

Maja PERAICA, Dubravka RAŠIĆ

*Jedinica za toksikologiju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada,
Ksaverska c. 2, 10000 Zagreb
mperaica@imi.hr*

RIZIK IZLOŽENOSTI NAJVAŽNIJIM MIKOTOKSINIMA RODA *Apergillus* ZA LJUDSKO ZDRAVLJE

SAŽETAK

Mikotoksini su toksini plijesni koje mogu uzrokovati akutna ili kronična trovanja ljudi koja se nazivaju mikotoksikoze. Do sada su se akutne mikotoksikoze, koje nastaju kao posljedica kraće izloženosti velikim količinama mikotoksina, pojavljivale kao epidemije u tropskim krajevima s tipičnim kliničkim simptomima i velikom smrtnošću. Kronične mikotoksikoze imaju blaži klinički tijek, a ovisno o svojstvima mikotoksina, mogu uzrokovati tumore ili druga oštećenja. Postoji vrlo malo dokazanih slučajeva bilo akutnih bilo kroničnih trovanja ljudi mikotoksini. Jedini mikotoksin za koji je sa sigurnošću utvrđena povezanost izloženosti ljudi s nastankom akutnog i kroničnog trovanja te nastanka karcinoma je aflatoksin B1 i njegovi derivati.

Ključne riječi: aflatoksin, citrinin, okratoksin, sterigmatocistin

UVOD

Mikotoksini su toksični sekundarni produkti plijesni koji zagađuju hranu u svim fazama proizvodnje i tijekom skladištenja. Rastu plijesni i stvaranju mikotoksina pogoduju visoke temperature kao i visoka vlaga pa je zato problem zagađenosti hrane donedavna posebno bio izražen u tropskim i suptropskim krajevima, a manje u umjerenim klimatskim područjima. S klimatskim promjenama raste rizik izloženosti ljudi i životinja mikotoksini iz hrane i u umjerenim klimatskim područjima jer bi se mogle pojaviti i plijesni kojih inače u umjerenim područjima nema.

Ljudi i životinje najčešće su izloženi mikotoksini zbog kontaminiranosti hrane i krmiva, a zbog izloženosti domaćih životinja mikotoksini i njihovi metaboliti mogu se naći u mlijeku i mesu i njihovim prerađevinama (siru, jogurtu, sirutki, kobasicama, slanini i sl.).

Do sada je izolirano više od 300 različitih mikotoksina, a samo je za nekolicinu poznato njihov toksičan, mutagen, genotoksičan, karcinogen i teratogen potencijal. Za većinu mikotoksina poznato je njihovo djelovanje na kulturama stanica, no istraživanja na pokusnim životinjama nisu provedena. Zanimljivo je da za neke mikotoksine (npr. citrinin) nema podataka u dostupnoj literaturi o

istraživanjima toksikokinetike na laboratorijskim životinjama, no u literaturi su dostupni podaci toksikokinetike citrinitina u ljudi (Degen i Gundert-Remy 2018).

Kemijske strukture mikotoksina vrlo su raznolike, a isto tako i mehanizam njihovog toksičnog djelovanja. Neki imaju vrlo jednostavnu strukturu (npr. 3-nitropropionska kiselina), a neki vrlo složenu (npr. beauvericin) ali o tome ne ovisi njihova toksičnost. Toksični učinci mikotoksina nazivaju se mikotoksikoze, koje mogu biti akutne kod kojih su ljudi izloženi visokim koncentracijama mikotoksina i kronične koje se pojavljuju nakon dugotrajne izloženosti nižim koncentracijama mikotoksina. Budući da su ljudi na vrhu hranidbenog lanca i životinjsku hranu treba pažljivo kontrolirati kako ne bi došlo do sekundarne izloženosti ljudi hranom životinjskog podrijetla.

Budući da će se klimatske promjene sigurno očitovati u nastanku mikotoksina koje proizvode plijesni roda *Aspergillus*, u ovom su članku obrađene različiti učinci tih mikotoksina na ljude i životinje. Iako neke od tih mikotoksina proizvode i drugi rodovi plijesni, one su najčešće proizvodi roda *Aspergillus*. U najtoksičnije i najviše istraživane mikotoksine spadaju aflatoksini, okratoksini, fumonizini, sterigmatocistin i citrinitin.

Rijetko su žitarice zagađene samo jednim mikotoksinom jer su obično kontaminirane s više vrsta plijesni, a mogu biti zagađene sojevima plijesni koje proizvode više vrsta mikotoksina. Odnedavno se učestalo istražuje toksični rizik izloženosti dva ili više mikotoksina pa je nađeno da oni mogu imati sinergističko, aditivno, ali i antagonističko djelovanje.

U literaturi se u tisućama radova spominje nikad dokazan i nepotvrđeni podatak da je 25% svjetskog uroda zagađeno mikotoksinima, a taj je podatak navodno službeni podatak FAO-a (Park i sur. 1999). Budući da se ne može ući u trag kako su Park i sur. došli do te procjene, nedavno je grupa autora procijenila podatke objavljenih u oko 500.000 analiza koje je *European Food Safety Authority* (EFSA) provela mjereći koncentracije aflatoksina, fumonizina, deksinivalenola, T-2 toksina, Ht-2 toksina, zearalenona i okratoksina A u žitaricama i orašastim plodovima sakupljenim u cijelom svijetu. Zanimljivo je da je nađeno da je postotak uzoraka zagađenih žitarica iznad dozvoljen granice u EU uistinu 25%, ali je postotak zagađenih žitarica koje sadrže mikotoksine iznad granice detekcije daleko veći (60-80%) (Eskola et al. 2019).

U ovom će radu biti prikazani toksični učinci mikotoksina koje proizvode plijesni roda *Aspergillus*: aflatoksina, sterigmatocistina, okratoksina i citrinitina.

Aflatoksini

Aflatoksini su skupina od više od 20 mikotoksina koji se nalaze u orašastim plodovima i žitaricama (posebno kukuruзу). Za ljude i životinje najopasniji su aflatoksin B1, B2, G1 i G2 koji su dobili nazive prema boji njihove fluorescencije kada su obasjani ultravioletnim zrakama (engl.: *blue*, *green*). Aflatoksin B1 (AFB1) je najtoksičniji i najviše istraživani derivat iz skupine aflatoksina.

Aflatoksin M1 (AFM1) je njegov hidroksiderivat koji nastaje metabolizmom u jetri, a izlučuje se majčinim i kravljim mlijekom. Može ga se naći u krvi izloženih ljudi, a izlučuje se i urinom i koristi se kao biomarker izloženosti aflatoksinu B1. AFB1 se u jetri metabolizira u karcinogeni spoj aflatoksin B1-8,9-epoksid koji ima *exo* i *endo* izomer od kojih je *exo* izomer elektrofilan i spontano reagira s nukleinskim kiselinama i proteinima. Važan metabolit koji nastaje iz AFB1 je i aflatoksikol (AFL) koji se može metabolizirati u placenti i prijeći kroz placentarnu barijeru. Smatra se da je AFL rezervoar za AFB1 u jetri jer se može enzimatski vratiti u AFB1 te da je AFL odgovoran za smanjeni rast djece u tropskim krajevima. Aflatoksini se mogu vezati na proteine plazme i na DNK stvarajući adukte za koje je ustanovljeno da su u dobroj korelaciji s dugotrajnijom izloženosti tim toksinima. To je važno zato što se AFB1 vrlo brzo metabolizira i izlučuje iz organima, pa je mjerenje njegove koncentracije pokazatelj samo nedavne izloženosti tom mikotoksinu. Za neke sindrome koji se pojavljuju u tropskim krajevima kod kojih je nađena visoka koncentracija AFB1 ili AFM1 u plazmi ili u organima nakon obdukcije vjerovalo se da su posljedica izloženosti tim mikotoksinima. To su kwashiorkor i Reyev sindrom kod kojih je znatno oštećena funkcija jetre. Ustanovljeno je da kwashiorkor nastaje zbog manjka proteina u prehrani male djece a oštećena jetra koja ne može metabolizirati AFB1. Reyev sindrom je teška neurološka bolest koja nastaje u djece nakon neke virusne infekcije liječene aspirinom (salicilatima). Izloženost značajno kontaminiranoj hrani aflatoksinima uzrokuje akutno trovanje koje se očituje simptomima oštećenja jetre koje može dovesti do smrtnog ishoda. U tropskim zemljama Afrike i Azije javljaju se povremeno epidemije akutne aflatoksikoze s vrlo velikom smrtnošću izloženih osoba, a u zemljama s umjerenom klimom takvi slučajevi nisu zabilježeni. Dugotrajno izlaganje manje kontaminiranoj hrani uzrokuje sporiji nastanak oštećenja jetre i smanjenje stvaranja leukocita u koštanoj srži a time do imunodeficijencije i smanjenog imunološkog odgovora na upale. Dugotrajana izloženost aflatoksinima, i to AFB1, AFB2, AFG1, AFB2 i AFM1 može uzrokovati nastanak ciroze jetre, a potom i primarnog karcinoma jetre. Primarni karcinom jetre pojavljuje se s velikom učestalošću u nekim azijskim i afričkim zemljama, posebno u onima u kojima je čest i hepatitis B koji može uzrokovati kroničnu upalu i cirozu jetre. Iz ciroze jetre može nastati primarni karcinom jetre djelovanjem aflatoksina jer je njihovo djelovanje sinergističko. Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) prema rezultatima pokusa na životinjama i epidemiološkim istraživanjima svrstala je te aflatoksine u Skupinu 1 to jest u skupinu u kojoj su supstancije za koje je dokazano da su kancerogene za ljude. Zbog toga je Svjetska zdravstvena organizacija a zatim i *European Food Security Agency (EFSA)* donijela preporuku o maksimalnim dozvoljenim koncentracijama aflatoksina u različitim namirnicama koje je prihvatila i Republika Hrvatska. Budući da postoji

opravdani strah od karcinogenog djelovanja aflatoksina većina je zemalja uvela stroge mjere kontrole za različite namirnice.

Sterigmatocistin

Sterigmatocistin (STC) je prekursor aflatoksina, a proizvode ga više od 50 vrsta plijesni. Najčešće su to *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Aspergillus* sekcija *Nidulans*, podvrsta *Versicolor*. Biosinteza sekundarnih produkata kod nekih od tih plijesni (*A. flavus* i *A. parasiticus*) koje mogu sintetizirati aflatoksin i STC dovodi uglavnom do stvaranja aflatoksina a manje do sinteze STC-a pa kontaminirana hrana sadrži manju koncentraciju STC-a. Druge plijesni (*A. nidulans* i *A. versicolor*) ne mogu sintetizirati aflatoksine pa zato u većoj mjeri stvaraju STC. Toksičnost STC-a manje je istraživana, a zbog sličnosti njegove strukture s aflatoksинима, pažnja znanstvenika više je bila usmjerena na njegovu karcinogenost koja je nađena u različitim pokusnim životinjama. Nisu opisani slučajevi akutnog ili kroničnog trovanja ljudi i domaćih životinja tim mikotoksinom. Budući da STC može uzrokovati nastanak karcinoma u različitim pokusnim životinjama, IARC ga je svrstao u skupinu 2B karcinogena (sigurni karcinogen za pokusne životinje, bez dovoljnih dokaza da je karcinogen za ljude). Unatoč tome još ne postoje propisi o dozvoljenim koncentracijama STC-a u različitim namirnicama.

Okratoksini

Okratoksine proizvode plijesni *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* i *Penicillium verrucosum* i to u umjerenim klimatskim područjima. Zagađuju žitarice, vino, pivo, grah, a može ga se naći i u svinjskom mesu i proizvodima od svinjskog mesa (kobasice, kulen). U prirodi se najčešće nalazi okratoksin A (OTA), a to je ujedno i najtoksičniji mikotoksin iz te porodice. OTA je prvenstveno nefrotoksičan a uz to je hepatotoksičan, embriotoksičan, teratogen, neurotoksičan, imunotoksičan i genotoksičan. Pojava simptoma trovanja i oštećenja bubrega u pokusnim životinjama ovisi o dozi OTA, a karcinogen je za više vrsta pokusnih životinja i zbog toga ga je IARC uvrstio u Skupinu 2B karcinogena.

Nema pouzdanih dokaza o akutnom trovanju zbog izloženosti tom mikotoksinu iako se pretpostavlja da je u nekoliko slučajeva trovanja uzrokovao akutno oštećenje i zatajenje bubrega. Krajem sedamdesetih godina prošloga stoljeća pretpostavilo se da uzrokuje Balkansku endemsku nefropatiju (BEN). BEN je obostrana bolest bubrega koja nakon duljeg razdoblja mikroalbuminurije i anemije napreduje do kroničnog zatajenja bubrega i smrti. BEN je povezan s izloženosti tom mikotoksinu jer dokazano da OTA uzrokuje bolest nazvanu mikotoksinska nefropatija svinja u skandinavskim zemljama u godinama kada je velika vlaga uzrokovala rast plijesni i stvaranje mikotoksina. Uočeno je da su histološke promjene bubrega svinja vrlo slične histološkim

promjenama ljudi oboljelih od BEN-a. BEN se javlja u geografski ograničenim područjima u Bosni i Hercegovini, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumunjskoj, Srbiji i na Kosovu, a sporadični slučajevi sa sličnim oštećenjima bubrega javljaju se u Kongu, Tunisu, Maroku i Egiptu. Nakon dugogodišnjih istraživanja izloženosti ljudi u endemskom kraju u Hrvatskoj, ustanovljeno je da se OTA češće nalazi u plazmi ljudi u endemskom kraju negoli izvan njega, ali povezanost izloženosti mikotoksinu OTA s nastankom BEN-a nikada nije dokazana. U Hrvatskoj je nađena znatna varijabilnost nalaza OTA u krvi zdravih ljudi u različitim regijama kao i u različitim godišnjim dobima. Najviše su koncentracije nađene u Slavoniji (Osijeku), a najniže u Primorsko-goranskoj županiji (Rijeci) što je i razumljivo jer stanovnici Osijeka konzumiraju dosta svinjskog mesa (u kome se često nalazi OTA) dok se u Rijeci stanovnici hrane pretežito mediteranskom prehranom. To se može objasniti neobičnom kinetikom jer se za razliku od drugih mikotoksina OTA vrlo dugo zadržava u organizmu. Zbog toga se u organizmu OTA nakuplja iz različitih namirnica, prvenstveno iz kontaminiranih proizvoda od žitarica. Budući da je svinjsko meso često kontaminirano tim mikotoksinom ljudi koji ga konzumiraju u većim količinama imaju veći rizik od izloženosti.

Citrinin

Citrinin (CTN) je bio donedavna manje istraživani mikotoksin koji je, kada je izoliran bio kandidat da se koristi kao antibiotik za gram-pozitivne bakterije (Flajs i Peraica, 2009). U daljnjim istraživanjima ustanovljeno je da je nefrotoksičan i uvršten je u mikotoksine. Daleko je manje nefrotoksičan od OTA pa je zato bio manje zanimljiv istraživačima i o njegovoj toksičnosti i karcinogenosti puno se manje zna. Međutim, čim je postavljena mikotoksinska teorija etiologije BEN-a odmah je pretpostavljeno da su OTA zajedno s CTN-om uzročnici BEN-a. CTN je izoliran iz kulture *Penicillium citrinum* Thom, a kasnije je nađeno da ga proizvode i *P. expansum*, *P. verrucosum*, *Aspergillus terreus* i *Monascus* (*M. ruber*). CTN se u hrani obično nalazi zajedno s OTA jer neke navedene plijesni proizvode oba mikotoksina.

Bubreg je ciljani organ toksičnosti CTN-a, ali u različitim pokusnih životinja izloženih tom toksinu nađene su i oštećenja jetre i koštane srži. Neki su autori našli da CTN nije karcinogen u miševa, dok su drugi našli da uzrokuje benigne tumore u bubrezima štakora (Arai i Hibino; 1983; Kanisawa 1984). Budući da nema dokaza da je CTN karcinogen, IARC ga je svrstao u Skupinu 3 (ograničeni dokazi da je karcinogen za pokusne životinje i bez dokaza da je karcinogen za ljude).

Citrinin je u usporedbi s drugim mikotoksinima malo toksičan. Nisu poznati slučajevi akutnog i kroničnog trovanja ljudi CTN-om, no istraživanja su pokazala da na pokusnim životinjama povećava toksični učinak drugih mikotoksina.

SUMMARY

Mycotoxins are toxins produced by molds which may cause acute and chronic intoxications called mycotoxicoses. Until now acute mycotoxicoses, which are caused by the exposure to high levels of mycotoxins in short period, appeared exclusively in tropical countries. They have typical clinic symptoms and high mortality. Chronic mycotoxicoses have less serious clinical appearance, but they may cause tumors and lesions of target organs. Both, acute and chronic mycotoxicoses are rarely proved in humans. The only mycotoxin that is proved to be ethiological agent of acute and chronic intoxication as well as the liver carcinoma is aflatoxin B1 and its derivatives.

Key words: aflatoxins, citrinin, ochratoxin, sterigmatocystin

LITERATURA

Arai, M., Hibino, T. (1983.). Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Lett*, 17, 281-287.

Bohm, J., De Saeger, S., Edler, L., Fink-Gremmels, J., Mante, P., Peraica, M., Stetina, R., Vrabcheva, T. (2013.). Scientific opinion on the risk for public health and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J*, 11, 3254.

Degen, G.H., Gundert-Remy, U. (2018.). Preliminary data on citrinin kinetics in humans and their use to estimate citrinin exposure based on biomarkers. *Toxicol Lett*, 282, 43-48.

Eskola, M., Kos, G., Elliot, C.T., Hajšlova, J., Mayar, S., Krska, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: validity of the widely cited „FAO estimate” of 25%. *Crit Rev Food Sci* (doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570)

Flajs, D., Peraica, M. (2009.). Toxicological properties of citrinin. *Arh Hig Rada Toksikol*, 60, 457-464.

International Agency for Research on Cancer (2002.). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82, Lyon: IARC.

Kanisawa, M. (1984.). Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Dev Food Sci*, 7, 245-254.

Park, D.L., Njapau, H., Boutrif, E. (1999.). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *FAO Food Nutr Agricul J*, 23, 49-56.

Pfohl-Leszkowicz, A., Tozlovanu, M., Manderville, R., Peraica, M., Castegnaro, M., Stefanović, V. (2007.). New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Mol Nutr Food Res*, 51, 1131-2246.

Pregledni rad