

# Estrogeno djelovanje zearalenona i njegove razine u urinu životinja za proizvodnju hrane animalnog podrijetla

---

Jadrić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:837126>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



VETERINARSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

**Marina Jadrić**

**Estrogeno djelovanje zearalenona i njegove razine u urinu životinja za proizvodnju  
hrane animalnog podrijetla**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Klinika za porodništvo i reprodukciju

Predstojnik:

prof. dr. sc. Tugomir Karadjole

Mentori:

prof. dr. sc. Marko Samardžija

prof. dr. sc. Jelka Pleadin

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Ivan Folnožić
2. prof. dr. sc. Marko Samardžija
3. prof. dr. sc. Jelka Pleadin
4. prof. dr. sc. Tugomir Karadjole (zamjena)

## ZAHVALA

Zahvalila bih se svojim mentorima prof. dr. sc. Marku Samardžiji i prof. dr. sc. Jelki Pleadin na savjetima i smjericama pri pisanju diplomskog rada. Zahvalila bih se svojim bližnjima koji su me bodrili tijekom studiranja kada mi je bilo potrebno i veselili se sa mnom na svakom riješenom ispitu.

## POPIS KRATICA

ZEN	Zearalenon
ZEL	Zearalenol
SD	Standardna devijacija
N	Broj dana
TDI	Tolerable daily intake, prihvatljivi dnevni unos
L.K.	Limit kvantifikacije
F1	Farma 1
F2	Farma 2
F3	Farma 3
M	Meso
U	Urin
H	Hrana za svinje

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA .....	2
2. 1. Mikotoksini .....	2
2. 2. Podjela mikotoksina .....	2
2. 3. Zearalenon.....	4
2. 4. Mehanizam djelovanja.....	5
2. 5. Estrogeno djelovanje ZEN-a.....	5
2. 6. Ostali učinci ZEN-a u svinja .....	7
2. 7. Rezidue ZEN-a u tkivu i mlijeku životinja .....	9
2. 8. „Carry-over“ efekt na farmama svinja u Hrvatskoj .....	10
2. 9. Pojavnost bolesti u različitim životinja i ljudi izloženih fumonizin mikotoksinima.....	14
2. 10. Zakonodavstvo Europske unije .....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3. 1. Uzorci.....	16
3. 2. ELISA metoda za određivanje ZEN-a.....	16
3. 2. 1. Oprema i pribor .....	16
3. 2. 2. Sadržaj KITA ZEN .....	16
3. 2. 3. Mjere predostrožnosti pri rukovanju kitom .....	16
3. 2. 4. Priprema reagensa.....	17
3. 2. 5. Princip metode.....	17
3. 2. 6. Priprema uzorka za analizu .....	17
3. 2. 6. 1. Priprema uzoraka hrane za svinje.....	17
3. 2. 6. 2. Priprema uzoraka urina .....	17
3. 2. 6. 3. Priprema uzorka mesa.....	18
3. 2. 7. Test procedura.....	18
3. 2. 8. Izračun koncentracije ZEN .....	19
3. 2. 9. Statistička analiza izmjerenog ZEN-a u urinu i mesu.....	19
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....	21
4. 1. Rezultati istraživanja mjerenja ZEN-a u krmnoj smjesi.....	21
4. 2. Rezultati istraživanja mjerenja ZEN-a u urinu .....	22

4. 3. Rezultati istraživanja mjerenja ZEN-a u mesu.....	23
4. 4. Minimalne i maksimalne koncentracije ZEN-a u uzorcima sa farmi.....	24
4. 5. Korelacija vrijednosti koncentracija ZEN-a u urinu s koncentracijama u mesu .....	25
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČCI.....	29
7. LITERATURA .....	30
8. SAŽETAK.....	34
9. SUMMARY .....	35
10. ŽIVOTOPIS.....	36

## POPIS PRILOGA

Slika 1, Struktura zearalenona i njegovih metabolita (LIU i APPLGATE, 2020.).

Slika 2, Intoksikacija zearalenonom (A) kontrolne nazimice (nisu bile izložene ZEN-u). (B) Nazimice s vulvovaginitisom nakon intoksikacije sa 2 mg ZEN-a/kg hrane kroz 24 dana (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

Slika 3, Normalni reproduktivni sustav krmača (A) te povećani reproduktivni trakt nakon ZEN intoksikacije sa 2 mg/kg u hrani kroz 24 sata (B) (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

Slika 4, Baždarena krivulja za računanje koncentracije ZEN-a, prema kitu ELISA.

Slika 5, Prikaz prosječne koncentracije zearalenona u uzorcima krmne smjese po farmama uzorkovanja.

Slika 6, Prikaz prosječne koncentracije zearalenona u uzorcima urina po farmama uzorkovanja.

Slika 7, Prikaz prosječne koncentracije zearalenona u uzorcima mesa po farmama uzorkovanja.

Slika 8, Korelacija vrijednosti koncentracije ZEN-a u urinu s koncentracijama ZEN-a određenim u mesu.



Tablica 1, Podjela mikotoksina u skupine prema organima i organskom sustavu prema kojima iskazuju štetni učinak (PLEADIN i sur., 2018.).

Tablica 2, Težine adrenalnih žlijezdi i reproduktivnog trakta kod mužjaka svinja izloženih ZEN-u (FARNWORTH i TRENHOLM, 1983.).

Tablica 3, Utjecaj zearalenona na reprodukciju farmskih životinja (SAMARDŽIJA i sur., 2017.).

Tablica 4, Koncentracija ZEN-a u hrani za svinje prikupljene sa farmi u Hrvatskoj 2014. godine (PLEADIN i sur., 2014.).

Tablica 5, Koncentracija ZEN-a u prirodno izloženih svinja u urinu ( $\mu\text{g/L}$ ) i mesu ( $\mu\text{g/kg}$ ) (PLEADIN i sur., 2014.).

Tablica 6, Metaboliti i „carry-over“ efekt svinja hranjenih hranom kontaminiranom ZEN-om (LIU i APPLGATE, 2020.).

Tablica 7, Preporuke Komisije Europske unije (2006/576/EC).

Tablica 8, Minimalne i maksimalne koncentracije ZEN-a u uzorcima sa farmi.

## 1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni čiji se izvor najčešće nalazi u žitaricama i proizvodima od žitarica za ljudsku prehranu i životinjsku hranidbu. Ljudi ih unose u organizam direktno kontaminiranom hranom ili neizravno putem kontaminiranih namirnica životinjskog podrijetla.

Razvoj i intenzitet produkcije mikotoksina uvjetovan je mikroklimatskim čimbenicima te uz pogodovne ekološke prilike trajno ugrožavaju proizvodnju i skladištenje hrane i hrane za životinje. Tako se tijekom sušnih i vrućih godina u žitaricama može uočiti značajnija prisutnost aflatoksina, a tijekom izuzetno vlažnih godina bilježe se veće količine fuzarijskih mikotoksina (PLEADIN i sur., 2018.). Općenito je temperatura od oko 25 °C idealna za rast plijesni te pad temperature na 10 °C s vlažnošću od 14 % aktivira sekundarni metabolizam odgovoran za produkciju zearalenona (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

Zearalenon (ZEN) je mikotoksin plijesni roda *Fusarium* koje ima endokrino-modulirajuće djelovanje. Izloženost ZEN-u rezultira poremećajima u urogenitalnom sustavu, dok kod jačih akutnih ili kroničnih otrovanja mogu ostaviti trajne posljedice na organima reproduktivnog sustava u obliku degenerativnih promjena testisa, jajnika, sjemenika, prostate te inhibicije prednjeg režnja hipofize i hipotalamusa. Učinak ovog mikotoksina dovodi do morfoloških i funkcionalnih poremećaja reproduktivnih organa i oštećenja spolnih stanica domaćih životinja, dovodi do hiperestrogenizma u goveda, svinja i peradi (MITTERBAUER i sur., 2003.). Pojavljuju se simptomi pri izloženosti domaćih životinja zearalenu, među kojima su pobačaji, produljenje trajanja estrusa, neplodnost životinja, smanjenje libida, mumifikacije (VISCONTI I PASCALE, 1998.).

Cilj ovog diplomskog rada je prikazati estrogeno djelovanje ZEN-a i utvrditi razine ovog mikotoksina u hrani koju su svinje primale tijekom tova te u njihovom urinu i mesu sa tri farme u Republici Hrvatskoj. U radu je ispitana i korelacija koncentracija ZEN-a u navedenim matriksima.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2. 1. Mikotoksini

Riječ mikotoksini dolazi od grčke riječi *myces* što znači gljiva i grčke riječi *toxicon* što znači otrov. Mikotoksini su kemijski spojevi, sekundarni metaboliti određenih filamentnih gljiva, odnosno plijesni, niske molekularne mase. Odsutnost vidljivih plijesni u hrani i hrani za životinje općenito ne znači nužno da mikotoksini nisu prisutni (PLEADIN i sur., 2018.).

Mikotoksini stvaraju plijesni iz rodova *Penicilium*, *Fusarium*, *Aspergillus* i *Trichotecium*. Biosinteza mikotoksina uvjetovana je mikroklimatskim čimbenicima i to količinom vlage u supstratu, relativnom vlažnosti zraka, prisutnošću kisika, pH vrijednošću, temperaturom, fizičkim oštećenjem i prisutnošću gljivičnih spora (JANSSEN i sur., 1997.). Do kontaminacije dolazi tijekom žetve, berbe, sušenja i skladištenja. Kontaminacija mikotoksinima roda *Fusarium*, tako i ZEN-a javlja se češće u područjima umjerene klime tijekom godina s povećanim padalinama te u razdoblju prije žetve. Višegodišnja istraživanja provedena u Hrvatskoj upućuju na čestu pojavnost kontaminacija žitarica i hrane za životinje (PEPELJNIAK i ŠEGVIĆ, 2004., DOMIJAN i sur., 2005., PLEADIN i sur., 2013., PLEADIN i sur., 2012a.).

„Carry-over“ efektom moguća je kontaminacija hrane životinjskog podrijetla, ukoliko je životinja tijekom hranidbe primala zagađeno krmivo, odnosno krmu smjesu. Posljedično tome potrošači mogu u svoj organizam neizravnim putem unijeti mikotoksine, u ovom slučaju ZEN, preko mesa, mlijeka i jestivih iznutrica.

Kako bi se od samog početka proizvodnje smanjila mogućnost za razvoj plijesni, a samim time i stvaranje mikotoksina, današnji postupci uključuju sadnju prilagođenih sorti, žitarica, pravilnu gnojidbu, suzbijanje korova i pravilno navodnjavanje. Tijekom berbe, odnosno žetve, potrebno je na minimum svesti oštećenja zrnja te time ukloniti rizik za naknadni razvoj gljivica odnosno plijesni tijekom skladištenja (BINDER, 2007.).

### 2. 2. Podjela mikotoksina

Sistematizacija se provodi prema vrsti plijesni, načinu djelovanja, podrijetlu, kemijskoj strukturi te s obzirom na bolesti i simptome koje mikotoksini u organizmu mogu uzrokovati.

Mikotoksini se dijele s obzirom na bolesti i simptome koje uzrokuju na: neurotoksine, nefrotoksine, hepatotoksine, estrogene toksine, imunosupresivne toksine, citotoksine te toksine koji uzrokuju anoreksiju i povraćanje.

Podjela mikotoksina s obzirom na podrijetlo su: skladišni mikotoksini aflatoksini, okratoksini te mikotoksini polja *Fusarium* koji se dijele na trihotecene (DON i T-2 toksine),

zearalenon i fumozine. Skupine prema kojima se mikotoksini svrstavaju s obzirom na bolesti i simptome koje uzrokuju u ljudskim i životinjskim organizmima prikazane su u Tablici 1.

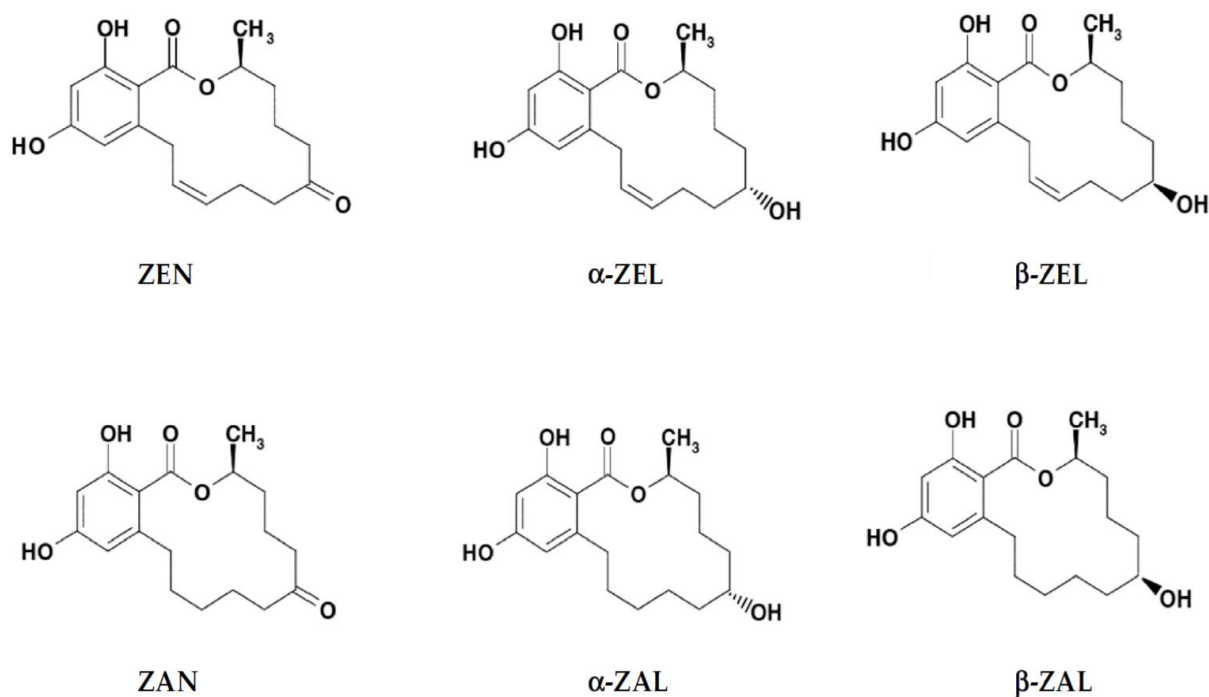
Tablica 1, Podjela mikotoksina u skupine prema organima i organskom sustavu prema kojima iskazuju štetni učinak (PLEADIN i sur., 2018.).

<b>Skupina mikotoksina</b>	<b>Bolesti i simptomi</b>	<b>Predstavnici skupine</b>
Nefrotoksini	uzrokuju insuficijenciju bubrega	okratoksini, citrinin, kvinoni, ksantomegnin, viomelein
Neurotoksini	uzrokuju oštećenje živčanog sustava i krvarenje u mozgu	patulin, penitrem, citreoviridin, fumonizin
Hepatotoksini	oštećuju funkciju stanice jetre i ubrzavaju razvoj karcinoma jetre	aflatoksini, penicilična kiselina, luteoskirin, cikloklorotin, rubratoksin, fumonizin
Estrogeni toksini	uzrokuju hiperestrogenizam u životinja i degeneraciju stanica spolnih organa	zearalenon
Citotoksini	oštećuju epitelne stanice kože i sluznice probavnog trakta i krvožilja	trihoteceni, toksini pukcinije
Imunosupresivni toksini	oštećuju imunost i njegov odgovor na kontaminacije u organizmu ljudi i životinja	okratoksini, trihoceteni
Respiratorni toksini	oštećuju dišne putove	fumonizin, trihoceteni, stahibotriotoksin
Fotosenzibilni toksini	uzrokuju hepatotoksične pojave, facijalni ekcem ovaca i goveda	sporidezmini
Toksini koji uzrokuju odbijanje i povraćanje hrane	uzrokuju zaziranje od ponuđene hrane, apatiju i povraćanje	deoksinivalenon, diacetoksiscirpenol

### 2. 3. Zearalenon

Mikotoksin zearalenon (F-2 toksin) spada u skupinu makrocikličnih laktona. Izoliran je 1962. godine iz kulture plijesni *Giberella zea*, koja predstavlja spolni stadij plijesni *Fusarium graminearum* (BENNET i KLICH, 2003.). Djeluje kao fitoestrogen i spada u nesteroidne estrogene koji se prirodno nalaze u biljkama te im je zajednička kemijska sličnost s sintetičkim i prirodnim hormonima estrogenima. Metabolit je različitih vrsta iz roda *Fusarium*, kao što su: *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. equiseti* i *F. graminearum* (CHELOWSKI, 1998.).

ZEN je lakton rezorcilne kiseline (6-10 hidroksi-6-okso-trans-1-undecil- $\beta$ -rezorcilna kiselina). Izgled mu je bijelog kristala molekularne mase 318 g/mol i temperature topljivosti 165 °C. Na Slici 1 prikazana je struktura ZEN-a i njegovih najznačajnijih metabolita.



Slika 1, Struktura zearalenona i njegovih metabolita (LIU i APPLGATE, 2020.).

Plijesni roda *Fusarium* rastu najintenzivnije pri temperaturi od 18 do 24 °C te pri relativnoj vlažnosti zraka većoj od 70 %. Potrebna je niža početna temperatura da bi se aktivirali enzimi uključeni u sintezu toksina (ABRAMSON, 1998.).

ZEN je termostabilan, nije topljiv u vodi, no topljiv je u organskim otapalima. Stabilan je tijekom procesa skladištenja, mljevenja, prerade i ne razgrađuje se pri visokim temperaturama (ZOLLNER i sur., 2002., ALEXANDER i sur., 2004.).

Pojavnost zearalenona dokazana je u većoj mjeri u kukuruzu, ječmu, pšenici, soji te je pronađen u proizvodima animalnog podrijetla životinja koje su prethodno hranjene kontaminiranom hranom (PLEADIN i sur., 2018.).

Intoksikacija ZEN-om kod domaćih životinja uočljiva je već pri koncentraciji od 100 mg/kg u hrani. Pritom su svinje među domaćim životinjama najosjetljivije na ovaj mikotoksin te se simptomi trovanja uočavaju pri koncentraciji od 0,1 mg ZEN-a/kg konzumirane hrane (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

#### 2. 4. Mehanizam djelovanja

ZEN unesen oralno apsorbira se u crijevima te dolazi do redukcije, nakon čega slijede reakcije hidroksilacije i konjugacije te do nastanka njegovih metabolita (DÄNICKE i WINKLER, 2015.). Smatra se da se od 80 do 85 % ZEN-a i njegovih metabolita apsorbira u kratkom vremenu u crijevima, a ZEN se može biotransformirati mikroflorom crijeva ili u stanicama mukoze. Biotransformacija ZEN-a ponajviše se odvija u jetri (MALLMANN i DILKIN, 2007.). Hidroksilacijom u jetri dobivaju se dva izomera  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) i  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL).  $\beta$ -ZEL ima sličnu aktivnost ZEN-u, dok je  $\alpha$ -ZEL četiri puta aktivniji i toksičniji od izvorne molekule ZEN-a (ZINEDINE i sur., 2007.).

Metaboliti ZEN-a u svinja se izlučuju u većim koncentracijama od goveda i to putem urina (MIROCHA i sur., 1981., DÖLL i sur., 2003.). U svinja ZEN se u većini slučajeva reducira u  $\alpha$ -ZEL te dolazi do enterohepatične recirkulacije što čini svinje jako osjetljivima na ovaj mikotoksin (DÄNICKE i sur., 2005., MALEKINEJAD i sur., 2006.). Pronalazak iste koncentracije ZEN-a u krvi i fecesu u istom vremenskom periodu ukazuje na postojanje enterohepatičke recirkulacije (MALLMANN i DILKIN, 2007.). Nakon aplikacije ZEN-a oralnim putem, u plazmi i urinu nalazimo u najvećoj koncentraciji ZEN te njegov metabolit  $\alpha$ -ZEL (FARNWORTH i TRENHOLM, 1983.).

#### 2. 5. Estrogeno djelovanje ZEN-a

ZEN i njegovi metaboliti imaju estrogeni i luteotropni učinak u organizmu. ZEN i njegovi metaboliti su strukturno slični estrogenu i imaju djelovanje kao  $\beta$ -estradiol te se kompetitivno vežu na receptore estrogena u tijelu (ALEXANDER i sur., 2004.).

Istraživanje provedeno na 24 odbijena jorkširska prašćića i to po 12 nekastriranih mužjaka i ženki. Apliciran im je pročišćeni zearalenon u koncentracijama od 0,5, 10 ili 15 mg ZEN-a/kg tjelesne mase. Nakon 7 sati od aplikacije prikupljeni su uzorci krvi u kojima su detektirani konjugati ZEN-a (139 uzoraka sa po 317 ng ZEN-a/mL krvi) te i  $\alpha$ -ZEN-a (65 uzoraka sa po 319 ng  $\alpha$ -ZEN-a/mL krvi). U prikupljenim uzorcima najveća koncentracija metabolita je bila od  $\alpha$ -ZEN-a. Mužjacima svinja uzeti su uzorci urina te su pronađene visoke

koncentracije konjugiranog ZEN-a (49 uzoraka sa po 197  $\mu\text{g}$  ZEN-a/mL urina) te i  $\alpha$ -ZEN-a (5 uzoraka sa po 80  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -ZEN-a/mL urina). Nakon tjedan dana reproduktivni trakt ženki prethodno izložen visokim koncentracijama ZEN-a bio je značajno povećan u usporedbi s kontrolnim jedinkama (koje nisu prethodno izlagane ZEN-u). Reproductivni sustav mužjaka koji su bili prethodno izloženi ZEN-u bio je značajno smanjen u usporedbi sa kontrolnim jedinkama. Vanjske promjene nisu zamijećene kod mužjaka. Podatci prikupljeni o reproduktivnom sustavu i adrenalnim žlijezdama žrtvovanih muških prašćića nakon tjedan dana od aplikacije ZEN-a prikazani su u Tablici 2 (FARNWORTH i TRENHOLM, 1983.).

Tablica 2, Težine adrenalnih žlijezdi i reproduktivnog trakta kod mužjaka svinja izloženih ZEN-u (FARNWORTH i TRENHOLM, 1983.).

<b>Tablica 2, Težina adrenalnih žlijezda i reproduktivnog trakta kod aplikacije zearalenona prascima</b>				
	Adrenalne žlijezde	Testisi	Seminalni vezikuli + mokraćovodi <sup>†</sup>	Penis
Doza (mg/kg)	Težina (g/kg)	Težina (g/kg)	Težina (g/kg)	Težina (g/kg)
15	0,073 <sup>“</sup>	1,30	0,74	0,99
10	0,087	1,33	0,80	1,12
5	0,069	1,31	0,74	1,19
0	0,094	1,63	1,22	1,27
SPA <sup>~</sup>	0,010	0,15	0,12	0,10
<sup>†</sup> Uključuje bulbouretralne žlijezde				
<sup>“</sup> Aritmetička sredina 3 životinje po doziranju				
<sup>~</sup> Standardna pogreška aritmetičke sredine; na temelju analize varijance skupa				

Koncentracija od 1 do 5 mg ZEN-a/kg hrane za svinje dovodi do pojave kliničkih simptoma i hiperestrogenizacije pri 1 mg ZEN-a/kg hrane za svinje. Nazimice hranjene hranom za svinje prethodno kontaminiranom ZEN-om pri koncentraciji od 0,25 mg ZEN-a/kg hrane imale su simptome poput crvenila i otečenja vulve, otečenja mamarnih kompleksa te pojave vezikularnih i cističnih folikula na ovarijima. Navedeni simptomi nestaju nakon hranjenja svinja hranom slobodnom od ovog mikotoksina (LIU i APPLGATE, 2020.).

Ovaj mikotoksin dovodi do inhibicije stvaranja folikularno stimulirajućeg hormona (FSH), što posljedično sprječava ovulaciju. Prilikom izlaganja svinja visokim koncentracijama ZEN-a u hrani kod nazimica se uočava učestalija pojava različitih simptoma. Primjećuje se pojava lažnih trudnoća, anestrija, smrtnosti i resorpcije embrija, oteknete edematozne vulve, učestali prolaps vagine i rektuma te smanjen broj prašćića u leglu (LIU i APPLGATE, 2020.). ZEN ima afinitet prema žutom tijelu pa dolazi do porasta koncentracije progesterona u krvi i pojavi „lažne“ trudnoće i anestrije (PLEADIN i sur., 2018.). Među ostalim simptomima pojavljuju se i produljenje trajanja estrusa, pobačaji, mrtvorodenja, smanjenje legla, mumifikacije, smanjenje libida (VISCONTI i PASCALE, 1998.).

Glavni klinički simptom prilikom trovanja svinja ZEN-om i njegovim metabolitima je hiperestrogenizam, prikazano na Slici 2 (MALLMANN i DILKIN, 2007.).



Slika 2, Intoksikacija zearalenonom (A) kontrolne nazimice (nisu bile izložene ZEN-u). (B) Nazimice s vulvovaginitisom nakon intoksikacije sa 2 mg ZEN-a/kg hrane kroz 24 dana (MALLMAN i DILKIN, 2007.).

## 2. 6. Ostali učinci ZEN-a u svinja

Prema istraživanju krmače i nerasti koji su dobivali pročišćeni ZEN oralno u dozama 5, 10, 15 mg/g nakon tjedan dana su imali znakove toksikoze, nerasti smanjenu masu penisa, sjemenovoda i mokraćnog trakta, bulbouretralne žlijezde i adrena, dok su krmače imale povećane reproduktivne organe (maternični rogovi, vrat maternice, rodnica) do četiri puta (FARNWORTH i TRENHOLM, 1983.).



Prilikom hranjenja krmača sa koncentracijom od 1,3 mg ZEN-a/kg hrane došlo je do smanjenja broja trombocita, hemoglobina, globulina, triglicerida i lipoproteina visoke gustoće u serumu te je došlo do povećanja enzimske aktivnosti i do degeneracije jetre i bubrega (JIANG i sur., 2010.).

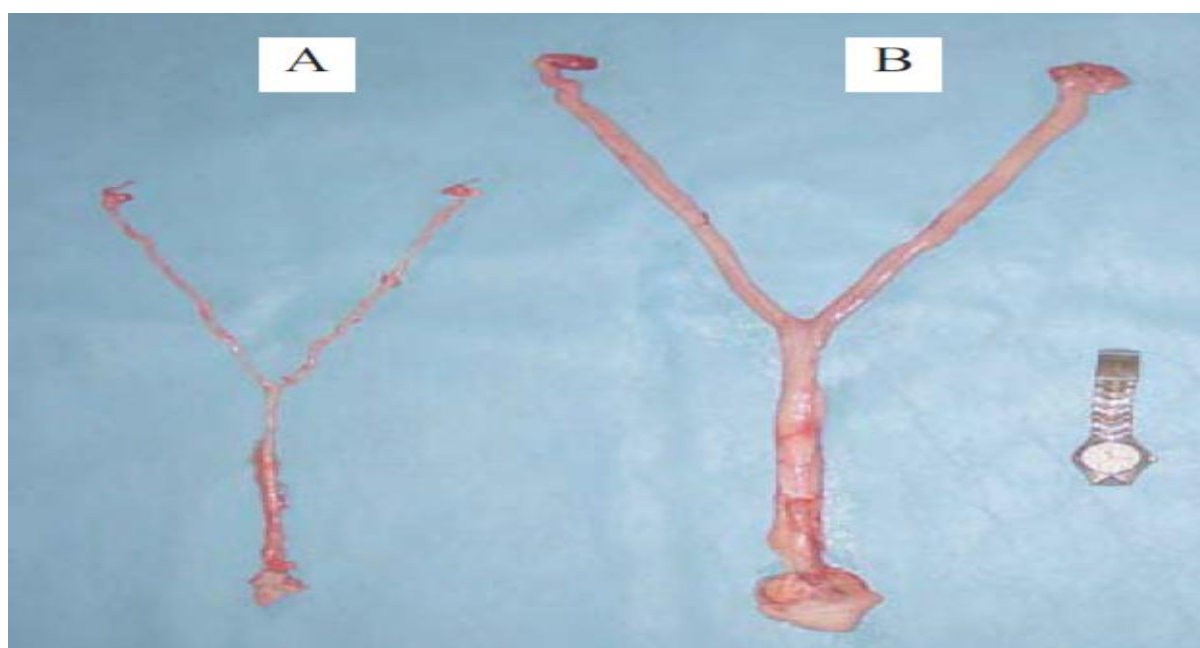
U Tablici 3, prikazan je različiti utjecaj zearalenona na reprodukciju farmških životinja. U nazimica kao najosjetljivijih životinja već pri malim dozama od 1,5 do 2 mg ZEN-a/kg hrane za svinje dolazi do hiperemije i otečenja stidnice, atrofije jajnika, povećanja maternice i prolapsa rodnice (EDWARDS i sur., 1987a). U krmača su potrebne veće doze da bi se javili klinički simptomi slični onima koji se javljaju kod nazimica. U krmača je zabilježena nimfomanija, pseudogravidnost, atrofija jajnika i degenerativne promjene endometrija. U nerasta već pri manjim dozama ZEN-a dolazi do smanjenja koncentracije testosterona, težine testisa i spermatogeneze pa posljedično nerasti pokazuju znakove feminizacije i smanjeni libido (MIRAGLIA i sur. 1998., PEPELJNJAK i sur., 2008.).

Tablica 3, Utjecaj zearalenona na reprodukciju farmških životinja (SAMARDŽIJA i sur., 2017.).

<b>Tablica 3, Utjecaj zearalenona na reprodukciju farmških životinja</b>			
Farmske Životinje	Doza ZEN (mg/kg)	Klinički znaci	Literatura
<u>Svinje</u>			
Prasad Nazimice	< 10	<b>edem stidnice, estrus, produženi interval između ciklusa</b>	EDWARDS i sur., 1987.a, EDWARDS i sur., 1987.b.
Gravidne krmače	25	<b>mali broj živooprasene prasadi, pseudograviditet</b>	EDWARDS i sur., 1987.b, GUTZWILLER i sur., 2009., KANORA, 2009.
Krmače u laktaciji	> 50	<b>promijenjen estrusni ciklus, atrofija jajnika</b>	EDWARDS i sur., 1987.a.
Nerasti	< 10	<b>smanjena pokretljivost spermija</b>	TSAKMAKIDIS i sur., 2008., GUTZWILLER i

			sur., 2009.
	> 20	<b>smanjeni libido i veličina testisa</b>	GUTZWILLER i sur., 2009.
<u>Goveda</u>			
Junice	5	edem vimena, vaginitis, smanjena koncepcija	ZINEDINE i sur., 2007., KANORA, 2009.
Krave	10-20	smanjena koncepcija, pobačaj	ZINEDINE i sur., 2007., KANORA, 2009.

Prilikom intoksikacije svinja sa 2 mg ZEN-a/kg u hrani tijekom 24 dana nastale su promjene reproduktivnog sustava. Promjene su okarakterizirane nakupljanjem tekućine, nastankom intersticijskih edema, proliferacijom stanica i metaplazijom skvamoznih epitelnih stanica vrata maternice i vagine. Vulva, vagina, vrat maternice i maternica su otečeni zbog kombinacije edema prilikom stanične hipertrofije te i hiperplazije dijelova njihovih struktura, prikazano na Slici 3, (MALLMANN i DILKIN, 2007.).



Slika 3, Normalni reproduktivni sustav krmača (A) te povećani reproduktivni trakt nakon ZEN intoksikacije sa 2 mg/kg u hrani kroz 24 sata (B) (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

#### 2. 7. Rezidue ZEN-a u tkivu i mlijeku životinja

Količina ZEN-a u tkivu ovisi o koncentraciji toksina unesenog hranom, vremenu izlaganja i životinjskoj vrsti. Prilikom hranidbe svinja s hranom kontaminiranom sa po 40 mg

ZEN-a/kg hrane dobivene su koncentracije ovog mikotoksina od po 78 do 128  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg jetre. U kokoši hranjenih sa po 100 mg ZEN-a/kg hrane izmjerena je koncentracija ZEN-a od 103 do 681  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg mišićnog tkiva i jetre. Prema *International Committee of Risk Evaluation to Mycotoxin Exposure-u* određeno je da granice rezidua ZEN-a u hrani animalnog podrijetla za ljudsku prehranu iznose 10  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg jetre i 2  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg mišićnog tkiva (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

Prilikom hranjena mliječnih krava hranom koja je kontaminirana s koncentracijom ZEN-a od po 12 mg ZEN-a/kg tjelesne težine dolazi do eliminacije ovog mikotoksina i njegovih metabolita mlijekom. U istraživanju su izmjerene koncentracije ZEN-a i njegovih metabolita u mlijeku te su bile 6,1  $\mu\text{g}$  ZEN-a/L mlijeka, 4  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -ZEL-a/L mlijeka i 6,6  $\mu\text{g}$   $\beta$ -ZEL-a/L mlijeka. U mlijeku mliječnih krava koje su prethodno hranjene s hranom koja sadrži 0,1 do 0,33 mg ZEN-a/kg tjelesne mase nisu detektirani ZEN i njegovi metaboliti (MALLMANN i DILKIN, 2007.).

## 2. 8. „Carry-over“ efekt na farmama svinja u Hrvatskoj

Pojam „carry-over“ predstavlja prijenos mikotoksina iz hrane za životinje u tkiva životinja koja se koriste u ljudskoj prehrani u slučajevima korištenja krmiva koja su kontaminirana mikotoksinima (SAMARDŽIJA i sur., 2017.).

Istraživanjem provedenim na farmama svinja u Hrvatskoj 2014. godine na 253 uzorka krmiva ustanovljene su visoke koncentracije ZEN-a za kukuruz 5522  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg kukuruza, za pšenicu 3366  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg pšenice i u dopuni krmivima 1949  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg dopune krmivima te su prikazani u Tablici 4. Na jednoj od farmi je ustanovljen hiperestrogenizam u svinja te su uzeta po 30 uzoraka urina (sa prosječnom koncentracijom od po 206  $\mu\text{g}$  ZEN-a/mL urina) i mesa (sa prosječnom koncentracijom 0,62  $\mu\text{g}$  ZEN-a/kg mesa). U hrani za svinje najveća koncentracija ZEN-a određena je u kukuruzu te je bila 2 puta veća vrijednost od preporučene. U hrani za tov svinja najveća izmjerena koncentracija ZEN-a je bila 8 puta veća od preporučene. U mesu je izmjerena koncentracija ZEN-a koja je 10 puta niža od one u urinu, to je prikazano u Tablici 5. (PLEADIN i sur., 2015.).

Tablica 4, Koncentracija ZEN-a u hrani za svinje prikupljene sa farmi u Hrvatskoj 2014. godine (PLEADIN i sur., 2015.).

<b>Tablica 4, Koncentracija ZEN-a u žitaricama i hrani za životinje skupljeni u Hrvatskoj na farmama 2014. godine</b>							
Uzorci	Preporučene vrijednosti'	N	Broj pozitivnih	Prosjek ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	SD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Min~ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Max ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

	( $\mu\text{g/kg}$ )		uzoraka“				
Kukuruz	3000	151	5	411	860	2,21	5522
Pšenica	2000	17	1	275	832	4,72	3366
Ječam	2000	13	0	1,78	2,46	2,30	8,07
Silaža	200+0	14	0	102	203	3,28	753
Hrana za prasad	100	20	0	21,5	21,8	2,04	63,2
Hrana za tov	250	38	3	117	355	2,17	1949
*Preporučene vrijednosti Europske komisije (2006/576/EC)							
“Uzorci ZEN-a s koncentracijom višom od preporučene							
~Minimalna vrijednost pozitivnih uzoraka							

Tablica 5, Koncentracija ZEN-a prirodno izloženih svinja u urinu ( $\mu\text{g/L}$ ) i mesu ( $\mu\text{g/kg}$ ) (PLEADIN i sur., 2015.).

<b>Tablica 5, Koncentracija ZEN-a u urinu (<math>\mu\text{g/L}</math>) i mesu (<math>\mu\text{g/kg}</math>) skupljenih od prirodno izloženih svinja</b>						
Uzorci	Spol	N	Aritmetička sredina $\pm$ SD	Srednja vrijednost	Min	Max
Urin	Mužjaci	11	238 $\pm$ 30,0	205	104	350
	Ženke	19	187 $\pm$ 27,1	154	22,7	390
Meso	Mužjaci	11	0,80 $\pm$ 0,36	0,34	< 0,28	4,31
	Ženke	19	0,51 $\pm$ 0,07	0,30	< 0,28	1,09
N Broj uzoraka						

U prethodnom istraživanju u sklopu *National Control Program* sakupljeni su uzorci hrane za životinje i urina sa farmi u različitim regijama Hrvatske. Ukupno je uzeto i analizirano 114 uzoraka od kojih je 64 uzoraka bila hrana za životinje svinje i goveda te 50 uzoraka urina svinja, goveda i mladih konja. Unatoč visokoj koncentraciji ZEN-a u uzorcima urina, zabilježena je 10 puta manja koncentracija u mesu i krvi (VULIĆ i sur., 2012.).

U Istraživanju provedenom u 4 različite regije u Hrvatskoj 2015. godine na farmama mliječnih krava, određivan je „carry-over“ efekt iz hrane kontaminirane *Fusarium* mikotoksinima u mlijeko mliječnih krava. Uzeto je po 56 uzoraka hrane i po 105 uzoraka mlijeka mliječnih krava. Izmjerene koncentracije zearalenona, deoksinovalenona i fumonizina mjerena su ELISA metodom. Izmjerena koncentracija ZEN-a je bila viša od preporučene u 9,5 % uzoraka kukuruzne silaže. ZEN je izmjeren u 94,3 % uzoraka mlijeka u koncentracijama od 0,3 do 88,6  $\mu\text{g}$  ZEN-a/L mlijeka. Prema TDI određenim za dnevni unos

ZEN-a, ljudsko zdravlje nije bilo ugroženo ni u najvišim izmjerenim koncentracijama ZEN-a u mlijeku mliječnih krava (PLEADIN, J. i sur., 2017.).

U Tablici 6, prikazane su svinje kroz različite raspone tjelesne mase koje su bile izložene različitim koncentracijama ZEN-a tijekom vremenskih intervala različite duljine te je prikazan „carry-over“ efekt ZEN-a i njegovih metabolita u različita tkiva (LIU, J. i T. APPLEGATE, 2020.).

Tablica 6, Metaboliti i „carry-over“ efekt svinja hranjenih hranom kontaminiranom ZEN-om (LIU i APPLEGATE, 2020.).

<b>Tablica 6, Metaboliti i „carry-over“ efekt ZEN-a u svinja</b>					
<b>Vrsta</b>	<b>ZEN konc. (mg/kg u hrani)</b>	<b>Dani</b>	<b>Metaboliti i „carry-over“ u tkiva (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> i <math>\mu\text{g}/\text{L}</math>) &lt; limita kvantifikacije (l.k.)'</b>	<b>Obilježja</b>	<b>Literatura</b>
<u>Prasica (8-11 kg tj.m.)</u>	40	28	Jetra, ZEN 128, $\alpha$ -ZEL 94 i $\beta$ -ZEL < l.k.	Konjugati nisu zabilježeni	JAMES i SMITH, 1982.
<u>Prasad (cca. 18 kg tj.m.)</u>	0,5 mg/kg tj.m.	Bolus	Jetra, bubrezi, mišići: ZEN, $\alpha$ -ZEL i $\beta$ -ZEL < l.k. (poslije inkubacije glukoronidazom)	ZEN: l.k., $\alpha$ -ZEL i $\beta$ -ZEL 0,8-9,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	ENDERS, 1984.
<u>Svinja (oko 50 kg tj.m.)</u>	1) ZEN: 0,25 2) ZEN: 0,25+ OTA 0,1	90	1) Jetra, bubrezi, mišići, adipozno tkivo: ZEN i $\alpha$ -ZEL < l.k. 2) Jetra, bubrezi $\alpha$ -ZEL (max. 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ poslije inkubacije glukoronidazom), ZEN < l.k.; mišići i		LUSKY i sur., 1997.

			adipozno tkivo: ZEN i ZAN < l.k.		
<u>Svinje</u> (cca. 70 kg tj.m.)	0,7	18	Jetra: ZEN <l.k. -3,1; $\alpha$ -ZEL 3,6-12; $\beta$ -ZEL 1,9-4,8; Mišići: $\alpha$ -ZAL > 13,3; $\alpha$ -ZEL > 14.5; tragovi ZEN-a i $\beta$ -ZAL; ZEN and ZAN < l.k.		ZÖLLNER i sur., 2002.
Prasad (cca. 33 kg tj.m.)	0,01; 0,06; 0,15; 0,22; 0,42	35	Jetra (poslije inkubacije s $\beta$ -glukoronidaza i sulfataza) 1,8 ZEN + 0,3 $\alpha$ -ZEL; 0,2 ZEN + 0,1 $\alpha$ -ZEL; 2,1 ZEN + 1,1 $\alpha$ -ZEL; 2,9 ZEN + 1,7 $\alpha$ -ZEL; 5,3 ZEN + 2,8 $\alpha$ -ZEL;		DÖLL i sur., 2003.
<u>Prasad</u> (cca. 33 kg tj.m.)	1 mg/kg tj.m.	Bolus	Jetra (14 dana nakon bolusa, nakon inkubacije s $\beta$ -glukuronidazom i sulfatazom): ZEN, $\alpha$ -ZEL i $\beta$ -ZEL < l.k.		DÄNICKE i sur., 2005.
<u>Svinje</u> (prasice i tovljenici)	0,056	84	Jetra: $\alpha$ -ZEL je jedini detektiran sa prosjekom od 0,0094; ZEN, $\alpha$ -ZEL i $\beta$ -ZEL nisu pronađeni u serumu	Rezidue ZEN + $\alpha$ -ZEL + $\beta$ -ZEL bili su pozitivno povezani u jetri i žuči (jetra je	GOYARTS. i sur., 2007.

				pokazala 0,9 % „carry- over“ efekt)	
--	--	--	--	---	--

## 2. 9. Pojavnost bolesti u različitim životinja i ljudi izloženih fumonizin mikotoksinima

Fumonizin mikotoksine u najvećem postotku pronalazimo u kukuruзу i krmu te su povezani sa oštećenjem jetre i nekim tipovima neoplazija. Fumonisin B1 (FB1) je klasificiran od strane IARC u grupi 2B te ima kancerogen potencijal u ljudi (IARC, 1993.).

U nerazvijenim zemljama gdje je postotak konzumacije kukuruza i njegovih prerađevina visok te i s tim pojavnost fuminozina, dovodi se u povezanost s pojavom većeg broja djece sa poteškoćama u razvoju (CHEN i sur., 2018.). U ljudi kod ezofagealnog tumora visoka je učestalost pronalaska fuminozin mikotoksina, što može ukazivati da ovi mikotoksini imaju ulogu u nastanku neoplazija (COME i sur., 2019.). Konzumiranjem hrane kontaminiranom ZEN-om tijekom trudnoće moguć je prelazak ZEN-a i njegovih metabolita preko posteljice (WARTH i sur., 2019.).

Fumonizin mikotoksini u životinja mogu uzrokovati bolesti kao što su leukoencephalomalacija u konja i u svinja plućni edem (MARASAS i sur., 1988., HARRISON i sur., 1990.).

U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da ZEN može dovesti do smrti Sertolijevih stanica u miševa prilikom izlaganja reaktivnom kisiku i ATP/AMPK putevima (ZHENG i sur., 2018.). Mehanizmi koji potiču apoptozu Leydigovih stanica u koza uzrokovanu ZEN-om nastaju zbog nastanka stresa na endoplazmatski retikulum i aktivacije autofagije (YANG i sur., 2017.).

## 2 10. Zakonodavstvo Europske unije

Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 definirane su najveće dopuštene količine ZEN-a u različitim vrstama hrane. ZEN se u određenoj mjeri prenosi iz hrane koju su životinje konzumirale u mlijeko, meso i jaja te zbog toga hrana animalnog podrijetla doprinosi sveukupnoj izloženosti ljudi navedenom mikotoksinu. Oriјentacijske vrijednosti (mg/kg) kao najveće preporučene vrijednosti ZEN-a u hrani za životinje s udjelom vlage od 12 %, dane su kao preporuke Komisije Europske unije (2006/576/EC) te su prikazane u Tablici 7.

Tablica 7, Preporuke Komisije Europske unije (2006/576/EC).

	Proizvodi namijenjeni za hranjenje životinja	<b>Orijentacijske vrijednosti ZEN-a u mg/kg za hranu za životinje s udjelom vlage 12%</b>
Krmiva	Žitarice i produkti žitarica (bez kukuruznih nusproizvoda)	2
	Kukuruzni nusproizvodi	3
Krmne smjese i dopune	Prasad i nazimice	0,1
	Tovne svinje i krmače	0,25



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3. 1. Uzorci

Uzorci hrane za svinje (n=3) te urina (n=15) i mesa (n=15) uzorkovani su s tri svinjogojske farme u Republici Hrvatskoj. Sa svake farme uzet je uzorak hrane za tovne svinje u količini od 500 do 1000 g u tri uzorka. Uzorci urina (50 mL) i mišića-mesa (200 g) uzeti su od po 15 svinja u fazi klanja sa svake od triju farmi. Životinje su tijekom hranidbe primale hranu za tovne svinje te je prvotno sa svake farme analizirana količina ZEN-a u hrani, a potom su na klanju uzeti uzorci urina i mesa, koji su također analizirani na prisutnost ZEN-a.

#### 3 .2. ELISA metoda za određivanje ZEN-a

##### 3. 2. 1. Oprema i pribor

kemijski analizator, *ChemWell 2910, Awareness Technology Inc.*,  
homogenizator, *Grindomix GM 200, Retsch*,  
digitalna vaga, *AND GF 2000*,  
tresilica *IKA HS 260 Control*,  
centrifuga, *Universal 120R, Hettich*,  
mlin, *TECATOR Cylotec 1093 Sample Mill, Höganäs*,  
hladnjak od 2 do 8 °C, LTH,  
jednokanalne mikropipete 10-100 µL i 100-1000 µL, *Eppendorf Research*,  
Erlenmeyer tikvice sa ubrušenim čepom,  
stakleni lijevci,  
filtrar papir (Whatman No. 1)

##### 3. 2. 2. Sadržaj KITA ZEN

Kemikalije za ovu metodu sadržane su u kitu Zearalenon, R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka, koji uključuje mikrotitracijsku ploču s 96 jažica (12 redova s po 8 jažica), šest standardnih otopina zearalenona (1,3 mL) koncentracije: 0 ppt, 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt i 4050 ppt, enzimski konjugat (0,7 mL), koncentrat, supstrat (7 mL), kromogen (7 mL), stop otopinu-1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (14 mL) i pufer za razrjeđivanje (50 mL).

##### 3. 2. 3. Mjere predostrožnosti pri rukovanju kitom

Mjere predostrožnosti uključuju sljedeće: kit treba čuvati pri temperaturi od 2 do 8 °C; ne zamrzavati komponente iz kita; prije uporabe sadržaj kita temperirati na sobnu temperaturu (od 18 do 25 °C); vratiti sve neupotrijebljene jažice u njihovu originalnu vrećicu na temperaturu od 2 do 8 °C, supstrat je osjetljiv na svjetlost te treba izbjegavati njegovo

izlaganje direktnoj svjetlosti; nakon isteka roka trajanja naznačenog na kitu ne preporuča ga se koristiti; nije dozvoljena zamjena pojedinih reagensa između kitova različitih lotova; obojenje otopine supstrata prije primjene testa ukazuje na nestabilnost i raspadanje reagensa; na raspadanje reagensa ukazuje i vrijednost apsorbancije (450 nm) nultog standarda niža od 0,6; stop otopina sadrži sumpornu kiselinu te treba paziti da ne dođe u dodir s kožom.

#### 3.2.4. Priprema reagensa

- 70 %-tna otopina metanola: razrijedi se 70 mL metanola s 30 mL destilirane vode, potrebno je svaki puta pripremiti svježu 70 %-tnu metanolnu otopinu,
- 40 %-tna otopina metanola: razrijedi se 40 mL metanola s 60 mL destilirane vode,
- 80 %-tna otopina metanola: razrijedi se 80 mL metanola s 20 mL destilirane vode,
- 50 mM Na-acetat pufer, pH 4,8: otopi se 0,41 g Na-acetata u 100 mL destilirane vode te podesi pH na 4,8 s 20 %-tnom octenom kiselinom,
- 20 mM TRIS-HCl pufer, pH 8,5: metanol/tris-HCl (20/80 v/v), otopi se 2,42 g tris-(hidroksimetil)-aminometana u otprilike 700 mL dest. vode uz 200 mL metanola (100 %-tnog), podesi se pH na 8,5 s 5 M HCl i nadopuni do 1000 mL s destiliranom vodom.

#### 3.2.5. Princip metode

ZEN se ekstrahira iz uzorka otopinom metanola te se dobiveni ekstrakt filtrira. Tako dobiveni filtrat koristi se za ELISA metodu. Određivanje ZEN-a temelji se na kompetitivnom (inhibicijskom) vezivanju.

#### 3.2.6. Priprema uzorka za analizu

##### 3.2.6.1. Priprema uzoraka hrane za svinje

Uzorci hrane za svinje usitnjeni su, čuvani na hladnom mjestu i zaštićeni od svjetla. Izmiješano je po 5 g uzorka sa 25 mL 70 % otopine metanola, energično miješano tri minute (ručno ili pomoću miješalice < 400 o/min), uzorak je ostavljen da odstoje od 2 do 3 minute, a ekstrakt je profiltriran kroz Whatman filter br. 1 te je potom razrijeđen u omjeru 1:7 (1+6) puferom za razrjeđivanje.

##### 3.2.6.2. Priprema uzoraka urina

Uzeto je po 0,5 mL uzorka urina te razrijeđeno s 3 mL 50 mM Na-acetatnog pufera (pH 4,8), dodano 8 µL glukoronidaze/sulfataze (*Helix pomatia*) i hidrolizirano 3 sata na 37 °C (u vodenoj kupelji).

Hidrolizirani uzorak pročišćen je na RIDA C18 kolonicama za kruto-faznu ekstrakciju. Kolonica je isprana s 3 mL metanola (100 %) pri protoku 1 mL/min, uravnotežno je s 2 mL 20 mM tris pufera pH 8,5 /metanol (80/20 v/v), nanesen je hidrolizirani uzorak urina (oko 3,5 mL), isprano s 2 mL 20 mM tris pufera pH 8,5/metanol (80/20 v/v), zatim isprano s 3 mL metanola (40 %), uklonjena je sva tekućina propuhivanjem zraka i sušenjem kolonice 1 min., te je eluirano s 1 mL metanola (80 %). Eluat je uparen do suhog u struji dušika na 60 °C, a rezidue ZEN-a su otopljene u 50 µL metanola i 450 µL pufera za razrjeđivanje uzoraka (pufer iz kita) i dobro protreseno. 50 µL pripremljenog uzorka korišteno je u analizi.

### 3. 2. 6. 3. Priprema uzorka mesa

U 2 g homogeniziranog uzorka mesa dodano je 3 mL 50 mM Na-acetatnog pufera (pH 4,8) i 8 µL glukoronidaze/sulfataze (*Helix pomatia*) i hidrolizirano 3 sata na 37 °C (u vodenoj kupelji). Zatim je dodano 7 mL metanola i dobro protreseno 20 min., centrifugirano na 3500 o/min, pri od 20 do 25 °C. Dobiveni supernatant (2 mL) razrijeđen je sa 2 mL destilirane vode, a zatim je dodano 3 mL diklormetana i protreseno 60 sec. te centrifugirano na 3500 o/min, pri od 20 do 25 °C. Gornji vodeni sloj u potpunosti je uklonjen, a donji sloj diklormetana uparen je do suhog u struji dušika na 60 °C. Rezidue ZEN-a su otopljene sa 2 mL pufera (pufer iz kita) i 1 mL izooktana te je sadržaj dobro protresen 30 sec. i centrifugiran na 3500 o/min pri od 20 do 25 °C. Gornji sloj je uklonjen te je pipetirano 450 µL pufera (donjeg sloja), te je dodano 50 µL metanola i promiješano i 50 µL pripremljenog uzorka koristio se u analizi ZEN-a.

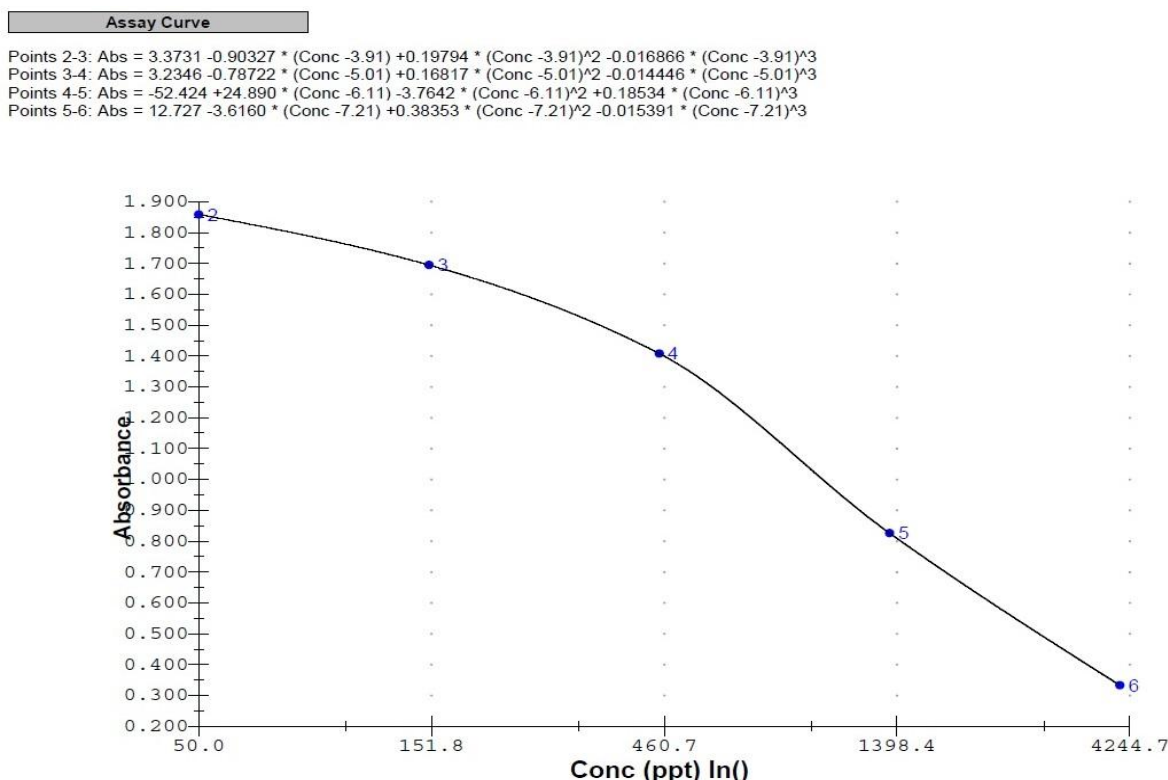
### 3. 2. 7. Test procedura

Test procedura provodi se prema uputi proizvođača ELISA kita Zearalenona, R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka, kako slijedi: pripremi se mikrotitracijska ploča s dovoljnim brojem jažica tako da standardi i uzorci budu postavljeni u duplikatima te se odredi položaj svakog od njih; doda se 50 µL otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redosljedu u jažice; doda se 50 µL razrijeđenog enzimskog konjugata u svaku jažicu koristeći multikanalnu pipetu, inkubira se na sobnoj temperaturi (od 20 do 25 °C) 2 sata u mraku; cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica; u sve jažice doda se po 250 µL destilirane vode i ponovno se ukloni tekućina te lupka o sloj papira; ispiranje je potrebno ponoviti 3 puta; doda se 50 µL supstrata i 50 µL kromogena korištenjem multikanalne pipete; inkubira se u mraku na sobnoj temperaturi 30 min.; doda se 100 µL stop otopine u svaku jažicu; ploča se lagano protrese i mjeri pri valnoj duljini od 450 nm u roku od 30 minuta nakon dodatka stop otopine.

### 3. 2. 8. Izračun koncentracije ZEN

Nakon analize pristupa se određivanju koncentracije ZEN u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog, odnosno nultog standarda (0 mg/kg) i množe se sa 100, te se dobiju postotci apsorbancije. Prema tome nulti standard je jednak 100 %.  $A/B \times 10 = C$  gdje je A apsorbancija standarda (ili uzorka), B apsorbancija nultog standarda, a C postotak apsorbancije.

Koncentracija ZEN-a u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje koja se crta na semi-logaritamskom grafičkom papiru (provodi se pomoću programa). Na ordinatu su nanese vrijednosti postotka apsorbancije za standardne koncentracije ZEN-a, a na apscisu njegove koncentracije (hrana za svinje i meso  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; urin  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Dobivene rezultate koncentracije ZEN-a očitane iz baždarne krivulje, prikazano na Slici 4, potrebno je pomnožiti s faktorom razrjeđenja, kako slijedi po vrstama analiziranog materijala: 35-hrana za životinje; 1-urin; 5,5-meso. Navedeni koraci izrade baždarne krivulje i izračuna koncentracije ZEN-a provedeni su pomoću računalnog programa kemijskog analizatora.



Slika 4, Baždarena krivulja za računanje koncentracije ZEN-a, dobivena ELISA metodom.

### 3. 2. 9. Statistička analiza izmjerenog ZEN-a u urinu i mesu

Prilikom provođenja statističke analize podataka korišten je programski paket SAS 9.4. (*Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD*). Deskriptivna statistika podataka izračunata je modulom PROC MEANS. Normalnost podataka je testirana

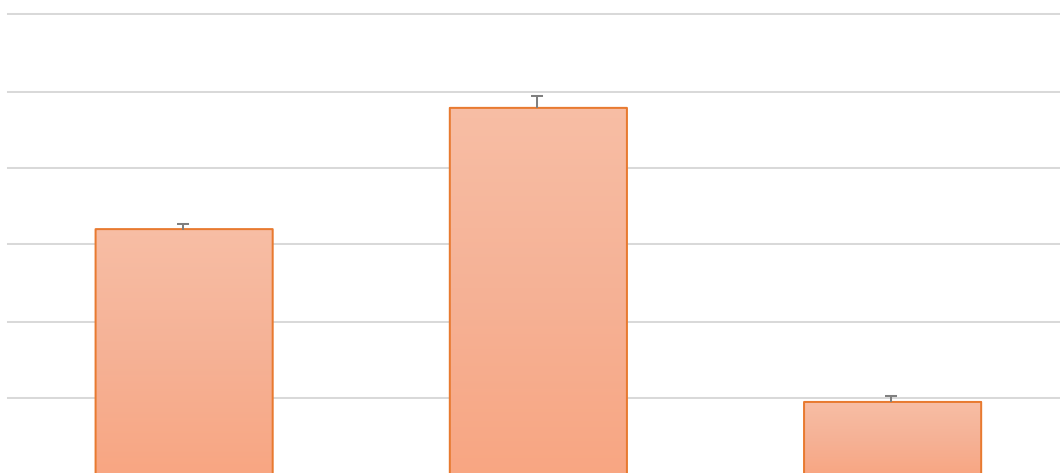
pomoću modula UNIVARIATE. Za analizu ZEN-a između farmi korišten je Kruskal-Wallis test pomoću NPAR1WAY procedure. Za regresijsku analizu vrijednosti ZEN-a u urinu i mesu izračunat je koeficijent determinancije ( $R^2$ ) i linearna regresijska jednačina pomoću REG procedure. Analiza je korištena za prikaz korelacije vrijednosti koncentracija ZEN-a u urinu svinja s koncentracijama određenima u mesu te su podatci prikazani na Slici 8.

#### 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Limit kvantifikacije (LOQ) za hranu za svinje iznosi 2,8 ng/g, za urin 0,1 ng/mL, a za meso 0,4 ng/g.

##### 4. 1. Rezultati istraživanja mjerenja ZEN-a u krmnoj smjesi

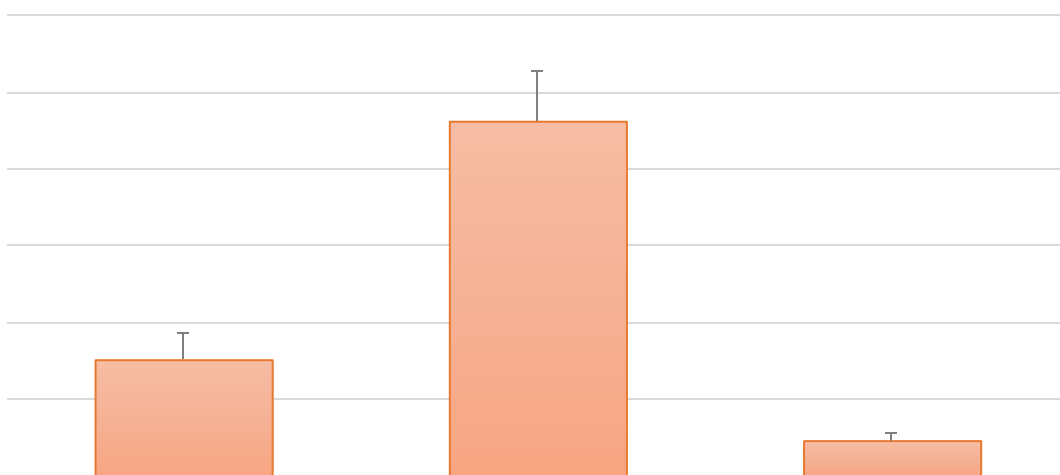
Uzeta su po 3 uzorka krmne smjese i dopune za tovne svinje s 3 farme. Na farmi 1 (F1) najveća koncentracija ZEN-a iznosila je 163,21 ng/g tj. 0,16 mg/kg (prosjeak (A) na F1 je 160,13 ng/g), a na farmi 2 (F2) 248,53 ng/g tj. 0,248 mg/kg (prosjeak (A) na F2 je 239,053 ng/g) te na farmi 3 (F3) 52,15 ng/g tj. 0,05 mg/kg (prosjeak (A) je 47,61 ng/g). Prosječne vrijednosti koncentracija prikazane su na Slici 5. Vrijednosti standardne devijacije (SD) utvrđenik količina ZEN-a u krmnoj smjesi po farmama iznosile su za F1 3,29 ng/g, za F2 8,24 ng/g te za F3 4,47 ng/g.



Slika 5, Prikaz prosječne koncentracije zearalenona i vrijedosti standardne devijacije u uzorcima krmne smjese po farmama uzorkovanja.

#### 4. 2. Rezultati istraživanja mjerenja ZEN-a u urinu

Uzeto je po 15 uzoraka urina s 3 farme. Na farmi 1 (F1) najveća koncentracija ZEN-a iznosila je 40,15 ng/mL (prosjek (A) je 30,36 ng/mL), a na farmi (F2) 116,32 ng/mL (prosjek (A) je 92,46 ng/mL) te na farmi (F3) 13,18 ng/mL ( prosjek (A) je 9,28 ng/mL). Prosječne vrijednosti koncentracija prikazane su na Slici 6. Vrijednosti standardne devijacije (SD) utvrđenik količina ZEN-a za uzorke urina po farmama iznosile su za F1 6,76 ng/mL, za F2 12,98 ng/mL te za F3 2,01 ng/mL.

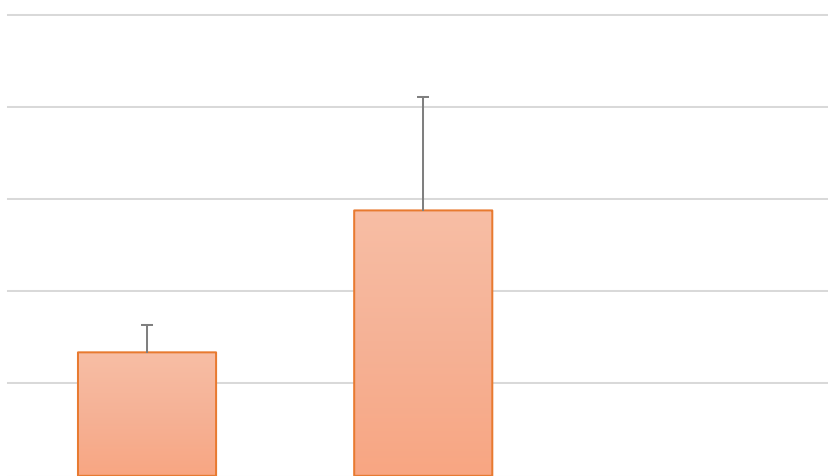


Slika 6, Prikaz prosječne koncentracije zearalenona u uzorcima urina po farmama uzorkovanja.

#### 4. 3. Rezultati istraživanja mjerenja ZEN-a u mesu

Uzeta su po 15 uzoraka mesa s 3 farme. Na farmi 1 (F1) najveća koncentracija ZEN-a iznosila je 0,96 ng/g (prosjeak (A) na F1 je 0,67 ng/g) te četiri uzorka nisu bila mjerljiva, a na farmi (F2) 2,32 ng/g (prosjeak (A) na farmi F2 je 1,44 ng/g) te na farmi (F3) imamo jedan uzorak koji je mjerljiv i on iznosi 0,42 ng/g. Prosječne vrijednosti koncentracija prikazane su na

Slici 7. Vrijednosti standardne devijacije (SD) utvrđenik količina ZEN-a za uzorke mesa po farmama iznosile su F1 0,155 ng/g, F2 0,62 ng/g te za F3 nije bilo dovoljno mjerljivih uzoraka.



Slika 7, Prikaz prosječne koncentracije zearalenona u uzorcima mesa po farmama uzorkovanja.



#### 4. 4. Minimalne i maksimalne koncentracije ZEN-a u uzorcima sa farmi

Uzete su sve izmjerene vrijednosti s 3 farme. Izračunate su minimalne i maksimalne koncentracije ZEN-a u hrani za svinje, urinu i mesu te su prikazane u Tablici 8. Na farmi 1 (F1) min. konc. ZEN-a za hranu za svinje iznosila je 156,65 ng ZEN-a/g hrane za svinje, a max. konc. 163,21 ng ZEN-a/g hrane za svinje. Za urin na farmi 1 (F1) min. konc. iznosila je 17,36 ng ZEN-a/mL urina, a max. konc. 40,15 ng ZEN-a/mL urina. Za meso na farmi (F1) min. konc. iznosila je 0,4 ng ZEN-a/g mesa, a max. konc. 0,96 ng ZEN-a/g mesa.

Na farmi 2 (F2) min. konc. ZEN-a za hranu za svinje iznosila je 233,51 ng ZEN-a/g hrane za svinje, a max. konc. 248,53 ng ZEN-a/g hrane za svinje. Za urin na farmi 2 (F2) min. konc. iznosila je 73,25 ng ZEN-a/mL urina, a max. konc. 116,32 ng ZEN-a/mL urina. Za meso na farmi 2 (F2) min. konc. iznosila je 0,76 ng ZEN-a/g mesa, a max. konc. 2,51 ng ZEN-a/g mesa.

Na farmi 3 (F3) min. konc. za hranu za svinje iznosila je 43,21 ng ZEN-a/g hrane za svinje, a max. konc. 52,15 ng ZEN-a/g hrane za svinje. Za urin na farmi 3 (F3) min. konc. iznosila je 6,25 ng ZEN-a/mL urina, a max. konc. 13,18 ng ZEN-a/mL urina. Za meso na farmi 3 (F3) min. mjerljiva konc. iznosila je 0,4 ng ZEN-a/g mesa, a max. konc. 0,4 ng ZEN-a/g mesa.

Tablica 8, Minimalne i maksimalne koncentracije ZEN-a u uzorcima s farmi.

<b>Tablica 8, Minimalne i maksimalne koncentracije ZEN-a (ng/g; ng/mL)</b>									
	FARMA 1			FARMA 2			FARMA 3		
Uzorci	H	U	M	H	U	M	H	U	M
<b>Min. konc.</b>	156,65	17,36	0,4	233,51	73,25	0,76	43,21	6,25	0,4
<b>Max. konc.</b>	163,21	40,15	0,96	248,53	116,32	2,51	52,15	13,18	0,4
H Hrana za svinje									
U Urin									
M Meso									

#### 4. 5. Korelacija vrijednosti koncentracija ZEN-a u urinu s koncentracijama u mesu

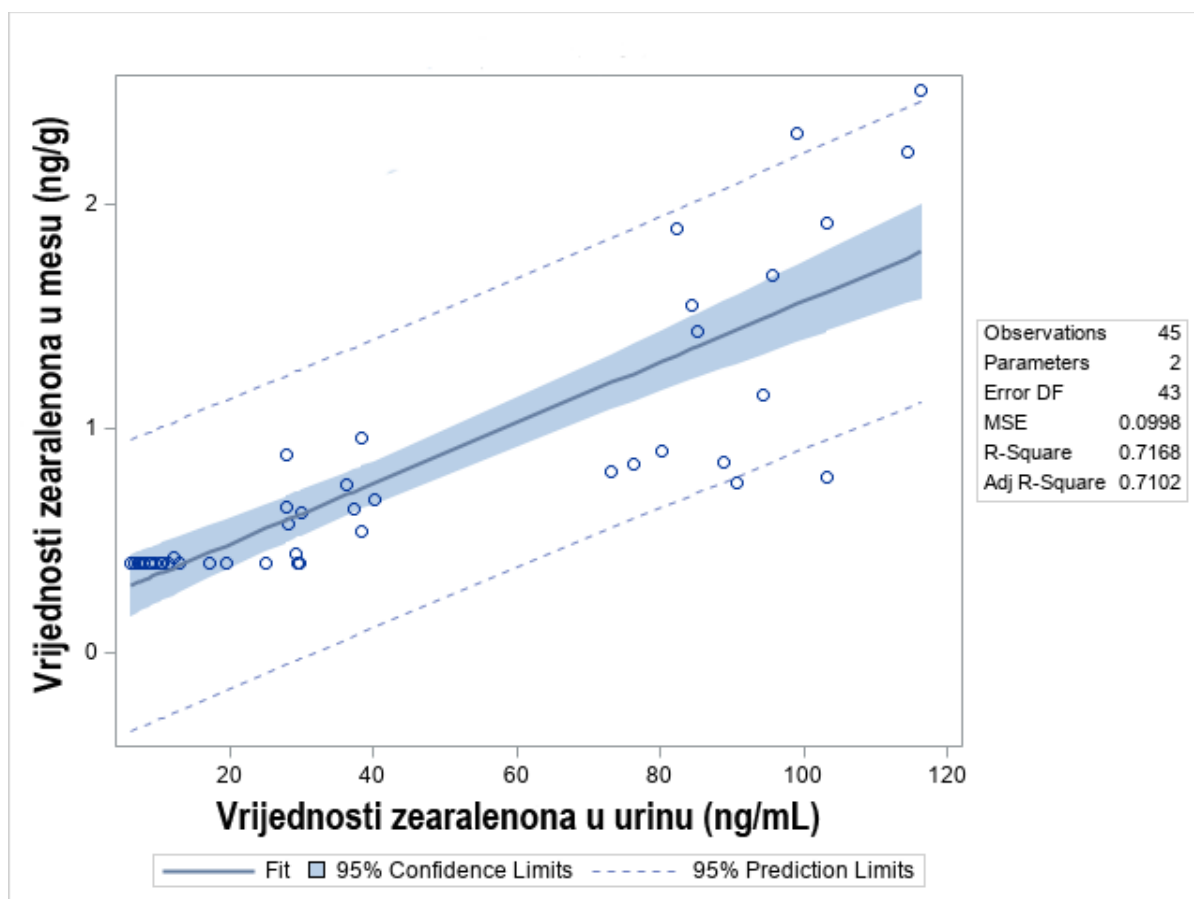
U svrhu utvrđivanja povezanosti koncentracije ZEN-a u urinu s koncentracijom ZEN-a u mesu, uspoređivani su podaci s 3 farme sa kojih je uzeto po 15 uzoraka urina i mesa. Za prikaz njihove povezanosti korištena je linearna regresijska jednačba (1) za izračunavanje vrijednosti ZEN-a u mesu.

$$M \left( \frac{ng}{g} \right) = 0,2115 + 0,0135 * U \left( \frac{ng}{mL} \right) \quad (1)$$

M-ZEN u mesu (ng/g)

U-ZEN u urinu (ng/mL)

Na Slici 8, prikazana je korelacija vrijednosti koncentracija ZEN-a u urinu svinja s koncentracijama određenim u njihovom mesu.



Slika 8, Korelacija vrijednosti koncentracije ZEN-a u urinu s koncentracijama ZEN-a određenim u mesu

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju prikupljeni su uzorci hrane za svinje, urina i mesa iz 2021. godine s 3 svinjogojske farme u Republici Hrvatskoj. Izmjerene vrijednosti zearalenona u hrani za tov svinja iznosile su na farmi 1 - 163,21 ng ZEN-a/g hrane za svinje, na farmi 2 - 248,53 ng ZEN-a/g hrane za svinje, a na farmi 3 - 52,15 ng ZEN-a/g hrane za svinje. Koncentracije ZEN-a u hrani za svinje dobivene u istraživanju sa sve 3 farme bile su unutar dopuštenih granica s obzirom na dopuštenu koncentraciju prema zakonodavstvu Republike Hrvatske.

U istraživanju provedenom u Hrvatskoj od 2014. godine u hrani za svinje koncentracije zearalenona u hrani bile su veće od preporučenih. Srednja vrijednost ZEN-a određena u kukuruza bila je 411 ng ZEN-a/g kukuruza, a najveća izmjerena koncentracija 5522 ng ZEN-a/g kukuruza, što ovu vrijednost čini 2 puta većom od najveće preporučene. U hrani za tov svinja najveća izmjerena koncentracija ZEN-a bila je 1949 ng ZEN-a/g hrane, što je 8 puta više od najveće preporučene prema zakonodavstvu Republike Hrvatske. U 5 uzoraka kukuruza (3.3 %), 1 uzorku pšenice (5,9 %) i 3 uzorka hrane za tov (7,9 %) utvrđene su koncentracije ZEN-a veće od preporučenih, dok u uzorcima ječma, silaže i hrane za prasid nisu pronađene koncentracije ZEN-a veće od preporučenih (PLEADIN i sur., 2015.).

U južnoj Europi i u Sredozemlju zbog temperature i vlage zraka kroz godinu očekuju se povišene koncentracije ZEN-a u hrani za životinje te u prijašnjem istraživanju najveća utvrđena koncentracija ZEN-a u hrani za životinje bila je 2348 ng ZEN-a/g hrane (BINDER i sur., 2007.). U istraživanju provedenom na farmama u Republici Hrvatskoj tijekom 2010. godine utvrđene su visoke koncentracije *Fusarium* mikotoksina u kukuruza koje su veće od preporučenih, što bi se moglo pripisati vremenskim prilikama zabilježenim tijekom tog perioda (PLEADIN i sur., 2012.a, 2012.b.). U prijašnjem istraživanju provedenom na farmama u Republici Hrvatskoj najveća izmjerena koncentracija ZEN-a u hrani za životinje bila je 1949 ng ZEN-a/g hrane te je zabilježena pojavnost hiperestrogenizma na jednoj od farmi koja je sudjelovala u istraživanju. Rezultati tog istraživanja pokazali su visoku koncentraciju ZEN-a u hrani za životinje, što se poklapa s podacima prikupljenima u Državnom hidrometeorološkom zavodu Republike Hrvatske. Prema zabilježenim podacima iz DHMZ-a u regijama iz kojih su uzeti uzorci u tom vremenskom razdoblju temperature su bile niske s visokim postotkom padalina u periodu prije žetve. Prirodna pojavnost ZEN-a u žitaricama prvenstveno u kukuruza govori o važnosti provođenja kontrola koncentracije ZEN-a, naročito tijekom hladnih i kišnih sezona (PLEADIN i sur., 2015.).

U prijašnjim istraživanjima utvrđeno je da je glavni put eliminacije ZEN-a putem urina (DÖLL i sur., 2003.). U životinja praćenje koncentracije ZEN-a u urinu može se

koristiti kao indikator za detekciju kontaminacije hrane ovim mikotoksinom (THIEU i PETTERSSON, 2009., TAKAGI i sur., 2011.). U istraživanju uzeti su uzorci urina i mesa mužjaka i ženki svinja. Srednja vrijednost prikupljenih uzoraka ZEN-a u urinu u svinja bila je  $206 \pm 20,6$   $\mu\text{g/L}$ . Razlika u koncentraciji ZEN-a u urinu između mužjaka i ženki nije bila značajna. Srednja vrijednost ZEN-a u mesu svinja bila je  $0,62 \pm 0,14$   $\text{ng/g}$ . Korelacija između koncentracije ZEN-a pronađena u uzorcima urina i mesa žrtvovanih svinja bila je značajna (PLEADIN i sur., 2015.). Zbog manjka informacija nismo u mogućnosti usporediti i povezati navedena istraživanja., budući da je za valjanu interpretaciju potrebno znati vremenski okvir, početak izloženosti svinja hranom kontaminiranom ZEN-om i vrijeme uzimanja uzoraka za analizu.

U prethodnom istraživanju na nekoliko farmi u Hrvatskoj iz različitih regija koje su bile hranjene sa hranom za svinje kontaminiranom ZEN-om, nasumično su uzeti uzorci urina. Najveća izmjerena koncentracija ZEN-a bila je 241,1  $\text{ng ZEN-a/mL}$  urina, dok je dnevni maksimalni unos (TDI) za ZEN 0,2  $\mu\text{g/kg}$  tjelesne mase. Prema danim podacima najveća koncentracija ZEN-a je 0,06  $\text{ng ZEN-a/g}$  tjelesne mase dnevno, što je 33 % TDI-a te ne predstavlja rizik za ljudsko zdravlje (VULIĆ i sur., 2012.).

TDI za ZEN putem hrane za ljude iznosi 0,25  $\text{ng ZEN-a/g}$  tjelesne mase (EFSA, 2017.). U ovom istraživanju interpretirati će se proizvoljna prosječna kilaža čovjeka i dnevni unos mesa potrošača. Prosječna kilaža čovjeka je 72 kilograma te prema tome dobijemo da je 18  $\mu\text{g ZEN-a}$  dnevni preporučeni unos prema odabranoj kilaži. U ovom istraživanju najveća koncentracija ZEN-a u mesu je 2,51  $\text{ng ZEN-a/g}$  mesa, pretpostavljeni unos mesa na dnevnoj bazi iznosi 150 g. Time se izračunom dobiva 376,5  $\text{ng ZEN-a}$  u obroku mesa tj. 0,376  $\mu\text{g ZEN-a}$  u mesnom obroku. Prema ovom izračunu potrošač ne doseže TDI konzumacijom mesa s farme 2 na kojoj je utvrđena najveća koncentracija. Koncentracija ZEN-a u hrani za tov svinja bila je u okviru preporučenih granica te je time koncentracija ZEN-a u mesu bila niska i sigurna za ljudsku konzumaciju.

U istraživanju iz 2014. godine najveće izmjerene koncentracije u uzorcima bile su 390  $\mu\text{g ZEN-a/L}$  urina tj. 390  $\text{ng ZEN-a/mL}$ , a 4,31  $\text{ng ZEN-a/g}$  mesa, što je prikazano u Tablici 5. Unatoč visokoj kontaminaciji ZEN-om u hrane za svinje, koncentracije ZEN-a u mesu su se pokazale niskima i sigurnima za ljudsku konzumaciju (PLEADIN i sur., 2015.). U ovom istraživanju najveća izmjerena koncentracija ZEN-a u urinu je na farmi 2 i iznosi 116,32  $\text{ng ZEN-a/mL}$  urina, a za meso na farmi 2 i iznosi 2,51  $\text{ng ZEN-a/g}$ . Kontaminacija hrane za svinje ZEN-om bila je u okviru najvećih preporučenih granica te se samim time i koncentracija ZEN-a u mesu pokazala niskom i sigurnom za ljudsku konzumaciju.



## 6. ZAKLJUČCI

Najveća koncentracija ZEN-a u hrani za tov svinja je manja od najvećih preporučenih granica. Provedbom redovnih mjerenja koncentracije ZEN-a u urinu životinja koje se koriste za ljudsku konzumaciju sprječava se moguća izloženost ljudi ovom značajnom kontaminantu. Nužna je provedba redovitih preventivnih mjera prilikom sadnje, obrade i skladištenja žitarica kako bi se moguća kontaminacija hrane za životinje svela na minimum. Posljedično tome smanjuje se i kontaminacija mesa farmskih životinja namijenjenih prehrani ljudi. Koncentracija ZEN-a u mesu životinja u skladu je s dnevnim dopuštenim granicama unosa ZEN-a za ljude, što je bilo i očekivano s obzirom na postavljenu preporučenu granicu ZEN-a u hrani.

Ovim radom dovedena je u korelaciju koncentracija ZEN-a u urinu s koncentracijom u mesu. U daljnjim istraživanjima, s ciljem prikupljanja što preciznijih podataka potrebno je imati spoznaju o trajanju izloženosti jedinki ZEN-u te o vremenu koje je prošlo do trenutka uzimanja uzorka urina i mesa od istih izloženih jedinki.

## 7. LITERATURA

1. ABRAMSON, D. (1998.): Mycotoxin formation and environmental factors. In : Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, Sinha K. K. Bhatnagar, D., Marcel Dekker, New York, pp. 255. - 277.
2. ALEXANDER, J., H. AUTRUP, D. BARD (2004.): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal 89, 1. - 35.
3. BENNET, J. W., M. KLICH (2003.): Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16, 497. - 516.
4. BINDER, E. M. (2007.): Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Animal Feed Science and Technology 133, 149. - 166.
5. CHELOWSKI, J. (1998): *Fusarium* and mycotoxins. In: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, New York, Marcel Dekker, pp. 45. - 64.
6. CHEN C., R. T. RILEY, F. WU (2018.): Dietary fumonisin and growth impairment in children and animals: a review. Food Sci. and Food Safety, 17(6),1448. - 1464.
7. COME, J., E. CAMBAZA, R. FERREIRA, J. DA COSTA, C. CARRILHO, L. L. SANTOS (2019.): Esophageal cancer in Mozambique: should mycotoxins be concern? The Pan African Medical Journal, 33, 187.
8. DÄNICKE, S., J. WINKLER (2015.): Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues („carry-over“). Food Chem. Toxicol. 84, 225. - 249.
9. DÄNICKE, S., E. SWIECH, L. BURACZEWSKA, K. H. UEBERSCHAR (2005.): Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 89, 268. - 276.
10. DOMIJAN, A. M., M. PERAICA, Ž. JURJEVIĆ, D. IVI, B. CVJETKOVIĆ (2005.): Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. Food Add, Contam. 22, 667. - 680.
11. EDWARDS, S., T. C. CANTLEY, B. N. DAY (1987.a): The effects of zearalenone on reproduction in swine. II. The effect on puberty attainment and postweaning, rebreeding performance. Theriogenology 28, 51. - 58.
12. EFSA (2017.): Risk for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed, p. 9.

13. FARNWORTH, E. R., H. L. TRENHOLM (1983.), The metabolism of the mycotoxin zearalenone and its effects on the reproductive tracts of young male and female pigs, pp. 968. - 973.
14. HARRISON L. R., B. M. COLVIN, J. T. GREENE, L. E. NEWMAN, J. R. COLE JR. (1990.): Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2 (3), 217. - 221.
15. IARC (1993.): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, No. 56).
16. JANSSEN, M. M. T., H. M. C. PUT, M. J. R. NOUT (1997.): Natural toxins. In: DE VRIES, J. : Food safety and Toxicity. CRC Press LCC, Florida (Chapter II).
17. JIANG, S. Z., Z. B., YANG, W. R., YANG, J., GAO, F. X. LIU, C. C. CHEN, F., CHI (2010.): Physiopathological effects of zearalenone in post-weaning female piglets with or without montmorillonite clay adsorbent. Livest. Sci., 131, pp. 130. - 136.
18. LIU, J. ,T. APPELEGATE (2020.): Zearalenone (ZEN) in Livestock and Poultry: Dose, Toxicokinetics, Toxicity and Estrogenicity, pp. 1. - 21.
19. MALEKINEJAD, H., R. MAAS-BAKKER, J. FINK-GREMMELS (2006.): Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. Vet. J. 172, 92. - 102.
20. MALLMANN C. A., P DILKIN (2007.), Mycotoxins and mycotoxicosis in Swine, pp. 55. -73.
21. MARASAS W. F., T. S. KELLERMAN, W. C. GELDERBLUM, J. A. COETZER, P. G. THIEL, J. J. VAN DER LUGT (1988.): Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 55 (4), 197. - 203.
22. MIRAGLIA, M., H. P. EGMOND, C. BRERA, J. GILBERT (1998.): Mycotoxins and Phycotoxins in chemistry, toxicology and food safety; Alaken Inc. Fort Collins, Colorado, pp. 363. - 397.
23. MIROCHA, C. J., S. V. PATHRE, T. S. ROBISON (1981.): Comparative metabolism of zearaleone and transmission into bovine milk. Food Cosmet. Toxicol. 19, 25. - 30.
24. MITTERBAUER, R., H. WEINDORFER, R. SAFAIE, M. LEMMENS, P. RUCKENBAUER, K. KUCHLER, G. ADAM (2003.): A sensitive and inexpensive



- yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 805. - 811.
25. PEPELJNIAK, S., M. ŠEVIĆ (2004.): An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. In: A. Logrieco & A. Visconti (Eds), *An overview of toxigenic fungi and mycotoxin in Europe*, pp. 33. - 50.
26. PEPELJNIAK, S., Z. CVETNIĆ, M. ŠEGVIĆ KLARIĆ (2008.): Okratoksin A i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977. - 2007.) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* 50, 147. - 159.
27. PLEADIN, J., V. VASILJ, D. PETROVIĆ (2018.): Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija, pp. 13. - 110.
28. PLEADIN, J., A. VULIĆ, M. ZADRAVEC, T. LEŠIĆ, M. BENIĆ, V. J. TKALEC, N. VAHČIĆ (2015.): Presence of *Fusarium* mycotoxins in feedstuffs and cow milk sampled from Croatian farms during 2015, pp. 102. - 111.
29. PLEADIN, J., M. SOKOLOVIĆ, N. PERŠI, M. ZADRAVEC, V. JAKI, A. VULIĆ (2012.): Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control* 28, 94. - 98.
30. PLEADIN, J., N. VAHČIĆ, N. PERŠI, D. ŠEVELJ, K. MARKOV, J. FRECE (2013.): *Fusarium* mycotoxins occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control* 32, 49. - 54.
31. PLEADIN, J., Ž. MIHALJEVIĆ, T. BARBIR, A. VULIĆ, I. KMETIČ, M. ZADRAVEC, V. BRUMEN, M. MITAK (2014.): Natural incidence of zearalenone in Croatian pig feed, urine and meat in 2014. *Food Add. and Contam., Part B*, pp. 278. - 282.
32. SAMARDŽIJA M., A. JELČIĆ, M. MITAK, J. PLEADIN (2017.): Estrogeni učinci zearalenona u farmskih životinja i opasnosti za zdravlje ljudi i životinja, *Veterinarska stanica* 48 (2), pp. 109. - 118.
33. TAKAGI M., S. UNO, E. KOKUSHI, S. SHIGA, S. MUKAI, T. KURIYAGAWA, K. TAKAGAKI, H. HASUNUMA, D. MATSUMOTO, K. OKAMOTO, F. SHAHADA, T. CHENGA, E. DEGUCHI, J. FINK-GREMMELS (2011.): Measurement of urinary zearalenone concentrations for monitoring natural feed contamination in cattle herds: on farm trials. *Journal Animal Sci.* 89, 287. - 296.
34. THIEU N. Q., H. PETTERSSON (2009.): Zearalenone, deoxynivalenol and aflatoxin B1 and their metabolites in pig urine as biomarkers for mycotoxin exposure. *Mycotoxin Res.*, 25, 59. - 66.

35. VISCONTI, A., M. PASCALE (1998.): Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatog. A* 815, 133. - 140.
36. WARTH, B., M. SULYOK, P. FRUHMANN, F. BERTHILLER, R. SCHUMACHER, C. HAMETNER, G. ADAM, J. FRÖHLICH, R. KRŠKA (2012.): Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method. *Toxicology Letters*, 211 (1), 85. - 90.
37. YANG D., T. JIANG, P. LIN, H. CHEN, L. WANG, N. WANG, F. ZHAO, K. TANG, D. ZHOU, A. WANG, Y. JIN (2017.): Apoptosis inducing factor gene depletion inhibits zearalenone-induced cell death in a goat Leydig cell line. *Reproductive Toxicology*, 67, 129. - 139.
38. ZHENG W. L., B. J. WANG, L. WANG, Y. P. SHAN, H. ZOU, R. L. SONG, T. WANG, J. H. GU, Y. YUAN, X. Z. LIU, G. Q. ZHU, J. F. BAI, Z. P. LIU, J. C. BIAN (2018.): ROS-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by zearalenone in mouse Sertoli cells via ER stress and the ATP/AMPK pathway. *Toxins*, 10 (1), 24.
39. ZINEDINE, A., J. M. SORIANO, J. C. MOLTO, J. MANES (2007.): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1. - 18.
40. ZOLLNER, P., J. JODLBAUER, M. KLEINOVA, H. KAHLBACHER, T. KUHN, W. HOCHSTEINER, W. LINDNER (2002.): Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue and liver samples of pig fed with mycotoxin-contaminated oats. *J. Agri. Food Chem.* 24, 2494. - 2501.

## 8. SAŽETAK

U istraživanju „Estrogeno djelovanje zearaleona i njegove razine u urinu životinja za proizvodnju hrane animalnog podrijetla “ autora Marina Jadrić, određivana je koncentracija zearalenona (ZEN-a) u hrani za tov svinja, njihovom urinu i mesu prethodno hranjenima kontaminiranom hranom. Na 3 farme u Republici Hrvatskoj 2021. godine uzeta su po 3 uzorka hrane za tovne svinje, izmjerene su različite koncentracije ZEN-a na farmama. Najviša izmjerena koncentracija je na farmi 2-248,53 ng ZEN-a/kg hrane za tov. Uzeti su uzorci urina i mesa post mortalno od 15 jedinki sa svake farme (n=45). Na farmi 2, izmjerena je najviša koncentracija ZEN-a u urinu od 116,32 ng ZEN-a/mL urina te je izmjerena i najviša koncentracija ZEN-a u mesu 2,32 ng ZEN-a/g mesa. Sva mjerenja su u dopuštenim granicama postavljenim od strane Europske komisije i EFSE, stoga ne ugrožavaju ljudsko zdravlje.

Ključne riječi mikotoksini, zearalenon, svinje, urin, meso.

## 9. SUMMARY

In this study „Estrogenic activity of zearalenone and its levels in the urine of animals for the production of human food of animal origin“, Marina Jadrić I was determining levels of the zearalenone (ZEN) in food for pigs and in pig urine and pig meat following contaminated feed consumption. Samples were collected from pig farms in Croatia 2021., it was collected 3 samples of food for pigs from each farm, different concentrations were detected on each farm and each sample. Maximal concentration of ZEN was on a farm 2-248,53 ng/kg. Samples of urine and meat were taken post mortem from 15 pigs from each farm (n=45). On the farm 2 was found maximal concentration of ZEN in urine samples 116,32 ng/ mL and as well in meat samples 2,32 ng/g. All measurements are within permissible limits set up by European commission and EFSA, furthermore are safe for human health.

Key word: mycotoxins, zearalenone, fattening pigs, urine, meat.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16.05.1995. godine u Splitu. Osnovnu školu Domovinske zahvalnosti u Kninu sam pohađala od 2002. do 2010. godine. Opću gimnaziju Lovre Montija u Kninu opću sam pohađala od 2010. do 2014. godine. Nakon srednje škole upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2014. do 2023. godine.

Tijekom studija bila sam volonter na Zavodu za kirurgiju Veterinarskog fakulteta.