

EKOLOŠKI I JAVNOZDRAVSTVENI RIZIK POVEZAN S PRISUTNOŠĆU OHRATOKSINA A U JEČMU

ECOLOGICAL AND PUBLIC HEALTH RISK ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A IN BARLEY

Marija Štefanec, Jasna Bošnir, D. Puntarić, A. Racz

Izvorni znanstveni članak
Primljeno: 25. kolovoza 2009.

SAŽETAK

Balkanska endemska nefropatija (BEN) još uvijek zaokuplja povećanu pažnju kao bolest uzrokovana utjecajem čimbenika iz okoliša. Teorija o mikotoksinima pojavu BEN-a tumači kao rezultat ingestije malih, ali učestalih količina ohratoksina A. Cilj ovog rada bio je utvrditi prisutnost i usporediti koncentracije ohratoksina A u ječmu uzorkovanom iz tri različita područja Slavonije: okolice Slavanskog broda koja se smatrala endemskim područjem za razvoj BEN-a, okolice grada Osijeka u kojoj se BEN-a sporadično pojavljuje, te s područja Nove Gradiške na kojem nema zabilježenih slučajeva BEN. Tankoslojna kromatografija je korištena u detekciji ohratoksina A u 120 uzoraka; po 20 uzoraka iz svakog područja u svakoj od dvije žetvene godine - 2007. i 2008. Ohratoksin A bio je prisutan u 100% uzoraka ječma s područja Slavanskog Broda kod kojih su zabilježene koncentracije bile između 20 i 25 µg/kg (žetva 2007.) i 10 i 20 µg/kg (žetva 2008.). Nasuprot tomu, ohratoksin A nije bio detektiran niti u jednom uzorku ječma s neendemskog područja Nove Gradiške. Neočekivano, ohratoksin A je bio prisutan i u svih 20 uzoraka ječma s Osječčkog područja u koncentracijama 10 i 20 µg/kg (žetva 2007.) Statistički značajna razlika je opažena između uzoraka s područja Slavanskog broda i svih drugih uzoraka s druga dva područja ($p < 0.001$), što govori o geografskom preklapanju distribucije, ali nije i nedvojbena dokaz etiološke povezanosti koju tek treba dokazati u budućnosti.

Ključne riječi: ječam, ohratoksin A, Balkanska endemska nefropatija, etiologija

UVOD

U centrima zdrave hrane mogu se naći razne vrste žitarica i proizvoda od žitarica, sušeno voće i povrće, sjemenke i drugi poljoprivredni proizvodi. Već duže se zna da su upravo takve namirnice tijekom vegetacije i skladištenja podložne rastu i

razvoju velikog broja plijesni koje imaju sposobnost sinteze biološki aktivnih tvari - mikotoksina

Marija Štefanec, dipl. san. ing., doc. dr. sc. Jasna Bošnir, prof. dr. sc. Dinko Puntarić, dr. med. spec. ZZJZ „Dr. Andrija Štampar“, Mirogojska 16, Zagreb; dr. sc. Aleksandar Racz, dr. med. spec., Zdravstveno veleučilište, Zagreb, Mlinarska 38 - Hrvatska.

(Weidenborner, 2001). Žitarice malog zrna (pšenica, raž, ječam, zob) sve do skladištenja i prerade slabije su podložne tvorbi mikotoksina nego žitarice velikog zrna (riža, kukuruz). Posljedica je to količine vode u zrnju za vrijeme žetve, transporta, skladištenja i prerade, što je bitan parametar za naknadni rast plijesni. U pravilu žitarice manjeg zrna žanju se kad je u njima sadržaj vode nizak, pa je i porast plijesni manji, tako da su rastu plijesni najviše izložene žitarice poput kukuruza. Do sad je poznato više od 100 mikotoksina od kojih su najznačajniji aflatoksini, ohratoksini, zeralenon, trihoteceni, citrinin, patulin, rubratoksin i sterigmatocistin (Lacey, 1989).

Epidemiolozi su posebno zanimljiv ohratoksin A koji se u kontinuitetu već tridesetak godina spominje kao mogući uzročnik nastanka tubulointersticijske kronične bolesti bubrega tzv. Balkanske endemske nefropatije (BEN), ali bez konačnog odgovora (Ceović i sur., 1992). Pored ohratoksina A u skupinu ohratoksina ubrajaju se ohratoksin B, ohratoksin C, ohratoksin D, 4 – hidroohratoksin A i ohratoksin α . (Weidenborner, 2001)

Po kemijskoj strukturi ohratoksini su dihidroizokumarini povezani u položaju 7 sa β -L – fenilalaninom peptidnom vezom. Ohratoksin A $C_{20}H_{18}ClNO_6$, odnosno ((R)-N-[(5-klor-3,4 – dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-oksi-1-H-2-benzopiran-7-il)karbonil]-L-fenilalanin) sadrži klor, ohratoksin B je njegov dekloranalogue, ohratoksin C je etilester ohratoksina A, a ohratoksin D je hidroksi-analogue ohratoksina A. Najtoksičniji je ohratoksin A, zatim ohratoksin C. Ohratoksin B se prije nije smatrao toksičnim, no detaljnim istraživanjima na pilicima je dokazana i njegova toksičnost (Krog i sur., 1977).

Ohratoksine proizvode plijesni roda *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. ostianus*) i roda *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. purpureescens*, *P. commune* i *P. cyclopium*).

Glavni supstrat za rast ohratoksinogenih plijesni i sintezu ohratoksina su zrnje ječma i pšenice kontaminirano plijesnim sa polja ili uskladištenja, te zrnje koje se upotrebljava za pripremu kruha, piva ili krme. Ohratoksini su izolirani iz kukuruza, kikirikija, osušenog zrna bijelog graha te zobi (Voice i sur., 2006).

Ohratoksin A je hepatotoksin i nefrotoksin kojem nije u potpunosti poznat mehanizam djelovanja. Pokusi *in vitro* s mitohondrijima jetre štakora pokazali su da ohratoksin inhibira stanično disanje, najvjero-

jatnije djelujući kao komparativni inhibitor proteina za prijenos dikarboksilnih kiselina, adenin dinukleotida i fosfata smještenih na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Suzuki i sur., 1975). Inhibitorni učinak ohratoksina A uočen je i kod enzima fosfoenolpiruvat karboksikinaze u bubregu kod štakora hranjenih s 2 mg/kg ohratoksina A tijekom dva dana (Meisner i Chan, 1974).

Suzuki i suradnici (1975) su na štakorima utvrdili prije 35 godina da ohratoksin A uzrokuje pojačanu razgradnju glikogena, praćenu porastom koncentracije glukoze u krvi, porastom laktata u krvi i jetri, što uzrokuje inhibiciju aktivnog transporta glukoze u jetru, smanjenu aktivnost sinteze glikogena te pojačanu aktivnost fosforilaze „a“. Pokusi na mikoorganizmima i na stanicama hepatoma štakora, pokazali su da ohratoksin A ima i inhibitorno djelovanje na tRNA sintezu u biosintezi proteina (Suzuki i sur., 1975).

Ohratoksin A je do sada pronađen u različitim namenicama u mnogim zemljama svijeta. Kontaminacija namirnica ohratoksinom A najizraženija je u Skandinaviji i baltičkim zemljama (Thuvander i sur., 2001; Wolff, 2000). Harvig i Chen (1974) prvi su otkrili ohratoksin A u prirodno vlažnom žitu u SAD-u. Shotwell i sur. (1969) prije pedeset godina pronašli su ohratoksin A u brašnu i pljesnivu kruhu u Engleskoj. Visoke koncentracije ohratoksina A pronađene su u ječmu Skandinavskih zemalja, naročito Danske, zatim Rumunjske, Bugarske, Hrvatske, a postoje podaci (Maaroufi i sur., 1995) da je ohratoksin A pronađen u hrani i serumu ljudi iz Tunisa i nekih drugih afričkih zemalja. Ohratoksin A je prije 30-ak godina zabilježen kao glavni etiološki faktor za svinjsku mikotoksičnu nefropatiju, a kako ta bolest ima puno toga zajedničkog s BEN-om u ljudi bila su potaknuta istraživanja o njihovoj etiološkoj povezanosti (Peraica i sur., 2001; Miletić-Medved i sur., 2005). Na području bugarskih i bivših jugoslavenskih endemskih regija otkrivena je velika učestalost kontaminacije hrane ohratoksinom A kao i veća koncentraciju ohratoksina A u krvi tadašnjih stanovnika u odnosu na neendemska područja (Radić i sur., 1997). Detekcija nekoliko karakterističnih ohratoksina A adukta u tumorima urinarnog trakta bugarskih stanovnika s ispitivanog endemskog područja dodatno je potkrijepilo teoriju o povezanosti ohratoksina A i BEN-a. Bolest se javlja najčešće u naseljima uz Dunav ili uz rijeke u njegovom slivnom toku, a u

Hrvatskoj se javlja u 7 sela u okolici Slavenskog Broda i to isključivo kod osoba odrasle dobi (Pavlović i sur., 1991). Dok jedni epidemiolozi (Puntarić i sur., 2001) podupiru teoriju da je BEN moguće uzrokovan ingestijom malih doza ohratoksina A putem hrane kroz određeno razdoblje, u literaturi je zastupljena i teorija da je bolest uzorkovana dugotrajnom izloženosti policikličkim aromatskim ugljikovodicima i drugim toksičnim sastojcima, koji u pitku vodu dospjevaju iz lignita u zemlji (Tatu i sur., 1998). Ovo istraživanje predstavlja mali doprinos mozaiku rasvjetljavanja mogućih uzroka nastanka BEN-a i put prema njenoj prevenciji

Cilj istraživanja bio je utvrditi koliko ima ohratoksina A u ječmu iz područja u kojem su zabilježeni slučajevi pojave BEN-a, te usporediti izmjene količine ohratoksina A s onima u ječmu iz drugih područja u kojima je bolest sporadična ili u kojima nije niti zabilježena. Područje Slavenskog Broda uzeto je kao tzv. endemsko područje, jer je tu zabilježena učestala pojava endemske nefropatije. Područje Osijeka uzeto je kao tzv. neendemsko područje sa sporadičnim slučajevima bolesti, a područje Nove Gradiške kao kontrolno područje u kojem do sada nema zabilježenih slučajeva pojave BEN-a, niti veće koncentracije ohratoksina A u žitaricama.

MATERIJAL I METODE

Uzimanje i postupak s uzorcima

Uzorci ječma prikupljeni su iz ječma skladištenog u dvije žetvene godine: 2007. i 2008. Uzorci ječma iz Slavenskog Broda i Osijeka dopremljeni su iz Poljoprivrednog instituta u Osijeku, a uzorci iz Slavenskog Broda sakupljeni su metodom slučajnog uzorkovanja u tamošnjim seoskim domaćinstvima. Ukupno je sakupljeno 120 različitih uzoraka ozimog ječma, po 20 iz 2007. godine i 20 iz 2008. godine sa svakog od 3 područja, što ukupno iznosi 60 uzoraka godišnje, odnosno ukupno 120 uzoraka za te dvije žetvene godine.

Određivanje mikotoksina

Nakon homogenizacije i usitnjavanja uzoraka ječma, te obrade uzoraka organskim otapalima, identifikacija i kvantifikacija uzoraka određivana je metodom tankoslojne kromatografije (Thin Layer Chromatography- TLC) uz granicu detekcije metode je 0,02 µg/kg.

Određivanje količine vode

Sadržaj vode u zrnu određivan je sušenjem u sušioniku na 103 °C tijekom 60 minuta prema standardnoj AOAC metodi 983.15 (Gaithersburg, 2005).

REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 1. Rezultati određivanja koncentracije ohratoksina A u uzorcima ječma iz 2007. i 2008. godine s područja Slavenskog Broda TLC metodom

Table 1. Results of detection of ochratoxin A concentrations in barley samples taken in Slavonski Brod area by means of TLC method in years 2007. and 2008.

Uzorak Sample N=20	Ječam s lokacije - Barley from location Slavonski Brod	Koncentracija ohratoksina A Ochratoxin A concentration TLC (µg/kg)
Žetva 2007. Harvest 2007	minimum - minimum	20
	maksimum - maximum	25
	srednja vrijednost - mean value	22,75
	stand. devijacija - stand.deviation	2,552
	maksimalno dopuštena koncentracija - maximum allowable concentration	5
Žetve 2008. Harvest 2008	minimum - minimum	10
	maksimum - maximum	20
	srednja vrijednost - mean value	16
	stand. devijacija - stand.deviation	5,026
	maksimalno dopuštena koncentracija - maximum allowable concentration	5

Tablica 2. Rezultati određivanja koncentracije ohratoksina A u uzorcima ječma iz 2007. i 2008. godine s područja Osijeka TLC metodom

Table 2. Results of detection of ochratoxin A concentrations in barley samples taken in Osijek area by means of TLC method in years 2007. and 2008.

Uzorak Sample N=20	Ječam s lokacije - Barley from location Osijek	Koncentracija ohratoksina A Ochratoxin A concentration TLC (µg/kg)
Žetva 2007. Harvest 2007	minimum - minimum	10
	maksimum - maximum	20
	srednja vrijednost - mean value	14,5
	stand. devijacija - stand.deviation	5,104
	maksimalno dopuštena koncentracija - maximum allowable concentration	5
Žetve 2008. Harvest 2008	minimum - minimum	/
	maksimum - maximum	10
	srednja vrijednost - mean value	/
	stand. devijacija - stand.deviation	3,662
	maksimalno dopuštena koncentracija - maximum allowable concentration	5

Tablica 3. Rezultati određivanja koncentracije ohratoksina A u uzorcima ječma iz 2007. godine s područja Nove Gradiške TLC metodom

Table 3. Results of detection of ochratoxin A concentrations in barley samples taken in Nova Gradiška area by means of TLC method in years 2007. and 2008.

Uzorak Sample N=20	Ječam s lokacije - Barley from location Nova Gradiška	Koncentracija ohratoksina A Ochratoxin A concentration TLC (µg/kg)
Žetva 2007. Harvest 2007	minimum - minimum	nije detektirano - not detected
	maksimum - maximum	nije detektirano - not detected
	srednja vrijednost - mean value	nije detektirano - not detected
	stand. devijacija - stand.deviation	/
	maksimalno dopuštena koncentracija - maximum allowable concentration	5
Žetve 2008. Harvest 2008	minimum - minimum	nije detektirano - not detected
	maksimum - maximum	nije detektirano - not detected
	srednja vrijednost - mean value	nije detektirano - not detected
	stand. devijacija - stand.deviation	/
	maksimalno dopuštena koncentracija - maximum allowable concentration	5

Ohratoksin A je utvrđen u svih 20 (100%) uzoraka ječma s područja Slavenskog Broda iz 2007. i 2008. godine, te u svih 20 (100%) uzoraka iz područja Osijeka iz 2007. godine. Najveća koncentracija

ohratoksina A iznosila je 25 µg/kg i zabilježena je u uzorcima ječma s područja Slavenskog Broda iz 2007. godine. Nešto manje količine od 20 µg/kg, odnosno 10 µg/kg detektirane su u uzorcima ječma s

područja Slavanskog Broda iz 2008. godine i Osijeka iz 2007. i 2008. godine. U uzorcima iz 2008. s područja Osijeka ohratoksin A detektiran je na 20% uzoraka. Jedino su u svim uzorcima s područja Nove Gradiške izmjerene koncentracije ohratoksina A bile ispod granice detekcije od 0,02 µg/kg.

Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani dopuštena količina ohratoksina A u žitaricama iznosi 5 µg/kg jestivog dijela. U usporedbi s dozvoljenim, srednje dobivene vrijednosti u Slavanskom Brodu 2007. godine (22,75 µg/kg) i 2008. godine (16 µg/kg) i Osijeku 2007. godine (14,5 µg/kg) su višestruko veće od dopuštene u uzorcima ječma s područja Slavanskog Broda.

tu vrijednost (srednje vrijednosti postotka vlage u zrnu kretale su se u rasponu od 10,422% do 11,400%), što potvrđuje da i pri manjoj vrijednosti sadržaja vode od dozvoljene, može doći do rasta plijesni ukoliko ječam nije pravilno skladišten i što je dulje vrijeme skladištenja. Zbog toga je vrlo važno kontrolirati sve parametre koji utječu na pojavu plijesni, a najvažniji su temperatura skladištenja, sadržaj vode i oštećenje zrna.

Dobiveni rezultati su u skladu s hipotezom ovog rada, a podudaraju se i s prethodnim istraživanjem ohratoksina A u drugim žitaricama. Puntarić i sur. (2001.) istraživali su vezu između ohratoksina A u namirnicama i pojave endemske nefropatije uspore-

Tablica 4. Izmjerene vrijednosti sadržaja vode u uzorcima ječma iz 2007. i 2008. godine

Table 4. Measured amounts of water in barley samples from years 2007. and 2008.

Lokacija - Location	Žetva - Harvest	Raspon % vode u zrnu Range of water % in sample	Srednja vrijednost Mean value
Slavonski Brod	2007.	10,504 - 10,754	10,658
Osijek	2007.	11,210 - 11,350	11,280
Nova Gradiška	2007.	11,230 - 11,631	11,400
Slavonski Brod	2008.	10,658 - 10,882	10,734
Osijek	2008.	10,216 - 10,706	10,422
Nova Gradiška	2008.	10,230 - 11,018	10,716

Usporedba dobivenih rezultata dviju godina žetve uzoraka (2007. i 2008.), pokazuje da su veće vrijednosti ohratoksina A izmjerene u uzorcima iz 2007. godine, što ide u prilog činjenici da vrijeme skladištenja utječe na pojavu mikotoksina. Što je dulje vrijeme skladištenja, povećava se rast plijesni na žitaricama, a s time i tvorba mikotoksina. Jedino se kontroliranjem uvjeta skladištenja mjerenjem svih parametara može spriječiti rast plijeni i proizvodnja mikotoksina. Unutar velikih volumena uskladištenih žitarica (ječma) najčešći uzrok rasta plijesni je promjena okolišnih uvjeta skladištenja ili ulazak vode. U takvim uvjetima spore plijesni germiniraju pa se može širiti po svojoj masi uskladištena materijala. Također je bitno kontrolirati sadržaj vode samog zrna ječma prije uskladištenja i tijekom skladištenja, te ukoliko sadržaj vode u zrnu prelazi 14%, ječam nije pogodan za uporabu, jer je vrlo velika mogućnost rasta plijesni i tvorbe mikotoksina. Izmjerene vrijednosti sadržaja vode u našim uzorcima nisu prelazile

đujući količine ohratoksina A u pšenici i kukuruzu s endemskog i neendemskog područja. Također su dobili da je najveća količina ohratoksina A bila izmjerena u uzorcima žitarica s područja Slavanskog Broda (38 µg/kg za pšenicu, 20 µg/kg za kukuruz), pri čemu je ohratoksin A bio utvrđen u 9 od 11 (81,82%) uzoraka kukuruza, te u sva 33 (100%) uzorka pšenice s tog područja, baš kao i u našem radu u svim uzorcima ječma s istog područja.

U uzorcima s područja Osijeka (9 µg/kg za pšenicu, 0,81 µg/kg za kukuruz), pri čemu je ohratoksin A bio utvrđen u 24 od 27 (88%) uzoraka pšenice, te u 4 od 15 (26%) uzoraka kukuruza s tog područja. Najniže vrijednosti ohratoksina A utvrđene su u žitaricama s područja Hrvatskog Zagorja kao tzv. neendemskog područja (2µg/kg za pšenicu, 0,42 µg/kg za kukuruz), pri čemu je ohratoksin A bio utvrđen u 14 od 17 (82%) uzoraka pšenice te u 1 od 5 (20%) uzoraka kukuruza s tog područja. Zanimljivo je da na području Nove Gradiške kao neendemskom

području u ovom istraživanju uopće nije zabilježena prisutnost ohratoksina A.

Doprinos teoriji o povezanosti prisutnosti ohratoksina A i endemske nefropatije predstavljaju i radovi koji prate razine ohratoksina A u serumu ljudi s područja BEN-a. Vrlo je zanimljiv pokazatelj Fuchsa i sur. (1991.) koji su u hiperendemskom selu Kaniža zabilježili pojavljivanje ohratoksina A u serumu u raspon vrijednosti od 2-50 ng/ml, a u neendemskim selima zabilježene su vrijednosti u rasponu od 2-20 ng/ml. Izostanak istraživanja koncentracije ohratoksina u stanovnika domaćinstava u kojima je uzorkovan ječam, kao i izostanak uvida u njihove prehrambene navike vrlo važno je ograničenje ovog istraživanja.

Istraživanjem provedenim u Bugarskoj Dimitrova i sur. (2001) također je istražena kontaminacija domaće hrane ohratoksinom A, tijekom kojeg je ispitano 165 uzoraka različite hrane (grah, krumpir, kukuruz, pšenica i brašno) i stočne hrane iz seoskih domaćinstava sjeverozapadne Bugarske. Uzorci su skupljani iz sela u kojima su zabilježeni slučajevi BEN-a iz domaćinstava u kojima je do tad zabilježena bolest te su podaci uspoređeni s onima iz sela u kojima nema zabilježenih slučajeva bolesti. Domaćinstva sa zabilježenim slučajevima pojave bolesti u endemskim selima imala su stalno veći omjer ohratoksina A pozitivnih uzoraka u odnosu na ostala testirana domaćinstva. Rezultati su prikazani kao mjesečna konzumacija ohratoksina A putem bazične hrane koja je u endemskim selima iznosila 1,21 mg/dan, naspram 0,71 mg/dan u selima i domaćinstvima u kojima nema zabilježenih slučajeva bolesti.

Prilog mogućoj povezanosti konzumacije ohratoksina A i BEN-a pružaju i pokusi na laboratorijskim životinjama u kojima je zabilježeno da nakon jednokratne aplikacije različite koncentracije ohratoksina A dolazi do gubitaka tjelesne mase, depresije, dijareje, poliurije i nefropatije (Brown i sur., 1976). Wong i Hsieh (1976) su hranu koja sadrži 200 µg/kg ohratoksina A davali svinjama i štakorima te uočili patološke promjene na bubrezima, a ostaci ohratoksina A bili su detektirani i u drugim organima i tkivima. Kuiper-Goodman i Scott (1989) su dokazali prisutnost ohratoksina A u svinjskim bubrezima i jetri metodom tekućinske kromatografije (TLC), a granica detekcije je bila 0,5 ng/g.

Neovisno o izostanku konačnog odgovora o etiološkoj povezanosti ohratoksina A u hrani i razvoja

BEN-a, radi se o spoju s mogućim kancerogenim rizikom, čija je dozvoljena dnevna doza 0,2 do 0,4 ng/kg tjelesne mase. S obzirom na navedeno potrebno je učiniti dodatne napore kako bi se količina ohratoksina A u hrani, posebice u žitaricama smanjila na najmanju moguću mjeru. Budući da su predisponirajući faktori za njihov nastanak mehaničko oštećenje zrna, oštećenje zrna parazitima, deficijencija minerala tijekom razvoja biljke i neprimjerena toplina i vlaga tijekom rasta, sazrijevanja biljke i uskladištenja borba protiv razvoja plijesni zahtijeva složeni i razrađeni sustav primjene niza agrotehničkih mjera od samog načina uzgoja, preko vremena i načina berbe, do transporta i uskladištenja žitarica, što je s obzirom na moguć štetni utjecaj na zdravlje ljudi od posebnog javnozdravstvenog interesa.

ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata i provedene rasprave, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Značajno veće količine ohratoksina A od MDK dopuštenim važećim propisima izmjerene su u svim uzorcima ječma s tzv. endemskog područja.

Za razliku od prisutnosti ohratoksina A u 100% uzoraka u obje praćene žetvene godine (2007. i 2008.) na endemskom području Slavanskog Broda i na needemskom području Nove Gradiške ohratoksin A nije detektiran niti u jednom uzorku u obje žetvene godine.

Veća razina ohratoksina A izmjerena je u uzorcima ječma iz 2007. godine u odnosu na 2008. godinu na području Slavanskog Broda i Osijeka, što pokazuje da su duljina vremena skladištenja i nepovoljni uvjeti skladištenja važni parametri koji utječu na rast plijesni i tvorbu mikotoksina.

Sadržaj vode u svim uzorcima ječma iz 2007. i 2008. godine bio je ispod vrijednosti propisane Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti žitarica. Nema statistički značajne razlike u izmjerenim vrijednostima sadržaja vode u uzorcima iz 2007. godine u odnosu na 2008. godinu, iako je zabilježena statistički značajnija prisutnost ohratoksina A u uzorcima ječma s područja Slavanskog Broda i Osijeka iz žetve 2007. godine u usporedbi s uzorcima iz žetve 2008. godine.

Rezultati ovog rada predstavljaju doprinos istraživanju moguće povezanosti ohratoksina A i BEN-a, ali su potrebna daljnja multidisciplinarna istraživanja i suradnja agronoma i epidemiologa na tom području, posebice budući da se radi o bolesti koja se može prevenirati.

LITERATURA

- Ceović, S., Hrbar, A., Sarić, M. (1992): Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* 30, (3), 183–188.
- Brown, M. H., Szech, G. M., Purmalis, B. P. (1976): Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 37, 331–338.
- Dimitrov, P. S., Simeonov, V. A., Stein, A. D. (2001): Balkan endemic nephropathy in Vratza, Bulgaria. *Europ. J. Epidemiology.* 17, (9), 847–853.
- Feder, G. L., Radovanović, Z., Finkelman, R. B. (1991): Relationship between weathered coal deposits and the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Kidney. Int. Suppl.* 34, 9–11.
- Fuchs, R., Radić, B., Čeović, S., Šošćarić, B., Hult, K. (1991): Human exposure to ochratoxin A. *IARC Sci. Publ.* 115, 131–4.
- Gaithersburg, M. D. (2005): Official Methods of Analysis 18th Ed., AOAC International Methods 983.15.
- Harving, J., Chen, Y. K. (1974): Some conditions favouring production of ochratoxin A and citrinin by *Penicillium viridicatum* in wheat. *Sci. Can. J. Plant.* 54, 17–22.
- Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceovic, S. (1977): Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 85, (3), 238–40.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. (1989): Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2, 179–248.
- Lacey, J. (1989): Prevention of mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (Eds. Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y.) Elsevier, USA.
- Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A. M., Ellouz, F., Creppy, E. E., Hammami, M. (1995): Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 609–615.
- Meisner, H., Chan, S. (1974): Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. *Biochemistry.* 13, (14), 2795–2800.
- Miletić-Medved, M., Domijan, A-M., Peraica, M. (2005): Recent data on endemic nephropathy and related urinary tumors. *Wien Klin. Wochenschr.* 117, 604–609.
- Narodne novine. (2008): Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. *Narodne novine*, 154/08
- Pavlovic, N. M., Varghese, Z., Persaud, J. W., Stefanovic, V., Strahinjic, S., Savic, V., Moorehead, J. F. (1991): Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Kidney Int. (Suppl.* 34), 102–104.
- Peraica, M., Domijan, A. M., Matašin, M., Lucic, A., Radic, B., Delas, F., Horvat, M., Bosanac, I., Balija, M., Grgicevic, D. (2001): Variations of ochratoxin A concentration in the blood of healthy population in some Croatian cities. *Arch. Toxicol.* 75, 410–414.
- Puntaric, D., Bosnir, J., Smit, Z., Skes, I., Baklaic, Z. (2001): Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. *Croat. Med. J.* 42, (3), 397–401.
- Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M. Lucic, A. (1997): Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol. Lett.* 91, (2), 105–109.
- Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Goulden, M. L. (1969): Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Appl. Microbiol.* 17, (5), 765–766.
- Suzuki, S., Satoh, T., Yamazaki, M. (1975): Effect of ochratoxin A on carbohydrate metabolism in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32, (1), 116–122.
- Thuvander, A., Paulsen, J. E., Axberg, K., Johansson, N., Vidnes, A., Olsen, Me.t (2001): Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem. Toxicol.* 12, (39), 1145–1151.
- Voice, T. C., Long, D. T., Radovanovic, Z., Atkins, J., L., McElmurry, S., P., Niagolova, N. D., Dimitrov P., Petropoulos, E. A., Ganey Varban, S. (2006): Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 12, 369–376.
- Weidenborner, M. (2001): *Encyclopedia of Food Mycotoxins.* Springer, Heidelberg.
- Wolff, J. (2000): Ochratoxin A in cereals and cereal products. *Archiv fur Lebensmittelhygiene.* 51, (4-5), 85–88.
- Wong, J. J, Hsieh, D. P. H. (1976): Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proc. Natl. Ac. Sci. (USA)* 73, 2241–2244.

SUMMARY

Balkan endemic nephropathy (BEN) is still drawing increased attention as an environmental disease. "The mycotoxin hypothesis" explains the BEN as a product of ochratoxin A ingestion in small intermittent amounts.

The aim of the paper is to determine and compare the presence and concentration of ochratoxin A in barley samples taken in three different areas of Slavonia, Croatia: the surroundings of Slavonski Brod, considered an endemic region with respect to Balkan endemic nephropathy (BEN), the surroundings of Osijek, a region where only sporadic cases of BEN have been reported, and the surroundings of Nova Gradiška, a non-endemic, BEN-free region. Thin-layer chromatography was used to determine ochratoxin A concentrations in 120 barley samples: 20 from each region sampled during 2007 and 2008 harvests. Ochratoxin A was present in 100% barley samples from the Slavonski Brod area, within concentration range from 20 to 25 µg/kg (2007 harvest) and from 10 to 20 µg/kg (2008 harvest), while, on the other hand, ochratoxin was not detected in any of the samples from the Nova Gradiška area. Unexpectedly, ochratoxin was also present in all 20 barley samples from the Osijek area within concentration range from 10 to 20 µg/kg (2007 harvest). A statistically significant difference was observed between the Slavonski Brod samples and all other barley samples ($p < 0.001$), which can be explained by geographical overlapping, but not as the unquestionable etiological evidence that still remains to be proved.

Key words: barley, ochratoxin A, Balkan endemic nephropathy, ethiology