Citrinin u dodacima prehrani na bazi crvene riže - potencijalni rizik za zdravlje ljudi

Đurović, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:037838

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivana Đurović

Citrinin u dodacima prehrani na bazi crvene riže - potencijalni rizik za zdravlje ljudi

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za mikrobiologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Maji Šegvić Klarić na svim savjetima i pomoći oko izrade ovog diplomskog rada.
Hvala mojoj obitelji na bezrezervnoj podršci i potpori kao i prijateljima uz koje je bilo ljepše koračati studentskim danima.

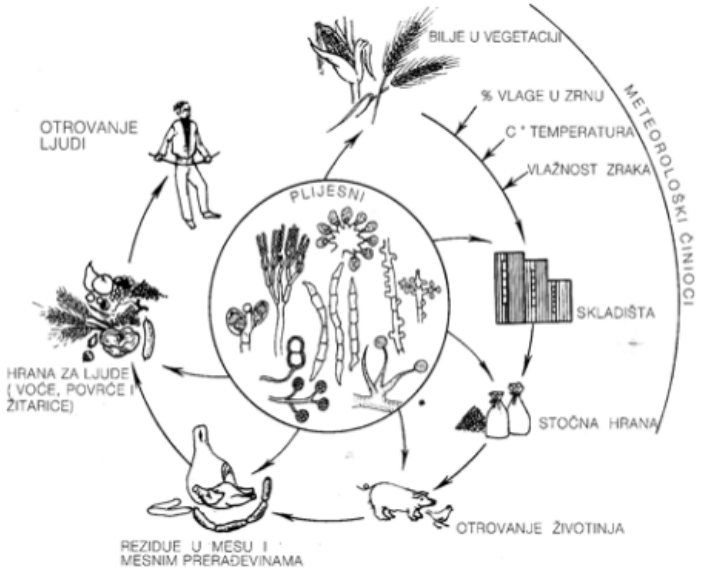
SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Mikotoksini 1
   1.2. Citrinin 2
      1.2.1. Kemijska svojstva citrinina 4
   1.3. Analitičke metode za određivanje citrinina 5
      1.3.1. Kromatografske tehnike 6
         1.3.1.1. Tankoslojna kromatografija 6
         1.3.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 7
      1.3.2. Kromatografske tehnike spregnute sa masenom spektroskopijom 8
         1.3.2.1. LC-MS tehnika 8
         1.3.2.2. GC-MS tehnika 8
      1.3.3. Imunokemijske metode analize 8
      1.3.4. Kolorimetrijske tehnike analize 9
   1.4. Štetni učinci citrinina 10
      1.4.1. Akutna toksičnost 10
      1.4.2. Subkronična toksičnost 11
      1.4.3. Nefrotoksičnost 11
      1.4.4. Reproduktivna toksičnost 12
      1.4.5. Toksičnost za ljude 12
   1.5. Mehanizam toksičnog djelovanja citrinina 14
   1.6. Crvena riža 17
      1.6.1. Farmakološki učinak crvene riže 19
2. OBRAZLOŽENJE TEME 21
3. MATERIJALI I METODE 22
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
   4.1. Zakonska regulativa 23
   4.2. Prisutnost citrinina u dodacima prehrani 24
   4.3. Prisutnost citrinina u hrani 31
5. ZAKLJUČAK 34
6. LITERATURA 35
7. SAŽETAK/SUMMARY 42

1.UVOD

1.1. Mikotoksini

Mikotoksini (*mykes-gljiva, toxicon-otrov*) su toksični proizvodi sekundarnog metabolizma nekih vrsta plijesni. S obzirom na ciljni organ djelovanja mogu se klasificirati kao npr. hepatotoksini, nefrotoksini ili neurotoksini, a mogu imati karcinogena, mutagena, imunotoksična i teratogena svojstva. Izloženost mikotoksinima i način unosa u ljudski organizam uglavnom je putem kontaminirane hrane, a rjeđe udisanjem ili transdermalnim putem. Bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze. Kontaminacija hrane mikotoksinima može biti primarna i sekundarna. Primarna kontaminacija, tj. kontaminacija mikotoksinima u hrani biljnog podrijetla posljedica je rasta plijesni na žitaricama, voću, povrću. Ako su životinje hranjenje mikotoksinima kontaminiranom hranom, metaboliti mikotoksina mogu se naći i hrani životinjskog podrijetla (meso, jaja, mlijeko) pa se takova oblik kontaminacije naziva sekundarnom kontaminacijom.



Slika 1. Put mikotoksina u hranidbenom lancu
(Ožegović i Pepeljnjak,1995)

Do danas je poznato više od 400 mikotoksina, no zbog svije pojavnosti i toksičnog potencijala kao kontaminanti hrane, najznačajniji su: aflatoksini (AFB_1, AFM_1), okratoksini (OTA), zearalenon (ZEA), fumonizini (FB_1, FB_2), trihoteceni (T-2 toksin, deoksinovalenol-DON) i patulin (PAT). Maksimalne dopuštene koncentracije navedenih mikotoksina u hrani regulirane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12). Osim u hrani, mikotoksini mogu biti i kontaminanti nekih farmaceutskih proizvoda kao što su biljne droge. Farmakopeja propisuje maksimalno dopuštene koncentracije aflatoksina B1 (ne više od 2 µg/kg biljne droge) i ostalih aflatoksina; B1, B2, G1 i G2 (ne više od 4 µg/kg, osim ako u pojedinoj monografiji nije drugačije propisano) za korijen vražje kandže, đumbir i plod sene. Pojavnost mikotoksina ovisi o vrsti plijesni, o klimatskim i okolišnim uvjetima te fizikalno-kemijskim čimbenicima (temperaturi -5 do 60 ^oC, sadržaju vode u namirnici 13% i više, koncentraciji plinova u atmosferi te sastavu namirnice i dr.). Najveća proizvodnja mikotoksina je u tropskim krajevima jer plijesni tamo imaju najbolje uvjete za rast, no u svim klimatskim zonama je raširena proizvodnja mikotoksina. Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda, FAO (*Food and Agriculture Organization*), 25% hrane koja se proizvodi u svijetu kontaminirano je mikotoksinima.

S obzirom da su mikotoksini česti kontaminanti hrane i nekih farmaceutskih proizvoda koji ovisno o koncentracijama i vremenu izloženosti mogu predstavljati rizik za zdravlje ljudi, osjetljive analitičke metode za njihovu detekciju i kvantifikaciju imaju presudnu ulogu u kontroli zdravstvene ispravnosti takvih supstrata, a time i prevenciji pojave mikotoksikoza.

1.2. Citrinin

Citrinin (CTN) je mikotoksin kojeg proizvode neke vrste iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Monascus*. Može se pronaći u namirnicama biljnog podrijetla, prvenstveno u žitaricama malog zrna (pšenica, zob, ječam, raž, riža) i velikog zrna (kukuruz), uljaricama (kikiriki) te voću, povrću i voćnim sokovima. Uglavnom nastaje nakon žetve i može ga se pronaći u pohranjenim žitaricama, tj. u silosima, a također i u drugim biljnim proizvodima kao što su grah, začinima te mliječnim proizvodima budući da su žitarice osnovna stočne hrane.

Neke vrste iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* osim citrinina također mogu proizvoditi i druge mikotoksine poput okratoksina A i patulina.

U žitaricama i voću najčešće su prisutni u kombinaciji (Flajs i Peraica, 2009).

Tablica 1. Zastupljenost citrinina u pojedinim namirnicama (Flajs i Peraica, 2009)

Namirnica	Udio citrinina (µg/kg)	Podrijetlo namirnice	Referentne vrijednosti
Ječam	160-2000 30-480	Njemačka Švedska	14 15
Jabuke	320-920	Portugal	16
Riža	49-92 700-1130	Indija Japan	6
Kukuruzno brašno	27-73 10-98 212	Japan Tajland Burma	17
Rajčica	70-760	Kanada	18
Kukuruz	12	Indija	19

Citrinin je izoliran iz kulture *Penicillium citrinum Thom* 1931. godine (Hetherington i Raistrick, 1931), a 1981. je izoliran iz *Monascus purpureus* (Wong i Koehler, 1981) kao blijedo žuti pigment monascidin A koji je kasnije klasificiran kao citrinin.

CTN se često javlja kao nepoželjan sastojak fermentacijskih produkata dobivenih pomoću *Monascus* vrste (crvena riža) koji se u Aziji stoljećima koristi za očuvanje mesa (konzervanas) i kao prehrambeno bojilo.

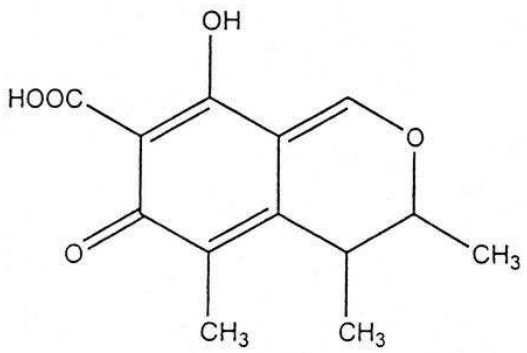
Monascus vrste se u Kini tradicionalno koriste kao izvor žutog i crvenog prirodnog pigmenta za hranu i za razliku od sintetskih bojila njihova toksičnost je puno je manja.

CTN pokazuje antibiotski učinak na gram-pozitivne bakterije, ali se nikad nije koristio kao antibiotik zbog svoje visoke nefrotoksičnosti. Također, CTN ima svojstava antifungika, antiprotozoika.

Iako je CTN primarno nefrotoksičan, može također dovesti do oštećenja jetre ili koštane srži.

Prema IARC (*International Agency for Cancer Research*) uvršten je u kategoriju 3 kancerogenih tvari u koju su uvrštene tvari kojima je dokazana kancerogenost na životinjskim modelima, ali nije dokazano kancerogeno djelovanje za ljude.

1.2.1. Kemijska svojstva citrinina



Slika 2. Strukturna formula citrinina

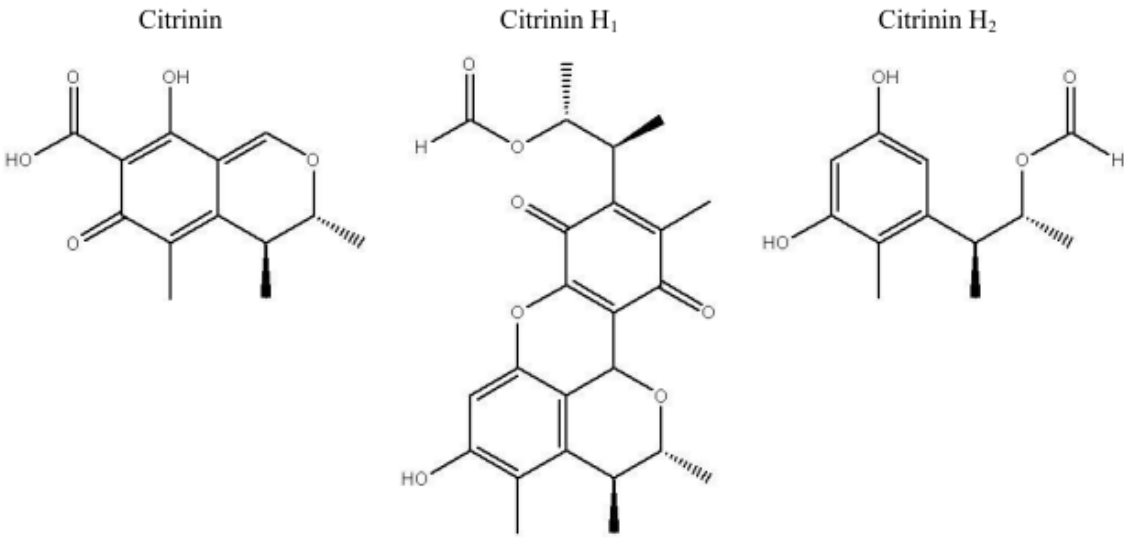
Molekulska formula: $C_{13}H_{14}O_5$

Molekulska masa: 250.25 g/mol

Naziv prema IUPAC –u: (3R, 4S)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3H-2-benzopiran-7-karboksilna kiselina

CAS broj; 518-75-2

Citrinin dolazi u obliku žutih kristala bez mirisa. Maksimalna UV apsorpcija izmjerena je na 250 nm, tj. na 333 nm u metanolnoj otopini, dok je temperatura tališta na 175°C. Umjereno topljiv (gotovo netopljiv) je u vodi, a topljiv u vodenoj otopini natrijevog hidroksida, natrijevog karbonata ili natrijevog acetata kao i u metanolu, acetonitrilu, etanolu i većini drugih polarnih otapala. Može tvoriti kelatne komplekse sa metalnim ionima.
Zagrijavanjem na 175°C se razgrađuje, a u vodenoj otopini do razgradnje dolazi na 140°C.
Pod utjecajem temperature, CTN se razgrađuje na produkte koji su veće ili manje toksičnosti. Nastali produkti su citrinin H1 koji je pokazuje veću toksičnost od citrinina te citrinin H2 koji ne pokazuje značajnu toksičnost.
Kao produkt razgradnje može nastati i dimer citrinina (Clark i sur., 2006).



Slika 3. Strukturne formule citrinina i razgradnih produkata

1.3. Analitičke metode za određivanje citrinina

Obzirom da su mikotoksini široko rasprostranjeni u okolini kao kontaminanti hrane za životinje i za ljude i da mogu uzrokovati ozbiljne probleme za zdravlje ljudi (oštećenje bubrega, jetre, živčanog sustava, kancerogenost, imunosupresija) važno je razviti dovoljno osjetljive metode za njihovu detekciju i odrediti granične koncentacije do koje mikotoksini ne predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje.

Prije početka analize, CTN je potrebno ekstrahirati iz uzorka i pročistiti ga, a s obzirom da je CTN nestabilan u vodenoj otopini i da se razgrađuje na temperaturama iznad 130°C, priprema uzorka za analizu nije jednostavan postupak.

Obzirom da rast plijesni i proizvodnja mikotoksina ovisi o usjevu, agrokulturnim mjerama za vrijeme rasta, vremenskim uvjetima za vrijeme žetve i nakon nje, procesima sušenja i skladištenja, zastupljenost mikotoksina je različita pa je uzorkovanje iznimno važno za dobivanje pouzdanih rezultata analize.

Kako bi se na kraju analize donijeli ispravni zaključci, od izrazite je važnosti znati odakle je uzorak uzet i pod kakvim uvjetima.

Uzorak za analizu se najčešće priprema metodom ekstrakcije između baze i kloroforma.
Moguća je i ekstrakcija između metanola i vode, a za analizu CTN također postoje komercijalne imunoafinitetne kolone (IAC).
Također je poznata upotreba razdiobe između aminopropila i čvrste faze (SPE) nakon ekstrakcije sa etilacetatom za uzorke crvene riže.
Nove metode razvijene za pripremu uzorka uključuju molekularno utisnute polimere (MIP).

Tehnike koje se primjenjuju za analizu CTN uključuju kolorimetrijske tehnike, kromatografske tehnike te imunokemijske metode analize.
Metode koje se primjenjuju su tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), imunoenzimske metode (*ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay*) kao i kromatografske tehnike spregnute s masenom spektrometrijom (LC-MS i GC-MS).

1.3.1. Kromatografske tehnike

1.3.1.1. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija; TLC (*thin-layer chromatography*) je metoda odjeljivanja u kojoj je stacionarna faza u tankom sloju jednolično nanesena na čvrsti nosač (ploču) od stakla, metala ili plastike. Kao stacionarna faza uglavnom se koristi silika gel.
Sastojci smjese koja se nanosi na stacionarnu fazu, nošeni mobilnom fazom, putuju različitom brzinom duž tankog sloja stacionarne faze, a brzina ovisi o omjeru raspodjele sastojaka između faza. Kao mobilna faza uglavnom se koristi smjesa otapala poput toluena, etilacetata i mravlje kiseline u različitim omjerima. Detekcija odijeljenih sastojaka provodi se UV detektorom pri čemu analit apsorbira UV svjetlo pa gasi fluorescenciju ploče (254 nm) ili analit pokazuje fluorescenciju (356 nm).
Također, detekcija se može provesti reakcijom analita s reagensom; prskanje ploče sa 20 % -tnom otopinom $AlCl_3$ u metanolu. Na taj se način poboljšava fluorescencija CTN na način da se žuta boja flurescencije mijenja u plavu, ali intenzivniju.
Dobiveni kromatogram ispitivane tvari uvijek je potrebno usporediti sa kromatogramom poredbene tvari razvijenim pod istim uvjetima.
TLC se kao brza, jeftina i učinkovita metoda separacije značajno primjenjivala u mikotoksikologiji prije razvoja i široke primjene HPLC-a. Pojavom HPLC-a, primjena ove

metode analize je smanjena prvenstveno zbog niskog praga osjetljivosti TLC metode (10–50 ng/g).

Glavni problem detekcije CTN pomoću TLC metode je njegova slaba fluorescencija na silikagelu (stacionarna faza) te nestabilnost CTN. Minimalna koncentracija koja se može dokazati je 15–20 µg/kg. Zbog niske osjetljivosti, metoda je pogodna samo za kvalitativne analize (EFSA, 2012).

1.3.1.2.Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti; *HPLC (high-performance liquid chromatography)* je metoda odjeljivanja u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (veličina čestica 3-10 µm) noseći sastavnice uzorka.

Uspostavlja se ravnoteža između stacionarne i mobilne faze, a mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze. Odjeljivanje se može temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama.

U tekućinskoj kromatografiji moguće su različite stacionarne faze pa se tako razlikuju kromatografija normalnih i kromatografija obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza, stacionarna faza je polarna (nemodificirani silikagel), dok je mobilna faza sastavljena od nepolarnog otapala (ili smjese otapala). Kod kromatografije obrnutih faza ili reverzno-fazne kromatografije, stacionarna faza je nepolarna (oktadecilsilil, oktasilil silikagel), a mobilnu fazu čine polarna otapala.

Obzirom da mobilnu fazu najčešće čini smjesa otapala različite polarnosti, u kromatorafskom postupku može se primjenjivati izokratična ili gradijentna eluacija. Gradijentna eluacija podrazumijeva promjenu sastava mobilne faze tijekom analize, dok je kod izokratične eluacije sastav mobilne faze tijekom analize nepromijenjen. Za detekciju primjenjuju se Diode array UV detektor (DAD), fluorescencijski detektor, maseni detektor, elektrokemijski detektor te detektor indeksa loma (Watson, 2012).

Za analizu CTN uglavnom se primjenjuje kromatografija obrnutih faza sa fluorescencijskim detektorom.

HPLC- UV tehnika ; obrnuto fazna kromatografska tehnika gdje se kao mobilna faza koristi fosforna kiselina, a primjenjuje se za dokazivanje CTN u biološkim tekućinama u količini od 2-5 ng.

HPLC –FD (fluorescencijska) tehnika; metoda je mnogo osjetljivija od HPLC metode sa UV detekcijom (10 ng/g). Odjeljivanje CTN u nekoj smjesi pomoću ove metode ovisi o interakciji sa stacionarnom fazom, pH, kiselosti otapala u mobilnoj fazi, temperaturi kolone (EFSA, 2012).

1.3.2.Kromatografske tehnike spregnute sa masenom spektoskopijom

1.3.2.1. LC-MS tehnika; tekućinska kromatografija spregnuta sa masenim spektofotometrom

Metoda uključuje ekstarakciju analita, pipremu uzorka,obrnuto-faznu HPLC separaciju te detekciju masenim spekrofotometrom.

Za masenu spektofotometriju primjenjuje se elektosprej ionizacija te ˝ion-trap ˝ analizator masa. Granica određivanja (LOQ) analita ovom metodom iznosi 200 ng.

1.3.2.2. GC-MS tehnika; plinska kromatografija spregnuta sa masenim spektofotometrom

Metoda zahtjeva uzorak koji je hlapljiv i termostabilan. Plinovita mobilna faza pod tlakom prolazi kroz grijanu kolonu prevučenu tekućom stacionarnom fazom, a odjeljivanje se temelji na razdiobi između mobilne i stacionarne faze.

CTN u *Monascus* vrsti je moguće kvalitativno i kvantitaivno odrediti ovom metodom plinske kromatograije sa masenom spektroskopijom koja uključuje ionski nadzor (*gas-chromatography-selected ion monitoring (SIM) mass spectrometry)*. LOQ citrinina ovom tehnikom iznosi 1 ppm.

1.3.3. Imunokemijske metode analize

Jednostavnije su metode jer nije potrebna posebna priprema uzorka, veliki volumeni otapala za čišćenje kao kod kromatografskih metoda gdje također treba obraćati pažnju na nestabilnost CTN, gubitak za vrijeme pripreme uzorka, a prinos i osjetljivost su relativno niski.

Ove metode se, obzirom da su brze i jeftine, uglavnom koriste kao “screening-testovi” (testovi koji prethode glavnoj analizi); olakšavaju analitičaru da odluči kojom će se metodom koristiti u daljnjem radu. Imunokemijske tehnike razvijene su za brojne mikotoksine jer predstavljaju brzu alternativu kromatografskim tehnikama. Visoko su specifične obzirom da se temelje uglavnom na interakcijama antigena i antitijela.

No, ako nedostatak ovih metoda ističe se mogućnost da sa antitijelom reagiraju tvari koje su strukturno slične ispitivanom antigenu, tj. analitu pa se dobiveni pozitivan rezultat ovih

analiza dodatno provjerava drugim analitičkim tehnikama kao što je HPLC. Spomenuta reaktivnost strukturno sličnih tvari za citrinin nije od velikog značaja.

U analizi CTN primjenjuju se imunoenzimatske metode (*ELISA; Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).* Radi se o imunokemijskoj metodi s obilježenim antigenom ili antitijelom, a uglavnom se provodi za utvrđivanje prisutnosti CTN u pšenici, grahu, kukuruzu, plijesni crvene riže (RMR; *red mould rice*) te drugim žitaricama. Raspon LOD (granice dokazivanja) kreće se od 2 do 15 000 µg/kg (EFSA, 2012).

Nedostatak ove metode je nedovoljna specifičnost i mogućnost cross-reakcija s konjugiranim metabolitima.

Za kvantitativno određivanje CTN u uzorcima riže razvijena je metoda sa imunoreaktorom u kojoj se sadržaj određuje amperometrijski.

Metoda je puno brža od kromatografskih metoda; rezulat analize je poznat za 2 do 45 minuta, koriste se mali volumeni reagensa, a LOD iznosi 0,1 µg/l (EFSA, 2012).

1.3.4. Kolorimetrijske tehnike analize

Kolorimetrijske tehnike se temelje na prirodnoj fluorescenciji CTN. Fluorescencijska spektrofotometrija je selektivna metoda za analizu fluorescentnih spojeva u prisutnosti velikog broja spojeva koji ne pokazuju fluorescenciju. Metoda se temelji na mjerenju emisije zračenja prilikom povratka molekule u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja. Molekula koja je pobuđena vidljivim (400-800 nm) ili ultravidljivim (UV) zračenjem (<400 nm) prelazi u energetski pobuđeno stanje u kojem ostaje vrlo kratko (10^{-8} s), a jedan od mehanizama kojim se vraća u osnovno energetsko stanje jest fluorescencija.

Da bi neka molekula pokazivala svojstvo fluorescencije mora imati visoko konjugirane dvostruko vezne strukture (aromatski prstenovi) i mora biti krute strukture.

CTN je konjugirana planarna molekula, tj. molekula koja posjeduje kromofore i ima svojstvo da pokazuje blagu fluorescenciju koja se može pojačati u kiselom mediju.

Polukvantitativno mjerenje fluorescencije je brz postupak koji se može koristiti za određivanje CTN u kukuruzu, ječmu, kikirikiju.

Metoda je brza i jeftina te služi analizu velikog broja uzorka.

Sa fluorescencijom CTN mogu inerferirati razna onečišćenja.

Također, LOD (granica dokazivanja analita) je vrlo visok (100-8000 µg/kg) pa ova metoda nema značajniju primjenu u analizi CTN.

1.4. Štetni učinci citrinina

1.4.1. Akutna toksičnost

Toksikokinetička ispitivanja CTN provedena su na animalnim modelima. CTN se izlučuje iz organizma pretežito renalnom ekskrecijom, a to je potvrđeno u istraživanju sa radioaktivno obilježenim CTN kojeg su proveli Reddy i sur. (1982). U toj studiji je ^{14}C radioaktivni CTN subkutano primijenjen na trudne štakorice u dozi od 35 mg/kg tjelesne težine na 12. dan gestacije (EFSA, 2012).

Tijekom prvih 24 sata primjene, u urinu je izmjereno 74 % radioaktivnosti (koja potječe od obilježenog citrinina), a 1,7 % kroz 48 sati. Sándor i sur. (1991) su opisali subakutnu toksičnost OTA i CTN u svinja. Studija je rađena tako da je grupama od 3 životinje davan OTA, CTN ili oba toksina i uspoređivalo se sa grupom od pet kontrolnih životinja. CTN je primjenjivan u dozi od 0,02 mg/kg tjelesne težine jednom dnevno kroz 8 tjedana. Značajno manje koncentracije CTN izmjerene su u životinja koje su primale smjesu CTN i OTA pa su autori zaključili da se CTN eliminira puno brže nego OTA (EFSA, 2012).

Akutna subkutana primjena CTN u dozama od 50,75 i 100 mg/kg tjelesne težine je letalna za zamorce, a kao znak morbiditeta navedena je dispneja. Zabilježeni su znakovi renalne tubularne nekroze, akutnog miokarditisa i nekroze želučane mukoze. Pri višim subkutanim dozama od 50-75 mg/kg tjelesne težine primjenjivane kroz 14 dana, CTN može uzrokovati značajne lezije na bubrezima. No, nijedna od pet životinja na koje je primijenjen CTN u dozi 25 mg/kg tjelesne težine nije uginula. Primijenjen na oko (kao 2% vodena otopina), uzrokuje konjuktivalnu iritaciju. LD_{50} za akutnu subkutanu primjenu za zečeve iznosi 20 mg/kg tjelesne težine, a ističu se povećana lakrimacija i salivacija te blage histopatološke promjene na bubrezima (EFSA, 2012).

Phillips i Hayes (1978) su proučavali promjene na tkivu jetre miševa nakon jedne intraperitonealne doze CTN (35 mg/kg tjelesne težine) te su uočili oštećenje parenhima i lobularnih zona, smanjenje razine glikogena te povećanu aktivnost mitoze u parenhimu.

Kod štakora kojima je intraperitinealno primjenjena jedna doza CTN (50 mg/kg tjelesne težine) unutar 3 sata javila se glukozurija i hematurija, a unutar 48 sata znakovi nefroze. Intravenska primjena CTN (5 mg) psu mješancu pod utjecajem anestezije dovela je do kratkotrajnog smanjenja krvnog tlaka.

Doza CTN veća od 100 mg/kg tjelesne težine, primjenjena oralno miševima ili zečevima, uzrokuje uginuće. Prema spomenutim provedenim istraživanjima, akutna letalna toksičnost

CTN kreće se u rasponu od 19 do 134 mg/kg tjelesne težine ovisno o životinjskoj vrsti te načinu primjene CTN (EFSA, 2012).

1.4.2. Subkronična toksičnost

Lee i sur. (2010) proveli su istraživanje s ciljem da se uspostavi sigurna koncentracija CTN za dodatke prehrani koji sadrže crvenu rižu (RMR; *red mould rice*).

Istraživanje je kroz 90 dana provedeno na mužjacima Wistar štakora koji su dobivali crvenu rižu fermentiranu uz mutantnu vrstu *Monascus ruber* koja proizvodi CTN.

Ti pripravci RMR su sadržavali različite koncentracije CTN (1, 2, 10, 20 i 200 mg/kg) i lovastatina.

Uz to, dvije skupine štakora su uzimale nefermentiranu rižu kojoj je CTN dodan u različitim količinama (2 i 200 mg/kg), a jedna grupa je uzimala nefermentiranu rižu bez dodanog CTN. Paramentri koji su se kod životinja promatrali su povećanje tjelesne mase, dnevni unos hrane, masa te biokemijska i histopatološka stanja bubrega i jetre.

Prema dobivenim rezultatima, čak i najviša primjenjivana doza ne uzrokuje značajnu toksičnost pa je zaključeno da preparati crvene riže koji sadrže CTN do 200 mg/kg pripravka nisu nefrotoksični.

Zaključno, rezultati 90-o dnevne studije pokazuju da citrinin u dozi od 20 µg/kg tjelesne težine dnevno može biti smatran kao NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) za štakore (EFSA, 2012).

1.4.3. Nefrotoksičnost

Arai i Hibino (1983) proveli su studiju o utjecaju CTN na bubrege štakora. Muške štakore stare 6 tjedana podijelili su u dvije grupe. Jednu grupu činilo je 50 štakora kojima je u hranu umiješan CTN (0,1% w/w), a drugu, kontrolnu skupinu činila su 22 štakora koja nisu dobivala CTN. Eksperiment su provodili kroz 80 tjedana. Nakon 32, 40,60 i 80 tjedana napravljena je histopatološka i strukturna analiza. Uočeno je da je tijekom eksperimenta smanjena tjelesna težina životinje, povećala se težina bubrega i jetre u odnosu na ukupnu tjelesnu težinu.

Uočena je dilatacija proksimalnih bubrežnih tubula, hiperplazija tubula kao i upalne promjene.

Nakon 40 tjedana kontinuirane primjene CTN kod svih je životinja uočena pojava hiperplazije tubularnog epitela kao i pojava malih adenoma (EFSA, 2012).

1.4.4. Reproduktivna toksičnost

Prema istraživanju koje su proveli Hood i sur. (1976), CTN se pokazao toksičnim za embrije i fetuse štakora. Kod štakorica koje su jednokratko primile dozu CTN od 35 mg/kg tjelesne težine u periodu od 3. do 15. dana gestacije nisu uočene skeletne promjene ploda, no uočeno je proširenje bubrega, hidrocefalus kao i rascjep nepca ploda. Istraživanja na mišjim stanicama embrija koje su proveli Chan i Shiao (2007) pokazala su da CTN uzrokuje apoptozu i značajno smanjuje implementaciju oplođenog jajšca u maternicu. Qingqing i sur. su proveli istraživanje (2010) o utjecaju CTN na reproduktivne organe miševa. Odrasli miševi su kroz 7 dana primali različite doze CTN intraperitonealno, a eksperimentom je dokazano da CTN uzrokuje značajno povećanje mase testisa, epididimisa i sjemene vrećice. Također, količina sjemene tekućine je smanjena, a povećan je broj nenormalnih spermatozoida, dok je razina testosterona je smanjena (EFSA,2012).

1.4.5. Toksičnost za ljude

U hrani za ljude i životinje CTN često dolazi i u kombinaciji sa drugim mikotoksinom; okratoksinom A (OTA). Međusobno djeluju aditivno te se smatra da su oba mikotoksina povezana sa nastankom bubrežne bolesti u ljudi nazvane balkanska endemska nefropatija ili endemska nefropatija. Endemsko područje je Bugarska. Na tom području su zabilježene puno veće koncentracije CTN u kukuruzu i grahu. Osim Bugarske, EN je zabilježena i na području Hrvatske (okolica Slavonskog Broda), Srbije, Bosne i Hercegovine te Rumunjske (Đukanović i Radovanović, 2003). Bolest napreduje sporo; kroz 10 do 20 godina,uglavnom završava letalno, a na tom području je zabilježena kod 0,5 do 4,4 % stanovništva (Čeović i sur., 1992).
Glavne karakteristike endemske nefropatije su ograničena geografska područja gdje je zastupljena poljoprivredna proizvodnja, visoka smrtnost zbog uremije i visoka učestalost tumora urinarnog trakta.
Endemska (balkanska) nefropatija je kronična tubulo-intesticijska bolest nepoznate etiologije. Za bolest su karakteristični fibroza renalnog korteksa, nekroza tubularnog epitela i tumori silaznog urinarnog trakta (uretra i zdjelica).

Mikotoksini se smatraju jednim od uzroka bolesti. Ta je teorija temeljena na analogiji između lezija na bubrezima svinja uzrokovanih OTA u skandinavskim zemljama i lezijama na ljudskim stanicama bubrega osoba oboljelih od endemske nefropatije. Iako se kod pacijenata sa kroničnim bubrežnim bolestima diljem svijeta u krvi kao i u hrani koju konzumiraju mogu pronaći niske koncentracije OTA, smatra se da su pacijenti na endemičnom području izloženi

količinama OTA koje često znatno nadilaze količine OTA u hrani na ne-endemičnom području. OTA se vrlo dugo zadržava u organizmu; vrijeme poluživota u plazmi nakon jednokratne oralne doze iznosi 35 dana. U endemičnom području hrana nije kontaminirana samo OTA već i drugim mikotoksinima. Klimatski uvjeti pogodni su za razvoj citrinina i fumonizina B_1 koji su karakterizirani kao nefrotoksični i potencijalni kancerogeni za ljude (Peraica i sur., 2008).

Također, kao mogući uzroci ove bolesti spominju se i drugi okolišni faktori kao što su teški metali i minerali, bakterije (β-hemolitički streptokok, E. coli, Leptospira), virusi, organske kompnente iz ugljena *Pliocene lignites* te aristolična kiselina (Pepeljnjak i Šegvić-Klarić, 2010).

Smatra se da organski toksini iz *Pliocene lignites* zagađuju vodu na endemičnim područjima i da su stanovnici dugoročno izloženi tim toksinima.

Aristolična kiselina (aristolochic acid) je derivat nitrofenantrena, a može se pronaći u stabljici i sjemenkama *Aristolochia* vrste koje rastu na područjima uz rijeke (poplavljenim podučjima) pa tako i uz Dunav koji teče endemičnim područjem. Obzirom da su to područja plodnih ravnica na kojima se uzgaja pšenica i druge žitarice, sjemenke ove biljke mogu se prilikom žetve pomiješati sa pšenicom i kasnije se naći u kruhu (Stefanović i sur., 2015).



Slika 4. Prikaz područja zastupljenosti balkanske endemske nefropatije (Maharaj, 2014)

1.5. Mehanizam toksičnog djelovanja citrinina

Mehanizam toksičnosti nije u potpunosti razjašnjen, no *in vitro* studijama prikazano je nekoliko mogućih rješenja; oksidativno oštećenje DNA, inhibicija sinteze proteina, oksidativni stres, oštećenje mitohondrija, poremećaj u procesu mitoze, aktivacija specifičnih signalnih puteva (MAPK), poremećaj homeostaze kalcija (EFSA,2012).
CTN utječe na permeabilnost mitohondrija, protok kalcija, otpuštanje citokroma c sa mitohondrija te na inhibiciju sinteze makromolekula što dovodi do stanične smrti (Da Lozo i sur.,1998; Chagas i sur.,1992; Yu i sur.,2006).
CTN potiče, inducira kromosomske aberacije u V79-E stanicama i mišjoj koštanoj srži, dok ne pokazuje mutagenost u Amesovom testu (Bouslimi i sur.,2008; Thust i Kneist, 1979; Würgler i sur.,1991).
Ispitivanje mehanizma toksičnog učinka CTN provedeno je na stanicama bubrega mladih hrčaka. Uočeno je da su stanice bubrega koje su inače izdužene i spljoštene, postale okrugle i otečene te da CTN u koncentracijama 0.1, 0.5 i 1.0 mM nakon 10 sati uzrokuje značajne promjene na mitohondrijima te staničnu smrt (Chagas i sur., 1994).

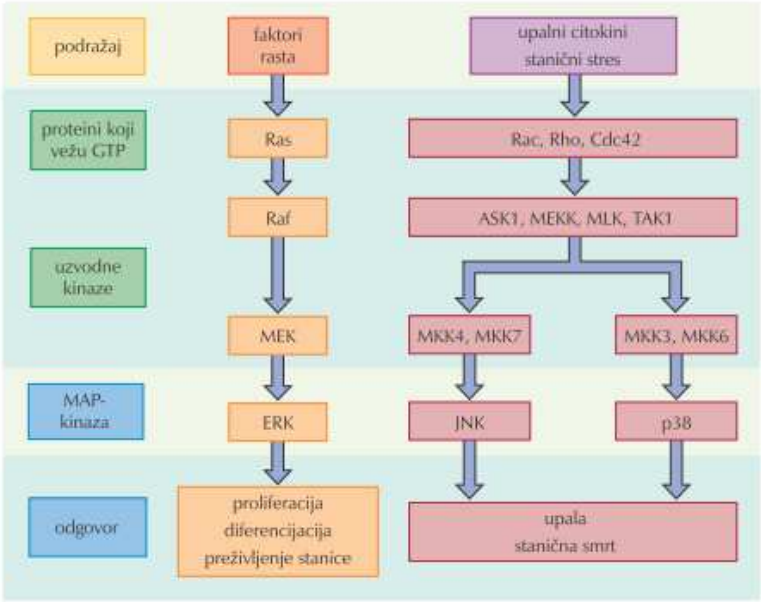
U istraživanju provedenom na epitelnim stanicama bubrega svinje (PK15) praćena je povezanost utjecaja kalcija na apoptozu i nekrozu uzrokovanu OTA (6 i 10 µM) i CTN (30 i 50 µM) samostalno ili u kombinaciji. Kad su primijenjeni zajedno, pokazan je aditivan citotoksični učinak. OTA i CTN ovisno o dozi, uzrokuju povećanje citosolne razine kalcija, ali njihova zajednička primjena ne dovodi do dodatnog povećanja razine kalcija.
Zastupljenost apoptoze i nekroze je veća nakon 24 h od primjene nego nakon 12 h od primjene. Istovremena izloženost stanica kelatoru kalcija BAPTA-AM značajno reducira CTN te CTN i OTA induciranu apoptozu. Poremećaj homeostaze kalcija uzrokovane CTN i OTA igra značajnu ulogu u procesu propadanja stanica, genotoksičnosti i smrti stanice.
Poznato je da porast kalcija u citoplazmi dovodi do povećanog ulaska kalcija u mitohondrije što onda izaziva otpuštanje citokroma c i indukciju apoptoze.

Izloženost ovim mikotoksinima preko kontaminirane hrane, povećava učestalost apoptoze i vodi ka nastajanju stanica otpornih na apoptozu koje se mogu transformirati u tumorske stanice (Šegvić Klarić i sur., 2012).

Kao moguć osnovni mehanizam individualnog ili kombiniranog toksičnog djelovanja CTN i OTA je oksidacijski stres. Ispitivanja su također provedena na PK15 stanicama.

Samostalno primijenjen CTN povećava razinu i oksidiranog (GSSG) i reduciranog (GSG) glutationa (najznačajnijeg antioksidansa u organizmu) nakon 24 sata od primjene.
Omjer GSH/GSSG je smanjen u većini jednostrukih ili dvostrukih izlaganja mikotoksinima što ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa. Osim na glutation, pokazalo se da CTN i OTA imaju učinak i na proteine toplinskog stresa, tj, Hsp proteine (*heat shock proteins*) koji imaju ulogu u pravilnom namatanju proteina i održavanju stabilnosti proteinske konformacije. Samostalno primijenjen OTA izaziva značajno smanjenje ekspresije Hsp70 i Hsp27 dok CTN stimulira ekspresiju Hsp proteina.
Kad se OTA i CTN primjenjuju u kombinaciji, raste ekspresija Hsp proteina i to puno značajnije nego samo primjenom CTN.
Izloženost CTN i OTA značajno smanjuje koncentraciju ukupnih tiola u stanici.
Značajne promjene u redoks statusu stanice (glutation, tioli) i protektivnim mehanizmina (Hsp proteini) ukazuju na moguće mehanizme toksičnog djelovanja CTN i OTA
(Šegvić Klarić i sur., 2014).

Kao mogući mehanizam toksičnog učinka, razmatran je ujecaj mikotoksina (OTA i CTN) na signalne puteve u stanici, tj. na aktivaciju mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPKs).
Signalni put MAP-kinaze je kaskada evolucijski očuvanih protein-kinaza koje imaju ključnu ulogu u prijenosu signala u svim eukariotskim stanicama. U tu skupinu ubrajaju se ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) , JNK (*c-jun N-terminal kinase*) i p38 kinaza.
ERK se aktivira u odgovoru na čimbenike rasta i diferencijacije dok se JNKs i p38 aktiviraju kao odgovor na upalne citokine i stanični stres. Iako ERKs, JNKs i p38 mogu djelovati štetno i protektivno, u većini slučajeva ERKs su povezane sa staničnim preživljavanjem dok su JNKs i p38 povezane sa apoptozom i mogu biti aktivirane oksidativnim stresom.



Slika 5. Putevi aktivacije MAP kinaze u stanicama sisavaca
(Cooper, 2010)

Na PK15 stanicama ispitivana je aktivacija i ekspresija mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPKs) Western blot analizom.

Obzirom na to jesu li stanice bile tretirane samo jednim mikotoksinom ili oba mikotoksina (CTN i OTA), kinaze su različito aktivirane. Samostalna primjena CTN ili OTA stimulira prolaznu ERK i odgađa JNK aktivaciju. MAP kinaze se aktiviraju samo kada su oba specifična treoninska (Thr) i tirozinska (Tyr) ostatka u strukturi kinaze fosforiliana. U prisutnosti mikotoksina, poremećena je ravnoteža između fosforilacijskih kinaza i defosforilacijskih fosfataza.

Kad su mikotoksini primjenjeni zajedno dovode do značajnog smanjenja ERK aktivacije.

Primjenom specifičnih inhibitora MAP kinaza pri istovremenom izlaganju stanica mikotoksinima, vidljiv je porast staničnog preživljavanja.

Istraživanja su pokazala da CTN može aktivirati JNK i tako dovesti do apoptotične smrti stanice (Rumora i sur., 2014).

Dodatno, antioksidansom resveratrolom inhibirana citrininom inducirana JNK aktivnost i potisnut gubitak potencijala mitohondrijske membrane (*MTT; mitochondrial membrane potential*), ukazuju na povezanost oksidativnog stresa i citrininom inducirane apoptoze (Chen i Chan, 2009).

1.6. Crvena riža

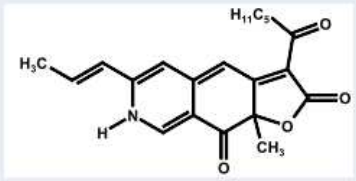
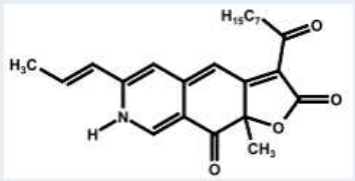
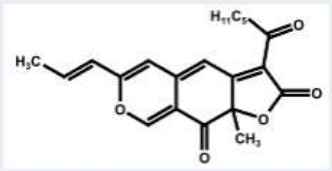
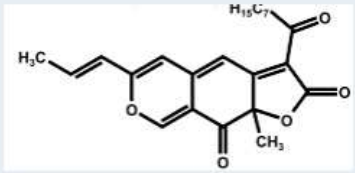
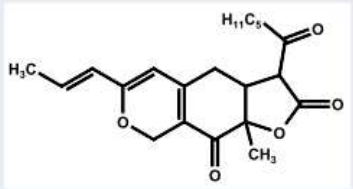
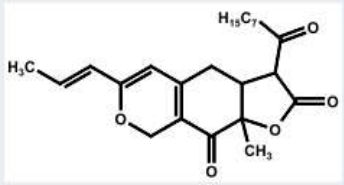
Crvena riža je fermentacijski produkt obične riže (*Oryza sativa*) i gljivice iz roda *Monascus* koja raste na riži.
Fermentacijom riže uz pomoć *Monascus* vrste (*M. ruber, M. purpureus, M. pilosus, M.floridanus*) nastaje crveni pigment, a također i potencijalno farmakološki aktivne tj. toksične sastavnice kao što su monakolini, monankarini, ankalaktoni i citrinin.

Vrsta *Monascus purpureus* i produkti fermentacije se u istočnim zemljama koriste kao bojila za hranu, pojačivači okusa (arome), konzervansi za meso i vino te u narodnoj medicini za probleme probave i cirkulacije krvi.
Danas je značajna njihova primjena u dodacima prehrani zbog svoje sposobnosti smanjenja razine kolesterola u krvi, regulacije krvnog tlaka i antioksidativnih sposobnosti.



Slika 6. Ilustracija crvene riže
(preuzeto sa https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/red-yeast-rice)

Ovisno o procesu fermentacije, glavni sastojci crvene riže su ugljikohidrati (25-73%), proteini (14-31%), voda (2-7%) i masne kiseline (1-5%). Tijekom fermentacije mogu nastati i brojni sekundarni produkti metabolizma; različiti pigmenti, farmakološki aktivne tvari kao što su monakolin (inhibitor HMG—CoA reduktaze), monakarin (inhibitor monoamin oksidaze), mikotoksin citrinin i druge uglavnom neobojene tvari.
Pigmenti koji nastaju fermentacijom *Monascus* vrste mogu se naći i vezani na proteine, peptide ili aminokiseline. Fermentacijom također nastaju i druge tvari kao što su steroli (beta-sitosterol, kampesterol, stigmasterol, sapogenin), izoflavonoidi i mononezasićene masne kiseline.

Crveni pigment	Rubropunktamin ($C_{21}H_{23}NO_4$) 	Monaskorubramin($C_{23}H_{27}NO_3$) 
Narančasto-crveni pigment	Rubropunktatin($C_{21}H_{22}O_5$) 	Monaskorubrin ($C_{23}H_{26}O_5$) 
Žuti pigment	Monascin – monaskoflavin ($C_{21}H_{26}O_5$) 	Ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) 

Slika 7. Osnovni pigmenti *Monascus purpureus*

(SKLM, 2013)

Sadržaj pigmenata u crvenoj riži ovisi o uvjetima u kojima se kultura vrste *Monascus* nalazi kao što su vlažnost, pH okoline, prisutnosti hranjivih tvari, zasićenosti okoline kisikom.

Kao aktivna tvar u preparatima crvene riže je monakolin K koji je po svojim svojstvima identičan lovastatinu (registriranom lijeku). Statini reguliraju, tj.smanjuju razinu kolestrola inhibirajući djelovanje hidroksimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze. Istraživanjima je dokazano da monakolin K (lovastatin) iz crvene riže pozitivno utječe na smanjenje LDL kolesterola u dozi od 10 mg dnevno.

1.6.1. Farmakološki učinak crvene riže

Učinak crvene riže je proučavan kroz nekoliko kliničkih studija sa različitim komercijalnim pripravcima crvene riže. Dnevna doza crvene riže primjenjivane u ovim studijama kretala se u rasponu od 1,2 do 4,8 g crvene riže što odgovara rasponu monakolina K od 7,2 mg do 12,8 mg. Zabilježeno je smanjenje LDL kolesterola do 30% kao i smanjenje ukupnog kolesterola do 23%. U jednoj studiji je zabilježeno da crvena riža primijenjena dva puta dnevno u dozi od 2,4 g (2 x 2400 mg dnevno) ima učinak jednak pravastatinu primijenjenom 2 puta dnevno u dozi od 20 mg (2 x 20 mg dnevno). Dodatno, dokazano je da smanjuje mortalitet kod pacijenata sa koronarnom srčanom bolesti kao i kod pacijenata sa preboljenim infarktom miokarda (SKLM, 2013).

Primjena crvene riže, tj. monakolina K zajedno sa sokom grejpa ili nekim drugim lijekovima može dovesti do značajnih interakcija sa štetnim posljedicama na zdravlje pacijenta.

Poznato je da se monakolin K (lovastatin) metabolizira putem jetrenog CYP 3A4 enzima, a sok grejpa djeluje kao inhibitor istog enzima.

Kao posljedica takve inhibicije, monakolon K ne pokazuje svoj terapijski učinak budući da se ne može prevesti u aktivnu formu, a dodatno se nakuplja u organizmu što dovodi do mialgije, miopatije, a posljedično i do rabdomiolize.

Miopatija se očituje kao mišićna bol ili slabost mišića, a povezana je sa znatnim porastom kreatin kinaze .

Rabdomioliza je rijetka, a može biti praćena akutnom bubrežnom insuficijencijom zbog mioglobinurije.

Neki od lijekova koji mogu stupati u interakcije sa monakolinom K su fibrati, niacin, amiodaron, cikolosporini, verapamil, itrakonazol, ketokonazol, makrolidni antibiotici (eritromicin, azitromicin), inhibitori HIV proteaze i drugi.

Zabilježene su i neke alergijske reakcije koje su se javile nakon kontakta sa crvenom rižom, uglavnom prilikom proizvodnje vegeterijanskih kobasica gdje crvena ruža služi kao konzervans, bojilo ili pojačivač okusa.

Do izloženosti je došlo preko respiratornog sustava i preko kože, a zabilježeni su slučajevi rinitisa, konjuktivitisa, astme te kožnih ekcema.

Iako monakolin K (lovastatin) iz crvene riže oponaša djelovanje statina registriranih kao lijekovi za liječenje dislipidemije, ne može se koristiti kao njihova zamjena jer još uvijek nema dovoljno podataka o dugoročnim učincima.

Zaključno, hipolipemički učinak crvene riže zasniva se na djelovanju monakolina kao i drugih prisutnih spojeva kao što su steroli i izoflavonoidi.
Prema kliničkim studijama, 10 mg monakolina prisutnih u dnevnoj dozi crvene fermentirane riže koja iznosi 2,4 g ima isti učinak kao i lovastatin u dozi od 10 do 40 mg.
Kao dodatak prehrani, namjenjena je pacijentima kod kojih je prisutan blagi poremećaj lipida u krvi kojima još nije potrebna terapija lijekovima (ciljane vrijednosti pokušavaju se postići reduciranom prehranom i fizičkom aktivnošću).
Također, namijenjena je pacijentima kod kojih postoji intolerancija na statine (Mornar i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Crvena riža je od davnina poznata kao sastavni dio azijske kuhinje jer se koristila kao bojilo hrane, začin, konzervans za meso i ribu, a svoje mjesto ima i u tradicionalnoj kineskoj medicini.

Posljednjih desetljeća na Zapadu je prepoznata i koristi se kao dodatak prehrani koji ima učinak na smanjenje povišenog udjela kolesterola u krvi.

Crvena riža nastaje kao produkt fermentacije obične (bijele) riže uz gljivice Monascus vrste.

Fermentacijom nastaju spojevi (monakolini) koji imaju terapijski učinak, a ovisno o uvjetima u kojima se postupak fermantacije odvija te o vrsti gljivice može nastati i neželjeni produkt - citrinin.

Citrinin je mikotoksin sa dokazanim nefrotoksičnim i hepatotoksičim učinkom i stoga predstavlja onečišćenje u dodacima prehrani sa crvenom rižom.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pregledati dostupnu literaturu, tj. znanstvene radove u kojima je istraživana zastupljenost citrinina u komercijalno dostupnim dodacima prehrane sa crvenom rižom te raspraviti mogući štetni učinak primjene takvih pripravaka na zdravlje ljudi ukoliko koncentacija citrinina nije unutar dozvoljenih granica.

3. MATERIJALI I METODE

U izradi ovog teorijskog diplomskog rada korišteni su različiti preglednici znanstvene literature kao što su baze podataka – PubMed, ScienceDirect, EBSCO, udžbenici Mikotoksikoze i Pharmaceutical analysis te Farmakopeja i Farmakoterapijski priručnik, zatim mrežne stranice sa srodnom tematikom, te pravilnici objavljeni u službenim glasilima. Više od 90% ovog diplomskog rada bazirano je na radovima objavljenim u znanstvenim časopisima. Metode rada bile su uglavnom pretraživanje uz pomoć ključnih riječi vezanih za određeno potpoglavlje diplomskog rada.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Značajna su istraživanja u posljednje vrijeme usmjerena na prisutnost CTN u kolorantima hrane koji se tradicionalno koriste i proizvode u Aziji fermentacijom riže uz pomoć *Monascus* gljivica, poznatiji kao RMR (*red mould rice*), a koriste se i sinonimi poput red yeast rice, red fermented rice, anka ili angkak, Beni-koji, Hong Qu, Hung-chu.

Crvena riža je dodatak prehrani koji se koristi kao alternativna terapija za hiperlipidemiju. Sadrži 14 aktivnih komponenata (monakolina) koji sprječavaju sintezu kolesterola u jetri. Zanimanje pacijenata za takve preparate zadnjih je godina u značajnom porastu. U SAD-u je u razdoblju od 2005. do 2008. godine zabilježen porast upotrebe za oko 80% (Childress i sur., 2012). Preparat se smatra učinkovitim i sigurnim jer su nuspojave (mijalgije) i interakcije s drugim lijekova ili hranom znatno manje nego kod primjene sintetskih statina. No, ovi preparati registrirani su kao dodaci prehrani i kao takvi ne podliježu strogim ispitivanjima kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti kojima moraju biti podvrgnuti lijekovi na recept i bez recepta (OTC; *over the counter*).

Poznato je da tijekom procesa proizvodnje, sirovina crvene riže može biti onečišćena mikotoksinom citrininom pa postoji vjerojatnost da neki dodaci prehrani sadrže ovaj mikotoksin.

U ovom diplomskom radu pretraživani su znanstveni radovi čiji su autori ispitivali prisutnost citrinina u komercijalno dostupnim dodacima prehrani prisutnim na tržištu.

Radovi se uglavnom odnose na područje SAD-a i Kine.

Prije pregleda znanstvenih radova, navedena je zakonska regulativa za preparate sa crvenom rižom prema kojima su komentirani rezultati navedenih istraživanja.

4.1. Zakonska regulativa

Preparati crvene riže na tržištu su regulirani kao dodaci prehrani.

Komisija Europske unije (EC) je 6. ožujka 2014. donijela regulativu (No 212/2014) kojom se određuje najviša dopuštena količina CTN u dodacima prehrani koji sadrže crvenu rižu dobivenu procesom fermentacije uz plijesan *Monascus purpureus*. Prema toj regulativi maksimalna dopuštena količina CTN u dodacima prehrani temeljenim na crvenoj riži iznosi 2000 µg/kg (2 mg/kg) preparata. Istraživanjima na životinja je utvrđena NOAEL vrijednost za CTN 20 µg/kg tjelesne težine dnevno (EFSA, 2012) pa je prema tome Znanstveni odbor za

kontaminante u prehrambenom lancu (CONTAM; *Panel on Contaminants in the Food Chain*) pri Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA; *European Food Safety Authority*) odredila razinu do koje se CTN ne smatra nefrotoksičnim za ljude. Uzimajući u obzir odgovarajući faktor nesigurnosti u visini od 100 i NOAEL vrijednost, taj limit iznosi 0,2 µg/kg tjelesne težine dnevno. Maksimalna dopuštena količina CTN u preparatima sa crvenom rižom koja iznosi 2 mg/kg preparata, određena je kako bi se osiguralo da moguće izlaganje CTN na taj način bude ispod praga nefrotoksičnosti.
U Kini je dozvoljena granica CTN u prehrambenim proizvodima sa crvenom rižom čak 40 puta manja; 50 µg/kg preparata (Li i sur., 2012).

4.2. Prisutnost citrinina u dodacima prehrani

U istraživanju koje su proveli Gordon i sur. (2010) ispitivano je 12 komercijalno dostupnih dodataka prehrani koji sadrže prah crvene riže. Preparati su kupljeni u ljekarni ili u web prodavonicama. Istraživanjem se željela utvrditi prisutna količina monakolina u pripravku kao i moguća prisutnost CTN. U svakoj ispitivanoj formulaciji, sadržaj praha crvene riže (aktivne tvari) deklariran je na 600 mg po kapsuli. Istraživanja su provedena od kolovoza 2006. do lipnja 2008. godine u New Yorku u neovisnom laboratoriju (ConsumerLab), a kao metoda analize korištena je reverzno-fazna HPLC metoda sa masenospektroskopskom (MS) detekcijom (HPLC-MS/MS) . U 4 proizvoda zabilježena je prisutnost CTN. Tijekom izvođenja analiza, proizvodi su obilježeni šiframa (slovima) pa je tako u proizvodu F pronađen povećani udio CTN; 189 µg po kapsuli. Četiri od ukupno 12 ispitivanih proizvoda kontaminirano je CTN u kapsuli. Na svakom od ispitivanih preparata navedena je preporučena dnevna doza; 600 mg dva puta dnevno. Prema navedenom, izračunat je očekivani dnevni unos CTN prisutnog kao onečišćenje (rezultati su prikazani u Tablici 2.).
Dakle, istraživanje je pokazalo da je CTN prisutan u jednoj trećini ispitivanih proizvoda (Gordon i sur., 2010). Prema ovom ispitivanju je vidljivo da u jednoj trećini ispitivanih uzoraka kod kojih je CTN pronađen, postoji velika razlika u njegovoj koncentraciji. Također, ako se u obzir uzme odredba Europske komisije prema kojoj preparati ne smiju sadržavati više od 2 ppm CTN, ovi preparati mogu se smatrati potencijalno opasnim za zdravlje.
Ako se promatra preparat F, kod kojeg je pronađena najveća koncentracija CTN, dnevnom dozom se u organizam unese 228,3 µg CTN. Tako bi odrasla osoba od 70 kg dnevno unijela 3,26 µg/ kg CTN što značajno prelazi prag nefrotoksičnosti za ljude (0,2 µg/kg tjelesne težine).

Tablica 2. Sadržaj CTN u ispitivanim preparatima i pretpostavljeni dnevni unos (prilagođeno iz reference Gordon i sur., 2010)

Kapsula crvene riže (600 mg)	Citrinin (ppm)	Citrinin (µg/kapsula)	Citrinin (µg/dnevno)
A	-	-	-
B	-	-	-
C	-	-	-
D	24	14,3	28,5
E	-	-	-
F	189	114,2	228,3
G	-	-	-
H	-	-	-
I	75,5	57,5	115,1
J	-	-	-
K	119	70,4	140,9
L	-	-	-

U istraživanju koje su proveli Heber i sur. (2001), devet različitih komercijalno dostupnih dodataka prehrani koji sadrže crvenu rižu su analizirani kako bi se odredio sadržaj monakolina i CTN. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogu li se rezultati kliničkih ispitivanja provedenih sa jednim (ili nekoliko) preparata crvene riže koji pokazuju povoljan učinak crvene riže na smanjivanje razine kolesterola, generalno primjenjivati za sve preparate sa crvenom rižom na tržištu. CTN je mjeren enzimskim-imunokemijskim metodama, a granica detekcije iznosila je 15 µg/g. Sedam od 9 ispitivanih uzoraka bilo je kontaminirano s CTN.

Tablica 3. Sadržaj CTN u ispitivanim kapsulama (prilagođeno iz reference Heber i sur., 2001)

Preparat sa crvenom rižom	Citrinin (µg/kapsula)
A	4,87
B	2,22
C	6,06
D	3,23
E	-
F	11,82
G	0,47
H	64,7
I	-

Autori ovog istraživanja zaključuju da se rezultati kliničkih ispitivanja ne mogu generalizirati obzirom da je dokazano da svaki preparat ne sadrži isti udio kao ni isti profil monakolina, a u više od 70% pripravaka prisutan je CTN čiji se udio značajno razlikuje od jednog do drugog preparata. Iako u ovom radu nije navedena masa pojedinačnih kapsula niti preporučena dnevna doza, za usporedbu možemo pretpostaviti da se dnevno uzimaju 2 kapsule.

Prema tome bi dva ispitivana preparata (F i H) prelazila prag nefrotoksičnosti (0,2 µg/kg tjelesne težine) ako pretpostavimo da je pacijent odrasla osoba od 70 kg.

U istraživanju koje su proveli Chen i Hu (2005) proučavani su različiti sojevi *Monascus* gljivica koji se koriste za dobivanje crvene riže, a uzorci su uzeti sa crvene riže komercijalno dostupne u Kini. Iako je crvena riža stoljećima u Aziji smatrana kao siguran lijek i prehrambena namirnica, spoznaje o mogućoj kontaminaciji nefrotoksičnim CTN bude sumnju u sigurnost primjene crvene riže. U Japanu je maksimalna dozvoljena koncentracija CTN u crvenoj riži 200 ng/g (0,2 mg/kg) dok u Europskoj uniji taj limit iznosi 2000 µg/kg (2 mg/kg).

Kako bi se izbjegla kontaminacija crvene riže CTN ili kako bi se koncentracije CTN održala niskim, potrebno je pronaći sojeve *Monascus* vrste koje ne proizvode CTN ili ga pak proizvode u vrlo malim količinama.

Stoga je ispitivan mutirani soj M12-69 koji pod definiranim uvjetima fermentacije proizvodi 0,13 ng/g CTN čime je pokazano da je ovaj soj pogodan za fermentiranje riže jer proizvodi mali udio CTN, a velik udio monakolina (Chen i Hu, 2005).

Tablica 4. Udio CTN kojeg proizvodi određeni soj gljivice (prilagođeno iz reference Chen i Hu, 2005)

Soj *Monascus* gljivice	Citrinin (ng/g)
M01	>1000
M02	<40
M06	<40
M07	400
M08	>1000
M10	>1000
M12	<40
M15	360
M16	800
M17	540
M22	540
M24	40
M25	80
M29	>1000

U istraživanju kojeg su proveli Li i sur. (2010) ispitivano je 109 uzoraka koji su se 2008. i 2009. mogli komercijalno nabaviti u Kini. Uzorci su podijeljeni u 5 kategorija; crvena riža korištena kao začin (11 uzoraka), crvena riža korištena u medicinske svrhe (19 uzoraka), crvena riža korištena kao funkcionalna hrana i lijek (29 uzoraka), biljni pripravci korišteni u tradicionalnoj kineskoj medicini; korijen i podanak (46 uzoraka), gotovi (zaštićeni) proizvodi kineske medicine na bazi crvene riže (4 uzorka). Uzorci su analizirani imunoafinitetnom tehnikom te kvantificirani HPLC-FD metodom, a uzorci kod kojih je dokazan CTN dodatno su analizirani LC-MS metodom. CTN je dokazan u 31 uzorku (28%) u rasponu koncentracija od 16,6 do 5253 µg/kg.

U Kini je dozvoljena granica CTN u prehrambenim proizvodima sa crvenom rižom 50 µg/kg (Li i sur.,2010).

Tablica 5. Rezultati ispitivanja 109 uzoraka crvene riže (prilagođeno iz reference Li i sur., 2012)

Uzorak	Broj uzoraka	Udio	Konc . CTN (µg/kg)	Postotak (%)
RFA	11	8/11	127-4960	73
RMM	19	19/19	18,2-5253	100
RFMP	29	4/29	16,6-62,5	14
TCMP	46	0/46	-	-
TCPP	4	0/4	-	-
Ukupno	109	31/109	16,6-5253	28

RFA *(red yeast rice food additives*); crvena riža korištena kao začin
RMM (*red yeast rice medicinal materials*);crvena riža korištena u medicinske svrhe
RFMP (*red yeast rice functional food and medicine products*);crvena riža korištena kao funkcionalna hrana i lijek
TCMP (*traditional Chinese medicinal plants*);biljni materijali korišteni u tradicionalnoj kineskoj medicini
TCPP (*traditional Chinese medicine patent prescriptions*); gotovi proizvodi sa crvenom rižom u tradicionalnoj kineskoj medicini

Prema ovom istraživanju je vidljivo da su preparati prisutni na kineskom tržištu poprilično kontaminirani CTN. U nekim uzorcima je koncentracija CTN čak 100 puta veća od dozvoljene granice (50 µg/kg).
Iako CTN nije pronađen u preparatima korištenim u tradicionalnoj kineskoj medicini, veoma je zastupljen u prehrambenim proizvodima široke promjene i predstavlja rizik za zdravlje.

Američka agencija za hranu i lijekove, FDA (*Food and Drug Administration*) 2007. godine izdala je pravilnik u okviru dobre proizvođačke prakse za dodatke prehrani (*Current Good Manufacturing Practice*) prema kojem se od proizvođača dodataka prehrani zahtjeva da tijekom proizvodnog postupka osiguraju izvrsnost i sigurnost proizvoda.
Prema tome bi proizvođači dodataka prehrani koji sadrže crvenu rižu trebali osigurati da preparat nije onečišćen CTN. Spomenuti pravilnik proizvođačima je samo preporuka, no ne i zakonska obaveza. FDA ne provjerava niti posjeduje informacije o tome koliko proizvođača analizira sirovinu crvenu riže na prisustvo CTN. Na američkom tržištu dostupni su proizvodi

na kojima je navedeno da je proizvod analiziran i da CTN nije prisutan, a postoji i oni kod kojih nema takvih informacija (Childress i sur., 2013). Dodaci prehrane sa crvenom rižom prisutni na hrvatskom tržištu ne sadrže informacije o ispitivanju proizvoda na prisutnost CTN.



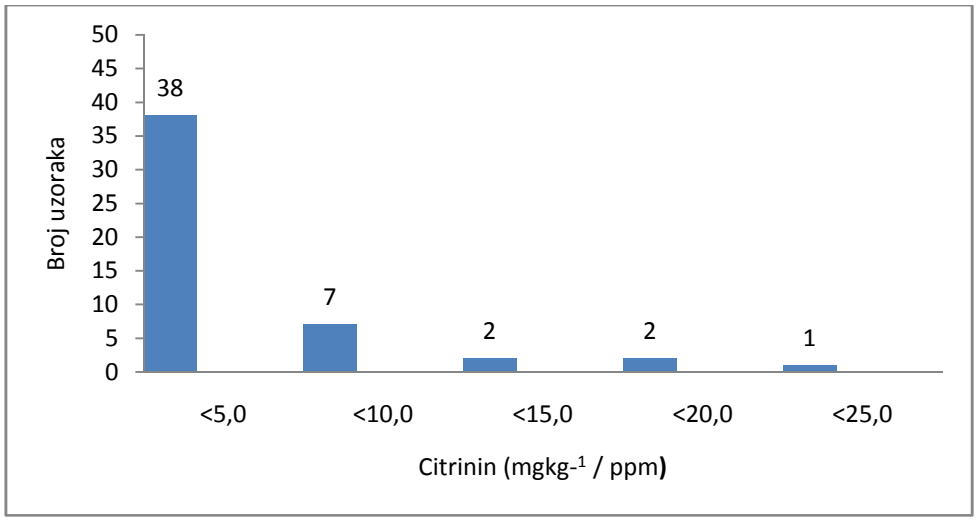
Slika 8. Preparati dostupni na američkom tržištu

Halbert i sur. (2008) proveli su kliničko ispitivanje kako bi usporedili učinak crvene riže i statina, a u pripravku koji su koristili CTN je bio prisutan u malim količinama. Kod pacijenata kod kojih je zabilježena mijalgija uzrokovana statinina tijekom primjene terapije, velika je vjerojatnost da će se simptomi vratiti kod zamjene statina za neki drugi, primjerice zamjene simvastatina za atorvastatin. Mnogi pacijenti sa intolerancijom na statine, skloni su alternativnoj terapiji i često se odlučuju za preparate crvene riže jer su istraživanja pokazala da pacijenti koji u anamnezi imaju SAM (*statin-associated myalgia*), podnose takve prepate bez povrata simptoma. U ovoj studiji uspoređivan je učinak preparata crvene riže i pravastatina na pojavu mijalgije kod pacijenata sa SAM. Ispitivanje je provedeno od siječnja do rujna 2008. godine u SAD-u (Philadelphia). 21 ispitivanik je dobivao crvenu rižu, a 22 ispitanika pravastatin (40 mg dnevno), a također su se tijekom 12 tjedana morali pridržavati smjernica o prehrani, životnim navikama, aktivnostima i slično. Svakodnevno su ispitanici bilježili osjećaju ju li bol u mišićima i u kojem rasponu (na skali od 0 do 10) ili je ne osjećaju.

Sudionici ispitivanja (21 osoba) su dnevno dobivali 4800 mg crvene riže dnevno; četiri kapsule od 600 mg dva puta dnevno.

Jedna kapsula sadržavala je 600 mg praha crvene riže. Kapsule su prethodno analizirane i utvrđeno je da je CTN prisutan u koncentraciji < 10 ppm (mg/kg ili µg/g). Ispitivanje je trajalo 12 tjedana. Iako CTN nije posebno ispitivan, ovo kliničko ispitivanje je zanimljivo za teoretsku procjenu rizika toksičnosti jer je analizom kapsula koje su korištene utvrđeno da je CTN prisutan u koncentraciji < 10 ppm (točna vrijednost nije poznata) (Halbert i sur., 2010). Obzirom da se dnevno uzima 8 kapsula od 600 mg (4800 mg), a da je u svakoj kapsuli zabilježana koncentracija CTN, tijekom dužeg vremena uzimanja pripravka, postoji vjerojatnost štetnog učinka na zdravlje. U Maleziji (2010) je napravljena analiza komercijalno dostupne crvene riže kako bi se utvrdila zastupljenost gljivica i mikotoksina u njima. 50 uzoraka je uzeto u analizu koja je pokazala da su u svih 50 uzoraka (100%) prisutne *Monascus* gljivice. Također, CTN je bio je zastupljen u svim uzorcima u rasponu koncentracija od 0.23 do 20.65 mg/kg što prelazi dozvoljene limite za CTN propisane u Maleziji i u Europi. Osim CTN, u svim uzorcima pronađen je OTA (0,23 - 2,48 µg/kg), a aflatoksin je pronađen u 92 % uzoraka (0,61-77,33 µg/kg).

CTN je pronađen u svih 50 uzoraka. U 38 uzoraka (76%) koncentracija CTN bila je unutar dozvoljenih 5 µg/kg (ppb), (Samsudin i Abdullah, 2013).



Graf 1. Zastupljenost CTN u ispitivanim uzorcima (prilagođeno iz reference Samsudin i Abdullah, 2013)

U svim uzorcima zabilježena je količina gljivica u rasponu od 1,4 x 10^4 do 2,1 x 10^6 CFU/g. koja nadilazi malezijskim propisima dopuštenu količinu od 5 x 10^2 CFU/g, a također i propisima ICMSF (*International Commission for Microbiological Specification of Foods*) prema kojima se dopuštena količina gljivica kreće u rasponu od 10^2 do 10^5. Na mjestima gdje su uzorci kupljeni, uvjeti čuvanja crvene riže su različiti; neki su posebno pakirani, neki su otvorenim spremnicima, skladište se u klimatiziranim ili neklimatiziranim prostorima i slično pa se može zaključiti da i uvjeti skladištenja proizvoda utječu na prisutnost gljivica u samom proizvodu. Prema nekim podacima, jedna osoba u Maleziji tjedno prosječno kupi između 0,2 i 0,5 kg crvene riže. Ako se pretpostavi da osoba konzumira 0,2 kg crvene riže, postoji vjerojatnost da će putem crvene riže u organizam unijeti 4 mg/kg CTN što je daleko iznad dozvoljenih granica. Na području Selangora živi oko 5,5 milijuna ljudi, a oko 28 % čine malezijski Kinezi koji vjeruju tradicionalnoj kineskoj medicini i svakodnevno koriste crvenu rižu u svojoj prehrani pa je važno da znaju kakve proizvode konzumiraju. Prema ovom istraživanju može se zaključiti da prisutnost velikog broja gljivica kao i mikotoksina u crvenoj riži predstavlja potencijalnu opasnost za zdravlje čovjeka te da je potrebna kontrola ovih onečišćenja u namirnicama za ljudsku prehranu (Samsudin i Abdullah, 2013). U Njemačkoj (2011) je provedeno ispitivanja preparata sa crvenom rižom koji su se mogli nabaviti u Internet trgovinama na njemačkom jeziku. Pronađeno je 5 proizvoda koji su sadržavali crvenu rižu u kapsulama. Korištena je NMR metoda sa granicom detekcije od 25 µg po kapsuli pa CTN nije zabilježen, tj. metoda nije bila dovoljno osjetljiva (Lachenmeier i sur., 2012).

4.3. Prisutnost citrinina u hrani

CTN se također može nalaziti u nekim namirnicama za ljudsku prehranu kao što su žitarice (kukuruz, pšenica), grah, kikiriki, sir ili vino, a često je prisutan zajedno s nekim drugim mikotoksinima, najčešće OTA. Oba mikotoksina prvenstveno su klasificirani kao nefrotoksični spojevi, a kad se primjenjuju zajedno djeluju sinergistički, a smatraju se uzročnicima balkanske nefropatije.

Prema IARC, OTA je svrstan u skupinu 2B (moguće kancerogeno djelovanje za ljude), dok je CTN svrstan u skupinu 3 kancerogenih tvari (dokazano kancerogeno djelovanje na životinjama, ali ne na ljudima).

Na PK15 stanicama koje su tretirane niskim koncentracijama OTA i CTN, uočen je sinergistički učinak na apoptozu te aditivni genotoksični učinak (Šegvić Klarić i sur., 2008).

Zastupljenost mikotoksina u hrani ovisi o geografskom položaju s kojeg ta hrana potječe budući da rast plijesni koje proizvode mikotoksine ovisi o klimatskim uvjetima. Tako je potencijalna opasnost za zdravlje veća u područjima gdje je veća zastupljenost pojedinih mikotoksina.

U Bugarskoj (1999) je analizom uzoraka žitarica utvrđena kontaminacija CTN i OTA, a OTA je bio više zastupljen. Povećana izloženost ovim mikotoksinima putem hrane zabilježena je i na području Srbije (Šegvić Klarić, 2012). Također, OTA može biti kontaminirana hrana za životinje (svinje, perad) pa se ovaj mikotoksin taloži osobito u bubrezima i jetri životinje, a u manjoj mjeri u mišićima i masnom tkivu (Sinovec i Resanovic, 2005).

Ljudi koji se hrane mesom ovih životinja indirektno su izloženi štetnom učinku OTA.

U Hrvatskoj je prema Pravilniku o najvećoj dopuštenoj količini kontaminanata u hrani, propisana maksimalna dozvoljena koncentracija OTA za neprerađene žitarice (5 µg/kg), proizvode dobivene iz neprerađenih žitarica (3 µg/kg), pržena i mljevena zrna kave (5 µg/kg), vino i sokove od grožđa (2 µg/kg), hranu na bazi žitarica za dojenčad i djecu te za posebne medicinske svrhe (0,5 µg/kg).

Iz istraživanja koje su proveli Li i sur. vidljivo je da je CTN na području Kine i drugih azijskih zemalja izrazito zastupljen u namirnicama široke potrošnje. Učestalom primjenom namirnica koje su potencijalno kontaminirane CTN raste rizik štetnog učinka na ljudsko zdravlje, a obzirom da ne postoji zakonska odredba kontrole CTN rizik je time veći.

Prema tome se može zaključiti da osobe koje žive na područje povećane vjerojatnosti kontaminacije hrane mikotoksinima (CTN i OTA), a koriste pripravke crvene riže za koje ne znaju jesu li onečišćeni CTN, pripadaju "rizičnoj" skupini pacijenata.

Dugoročni unos CTN putem hrane, a osobito ako je hrana dodatno kontaminirana OTA, predstavlja mogući rizik za oštećenje bubrega ili razvoj karcinoma bubrega.

Preparati crvene riže mogu doprinijeti tome ako se u njima nalazi CTN u većim količinama, a prema spomenutim istraživanjima je vidljivo da na tržištu postoje preparati u kojima koncentracija CTN nije zanemariva. Različiti komercijalno dostupni preparati sa crvenom rižom su različitog sastava, kako aktivne tvari (monakolina K) tako i neželjenog onečišenja-mikotoksina citrinina.

Prema ispitivanjima provedenim na životinjama, CTN je pokazao prvenstveno nefrotoksična svojstva, a prema IARC uvršten je u kategoriju 3 kancerogenih tvari. Količine CTN koje su primjenjivane u ispitivanjima na životinjama su uglavnom puno veće od količina pronađenih u preparatima sa crvenom rižom ili u hrani, no dugotrajnim unosom, a posebno u kombinaciji s drugim mikotoksinima (OTA) može imati štetan učinak na zdravlje ljudi.

Na ljudima nisu rađena istraživanja poput onih na životinjama, no sumnja se na umiješanost CTN u nastanak endemske nefropatije.
U područjima koja su pogodna za rast *Monascus* vrste, CTN je često kao onečišćenje prisutan u žitaricama, povrću, voću i voćnim sokovima pa je tako svakodnevna prehrana jedan od načina unosa ovog mikotoksina u organizam. Osim *Monascus* vrste, CTN može proizvoditi i *Penicillium* vrsta. Poznati uzročnik truljenja jabuka i proizvođač mikotoksina patulina, *Penicillium expansum*, proizvodi i CTN koji je tako na području Hrvatske pronađen u 19% ispitivanih jabuka (Pepeljnjak i sur., 2002). Također, *Penicillium citrinum* vrsta koja je prisutna u gotovo svim klimatskim područjima može biti prisutna u hrani, a najčešće se nalazi na žitaricama, orašastim plodovima i voću.

Prema brojim kliničkim ispitivanjima, crvena riža pokazuje pozitivan učinak na smanjenje kolesterola u krvi uz mnogo manje neželjenih reakcija nego uslijed primjene sintetskih statina.

Pacijenti je smatraju sigurnim lijekom jer su često mišljenja da biljni pripravci nisu štetni te da ih se ne treba bojati za razliku od industrijskih lijekova. U slučaju crvene riže se pokazalo da to nije tako jer zbog slabe zakonske regulative postoji rizik od štetnog učinka CTN na zdravlje ljudi.
Preparati crvene riže na tržištu su registrirani kao dodaci prehrani i ne podliježu strogim ispitivanjima kao što je to slučaj za lijekove. Prema CGMP-u (*Current Good Manufacturing Practice*) proizvođači bi trebali voditi računa da njihovi proizvodi ne sadrže CTN ili da ga sadrže unutar dozvoljenih granica, no nemaju i zakonsku obavezu, a gotovi proizvodi ne podliježu kontroli CTN od strane nekih službenih kontrolnih tijela. Na pakiranju proizvoda nije nužno navedeno da li je ispitivana prisutnost CTN u proizvodu pa pacijent ne može znati, tj. biti siguran da proizvod ne sadrži CTN.
Za vjerovati je da se ozbiljni proizvođači pridržavaju CGMP-a i ostalih propisa, no potrebna je ujednačena zakonska regulativa sa strožim kontrolama koja bi jamčila sigurnost za ljudsko zdravlje.

5. ZAKLJUČAK

- Preparati crvene riže prisutni na tržištu mogu biti onečišćeni nefrotoksičnim mikotoksinom citrininom. Istraživanja provedena na području SAD-a i Kine u proteklih 5 - 10 godina pokazuju da su pacijentima dostupni preparati koji sadrže citrinin, a u nekim su pronađene i znatnije količine.

- Registrirani kao dodaci prehrani, ovi preparati ne podliježu strogim kontrolama kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti kroz koje moraju proći lijekovi, no postoje smjernice koje na temelju provedenih ispitivanja na životinjama preporučuju dozvoljene količine citrinina u dodacima prehrani ili u hrani. Obzirom na različite klimatske uvjete i zastupljenost mikotoksina, smjernice nisu jednake u cijelom svijetu, a u nekim zemljama takve smjernice niti ne postoje.
  Europska komisija i EFSA su 2014. godine donijele regulaciju prema kojoj maksimalna dopuštena količina citrinina u dodacima prehrani sa crvenom rižom dobivenom fermentacijom sa gljivicom *Monascus purpureus* iznosi 2000 µg/kg. U Kini je dozvoljena granica citrinina u prehrambenim proizvodima sa crvenom rižom 50 µg/kg.

- Citrinin se može nalaziti i u žitaricama i voću, a često u kombinaciji s mikotoksinom okratoksinom A s kojim djeluje sinergistički pa je dugoročnom primjenom kontaminirane hrane povećana vjerojatnost za razvoj nefrotoksikoze, odnosno karcinoma bubrega.

- Svi proizvođači dodataka prehrani sa crvenom rižom trebali bi se pridržavati pravila dobre proizvođače prakse (CGMP) i kontrolirati prvenstveno polazne sirovine na prisutnost citrinina.

- Bolja zakonska regulativa dodataka prehrani u budućnosti pružila bi pacijentima sigurnost u liječenju hiperlipidemije crvenom rižom bez rizika nefrotoksičnog učinka citrinina.

6. LITERATURA

Bouslimi A, Bouaziz C, Ayed-Boussema I, Hassen W, Bacha H. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicology*, 2008, 251, 1-7.

Burke FM. Red Yeast Rice for the Treatment of Dyslipidemia. *Curr Atheroscler Rep*, 2015, 17, 22.

Chagas G, Klüppel M, Campello A, Buchi D, De Olivera M. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. *Cell Struct Funct,* 1994, 19, 103-108.

Chagas GM, Campello AP, Klüppel ML. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *J of app tox*, 1992, 12, 123-129.

Chan WH. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts, *Biochem J*., 2007, 404, 317-26.

Chen CC, Chan WH. Inhibition of Citrinin-Induced Apoptotic Biochemical Signaling in Human Hepatoma G2 Cells by Resveratrol. *In J Mol Sci*, 2009, 10, 3338-3357.

Chen F, Hu X. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *Int J Food Microbiol*, 2005, 103, 331–337.

Childress L, Gay A, Zargar A, Ito MK. Review of red yeast rice content and current Food and drug administration oversight. *J clin lipidol*, 2013, 7, 117-122.

Cooper GM, Hausman R. Stanica. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 630-636.

Cunningham E. Is red yeast rice safe and effective for lowering serum Cholesterol?. *J Am Diet Assoc*, 2011.

Čeović S, Hrabar A, Šarić M. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*, 1992, 30, 183-188.

Da Lozzo EJ, Oliveira MB, Carnieri EG. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition. *J Biochem Mol Toxicol*, 1998,12, 291-297.

Đukanović Lj, Radovanović Z. Balkan endemic nephropaty. U: Clinical Nephrotoxins, 2nd edition. E.de Broe M, Porter GA, Bennett WM, Verpooten GA.urednici, Springer Netherlands, 2003, str. 587-601.

EFSA, 2012. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed, *EFSA Journal*, 2012.

EP (European Pharmacopoeia), 2007. Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), 6th ed., str. 257

EU, 2014. European Union Commission Regulation (EU) No. 212/2014 of 6 March 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast Monascus purpureus. *Official Journal of the European Union*, 67, 3-4.

Fabijanić D. Statini općenito. *Medicus*, 2010, 19, 147-161.

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

Francetić I. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 274.

Gordon RY, Becker DJ. The Role of Red Yeast Rice for the Physician. *Curr Atheroscler Rep*, 2011, 13, 73 – 80.

Gordon RY, Cooperman T, Obermeyer W, Becker DJ. Marked variability of monacolin levels in commercial red yeast rice products buyer beware. *Arch Intern Med*. 2010. 1722-1727.

Halbert SC, French B, Gordon RY, Farrar JT, Schmitz K, Morris PB, Thompson PD, Rader DJ, Becker DJ. Tolerability of red yeast rice (2,400 mg twice daily) versus pravastatin (20 mg twice daily) in patients with previous statin intolerance. *Am J Cardiol*, 2010, 198–204.

Heber D, Lembertas A, Bowerman S, Liang V. An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: Implications of variability in chemical profile and contents. *Journal Altern Complement Med*, 2001, 7, 133-139.

Hetherington AC i Raistrick H. Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum Thom*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1931, 220, 269-295.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of cancerogenic risks to humans, Some Naturally Occurring and Synthetic Food Cornponents. Furocournarins and Ultraviolet Radiation. IARC Press 1986, 40, 66-77.

Jeswal P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of Mus musculus. *Cytobios*, 1996, 86, 29-33.

Journoud M, Jones PJH. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. *Life Sci*, 2004, 74, 2675–2683.

Klimek M, Wang S, Ogunkanmi A. Safety and efficacy of red yeast rice (Monascus purpureus) as an alternative therapy for hyperlipidemia. *P&T*, 2009, 34, 313-327.

Lachenmeier DW, Monakhova YB, Kuballa T, Löbell Behrends S, Maixner S, Kohl-Himmelseher M, Waldner A, Steffen C. Regulatory evaluation of red yeast rice (Monascus spp.) food supplements sold via the Internet. *Jahrgang*, 2012,108, 357-360.

Li Y, Jiang L, Jia Z, Xin W,Yang S, Yang Q, Wang L. A meta-analysis of red yeast rice: an effective and relatively safe alternative approach for dyslipidemia. *Plos one*, 2014, 9, 1-10.

Li Y, Zhou YC, Yang MH, Ou Yang Z. Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. *Food Chem*, 2012, 132, 1040-1045.

Maharaj SVM. Limitations and plausibility of the Pliocene lignite hypothesis in explaining the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health*, 2014, 20, 77-91.

Milićević D, Nedeljković Trailović J, Mašić Z. Mikotoksini u lancu ishrane – analiza rizika i značaj za javno zdravstvo. *Tehnologija mesa*, 2014, 55, 22-38.

Mirošević Skvrce N, Andrić A, Macolić Šarinić V. Rizici primjene dodataka prehrani koji sadrže crvenu rižu u bolesnika koji su iskusili nuspojave na lijekove iz skupine statina. *Farmaceutski glasnik*, 2012, 68, 108-113.

Mornar A, Nigović B, Sertić M. Identifikacija monakolina i citrinina u crvenoj fermentiranoj riži primjenom LC/MS/MS tehnike. *Farmaceutski glasnik*, 2012, 68, 243-253.

Ostry V, Malir F, Ruprich J. Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins*, 2013, 5, 1574-1586.

Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 225.

Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by Monascus sp.. *Inter J Food Microbiol*, 2008, 126, 20-23.

Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Leksawasdi N. Review of Angkak Production (Monascus purpureus). *Chiang Mai J Sci*., 2007, 34, 319-328.

Pepeljnjak S, Šegvic Klarić M, Ožegović L. Citrininotoxinogenicity of Penicillium spp. isolated from decaying apples. *Brazilian J Microbiol*, 2002, 33, 134-137.

Pepeljnjak S, Šegvić Klarić M. «Suspects» in etiology of Endemic nephropathy: Aristolochic acid versus mycotoxins. *Toxins*, 2010, 2, 1414-1427.

Peraica M, Domijan AM, Miletić-Medved M, Fuchs R. The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy. *Wien Klin Wochenschr*, 2008, 120/13–14, 402–407.

Peraica M, Rašić D. Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva*, 2012, 54, 81-87.

Permanent Senate Commission on Food Safety (SKLM). Toxicological evaluation of red mould rice: An update. Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013.

Pollak L. Dodaci prehrani i hrana za posebne prehrambene potrebe. *Medicus*, 2008, 17, 47-55.

Pravilnik o dodacima prehrani, 2013, Zagreb, *Narodne novine*, broj 39 (NN/39/2013).

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, 2012, Zagreb, *Narodne novine*, broj 146 (NN/146/12).

Red yeast rice, 2013., https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/red-yeast-rice, pristupljeno 02. 06. 2015.

Rumora L, Domijan AM, Žanić Grubišić T, Šegvić Klarić M. Differential activation of MAPKs by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments in porcine kidney PK15 cells. *Toxicon*, 2014, 90, 174-183.

Samsudin NIP, Abdullah N. A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia. *Mycotoxin Res*, 2013, 29, 89-96.

Sinovec Z, Resanović R. Mikotoksini u hrani za životinje - rizik po zdravlje ljudi. *Tehnologija mesa*, 2005, 46, 39-44.

Speijers GJA, Speijers MHM. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Lett*, 2004, 153, 91–98.

Stefanović V, Toncheva D, Polenakovic M. Balkan nephropathy. *Clin Nephrol*, 2015,83, 64-69.

Šegvić Klarić M, Medić N, Hulina A, Žanić Grubišić T, Rumora L. Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71, 97-105.

Šegvić Klarić M, Želježić D, Rumora L, Peraica L, Pepeljnjak S, Domijan AM. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin, *Arch Toxicol*, 2012, 86, 97-107.

Šegvić Klarić M. Adverse effects of combined mycotoxins. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2012, 63, 519-530.

Thust R, Kneist S. Activity of citrinin metabolized by rat and human microsome fractions in clastogenicity and SCE assays on Chinese hamster V79-E cells. *Mutat Res*,1979, 67, 321-330.

Walker R, Whittlesea C. Clinical pharmacy and therapeutics. Elsevier Ltd., 2012, str. 389-395.

Watson DG. Pharmaceutical analysis 3rd ed.. Elsevier Science, 2012, str. 205;265; 302.

Wong HC, Koehler PE. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J Food Sci*, 1981, 46, 589-592.

Würgler FE, Friederich U, Schlatter J. Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cnestine in Salmonella typhimurium TA102. *Mutat Res*, 1991, 261, 209-216.

Xu B, Jia X, Gu L, Sung C. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Cont*, 2006, 17, 271-285.

Yu FY, Liao YC, Chang CH, Liu BH. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway, *Toxicol Lett*, 2006, 161,143-151.

Zaied C, Zouaoui N, Bacha H, Abid S. Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food cont*, 2012, 28, 106-109.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Mikotoksini su toksični proizvodi sekundarnog metabolizma nekih vrsta plijesni. Jedan je od takvih toksičnih produkata i citrinin (CTN). Proizvode ga rodovi *Penicillium*, *Aspergillus* i *Monascus*, a može se naći u namirnicama biljnog podrijetla (pšenica, riža, ječam, kukuruz) te voću, povrću i voćnim sokovima. CTN je primarno nefrotoksičan, a može također dovesti do oštećenja jetre ili koštane srži. IARC ga svrstava u kategoriju 3 kancerogenih tvari.

U ovom je radu CTN promatran kao moguće onečišćenje u dodacima prehrani s crvenom rižom te su pretraživani znanstveni radovi čiji su autori ispitivali prisutnost CTN u komercijalno dostupnim pripravcima crvene riže. Crvena riža nastaje procesom fermentacije riže (*Oryza sativa*) uz gljivice iz roda *Monascus*. U Aziji se tradicionalno koristi kao bojilo za hranu i aromu te u narodnoj medicini za liječenje problema probave i cirkulacije krvi. U suvremenoj je medicini prepoznata kao sredstvo za regulaciju povišenih vrijednosti kolesterola u krvi budući da fermentacijom nastaje aktivna tvar - monakolin K. Brojne kliničke studije potvrdile su djelotvornost crvene riže u terapiji hiperlipidemije. Međutim, ukoliko se proces fermentacije ne odvija pod kontroliranim uvjetima, može nastati CTN.

Istraživanja provedena u proteklih 5 - 10 godina pokazuju da su pacijentima dostupni preparati koji sadrže CTN, a u nekim su pronađene i količine koje su znatno veće od onih koje su navedene u smjernicama, a propisane su na temelju ispitivanja provedenih na životinjskim modelima. Smjernice su različite za pojedine dijelove svijeta budući da zastupljenost mikotoksina ovisi o klimatskim uvjetima. U ovom je radu prisutnost CTN u ispitivanim uzorcima uspoređivana sa smjernicama koje vrijede na području Europske unije.

Dodatno, CTN se zajedno s drugim mikotoksinima (uglavnom okratoksinom A) može naći i u hrani (žitaricama i voću) pa je dugoročnom primjenom kontaminirane hrane povećana vjerojatnost za razvoj nefrotoksikoze, odnosno karcinoma bubrega. Proizvođači ovih dodataka prehrani trebali bi kontrolirati prisutnost CTN u polaznim sirovinama, a u budućnosti bi trebala postojati bolja zakonska regulativa za dodatke prehrani kako bi se pacijentima osigurala sigurnost u liječenju hiperlipidemije crvenom rižom bez rizika nefrotoksičnog učinka CTN.

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi. One of such toxic products is citrinin (CTN). CTN is produced by several fungal species belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus* and can be found in foods of plant origin (wheat, rice, barley, maize), fruits and fruits juices. CTN is primary nephrotoxic but also can cause liver damage and bone marrow damage. IARC has classified CTN in group 3 of carcinogens.

In this study, data on CTN as possible contaminant of food supplements with red yeast rice and scientific papers with CTN occurrence in commercially available food supplements were discussed. Red yeast rice is fermented product of rice (*Oryza sativa*) and *Monascus* spp.

In Asia it is traditionally used as food colorant, flavour and in traditional Chinese medicine for treating digestive problems and blood circulation. Modern medicine uses red yeast rice for regulation of elevated blood cholesterol levels whereas active substance- monacolin K is the product of fermentation. Many clinical studies confirmed effectiveness of red yeast rice in therapy of hyperlipidaemia. If fermentation process is not under controlled conditions, CTN may occur as product. Studies conducted in the past 5-10 years show that the preparations containing CTN are available to patients, and in some preparations amounts that are considerably higher than the concentration in guidelines (based on tests carried out on animal models) were found. The guidelines are different for certain parts of the world because the occurrence of mycotoxins depends on the climatic conditions.

In this study, the presence of CTN in the analysed samples was compared with the guidelines that apply in the European Union. In addition, CTN co-occur with other mycotoxins, particularly ochratoxin A, which was confirmed in foods (grains and fruits).

Thus, the long-term exposure through contaminated food may increase the possibility for developing nephrotoxicoses or kidney cancer.

Manufacturers of these supplements should control the presence of CTN in raw material and in the future there should be a better legal framework for dietary supplements in order to ensure the safety of patients in the treatment of hyperlipidaemia using red rice without any risk of nephrotoxic effect of CTN.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Citrinin u dodacima prehrani na bazi crvene riže - potencijalni rizik za zdravlje ljudi

Ivana Đurović

SAŽETAK

Mikotoksini su toksični proizvodi sekundarnog metabolizma nekih vrsta plijesni. Jedan je od takvih toksičnih produkata i citrinin (CTN). Proizvode ga vrste iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Monascus*, a može se naći u namirnicama biljnog podrijetla (pšenica, riža, ječam, kukuruz) te voću, povrću i voćnim sokovima. CTN je primarno nefrotoksičan, a može također dovesti do oštećenja jetre ili koštane srži. IARC ga svrstava u kategoriju 3 kancerogenih tvari. U ovom je radu CTN promatran kao moguće onečišćenje u dodacima prehrani s crvenom rižom te su pretraživani znanstveni radovi čiji su autori ispitivali prisutnost CTN u komercijalno dostupnim pripravcima crvene riže. Crvena riža nastaje procesom fermentacije riže (*Oryza sativa*) uz gljivice iz roda *Monascus*. U Aziji se tradicionalno koristi kao bojilo za hranu i aromu te u narodnoj medicini za liječenje problema probave i cirkulacije krvi. U suvremenoj je medicini prepoznata kao sredstvo za regulaciju povišenih vrijednosti kolesterola u krvi budući da fermentacijom nastaje aktivna tvar - monakolin K. Brojne kliničke studije potvrdile su djelotvornost crvene riže u terapiji hiperlipidemije. Međutim, ukoliko se proces fermentacije ne odvija pod kontroliranim uvjetima, može nastati CTN. Istraživanja provedena u proteklih 5 - 10 godina pokazuju da su pacijentima dostupni preparati koji sadrže CTN, a u nekim su pronađene i količine koje su znatno veće od onih koje su navedene u smjernicama, a propisane su na temelju ispitivanja provedenih na životinjskim modelima. Smjernice su različite za pojedine dijelove svijeta budući da zastupljenost mikotoksina ovisi o klimatskim uvjetima. U ovom je radu prisutnost CTN u ispitivanim uzorcima uspoređivana sa smjernicama koje vrijede na području Europske unije.Dodatno, CTN se zajedno s drugim mikotoksinima (uglavnom okratoksinom A) može naći i u hrani (žitaricama i voću) pa je dugoročnom primjenom kontaminirane hrane povećana vjerojatnost za razvoj nefrotoksikoze, odnosno karcinoma bubrega. Proizvođači ovih dodataka prehrani trebali bi kontrolirati prisutnost CTN u polaznim sirovinama, a u budućnosti bi trebala postojati bolja zakonska regulativa za dodatke prehrani kako bi se pacijentima osigurala sigurnost u liječenju hiperlipidemije crvenom rižom bez rizika nefrotoksičnog učinka CTN.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranice, 1 grafički prikaz, 5 tablica i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: citrinin, crvena riža, Monascus purpureus, dodaci prehrani, mikotoksini

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Željan Maleš, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: 29. lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Citrinin in red rice based food supplements - a potential risk to human health

Ivana Đurović

SUMMARY

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi. One of such toxic products is citrinin (CTN). CTN is produced by several fungal species belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus* and can be found in foods of plant origin (wheat, rice, barley, maize), fruits and fruits juices. CTN is primary nephrotoxic but also can cause liver damage and bone marrow damage. IARC has classified CTN in group 3 of carcinogens. In this study, data on CTN as possible contaminant of food supplements with red yeast rice and scientific papers with CTN occurrence in commercially available food supplements were discussed. Red yeast rice is fermented product of rice (*Oryza sativa*) and *Monascus* spp. In Asia it is traditionally used as food colorant, flavour and in traditional Chinese medicine for treating digestive problems and blood circulation. Modern medicine uses red yeast rice for regulation of elevated blood cholesterol levels whereas active substance- monacolin K is the product of fermentation. Many clinical studies confirmed effectiveness of red yeast rice in therapy of hyperlipidaemia. If fermentation process is not under controlled conditions, CTN may occur as product. Studies conducted in the past 5-10 years show that the preparations containing CTN are available to patients, and in some preparations amounts that are considerably higher than the concentration in guidelines (based on tests carried out on animal models) were found. The guidelines are different for certain parts of the world because the occurrence of mycotoxins depends on the climatic conditions.In this study, the presence of CTN in the analysed samples was compared with the guidelines that apply in the European Union. In addition, CTN co-occur with other mycotoxins, particularly ochratoxin A, which was confirmed in foods (grains and fruits). Thus, the long-term exposure through contaminated food may increase the possibility for developing nephrotoxicoses or kidney cancer. Manufacturers of these supplements should control the presence of CTN in raw material and in the future there should be a better legal framework for dietary supplements in order to ensure the safety of patients in the treatment of hyperlipidaemia using red rice without any risk of nephrotoxic effect of CTN.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 1 figures, 5 tables and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: citrinin, red yeast rice, Monascus purpureus, food supplements, mycotoxins

Mentor: **Maja Šegvić Klarić**, **Ph.D.** *Associated Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić**, **Ph.D.** *Associated Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željan Maleš, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Hafner, **Ph.D.** *Associated Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 29, 2015.