA), citrinin (CIT), deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), and zearalenone (ZEN) in urine samples from patients with BEN. The sample analysis was performed using the Sciex QTrap®6500+ LC-MS/MS system, equipped with a Turbo V electrospray ionization source, and the Agilent 1290 series UHPLC system. Sample preparation methods included centrifugation, deglucuronidation with β -glucuronidase, and extraction using SPE columns. Analytical samples were analyzed on an Acquity HSS T3 column using multiple reaction monitoring methods in the ESI-MS/MS mode. The study analyzed 126 urine samples from BEN patients. The results showed the presence of OTA in 14.38% of the samples, while CIT was not detected. Other mycotoxins were also detected: DON in 10.27%, NIV in 4.11%, and ZEN in 1.03%. These findings indicate significant exposure to OTA, while the presence of other mycotoxins highlights the need for further research on their impact on the health of BEN patients. In addition, a comparison with previous studies, including analyses of urine samples from pregnant women, shows different detection levels of OTA depending on the sample processing method. The results suggest that a higher percentage of samples from pregnant women tested positive for OTA compared to the study on BEN patients.

Keywords: Balkan endemic nephropathy, biomarkers of mycotoxin exposure, ochratoxin A, citrinin, LC-MS/MS

Popis korištenih kratica

AA Aristolohična kiselina

AAI Aristolohična kiselina I

AAII Aristolohična kiselina II

ACN Acetonitril

AF Aflatoksin

AFB1 Aflatoksin B1

AFM1 Aflatoksin M1

BEN Balkanska endemska nefropatija

CIT Citrinin

DON Deoksinivalenol

ELISA Enzimski imunosorpcijski test

FB Fumonizin

FB1 Fumonizin B1

H₂O Voda

HPLC Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IARC Međunarodna agencija za istraživanje raka

LC-MS/MS Tekućinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom

LOD Granica detekcije

LOQ Granica kvantifikacije

OTA Ochratoksin A

OT α Ochratoksin α

TCT Trihoteceni

ZEA Zearalenon

α -ZEA α -zearalenolom

β -ZEA β -zearalenolom

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Plijesni.....	2
3.	Mikotoksini.....	3
3.1.	Mikotoksikoze kod ljudi.....	3
3.2.	Negativan utjecaj mikotoksina na ljude	4
3.3.	Utjecaj klimatskih promjena na mikotoksine.....	5
4.	Biomarkeri i procjena izloženosti	6
4.1.	Metode analize biomarkera	7
4.1.1.	<i>Glukuronidi i glukuronidaza</i>	7
4.2.	Ohratoksin α	8
4.3.	Dihidrocitrinon.....	8
5.	Balkanska endemska nefropatija.....	9
5.1.	Uzročnici BEN-a.....	10
5.1.1.	<i>Citrinin</i>	10
5.1.2.	<i>Ohratoksin A</i>	11
5.1.3.	<i>Aristolohična kiselina</i>	11
5.2.	Simptomi BEN-a.....	12
5.3.	BEN u Hrvatskoj.....	13
6.	Prehrana pacijenata oboljelih od kroničnih bubrežnih bolesti.....	14
6.1.	Natrij.....	14
6.2.	Kalij.....	15
6.3.	Fosfor	15
6.4.	Unos tekućine.....	16
7.	Eksperimentalni dio	17
7.1.	Uzorci.....	17
7.2.	Priprema uzorka	18
7.3.	LC – MS/MS	18
7.4.	Validacijski test.....	19
8.	Rezultati	20
9.	Zaključak.....	23
10.	Literatura	24
	Popis slika.....	27

1. Uvod

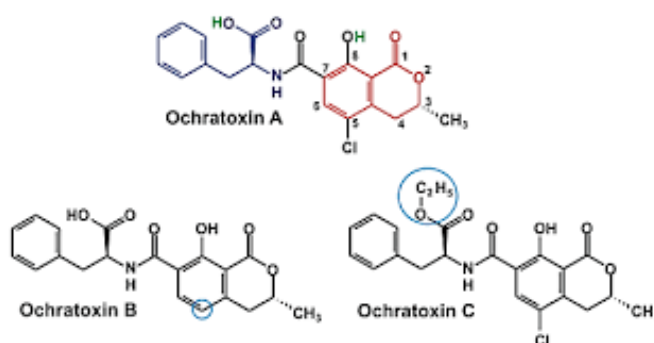
Kronične bubrežne bolesti predstavljaju značajan izazov za javno zdravlje širom svijeta, a posebno u određenim regijama s visokom prevalencijom specifičnih oblika ove bolesti. Balkanska endemska nefropatija je jedno od takvih stanja koje pogađa ljude u specifičnim dijelovima Balkana, uključujući određene regije Hrvatske. BEN je kronična bolest bubrega koja se pojavljuje u endemskim područjima i karakterizira se postupnim gubitkom funkcije bubrega, često uzrokovanim izloženošću mikotoksinima prisutnim u hrani i vodi. Mikotoksini, toksični spojevi koje proizvode određene vrste gljiva, prepoznati su kao važni faktori u razvoju i napretku bubrežnih bolesti, uključujući BEN. Najpoznatiji mikotoksin povezan s BEN-om je ohratoksin A, dok citrinin također igra ulogu u razvoju ove bolesti. OTA je posebno značajan zbog svoje nefrotoksičnosti i karcinogenosti, dok CIT može dodatno pogoršati stanje bubrega. Ove toksične tvari prisutne su u različitim prehrambenim proizvodima i njihov utjecaj na zdravlje može biti ozbiljan, osobito kod osoba s postojećim problemima bubrega. S obzirom na važnost mikotoksina u razvoju i napredovanju BEN-a, istraživanje prisutnosti ovih spojeva u uzorcima urina oboljelih od BEN-a može pružiti ključne informacije za razumijevanje bolesti i razvoj učinkovitih preventivnih mjera. Ova studija koristi napredne analitičke metode, uključujući LC-MS/MS sustav, za detekciju i kvantifikaciju biomarkera mikotoksina u urinu pacijenata s BEN-om. Korištenje ovih tehnika omogućuje precizno određivanje razina OTA, CIT-a i drugih mikotoksina, pružajući važne podatke za procjenu izloženosti i njenog utjecaja na zdravlje pacijenata. Pored toga, istraživanje se usmjerava na utjecaj bolničke prehrane na prisutnost mikotoksina u urinu, s obzirom da bolnička hrana mora značajno pozitivno utjecati na zdravstveno stanje pacijenata. Analizom uzoraka urina prikupljenih od pacijenata koji su konzumirali bolničku hranu, nastojimo razumjeti kako prehrambene navike mogu utjecati na koncentraciju mikotoksina i na taj način na tijek bolesti. Ova studija ne samo da doprinosi boljem razumijevanju utjecaja mikotoksina na pacijente s BEN-om, već i pruža smjernice za razvoj prehrambenih preporuka i strategija za smanjenje izloženosti mikotoksinima. Rezultati istraživanja mogu imati značajne posljedice za javno zdravlje u regijama pogođenim BEN-om i mogu pomoći u formuliranju učinkovitijih pristupa za prevenciju i upravljanje kroničnim bubrežnim bolestima.

2. Plijesni

Plijesni su dio široke skupine gljiva s nitastom strukturom, izgrađenih od gusto povezanih cjevastih stanica koje su bezbojne i ne sadrže klorofil. Njihove hife, koje su niti gljiva, rastu u obliku isprepletene mreže i tvore micelij, odnosno prašnjavu ili paučinastu prevlaku na podlozi. Većina hifa ima vegetativnu funkciju, što znači da neprestano rastu i formiraju koloniju plijesni. Na vrhovima zračnih hifa nalaze se specijalizirane stanice koje proizvode spore, a koje u povoljnim uvjetima mogu stvoriti nove kolonije plijesni. Plijesni mogu proizvoditi nespodne i spolne spore. Spore su otporne na uvjete koji bi inače uništili vegetativne stanice gljiva. Najčešći način razmnožavanja plijesni je nespodni, pri čemu su spore odgovorne za početak infekcija kod ljudi. Plijesni su primarno saprofiti, koriste organsku tvar kao izvor hrane koja im je potrebna za rast, reprodukciju i obranu. Njihova sposobnost prilagodbe novim izvorima hrane često dovodi do štetnih posljedica u poljoprivredi i industriji, osobito jer mogu rasti i u uvjetima s vrlo malo vlage, što im omogućuje da budu značajni biljni patogeni. Plijesni koje proizvode mikotoksine često kontaminiraju prehrambene sirovine te se prema klasifikaciji dijele na plijesni polja i plijesni skladišta. Među plijesnima koje proizvode mikotoksine u hrani, ističu se rodovi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, . Iako su mnoge vrste plijesni poznate po proizvodnji štetnih metabolita, određeni proizvodi gljiva pokazali su se iznimno korisnima. Primjerice, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi etanol i ugljikov dioksid tijekom fermentacije glukoze [1]. Zbog fermentacije koju provodi, *Saccharomyces cerevisiae* važan je za industriju pića, koja se oslanja na ovaj kvasac u proizvodnji mnogih fermentiranih napitaka, uključujući vino, pivo i jabukovaču. Kao i destiliranih pića poput ruma, votke, viskija i rakije. Osim u industriji pića *Saccharomyces cerevisiae* najzastupljenija je vrsta kvasca u izradi kruha i kiselog tijesta. Tijekom fermentacije šećera, kvasne stanice djeluju kao sredstvo za dizanje tijesta u pekarskim proizvodima, što rezultira povećanjem volumena tijesta zbog nastajanja plinova [2]. Plijesni iz rodova *Penicillium camamberti*, *Penicillium caseolicolum*, *Penicillium candidum*, *Penicillium roqueforti* i *Geotrichum candidum*, poznati kao plemenite plijesni, značajni su za proizvodnju sira poput Gorgonzole, Brie i Stilton [3].

3. Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni metaboliti koje proizvode gljive, a toksični su za sisavce, perad i ribu. Male su molekulske mase ali se strukturno razlikuju (**Slika 1**). Tako su aflatoksin (AF), patulin, ohratoksin A (OTA), zearalenon (ZEA), trihoteceni (TCT), od kojih je najvažniji deoksinivalenol (DON) i fumonizini B (1-3) (FB), citrinin (CIT) jedni od poznatijih mikotoksina. Oni imaju snažan i raznovrstan štetan utjecaj na biološke procese. Tako su neki mikotoksini poput AF, OTA i FB kancerogeni dok su neki, kao što su AF i sterigmatocistin, mutageni. Drugi mikotoksini mogu uzrokovati teratogene, hemoragične, hepatotoksične, dermatotoksične i neurotoksične posljedice. Bolesti koje nastaju zbog mikotoksina nazivaju se mikotoksikoze [4].



Slika 1. Razlika u strukturnoj građi Ohratoksina [1]

3.1. Mikotoksikoze kod ljudi

Mikotoksini su jedni od glavnih prirodnih zagađivača i uzročnici su mikotoksikoze kod ljudi [5]. Kontaminacija hrane različita je svake godine, a ovisi i o geografskoj regiji [6]. Osim toga značajno ovisi o klimatskim i higijenskim uvjetima, te ekonomskom bogatstvu regije. Zbog toga je kontaminacija hrane mikotoksinam prisutnija u zemljama trećeg svijeta odnosno u tropskim i subtropskim regijama [5]. Do mikotoksikoze kod ljudi dolazi zbog konzumacije hrane biljnog i životinjskog podrijetla koji u sebi sadrže mikotoksine [4]. Plijesni mogu usjeve biljaka kontaminirati tijekom vegetacije. Također se mogu prenositi sjemenom te rasti zajedno s biljkama, a osim toga do kontaminacije može doći i prilikom skladištenja [6]. Bolesti koje su uzrokovale plijesni, tijekom godina, kod ljudi su ergotizam u Europi, alimentarna toksična aleukija u Rusiji, akutna aflatoksikoza u Africi te Južnoj i Istočnoj Aziji te primarni rak jetre kod ljudi u Africi i Jugoistočnoj Aziji. Također se za smatra da ima veliku ulogu u balkanskoj endemskoj nefropatiji u bivšoj Jugoslaviji te u kroničnom intersticijskom nefritisu u Sjevernoj Africi [4].

3.2. Negativan utjecaj mikotoksina na ljude

Mikotoksikoze, kao i drugi toksični sindromi, dijele se na akutne i kronične. Akutna toksičnost manifestira se naglo i uzrokuje brzu toksičnu reakciju, dok kronična toksičnost nastaje uslijed dugotrajnog izlaganja niskim razinama toksina. To može rezultirati razvojem raka i drugih trajnih zdravstvenih problema [7]. Unos AF može uzrokovati brojne zdravstvene poremećaje, a njihova ozbiljnost varira ovisno o količini AF koju osoba unese, dužini izloženosti, općem zdravstvenom stanju i dobi osobe. Posebno je zabrinjavajuće što AF, naročito aflatoksin B1 (AFB1), imaju izražen kancerogeni učinak. Prema klasifikaciji Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC) AFB1 je uvršten u skupinu 1 karcinogena, zbog veoma visokog rizika od primarnog raka jetre kod ljudi. AF mogu uzrokovati i smanjenje broja T4 limfocita, što je povezano s različitim simptomima imunološkog deficita. OTA također predstavlja značajan rizik za ljudsko zdravlje, jer može uzrokovati nefropatije i tumore mokraćnog sustava. Toksin ZEA i njegovi derivati povezani su s preranim pubertetom kod djece i hormonskim poremećajima kod odraslih, uključujući estrogenizaciju, te inhibiciju normalnog razvoja testisa kod muškaraca. Također je poznato da ZEA može igrati ulogu u razvoju raka prostate [8]. Fumonizin B1 (FB1), kao najzastupljeniji oblik fumonizina, klasificiran je od strane IARC-a kao kancerogen grupe 2B, što znači da je mogući kancerogen za ljude. Osim toga, fumonizini inhibiraju unos folne kiseline putem folatnog receptora, što je također povezano s visokom učestalošću defekata neuralne cijevi u ruralnim populacijama poznatim po konzumaciji kontaminiranog kukuruza. Primarni toksični učinak TCT manifestira se inhibicijom sinteze proteina. Ovi mikotoksini posebno utječu na aktivno epitelne stanice probavnog trakta, kožu, te limfoidne i eritroidne stanice. Toksični učinci TCT mogu rezultirati opsežnom smrću stanica oralne sluznice i kože u kontaktu s toksinom, kao i akutnim posljedicama na probavni sustav. Također, dolazi do smanjenja funkcije koštane srži i oslabljene imunološke reakcije[7].

3.3. Utjecaj klimatskih promjena na mikotoksine

Ljudska aktivnost značajno utječe na klimatske i vremenske fenomene, zbog čega živimo u razdoblju intenzivnih ekoloških promjena. Povećanje koncentracija stakleničkih plinova, poput metana, ugljičnog dioksida, dušikova oksida i klorofluorouglijika u atmosferi, rezultira globalnim zagrijavanjem, promjenama u obrascima oborina te češćim i intenzivnijim sušama. Klimatske promjene i ekstremni klimatski događaji postali su dio svakodnevice, a njihova učestalost i intenzitet sve su izraženiji. Brojna istraživanja pokazuju da su biljne epidemije, poput pojave bolesti i štetnika, klimatski uvjetovane. Promjene u temperaturi, vlažnosti i obrascima oborina stvaraju uvjete koji pogoduju razvoju biljnih patogena, plijesni i insekata, što dodatno ugrožava poljoprivredne usjeve i globalnu sigurnost hrane [9]. Ključni čimbenici u produkciji mikotoksina su okolišni uvjeti, odnosno klimatski čimbenici karakteristični za pojedina geografska područja, koji mogu varirati na godišnjoj razini. Istraživanja pokazuju da klimatske promjene, poput povišene koncentracije ugljičnog dioksida, povećanja temperature te učestalih izmjena sušnih i kišnih razdoblja, imaju značajan utjecaj na rast plijesni i pojavu mikotoksina. Dugoročne promjene u temperaturi, vlažnosti, količini oborina te učestalost ekstremnih vremenskih pojava već imaju utjecaj na poljoprivrednu praksu, proizvodnju i kvalitetu usjeva. S obzirom na sve izraženije klimatske promjene, očekuje se da će one u budućnosti značajno utjecati na pojavnost toksikotvornih plijesni, vrstu mikotoksina i njihovu učestalost u različitim geografskim područjima, što će predstavljati važan zdravstveni i ekonomski rizik te izazov za globalnu sigurnost hrane. Povećanje temperatura u kombinaciji s ekstremnim oborinama ili sušnim razdobljima povećava stres biljaka, dodatno predisponirajući kukuruz i druge žitarice na infekcije plijesnima i kontaminaciju mikotoksinima. *Aspergillus* vrste dominiraju u toplim i umjerenim dijelovima svijeta, dok su *Penicillium* vrste česte u hladnijim dijelovima svijeta. Stoga se AF, koje proizvode *Aspergillus* vrste, u većim koncentracijama nalaze u tropskim i suptropskim područjima, fuzarijski mikotoksini u umjerenom klimatskom području, a OTA, koje najviše produciraju plijesni iz roda *Penicillium* i *Aspergillus*, u područjima hladnije klime, ali i tropskim i suptropskim područjima[10].

4. Biomarkeri i procjena izloženosti

Pojam biomarkera koristi se u širokom smislu kako bi obuhvatio različite oblike mjerenja koja prikazuju interakciju između biološkog sustava i potencijalnih opasnosti iz okoline, uključujući kemijske, fizičke ili biološke prijetnje. Biomarkeri se mogu definirati kao bilo koji biološki odgovor na okolišne kemikalije na staničnoj ili molekularnoj razini, koji se mjeri unutar organizma ili u njegovim produktima kao što su krv, urin, feces, kosa, nokti i slično. Ovi pokazatelji omogućuju utvrđivanje odstupanja od normalnog fiziološkog stanja koja nisu vidljiva na razini cijelog organizma [11]. Kako bi se procijenila izloženost ljudi koja proizlazi iz konzumacije kontaminirane hrane, razvijeni su pristupi temeljeni na biomarkerima kao komplementarni alati biološkog praćenja, uz standardne metode analize hrane [12]. Mjerenje specifičnih biomarkera u biološkim tekućinama, poput urina ili krvi, koristi se za praćenje bioraspoloživosti mikotoksina kao što su AFB, OTA, DON, ZEA i FB1 kod ljudi i životinja. Iako urin odražava prisutnost biomarkera mikotoksina unutar kraćeg vremenskog razdoblja u usporedbi s krvlju, često se preferira za biološko praćenje zbog nekoliko prednosti. Uzimanje uzoraka urina je neinvazivno, jednostavno za rukovanje, nosi manji rizik od infekcije za osoblje koje rukuje uzorcima, te sadrži važne biomarkere glavnih mikotoksina. Prikladni urinarni biomarkeri za navedene mikotoksine uključuju aflatoksin M1, aflatoksin P1, aflatoksin Q1, OTA, ohratoksin α ($OT\alpha$), DON i njegov metaboliti glukuronidi, te sulfati odnosno de-epoksid deoksinivalenol, te ZEA s njegovim metabolitima α -zearalenolom (α -ZEA), β -zearalenolom (β -ZEA) i FB1 [13].

4.1. Metode analize biomarkera

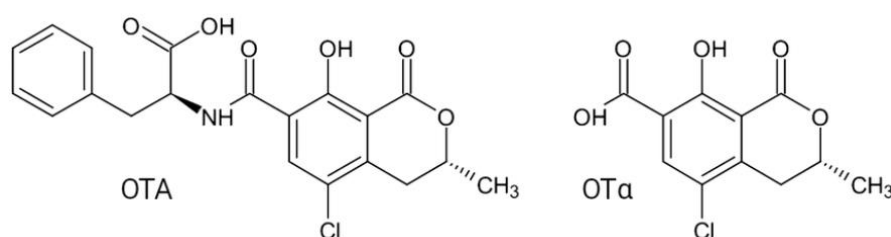
Istraživanja biomarkera za procjenu izloženosti mikotoksinima započela su krajem 1980-ih i početkom 1990-ih, uz opsežne studije o kancerogenim AF. Ova istraživanja bila su ključna za utvrđivanje etiološke uloge AF u ljudskim bolestima, omogućujući preciznije procjene izloženosti, bolji uvid u mehanizme bolesti, te razvoj i evaluaciju preventivnih mjera. AFM1 analiziran je kompetitivnim izravnim enzimskim imunosorpcijskim testom (ELISA), dok je aflatoksin-N7-gvanin mjereno tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Kasnih 1990-ih, istraživanja su se proširila na OTA i FB, uglavnom koristeći HPLC s fluorescentnom detekcijom, kao i povremeno primjenjujući radioimunotestove, ELISA i tekućinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Prvo istraživanje biomarkera trihotecenskog deoksinivalenola (poznatog kao vomitoksin) započeto je 2003. godine razvitkom LC-MS/MS metode za mjerenje kombinacije slobodnog DON-a i njegovih glukuronida nakon enzimске hidrolize i primjene kolone imunoafiniteta kao parametra u urinu ljudi i životinja. Daljnje LC-MS/MS metode razvijene su za preciznije određivanje DON-a i njegovih metabolita, koristeći sintetičke referentne standarde. Razvojem najnovije generacije visokoosjetljivih LC-MS/MS instrumenata, javlja se sve veća usmjerenost prema primjeni multitoksinskih metoda u istraživanju biomarkera mikotoksina [12].

4.1.1. Glukuronidi i glukuronidaza

Glukuronska kiselina je spoj koji se stvara metabolizmom glukoze. Spajanjem glukuronske kiseline s različitim tvarima nastaju topljive soli, poznate kao glukuronidi. Ove soli omogućuju brzo uklanjanje iz organizma putem mokraćne ili žuči [14]. Kod određenih uzoraka upotrebljava se enzim beta-glukuronidaza, koja hidrolizira glukuronidne konjugate određenih skupina analita u slobodne oblike. Glukuronidacija je uobičajeni put metabolizma u jetri, gdje se glukuronska kiselina veže s funkcionalnom skupinom na matičnom spoju kako bi se povećala njegova topljivost u vodenoj fazi i olakšalo izlučivanje iz tijela putem urina. Glukuronidi su često polarniji i manje topljivi u organskim otapalima koja se koriste za ekstrakciju na čvrstoj fazi u usporedbi sa svojim odgovarajućim slobodnim oblicima, što smanjuje analitičke povrate. Dodavanjem beta-glukuronidaze u uzorak prije ekstrakcije, glukuronidni konjugati se mogu hidrolizirati natrag u svoje slobodne oblike, koji su obično topljiviji u organskom otapalu i mogu se učinkovitije eluirati [15].

4.2. Ohratoksin α

OT α nastaje kemijskim promjenama u strukturi OTA tijekom metabolizma ili obrade hrane (Slika 2). Ovaj proces uključuje enzimski hidrolizu peptidne veze OTA, koju kataliziraju različite peptidaze i lipaze, čime se formira OT α . Zbog ovih procesa, OT α je identificiran kao pouzdani biomarker za prisutnost OTA u raznim biološkim matricama, uključujući sirovo mlijeko, plazmu i urin kod ljudi i životinja. Europska komisija postavila je maksimalnu granicu od 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za OTA u žitaricama i proizvodima od žitarica, dok je proces određivanja maksimalne granice za OT α još uvijek u tijeku [16].



Slika 2. Kemijske strukture OTA (lijevo) i OT α (desno) [2]

4.3. Dihidrocitrinon

Dihidrocitrinon je kemijski spoj koji se najčešće pojavljuje kao metabolit citrinina. Iako se smatra manje toksičnim od citrinina, prisutnost dihidrocitrinona ukazuje na izloženost citrininu, što ga čini važnim za analize i procjene toksikoloških profila. Ovaj spoj koristi se u toksikološkim studijama kao biomarker za procjenu izloženosti citrininu u organizmima. Također, dihidrocitrinon je od značaja u istraživanjima kontaminacije hrane, budući da je citrinin prisutan u određenim fermentiranim proizvodima, poput fermentirane riže, što izaziva zabrinutost u prehrambenoj industriji [17].

5. Balkanska endemska nefropatija

Balkanska endemska nefropatija (BEN) je kronični poremećaj bubrega koji često ima smrtni ishod. BEN se javlja kao endemska bolest, specifična za određena ruralna područja Balkana, točnije za dijelove Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Srbije, Rumunjske i Bugarske (**Slika 3**) [8]. Najistaknutija karakteristika BEN-a je njezina endemska priroda, koja se očituje u obiteljskom, ali ne nasljednom obrascu pojavnosti. Zahvaća isključivo ruralnu poljoprivrednu populaciju, dok među stanovnicima većih gradova nikada nije zabilježena [18]. Specifičnost ove bolesti leži u činjenici da u susjednim selima nije zabilježena pojava kronične bubrežne bolesti. Isto tako bolest nije zahvatila sva kućanstva u selima u kojima je utvrđena kronična bolest. U nekim kućanstvima oboljevali su članovi različitih generacija, te krvni i nekrvni srodnici. Dok su susjedna kućanstva bila potpuno pošteđena bolesti [19]. Razvoj bolesti se odvija kroz dug latentni period, a najčešće se javlja kod osoba u dobi od 40. do 60. godine života. Dok bolest pogađa odrasle osobe, djeca uglavnom nisu zahvaćena. U mnogim slučajevima, bolest napreduje do stadija terminalnog zatajenja bubrega, a procjenjuje se da je oko 100.000 ljudi u riziku od razvoja bolesti, dok je približno 25.000 osoba već oboljelo [18].



Slika 3. Ruralna područja Balkana u kojima se razvio BEN [3]

5.1. Uzročnici BEN-a

Različiti okolišni čimbenici koji su povezani s razvijanjem BEN-a kod ljudi istražuju se već desetljećima. Među tim čimbenicima ističu se teški metali i metaloidi, mikotoksini, hidrogeokemijski čimbenici te nefrotoksični i kancerogeni biljni proizvod aristolohična kiselina (AA). Iako je do danas predloženo nekoliko hipoteza o prirodi BEN-a, kronično trovanje AA ima ključan utjecaju na razvoj BEN-a i s njime povezanih karcinoma [18]. Osim AA glavni potencijalni uzročnici ove bolesti su mikotoksini, ponajviše OTA [6], te CIT zbog svoje nefrotoksičnosti [20].

5.1.1. Citrinin

CIT predstavlja ozbiljan problem, naročito u zemljama s toplom klimom, jer u takvim uvjetima postaje jedan od glavnih uzročnika trovanja hranom. Plijesni iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Monascus* glavni su proizvođači CIT-a, a *Penicillium* vrste su od posebne važnosti i poznato je da proizvode CIT širom svijeta. Najčešće se javlja u namirnicama biljnog porijekla. Njegova prisutnost zabilježena je i u raznim vrstama žitarica, uključujući kukuruz, pšenicu, raž, rižu, ječam i zob, kao i u proizvodima na bazi žitarica, voćnim sokovima i jabukama. Također, pronađen je u pečenim orašastim plodovima kao što su bademi, kikiriki i lješnjaci, uljaricama poput suncokreta, te začinima kao što su kurkuma, korijander, komorač, crni papar, kardamom i kumin. Pored toga, CIT može kontaminirati sir, gdje toksične sojeve plijesni rastu unutar sirne mase. Ovaj mikotoksin djeluje kao snažan nefrotoksin zbog čega ga je IARC svrstao u grupu 3 kancerogena [20]. Dokazi sugeriraju da zajednički učinak CIT i OTA može pojačati toksičnost, što dovodi do razvoja bubrežnih bolesti kod ljudi. Osim bubrega, CIT također cilja jetru, mitohondrijski respiratorni lanac i koštano srž. CIT, u kombinaciji s drugim mikotoksinima, ima ulogu u razvoju BEN-a. U interakciji s OTA, CIT može smanjiti aktivnost sinteze ribonukleinske kiseline u bubrežnom tkivu, čime dodatno pojačava svoje nefrotoksične učinke. Nastali kompleks mikotoksina narušava normalnu funkciju bubrega, što može dovesti do razvoja različitih bubrežnih oboljenja. Osim toga, udruženo djelovanje CIT i OTA povezano je i s hepatorenalnom karcinogenezom, odnosno razvojem karcinoma u jetri i bubrezima [21].

5.1.2. Ohratoksin A

OTA je najčešći i najtoksičniji produkt ohratoksina, a njegovo stvaranje potiču visoka temperatura i vlaga [22]. Izloženost OTA-i može uzrokovati različite toksične učinke na ljudsko zdravlje, stoga je IARC klasificirala OTA kao mogući ljudski kancerogen. Ovaj toksin povezan je s brojnim nepovoljnim zdravstvenim učincima kod ljudi i životinja, uključujući bubrežnu, neurološku, imunološku i embriotsku toksičnost, kao i mutagene i teratogene učinke [23]. Zbog svog dugog poluvijeka te nakupljanja u bubrezima, zbog mimikrije sa aminokiselinom fenilalaninom, OTA pridonosi razvoju nefrotoksičnosti. U područjima s visokom koncentracijom OTA-e u hrani zabilježena je i visoka učestalost bubrežnih adenoma i karcinoma, zbog toga se OTA smatra jednim od uzročnika BEN-a i tumora mokraćnog sustava [8].

5.1.3. Aristolohična kiselina

AA je biljni ekstrakt dobiven iz vrsta roda *Aristolochia* spp., kao što su *Aristolochia clematitis*, *Aristolochia fangchi* i *Aristolochia manshuriensis*. Ova kiselina predstavlja mješavinu strukturno srodnih nitrofenantrenskih karboksilnih kiselina, od kojih su najznačajnije aristolohična kiselina I (AAI) i aristolohična kiselina II (AAII) [24]. Rezultati provedenih eksperimenata pokazali su da AAI ima ključnu ulogu u promjenama unutar bubrežnog tkiva. Dva glavna ciljana tkiva izložena djelovanju AAI su bubrežni korteks, s posebnim naglaskom na proksimalni bubrežni tubul gdje dolazi do razvoja intersticijske fibroze i kroničnog bubrežnog zatajenja, te prijelazni epitel gornjeg dijela mokraćnog sustava koji je povezan s nastankom uroepitelnih karcinoma. Ova tkiva su također utvrđena kao ciljana tkiva u endemskoj nefropatiji. Zbog snažnog djelovanja, IARC je AAI svrstao u skupinu 1 ljudskih kancerogena [19]. AA pronađena je u brašnu koje je proizvedeno od pšenice kontaminirane sjemenkama *Aristolochia clematitis*, a koje su konzumirali stanovnici žarišnog sela. Ovi nalazi dokazuju da AA predstavlja jedan od ključnih uzročnika BEN-a [25].

5.2. Simptomi BEN-a

Ljudi su primarno izloženi mikotoksinima putem prehrane, iako postoje iznimke gdje izloženost može nastati i putem prašine. Glavno područje apsorpcije mikotoksina u organizmu je tanko crijevo, odakle se oni prenose u jetru. U okviru svoje uobičajene prehrane, ljudi također mogu biti izloženi modificiranim, ili "maskiranim", mikotoksinima koji pokazuju različite obrasce adsorpcije. Tipična konjugacija ovih mikotoksina sa šećerima, najčešće glukozom, povećava njihovu otpornost na apsorpciju u tankom crijevu. Kada ovi konjugati dospiju u debelo crijevo, mikrobiota može hidrolizirati te konjugate, oslobađajući "roditeljski" mikotoksin, koji se zatim može apsorbirati. Ovaj proces uključuje prijenos kroz portalnu venu do jetre, gdje se odvija daljnji metabolizam [5]. Klinički simptomi i markeri BEN-a nisu specifični i često ostaju neprepoznati nekoliko godina. Nakon početne asimptomatske faze, pacijenti mogu osjećati slabost, iscrpljenost, blage bolove u lumbalnom dijelu, blijedost kože te bakreno-smeđu boju dlanova i stopala. U ovoj fazi bolesti, koja se obično javlja u starijoj dobi, razvija se anemija povezana sa značajnim gubitkom bubrežne funkcije što ukazuje na prisutnost kronične bubrežne bolesti. Međutim, ispitivanja stanja bubrega pokazala su različito smanjenje veličine bubrega, uključujući vrlo male smanjene bubrege u završnim stadijima bolesti. Nažalost, trenutno ne postoje specifični dijagnostički markeri za BEN. Ipak, kombinacija epidemioloških, kliničkih i biokemijskih podataka, uz obrazac bolesti povezanog oštećenja i isključenje drugih bubrežnih bolesti, snažno sugerira prisutnost BEN-a [18].

5.3. BEN u Hrvatskoj

Godine 1955. i 1956. na Odjelu za unutarnje bolesti tadašnje Opće bolnice u Slavskom Brodu, liječnici su prvi put uočili veći broj bolesnika s uremijom, koji su se isticali po određenim zajedničkim obilježjima. Svi pacijenti dolazili su iz nekoliko sela zapadne brodske Posavine, a prema njihovim zdravstvenim povijestima, nisu imali prethodnih bubrežnih bolesti. Većina pacijenata bila je u završnom stadiju zatajenja bubrega [26]. Godine 1959. BEN je prvi put prepoznat u Hrvatskoj, a prvo zahvaćeno selo ovom bolesti je bio Slavonski Kobaš [19]. Prva terenska istraživanja proširenosti bolesti provedena su u srpnju 1957. godine u selima iz kojih je dolazio najveći broj uremičnih bolesnika, a to su Bebrina, Slavonski Kobaš i Pričac (**Slika 4**). Daljnja, opsežnija populacijska istraživanja provedena su u jesen iste godine prema uputama Saveznog zavoda za zaštitu zdravlja iz Beograda. Obje provjere potvrdile su ranije spoznaje o značajnoj prisutnosti bolesti u sva tri ispitivana posavska sela. Na temelju epidemioloških i kliničkih obilježja, bilo je očito da se radi o posebnoj bolesti bubrega koja do tada nije bila opisivana u literaturi. Osnivanjem Stručnog odbora za endemsku nefropatiju pri Zavodu za zaštitu zdravlja Socijalističke Republike Hrvatske u Zagrebu 1975. godine započinje sustavno praćenje bolesti [26]. U svrhu uspostavljanja ujednačenijih dijagnostičkih kriterija za BEN, održan je sastanak u Zagrebu 2006. godine. Nakon toga, na Braču 2008. godine, održana je radionica pod nazivo „Međunarodna radionica o dijagnostičkim kriterijima za BEN", a zatim je 2012. godine u Skoplju ponovno organiziran sastanak. Kojemu je cilj bio pružanje preporuka za dijagnozu i terapiju pacijenata oboljelih od BEN-a [18].



Slika 4. Žarišna sela u Hrvatskoj [4]

6. Prehrana pacijenata oboljelih od kroničnih bubrežnih bolesti

Pravilna uravnotežena prehrana predstavlja ključ za očuvanje dobrog zdravlja, osobito za osobe s kroničnim bubrežnim bolestima. Nepravilna prehrana može značajno pogoršati stanje bubrežne bolesti i uzrokovati brojne komplikacije, uključujući pogoršanje hipertenzije uslijed prekomjernog unosa natrija, putem soli, ili pothranjenost uzrokovanu nedostatkom proteina. Stoga je od presudne važnosti osigurati prehranu koja ispunjava dnevne energetske potrebe kroz adekvatan unos kalorija, proteina i vitamina, dok istovremeno ograničava unos soli, tekućine, te hrane bogate fosforom i kalijem. Kako bi se postigla optimalna prehrambena ravnoteža, važno je ograničiti unos tekućine i konzumirati većinu hrane u čvrstom obliku, smanjujući unos variva i juha. Preporučuje se priprema hrane bez dodatka soli te izbjegavanje konzervirane hrane, koja često sadrži visoke količine natrija. Također, potrebno je paziti na smanjenje konzumacije namirnica koje su bogate natrijem, kalijem i fosforom kako bi se izbjegle potencijalne komplikacije i očuvalo zdravlje bubrega [27].

6.1. Natrij

Natrij je elektrolit i ključni sastojak kuhinjske soli, koji igra značajnu ulogu u održavanju ravnoteže tekućina i elektroita u organizmu. Oštećenje bubrega može ometati sposobnost tijela da pravilno regulira razine natrija, što može dovesti do niza zdravstvenih problema. Dnevna potreba organizma za natrijem iznosi oko 1 g, a najveći dio unosa natrija dolazi iz kuhinjske soli, pri čemu 1 gram soli sadrži otprilike 400 mg natrija. Za osobe s kroničnim bubrežnim bolestima, ključno je pažljivo pratiti unos soli i natrija. To uključuje smanjenje količine soli koju dodaju hrani, kao i izbjegavanje industrijski prerađene hrane i gotovih konzerviranih namirnica koje često sadrže visoke koncentracije natrija. Posebnu pozornost treba posvetiti namirnicama koje imaju visoke razine natrija, kao što su suhomesnati proizvodi, dimljeni losos, suhi bakalar, dimljena puretina, te konzervirane hrane poput pašteta, sardina u ulju, dagnji i kavijara. Zreli sirevi, kao što su roquefort, gorgonzola, feta, parmezan i gauda, kao i sirni namazi, topljeni sirevi, grickalice poput čipsa, štapića, krekeri i pereci, kikiriki i kokice, također su poznati po visokom sadržaju natrija. Gotovi umaci, instant juhe, majoneza i senf, kao i neke žitne pahuljice poput Cornflakesa, pekarski proizvodi, također ukiseljeno povrće kao što su feferoni, krastavci, paprika i kupus, mogu značajno doprinijeti unosu natrija. Stoga je važno pažljivo birati prehrambene proizvode i pratiti njihov sadržaj natrija kako bi se upravljalo zdravljem bubrega i smanjile moguće komplikacije [27].

6.2. Kalij

Kako kronična bubrežna bolest napreduje, sposobnost bubrega da održava ravnotežu kalija u organizmu postaje sve osjetljivija. Prekomjerni unos kalija kod osoba s bubrežnim bolestima može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme, uključujući poremećaje srčane funkcije, mišićnu slabost, pa čak i srčani zastoj. Stoga je redovno praćenje razine kalija kroz laboratorijske nalaze od ključne važnosti za upravljanje ovim stanjem. Ako rezultati laboratorijskih testova ukazuju na višu razinu kalija, pacijent bi trebao pažljivo voditi evidenciju o prehranbenim navikama kako bi se prepoznali mogući izvori viška kalija i pravovremeno spriječile potencijalne posljedice. Kalij se prirodno nalazi u mnogim namirnicama biljnog podrijetla, uključujući voće i povrće, a njegova prisutnost nije smanjena kuhanjem, pečenjem, smrzavanjem ili konzerviranjem. Međutim, kalij je lako topiv u vodi, što omogućuje smanjenje njegove koncentracije ako se voda u kojoj je namirnica bila namakana, kuhana ili konzervirana, baci. Osobito je učinkovita metoda namakanja usitnjenog povrća u hladnoj vodi najmanje dva sata prije pripreme; nakon namakanja, vodu treba baciti kako bi se smanjio sadržaj kalija za otprilike jednu trećinu. Ove metode pripreme hrane pomažu u održavanju razine kalija unutar preporučenih granica i minimiziraju rizik od komplikacija povezanih s prekomjernim unosom kalija [27].

6.3. Fosfor

Fosfor je mineral od esencijalne važnosti za formiranje i rast kostiju te očuvanje čvrstoće zubi. Međutim, u ranoj fazi bubrežnog zatajenja, bubrezi ne mogu učinkovito ukloniti višak fosfora iz organizma, što dovodi do povišene razine fosfora u krvi. Visoke razine fosfora mogu uzrokovati slabljenje kostiju i pridonijeti razvoju ateroskleroze. Kako bi se spriječile ove komplikacije, od esencijalne je važnosti uvesti dijetu s niskim sadržajem fosfata što je ranije moguće, ovisno o stadiju bolesti. Namirnice koje su bogate bjelančevinama i kalcijem obično sadrže i visoke količine fosfata. Stoga bi konzumacija mliječnih proizvoda (osim svježeg sira i kiselog vrhnja), jaja, mesa, ribe, mahunarki, gljiva, žitarica, suhog i koštuničavog voća, čokolade, konzervirane hrane i gaziranih pića trebala biti značajno smanjena. Iako je preporučljivo ograničiti unos ovih namirnica, pacijenti mogu i dalje uključivati ove namirnice u prehranu u manjim količinama, uz uvjet da ne zaborave uzimati vezače fosfata kako bi se smanjila apsorpcija fosfata iz hrane. Međutim, važno je napomenuti da vezači fosfata neće biti učinkoviti ako se fosfati unose u prekomjernim količinama. Stoga je ključno pažljivo pratiti unos fosfata i pridržavati se preporuka za prehranu kako bi se očuvalo zdravlje kostiju i spriječile moguće komplikacije [27].

6.4. Unos tekućine

U slučaju zatajenja bubrega, često dolazi do smanjenog izlučivanja mokraće, a u nekim slučajevima može doći do potpunog prestanka mokrenja. Budući da bubrezi ne mogu učinkovito proizvoditi i izbacivati mokraću, sva unesena tekućina ostaje u organizmu, bilo u stanicama ili krvnim žilama, odnosno izlučuje se putem disanja ili znojenja te fecesom (proljevom). Ova nakupljena tekućina uzrokuje značajno opterećenje, jer stanice i krvne žile moraju primiti više tekućine nego što je uobičajeno, što može dovesti do njihove proširenosti. Srce se također mora prilagoditi povećanom volumenu krvi, dok pluća mogu biti pogođena zbog zadržane tekućine, što otežava disanje. Stoga je ključno strogo ograničiti unos tekućine. Važno je imati na umu da tekućina uključuje sve vrste pića, kao što su voda, kava, sok, alkoholna pića i mlijeko, kao i tekuće hrane poput juha, variva, te voća i povrća kao što je lubenica ili krastavci. Također, treba izbjegavati soljenje hrane, jer slana i začinjena hrana može izazvati žeđ, što dodatno povećava unos tekućine. Osobe s kroničnim bubrežnim bolestima koje povremeno idu na dijalizu trebaju ograničiti ukupni unos tekućine na najviše 2,5 litre dnevno. Ova količina uključuje tekućinu iz svih izvora, uključujući ono što se pije i hranu koja sadrži tekućinu. Prekomjerni unos tekućine može ozbiljno opteretiti organizam, smanjiti kvalitetu života i skratiti životni vijek, uzrokujući brojne komplikacije. Stoga je od ključne važnosti pridržavati se preporuka za ograničenje unosa tekućine kako bi se održalo optimalno zdravlje i spriječile potencijalne zdravstvene probleme [27].

7. Eksperimentalni dio

Razvoj metode i analiza uzoraka provedeni su korištenjem Sciex QTrap®6500+ LC-MS/MS sustava, koji je opremljen Turbo V elektrosprej ionizacijskim izvorom i spojen na UHPLC sustav Agilent 1290 serije. Za obradu i procjenu podataka korišteni su softveri Analyst (verzija 1.6.3.) i Multiquant® 3.0.2., dok je Statistica softver korišten za statističku analizu dobivenih podataka, a parametri vrijednosti izračunati su u Excelu. Metanol, acetonitril (ACN) i ledena octena kiselina nabavljeni su od Merck (Darmstadt, Njemačka), dok su standardi mikotoksina kupljeni od Romer Labs Diagnostic GmbH iz Tullna, Austrija. Kruti standardni spojevi otopljeni su u čistom ACN, dok su ostali standardi isporučeni u ACN ili ACN/H₂O i pohranjeni na -20 °C [5].

7.1. Uzorci

U istraživanju je sudjelovalo 126 osoba koje boluju od BEN-a, bolesti koja pogađa ljude u određenim dijelovima Hrvatske, te Balkana. Od ukupnog broja sudionika, 47 su bili muškarci, a 79 žene. Sve osobe dolaze iz obitelji koje žive u selima poznatim po tome što se u njima često pojavljuje ova bolest. Sudionici istraživanja proveli su neko vrijeme u bolnici, gdje su bili izloženi bolničkoj prehrani i hrani koju su konzumirali izvan bolničke prehrane. Takav način prehrane može imati utjecaj na njihovo zdravlje i razvoj bolesti.

7.2. Priprema uzorka

Uzorci urina koji su se čuvali na -20°C , ostavljeni su da postignu sobnu temperaturu, a zatim se centrifugiraju pri $5600\times g$ kroz 3 minute. Supernatant ($500\ \mu\text{L}$) pomiješan je s $500\ \mu\text{L}$ fosfatno-puferirane fiziološke otopine koji sadrži 3000 U β -glukuronidaze iz *E. coli* tipa IX-A. Nakon toga uzorci su ostavljeni na temperaturi od $37\ ^{\circ}\text{C}$ tijekom 16 sati, kako bi se omogućila deglukuronidacija mikotoksinskih glukuronida. Nakon hidrolize, 1 mL uzorka prošao je kroz Oasis PRiME HLB® SPE kolone, koje su prethodno uravnotežene s 1 mL metanola (MeOH) i 1 mL vode (H_2O). Mikotoksini su nakon dvostrukog ispiranja s $500\ \mu\text{L}$ H_2O eluirani s $200\ \mu\text{L}$ ACN, što je ponovljeno tri puta. Ekstrakti su zatim ispareni pod blagim mlazom dušika na sobnoj temperaturi, rekonstituirani s $470\ \mu\text{L}$ otapala za razrjeđivanje (10% ACN, 0,1% octene kiseline) te pojačani s $30\ \mu\text{L}$ mješavine internog standarda (IS) [5].

7.3. LC – MS/MS

Analitički uzorci su analizirani na Acquity HSS T3 koloni s veličinom punjenja od $1,8\ \mu\text{m}$. Kao eluenti su korišteni H_2O (eluent A) i ACN (eluent B). Oba dva eluenta su kiseljeni s 0,1% octenom kiselinom (HAc). Kromatografija je započela s 90% eluenta A u prvih 2 minute, nakon čega je postotak eluenta B linearno povećan na 50% do 15 minute. Zatim je postotak eluenta B povećan na 95% do 18 minute. Nakon toga uslijedilo je vrijeme zadržavanja od 4 minute, a potom je kolona ponovno upravljena na 90% eluenta A tijekom 3 minute. Brzina protoka bila je $100\ \mu\text{L}/\text{min}$. Nakon injekcije uzorka od $10\ \mu\text{L}$, igla je isprana 20 sekundi kako bi se smanjila prisutnost ostataka i kroskontaminacija. Izlazna tekućina iz kolone preusmjeravana je ili na maseni spektrometar ili u otpad putem ventila sa šest priključaka. Kolona je održavana na $35\ ^{\circ}\text{C}$. ESI-MS/MS analiza provedena je u režimu planiranog višestrukog praćenja reakcija s prozorom detekcije od 180 sekundi. Za svaki analit praćena su najmanje dva pojedinačna prijelaza. Svaka kromatografska serija obuhvaćalo je dva MS/MS eksperimenta u kojima su oba načina ionizacije radila simultano uz brzo prebacivanje polariteta. Sva mjerenja su provedena s: temperaturom izvora $550\ ^{\circ}\text{C}$, plinom zavjese pri 30 psi (69 kPa od maks. 99,5% dušika), plinom izvora iona 1 (plin za omatanje) pri 80 psi (345 kPa dušika), plinom izvora iona 2 (plin za sušenje) pri 80 psi (345 kPa dušika), i visokim plinom za koliziju (dušik). Nakon ionizacije bio je 4500 V u negativnom načinu i također 4500 V u pozitivnom načinu. MS/MS parametri specifični za analite optimizirani su izravnom infuzijom referentnih standarda [5].

7.4. Validacijski test

Provedena je interna validacija u skladu s Odlukom Europske komisije 2002/657/EC, uz manje prilagodbe. Istraživani su parametri poput granice detekcije (LOD), granice kvantifikacije (LOQ), ponovljivosti, ponovljivost unutar laboratorija, istinitosti i linearnosti. Oporavak je procijenjen putem eksperimenta u kojem su uzorci praznog urina obogaćeni standardnom mješavinom mikotoksina. Ovaj proces oporavka detaljnije je istražen od propisanog, koristeći šest različitih koncentracija (1x, 1.5x, 2x LOQ te dodatno 30x, 100x i 300x LOQ), kako bi obuhvatio raspon očekivanih koncentracija u populacijama niske i visoke izloženosti. Koncentracije dodavanja bile su odabrane u skladu s kalibracijskim rasponom i LOQ-om svakog analita. S obzirom na nedostatak prikladnog referentnog materijala, procjena istinitosti i selektivnosti temeljila se na oporavku prema smjernicama EC 657/2002. Mjerenja su izvedena tijekom tri dana, s po šest ponavljanja za svaku razinu koncentracije. Za svaki mikotoksin izrađena je kalibracijska krivulja za vanjsku kalibraciju, temeljena na najmanje pet razina koncentracije. Multimikotoksinski kalibranti pripremljeni su razrjeđivanjem 1:100 (v/v) s otapalom za razrjeđivanje. Vrijednosti LOD i LOQ izračunate su na temelju omjera signala i šuma od 3:1 i 10:1 iz kromatograma urina s dodatkom mikotoksina, korištenjem Analyst® S-to-N skripte. Dodatna potvrda osigurana je omjerom ionskih kvantifikatora i kvalifikatora, uz maksimalno dopuštena odstupanja od 50% kada je relativni intenzitet baznog vrha bio $\geq 10\%$. Relativno zadržavanje vremena analiziranih mikotoksina i unutarnjih standarda je bilo unutar 0,1 minute u odnosu na kalibracijsku otopinu. Kod mikotoksina bez unutarnjih standarda (DOM-1, DHC, α - i β -ZEA), izračuni su provedeni korištenjem površine vrha, umjesto omjera površine vrhova kao kod mikotoksina s dostupnim unutarnjim standardima. Za izračun učinkovitosti ekstrakcije, matriks efekta (potiskivanje ili pojačanje signala (SSE)) i prividnog oporavka (R_A), korištene su formule (1), (2) i (3) [5].

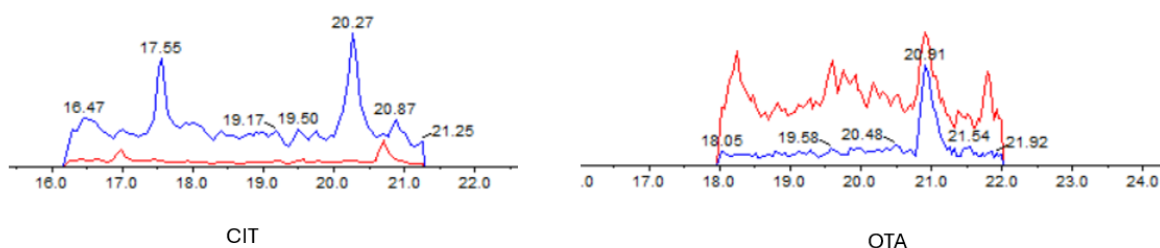
$$EE (\%) = \frac{\text{prosječna površina (uzorci s dodanom supstancom)}}{\text{prosječna površina (standard usklađen s matricom)}} \times 100 \quad (1)$$

$$RA (\%) = \frac{\text{prosječna površina (uzorci s dodanom supstancom)}}{\text{prosječna površina (standard razrijeđen otapalom)}} \times 100 \quad (2)$$

$$SSE (\%) = \frac{\text{prosječna površina (standard usklađen s matricom)}}{\text{prosječna površina (standard razrijeđen otapalom)}} \times 100 \quad (3)$$

8. Rezultati

U okviru istraživanja provedena je analiza na 126 uzoraka urina od ispitanika kojima je dijagnosticirana bolest BEN, te su zbog toga hospitalizirani. Cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost mikotoksina u uzorcima urina nakon određenog vremenskog perioda u bolnici gdje su bili izloženi bolničkoj prehrani i hrani koju su konzumirali izvan bolničke prehrane. Analizom uzoraka otkrivena je prisutnost OTA-e u iznosu od 14,38%, odnosno od 126 uzoraka u 42 uzorka se nalazio OTA. Visoka prisutnost OTA ukazuje na to da ispitanici i dalje pate od BEN-a. S druge strane CIT, koji se isto tako kao OTA smatra uzročnikom BEN-a, nije pronađena u uzorcima (**Slika 5**). Pored OTA-e u uzorcima su detektirani i drugi mikotoksini, uključujući DON, NIV i ZEA. Prisutnost DON-a detektirana je u 30 uzoraka (10,27%), NIV-a u 12 uzoraka (4,11%), dok je ZEA bio prisutan u 3 uzorka (1,03%). Iako prisutnost ovih mikotoksina nije visoka, treba ih uzeti u obzir prilikom ocjenjivanja ukupne sigurnosti hrane koja se konzumira.



Slika 5. Prisutnost CIT (lijevo) i OTA (desno) kod jednog ispitanika [5]

U istraživanju koje su proveli Šarkanj i suradnici (2012.), po prvi put je utvrđeno prisustvo OTA i njegovog metabolita $OT\alpha$ kod trudnica. Istraživanje je obuhvatilo 40 uzoraka urina trudnica, a stopa pozitivnosti za prisutnost OTA porasla je na 100% nakon primjene enzimatskog tretmana. Sve utvrđene razine bile su iznad LOQ. Prosječna koncentracija OTA u pozitivnim uzorcima nakon enzimatskog tretmana iznosila je $0,22 \pm 0,30$ ng/mL, dok se ukupna srednja vrijednost OTA u urinu, prema ovom istraživanju, nalazi u srednjem rasponu vrijednosti [28]. U provedenom istraživanju prosječna vrijednost OTA iznosi 0,0086, a standardna devijacija je 0,0117 (**Tablica 1**). Osim toga raspon koncentracije OTA iznosi 0,0511 dok je srednja vrijednost 0,0266. Međutim $OT\alpha$ nije analiziran u ovom istraživanju. Važno je napomenuti da se populacija obuhvaćena ovim istraživanjem razlikuje od populacije koja je sudjelovala u istraživanju provedenom od strane Šarkanja i suradnika. Kod trudnica, osim promjena u metabolizmu, distribuciji i eliminaciji ksenobiotika povezanih s trudnoćom, moguće su značajne razlike u

nasljednim osobinama. Na primjer, hidroliza peptidne veze OTA i stvaranje OT α uglavnom se događa tijekom probave, a ovaj proces posreduju crijevni mikrobi. Osim toga, unos hrane kod trudnica je povećan, što bi moglo objasniti razlike u udjelu pozitivnih uzoraka[28]. Istraživanje koje su 2013. godine proveli Šarkanj i suradnici na uzorku od 40 trudnica iz Hrvatske analiziralo je prisutnost ukupno 15 biomarkera izvedenih iz mikotoksina. U analizi su otkriveni biomarkeri mikotoksina s postotkom oporavka u rasponu od 88% do 104%, dok su LOD bile u rasponu od 0,05 do 6 μ g/L. Rezultati su pokazali da je 97,5% uzoraka (39/40) sadržavalo DON i/ili njegove metabolite, dok je manji broj uzoraka (10%; 4/40) imao detektabilne koncentracije OTA [29]. Prevalencija DON-a, u ovom provedenom istraživanju, iznosila je 30/ 126, odnosno 10,27% (**Tablica 1**). Prosječna vrijednost DONA u uzorcima iznosi 9,81, a standardna devijacija 9,15. srednja vrijednost DON-a je 19,51, a raspon koncentracije u uzorcima iznosi 38,76.

Tablica 1. Rezultati dobiveni nakon analize uzoraka [1]

Mikotoksini	alternariol	zearalenon	a-zearalenol	b-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.
LOD	0,01	0,003	0,01	0,003	0,0003	0,003
Min	0,118	0,008937	0	0	0,001024	0
Max	11,17	0,05056	0	0	0,05209	0
Average	3,803966667	0,024185667	0	0	0,008604667	0
SD	6,379172674	0,022933684	0	0	0,011723468	0
Median	0,1239	0,01306	0	0	0,00459	0
IQR	5,526	0,0208115	0	0	0,00485725	0
Prevalencija N	3	3	0	0	42	0
Prevalencija %	1,03%	1,03%	0,00%	0,00%	14,38%	0,00%

Tablica 1. Rezultati dobiveni nakon analize uzoraka (nastavak) [1]

Mikotoksini	dihidrocitrinon	deoksinivalenol	nivalenol	deepoksideoksinivalenol	fumonizin B1	aflatoksin M1
Produce miktoksina	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.
LOD	0,003	0,05	0,05	0,3	0,001	0,0003
Min	0	0,129	0,05289	0	0	0
Max	0	38,89	17,48	0	0	0
Average	0	9,808466667	3,3436575	0	0	0
SD	0	9,153556357	4,882505829	0	0	0
Median	0	6,0425	1,5705	0	0	0
IQR	0	8,322	2,5439	0	0	0
Prevalencija N	0	30	12	0	0	0
Prevalencija %	0,00%	10,27%	4,11%	0,00%	0,00%	0,00%

9. Zaključak

Istraživanje provedeno na uzorcima urina osoba oboljelih od BEN-a otkrilo je prisutnost mikotoksina u značajnim količinama, pri čemu je najistaknutiji mikotoksin bio OTA. Detekcija OTA u 42 od 126 (14,38%) uzoraka ukazuje na to da prisutnost ovog mikotoksina može biti povezana s patofiziologijom BEN-a. Raspon koncentracije OTA u uzorcima iznosio je 0,051, dok je srednja vrijednost 0,0266. Uz OTA, DON je detektiran u višim razinama, tako je njegova prevalencija 10,27% (30/126). Raspon koncentracije DON-a u uzorcima iznosio je 38,76, a srednja vrijednost 19,51. U uzorcima su također identificirani NIV i ZEN, iako u znatno manjim količinama (4,11% i 1,03%, redom). Ova prisutnost mikotoksina, iako ne u visokom postotku, sugerira potrebu za daljnjim ispitivanjima s obzirom na potencijalne rizike za zdravlje. Ova istraživanja naglašavaju potrebu za kontinuiranim praćenjem i analitikom mikotoksina, kao i za uvođenjem strogih kontrolnih mjera u prehrambenim praksama, posebno u sredinama koje su poznate po visokom riziku od mikotoksikoza. S obzirom na utjecaj koji mikotoksini mogu imati na zdravlje, dodatna istraživanja su neophodna kako bi se bolje razumjeli njihovi učinci i razvile učinkovite strategije za prevenciju i kontrolu.

10. Literatura

- [1] Prica D. Mikotoksini u uzorcima hrane (diplomski rad). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2022. 52 str.
- [2] Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.S., Hatziloukas E. Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications. *AIMS Microbiology*. 2020; 6 (1): 1–31. Dostupno na: doi: : 10.3934/microbiol.2020001
- [3] Štadler T. Mikrobne kulture u proizvodnji sireva (diplomski rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet; 2017. 57 str.
- [4] Steyn. P.S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*. 1995; 82/83: 843-851. Dostupno na: doi: 10.1016/0378-4274(95)03525-7
- [5] Šarkanj B., Ezekiel C.N., Turner P.C., Abia W.A., Rychlik M., Krska R., Sulyok M., Warth B. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Analytica Chimica Acta*. 2018; 1019: 84-92. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.036>
- [6] Krska R. (ed), Richard J.L., Schuhmacher R., Slate A.B., Whitaker T.B. *Guide to Mycotoxins*. Leicestershire: Anytime Publishing Services; 2012. https://www.foodriskmanagement.com/wp-content/uploads/2013/03/Romer-Labs-Guide-to-Mycotoxin-Book_Original_41686.pdf
- [7] Zain M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2011; 15 (2): 129-144. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- [8] Resanović R.D., Vučićević M.Z., Nedeljković Trailović J.B., Maslić-Strižak D.N., Jačević V.M. Mycotoxins and their effect on human health. *Jour. Nat.* 2013; 124: 315-324. Dostupno na: doi: 10.2298/ZMSPN1324315R
- [9] Paterson R.R.M., Lima. N. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*. 2011; 44 (9): 2555-2566. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.038>
- [10]] Pleadin J., Zadravec M., Lešić T., Vasilj V., Markov K. Klimatske promjene - Potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina. *Veterinarska stanica*. 2020; 51 (6): 659-67. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.46419/vs.51.6.8>
- [11] Van der Oost R.; Visa C.P., Van den Brink N.W. *Biomarkers in environmental assessment*. United States of America: Taylor and Franis group; 2005.
- [12] Warth B., Sulyok M., Krska R. LC-MS/MS-based multibiomarker approaches for the assessment of human exposure to mycotoxins. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405 (17): 5687-5695. Dostupno na: doi: 10.1007/s00216-013-7011-1

- [13] Solfrizzo M., Gambacorta L., Warth B., White K., Srey C., Sulyok M., Krska R., Gong Y.Y. Comparison of single and multi-analyte methods based on LC-MS/MS for mycotoxin biomarker determination in human urine. *World Mycotoxin Journal*. 2013; 6 (4): 355-366. Dostupno na: doi: :10.3920/WMJ2013.1575
- [14] Leksikografski zavod Miroslava Krleže, Hrvatska enciklopedija. Glukuronska kiselina. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/glukuronska-kiselina> [pristupljeno 21.9.2024.]
- [15] Jambrošić K. Pregled analitičkih tehnika u epidemiologiji temeljenoj na analizi otpadnih voda [predavanje]. *Kemijski seminar I. Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb. Ožujak 2023.*
- [16] Oluwakayode ., Sulyok M., Krska R., Medina A. The effect of the interactions of water activity, and temperature on OTA, OTB, and OT α produced by *Penicillium verrucosum* in a mini silo of natural and inoculated wheat using CO₂ production as fungal activity sentinel. *Food Chemistry*. 2024; 460: 1-10. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140590>
- [17] Mamić Subašić L. Citotoksičnost citrinina za ljudske stanice pluća i jetre (diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutskobiokemijski fakultet: 2019. 33 str.
- [18] Stiborová M., Arlt V.M., Schmeiser H.H. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Archives of Toxicology*. 2016; 90 (11): 2595–2615. Dostupno na: doi: 10.1007/s00204-016-1819-3
- [19] Jelaković B, Dika Ž, Karanović S, Vuković Lela I. Endemska nefropatija u Hrvatskoj. *Liječnički vjesnik*. 2015; 137 (3-4): 100-108. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/172692>
- [20] Kamle M, Mahato DK, Gupta A, Pandhi S, Sharma N, Sharma B, Mishra S, Arora S, Selvakumar R, Saurabh V, Dhakane-Lad J, Kumar M, Barua S, Kumar A, Gamlath S, Kumar P. Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies. *Toxins (Basel)*. 2022; 14 (2): 1-25. Dostupno na: doi: 10.3390/toxins14020085.
- [21] Doughari Hamuel J. The Occurrence, Properties and Significance of Citrinin Mycotoxin. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2015; 6 (11): 3-6. Dostupno na: doi: :10.4172/2157-7471.1000321
- [22] Salasib A. A Review of Ochratoxin A Occurrence, Condition for the Formation and Analytical Methods. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*. 2020; 6 (2): 180-185. Dostupno na: doi: : <https://dx.doi.org/10.17352/2455-815X.000071>
- [23] Klingelhöfer D., Braun M., Schöffel N., Oremek G.M., Brüggmann D., Groneberg D.A. Ochratoxin – Characteristics, influences and challenges of global research. *Food Control*. 2020; 114: 1-14. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107230>

- [24] Arlt V.M., Stiborova M., Schmeiser H.H. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*. 2002; 17 (4): 265-277. Dostupno na: doi: 10.1093/mutage/17.4.265
- [25] Debelle F.D., Vanherweghem J.L., Nortier J.L. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem. *Kidney International*. 2008; 74 (2): 158-169. Dostupno na: doi: <https://doi.org/10.1038/ki.2008.129>
- [26] Čeović S., Hrabar A., Radonić M., Stavljenić A., Čvorišćec D., Pleština R., Miletić-Medved M., Tucak A., Kenda A., Kozmar D. Epidemiološka i socijalno medicinska obilježja balkanske endemske nefropatije u Brodsko-posavskom žarištu. *Med Vjesn*. 1988; 20 (2) : 53-57. Dostupno na: file:///C:/Users/Korisnik/Desktop/literatura%20[20]-26.pdf
- [27] Opća županijska bolnica Požega, gradska bolnica Pakrac. Preporuka za pacijente oboljele od kronične bubrežne bolesti i nefrotskog sindroma. file:///C:/Users/Korisnik/Desktop/literatura%20[21]-27.pdf [pristupljeno; 10.9.2024.]
- [28] Klapac T, Šarkanj B, Banjari I, Strelec I. Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50 (12): 4487-92. Dostupno na: doi: 10.1016/j.fct.2012.09.030
- [29] Šarkanj B, Warth B, Uhlig S, Abia WA, Sulyok M, Klapac T, Krska R, Banjari I. Urinary analysis reveals high deoxynivalenol exposure in pregnant women from Croatia. *Food Chem Toxicol*. 2013; 62: 231-7. Dostupno na: doi: 10.1016/j.fct.2013.08.043

Popis slika

- [1] **Slika 1.** Razlika u strukturnoj građi Ochratoxina (D. Prica: Mikotoksini u uzorcima hrane, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Rijeka, 2022.)
- [2] **Slika 2.** Kemijske strukture OTA (lijevo) i OT α (desno)
(https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-ochratoxin-A-OTA-left-and-ochratoxin-a-OTa-right_fig4_341980781, 2024)
- [3] **Slika 3.** Ruralna područja Balkana u kojima se razvio BEN (Wikipedija: Balkanska endemska nefropatija, 2023.)
- [4] **Slika 4.** Žarišna sela u Hrvatskoj (www.map.com.hr , 2024)
- [5] **Slika 5.** Prisutnost CIT (lijevo) i OTA (desno) kod jednog ispitanika (Analyst (1.6.3.), 2024)

Popis tablica

- [1] **Tablica 1.** Rezultati dobiveni nakon analize uzoraka (vlastoručna literatura)



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 privajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, Paula Pilica pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autorica završnog rada pod naslovom „Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici“ koji imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju“ te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:

Paula Pilica

(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, Paula Pilica neopozivo izjavljujem da sam suglasna s javnom objavom završnog rada pod naslovom „Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici koji imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju“ čiji sam autorica.

Student/ica:

Paula Pilica

(vlastoručni potpis)

Koprivnica, rujan 2024.

Izloženost mikotoksinima kod pacijenata u bolnici koji imaju utvrđenu balkansku endemsku nefropatiju_BS.docx

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES
