

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Martina Jurković

**IZLOŽENOST HRVATSKE POPULACIJE SLOBODNOM I
MASKIRANIM OBLICIMA DEOKSINIVALENOLA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, srpanj, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 612.461+577.121(497.5)(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na II. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. studenog 2014.
Voditelj: *prof. dr. sc. Tomislav Klapeć*

IZLOŽENOST HRVATSKE POPULACIJE SLOBODNOM I MASKIRANIM OBLICIMA DEOKSINIVALENOLA

Martina Jurković, 19/9-07

Sažetak: DON je jedan od najčešćih trihotecena u hrani, koje uglavnom proizvodi plijesan *Fusarium graminearum*. Cilj istraživanja bio je odrediti ukupnu izloženost DON-u i derivatima na temelju podataka o konzumaciji namirnica i rezultatima LC-MS/MS analiza ključnih proizvoda. Analizirane su i koncentracije nepromijenjenog DON-a i glukuronidnih metabolita u uzorcima urina prikupljenim od 49 ispitanika. Svrha je bila odrediti utjecaj tipa prehrane (veganskog, lakotoovovegetarijanskog i omnivorskog) na metabolizam i izlučivanje DON-a. Istraživanje je provedeno tijekom tri uzastopna dana, pri čemu su prva dva dana bila pripremni period uz isključivanje hrane koja može sadržavati DON. Trećeg dana konzumirani su proizvodi od žitarica s poznatim razinama DON-a. DON-15-GlcA detektiran je u svim uzorcima urina, koncentracije DON-a su bile ispod LOD-a u 14% uzoraka, dok su koncentracije DON-3-GlcA prelazile LOD vrijednost u samo dva uzorka. Prosječne koncentracije DON-3-GlcA, DON-15-GlcA i DON iznosile su 15,79 ng/mL, 38,98 ng/mL odnosno 4,75 ng/mL. Utvrđeno je da su prosječne stope izlučivanja DON-a i glukuronidacije 75% odnosno 89%. Uparivanjem omnivorskih i veganskih ispitanika i korekcijom rezultata na kreatinin utvrđen je značajno veći udio DON-15-GlcA u urinu vegana u odnosu na omnivore. Osim toga, brojni sastojci hrane povezani s biljnom prehranom bili su u korelaciji s povećanim izlučivanjem DON-a u urinu. Rezultati mogu ukazivati na stimulaciju urinarnog izlučivanja DON-a fitokemikalijama.

Ključne riječi: (*DON, metaboliti, urin*)

Rad sadrži: 146 stranica
28 slika
28 tablica
3 priloga
100 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | dr. sc. <i>Gabriella Kanižai-Šarić</i> , izv. prof. | predsjednik |
| 2. | dr. sc. <i>Ines Banjari</i> , izv. prof. | član |
| 3. | dr. sc. <i>Bojan Šarkanj</i> , doc. | član |
| 4. | dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i> , izv. prof. | zamjena člana |

Datum obrane: 03. srpnja 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Engineering
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 612.461+577.121(497.5)(043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. 2 held on November 25, 2014.

Mentor: *prof. dr. sc. Tomislav Klapeć*

EXPOSURE OF CROATIAN POPULATION TO FREE AND MASKED FORMS OF DEOXYNIVALENOL

Martina Jurković, 19/9-07

Summary: DON is one of the most commonly occurring trichothecenes, produced mainly by *Fusarium graminearum*. The study aimed to determine the total exposure to DON and derivatives based on food information and LC-MS / MS analysis of key products. The concentrations of unchanged DON and glucuronide metabolites in urine samples of 49 volunteers were also analyzed. The purpose was to determine the effect of diet (vegan, lacto-ovovegetarian or omnivorous) on metabolism and excretion of DON. The study was conducted over three consecutive days, with two days of preparatory period with the exclusion of food that could contain DON. On the third day, cereal products with known DON levels were consumed. DON-15-GlcA was detected in all urine samples, DON concentrations were below LODs in 14% of samples, while DON-3-GlcA concentrations exceeded LOD values in only two samples. Average concentration of DON-3-GlcA, DON-15-GlcA, and DON were 15.79 ng/mL, 38.98 ng/mL and 4.75 ng/mL, respectively. The mean rates of DON excretion and glucuronidation were determined to be 75% and 89%. Pairing of omnivorous and vegan subjects and correction to creatinine significantly increased the share of DON-15-GlcA in vegan urine compared to omnivores. Additionally, a number of food components associated with plant nutrition were correlated with increased DON excretion in urine. The results may indicate stimulation of DON urinary excretion pathways by phytochemicals.

Key words: (*DON, metabolite, urine*)

Thesis contains: 146 pages
28 figures
28 tables
3 supplements
100 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Gabriella Kanižai-Šarić</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Ines Banjari</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Bojan Šarkanj</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. <i>Daniela Čačić Kenjerić</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: July 03, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Tomislavu Klapecu na nesebičnoj pomoći, korisnim savjetima i strpljenju prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Posebno zahvaljujem mojoj obitelji, prvenstveno roditeljima koji su mi omogućili da studiram, da postignem ovo što jesam i koji su vjerovali u moj uspjeh, a zatim suprugu i djeci na njihovoj bezuvjetnoj ljubavi, podršci, strpljenju i razumijevanju za sve vrijeme koje nisam mogla provesti s njima. Svima vam hvala od srca jer moj uspjeh ne bi ništa značio bez vas.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. MIKOTOKSINI	5
2.2. TRIHOTECENI	10
2.2.1. DEOKSINIVALENOL	12
2.2.1.1. 3-ACETIL-DEOKSINIVALENOL I 15-ACETIL-DEOKSINIVALENOL	13
2.2.2. MASKIRANI MIKOTOKSINI	14
2.2.2.1. DEOKSINIVALENOL-3-GLUKOZID	17
2.2.2.2. GLUKURONIDACIJA	18
2.3. ZAKONODAVSTVO	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. ZADATAK	23
3.2. MATERIJAL I METODE	23
3.2.1. Procjena izloženosti populacije RH DON-u i derivatima.....	24
3.2.1.1. Uzorkovanje proizvoda na tržištu.....	24
3.2.1.2. Priprema uzoraka i instrumentalna analiza DON-a i derivata.....	27
3.2.1.3. Procjena izloženosti populacije RH slobodnom i maskiranim oblicima DON-a.....	29
3.2.2. Studija izlučivanja DON-a i glukuronidnih metabolita na ispitanicima	30
3.2.2.1. Odabir ispitanika, proizvoda koje će ispitanici konzumirati i prikupljanje uzoraka urina...	30
3.2.2.2. Analiza DON-a i glukuronidnih metabolita u urinu	35
3.2.2.3. Određivanje kreatinina u urinu	35
3.2.2.4. Izračun ukupno izlučenog DON-a i metabolita	36
3.2.2.5. Unos nutrijenata ispitanika	37
3.2.2.6. Statistička obrada	37
4. REZULTATI I RASPRAVA	38
4.1. PROCJENA IZLOŽENOSTI POPULACIJE RH DON-U I DERIVATIMA	39
4.1.1. Unos namirnica koje sadrže DON i derivate	39
4.1.2. DON i derivati u proizvodima od žitarica.....	41
4.1.3. Izloženost populacije RH DON-u i derivatima.....	45
4.2. STUDIJA IZLUČIVANJA DON-A I GLUKURONIDNIH METABOLITA NA ISPITANICIMA	50
4.2.1. DON i glukuronidni metaboliti u urinu	55
4.2.2. Unos nutrijenata i namirnica ispitanika	76
4.2.3. Uparivanje OMN i VEG ispitanika	105
5. ZAKLJUČCI	113
6. LITERATURA	116
7. PRILOZI	125

Popis oznaka, kratica i simbola

3-Ac-DON	3-acetil-deoksinivalenol
15-Ac-DON	15-acetil-deoksinivalenol
AFB1	aflatoksin B1
AFB2	aflatoksin B2
AFG1	aflatoksin G1
AFG2	aflatoksin G2
AFM1	aflatoksin M1
ARfD	akutna referentna doza (engl. <i>Acute Reference Dose</i>)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i>)
D3G	deoksinivalenol-3-glukozid
DOM-1	de-epoksi DON
DON	deoksinivalenol
DON-3-GlcA	deoksinivalenol-3-glukuronid
DON-15-GlcA	deoksinivalenol-15-glukuronid
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (engl. <i>European Food Safety Authority</i>)
EC	Europska komisija (engl. <i>European Commission</i>)
ELISA	imunoenzimski test (engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FFQ	upitnik učestalosti konzumacije (engl. <i>Food Frequency Questionnaire</i>)
HAPIH	Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
HS	Hrvatski sabor
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ILSI	Međunarodni prirodosnanstveni institut (engl. <i>International Life Sciences Institute</i>)
IPCS	Međunarodni program kemijske sigurnosti (engl. <i>International Programme on Chemical Safety</i>)
JECFA	Zajedničko stručno vijeće Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda i Svjetske zdravstvene organizacije o prehrambenim dodacima Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LB	donja granica (engl. <i>lower bound</i>)

LC-MS/MS	tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (engl. <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
LOD	limit detekcije
LOQ	limit kvantifikacije
LOV	lakto-ovovegetarijanci
OMN	omnivori (svejedi)
OTA	ohratoksin A
PMTDI	privremeni maksimalno tolerirani dnevni unos (engl. <i>provisional maximum tolerable daily intake</i>)
SSS	srednja stručna sprema
TDI	tolerirani dnevni unos (engl. <i>tolerable daily intake</i>)
TDS	studija ukupne prehrane (engl. <i>Total Diet Study</i>)
UB	gornja granica (engl. <i>upper bound</i>)
UGT	uridin-difosfat glukuronozil transferaza
uOMN	upareni omnivori
uVEG	upareni vegani
VEG	vegani
VSS	visoka stručna sprema

1. UVOD

Deoksinivalenol (DON) je mikotoksin koji pripada u skupinu trihotecena. Uglavnom ga proizvode plijesni roda *Fusarium*. Infekcija usjeva plijesnima ovog roda ovisi o vremenskim prilikama, a pogoduje joj visoka vlaga u vrijeme cvatnje (JECFA, 2001). DON se javlja uglavnom u žitaricama poput pšenice, ječma, zobi, raži i kukuruza. Zrna žitarica mogu biti kontaminirana na polju ili tijekom skladištenja. Kemijski je stabilan i donekle otporan na toplinsku obradu, te se također može naći u hrani na bazi žitarica (EFSA, 2013a) kao što su proizvodi od brašna, kukuruzne pahuljice, hrana za dojenčad, slad, pivo i druga hrana (Šarkanj i sur., 2010). Osim DON-a, plijesni proizvode i njegove acetilirane derivate: 3-acetil-deoksinivalenol (3-Ac-DON) i 15-acetil-deoksinivalenol (15-Ac-DON) koji se mogu u namirnicama pronaći zajedno s DON-om i njihova razina je obično manja od 10% ukupne količine DON-a.

Deoksinivalenol-3-glukozid (D3G) je biljni metabolit DON-a i spada u skupinu tzv. maskiranih mikotoksina (EFSA, 2013b), kasnije preimenovanih u modificirane mikotoksine (Kovač i sur., 2018; Rychlik i sur., 2014). Mehanizmima detoksikacije, biljke su sposobne konjugirati DON sa šećerima, aminokiselinama ili sulfatnim grupama, pri čemu kao glavni metabolit nastaje D3G. Osim toga, D3G može nastati i tijekom tehnološkog procesa, gdje mehanička ili toplinska energija mogu izazvati značajne modifikacije, uključujući reakcije s makromolekularnim komponentama kao što su šećeri, proteini ili lipidi (Galaverna i sur., 2009). D3G se može hidrolizirati u probavnom traktu sisavaca što pospješuje apsorpciju DON-a, čime pridonosi ukupnoj izloženosti DON-u kod pojedinaca (EFSA, 2013a). Maskirani ili konjugirani mikotoksini mogu imati vrlo različito kemijsko ponašanje u odnosu na slobodne mikotoksine, te stoga često ostaju nedetektirani pri rutinskim i zakonski propisanim analizama mikotoksina (Galaverna i sur., 2009).

Maksimalna koncentracija DON-a u žitaricama i proizvodima od žitarica propisana je Uredbom Europske komisije br. 1881/2006 (EK, 2006) te iznosi od 200-1750 µg/kg. Maskirani metaboliti nisu uzeti u obzir u procjeni izloženosti ukupnim mikotoksinima iz proizvoda na bazi žitarica (Vendl i sur., 2010). JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) je 2001. godine utvrdila privremeni maksimalno tolerirani dnevni unos (PMTDI) za DON od 1 µg/kg tjelesne mase (t.m.) (JECFA, 2001). Budući da se 3-Ac-DON konvertira u DON i doprinosi ukupnoj toksičnosti DON-a, JECFA je 2011. godine promijenila PMTDI za DON u grupni PMTDI od 1 µg/kg t.m. za sumu DON-a i njegovih acetiliranih derivata (JECFA, 2011).

Osim toga, 2011. godine JECFA je utvrdila i grupnu akutnu referentnu dozu (ARfD) od 8 µg/kg t.m. za sumu DON-a i njegovih acetiliranih derivata (JECFA, 2011). Budući da nije bilo dovoljno informacija o D3G-u, on nije uključen u grupni ARfD.

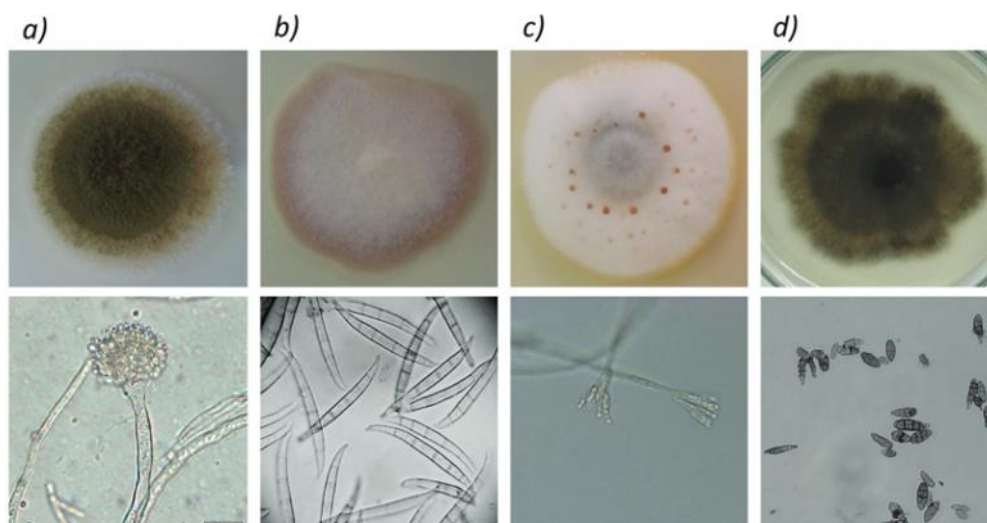
Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je 2017. godine izdala znanstveno mišljenje vezano za prisutnost DON-a i njegovih acetiliranih i maskiranih oblika u hrani i hrani za životinje gdje je utvrdila grupni TDI od 1 µg/kg t.m. i grupni ARfD od 8 µg/kg t.m. za sumu DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a (EFSA, 2017).

Zaštita ljudi od ovog kontaminanta trebala bi biti osnovna i prioritetna zadaća javnog zdravstva u svim zemljama. To je osnovna svrha procjene izloženosti, koja je sastavni dio procesa procjene rizika. Procjena izloženosti sastoji se od povezivanja podataka o prehrambenim navikama s podacima o koncentraciji određenog kontaminanta i obično uključuje primjenu statističkih faktora prilagodbe koji dovode do stvaranja zaključaka o količini kontaminanta koja se uobičajeno konzumira ili koja se konzumira tijekom cijelog životnog vijeka (Raad i sur., 2014).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini predstavljaju različitu grupu sekundarnih metabolita plijesni (**Slika 1**) (Nielsen i sur., 2011; Kuzdraliński i sur., 2013; Rodríguez-Carrasco i sur., 2013), koji su kemijski i toksikološki različiti (Sudakin, 2003) i razvijaju se na velikom broju poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (Bertuzzi i sur., 2011).



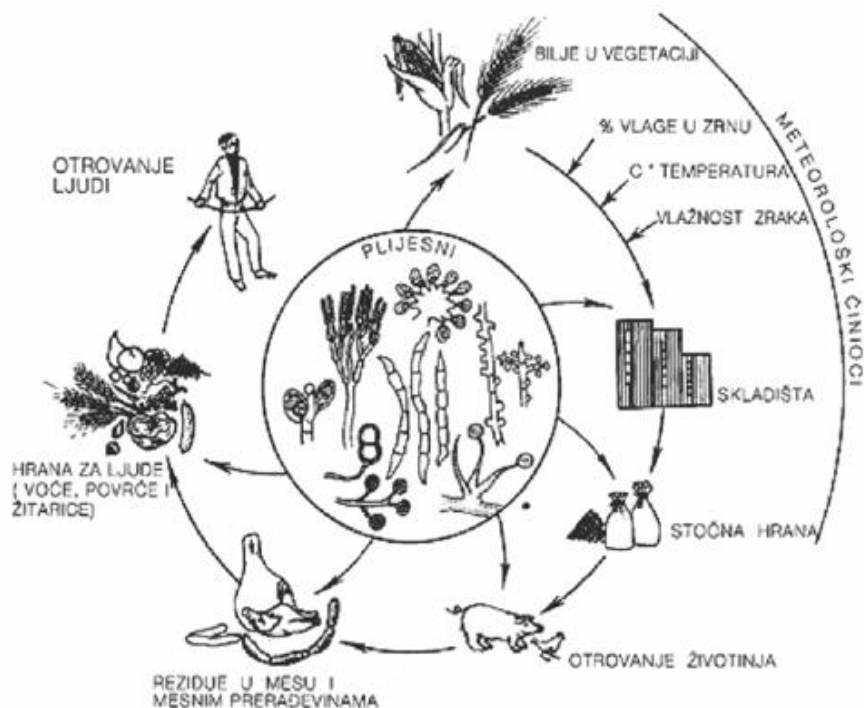
Slika 1 Mikroskopski snimak plijesni a) *Aspergillus*, b) *Fusarium*, c) *Penicillium*, d) *Alternaria* (Kovač i sur., 2018)

Identificirano je više od 400 mikotoksina, ali najvažnije grupe mikotoksina koje se nalaze u hrani su: aflatoksini (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 i AFM1) koje proizvode plijesni iz roda *Aspergillus*; ohratoksin A (OTA) kojeg proizvode *Aspergillus* i *Penicillium* vrste; trihoteceni (T-2, HT-2, DON, neosolaniol, nivalenol i dr.), zearalenon, fumonizini (FB1 i FB2) koje proizvode *Fusarium* vrste (Škrbić i sur., 2012; Vidal i sur., 2013); ergot alkaloidi koje proizvode *Claviceps* vrste, te altenuen, alternariol, alternariol metil eter, altertoksin i tenuazonska kiselina koje proizvode *Alternaria* vrste (Marin i sur., 2013).

Tablica 1 Lista najpoznatijih mikotoksina i plijesni koji ih proizvode (Marin i sur., 2013)

Mikotoksini	Plijesni
Deoksinivalenol	<i>Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium cerealis</i>
T-2 i HT-2 toksin	<i>Fusarium acuminatum, Fusarium poae, Fusarium sporotrichioides, Fusarium langsethiae</i>
Aflatoksini	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus</i>
Citrinin	<i>Aspergillus carneus, Aspergillus terreus, Penicillium citrinum, Penicillium hirsutum, Penicillium verrucosum</i>
Fumonizini	<i>Fusarium moniliforme, Fusarium culmorum, Fusarium avenaceum, Fusarium proliferatum, Fusarium nivale</i>
Nivalenol	<i>Fusarium moniliforme, Fusarium equiseti, Fusarium oxysporum, Fusarium culmorum, Fusarium avenaceum, Fusarium roseum, Fusarium nivale</i>
Ohratoksin A	<i>Aspergillus ochraceus, Penicillium viridictum</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus, Penicillium expansum, Botrytis cinerea, Penicillium roqueforti, Penicillium claviforme, Penicillium griseofulvum</i>
Zearalenon	<i>Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Fusarium roseum, Fusarium moniliforme, Fusarium avenaceum, Fusarium equiseti, Fusarium nivale</i>

Proizvodnja mikotoksina na poljoprivrednim usjevima ovisi o vrsti plijesni (**Tablica 1**), supstratu i uvjetima temperature i vlažnosti i najčešće se pojavljuju na oštećenim biljkama (Sirot i sur., 2013). Do proizvodnje mikotoksina može doći u različitim točkama u prehrambenom lancu: prije žetve, za vrijeme žetve te tijekom sušenja i skladištenja. Loša poljoprivredna praksa, nepravilno sušenje, rukovanje, pakiranje, skladištenje i transport povećavaju rizik od rasta plijesni i proizvodnje mikotoksina (**Slika 2**). U prerađenoj hrani daljnja proizvodnja mikotoksina je otežana jer uvjeti skladištenja sprječavaju kontaminaciju plijesnima i biosintezu mikotoksina posebice kada je aktivitet vode u proizvodu dovoljno nizak. Međutim, kada se aktivitet vode u skladištenom proizvodu poveća do razina koje omogućavaju rast plijesni i proizvodnju mikotoksina toksini se mogu nakupljati i u prerađenim proizvodima (Marin i sur., 2013).



Slika 2 Izvori kontaminacije i unos mikotoksina u organizam (Perši i sur., 2011)

Ovisno o klimatskim uvjetima, *Fusarium* plijesni su značajne u prehrambenom lancu zastupljenom žitaricama jer mogu smanjiti prinos usjeva i kontaminirati žitarice mikotoksinima (Martins i sur., 2008).

Kontaminacija žitarica *Fusarium* toksinima zabilježena je skoro u cijelom svijetu, stoga se može očekivati i kontaminacija proizvoda na bazi žitarica jer se preradom mikotoksini ne eliminiraju u potpunosti (Castillo i sur., 2008; Dos Santos i sur., 2013). Mikotoksini su obično termostabilni te u većoj ili manjoj mjeri opstaju tijekom transformacije kontaminiranih biljaka, ovisno o procesu, i obično se ne eliminiraju tijekom kuhanja i sterilizacije. Lipofilni mikotoksini se mogu vezati na proteine plazme, i dugo se zadržati u organizmu kada je izloženost kronična odnosno ponavljana pogotovo kod osjetljive populacije kao što su djeca (Castillo i sur., 2008., Sirot i sur., 2013; Raad i sur., 2014).

Mikotoksini se mogu pojaviti u prehrambenom lancu zbog infekcije usjeva plijesnima, bilo da ih ljudi direktno konzumiraju ili da se koriste kao hrana za životinje. Metabolizam unesenih mikotoksina može rezultirati njihovim nakupljanjem u različitim organima i tkivima, ulaskom u prehrambeni lanac preko mesa, mlijeka ili jaja (Marin i sur., 2013).

Mikotoksini mogu imati različita toksična svojstva kao što su karcinogenost, imunotoksičnost, neurotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivna i razvojna toksičnost, itd. (**Tablica 2**) (Serrano i sur., 2012). Toksičnost mikotoksina razlikuje se ovisno o vrsti toksina, i kod životinja je uočeno da ovisi o vrsti, dozi, vremenu izloženosti, spolu i dobi (Sirot i sur., 2013). Budući da toksičnost mikotoksina još nije utvrđena za sve mikotoksine koji se nalaze u hrani, njihov ukupan utjecaj na ljudsko zdravlje se ne može procijeniti (Škrbić i sur., 2012). Bolesti izazvane mikotoksinima - mikotoksikoze (De Boevre i sur., 2013; Marin i sur., 2013) pokazuju različite kliničke simptome gdje učinci antagonizma, sinergizma i aditivnosti između nekoliko mikotoksina mogu promijeniti negativan zdravstveni utjecaj na izloženi organizam (De Boevre i sur., 2013).

Dijagnostičke značajke koje karakteriziraju mikotoksikoze su sljedeće: bolest nije prenosiva; utjecaj lijekova i antibiotika ima mali ili nikakav učinak, pojava ili epidemija je često sezonska i obično je povezana sa specifičnim namirnicama, pregled sumnjive hrane ili namirnica obično pokazuje znakove aktivnosti plijesni (Marin i sur., 2013).

Tablica 2 Bolesti u ljudi koje se povezuju s unosom mikotoksina (Fung i Clark, 2004)

Štetno djelovanje	Mikotoksini	Predloženi mehanizam	Način unosa
Plućna krvarenja Encefalopatija	Trihoteceni Aflatoksini Ergot alkaloidi	Inhibicija sinteze proteina i kolagena Citotoksičnost Vazokonstrikcija	Potrebna je visoka razina toksina u zraku Konzumacijom hrane kontaminirane toksinima
Depresija središnjeg živčanog sustava (CNS)	Mikrobne hlapljive organske kemikalije (kompleksni alkoholi i aldehidi)	Smanjenje aktivnosti CNS neurona slično alkoholima i aldehydima	Dovoljne/preterane koncentracije koje izazivaju iritaciju sluznice
Hematološka / imunološka supresija	Trihoteceni Aflatoksini	Inhibicija sinteze proteina i enzima	Potrebna je visoka razina toksina u zraku ili konzumacijom
Rak jetre	Aflatoksini	Vežanje elektrofila za nukleofilna mjesta DNA i RNA	Konzumacijom hrane kontaminirane toksinima
Rak jednjaka	Fumonizini	Izravna citotoksičnost	Konzumacijom hrane kontaminirane toksinima
Nefropatija	Ohratoksini	Vežanje za nukleofilna mjesta	Konzumacijom hrane kontaminirane toksinima
Teratogenost	Ergot alkaloidi Trihoteceni Aflatoksini		
Gastrointestinalna toksičnost	Većina mikotoksina	Izravna citotoksičnost	Konzumacijom hrane kontaminirane toksinima

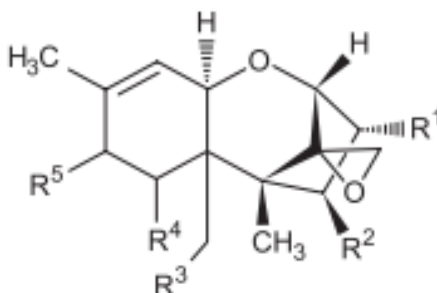
Klasični pristup procjeni izloženosti mikotoksinima je posljednjih desetljeća bio baziran na detektiranju i kvantificiranju prisutnosti ovih kontaminanata u hrani. Ovaj pristup se ne smatra pouzdanim zbog manjkavosti varijabilnosti u:

- razini kontaminacije hrane,
- pripremi hrane,
- individualnoj potrošnji i individualnoj toksikokinetici i toksikodinamici.

S druge strane, detektiranje prisutnosti biomarkera mikotoksina u biološkim tekućinama kao što su krv i urin može biti korisnije i pouzdanije za akutnu i kroničnu procjenu izloženosti jer omogućuje predviđanje buduće štetne posljedice (Njumbe Ediage i sur., 2012). Kod ljudi, većina mikotoksina i njihovih metabolita učinkovito se izlučuje putem urina što omogućuje procjenu izloženosti preko koncentracije u urinu pod uvjetom da je uspostavljen odnos između doze i odgovora (dose-response). Takvo određivanje zahtijeva osjetljive mjerne instrumente zbog niskih koncentracija (Šarkanj i sur., 2013; 2018).

2.2. TRIHOTECENI

Trihoteceni su grupa strukturno vezanih mikotoksina s različitim stupnjem toksičnog potencijala. Imaju seskviterpenoidnu prstenastu strukturu i klasificiraju se prema prisutnosti odnosno odsutnosti karakterističnih funkcionalnih skupina. Sadrže epoksid na 12. i 13. C atomu (**Slika 3**), koji je odgovoran za njihovu toksičnost (Sudakin, 2003; Omurtag i Beyoglu, 2007; Maresca, 2013; Aniołowska i Steininger, 2014). Toksičnost trihotecena je u velikoj mjeri posljedica njihove sposobnosti inhibiranja sinteze proteina (Omurtag i Beyoglu, 2007; Maresca, 2013).



Slika 3 Strukturna formula trihotecena (Šarkanj i sur., 2010)

Ovisno o karakterističnim funkcionalnim grupama, trihotecene se dijeli u 4 grupe:

- Tip A: trihodermol, trihodermin, 4,15-diacetoksiscirpenol, neosolaniol, T-2 toksin, HT-2 toksin, isotrihodermol, kalonektrin, 7,8-dihidroksikalonektrin, harzianum A;
- Tip B: deoksinivalenol, nivalenol, fuzarenon X, trihotecin, trihotecinol A;
- Tip C: krotocin;
- Tip D: satratoksin H, roridin A, bakarin, verukarin A (McCormic i sur., 2011).

Trihoteceni tipa A i tipa B razlikuju se prema prisutnosti odnosno odsutnosti karbonilne grupe na 8. C atomu. Trihoteceni tipa C sadrže dodatnu epoksidnu grupu na 7. i 8. ili 9. i 10. C atomu. Trihoteceni tipa D sadrže makrociklički prsten na 4. i 15. C atomu (Sudakin, 2003; De Boevre i sur., 2013).

Trihoteceni tipa A i B su široko rasprostranjeni u žitaricama kao prirodni zagađivači, dok su trihoteceni tipa C i D manje važni, jer se neki od njih ne nalaze u hrani i hrani za životinje (De Boevre i sur., 2013). Najčešće ih proizvode plijesni rodova *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* i *Stachybotrys* (Aniołowska i Steininger, 2014).

Plijesni roda *Fusarium* koji često kontaminiraju poljoprivredne usjeve, a posebno žitarice kao što su pšenica, kukuruz, ječam, zob, riža i raž izazivaju fuzarijsku palež klasa (Montes i sur., 2012) pri čemu dolazi do formiranja obezbojenih i osušenih zrna, smanjenog prinosa, smanjene kvalitete zrna i kontaminacije s nekoliko vrsta mikotoksina (uglavnom DON-a), (Dos Santos i sur., 2013). Kontaminacija usjeva plijesnima roda *Fusarium* je zabilježena i u Hrvatskoj (Ćosić i sur., 2004; Ćosić i sur., 2008a; 2008b). Infekcija usjeva rodom *Fusarium* ovisi o klimatskim uvjetima i u većoj mjeri ovisi o rasporedu a ne o količini padalina (Simsek i sur., 2012).

Najčešći način izloženosti ljudi trihotecenima je putem prehrane (Sudakin, 2003; Dos Santos i sur., 2013). Trihoteceni su vrlo stabilni spojevi pri skladištenju, mljevenju, preradi i kuhanju hrane, i ne uništavaju se pri visokim temperaturama (Marin i sur., 2013).

Trihoteceni pri akutno visokim dozama izazivaju povraćanje, proljev i krvarenje, dok kronični unos malih količina trihotecena dovodi do povećane osjetljivosti na infektivne bolesti kao rezultat supresije imunološkog sustava i drugih simptoma kao što su anoreksija, anemija, neuroendokrine promjene i imunološki efekti (Montes i sur., 2012).

2.2.1. DEOKSINIVALENOL

DON (**Slika 4**), poznat i pod nazivom vomitoksin, je mikotoksin koji spada u skupinu trihotecena tipa B i kojeg proizvode plijesni *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum* te najčešće kontaminira pšenicu, ječam, kukuruz, zob i raž (Meky i sur., 2003; Nielsen i sur., 2011; Warth i sur., 2011; 2012; Kuzdraliński i sur., 2013). DON se često može naći u manjim količinama i u određenim proizvodima kao što su pivo i druga fermentirana pića, žitaricama za doručak, kruhu i sličnim proizvodima (Sudakin, 2003; Mishra i sur., 2013). Nastajanje DON-a u žitaricama ovisi o klimatskim uvjetima i na taj način varira među zemljopisnim regijama ili područjima te godinama uzgoja. DON može nastati i tijekom skladištenja ukoliko sadržaj vlage nije dobro kontroliran (Wu i sur., 2007).

Najveća razina DON-a je zabilježena u vanjskom sloju zrna žitarica. Zadnjih godina, potiče se konzumaciju integralnih proizvoda i proizvoda od cjelovitih žitarica, čime se povećava vjerojatnost njegovog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje (Vidal i sur., 2013).

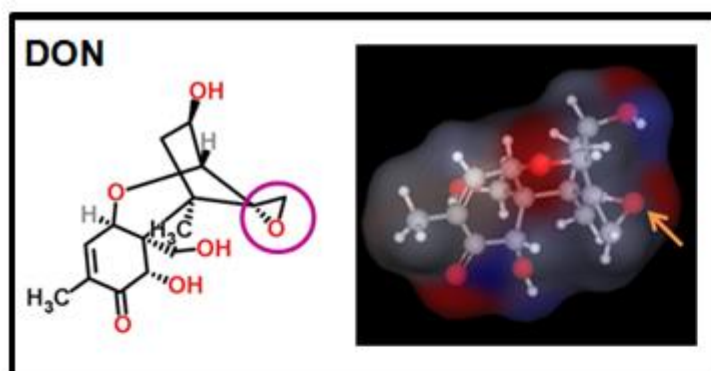
DON je vrlo stabilan spoj (pH: 1-10, temp. 150°C) tijekom skladištenja i prerade/kuhanja hrane, i potrebni su drastični uvjeti za njegovu degradaciju (Mishra i sur., 2013; Maresca, 2013). Topiv je u vodi i u nekim polarnim otapalima (metanolu, acetonitrilu i etil acetatu) (Ji i sur., 2014). Iako DON nije toksičan kao drugi trihoteceni (T-2 i HT-2), jedan je od najznačajnijih kontaminanata žitarica u svijetu (Marin i sur., 2013).

Nakon unosa može izazvati različite toksikoze kod ljudi i domaćih životinja. Akutni učinci trovanja hranom kod ljudi su bol u abdomenu, vrtoglavica, glavobolja, iritacija grla, mučnina, proljev, povraćanje i krv u stolici (Pieters i sur., 2004; Cano-Sancho i sur., 2011; Marin i sur., 2013; Maresca, 2013). DON utječe i na imunološki sustav i mijenja različite parametre u krvi, a osim toga nadražuje i gastrointestinalni sustav. Glavni dugoročni učinci pri niskim koncentracijama su smanjeni rast i smanjeni unos hrane (Pieters i sur., 2004).

Na molekularnoj razini, DON narušava normalnu funkciju stanica inhibicijom sinteze proteina vezanjem na ribosome, kao i aktivacijom kritičnih staničnih kinaza koje su uključene u prijenos signala vezanih za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (Martins i sur., 2008; Vidal i sur., 2013). Također utječe na unos hrane, tjelesnu težinu i suzbija humoralnu i staničnu imunološku funkciju (Martins i sur., 2008). Inhibicija sinteze proteina indirektno utječe na sintezu DNA i RNA, upalne procese i neurološke procese (Warth i sur., 2012).

Sadržaj DON-a u velikoj mjeri ovisi o osjetljivosti kultivara prema *Fusarium* vrstama, prethodnoj kulturi, postupcima obrade tla i upotrijebljenom fungicidnom sredstvu. *Fusarium graminearum* optimalno raste na 25°C i kod aktivnosti vode iznad 0,88, dok *Fusarium culmorum* najbolje raste pri 21°C i aktivnosti iznad 0,87 (Simsek i sur., 2012).

Hrana kontaminirana DON-om obično sadrži nativni DON i njegove derivate. Glavni derivati DON-a su metaboliti koje proizvode plijesni (acetilirani derivati: 3-Ac-DON i 15-Ac-DON), biljke (DON-3-sulfat, DON-15-sulfat (Warth i sur., 2015) i D3G), životinje (glukuronski derivati: deoksinivalenol-3-glukuronid (DON-3-GlcA) i deoksinivalenol-15-glukuronid (DON-15-GlcA) i sulfatni derivati (DON-3-sulfat i DON-15-sulfat (Warth i sur., 2016)) ili bakterije (de-epoksi dien derivati: DOM-1). Različite studije pokazuju da hrana sadrži velike količine metabolita DON-a, većinom metabolita koji nastaju iz plijesni ili biljke (3 i 15-Ac-DON i D3G), i čak i do 75% ukupne količine DON-a potječe od metabolita (Maresca, 2013).



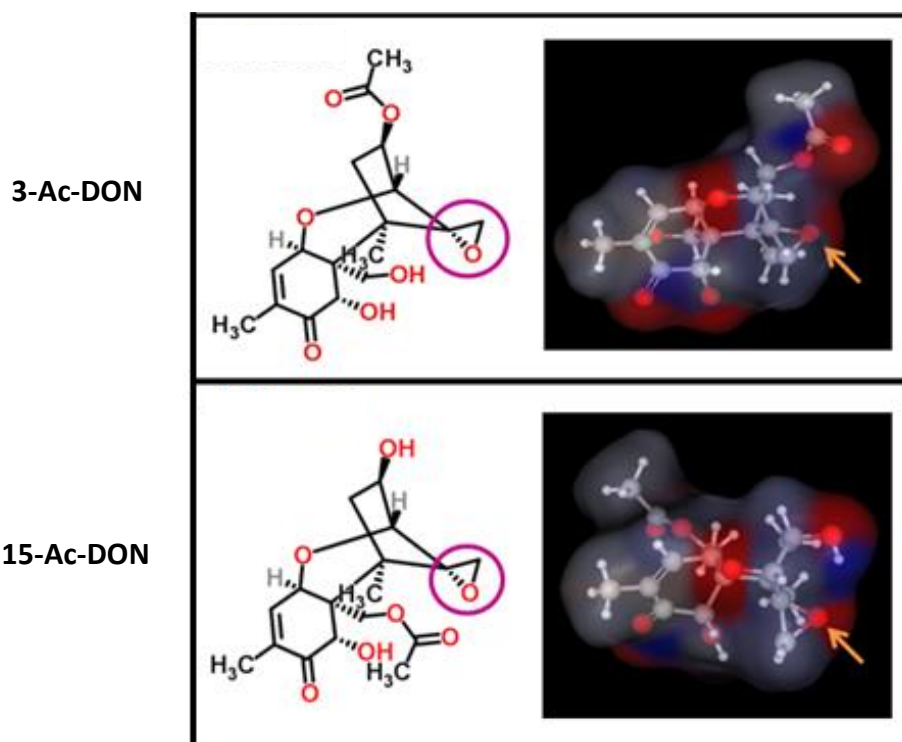
Slika 4 Struktura DON-a s naznačenim položajem epoksida (Maresca, 2013)

2.2.1.1. 3-ACETIL-DEOKSINIVALENOL I 15-ACETIL-DEOKSINIVALENOL

Acetilacija je opisana kao proces detoksikacije trihotecena koji koriste *Fusarium* vrste kako bi se zaštitile od vlastitih toksina (Boutigny i sur., 2008).

Acetilirani derivati DON-a, 3-Ac-DON i 15-Ac-DON (**Slika 5**), koji dolaze istovremeno s DON-om u žitaricama (Castillo i sur., 2008) obično su metaboliti koji nastaju iz plijesni (Berthiller i sur., 2013). Prisutni su u razini od 10-20% od ukupne količine DON-a, a odnos između DON-a i acetiliranih oblika varira. Acetilirani oblici se brzo deacetiliraju *in vivo* (3-Ac-DON u DON) (Kanižai Šarić i sur., 2011).

In vitro studije o usporednoj toksičnosti DON-a i njegovih acetiliranih derivata pokazuju da su 15-Ac-DON i 3-Ac-DON jednako ili čak i manje toksični u usporedbi s DON-om. Nasuprot tome, studije o akutnoj oralnoj toksičnosti acetiliranih derivata DON-a kod miševa otkrivaju jednaku LD₅₀ vrijednost za DON i njegove acetilirane metabolite, što pokazuje da je oralna toksičnost 3-Ac-DON-a i 15-Ac-DON-a *in vivo* usporediva s toksičnošću DON-a (Rychlik i sur., 2014).



Slika 5 Struktura 3-Ac-DON-a i 15-Ac-DON-a s naznačenim položajem epoksida (Maresca, 2013)

2.2.2. MASKIRANI MIKOTOKSINI

International Life Science Institute (ILSI) 2011. godine utvrđuje definiciju maskiranih mikotoksina kao derivata mikotoksina koji se ne mogu detektirati konvencionalnim analitičkim metodama jer je njihova struktura promijenjena u biljci. Međutim, postoje i druge tvari koje potječu od mikotoksina, a koje nisu proizvedene u biljci. Takve tvari mogu nastati tijekom probave sisavaca, kao metaboliti plijesni ili tvari koje nastaju termičkom obradom tijekom prerade hrane. Ove tvari nisu pokriveno izrazom „maskirani mikotoksini“ (Rychlik i sur., 2014; Kovač i sur., 2018).

Kako bi obuhvatili sve moguće oblike u kojima mikotoksini i njihovi modificirani oblici mogu postojati, Rychlik i sur. (2014) su predložili novu sustavnu definiciju „modificiranih mikotoksina“ koja se sastoji od 4 razine (Tablica 3).

Tablica 3 Sustavna definicija „modificiranih mikotoksina“ (Rychlik i sur., 2014)

1. razina	2. razina	3. razina	4. razina	Primjer
Slobodni mikotoksini				DON, Aflatoksin B1, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON
Mikotoksini vezani u matriks	Kompleksi, fizički otopljeni ili zarobljeni			Fumonizini vezani na škrob, OTA- i DON-oligosaharidi
	Kovalentno vezani			Aflatoksin B1-epoksid
Modificirani mikotoksini	Biološki modificirani	Funkcionalizirani (metaboliti 1. faze)	Konjugirani od strane biljaka (maskirani prema ILSI-ju)	D3G
		Konjugirani (metaboliti 2. faze)	Konjugirani od strane životinja	DON-3/8/15-glukuronid, HT2-3/4-glukuronid
			Konjugirani od strane plijesni	ZEN-14-sulfat
		Drukčije modificirani		Deepoksi-DON (=DOM-1)
	Kemijski modificirani	Termički formirani		norDON A-C, N-karboksi-metil FB1, 14-(R)-OTA
		Netermički formirani		DON-sulfonat, norDON A-C (pod alkalnim uvjetima)

U proizvodima koji su kontaminirani mikotoksinima pojavljuju se mnogi strukturno vezani spojevi koji nastaju metabolizmom biljke ili preradom hrane a koji mogu nastajati zajedno s nativnim toksinima. Derivati mikotoksina (konjugirani ili maskirani) mogu imati različito kemijsko ponašanje i na taj način ostati nedetektirani rutinskim analizama (Galaverna i sur., 2009; Berthiller i sur., 2013). Također se mogu hidrolizirati u svoje prekursore u probavnom traktu životinja ili mogu imati jednaki toksični učinak kao slobodni mikotoksini. Posebice je taj fenomen vezan za *Fusarium* toksine (Galaverna i sur., 2009). Kemijske transformacije kojima se proizvode maskirani mikotoksini katalizirane su biljnim enzimima koji su uključeni u proces detoksifikacije (Berthiller i sur., 2013). Razlikuju se tri faze kemijskih modifikacija tijekom metabolizma biljke:

- Faza I uključuje redukciju, oksidaciju i acetilaciju nativnog mikotoksina koji rezultira aktivacijom dobivene molekule i većom razinom toksičnosti,
- Faza II uključuje enzimatsku transformaciju tih reaktivnih grupa kao što su konjugacija, glukozidacija i sulfatizacija koja vodi do formiranja hidrofilnijih spojeva, olakšavajući eliminaciju maskiranih mikotoksina i na taj način smanjuju toksičnost,
- Faza III se sastoji od razmještanja mikotoksina u vakuole biljke ili vezanja na staničnu stijenkku (De Boevre i sur., 2013).

Tehnološki proces također ima važnu ulogu u mehanizmu maskiranja, posebno u proizvodima na bazi žitarica. Mehanička ili toplinska energija tijekom procesa transformacije može izazvati značajne promjene, uključujući reakcije s komponentama makromolekula kao što su šećeri, proteini ili lipidi ili oslobađanje nativnih oblika nakon razgradnje maskiranih derivata (Galaverna i sur., 2009). Preradom hrane, mikotoksini se također mogu kemijski mijenjati, ali spojevi koji nastaju na taj način su manje toksični od nativnog mikotoksina (Berthiller i sur., 2013).

Potencijalni rizik za potrošače nastaje tijekom probave gdje može doći do hidrolize maskiranih mikotoksina u njihove toksične native oblike (De Boevre i sur., 2013).

Maskirani mikotoksini sastoje se od ekstrahiranih konjugiranih i vezanih (neekstrahiranih) mikotoksina. Vezani mikotoksini su kovalentno ili nekovalentno vezani na polimerne ugljikohidrate ili proteinske matrikse. Ekstrahirani konjugirani mikotoksini mogu se detektirati prikladnim analitičkim metodama. Ako im je poznata struktura i ako su dostupni analitički standardi pomoću tandemske masene spektrometrije. Za one mikotoksine za koje ne postoje dostupni analitički standardi može se koristiti masena spektrometrija konjugirana sa TOF-om (Time of flight treći kvadrupol) ili orbitrap tehnologijom (Kovač i sur., 2018). Za razliku od njih, vezani mikotoksini nisu direktno dostupni i prvo se moraju osloboditi iz matriksa kemijskim ili enzimskim postupcima prije analize da bi se analizirali tandemskom masenom spektrometrijom (Berthiller i sur., 2013). Analitičke metode koje se najčešće koriste za određivanje mikotoksina su imunoenzimski test (ELISA) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) sa različitim detektorima (EFSA, 2014).

Modifikacije molekula mikotoksina kojima se smanjuje ili eliminira toksičnost mogu dovesti do precijenjene procjene izloženosti mikotoksinima. To se dešava kada se analitičkom metodom

(npr. ELISA) može odrediti modificirani mikotoksin zajedno s nemodificiranim molekulama, ali se ne zna da li analitički signal potječe od manje toksičnog ili netoksičnog derivata (Berthiller i sur., 2013).

2.2.2.1. DEOKSINIVALENOL-3-GLUKOZID

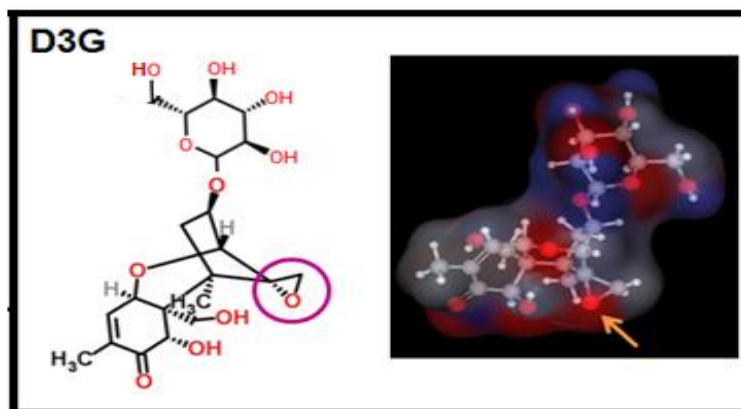
D3G (**Slika 6**) je biljni metabolit koji se nalazi u prirodno kontaminiranim žitaricama kao što su pšenica, ječam i kukuruz. Žitarice kontaminirane s plijesnima koje proizvode DON sposobne su detoksificirati taj mikotoksin. Jedan od glavnih putova detoksifikacije je konjugacija DON-a s glukoznom jedinicom pri čemu nastaje D3G (Berthiller i sur., 2013). Mehanizmom detoksifikacije biljke su sposobne pretvoriti relativno apolarne trihotecene u polarne derivate konjugacijom sa šećerima, aminokiselinama ili sulfatnim grupama, kako bi ih razmjestili u vakuole. U slučaju DON-a nastali derivat je D3G (Galaverna i sur., 2009), DON-3-sulfat ili DON-15-sulfat (Warth i sur., 2015).

Glikozilacija, reakcija koja se odvija u II. fazi metabolizma biljaka, predstavlja glavni put detoksifikacije ksenobiotika. Konjugati koji nastaju u II. fazi mogu biti inkorporirani u netopive frakcije staničnog zida biljke (III. faza metabolizma) ili konvertirani u topive oblike i prebačeni u stanične vakuole biljke (Berthiller i sur., 2011).

D3G je manje aktivan kao inhibitor sinteze proteina od DON-a. Stoga se reakcije glukolizacije smatraju reakcijama detoksifikacije DON-a u biljkama. Neke vrste pšenice koje učinkovitije pretvaraju DON u D3G, otpornije su na širenje plijesni *F. graminearum* koje proizvode DON u biljci. Ugradnja mehanizma detoksifikacije u kultivare koji su jako osjetljivi na plijesni iz roda *Fusarium* dovodi do povećanja D3G/DON odnosa (Berthiller i sur., 2011). Stoga, visoki omjer D3G/DON može biti dobar, ako je ukupni sadržaj svih metabolita DON-a nizak (Berthiller i sur., 2013). D3G djelomično može prijeći u DON pomoću bakterija intestinalnog trakta (Vendl i sur., 2010; Berthiller i sur., 2011), te na taj način doprinosi ukupnoj izloženosti DON-u (EFSA, 2013a).

Prisutnost D3G-a se opsežno istražuje u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica, i rezultati pokazuju da koncentracija D3G-a može biti čak i do 70% koncentracije DON-a, dok u pivu može biti i veća od koncentracije DON-a (Berthiller i sur., 2013). Premda istraživanja zadnjih godina pokazuju da glukozid deoksinivalenola (D3G) ima toksičan potencijal, postavljanje

toksikoloških referentnih vrijednosti, kao i maksimalno dozvoljenih količina bazirano je isključivo na roditeljskom spoju (Rychlik i sur., 2014).



Slika 6 Strukturna formula D3G-a s naznačenim položajem epoksida (Maresca, 2013)

2.2.2.2. GLUKURONIDACIJA

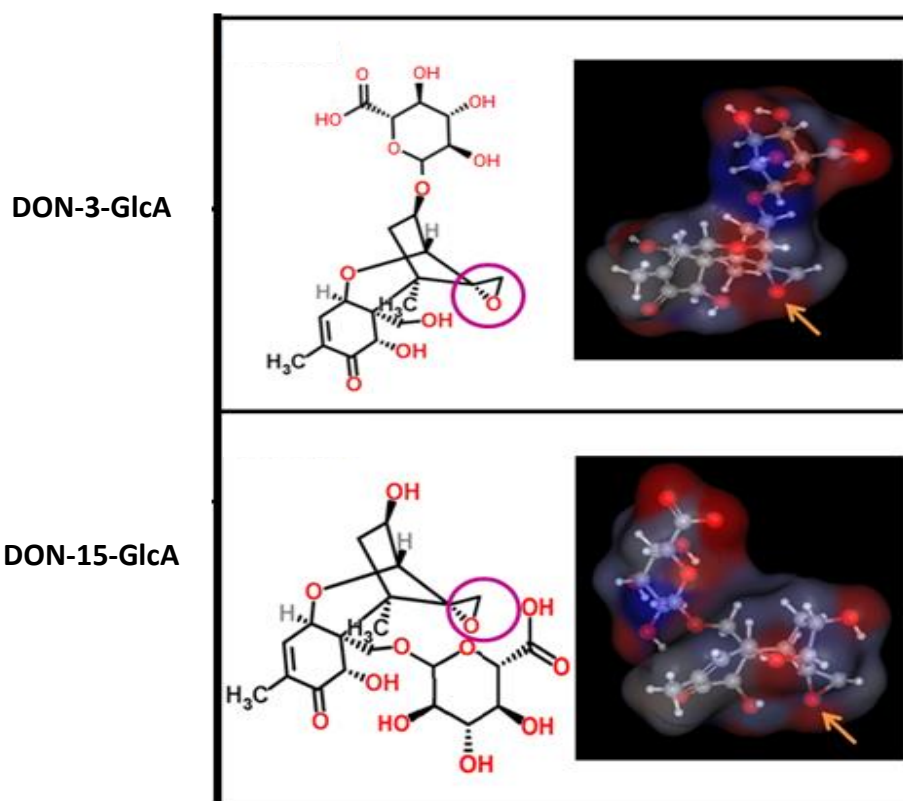
S obzirom na uobičajenu izloženost DON-u, važno je razumjeti potencijalne zdravstvene rizike kod ljudi. Osim količine DON-a koja je važna prilikom određivanja izloženosti, također je važno proučavanje individualnih varijacija u metabolizmu ksenobiotika, a time i profila aktiviranih i detoksifikacijskih metabolita (Turner i sur., 2011).

Kako bi se što bolje provele epidemiološke studije o štetnom utjecaju DON-a, potrebno je što pouzdanije odrediti izloženost na individualnoj razini. Nepravilnosti u podacima prehrambenih navika i heterogena raspodjela mikotoksina u prehrambenim proizvodima ograničava upotrebu navedenih podataka u određivanju izloženosti kod ljudi. Pouzdaniji indikator pojedinačne izloženosti je određivanje biomarkera u krvi ili urinu (Meky i sur., 2003; Turner i sur., 2008a).

Nakon unosa DON-a otkrivena su dva metabolička puta. DON se može deepoksidirati u DOM-1 pomoću crijevne mikroflore ili se može konjugirati s glukuronidom pomoću UDP-glukuronozil-transferaze kod sisavaca (Wu i sur., 2007; Turner i sur., 2011). Nedavna istraživanja pokazuju da se DON može naći u urinu i u obliku sulfata kao posljedica metabolizma druge faze pomoću sulfotransferaza u crijevima ili jetri, pri čemu se sulfati vežu pretežno na 3. C atom za razliku od glukuronida koji se vežu pretežno na 15. C atom u molekuli DON-a (Warth i sur., 2016). Glavni detoksifikacijski put DON-a kod ljudi je glukuronidacija, pri

čemu su u ljudskom urinu identificirana i karakterizirana dva metabolita: DON-3-GlcA i DON-15-GlcA (**Slika 7**) (Šarkanj i sur., 2013). Također kod drugih sisavaca (svinje, štakori, miševi i krave) su potvrđeni i izo-DON glukuronidi i izo-deepoksi-DON glukuronidi kao jedni od metabolita u koje se DON konvertira (Schwartz-Zimmermann i sur., 2017). Osim glukuronidacije, konjugacija sa sulfatom je također jedan od mehanizama detoksifikacije DON-a koji je potvrđen i u ljudima (Warth i sur., 2016), kao i u drugim životinjama (Jurišić i sur., 2019; Schwartz i sur., 2015; Thanner i sur., 2016), a nastaju DON-3-sulfat i DON-15-sulfat kao glavni metaboliti.

Brojne studije pokazuju da se DON brzo metabolizira u glukuronidne konjugate. Određivanje glukuronidnih oblika može poslužiti kao dodatni biomarker, koji je važan za procjenu bioraspoloživosti *Fusarium* mikotoksina i za izradu točnije procjene rizika (Warth i sur., 2011).



Slika 7 Strukture DON-3-GlcA i DON-15-GlcA s naznačenim položajem epoksida (Maresca, 2013)

Detektiranje i/ili kvantificiranje sume DON-a i njegovih metabolita u ljudskom urinu preporučeno je za biomonitoring ovog toksina (Njumbe Ediage i sur., 2012).

2.3. ZAKONODAVSTVO

Zakonom o kontaminantima (HS, 2013) preuzete su odredbe Uredbe Komisije 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (EC, 2006) sa svim izmjenama i dopunama. U navedenim uredbama postavljene su najveće dopuštene količine za DON u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica (**Tablica 4**).

Tablica 4 Najveće dopuštene količine DON-a u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica (EK, 2006)

2.4.	Deoksinivalenol	µg/kg
2.4.1.	Neprerađene žitarice, osim tvrde pšenice, zobi i kukuruza	1250
2.4.2.	Neprerađena tvrda pšenica i zob	1750
2.4.3.	Neprerađeni kukuruz, osim neprerađenog kukuruza namijenjenog za preradu mokrom meljavom	1750
2.4.4.	Žitarice namijenjene za izravnu prehranu ljudi, žitno brašno, mekinje i klice kao konačni proizvod stavljen na tržište za izravnu prehranu ljudi, osim hrane navedene u točkama 2.4.7., 2.4.8. i 2.4.9.	750
2.4.5.	Tjestenina (suha)	750
2.4.6.	Kruh (uključujući male pekarske proizvode), kolači, keksi, snack proizvodi od žitarica i žitarice za doručak	500
2.4.7.	Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu	200
2.4.8.	Frakcije meljave kukuruza s veličinom čestica > 500 mikrona, uvrštene pod oznaku CN 1103 13 ili 1103 20 40 i drugi proizvodi meljave kukuruza s veličinom čestica > 500 mikrona koji se ne upotrebljavaju za izravnu prehranu ljudi uvršteni pod oznakom CN 1904 10 10	750
2.4.9.	Frakcije meljave kukuruza s veličinom čestica ≤ 500 mikrona, uvrštene pod oznaku CN 1102 20 40 i drugi proizvodi meljave kukuruza s veličinom čestica ≤ 500 mikrona koji se ne upotrebljavaju za izravnu prehranu ljudi uvršteni pod oznakom CN 1904 10 10	1250

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) je 2001. godine utvrdila privremeni maksimalno tolerirani dnevni unos (PMTDI) od 1 µg/kg t.m. te akutnu referentnu dozu (ARfD) od 8 µg/kg t.m. za DON (JECFA, 2001). Budući da se 3-Ac-DON konvertira u DON i doprinosi ukupnoj toksičnosti DON-a, JECFA je 2011. godine promijenila PMTDI i ARfD za DON u grupni PMTDI od 1 µg/kg t.m. i grupnu ARfD od 8 µg/kg t.m. za sumu DON-a i njegovih acetiliranih derivata (JECFA, 2011). Budući da nije bilo dovoljno informacija o D3G-u, on nije bio uključen niti u grupni PMTDI niti u grupni ARfD. EFSA je 2017. godine izdala znanstveno mišljenje vezano za prisutnost DON-a i njegovih acetiliranih i maskiranih oblika u hrani i hrani

za životinje gdje je utvrdila grupni TDI od 1 µg/kg t.m. i grupni ARfD od 8 µg/kg t.m. za sumu DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a (EFSA, 2017).

Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) klasificirala je DON u grupu 3, što znači da nema dokaza o njegovoj karcinogenosti (IARC, 1993).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj rada bio je utvrditi izloženost odrasle populacije Republike Hrvatske (RH) slobodnom i maskiranom obliku DON-a.

Istraživanje je provedeno u dvije faze:

1. Procjena izloženosti populacije RH DON-u i derivatima
 - Iz istraživanja „Prehrambene navike odrasle populacije RH“ koje je proveo Centar za sigurnost hrane Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH) dobiveni su podaci o najčešće korištenim brendovima hrane na bazi žitarica;
 - Određena je količina DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a u odabranim brendovima pomoću LC-MS/MS tehnike;
 - Na temelju podataka o prehrambenim navikama i količini DON-a provedena je procjena izloženosti konzumenata proizvoda na bazi žitarica.
2. Studija izlučivanja DON-a i glukuronidnih metabolita na ispitanicima
 - Odabrani su ispitanici koji su konzumirali proizvode s poznatom koncentracijom DON-a i derivata, provedena je kratka anketa o njihovim prehrambenim navikama, socio-ekonomskom statusu, antropometrijskim podacima, te prikupljen 24-satni uzorak urina;
 - Izvršena je analiza uzoraka urina na slobodni DON i njegove glukuronidne oblike DON-3-GlcA i DON-15-GlcA, te kreatinin;
 - Potom je procijenjen utjecaj antropometrijskih karakteristika, socioekonomskog statusa te sastojaka hrane na metabolizam ovog mikotoksina čime se može dobiti uvid u prehrambene navike i/ili populacijske skupine različite osjetljivosti na DON;
 - Statistička obrada i interpretacija rezultata.

3.2. MATERIJAL I METODE

Kako bi utvrdili prehrambene navike opće populacije odraslih, HAPIH je proveo Nacionalno istraživanje o prehrambenim navikama odrasle populacije u Hrvatskoj sukladno EFSA-inim smjernicama (EFSA, 2009). Istraživanje je provedeno u odrasloj populaciji (18-64 godine) u dva ponavljanja (prvi dio u jesen 2011., drugi dio u ljeto 2012., zbog sezonskih varijacija) na reprezentativnom uzorku od 2002 ispitanika. Primijenjena je metoda 24-satnog prisjećanja te je u svakom ponavljanju anketa provedena za dva radna dana (između kojih je razmak morao

biti najmanje dva tjedna) i jedan dan vikenda. Podaci su prikupljeni pomoću dva intervjua licem u lice u domovima sudionika. Reprezentativni uzorak obuhvatio je različite socio-demografske i antropometrijske parametre (regionalnu pokrivenost, ruralna ili urbana sredina, razina obrazovanja, mjesečni prihod, zaposlenost i obiteljski status, razina tjelesne aktivnosti, tjelesna težina i visina, tip prehrane). Osim toga, za svaku konzumiranu hranu ispitanici su naveli učestalost konzumacije, s klasifikacijom podijeljenom u 11 razina (nekoliko puta dnevno; jednom dnevno; 4-5 puta tjedno; 2-3 puta tjedno; jednom tjedno; 2-3 puta mjesečno; jednom mjesečno; jednom u 2-3 mjeseca; jednom u pola godine; jednom godišnje i rjeđe). Svrha ovih informacija bila je olakšati određivanje kronične izloženosti. Priručnik Sente i sur. (2004) je korišten za pomoć ispitanicima u određivanju količine konzumirane hrane i pića. Za hranu koja nije obuhvaćena priručnikom korištene su mjere koje se koriste u kućanstvima, kao i vaganje određene hrane i pića. Svi sudionici su također zamoljeni da opišu hranu i piće koje su konzumirali (mjesto konzumacije, mjesto kupnje, način pripreme, brend i porijeklo hrane) kako bi se pomoglo u identifikaciji hrane i pića u klasifikaciji.

3.2.1. PROCJENA IZLOŽENOSTI POPULACIJE RH DON-U I DERIVATIMA

3.2.1.1. Uzorkovanje proizvoda na tržištu

Namirnice u kojima se, prema postojećoj literaturi, mogu naći DON i njegovi derivati odabrane su s popisa dobivenog istraživanjem „Prehrambene navike odrasle populacije“ koje je proveo HAPIH. Istraživanjem su utvrđeni najčešće konzumirani brendovi i konzumirane količine odabranih namirnica. Prema navedenom je sastavljena lista proizvoda koji su kupljeni na tržištu i analizirani (**Tablica 5**).

Tablica 5 Lista proizvoda i jela na bazi žitarica u kojima je analiziran DON

	Namirnica	Brend / proizvođač (Prodajno mjesto)
BRAŠNO	Brašno, pšenično, bijelo, Tip 550	Podravka (Konzum)
	Brašno, pšenično, bijelo, Tip 400	Podravka (Konzum)
	Brašno, pšenično, integralno	Farina (Konzum)
	Brašno, pšenično, integralno	Biovita (Konzum)
	Brašno, raženo, Tip 1250	Farina (Konzum)
	Brašno, raženo, Tip 1250	Podravka (Konzum)
KRUH I PECIVA	Kruh, bijeli	(Pekara Jug 2)
	Kruh, bijeli	(Interspar)
	Kruh, bijeli	(Pekara Mlinar)
	Kruh, polubijeli	(Pekara Jug 2)
	Kruh, polubijeli	(Interspar)
	Kruh, polubijeli	(Pekara Mlinar)
	Kruh, crni	(Billa)
	Kruh, crni	(Pekara Jug 2)
	Kruh, crni	(Interspar)
	Kruh, integralni	Sovital (Konzum)
	Kruh, integralni	Zrnopan (Interspar)
	Pecivo, integralno	(Pekara Kadulja)
	Pecivo, integralno	(Interspar)
	Slanac	(Pekara Jug 2)
	Slanac	(Pekara Kadulja)
PIZZA	Pizza, funghi	(Restoran Food Panic)
	Pizza, capricciosa	(Pizzeria La Rosa)
	Pizza	(Konzum)
FINI PEKARSKI PROIZVODI	Buhtla s čokoladom	(Pekara Kadulja)
	Buhtla s pekmezom	(Pekara Kadulja)
	Burek s mesom	(Pekara Mlinar)
	Burek s mesom	(Pekara Kadulja)
	Burek sa sirom	(Pekara Mlinar)
	Burek sa sirom	(Pekara Kadulja)
	Kroasana, integralna	(Pekara Jug 2)
	Kroasana	(Pekara Kadulja)
	Krofna s pekmezom	(Pekara Mlinar)
	Krofna s pekmezom	(Konzum)
	Palačinke, integralno pšenično brašno	Brašno: Farina (Konzum)

Tablica 5 Lista proizvoda i jela na bazi žitarica u kojima je analiziran DON – nastavak

	Namirnica	Brend / proizvođač (Prodajno mjesto)
	Palačinke, bijelo pšenično brašno, Tip 550	Brašno: Podravka (Konzum)
	Štrudla s jabukama	(Pekara Mlinar)
	Štrudla s čokoladom i vanilijom	(Pekara Mlinar)
ŽITARICE ZA DORUČAK	Pločica od žitarica	Fitness, Nestle (Konzum)
	Pločica od žitarica, čokolada-banana	Corny, Schwartzauer Werke (Konzum)
	Pločica od žitarica, čokolada-kikiriki	Corny, Schwartzauer Werke (Konzum)
	Čokolino, žitna kašica	Podravka (Interspar)
	Čokolino, žitna kašica	Podravka (Konzum)
	Griz, Tip 400	Lino, Podravka (Konzum)
	Griz, Tip 400	K Plus, (Konzum)
	Palenta	K Plus (Konzum)
	Palenta	Tena (Konzum)
	Palenta	Franck (Konzum)
	Corn flakes	Nestle (Konzum)
	Corn flakes	Provita, Podravka (Konzum)
	Corn flakes	K Plus (Konzum)
	Bran flakes	Prima Vita (Billa)
	Žitne pahuljice s čokoladom	Nesquik, Nestle (Konzum)
	Žitne pahuljice s voćem	Biovita (Konzum)
	Zobene pahuljice	Hahne (Konzum)
	Zobene pahuljice	Biovita (Konzum)
	Müsli, integralne žitarice i voće	K Plus (Konzum)
	Müsli, integralne žitarice i voće	Vitalis plus, Dr Oetker (Konzum)
Müsli, integralne žitarice i voće	Fitness, Nestle (Konzum)	
Pšenične mekinje	Prima Vita (Billa)	
KEKSI	Keksi, slani, krekeri	K Plus, party mix (Konzum)
	Keksi, slani, krekeri	Vic krekeri 3D, Kraš (Konzum)
	Keksi, slatki, čajni kolutiči	Kraš (Konzum)
	Keksi, slatki, napolitanke s čokoladom	Kraš (Konzum)
	Keksi, slatki, napolitanke	Jadro, Karolina (Konzum)
	Keksi, slatki, čajno pecivo	Domaćica, Kraš (Konzum)
TJESTENINA	Tjestenina, penete br. 24	Cetina, (Konzum)
	Tjestenina, penne rigate n. 73	Barilla (Konzum)
	Tjestenina, penne rigate	K Plus (Konzum)
	Tjestenina, pužići br. 156	Klara (Konzum)
	Tjestenina, pene rigate piccole	Pasta Zara (Konzum)

Tablica 5 Lista proizvoda i jela na bazi žitarica u kojima je analiziran DON – nastavak

	Namirnica	Brend / proizvođač (Prodajno mjesto)
	Tjestenina, makaroni	Riola (Konzum)
P I V O	Pivo, svijetlo	Ožujsko (Konzum)
	Pivo, svijetlo	Pan (Konzum)
	Pivo, svijetlo	Osječko (Konzum)
	Pivo, svijetlo	Karlovačko (Konzum)
O S T A L O	Kokice, za mikrovalnu	K Plus (Konzum)
	Kokice	(Štand 1, Kino Europa)
	Kokice	(Štand 2, Kino Europa)
	Kukuruz, kuhani	(Štand 1, Kino Europa)
	Kukuruz, kuhani	(Štand 2, Kino Europa)

3.2.1.2. Priprema uzoraka i instrumentalna analiza DON-a i derivata

Zbog topivosti DON-a u vodi (Kushiro, 2008), tjestenina kupljena na tržištu je prije usitnjavanja i analize, kuhana, kako bi se utvrdio stvarni unos DON-a. Osim tjestenine, pripremljene su i palačinke od uzorkovanog brašna (bijelo glatko brašno i integralno brašno), koje su zatim analizirane.

Za određivanje DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a u uzorcima namirnica korištena je "razrijedi i injiciraj" LC-MS/MS metoda (Malachova i sur. 2014).

Uzorci namirnica homogenizirani su te usitnjeni na mlinu M20 (IKA). Pet grama homogeniziranog uzorka je ekstrahirano s 20 mL ekstrakcijskog otapala (acetonitril/voda/octena kiselina 79:20:1, v/v/v) u plastičnim epruvetama od 50 mL (Falcon). Ekstrakcija je provedena na orbitalnoj tresilici 3017 (GFL), tijekom 90 min, pri 180 okretaja u minuti uz sobnu temperaturu. Nakon ekstrakcije, 500 µL uzorka je razrijeđeno s 500 µL otopine za razrjeđivanje (acetonitril/voda/octena kiselina 20:79:1, v/v/v) u vialama za LC-MS/MS, koje se potom dobro izmiješaju na vorteks miješalici.

Detekcija i kvantifikacija provedena je s QTrap 5500 MS/MS sustavom (AB Sciex) opremljenim s turbo ion spray elektrosprejno-ionizacijskim (ESI) izvorom i serijom 1290 UHPLC sustava (Agilent). Detalji instrumentalnih parametara su navedeni u članku (Malachova i sur., 2014).

Iskorištenje, te limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) su određeni analizom uzoraka kukuruza, pšenice i piva u koje je dodana poznata količina analiziranih tvari, uz odnos signala i šuma (signal to noise ratio) od 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ (**Tablica 6**).

Tablica 6 Vrijednosti iskorištenja, limita detekcije i limita kvantifikacije za DON i derivate u kukuruzu, pšenici i pivu

	15-Ac-DON	3-Ac-DON	DON	D3G
LOD (ng/g)	0,50	0,20	0,20	0,01
LOQ (ng/g)	1,65	0,66	0,66	0,03
Iskorištenje (%)	75-89	87-95	85-98,8	99-106

Analizirane koncentracije su korigirane za srednju vrijednost iskorištenja analita. Prilikom izračuna izloženosti DON-u i derivatima je namirnicama za koje su utvrđene koncentracije niže od LOD-a ili LOQ-a pripisano pola vrijednosti ovih parametara ukoliko je udio uzoraka s ovakvim vrijednostima bio manji od 60% (IPCS, 2009).

Ukoliko je udio uzoraka s vrijednostima ispod LOD-a i LOQ-a bio veći od 60%, računate su donja granična vrijednost (engl. *lower bound*, LB) i gornja granična vrijednost (engl. *upper bound*, UB). U slučaju LB-a je uzorcima ispod LOD-a i LOQ-a pripisana nula, dok je za izračun UB-a uzorcima pripisana vrijednost LOD-a tj. LOQ-a.

Ekvivalenti DON-a iz D3G-a računati su prema formuli:

$$C_{DON \text{ iz } D3G-a} = \frac{Mr_{DON}}{Mr_{D3G}} \times C_{D3G} \quad (1)$$

gdje je: C = koncentracija [$\mu\text{g}/\text{kg}$],
 Mr_{DON} = molekularna masa DON-a [296 g/mol],
 Mr_{D3G} = molekularna masa D3G-a [458,46 g/mol].

Postotak DON-a iz D3G-a za svaki pojedini uzorak računat je prema formuli:

$$\% = \frac{C_{DON \text{ iz } D3G-a}}{C_{DON \text{ ukupno}}} \times 100 \quad (2)$$

gdje je: % = postotak DON-a iz D3G-a,

C = koncentracija [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

Prosječni doprinos D3G-a ukupnoj količini DON-a izračunat je kao prosječna vrijednost postotka za svaki pojedini uzorak.

Za svaku namirnicu kupljeno je više uzoraka različitog brenda ili od različitih proizvođača, a za procjenu izloženosti, na temelju rezultata svih uzoraka za pojedinu namirnicu, računata je srednja vrijednost.

3.2.1.3. Procjena izloženosti populacije RH slobodnom i maskiranim oblicima DON-a

Od ukupno 2002 ispitanika koja su sudjelovala u istraživanju, njih 1987 su konzumenti proizvoda na bazi žitarica. Na temelju koncentracije DON-a i derivata u namirnicama s tržišta RH i podataka o konzumaciji tih namirnica izračunata je ukupna izloženost odrasle populacije kao zbroj unosa iz namirnica, pri čemu je korištena sljedeća formula za pojedinačne namirnice (3):

$$I = \frac{C \times k}{m} \quad (3)$$

gdje je: I - izloženost DON-u i derivatima [$\mu\text{g}/\text{kg t.m./danu}$],
 C - prosječna koncentracija DON-a i derivata [$\mu\text{g}/\text{kg}$],
 k - prosječna konzumacija [kg/dan],
 m - tjelesna masa [kg].

Obzirom na utvrđeni grupni TDI (EFSA, 2017), C u gornjoj formuli je suma koncentracija DON-a, 15-Ac-DON-a, 3-Ac-DON-a i D3G-a.

Prosječna izloženost DON-u određena je za sve konzumente te za podskupine ispitanika (razvrstane po spolu, dobi, indeksu tjelesne mase (eng. *body mass index*, BMI; tjelesna masa u kilogramima podijeljena s kvadratom tjelesne visine u metrima), životnoj sredini, primanjima u kućanstvu) i uspoređena s grupnim TDI-jem za DON i njegove acetilirane i maskirane oblike (EFSA, 2017).

3.2.2. STUDIJA IZLUČIVANJA DON-A I GLUKURONIDNIH METABOLITA NA ISPITANICIMA

3.2.2.1. Odabir ispitanika, proizvoda koje će ispitanici konzumirati i prikupljanje uzoraka urina

Istraživanje je provedeno tijekom studenog 2014. godine. Ispitanici su bili odrasle, zdrave osobe, koje ne troše nikakve lijekove, pri čemu su regrutirani ispitanici tri različita tipa prehrane: omnivori ili svejedi (OMN), vegani (VEG) te lakto-ovovegetarijanci (LOV). U istraživanju je sudjelovalo 49 ispitanika: 19 muškaraca i 30 žena, u dobnom rasponu od 22-52 godine. Ispitanici su popunili kraći anketni listić o antropometrijskim podacima, socio-ekonomskom statusu te navici pušenja (**Prilog 1**). S obzirom na stupanj obrazovanja ispitanici sa srednjom i višom stručnom spremom su svrstani u SSS skupinu, a oni s visokom stručnom spremom u VSS skupinu. Osnovni podaci o ispitanicima dani su u **Tablici 7**.

Prva dva dana ispitanici su morali iz prehrane potpuno isključiti unos svih namirnica i hrane koja u sastavu ima žitarice i soju. Zbog smanjenog dnevnog unosa ugljikohidrata predložen je zamjenski unos krumpira, batata (slatkog krumpira), bundeve, graha, graška, leće, slanutka i orašastih plodova. Ispitanici su po želji i bez količinskih ograničenja mogli konzumirati mlijeko i mliječne proizvode, meso, jaja, svo voće i povrće, gljive, orašaste plodove i sva bezalkoholna i alkoholna pića osim piva i napitaka od soje ili žitarica.

Na temelju rezultata analize DON-a i derivata u namirnicama s tržišta RH odabrana su tri proizvoda koje su ispitanici konzumirali treći dan: polubijeli kruh, pšenične mekinje i žitne pahuljice s mekinjama (eng. *bran flakes*). Za svakog ispitanika je, na temelju tjelesne mase, izračunata količina namirnica koje mogu konzumirati u jednom danu, a da se ne prijeđe akutna referentna vrijednost (ARfD) od 8 µg/kg t.m. Količine DON-a koje su ispitanici unosili navedene su u **Tablici 14**.

Izračunata količina je podijeljena kroz tri obroka: doručak, ručak i večeru. Svaki ispitanik je dobio odvagane količine namirnica koje je morao konzumirati, detaljne upute o prehrani tijekom tri dana ispitivanja te obrasce (**Prilog 2**) u koje su trebali bilježiti unos hrane i pića, posude za prvi jutarnji uzorak i 24-satni uzorak urina te upute za prikupljanje uzoraka urina (**Prilog 2**).

Trećeg dana istraživanja, uz konzumaciju proizvoda koje su dobili, ispitanici su počeli prikupljati uzorke urina. Prvi jutarnji uzorci urina (prije unosa bilo kakve hrane i pića) prikupljeni su u nesterilne plastične posude (otprilike 50 mL). Nakon miješanja, uzorak od 10 mL je prebačen u plastičnu kivetu (Falcon) i čuvan u zamrzivaču (-20°C) do analize. Prvi jutarnji uzorak urina služi za provjeru eventualne prisutnosti DON-a i derivata što bi ukazivalo na konzumaciju žitarica i proizvoda tijekom prethodna dva dana. Ostale urine trećeg dana i prvi jutarnji urin četvrtog dana istraživanja (24-satni uzorak) prikupljeni su u plastične boce od 2 L i čuvani u hladnjaku tijekom prikupljanja do analize. Po dostavljanju 24-satnog uzorka urina, izmjeren je volumen, cijeli uzorak je promiješan i izdvojen uzorak od 10 mL koji je prebačen u plastičnu kivetu (Falcon) i čuvan u zamrzivaču (-20°C) do analize. Uzorci urina su preuzimani u direktnom dogovoru s ispitanicima, odmah po isteku 24-satnog perioda.

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo za istraživanja na ljudima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta i svi ispitanici su potpisali obrazac kojim potvrđuju suglasnost za sudjelovanje nakon što su obaviješteni o detaljima istraživanja (**Prilog 3**).

Tablica 7 Podaci o ispitanicima

Ispitanik	Dob (god.)	Spol	Tjelesna masa (kg)	Visina (cm)	BMI*	Pušenje**	Trajanje (god.)	Cigareta na dan	Tip prehrane***	Edukacija****	Primanja (HRK)
HAH_01	46	M	65	174	21,5	N			LOV	VSS	11000
HAH_02	38	Ž	54	160	21,1	N			OMN	VSS	12500
HAH_03	39	M	94	167	33,7	N			OMN	VSS	12500
HAH_04	39	M	70	176	22,6	P	20	15	OMN	SSS	2850
HAH_05	34	M	80	192	21,7	N			OMN	VSS	11000
HAH_06	30	Ž	48	165	17,6	P		1,5	OMN	VSS	7000
HAH_07	31	Ž	50	163	18,8	N			OMN	VSS	6300
HAH_09	37	Ž	60	177	19,2	P	23	25	OMN	VSS	1500
HAH_10	38	Ž	55	168	19,5	N			OMN	SSS	1500
HAH_12	39	Ž	55	164	20,4	N			OMN	SSS	2000
HAH_14	30	M	85	183	25,4	N			OMN	VSS	3200
HAH_15	26	Ž	60	174	19,8	P	5	0,3	OMN	VSS	10000
HAH_16	33	Ž	63	165	23,1	N			OMN	VSS	4000
HAH_17	37	Ž	62	166	22,5	N			OMN	VSS	9000
HAH_18	46	Ž	61	172	20,6	P	20	3	OMN	VSS	5000
HAH_19	31	M	85	195	22,4	N			OMN	VSS	8000
HAH_20	27	M	75	195	19,7	N			OMN	VSS	5600
HAH_21	29	Ž	63	167	22,6	N			OMN	VSS	5700
HAH_22	52	M	105	185	30,7	N			OMN	SSS	3000
HAH_54	32	Ž	55	160	21,5	N			LOV	VSS	5000

Tablica 7 Podaci o ispitanicima - nastavak

Ispitanik	Dob (god.)	Spol	Tjelesna masa (kg)	Visina (cm)	BMI*	Pušenje**	Trajanje (god.)	Cigareta na dan	Tip prehrane***	Edukacija*** *	Primanja (HRK)
HAH_58	38	Ž	65	160	25,4	N			OMN	SSS	6000
HAH_59	33	Ž	66	181	20,1	P	15	10	VEG	VSS	3500
HAH_60	33	Ž	63	163	23,7	N			VEG	VSS	4000
HAH_61	25	Ž	55	160	21,5	P	6	3	VEG	SSS	2300
HAH_62	29	M	68	178	21,5	P	10	10	VEG	SSS	2300
HAH_63	33	Ž	62	164	23,1	P	10	15	VEG	VSS	6000
HAH_64	38	Ž	65	176	21,0	P	21 (4 g pauze)	20	VEG	SSS	6000
HAH_65	29	Ž	72	170	24,9	N			VEG	VSS	2000
HAH_66	23	Ž	54	172	18,3	P	9	20	LOV	VSS	1900
HAH_67	44	Ž	96	174	31,7	N			VEG	SSS	4000
HAH_68	24	Ž	65	175	21,2	N			VEG	VSS	2300
HAH_69	35	Ž	57	159	22,5	N			VEG	SSS	3500
HAH_70	23	Ž	63	169	22,1	N			VEG	SSS	2300
HAH_71	35	Ž	65	177	20,7	N			VEG	VSS	2300
HAH_72	30	M	72	182	21,7	P	10	2	VEG	VSS	2300
HAH_74	24	Ž	63	172	21,3	N			OMN	VSS	4000
HAH_75	24	M	90	179	28,1	N			OMN	SSS	4000
HAH_76	38	M	78	190	21,6	N			LOV	SSS	3500
HAH_77	31	Ž	46	169	16,1	N			LOV	VSS	3500
HAH_78	22	M	76	178	24,0	N			OMN	SSS	2600
HAH_79	30	M	77	183	23,0	N			VEG	SSS	4000

Tablica 7 Podaci o ispitanicima - nastavak

Ispitanik	Dob (god.)	Spol	Tjelesna masa (kg)	Visina (cm)	BMI*	Pušenje**	Trajanje (god.)	Cigareta na dan	Tip prehrane***	Edukacija****	Primanja (HRK)
HAH_80	33	M	84	167	30,1	N			OMN	VSS	5000
HAH_81	30	Ž	69	181	21,1	N			OMN	VSS	6500
HAH_82	28	M	105	169	36,8	N			OMN	VSS	4250
HAH_83	26	Ž	51	168	18,1	P	8	5	OMN	SSS	4250
HAH_84	25	M	106,4	189	29,8	P	10	20	OMN	VSS	3000
HAH_85	24	Ž	54	169	18,9	N			OMN	VSS	3000
HAH_86	33	M	113	182	34,1	P	15	20	OMN	SSS	2800
HAH_87	38	M	86	184	25,4	N			OMN	VSS	3925

*BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

**P – pušači; N – nepušači

***OMN – omnivori; VEG – vegani; LOV – lakto-ovovegetarijanci

**** SSS – srednja stručna sprema; VSS – visoka stručna sprema

3.2.2.2. Analiza DON-a i glukuronidnih metabolita u urinu

Detekcija i kvantifikacija provedena je s QTrap 5500 MS/MS sustavom (AB Sciex) opremljenim s turbo ion spray elektrosprejno-ionizacijskim (ESI) izvorom i serijom 1290 UHPLC sustava (Agilent), prema metodi opisanoj u radu Šarkanja i sur. (2013). Određivani su slobodni DON i njegovi glukuronidni oblici: DON-3-GlcA i DON-15-GlcA.

Prividno iskorištenje te limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) određeni su analizom uzoraka urina u koje je dodana poznata količina analiziranih tvari. Korišten je odnos signala i šuma od 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ. Ključni validacijski parametri metode dani su u **Tablici 8**.

Tablica 8 Vrijednosti prividnog iskorištenja, limita detekcije i limita kvantifikacije za DON i metabolite u urinu

	DON	DON-3-GlcA	DON-15-GlcA
LOD (ng/mL)	0,15	3,00	1,50
LOQ (ng/mL)	0,50	9,99	5,00
Prividno iskorištenje (%)	93,8	104	98,4

Analizirane koncentracije su korigirane za srednju vrijednost prividnog iskorištenja analita. U svrhu daljnjih izračuna, uzorcima za koje su utvrđene koncentracije niže od LOD-a ili LOQ-a pripisano je pola vrijednosti ovih parametara.

3.2.2.3. Određivanje kreatinina u urinu

Kako bi se uklonio utjecaj količine konzumirane tekućine, odnosno volumena urina na koncentraciju biomarkera u uzorcima urina, određena je i količina kreatinina u urinu. Za određivanje kreatinina korištena je "razrijedi i injiciraj" LC-MS/MS metoda Wartha i sur. (2012). Koncentracija DON-a i metabolita u urinu izražena je u $\mu\text{g/g}$ kreatinina.

3.2.2.4. Izračun ukupno izlučenog DON-a i metabolita

Koncentraciji nepromijenjenog DON-a u urinu pribrojena je koncentracija glukuronidnih metabolita (DON-3-GlcA i DON-15-GlcA) koja je preračunata u ekvivalente DON-a prema formuli:

$$e = \frac{C_{DON-3-GlcA \text{ ili } DON-15-GlcA} \times MW_{DON}}{MW_{DON-3-GlcA \text{ ili } DON-15-GlcA}} \quad (4)$$

gdje je: e - ekvivalenti DON-a iz glukuronida [$\mu\text{g}/\text{danu}$],
 C - koncentracija DON-3-GlcA ili DON-15-GlcA u urinu [$\mu\text{g}/\text{kg}$],
 Mw - molekularna masa DON-3-GlcA ili DON-15-GlcA [kg/dan].

Ukupna količina izlučenog DON-a (i_{DON}) je izračunata kao suma slobodnog DON-a i ekvivalenta DON-a iz DON-3-GlcA i DON-15-GlcA kako bi se korigirala veća molekulska masa glukuronida.

Na temelju podataka o količini DON-a i derivata u namirnicama koje su ispitanici konzumirali i podataka o količini nepromijenjenog i glukuronidnog DON-a u urinu određena je stopa izlučivanja i stopa konjugacije za svakog pojedinog ispitanika.

Stopa izlučivanja određena je prema formuli:

$$SI = \frac{i_{DON}}{u_{DON}} \times 100 \quad (5)$$

gdje je: SI - stopa izlučivanja [%],
 i_{DON} - ukupno izlučeni DON [$\mu\text{g}/\text{danu}$],
 u_{DON} - unos DON-a [$\mu\text{g}/\text{danu}$].

Stopa konjugacije određena je prema formuli:

$$SK = \frac{C_{DON-3-GlcA} + C_{DON-15-GlcA}}{i_{DON}} \times 100 \quad (6)$$

gdje je: SK - stopa konjugacije [%],

C - koncentracija DON-3-GlcA ili DON-15-GlcA u urinu [$\mu\text{g}/\text{kg}$],

iDON - ukupno izlučeni DON [$\mu\text{g}/\text{danu}$].

Ispitan je utjecaj različitih značajki podskupina ispitanika na udio ukupno izlučenog DON-a tijekom 24-satnog perioda te na udio nepromijenjenog DON-a i glukuronidnih metabolita u urinu.

3.2.2.5. Unos nutrijenata ispitanika

Na temelju dnevnika prehrane koji su ispitanici ispunjavali kroz tri dana, napravljen je izračun unosa nutrijenata za svakog ispitanika pojedinačno, pomoću programa NutriPro (Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek) kreiranog za specifičnu obradu nutricionističkih podataka temeljen na tablicama o sastavu namirnica i pića (Kaić-Rak i AntoniĆ, 1990). Određen je unos vode, ukupnih bjelančevina, bjelančevina biljnog i životinjskog porijekla, ukupnih masti, zasićenih masti, jednostruko i višestruko nezasićenih masti, ukupnih ugljikohidrata, vlakana, alkohola, kao i unos energije. Odvojeno je računat unos navedenih nutrijenata za prva dva dana pripremne prehrane te za treći dan intervencijske prehrane. Naime, unos tijekom prva dva dana prehrane bolje odražava prehrambene navike ispitanika, unatoč tome što je unos žitarica bio zabranjen.

3.2.2.6. Statistička obrada

Primarna obrada podataka provedena je u programu MS Office Excel 2016 (Microsoft). Podaci o konzumaciji prikazani su kao srednja vrijednost, standardna devijacija, minimalni i maksimalni unos, te medijan, dok su podaci o izloženosti prikazani kroz prosjek i raspon pri LB i UB vrijednostima. Ispitivanje normalnosti razdiobe provedeno je Kolmogorov-Smirnov testom. Razlika između dvije nezavisne varijable testirana je neparametrijskim Mann-Whitneyevim U testom. Za izračun korelacije numeričkih vrijednosti korišten je Spearmanov test korelacije. Statistička obrada provedena je pomoću programa Statistica 13.3 (StatSoft, SAD) uz statističku značajnost razlika ili korelacije ukoliko je p-vrijednost bila manja od 0,05.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PROCJENA IZLOŽENOSTI POPULACIJE RH DON-U I DERIVATIMA

4.1.1. Unos namirnica koje sadrže DON i derivate

Tablica 9 Konzumacija namirnica u kojima se može naći DON (g/dan) među odraslom populacijom s područja RH

	n	Prosjek	SD	Min	Max	Medijan
Kruh i peciva	1801	134,58	101,67	0,03	833,33	113,33
Kruh, bijeli	809	112,53	85,55	0,03	617,33	93,33
Kruh, polubijeli	997	118,68	80,06	0,89	833,33	100,00
Kruh, crni	177	111,49	74,87	0,12	400,00	92,80
Kruh, integralni	48	80,27	64,34	0,14	350,00	79,72
Pecivo, integralno	18	55,03	48,14	11,20	220,00	43,60
Slanac	177	47,71	28,23	0,24	175,00	51,20
Pizza	256	35,59	54,76	0,31	441,90	17,41
Fini pekarski proizvodi	778	76,81	114,72	0,24	1305,00	37,60
Buhtla	31	36,68	38,50	4,50	177,00	21,00
Burek	252	75,80	79,53	0,75	500,00	42,00
Kroasan	85	39,06	35,23	0,24	170,00	28,80
Krofna	101	48,51	42,00	1,60	180,00	32,40
Palačinke	256	76,12	111,64	1,50	790,00	34,60
Štrudla	225	52,48	88,80	0,35	883,20	24,50
Žitarice za doručak	314	51,78	80,41	0,00	402,00	11,37
Pločica od žitarica	5	53,40	38,43	9,00	102,00	64,00
Čokolino	35	23,75	29,10	0,50	128,00	15,00
Griz	21	0,51	0,77	0,05	2,74	0,22
Palenta	131	3,31	3,54	0,00	14,43	1,55
Corn flakes	70	97,46	82,99	7,00	376,67	72,00
Žitne pahuljice s čokoladom	14	112,91	107,93	1,00	400,00	93,60
Žitne pahuljice s voćem	5	78,40	72,21	18,00	200,00	72,00
Zobene pahuljice	32	84,48	71,17	14,00	300,00	67,00
Müesli	22	146,36	114,86	2,80	315,00	118,00
Keksi	373	32,50	36,53	0,00	272,00	21,00
Krekeri	25	25,47	39,17	0,00	150,00	8,64
Čajni kolutići	64	34,07	25,12	2,88	110,00	27,20
Napolitanke	219	30,05	33,72	0,09	200,00	18,00
Domaćica	105	25,94	25,49	0,05	180,00	17,28
Tjestenina	1398	33,59	51,48	0,04	681,65	18,33
Pivo	509	495,02	574,39	0,24	5400,00	300,00
Ostalo	53	60,81	100,07	0,60	500,00	21,00
Kokice	32	45,38	90,38	0,60	500,00	21,00
Kukuruz, kuhani	22	80,48	109,09	0,69	462,00	39,97
Ukupno	1987	368,97	451,28	2,29	5748,13	217,46

Prosječna konzumacija pojedinih namirnica u kojima se može naći DON prikazana je u **Tablici 9**. Navedeni rezultati prikazani su samo za konzumente. Vidljivo je da je najveći broj konzumenata konzumirao pšenični kruh i peciva, nakon čega je slijedila konzumacija tjestenine, finih pekarskih proizvoda i piva, dok su ostali proizvodi bili zastupljeni u puno manjoj količini. Što se tiče unosa različitih namirnica, najveća prosječna konzumacija je utvrđena za pivo kao i maksimalno prijavljeni dnevni unos.

Turner i sur. (2009) su isto određivali unos proizvoda na bazi žitarica u kojima se može naći DON te su također ustanovili najveću konzumaciju piva (238 g/dan), ali je prijavljeni unos bio duplo manji nego u ovom istraživanju.

Od 509 konzumenata piva većinu su činili muškarci (389 ispitanika), dok je žena bilo 120. Prema dobi je nešto veći broj konzumenata bio u mlađoj populaciji (18-40 godina; 265 ispitanika) nego u starijoj populaciji (41-64 godine; 244 ispitanika). Od 389 muških konzumenata piva, njih 205 je pripadalo mlađoj populaciji, dok je 184 pripadalo starijoj populaciji. Što se tiče ženskih konzumenata piva, bio je podjednak broj u različitoj dobnoj populaciji (po 60 konzumenata i u mlađoj i u starijoj populaciji).

4.1.2. DON i derivati u proizvodima od žitarica

Tablica 10 Srednje koncentracije DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a u analiziranim proizvodima na bazi žitarica pri LB i UB vrijednostima ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	Namirnica	3-Ac-DON		15-Ac-DON		DON	D3G	
		LB	UB	LB	UB		LB	UB
BRAŠNO	Brašno, pšenično, bijelo	0	0,2	0	0,5	153,77	0	5,36
	Brašno, pšenično, bijelo	0	0,2	0	0,5	84,62	0	3,04
	Brašno, pšenično, integralno	0	0,2	0	0,5	173,20	0	6,31
	Brašno, pšenično, integralno	0	0,2	0	0,5	138,38	0	9,86
	Brašno, raženo	0	0,2	0	0,5	175,55	0	0,01
	Brašno, raženo	0	0,2	0	0,5	56,09	0	0,01
KRUH I PECIVA	Kruh, bijeli	0	0,2	0	0,5	147,77	0	0,01
	Kruh, bijeli	0	0,2	0	0,5	110,69	0	2,63
	Kruh, bijeli	0	0,2	0	0,5	23,21	0	0,01
	Kruh, polubijeli	0	0,2	0	0,5	137,65	0	3,29
	Kruh, polubijeli	0	0,2	0	0,5	80,54	0	4,24
	Kruh, polubijeli	0	0,2	0	0,5	33,59	0	0,01
	Kruh, crni	0	0,2	0	0,5	118,79	0	4,4
	Kruh, crni	0	0,2	0	0,5	102,11	0	3,19
	Kruh, crni	0	0,2	0	0,5	81,38	0	3,11
	Kruh, integralni	0	0,2	0	0,5	68,40	0	0,01
	Kruh, integralni	0	0,2	0	0,5	65,04	0	0,01
	Pecivo, integralno	0	0,2	0	0,5	87,04	0	0,01
	Pecivo, integralno	0	0,2	0	0,5	18,53	0	0,01
	Slanac	0	0,2	0	0,5	126,56	0	2,59
Slanac	0	0,2	0	0,5	58,61	0	0,01	
PIZZA	Pizza, funghi	0	0,2	0	0,5	102,27	0	1,87
	Pizza, capricciosa	0	0,2	0	0,5	38,38	0	1,09
	Pizza	0	0,2	0	0,5	19,98	0	0,01
FINI PEKARSKI PROIZVODI	Buhtla s čokoladom	0	0,2	0	0,5	12,71	0	0,01
	Buhtla s pekmezom	0	0,2	0	0,5	20,7	0	0,01
	Burek s mesom	0	0,2	0	0,5	56,67	0	1,51
	Burek s mesom	0	0,2	0	0,5	21,33	0	0,43

Tablica 10 Srednje koncentracije DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a u analiziranim proizvodima na bazi žitarica ($\mu\text{g}/\text{kg}$) - nastavak

	Namirnica	3-Ac-DON		15-Ac-DON		DON	D3G	
		LB	UB	LB	UB		LB	UB
FINI PEKARSKI PROIZVODI	Burek sa sirom	0	0,2	0	0,5	50,06	0	1,39
	Burek sa sirom	0	0,2	0	0,5	20,91	0	0,01
	Kroasana, integralna	0	0,2	0	0,5	70,83	0	1,75
	Kroasana	0	0,2	0	0,5	35,04	0	0,01
	Krofna s pekmezom	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Krofna s pekmezom	0	0,2	0	0,5	30,74	0	0,01
	Palačinke, integralno pšenično brašno	0	0,2	0	0,5	29,17	0	0,72
	Palačinke, bijelo pšenično brašno, Tip 550	0	0,2	0	0,5	23,69	0	0,38
	Štrudla s jabukama	0	0,2	0	0,5	31,51	0	1,27
	Štrudla s čokoladom i vanilijom	0	0,2	0	0,5	16,74	0	0,01
ŽITARICE ZA DORUČAK	Pločica od žitarica	0	0,2	0	0,5	64,26	0	0,01
	Pločica od žitarica, čokolada-banana	0	0,2	0	0,5	19,13	0	6,97
	Pločica od žitarica, čokolada-kikiriki	0	0,2	0	0,5	16,05	0	0,01
	Čokolino, žitna kašica	0	0,2	0	0,5	62,01	0	0,01
	Čokolino, žitna kašica	0	0,2	0	0,5	47,03	0	0,01
	Griz, Tip 400	0	0,2	0	0,5	99,43	0	3,6
	Griz, Tip 400	0	0,2	0	0,5	38,32	0	0,01
	Palenta	0	0,2	0	0,5	141,70	0	0,01
	Palenta	0	0,2	0	0,5	134,01	0	0,01
	Palenta	0	0,2	0	0,5	72,20	0	3,67
	Corn flakes	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Corn flakes	0	0,2	0	0,5	76,23	0	0,01
	Corn flakes	0	0,2	0	0,5	58,23	0	0,01
	Bran flakes	0	0,2	0	0,5	171,04	0	4,35
	Žitne pahuljice s čokoladom	0	0,2	0	0,5	106,4	0	0,01
	Žitne pahuljice s voćem	0	0,2	0	0,5	24,81	0	0,01
	Zobene pahuljice	0	7,0 6	0	0,5	84,94	0	18,43
	Zobene pahuljice	0	0,2	0	0,5	26,11	0	3,72
	Müsli, integralne žitarice i voće	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Müsli, integralne žitarice i voće	0	0,2	0	0,5	324,45	0	0,01

Tablica 10 Srednje koncentracije DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a u analiziranim proizvodima na bazi žitarica ($\mu\text{g}/\text{kg}$) - nastavak

	Namirnica	3-Ac-DON		15-Ac-DON		DON	D3G	
		LB	UB	LB	UB		LB	UB
	Müsli, integralne žitarice i voće	0	0,2	0	0,5	39,13	0	0,01
	Pšenične mekinje	0	0,2	0	0,5	288,64	0	13,69
KEKSI	Keksi, slani, krekeri	0	0,2	0	0,5	53,79	0	0,01
	Keksi, slani, krekeri	0	0,2	0	0,5	37,94	0	0,01
	Keksi, slatki, čajni kolutići	0	0,2	0	0,5	103,56	0	0,01
	Keksi, slatki, napolitanke s čokoladom	0	0,2	0	0,5	48,97	0	0,01
	Keksi, slatki, napolitanke	0	0,2	0	0,5	29,56	0	0,01
	Keksi, slatki, čajno pecivo	0	0,2	0	0,5	16,24	0	0,01
TJESTENINA	Tjestenina, penete br. 24	0	0,2	0	0,5	0,33	0	0,01
	Tjestenina, penne rigate n. 73	0	0,2	0	0,5	43,08	0	2,19
	Tjestenina, penne rigate	0	0,2	0	0,5	33,68	0	1,00
	Tjestenina, pužići br. 156	0	0,2	0	0,5	16,27	0	0,01
	Tjestenina, pene rigate piccole	0	0,2	0	0,5	13,85	0	0,01
	Tjestenina, makaroni	0	0,2	0	0,5	13,23	0	0,90
PIVO	Pivo, svijetlo	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Pivo, svijetlo	0	0,2	0	0,5	42,02	0	0,01
	Pivo, svijetlo	0	0,2	0	0,5	26,19	0	4,24
	Pivo, svijetlo	0	0,2	0	0,5	25,87	0	0,01
OSTALO	Kokice, za mikrovalnu	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Kokice	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Kokice	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Kukuruz, kuhani	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01
	Kukuruz, kuhani	0	0,2	0	0,5	0,10	0	0,01

Iz **Tablice 10**, koja pokazuje koncentracije DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i D3G-a pri LB i UB vrijednostima u proizvodima na bazi žitarica, vidljivo je da niti jedan uzorak nije premašio MDK vrijednost koja je propisana za DON (**Tablica 4**). Najviše koncentracije su očekivano sadržavali proizvodi od integralnih ili cjelovitih žitarica jer je koncentracija DON-a najveća u vanjskom sloju zrna. DON je detektiran u skoro svim analiziranim uzorcima (71/81; 88%). U uzorcima nije detektiran 15-Ac-DON, a 3-Ac-DON je sadržavao mjerljive koncentracije samo u

jednom uzorku zobnih pahuljica. D3G je izmjeren u koncentracijama iznad LOQ-a u 38% uzoraka, a srednja koncentracija je iznosila 1,5 µg/kg. Prosječni doprinos D3G-a ukupnoj količini DON-a u uzorcima je bio 1,7%. Najviši udio (19%) je zabilježen u uzorku pločica od žitarica.

Galaverna i sur. su 2009. godine analizom maskiranog oblika DON-a u proizvodima na bazi pšenice utvrdili nisku koncentraciju DON-a. Ista skupina autora je potom provela istraživanje umjetne inokulacije zrna pšenice rodnom *Fusarium* pri čemu je doprinos D3G-a ukupnoj količini DON-a iznosio 2-30%, što ukazuje na potencijalno značajan doprinos glukozidnih oblika DON-a ukupnoj kontaminaciji.

Koncentracija DON-a i maskiranih i acetiliranih oblika u proizvodima na bazi žitarica određivana je i u proizvodima s njemačkog tržišta (Vendl i sur., 2010). Osamdeset četiri uzorka proizvoda na bazi žitarica podijeljeni su u 25 kategorija proizvoda. Za svaku kategoriju proizvoda, odabrano je tri do četiri uzorka istog proizvoda, ali različitog proizvođača. Za razliku od ovog istraživanja gdje je DON bio detektiran u većini uzoraka, u istraživanju navedenih autora DON je detektiran u 8 kategorija proizvoda (pšeničnom brašnu, pšeničnom kruhu, pšeničnom kruhu od cjelovitih žitarica, pšeničnoj krupici, keksima, pšeničnim žitaricama za doručak, pahuljicama od mekinja i krekerima), D3G u 2 kategorije proizvoda (pšeničnom kruhu i pšeničnom kruhu od cjelovitih žitarica), dok 3-Ac-DON nije detektiran ni u jednoj kategoriji (Vendl i sur., 2010). Slično ovom istraživanju, najveća koncentracija DON-a je bila u proizvodima od cjelovitih žitarica (*bran flakes*), zatim u krekerima i pšeničnom brašnu.

Rezultati ovog istraživanja se podudaraju s podacima koje je objavila EFSA (2013a), po kojima se 3-Ac-DON i 15-Ac-DON rjeđe detektiraju i u znatno manjim količinama nego DON. Međutim, za razliku od ovog istraživanja, u EFSA-inom izvješću se 15-Ac-DON pojavljuje u većem broju proizvoda nego 3-Ac-DON. Od ukupno 3593 uzorka za koje je EFSA imala rezultate analiza za DON, 3-Ac-DON i 15-Ac-DON, u 1377 uzoraka je kvantificiran barem jedan od navedenih oblika DON-a. 3-Ac-DON je pronađen u 12 uzoraka u kojima nije detektiran 15-Ac-DON, 15-Ac-DON je pronađen u 83 uzorka u kojima nije detektiran 3-Ac-DON, a DON je pronađen u 1280 uzoraka u kojima nisu detektirani acetilirani derivati. Prosječni doprinos DON-a sumi DON-a, 3-Ac-DON-a i 15-Ac-DON-a je iznosio od 72,2% u tjestenini do 82,3% u mlinskim proizvodima (brašno, krupica i mekinje različitih žitarica). S druge strane, prosječni doprinos 3-Ac-DON-a i

15-Ac-DON-a je bio najmanji u mlinskim proizvodima (8% za 3-Ac-DON i 9,7% za 15-Ac-DON) a najveći u tjestenini (13,9% za 3-Ac-DON i 13,9% za 15-Ac-DON). Kako podaci kojima EFSA raspolaže potječu iz monitoringa pojedinih država članica EU, rezultati za D3G su bili dostupni samo iz Češke i to samo za neprerađenu pšenicu i raž. D3G je pronađen samo u 5% uzoraka, što je znatno manje nego u ovom istraživanju gdje je postotak iznosio 38%. Osim analiziranih proizvoda, razlike u pojavnosti su možda i posljedica drukčije analitičke metodologije (EFSA, 2013a), godine analize (vremenske prilike koje su pogodovale nastanku većih količina maskiranih oblika), vrsti žitarica (bolja glikozidacija DON-a), i vrsti plijesni koja je inficirala žitarice (Kovač i sur., 2018).

4.1.3. Izloženost populacije RH DON-u i derivatima

Tablica 11 Ukupna izloženost odrasle populacije RH DON-u i izloženost prema različitim kategorijama proizvoda pri LB i UB vrijednostima ($\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. na dan)

	LB		UB	
	Prosjek	Minimum-Maksimum	Prosjek	Minimum-Maksimum
Ukupno	0,24	0,00 - 2,12	0,25	0,00 - 2,16
Kruh i peciva	0,16	0,00 - 0,96	0,16	0,00 - 0,98
Pizza	0,03	0,00 - 0,26	0,03	0,00 - 0,27
Fini pekarski proizvodi	0,03	0,00 - 0,43	0,03	0,00 - 0,45
Žitarice za doručak	0,05	0,00 - 0,66	0,05	0,00 - 0,67
Keksi	0,02	0,00 - 0,15	0,02	0,00 - 0,15
Tjestenina	0,01	0,00 - 0,18	0,01	0,00 - 0,19
Pivo	0,14	0,00 - 1,53	0,15	0,00 - 1,65
Ostalo	0,00	0,00 - 0,00	0,00	0,00 - 0,01

Na temelju koncentracija DON-a i derivata i podataka o konzumaciji proizvoda izračunata je ukupna izloženost populacije DON-u te raspon izloženosti prema kategoriji proizvoda (**Tablica 11**). Rezultati pokazuju da je prosječna izloženost odrasle populacije RH 0,24 odnosno 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. na dan pri LB odnosno UB vrijednostima, što je u odnosu na grupni TDI za DON i derivate znatno manja vrijednost. Od ukupnog broja konzumenata proizvoda na bazi žitarica, 24 konzumenta (1,2%) je bilo izloženo koncentraciji DON-a i derivata višoj od utvrđenog grupnog TDI-ja od 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. na dan. Izloženost konzumenata putem pojedinog tipa proizvoda je bila ispod grupnog TDI-ja za sve proizvode, osim za pivo kod kojeg je jedan od 509

konzumenata (0,2%) unio više od grupnog TDI-ja. Izloženost DON-u koja prelazi tolerirani dnevni unos od 1 µg/kg t.m. na dan kretala se u rasponu od 1-2,12 µg/kg t.m. na dan pri LB vrijednostima, odnosno 1-2,16 µg/kg t.m. na dan pri UB vrijednostima, što podrazumijeva nizak rizik kroničnih štetnih učinaka. Kod 12 od 24 konzumenata s većom izloženošću najveći doprinos je imalo pivo (0,34-1,65 µg/kg t.m. na dan).

EFSA je u izvješću iz 2013. godine utvrdila veću izloženost DON-u. Raspon LB vrijednosti kretao se od 0,17-0,32 µg/kg t.m. na dan, dok je odgovarajući raspon UB vrijednosti bio od 0,25-0,46 µg/kg t.m. na dan. Postotak konzumenata koji su premašili grupni TDI je pri donjoj granici LOD-a bio 0-0,3%, dok je pri gornjoj granici LOD-a bio 0-5,5%. EFSA navodi da se rezultati mogu razlikovati iz više razloga. Navedeno istraživanje nije u izračun izloženosti uključilo D3G, te su za određivanje izloženosti korišteni podatci monitoringa za period između 2007.-2012. godine (EFSA, 2013a). U istraživanju izloženosti populacije RH DON-u prikupljanje i analiza proizvoda provedena je 2014. godine. Kako koncentracija DON-a u žitaricama ovisi o vremenskim uvjetima, odnosno o tome da li je sezona bila kišovita i pogodna za razvoj *Fusarium* plijesni, o tome ovise i koncentracije DON-a u proizvodima. Međutim za proizvode koji su analizirani i čiji rezultati su prikazani u **Tablici 10** ne znamo da li su proizvedeni od žitarica berbe 2013. ili prije, pa koncentraciju DON-a ne možemo povezati s vremenskim uvjetima.

Tablica 12 Minimalni i maksimalni doprinos pojedinih grupa hrane ukupnoj izloženosti odrasle populacije RH DON-u pri LB vrijednostima (%)

Grupa hrane	Minimum - Maksimum
Kruh i peciva	0,0023 - 44,44
Pizza	0,014 - 13,19
Fini pekarski proizvodi	0,0054 - 21,87
Žitarice za doručak	0,0002 - 33,40
Keksi	0,0001 - 7,58
Tjestenina	0,0007 - 9,14
Pivo	0,0036 - 77,38
Ostalo	0 - 0,04

Tablica 12 prikazuje postotak minimalnog i maksimalnog doprinosa pojedinih grupa hrane ukupnoj izloženosti DON-u pri LB vrijednostima. Rezultati pokazuju da je najveći doprinos ukupnoj izloženosti bio u grupi piva, nakon čega slijede kruh i peciva te žitarice za doručak.

EFSA je u svom istraživanju 2013. godine također određivala minimalni i maksimalni doprinos pojedinih grupa hrane na temelju podataka o prehrambenim navikama država članica koji se nalaze u EFSA-inoj bazi podataka (EFSA Food Comprehensive Database) (EFSA, 2013a). U njihovom istraživanju najveći doprinos je bio u grupi kruha i peciva (66,1%), dok je na drugom mjestu grupa finih pekarskih proizvoda (keksi i kolači) s doprinosom ukupnoj izloženosti od 30%.

Tablica 13 Ukupna izloženost odrasle populacije RH DON-u i izloženost prema podskupinama ispitanika pri LB i UB vrijednostima ($\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. na dan)

		LB				UB		
		N	Prosjek	Min-Maks	% >TDI	Prosjek	Min-Maks	% >TDI
Ukupno		1987	0,24	0,00 - 2,12	1,2	0,25	0,00 - 2,16	1,2
Spol	Muškarci	966	0,28	0,00 - 2,12	1,8	0,30	0,00 - 2,16	1,9
	Žene	1021	0,19	0,00 - 1,63	0,6	0,20	0,00 - 1,64	0,6
Dob	18-40 god.	982	0,26	0,00 - 2,12	1,5	0,27	0,00 - 2,16	1,6
	41-64 god.	1005	0,21	0,00 - 1,34	0,8	0,22	0,00 - 1,40	0,8
BMI	Pothranjeni (< 18,50)	45	0,30	0,00 - 1,25	4,4	0,31	0,00 - 1,31	4,4
	Normalno uhranjeni (18,50-24,99)	955	0,25	0,00 - 2,12	1,3	0,26	0,00 - 2,16	1,4
	Prekomjerna masa (25,00-29,99)	696	0,23	0,00 - 1,92	1,3	0,24	0,00 - 2,04	1,3
	Pretili (≥ 30)	291	0,20	0,00 - 0,95	0,0	0,21	0,00 - 0,96	0,0
Životna sredina	Grad	1236	0,24	0,00 - 2,12	1,1	0,25	0,00 - 2,16	1,2
	Selo	751	0,24	0,00 - 1,63	1,2	0,25	0,00 - 1,64	1,2
Tip prehrane	OMN	1895	0,24	0,00 - 2,12	1,2	0,25	0,00 - 2,16	1,3
	LOV	89	0,16	0,00 - 0,97	0,0	0,17	0,00 - 0,98	0,0
	VEG	3	0,37	0,15 - 0,79	0,0	0,39	0,16 - 0,83	0,0

Osim izloženosti prema kategoriji proizvoda, određivana je i izloženost prema podskupinama ispitanika pri LB i UB vrijednostima (**Tablica 13**). Podjelom ispitanika u podskupine utvrđeno je da je bio podjednak broj muškaraca i žena koji su konzumirali proizvode na bazi žitarica, ali je prosječna izloženost muškaraca bila veća, što se može pripisati konzumaciji većih količina hrane, kao i većih količina piva koje je najviše doprinijelo unosu kod ispitanika koji su premašili grupni TDI. Od 24 konzumenata koji su prešli grupni TDI, 18 konzumenata su muškarci (75%), dok su 6 konzumenata žene (25%). Isto tako, broj mlađih i starijih konzumenata je bio podjednak, ali su mlađi konzumenti bili nešto više izloženi DON-u, što se također može

pripisati konzumaciji većih količina hrane kod mlađe populacije. Kod BMI-ja izloženost se smanjivala s povećanjem tjelesne mase, pa je tako najveća bila kod pothranjenih osoba, a najmanja kod pretilih osoba. Najvjerojatniji razlog razlika je tjelesna masa na koju se izloženost izražava, pri čemu se unosi nisu značajno razlikovali između podskupina. Ujedno, u podskupini pothranjenih osoba najveći je postotak konzumenata čija je izloženost premašila grupni TDI. Podaci pokazuju da prosječna izloženost nije ovisila o životnoj sredini i bila je podjednaka u gradu i na selu, iako je broj ispitanika iz grada bio skoro dvostruko veći od broja ispitanika sa sela. Izračun prosječne izloženosti s obzirom na tip prehrane pokazuje da je izloženost bila najveća u podskupini VEG, zatim u podskupini OMN i najmanja u podskupini LOV ispitanika, iako je najveći broj osoba koje su premašile TDI bio u podskupini OMN. Razlog najveće izloženosti kod VEG je veća konzumacija proizvoda na bazi žitarica budući da oni ne konzumiraju namirnice animalnog porijekla (Clarys i sur., 2014). Osim toga, u podskupinama VEG i LOV je bio znatno manji broj ispitanika nego u podskupini OMN što može utjecati na točnost rezultata.

Ali i sur. (2016) su proveli istraživanje o procjeni izloženosti DON-u na ispitanicima iz Bangladeša i Njemačke. Ispitanici su ispunili upitnik 24-satnog prisjećanja za prethodna dva dana, kao i upitnik o učestalosti konzumacije (FFQ). Na temelju rezultata utvrdili su da kod ispitanika ne postoji statistički značajna razlika u unosu DON-a prema životnoj sredini, kao ni prema dobi, spolu i BMI-ju ispitanika. Osim toga, nijedna osoba u njihovom istraživanju nije premašila TDI, dok su ga u ovom istraživanju premašile 24 osobe.

Ok i sur. (2009) su određivali koncentraciju DON-a na 689 uzoraka proizvoda na bazi žitarica sa korejskog tržišta, te su napravili procjenu izloženosti na temelju podataka o prehrambenim navikama. Njihovi rezultati su pokazali da se izloženost ne razlikuje u ovisnosti o spolu i da je bila podjednaka kod muškaraca i kod žena, za razliku od ovog istraživanja. Što se tiče dobi, ispitanike su podijelili u 3 dobne kategorije koje spadaju u grupu odraslih (20-29, 30-49 i 50-64 godine) i izloženost je bila podjednaka u svim dobnim kategorijama, što se podudara sa rezultatima provedenom na populaciji RH. Ipak, u njihovom istraživanju niti jedna osoba nije prešla TDI.

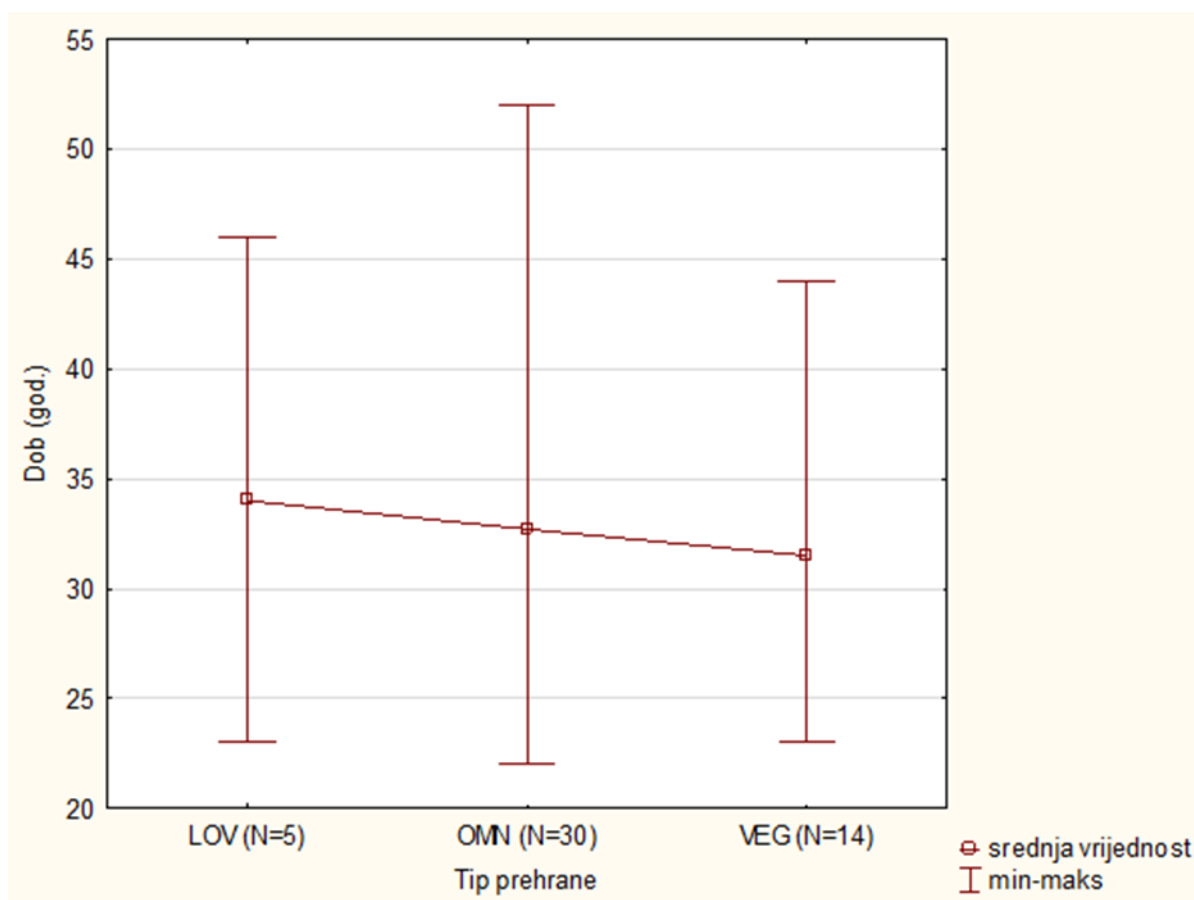
Potpuno drukčije podatke su dobili Raad i sur. (2014) koji su određivali izloženost odrasle libanonske populacije mikotoksinima kroz studiju ukupne prehrane (*total diet study*, TDS). U

njihovom istraživanju prosječna izloženost je bila znatno veća (1,56 µg/kg t.m./dan) od izloženosti populacije RH. Utvrđena prosječna izloženost libanonske populacije je ujedno iznad TDI vrijednosti. Odstupanja rezultata mogu nastati zbog različitih prehrambenih navika, kao i zbog različite godine prikupljanja uzoraka, ovisno o razvoju *Fusarium* plijesni tijekom različitih sezona.

Sirot i sur. (2013) su određivali izloženost francuske populacije mikotoksinima uz TDS. Njihovi rezultati izloženosti su također bili nešto veći od ovdje prezentiranih (0,373-0,379 µg/kg t.m./dan). U njihovom istraživanju je i pri izračunu LB-a i UB-a TDI premašilo tek 0,5% osoba.

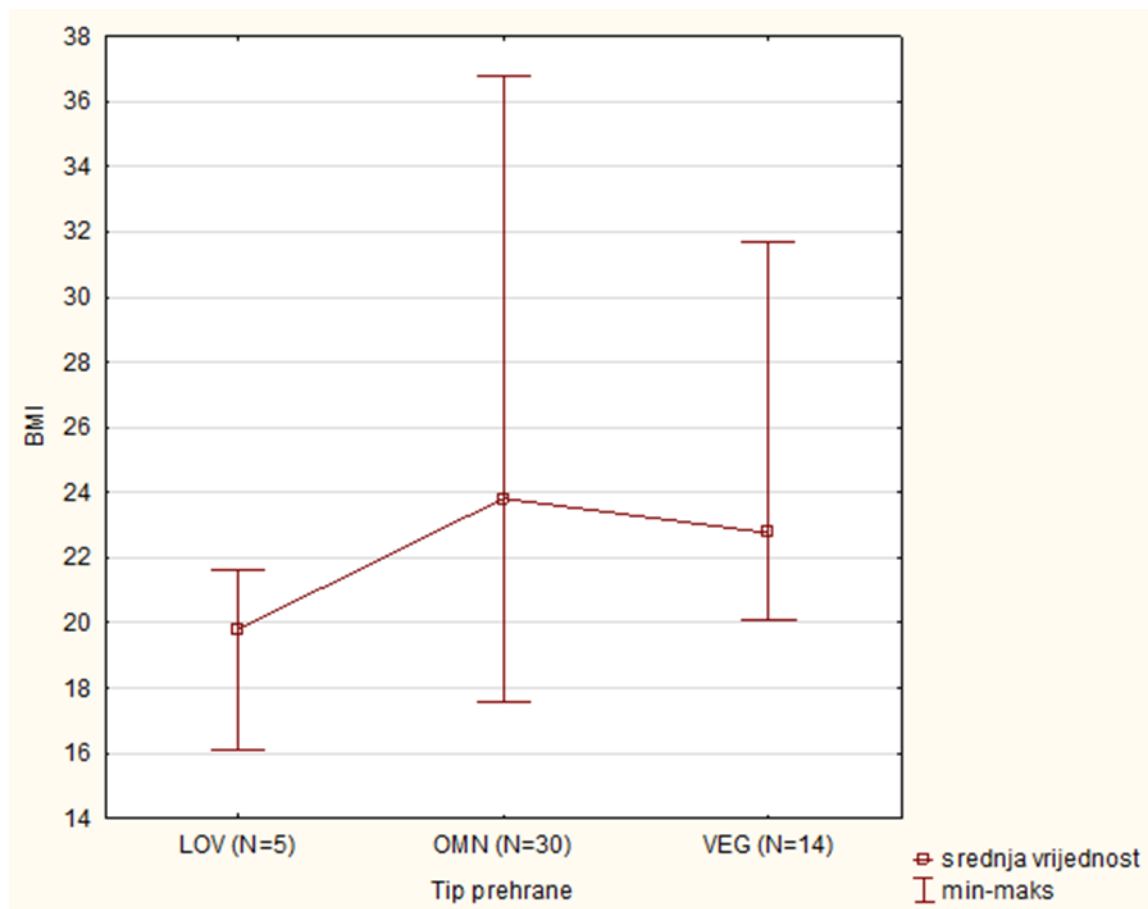
4.2. STUDIJA IZLUČIVANJA DON-A I GLUKURONIDNIH METABOLITA NA ISPITANICIMA

Različita istraživanja (Wells i sur, 2017; Brera i sur., 2015; Court, 2010; Kroon, 2006; Miners i Mackenzie, 1991) pokazuju da dob, spol, BMI, pušenje, mjesečna primanja i stupanj obrazovanja mogu imati utjecaj na izlučivanje DON-a te je stoga provedena usporedba prema tim parametrima na skupini ispitanika različitih tipova prehrane analizom ključnih urinarnih metabolita nakon unosa poznate količine DON-a.



Slika 8 Dob ispitanika podijeljenih u podskupine prema tipu prehrane

Slika 8 prikazuje usporedbu ispitanika s različitim tipom prehrane s obzirom na godine. Iz rezultata je vidljivo da je podjednak prosjek godina u sve tri podskupine ispitanika. Najveći raspon godina je bio u podskupini OMN, dok je kod LOV i VEG podskupina raspon godina bio podjednak. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u dobi ispitanika između promatranih podskupina (LOV-OMN, LOV-VEG, OMN-VEG) ($p > 0,05$).



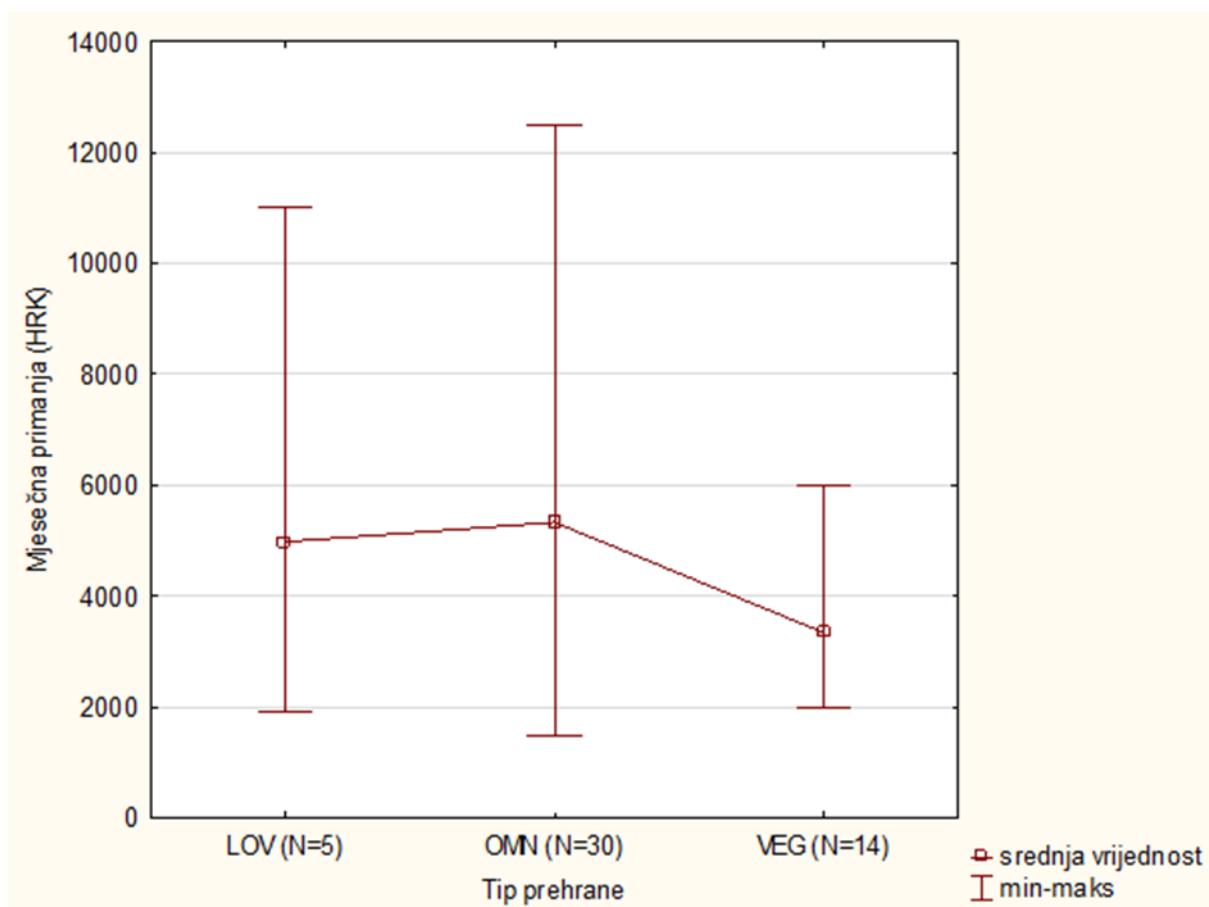
Slika 9 BMI ispitanika podijeljenih u podskupine prema tipu prehrane

Rezultati usporedbe ispitanika s različitim tipom prehrane s obzirom na BMI (**Slika 9**) pokazuju da je prosječni BMI kod OMN i VEG podskupina bio podjednak, dok je kod LOV podskupine bio nešto niži. Razlog tome može biti što je u podskupini LOV znatno manje ispitanika (N=5) nego u ostalim podskupinama (OMN=30, VEG=14). Statističkom obradom podataka utvrđeno je da ne postoji značajna razlika između bilo kojeg para podskupina (LOV-OMN, LOV-VEG, OMN-VEG) ($p > 0,05$).

Brera i sur. (2015) su također određivali BMI kod osoba s različitim tipovima prehrane. U njihovom israživanju su ispitanici podijeljeni na OMN i vegetarijance u koje spadaju i LOV i VEG tipovi prehrane. Podaci su prikupljeni za ispitanike iz Italije, Norveške i Velike Britanije. Rezultati pokazuju da je u Italiji BMI kod žena bio veći u podskupini OMN nego kod vegetarijanaca, dok je kod muškaraca BMI bio veći u podskupini vegetarijanaca nego kod OMN. U Norveškoj BMI je kod žena bio jednak u obje podskupine, dok je kod muškaraca bio

veći u podskupini OMN. U Velikoj Britaniji je BMI kod muškaraca i žena bio veći u podskupini OMN nego kod vegetarijanaca.

Wells i sur. (2017) su u svom istraživanju koristili podatke iz izvješća Brera i sur. (2015) samo za ispitanike iz Velike Britanije gdje je izvršena usporedba između VEG i OMN. Njihovi rezultati su u skladu s rezultatima u ovom istraživanju, jer je BMI bio nešto niži u podskupini vegetarijanaca, ali ta razlika nije bila statistički značajna.



Slika 10 Mjesečna primanja (HRK) ispitanika podijeljenih u podskupine prema tipu prehrane

Rezultati usporedbe ispitanika s različitim tipom prehrane s obzirom na mjesečna primanja (**Slika 10**) pokazuju da se prosječna primanja koja su imali ispitanici u podskupini OMN i LOV nisu bitno razlikovala, dok su ispitanici u podskupini VEG imali najniža prosječna primanja. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da su OMN imali značajno viša primanja u odnosu na VEG ($p = 0,023$), dok između ostalih podskupina nisu ustanovljene značajne razlike ($p > 0,05$). Socio-ekonomski status i primanja mogu utjecati na izbor hrane a samim time i na unos

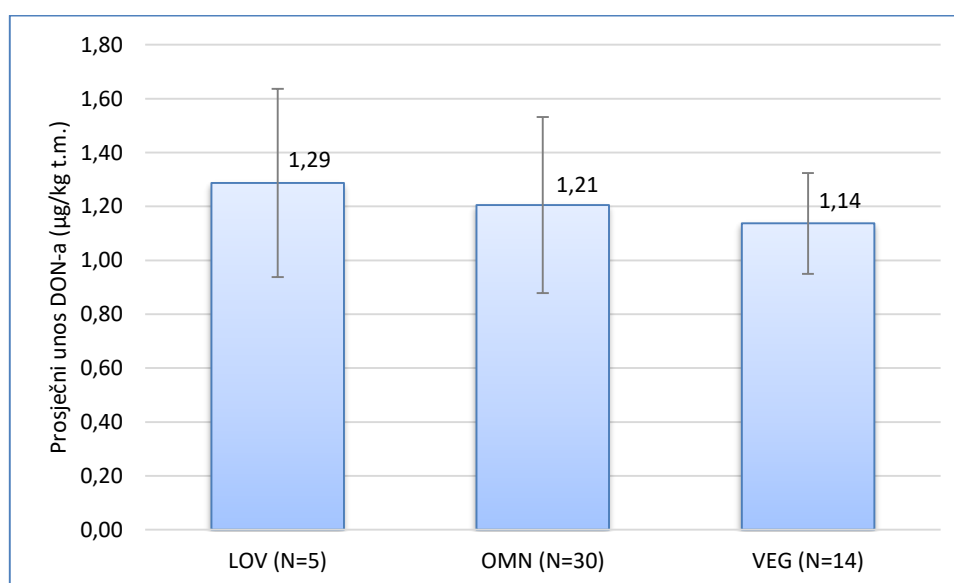
mikotoksina, čemu u prilog govore hipoteze u slučaju ohratoksina A kako će veći socio-ekonomski status biti povezan s većim unosom hrane kontaminirane ovim toksinom te rezultirati povećanim rizikom vezanih bolesti (Klapec i sur., 2012; Schwartz, 2002).

Tablica 14 Ukupan unos DON-a ispitanika ($\mu\text{g}/\text{kg}$) i unos prema tjelesnoj masi ($\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. na dan)

Ispitanik	Ukupan unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. na dan)
HAH_01	110,72	1,70
HAH_02	56,64	1,05
HAH_03	98,59	1,05
HAH_04	119,24	1,70
HAH_05	83,91	1,05
HAH_06	81,76	1,70
HAH_07	85,17	1,70
HAH_09	62,93	1,05
HAH_10	57,69	1,05
HAH_12	57,69	1,05
HAH_14	144,79	1,70
HAH_15	62,93	1,05
HAH_16	66,08	1,05
HAH_17	82,64	1,33
HAH_18	63,98	1,05
HAH_19	176,29	2,07
HAH_20	78,67	1,05
HAH_21	57,02	0,91
HAH_22	110,13	1,05
HAH_54	43,34	0,79
HAH_58	68,18	1,05
HAH_59	69,23	1,05
HAH_60	75,06	1,19
HAH_61	57,69	1,05
HAH_62	71,32	1,05
HAH_63	65,03	1,05
HAH_64	68,18	1,05
HAH_65	99,00	1,37
HAH_66	69,57	1,29
HAH_67	100,69	1,05
HAH_68	68,18	1,05
HAH_69	80,64	1,41
HAH_70	98,22	1,56

Ispitanik	Ukupan unos DON-a (µg/kg)	Unos DON-a (µg/kg t.m. na dan)
HAH_71	68,18	1,05
HAH_72	75,52	1,05
HAH_74	105,61	1,68
HAH_75	118,49	1,32
HAH_76	89,72	1,15
HAH_77	69,18	1,50
HAH_78	121,90	1,60
HAH_79	120,05	1,56
HAH_80	88,11	1,05
HAH_81	143,11	2,07
HAH_82	110,13	1,05
HAH_83	48,46	0,95
HAH_84	65,91	0,62
HAH_85	56,64	1,05
HAH_86	118,52	1,05
HAH_87	90,20	1,05

Tablica 14 pokazuje ukupan unos DON-a za svakog ispitanika kao i unos DON-a po kilogramu t.m. Rezultati pokazuju da je unos DON-a kod svih ispitanika bio znatno niži od ARfD-a od 8 µg/kg t.m. na dan. Raspon minimalnog i maksimalnog unosa DON-a po kilogramu t.m. se kretao od 0,62 do 2,07 µg/kg t.m. na dan (srednja vrijednost $1,19 \pm 0,29$ µg/kg t.m.) te je ovisio prvenstveno o stvarnim količinama namirnica poznate koncentracije DON-a koje su ispitanici konzumirali.



Slika 11 Usporedba prosječnog unosa DON-a prema tipu prehrane (µg/kg t.m. ± SD)

Rezultati usporedbe prosječnog unosa DON-a ispitanika s različitim tipom prehrane (**Slika 11**) pokazuju da je prosječni unos DON-a bio podjednak u svim podskupinama. Nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između prosječnih unosa DON-a kod pojedinih podskupina.

4.2.1. DON i glukuronidni metaboliti u urinu

U pet analiziranih uzoraka prvog jutarnjeg urina utvrđene su razine nepromijenjenog DON-a ispod LOD-a i LOQ-a.

Tablica 15 Koncentracije DON-a i glukuronidnih metabolita u uzorcima 24-satnog urina ispitanika (ng/mL)

Ispitanik	DON-3-GlcA (ng/mL)	DON-15-GlcA (ng/mL)	DON (ng/mL)
HAH_01	14,42	43,13	6,61
HAH_02	14,42	13,51	2,54
HAH_03	14,42	32,04	2,54
HAH_04	14,42	31,46	2,54
HAH_05	14,42	52,56	8,43
HAH_06	48,03	64,33	12,29
HAH_07	14,42	31,36	5,84
HAH_09	14,42	13,51	2,54
HAH_10	14,42	86,27	18,82
HAH_12	14,42	13,51	0,76
HAH_14	14,42	31,46	5,51
HAH_15	14,42	13,51	2,54
HAH_16	14,42	13,51	0,76
HAH_17	14,42	59,35	8,31
HAH_18	14,42	13,51	2,58
HAH_19	14,42	58,98	8,09
HAH_20	14,42	13,51	2,54
HAH_21	14,42	13,51	0,76
HAH_22	14,42	76,11	10,06
HAH_54	14,42	30,89	2,54
HAH_58	14,42	71,19	8,44
HAH_59	14,42	46,04	2,54
HAH_60	14,42	42,46	6,10
HAH_61	14,42	30,12	0,76

Tablica 15 Koncentracije DON-a i glukuronidnih metabolita u uzorcima 24-satnog urina ispitanika (ng/mL) - nastavak

Ispitanik	DON-3-GlcA (ng/mL)	DON-15-GlcA (ng/mL)	DON (ng/mL)
HAH_62	14,42	44,94	6,03
HAH_63	14,42	38,09	5,72
HAH_64	14,42	13,51	2,54
HAH_65	14,42	33,21	2,54
HAH_66	48,03	102,76	8,77
HAH_67	14,42	47,38	0,76
HAH_68	14,42	37,42	0,76
HAH_69	14,42	13,51	2,54
HAH_70	14,42	59,57	9,46
HAH_71	14,42	33,34	2,54
HAH_72	14,42	41,80	2,54
HAH_74	14,42	33,48	2,54
HAH_75	14,42	60,44	6,99
HAH_76	14,42	86,71	11,34
HAH_77	14,42	13,51	2,54
HAH_78	14,42	13,51	2,54
HAH_79	14,42	115,25	8,07
HAH_80	14,42	28,84	2,54
HAH_81	14,42	13,51	2,54
HAH_82	14,42	38,15	4,51
HAH_83	14,42	40,21	2,54
HAH_84	14,42	39,76	5,31
HAH_85	14,42	38,20	7,46
HAH_86	14,42	13,51	2,51
HAH_87	14,42	13,51	2,54

Rezultati analize DON-a i njegovih glukuronidnih oblika iz 24-satnog urina prikazani su u **Tablici 15** i pokazuju da je u svim analiziranim uzorcima detektiran DON-15-GlcA. DON je bio ispod LOD-a u 7 od 49 uzoraka (14%), dok je ispod LOQ-a bilo 22 od 49 uzoraka (45%). DON-3-GlcA bio je ispod LOD-a u najvećem broju uzoraka i samo su dva uzorka (4%) sadržavala koncentraciju ispod LOQ-a, ali iznad LOD-a. Prosječna koncentracija za DON-3-GlcA je iznosila 15,79 ng/mL, za DON-15-GlcA 38,98 ng/mL, te za DON 4,75 ng/mL.

Šarkanj i sur. (2013) su određivali biomarkere u urinu trudnica s područja istočne Slavonije. U njihovom istraživanju DON je bio prisutan u 76% uzoraka, DON-15-GlcA u 98% uzoraka, a DON-

3-GlcA u 83% uzoraka. Prosječne koncentracije DON-a i glukuronida su bile znatno veće nego u ovom istraživanju i za DON-15-GlcA je iznosila 120,4 $\mu\text{g/L}$, za DON-3-GlcA 28,8 $\mu\text{g/L}$, dok je za DON iznosila 18,3 $\mu\text{g/L}$. Ispitanici su u ovom istraživanju konzumirali hranu s poznatom količinom DON-a uz prosječnu izloženost oko TDI vrijednosti (**Slika 11**), ali razlike su vjerojatno uzrokovane i činjenicom da trudnoća podrazumijeva povećan unos hrane te utječe na općenito povećanje glukuronidacije, te unosom kontaminiranije hrane (Miners i Mackenzie, 1991; Šarkanj i sur., 2013). Stoga se može očekivati veća koncentracija i DON-a i njegovih glukuronidnih metabolita kod trudnica (Šarkanj i sur., 2013).

Istraživanje na 27 ispitanika u Austriji detektiralo je DON u 22% uzoraka, DON-15-GlcA u 96% uzoraka, a DON-3-GlcA u 56% uzoraka. DON je određivan u prvom jutarnjem urinu, a ispitanici su dan prije prikupljanja urina konzumirali normalnu prehranu (Warth i sur., 2012), dok su u ovom istraživanju analizirani 24-satni uzorci urina nakon konzumacije proizvoda poznatog sadržaja DON-a.

Istraživanje uz intervencijsku prehranu (uz unos DON-a od 2,3 $\mu\text{g/kg t. m.}$) i određivanje istih biomarkera u 24-satnom urinu jedne osobe utvrdilo je prosječne urinarne koncentracije DON-a i glukuronida u rasponu utvrđenih u ovom istraživanju, tj. 22 $\mu\text{g/L}$ za DON-15-GlcA, 8 $\mu\text{g/L}$ za DON-3-GlcA te 9 $\mu\text{g/L}$ za DON (Warth i sur., 2013).

Slično istraživanje su proveli i Huybrechts i sur. (2014) na 29 ispitanika gdje su određivali DON i glukuronide u prvom jutarnjem urinu. Njihovi rezultati su bili nešto drugačiji nego u ovom istraživanju i kod njih se DON izlučivao u znatno manjem postotku (59,4% uzoraka), a DON-3-GlcA u znatno većem postotku (90,6% uzoraka), dok je postotak izlučivanja DON-15-GlcA bio isti (100% uzoraka). Prosječna koncentracija DON-a je bila znatno manja (0,7 ng/mL), dok su prosječne koncentracije DON-3-GlcA (11,8 ng/mL) i DON-15-GlcA (82,6 ng/mL) bile znatno veće u usporedbi s ovdje prezentiranim istraživanjem.

Heyndrickx i sur. (2015) su također određivali koncentraciju DON-a i njegovih glukuronidnih oblika u prvom jutarnjem urinu u sklopu BIOMYCO studije na 239 odraslih osoba s područja Belgije. U njihovom istraživanju pojavnost DON-a u urinu bila je znatno manja (37%), DON-3-GlcA se izlučivao u nešto većem postotku (77%) dok se DON-15-GlcA izlučivao u istom postotku (100%) kao i u ovdje prezentiranom istraživanju. Prosječna koncentracija DON-a je bila manja

(3,9 ng/mL), dok su prosječne koncentracije DON-3-GlcA (7,5 ng/mL) i DON-15-GlcA (53,8 ng/mL) bile veće nego u ovom istraživanju (Heyndrickx i sur., 2015).

Veće koncentracije DON-3-GlcA i DON-15-GlcA u navedenim istraživanjima mogu se pripisati činjenici da su navedeni metaboliti određivani u prvom jutarnjem urinu koji je koncentriraniji nego 24-satni uzorak.

Tablica 16 DON i ekvivalenti DON-a iz glukuronidnih metabolita u urinu ispitanika

Šifra	Volumen urina (mL)	Urin				Stopa izlučivanja (%)	Stopa konjugacije (%)
		DON-3-GlcA (µg/dan)*	DON-15-GlcA (µg/dan)*	Slobodni DON (µg/dan)	Ukupni DON (µg/dan)*		
HAH_01	2070	18,72	55,98	13,68	88,38	79,8	84,52
HAH_02	2090	18,90	17,71	5,31	41,93	74,0	87,34
HAH_03	2325	21,03	46,71	5,91	73,65	74,7	91,98
HAH_04	2770	25,05	54,64	7,04	86,73	72,7	91,89
HAH_05	1345	12,17	44,33	11,33	67,83	80,8	83,29
HAH_06	600	18,07	24,20	7,37	49,65	60,7	85,15
HAH_07	1900	17,19	37,37	11,09	65,65	77,1	83,10
HAH_09	2080	18,81	17,63	5,28	41,73	66,3	87,34
HAH_10	440	3,98	23,81	8,28	36,07	62,5	77,04
HAH_12	3900	35,28	33,05	2,97	71,30	123,6	95,83
HAH_14	3220	29,12	63,53	17,73	110,39	76,2	83,94
HAH_15	2700	24,42	22,88	6,86	54,16	86,1	87,34
HAH_16	3890	35,18	32,97	2,96	71,12	107,6	95,83
HAH_17	875	7,91	32,57	7,27	47,76	57,8	84,77
HAH_18	1860	16,82	15,76	4,81	37,39	58,4	87,15
HAH_19	1860	16,82	68,79	15,05	100,66	57,1	85,05
HAH_20	2675	24,20	22,67	6,80	53,66	68,2	87,34
HAH_21	2205	19,94	18,69	1,68	40,31	70,7	95,83
HAH_22	1215	10,99	57,99	12,23	81,21	73,7	84,94
HAH_54	1200	10,85	23,25	3,05	37,15	85,7	91,79
HAH_58	860	7,78	38,40	7,26	53,44	78,4	86,41
HAH_59	1445	13,07	41,72	3,67	58,46	84,5	93,72
HAH_60	1860	16,82	49,53	11,34	77,69	103,5	85,41
HAH_61	1720	15,56	32,49	1,31	49,36	85,6	97,34
HAH_62	1770	16,01	49,88	10,67	76,56	107,3	86,06
HAH_63	1430	12,93	34,16	8,18	55,27	85,0	85,21
HAH_64	1320	11,94	11,19	3,35	26,48	38,8	87,34
HAH_65	2170	19,63	45,20	5,51	70,34	71,0	92,16

Tablica 16 DON i ekvivalenti DON-a iz glukuronidnih metabolita u urinu ispitanika - nastavak

Šifra	Volumen urina (mL)	Urin				Stopa izlučivanja (%)	Stopa konjugacije (%)
		DON-3-GlcA (µg/dan)*	DON-15-GlcA (µg/dan)*	Slobodni DON (µg/dan)	Ukupni DON (µg/dan)*		
HAH_66	400	12,05	25,78	3,51	41,33	59,4	91,51
HAH_67	1630	14,74	48,43	1,24	64,41	64,0	98,07
HAH_68	1700	15,38	39,90	1,30	56,57	83,0	97,71
HAH_69	2160	19,54	18,31	5,49	43,33	53,3	87,34
HAH_70	1350	12,21	50,43	12,77	75,41	76,1	83,07
HAH_71	1870	16,91	39,10	4,75	60,77	89,1	92,18
HAH_72	1580	14,29	41,42	4,01	59,72	79,1	93,28
HAH_74	1030	9,32	21,62	2,62	33,56	31,8	92,20
HAH_75	920	8,32	34,87	6,43	49,62	41,9	87,04
HAH_76	1220	11,03	66,34	13,84	91,21	101,7	84,83
HAH_77	1580	14,29	13,39	4,01	31,70	45,8	87,34
HAH_78	3440	31,11	29,15	8,74	69,01	56,6	87,34
HAH_79	620	5,61	44,81	5,00	55,42	79,2	90,97
HAH_80	2800	25,33	50,64	7,11	83,08	94,3	91,44
HAH_81	2270	20,53	19,24	5,77	45,54	62,9	87,34
HAH_82	2880	26,05	68,91	13,00	107,95	98,0	87,96
HAH_83	1710	15,47	43,12	4,34	62,93	129,9	93,10
HAH_84	1100	9,95	27,43	5,84	43,22	65,6	86,48
HAH_85	1115	10,09	26,71	8,32	45,11	79,6	81,56
HAH_86	2525	22,84	21,40	6,35	50,59	42,7	87,45
HAH_87	2310	20,89	19,58	5,87	46,34	51,4	87,34

* Ekvivalenti DON-a

DON se iz organizma može izlučiti putem urina i fecesa, pri čemu potonji doprinosi u fecesu uglavnom putem metabolita u žuči ili je riječ o neapsorbiranom DON-u (Brera i sur., 2015). Najveći put izlučivanja je urin, u koji se može izlučiti kao glukuronidni metaboliti i de-epoksi deoksinivalenol (DOM-1). DON-3-GlcA i DON-15-GlcA su glavni metaboliti DON-a u urinu, dok se DOM-1 nalazi u manjoj količini. Ukupna količina izlučenog DON-a prikazana je u **Tablici 16**. Stopa izlučivanja DON-a urinom kretala se u rasponu od minimalno 32 do maksimalno 130%, uz prosjek od 75%. U ovom istraživanju u prosjeku je bilo izlučeno 53 od 60 µg ekvivalenata DON-a u obliku glukuronida, što odgovara stopi konjugacije od 89%, uz raspon od 77 do 98%. Od ukupno izlučene količine DON-a u urinu, prosječni udio slobodnog DON-a bio je 11%, ekvivalenata DON-a iz DON-3-GlcA bilo je 30% i ekvivalenata DON-a iz DON-15-GlcA bilo je

59%. Iz rezultata je vidljivo da je najveći dio DON-a iz organizma bio izlučen u obliku DON-15-GlcA. Omjer DON-15-GlcA i DON-3-GlcA bio je, dakle, 2:1.

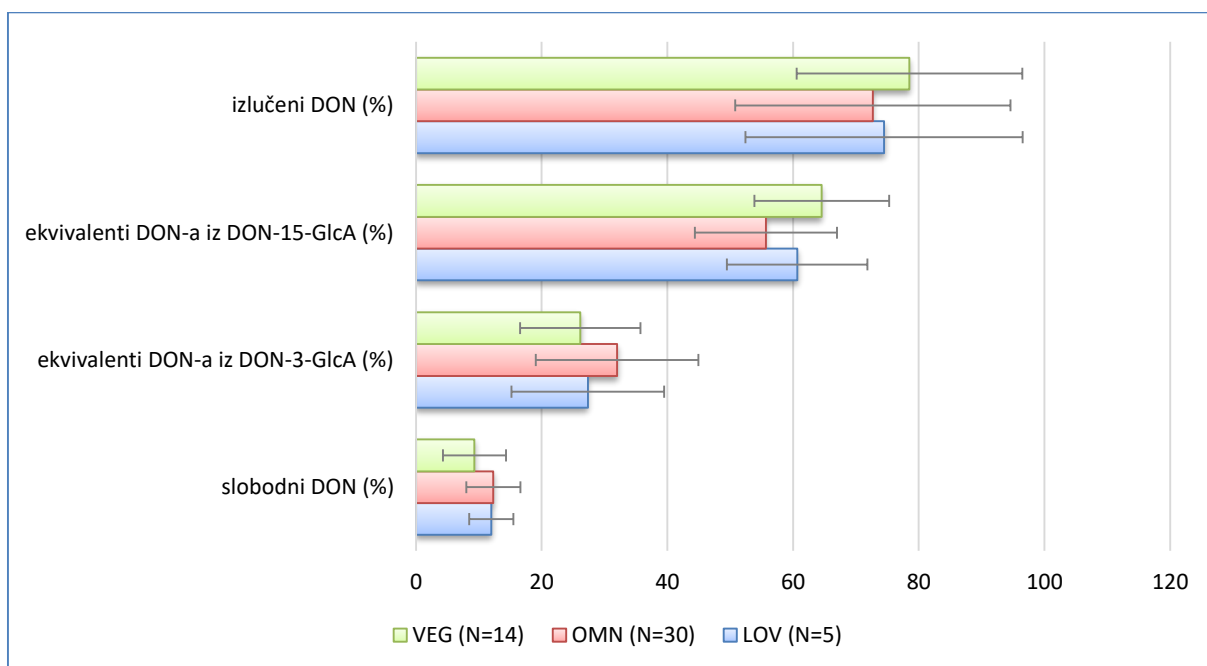
Slično istraživanje su proveli i Warth i sur. (2013) no samo na jednom ispitaniku koji je kroz četiri dana konzumirao intervencijsku prehranu u kojem je utvrđena prosječna stopa izlučivanja DON-a od 68%, dok je stopa konjugacije bila 76%. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su u skladu s rezultatima Warth i sur. (2013) prema kojima je najveći postotak izlučivanja DON-a također bio u obliku DON-15-GlcA. Prosječni udio slobodnog DON-a u ukupno izlučenoj količini je bio veći i iznosio je 23%, udio ekvivalenata DON-a iz DON-3-GlcA je bio manji nego u ovom istraživanju (21%), dok je udio ekvivalenata DON-a iz DON-15-GlcA bio jednak i iznosio je 56%. Izmjereni omjer DON-15-GlcA i DON-3-GlcA bio je nešto veći nego ovdje tj. 3:1.

Brera i sur. (2015) su proveli slično istraživanje na 635 ispitanika iz Italije, Norveške i Velike Britanije. Kod njih je količina glukuronida iznosila 66 - 80% od ukupne količine DON-a u urinu. Rezultati za količinu glukuronida su bili nešto niži nego u ovom istraživanju (89%), a razlog može biti što je za određivanje DON-a korišten prvi jutarnji urin.

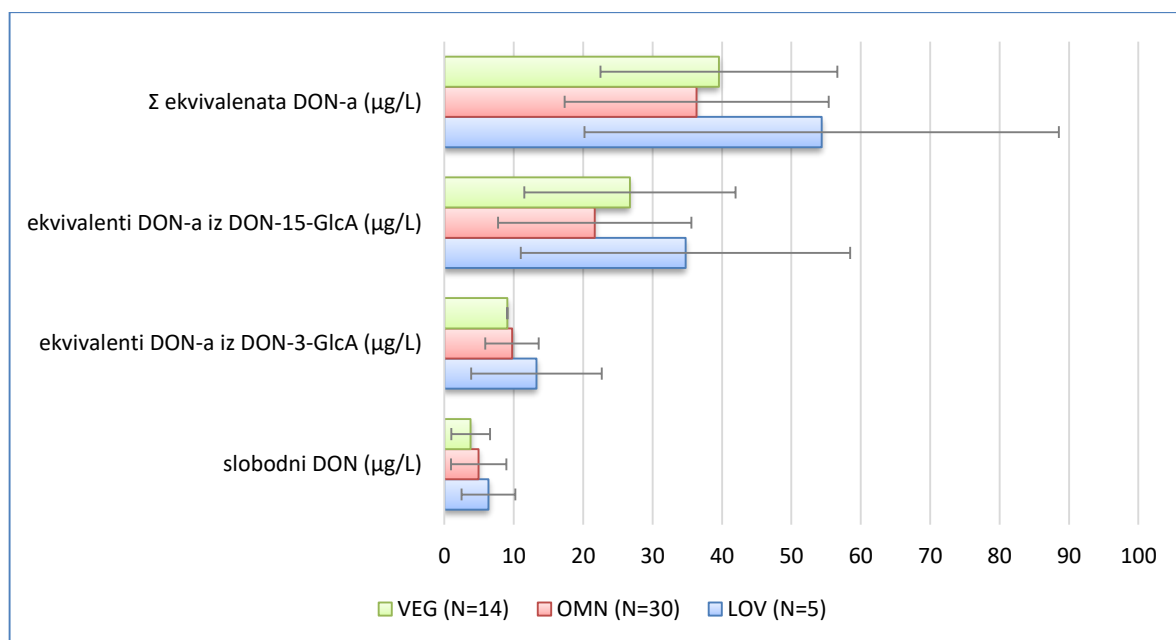
Turner i sur. (2010) su proveli istraživanje na 35 ispitanika kroz 12 dana. Prvih 8 dana ispitanici su normalno konzumirali hranu, vodili dnevnik prehrane i skupljali 24-satni urin, dok su sljedeća 4 dana imali dvije intervencije. 25 ispitanika je imalo djelomičnu intervencijsku prehranu u kojoj je od svih proizvoda na bazi žitarica bila dozvoljena jedino konzumacija kruha, dok su ostalih 10 ispitanika imali strogu intervencijsku prehranu bez konzumiranja proizvoda na bazi žitarica. U istraživanju Turnera i sur. stopa izlučivanja DON-a je bila gotovo ista stopi utvrđenoj u ovom istraživanju i iznosila je 72%, dok je stopa konjugacije bila 91%.

Određivanjem urinarnih biomarkera u uzorcima prvog jutarnjeg urina, Warth i sur. (2012) ustanovili su stopu konjugacije DON-a od 86%.

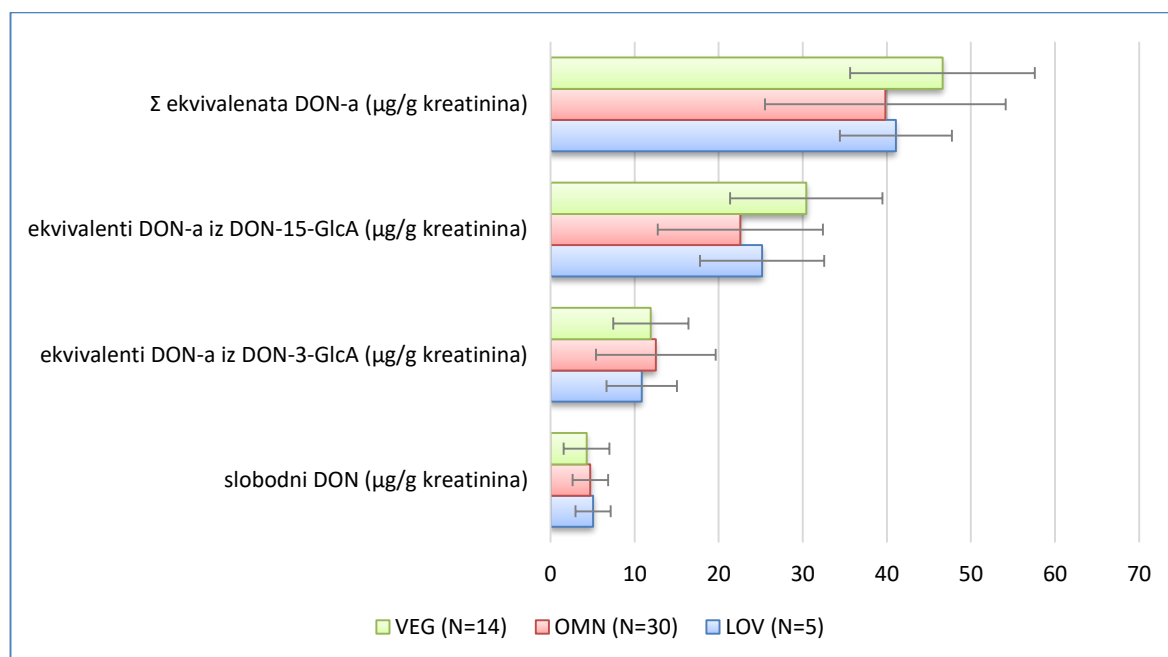
Maul i sur. (2015) su istraživali utjecaj 12 ljudskih UGT enzima na glukuronidaciju DON-a gdje su utvrdili da se enzimi UGT2B4 i UGT2B7 mogu identificirati kao glavni enzimi uključeni u glukuronidaciju i detoksikaciju DON-a. Ova dva enzima pokazala su značajne razlike u glukuronidaciji DON-a, pri čemu UGT2B4 preferencijalno tvori DON-15-GlcA, dok UGT2B7 katalizira stvaranje DON-3-GlcA.



Slika 12 Usporedba udjela ekvivalenata DON-a, slobodnog DON-a te postotka unešenog DON-a izlučenog urinom tijekom 24 sata u ovisnosti o tipu prehrane ispitanika ($\% \pm SD$)



Slika 13 Usporedba udjela ekvivalenata DON-a iz metabolita, slobodnog DON-a te sume ekvivalenata izlučenih u litri urina u ovisnosti o tipu prehrane ispitanika ($\mu\text{g/L} \pm SD$)



Slika 14 Usporedba udjela ekvivalenata DON-a iz metabolita, slobodnog DON-a te sume ekvivalenata izraženih na količinu kreatinina u urinu u ovisnosti o tipu prehrane ispitanika (µg/g kreatinina ± SD)

U istraživanju je ispitivan utjecaj tipa prehrane na način metabolizma DON-a te na ukupnu količinu DON-a izlučenu urinom, pri čemu su rezultati izraženi na tri različita načina: udjeli ukupno izlučenog DON-a i metabolita u urinu tijekom 24 sata (**Slika 12**), udjeli DON-a i metabolita izraženi na litru urina (**Slika 13**), te udjeli DON-a i metabolita izraženi na gram kreatinina (**Slika 14**).

Podskupina VEG je tijekom 24 sata izlučila nešto manje slobodnog DON-a u urinu u odnosu na OMN (**Slika 12**), ali razlika nije dosegla statističku značajnost ($p = 0,084$). Nije utvrđen utjecaj bilo kojeg tipa prehrane na udio DON-3-GlcA, ali je zato VEG prehrana poticala pojačano izlučivanje DON-a u obliku DON-15-GlcA u odnosu na OMN podskupinu ($p = 0,027$). Nisu utvrđene značajne razlike između podskupina VEG i OMN s obzirom na ukupnu količinu unešenog mikotoksina koji je izlučen urinom. Ipak, tendencija izlučivanja veće količine DON-a kao glukuronida uz VEG prehranu smanjuje rizik štetnih učinaka ovim mikotoksinom.

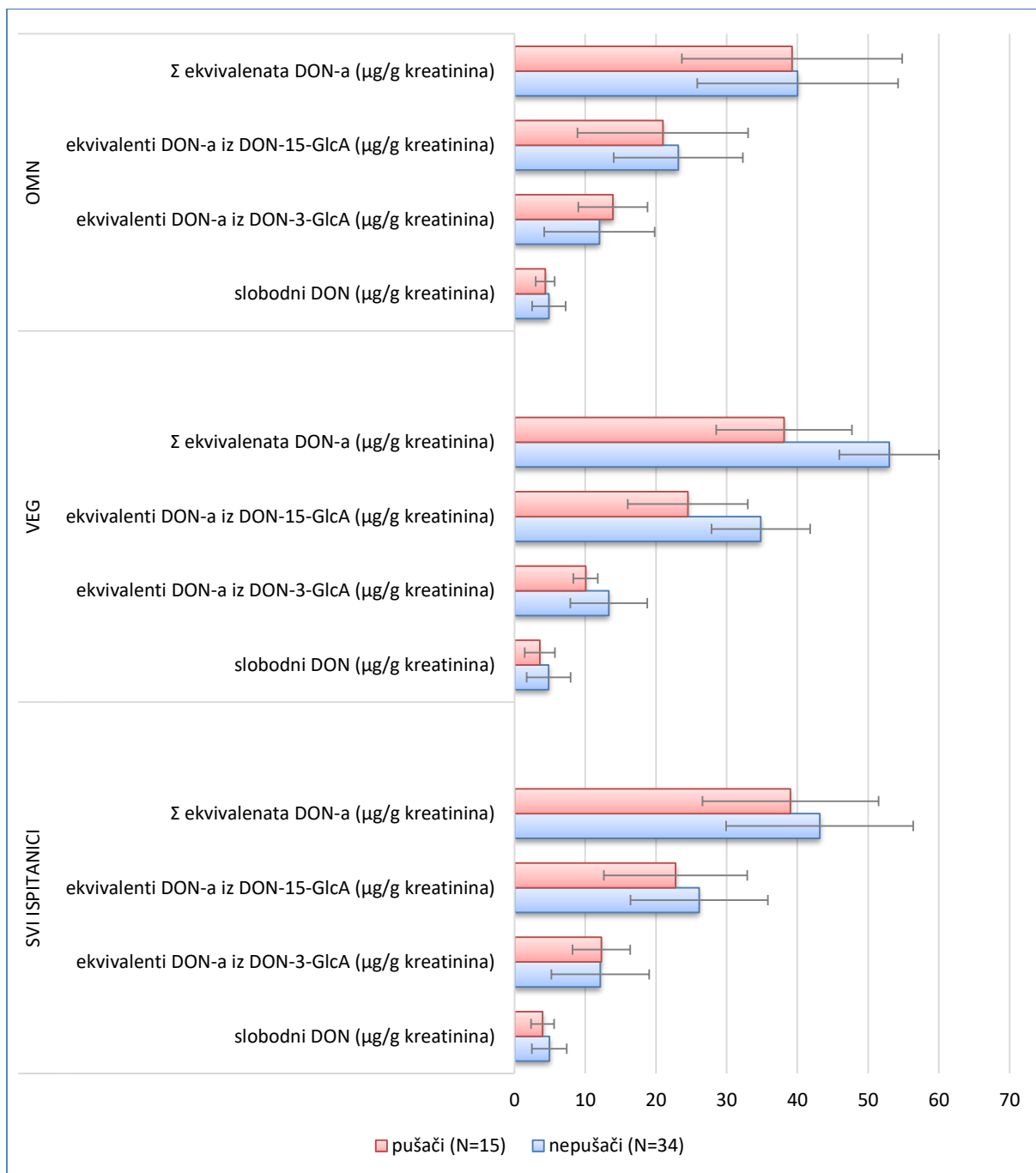
Izražavanjem količine DON-a i metabolita po jedinici volumena urina (**Slika 13**) nije utvrđen statistički značajan utjecaj tipa prehrane ni na jedan promatrani parametar.

Korekcijom rezultata za DON i metabolite u urinu prema sadržaju kreatinina (**Slika 14**), utvrđen je utjecaj VEG prehrane na udio DON-15-GlcA, uz značajno veći udio u odnosu na OMN ($p = 0,015$). VEG podskupina je imala i najveći prosjek sume ekvivalenata u urinu, uz tendenciju pojačanog izlučivanja u odnosu na OMN podskupinu ($p = 0,104$). Izražavanje na urinarni kreatinin je vjerojatno rezultiralo najpouzdanijom statističkom usporedbom za promatrane ispitanike obzirom da razine kreatinina u urinu variraju ovisno o mišićnoj masi, spolu, dobi, BMI-ju, ali i unosu bjelančevina (Barr i sur., 2005). Suma analiziranih glukuronida izražena po gramu kreatinina je također bila značajno viša kod VEG nego kod OMN: $42,33 \pm 10,41 \mu\text{g/g}$ kreatinina prema $35,09 \pm 13,51 \mu\text{g/g}$ kreatinina ($p = 0,048$).

Dobiveni rezultati su u suprotnosti s onima utvrđenim na populaciji Velike Britanije kod kojih je bio veći postotak slobodnog DON-a kod VEG nego kod OMN, dok je vrijedio obrat za glukuronide DON-a (Wells i sur., 2017). Također, Brera i sur. (2015) ustanovili su slično usporedbom odraslih OMN i VEG u norveškoj populaciji, dok su u talijanskoj populaciji rezultati u skladu s onim prezentiranim ovdje tj. OMN su imali veći udio nepromijenjenog DON-a u urinu. Štoviše, udio slobodnog DON-a je bio otprilike jednak udjelu glukuronida u podskupini OMN. Treba napomenuti da su vegetarijanci u ove dvije studije (Wells i sur., 2017; Brera i sur., 2015) zapravo bili LOV.

Ujedno, prehrana ispitanika u ovom istraživanju odstupala je od uobičajene zbog ograničenja intervencijske prehrane. VEG prehrana se u značajnoj mjeri oslanjala na unos žitarica te je isključivanje ovih namirnica tijekom prva dva dana pripremnog perioda mahom podrazumijevalo veći unos drugih tipova biljne hrane.

Rezultati upućuju na tendenciju razlika u izlučivanju DON-a i metabolita između podskupina OMN i VEG. Stoga je u nastavku ispitan utjecaj pušenja, spola i edukacije na izlučivanje DON-a obzirom na nejednak udio ovih karakteristika u OMN i VEG podskupinama, dok je prikaz za LOV izostavljen jer nema značajnih razlika i zbog malog broja ispitanika.

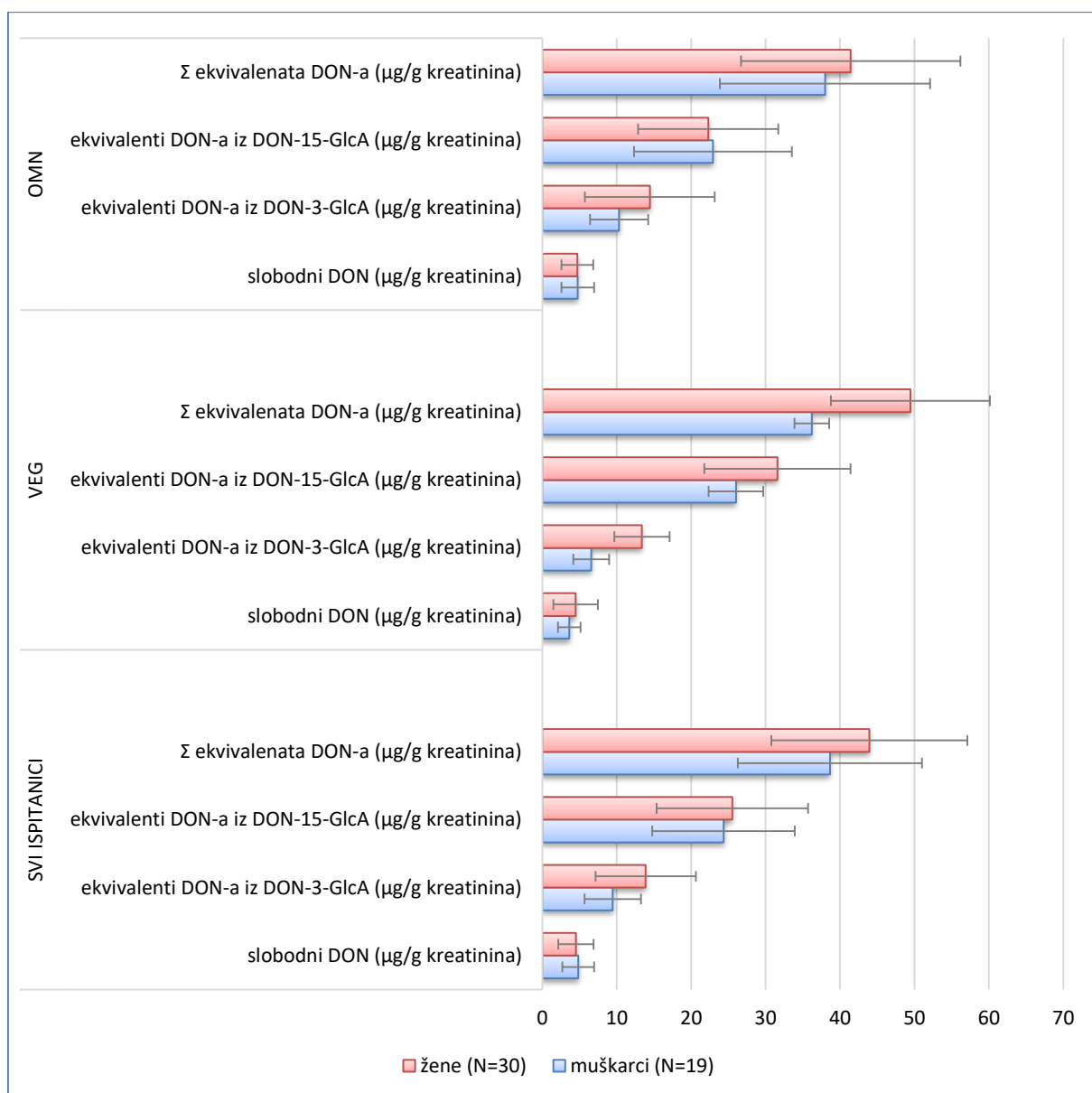


Slika 15 Usporedba udjela ekvivalenata DON-a iz metabolita, slobodnog DON-a te sume ekvivalenata izraženih na količinu kreatinina u urinu u ovisnosti o navici pušenja ispitanika (μg/g kreatinina ± SD)

Podjelom ispitanika u dvije podskupine prema navici pušenja utvrđen je unos DON-a na dan intervencije od $1,23 \pm 0,30$ μg/kg t.m. za nepušače te $1,12 \pm 0,27$ μg/kg t.m. za pušače ($p = 0,156$). Utjecaj pušenja na metabolizam i izlučivanje DON-a je ispitan usporedbom udjela DON-a i metabolita izlučenih u urinu tijekom 24 sata, usporedbom udjela DON-a i metabolita

izraženih na litru urina, te usporedbom udjela DON-a i metabolita izraženih na gram kreatinina. Samo su potonji rezultati prikazani na **Slici 15**. Rezultati za podskupinu VEG pokazuju da nepušači izlučuju značajno više DON-a u obliku DON-15-GlcA ($p = 0,045$) i sume ekvivalenata DON-a ($p = 0,012$) u odnosu na pušače, čime se kod nepušača smanjuje izloženost. U ostalim podskupinama nije utvrđena statistički značajna razlika između pušača i nepušača.

Neka istraživanja (Court, 2010; Kroon, 2006; Miners i Mackenzie, 1991) pokazala su da pušenje može poticati glukuronidaciju, pri čemu ukupni učinak ovisi o izoenzimu, njegovoj lokaciji te intenzitetu pušenja. Primjerice, UGT2B7, izoenzim važan u glukuronidaciji DON-a, nije imao veću enzimsku aktivnost kod pušača, iako je istovremeno bila povećana glukuronidacija drugim izoenzimima (Court, 2010). Više vrijednosti za ukupno izlučeni DON i DON-15-GlcA kod VEG nepušača bi mogle biti odraz većeg unosa voća i povrća u odnosu na pušače (prosječno 1204 prema 620 g za prva dva dana pripremnog perioda; $p = 0,033$), pri čemu su tvari iz biljne hrane imale jači utjecaj na indukciju specifičnih UGT enzima (UGT2B4 i 2B7), ključnih u metabolizmu DON-a prema Maulu i suradnicima (2015), od pušenja. Ovo je logičnije i obzirom na glavne lokacije glukuronidacije DON-a (crijeva i jetra), dok pušenje ima primaran utjecaj na indukciju enzima u plućima.



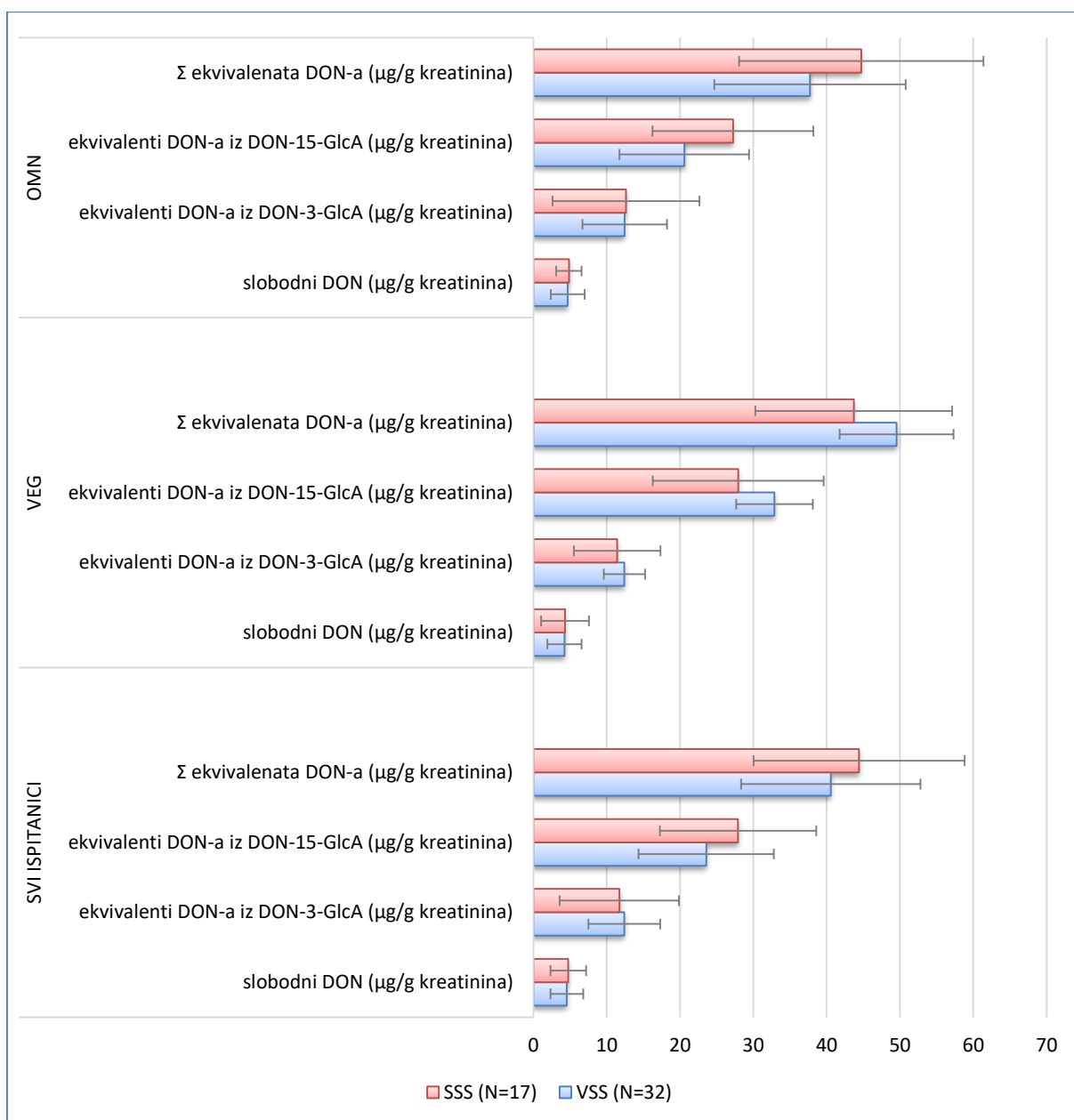
Slika 16 Usporedba udjela ekvivalenata DON-a iz metabolita, slobodnog DON-a te sume ekvivalenata izraženih na količinu kreatinina u urinu u ovisnosti o spolu ispitanika ($\mu\text{g/g}$ kreatinina \pm SD)

Prosječni unos DON-a svih ženskih ispitanika na dan intervencije bio je $1,17 \pm 0,25 \mu\text{g/kg t.m.}$ a muškaraca $1,22 \pm 0,36 \mu\text{g/kg t.m.}$ ($p = 1,00$). Uspoređeni su udjeli DON-a i metabolita izlučenih u urinu tijekom 24 sata, udjeli DON-a i metabolita izraženih na litru urina, te udjeli DON-a i metabolita izraženih na gram kreatinina. Statistički značajna razlika utvrđena je samo za ekvivalente DON-a iz DON-3-GlcA u urinu izražene na kreatinin (**Slika 16**), uz prosječno višu koncentraciju u urinima žena ($p = 0,011$) u podskupini svih ispitanika.

S obzirom na neravnomjerne udjele tipova prehrane među muškim i ženskim ispitanicima, utjecaj spola je zasebno ispitan u OMN i VEG podskupinama. Vegana muškog spola je bilo samo 3 od 14 ispitanika i njihov prosječni unos DON-a na dan intervencije je bio $1,00 \pm 0,08$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. Veganke su imale značajno viši prosječni unos od $1,17 \pm 0,19$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. Usporedbom uz tri navedena pristupa su ponovno utvrđene značajne razlike samo prilikom korekcije rezultata prema sadržaju kreatinina u urinu (**Slika 16**), međutim treba naglasiti da je broj muških VEG bio mali te da bi razlike trebalo ispitati na podjednakom broju muških i ženskih VEG. Veganke (N = 11) su izlučivale više ekvivalenata DON-a iz DON-3-GlcA ($p = 0,013$) i više ukupnih ekvivalenata ($p = 0,043$) u odnosu na vegane. Zapravo, veganke su izlučivale prosječno više i nepromijenjenog DON-a i metabolita, što je očekivano uz prosječno viši unos. Muški OMN (N = 14) su imali prosječni unos DON-a od $1,24 \pm 0,39$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., a ženski OMN (N = 16) $1,17 \pm 0,27$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. Razlika nije statistički značajna ($p = 0,575$).

Usporedbama nije utvrđena značajna razlika između ženskih i muških OMN niti za jedan parametar bez obzira na način izražavanja rezultata (**Slika 16**). Zanimljivo je da su žene, kao i u slučaju VEG podskupine, izlučivale više DON-a u obliku DON-3-GlcA, iako razlika nije dosegla statističku značajnost. Slične rezultate su dobili i Pestka i sur. (2017), gdje su uspoređivali izlučivanje DON-a kod štakora i utvrđeno je bolje islučivanje kod ženki nego kod muških jedinki.

Radovi koji su ispitali razlike u učinkovitosti glukuronidacije uglavnom su ustanovili opsežniji metabolizam pojedinih lijekova UGT-ovima kod muškaraca (Court, 2010) i većina istraživanja upućuje na neznatne učinke spola. Povećana aktivnost UGT2B7 kod žena je moguća budući da je to UGT enzim s najvećom katalitičkom aktivnošću prema estrogenima i njegovim endogenim metabolitima (Lépine i sur., 2004). Woelfingseder i suradnici (2019) su utvrdili također da pojavnost kulmorina, također mikotoksina *Fusarium* plijesni koji se pojavljuje zajedno s DON-om, smanjuje glukuronidaciju DON-a, što je još jedna od varijabli koja je mogla utjecati na konačne rezultate.



Slika 17 Usporedba udjela ekvivalenata DON-a iz metabolita, slobodnog DON-a te sume ekvivalenata izraženih na količinu kreatinina u urinu u ovisnosti o edukaciji ispitanika ($\mu\text{g/g}$ kreatinina \pm SD)

Utjecaj edukacije na izlučivanje DON-a za sve ispitanike te podskupine prema tipu prehrane prikazan je na **Slici 17**. Ispitanici podijeljeni u dvije podskupine prema stupnju obrazovanja su imali jednak unos DON-a na dan intervencije, tj. $1,20 \pm 0,32 \mu\text{g/kg t.m.}$ VSS ispitanika te $1,18 \pm 0,25 \mu\text{g/kg t.m.}$ SSS ispitanika ($p = 0,950$). Nije utvrđena statistički značajna razlika između udjela DON-a i metabolita izlučenih u urinu tijekom 24 sata, udjela DON-a i metabolita izraženih na litru urina, niti između udjela DON-a i metabolita izraženih na gram kreatinina.

Unos DON-a na dan intervencije nije se značajno razlikovao ($p = 0,898$) između VEG s VSS-om ($N=7$; $1,12 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) i onih sa SSS-om ($N=7$; $1,16 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{kg t.m.}$). Provedbom daljnjih statističkih analiza utvrđeno je da razina edukacije nije imala utjecaj na izlučivanje DON-a i metabolita u ovoj skupini ispitanika.

Slično je utvrđeno za OMN, pri čemu je unos DON-a bio jednak ($1,21 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{kg t.m.}$ za VSS ($N=21$) te $1,20 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{kg t.m.}$ za SSS ispitanike ($N=9$); $p = 0,892$).

De Irala-Estévez i sur. (2000) istraživali su razlike u konzumaciji voća i povrća između grupa različitog socio-ekonomskog statusa (edukacija i zanimanje) u EU i rezultati su pokazali da su ispitanici s većim stupnjem edukacije konzumirali više voća i povrća. Iste rezultate su dobili i Dubowitz i sur. (2008). Fitokemikalije su prisutne u svim vrstama biljnih namirnica, osobito u svježem voću i povrću. S obzirom da fitokemikalije potiču rad UGT i drugih metaboličkih enzima (Gopalakrishnan i Kong, 2008), izlučivanje ukupnog DON-a i metabolita bi moglo biti veće kod osoba s većim stupnjem edukacije. Rezultati ovog istraživanja bi stoga mogli biti posljedica činjenice da nisu utvrđene značajne razlike u ukupnom dnevnom unosu voća i povrća tijekom prva dva dana pripremnog perioda ispitanika podijeljenih prema razini stručne spreme u OMN podskupini (VSS: $633,5 \pm 238,0 \text{ g}$, SSS: $577,0 \pm 330,3 \text{ g}$; $p = 0,526$).

Tablica 17 Povezanost dobi ispitanika s pokazateljima metabolizma i urinarnog izlučivanja DON-a

	N	Spearman R	p-vrijednost
Svi ispitanici			
slobodni DON (%) & dob (god.)	49	0,08	0,595
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & dob (god.)	49	-0,03	0,863
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & dob (god.)	49	-0,05	0,750
izlučeni DON (%) & dob (god.)	49	0,01	0,975
VEG			
slobodni DON (%) & dob (god.)	14	-0,08	0,783
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & dob (god.)	14	0,28	0,327
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & dob (god.)	14	-0,29	0,322
izlučeni DON (%) & dob (god.)	14	-0,28	0,326
OMN			
slobodni DON (%) & dob (god.)	30	-0,01	0,971
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & dob (god.)	30	-0,02	0,923
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & dob (god.)	30	-0,01	0,970
izlučeni DON (%) & dob (god.)	30	0,11	0,567

Za određivanje eventualnog utjecaja dobi na metabolizam i izlučivanje DON-a korišten je Spearmanov koeficijent korelacije, pri čemu je dob ispitanika korelirana s postotnim udjelima DON-a i metabolita izlučenih u urinu tijekom 24 sata (**Tablica 17**). Bez obzira u kojoj skupini ispitanika je analiza provedena, povezanost dobi s bilo kojim pokazateljem izlučivanja DON-a nije ustanovljena. Ovo je možda i posljedica činjenice da su ispitanici uglavnom bili mlađe dobi (**Slika 8**). Može se primijetiti slaba tendencija pojačanog izlučivanja DON-a u obliku 3-glukuronida, smanjenog izlučivanja u obliku 15-glukuronida, te smanjenog udjela ukupno izlučenog DON-a s dobi u VEG podskupini. Obzirom da ovakvi trendovi nisu zabilježeni kod OMN, ove rezultate je teško objasniti izvan konteksta specifičnosti VEG tipa prehrane tj. povećanog unosa voća i povrća, kako je već spomenuto prije. Također treba napomenuti da mali broj ispitanika umanjuje pouzdanost rezultata te bi mogućnost interakcije biljne prehrane i slabljenja fizioloških funkcija s dobi trebalo ispitati na većem uzorku.

Druge studije koje su ispitivale utjecaj dobi na izlučivanje DON-a (Ali i sur., 2016; Turner i sur., 2008b) nisu utvrdile značajnu povezanost, ali treba napomenuti da je bilo riječ o drukčijem konceptu istraživanja, pri kojem unos DON-a ispitanika nije bio poznat. Stoga u tim studijama

nije bilo moguće procijeniti eventualni učinak slabljenja fizioloških funkcija tijekom starenja na metabolizam i izlučivanja DON-a.

Tablica 18 Povezanost BMI-ja ispitanika s pokazateljima metabolizma i urinarnog izlučivanja DON-a

	N	Spearman R	p-vrijednost
Svi ispitanici			
slobodni DON (%) & BMI	49	-0,06	0,687
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & BMI	49	-0,18	0,205
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & BMI	49	0,27	0,058
izlučeni DON (%) & BMI	49	-0,04	0,801
VEG			
slobodni DON (%) & BMI	14	0,20	0,482
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & BMI	14	-0,21	0,468
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & BMI	14	-0,03	0,929
izlučeni DON (%) & BMI	14	-0,23	0,431
OMN			
slobodni DON (%) & BMI	30	-0,20	0,296
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & BMI	30	-0,10	0,611
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & BMI	30	0,28	0,138
izlučeni DON (%) & BMI	30	-0,11	0,580

U **Tablici 18** prikazan je utjecaj BMI-ja na izlučivanje DON-a za različite podskupine ispitanika. Veza između ekvivalenata DON-a iz DON-15-GlcA u urinu i BMI-ja svih ispitanika je bila na samoj granici statističke značajnosti. Također, udio ekvivalenata DON-a iz DON-3-GlcA je uvijek pokazivao tendenciju slabe negativne povezanosti s vrijednošću BMI-ja.

Utvrđena je pojačana konjugacija lijekova uz UGT kod pretelih osoba (Brill i sur., 2012), što se povezuje s povećanjem ili bolestima jetre kao glavne lokacije metabolizma toksikanata, ali i višom aktivnošću UGT-ova u masnom tkivu. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s navedenim pretpostavkama. Potencijalna modulacija stopi ekspresije UGT2B4 i UGT2B7 izoenzima uzrokovane debljinom koja bi mogla utjecati na manju produkciju 3-glukuronida DON-a može biti ustanovljena uz veći broj ispitanika i/ili proteomskim analizama (Miyachi i sur., 2016).

Tablica 19 Povezanost mjesečnih primanja po članu kućanstva ispitanika s pokazateljima metabolizma i urinarnog izlučivanja DON-a

	N	Spearman R	p-vrijednost
Svi ispitanici			
slobodni DON (%) & primanja (HRK)	49	0,21	0,155
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & primanja (HRK)	49	0,01	0,947
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & primanja (HRK)	49	-0,15	0,292
izlučeni DON (%) & primanja (HRK)	49	-0,03	0,847
VEG			
slobodni DON (%) & primanja (HRK)	14	0,25	0,395
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & primanja (HRK)	14	-0,11	0,712
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & primanja (HRK)	14	-0,18	0,539
izlučeni DON (%) & primanja (HRK)	14	-0,17	0,565
OMN			
slobodni DON (%) & primanja (HRK)	30	0,05	0,777
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%) & primanja (HRK)	30	-0,07	0,700
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%) & primanja (HRK)	30	0,04	0,824
izlučeni DON (%) & primanja (HRK)	30	0,14	0,458

Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 19**, mjesečna primanja po članu kućanstva nemaju značajan utjecaj na izlučivanje DON-a u promatranoj skupini ispitanika i podskupinama.

Istraživanja sustavno ukazuju na činjenicu da je unos voća i povrća veći kod osoba višeg socio-ekonomskog statusa i većih mjesečnih primanja (De Irala-Estévez i sur., 2000; Dubowitz i sur., 2008). Veći unos voća i povrća povezan je s višim unosom fitokemikalija koje potiču rad UGT enzima, što bi moglo dovesti do pojačanog izlučivanja glukuronidnih oblika DON-a i smanjenja izloženosti. Ovo nije potvrđeno na promatranom uzorku ispitanika.

Tablica 20 Povezanost apsolutnih vrijednosti unosa DON-a sa slobodnim DON-om i ekvivalentima DON-a u urinu

	N	Spearman R	p-vrijednost
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{dan}$) & slobodni DON ($\mu\text{g}/\text{dan}$)	49	0,50	<0,001
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{dan}$) & ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g}/\text{dan}$)	49	0,20	0,159
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{dan}$) & ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g}/\text{dan}$)	49	0,52	<0,001
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{dan}$) & ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g}/\text{dan}$)	49	0,53	<0,001
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{dan}$) & Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g}/\text{dan}$)	49	0,56	<0,001

*Crveno označene vrijednosti su značajne pri $p < 0,05$

Tablica 21 Povezanost unosa DON-a izraženog na jedinicu tjelesne mase sa slobodnim DON-om i ekvivalentima DON-a izraženim na količinu kreatinina u urinu

	N	Spearman R	p-vrijednost
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & slobodni DON-a ($\mu\text{g}/\text{g kreatinina}$)	49	0,45	0,001
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g}/\text{g kreatinina}$)	49	0,21	0,144
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g}/\text{g kreatinina}$)	49	0,25	0,077
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g}/\text{g kreatinina}$)	49	0,32	0,024
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g}/\text{g kreatinina}$)	49	0,36	0,011

*Crveno označene vrijednosti su značajne pri $p < 0,05$

Tablica 22 Povezanost unosa DON-a izraženog na jedinicu tjelesne mase s udjelima slobodnog DON-a i ekvivalenta te udjelom unešenog DON-a izlučenog u urinu

	N	Spearman R	p-vrijednost
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & slobodni DON (%)	49	0,30	0,038
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)	49	-0,09	0,542
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)	49	-0,0004	0,998
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & konjugirani DON (%)	49	-0,27	0,062
Unos DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg t.m.}$) & izlučeni DON (%)	49	-0,28	0,050

*Crveno označene vrijednosti su značajne pri $p < 0,05$

Utjecaj ukupnog unosa DON-a na njegovo izlučivanje urinom prikazan je u **Tablicama 20, 21 i 22**, pri čemu su korelirani pokazatelji izlučivanja izraženi na različite načine. Primjerice, korelacijom apsolutnih vrijednosti unosa i izlučene količine DON-a i ekvivalenta tijekom 24 sata (**Tablica 20**) utvrđena je snažna pozitivna veza unosa sa slobodnim DON-om, ekvivalentima DON-a iz DON-15-GlcA, sa sumom glukuronida te ukupnom količinom DON-a i ekvivalenta. Korelacija unosa i ekvivalenta iz 3-glukuronida nije utvrđena. Ujednačavanjem rezultata uz izražavanje unosa DON-a na jedinicu tjelesne mase, te razine DON-a i metabolita u urinu prema sadržaju kreatinina (**Tablica 21**), pozitivni koeficijenti korelacije su atenuirani te se veza unosa s razinom 15-glukuronida izgubila, ali ona sa sumom glukuronida je zadržala statističku značajnost. Ovakvi rezultati bi mogli značiti da će povećanje unosa DON-a dovesti do proporcionalnog rasta izlučivanja u obliku glukuronidnih metabolita, što može za posljedicu imati manji štetni učinak ovog toksina.

Ispitana je i eventualna veza unosa s postotnim udjelima slobodnog DON-a i metabolita, poradi analize utjecaja razine izloženosti na omjere metabolita i kapacitete konjugacije i izlučivanja DON-a. Pozitivna, statistički značajna veza s unosom utvrđena je za udio slobodnog DON-a (**Tablica 22**), dok se udjeli glukuronidnih metabolita nisu povećavali s dozom. Upravo suprotno, slaba negativna veza unosa i stope konjugacije DON-a bila je na granici statističke značajnosti. Iznenađuje i činjenica da je ustanovljena značajna tendencija slabijeg ukupnog izlučivanja DON-a urinom u bilo kojem obliku s povećanjem unosa.

Stabilan omjer DON-3-GlcA i DON-15-GlcA u urinu bez obzira na dozu su ustanovili Warth i suradnici (2013) analizom 45 spot uzoraka urina koji su uključivali i prve jutarnje urine. Koncentracije ovih analita su značajno varirale od uzorka do uzorka, ali je omjer metabolita uvijek bio oko 3:1 u korist 15-glukuronida.

4.2.2. Unos nutrijenata i namirnica ispitanika

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugljikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_01	1	2067,5	1396,4	32,6	17,9	14,6	70,5	12,2	24,8	32,5	157,4	21,2	5,4
	2	2636,8	2307,2	41,7	32,4	15,5	82,8	22,9	30,9	26,7	363,0	67,0	0,0
	3	3216,4	2829,7	112,3	77,3	35,0	60,8	22,9	14,4	23,5	506,2	116,6	0,0
HAH_02	1	2893,4	2398,7	105,9	13,4	92,5	152,9	47,7	55,7	39,8	126,6	21,9	15,0
	2	1864,0	1064,9	21,7	11,0	16,1	32,5	3,2	7,8	15,1	144,0	18,9	16,1
	3	2509,3	2239,9	75,7	43,0	32,8	78,9	26,6	23,1	26,7	310,0	55,7	10,0
HAH_03	1	2862,5	2728,9	127,3	10,7	116,7	159,1	47,4	65,8	45,8	131,9	17,6	38,1
	2	2170,8	1455,5	22,7	12,0	11,6	42,8	7,4	10,9	24,4	163,3	21,1	50,0
	3	2764,9	3960,2	105,5	73,2	32,4	176,3	59,4	73,2	45,6	451,6	93,0	40,0
HAH_04	1	1198,5	1677,3	66,7	14,6	58,8	85,9	36,5	28,6	13,9	160,2	19,5	0,0
	2	1300,4	1417,1	67,4	10,3	57,3	75,4	22,2	26,0	22,2	124,4	14,9	0,0
	3	1273,8	3097,4	110,2	83,6	28,4	74,5	31,0	19,8	21,1	546,0	120,5	0,0
HAH_05	1	1949,7	2786,9	88,4	32,6	55,8	176,7	52,2	92,0	34,6	217,8	30,4	0,0
	2	1358,3	3094,2	104,1	61,5	42,6	237,9	41,1	114,5	82,4	138,7	38,4	0,0
	3	2357,0	3291,9	164,0	61,1	102,8	100,7	44,1	33,9	20,8	465,3	77,0	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine bijline (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_06	1	1590,2	1683,8	66,3	13,3	53,0	91,5	34,8	39,2	15,7	156,3	22,9	0,0
	2	1307,5	1754,5	57,4	17,1	44,7	106,1	36,7	32,5	35,6	145,2	18,8	0,0
	3	1383,5	3199,7	132,9	55,5	77,5	132,1	68,6	43,5	15,9	406,9	82,2	0,0
HAH_07	1	2381,8	2494,9	163,0	22,7	140,3	96,0	23,0	39,1	28,6	250,2	51,5	0,0
	2	809,3	1400,7	57,4	12,4	52,2	78,9	29,9	29,4	14,6	111,0	14,1	0,0
	3	1440,6	2935,9	132,4	66,0	66,5	91,7	45,5	24,4	15,2	430,5	94,6	0,0
HAH_09	1	3647,0	2590,3	89,1	13,7	75,9	177,2	65,8	67,2	38,6	160,3	17,1	0,0
	2	3173,9	2994,8	89,2	12,5	108,2	192,9	31,6	57,8	94,7	197,6	13,0	0,0
	3	2798,1	3143,9	140,3	51,6	88,6	124,7	58,9	35,2	20,6	391,2	65,6	0,0
HAH_10	1	1590,6	1233,2	58,9	6,9	52,0	50,5	19,2	16,9	5,5	138,8	8,1	0,0
	2	952,9	1266,8	36,1	23,9	12,2	63,9	13,0	15,9	29,3	146,0	18,7	0,0
	3	1064,1	1983,5	92,6	47,4	45,2	47,9	19,2	10,1	7,1	315,4	60,1	0,0
HAH_12	1	2115,6	2132,6	124,5	16,2	108,3	119,0	27,6	40,2	49,5	141,9	31,8	0,0
	2	2156,4	1746,9	87,7	16,1	74,2	85,3	17,1	28,3	39,0	156,0	26,9	0,0
	3	1985,4	2794,3	91,8	65,4	26,8	68,2	21,9	20,4	24,9	470,7	91,6	13,5
HAH_14	1	2607,0	1681,6	31,2	28,6	2,6	102,8	9,9	58,2	34,6	168,1	35,1	0,0
	2	2767,4	2836,9	81,2	39,7	41,6	160,4	30,0	63,4	64,5	273,8	50,0	5,4
	3	6267,6	5413,1	247,4	98,0	149,4	212,9	109,1	72,7	27,8	691,3	146,2	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine bijline (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_15	1	3569,3	2513,5	113,0	46,9	66,1	175,4	51,7	81,2	35,5	126,7	28,1	0,0
	2	3576,8	2506,7	134,4	21,7	114,9	144,2	50,7	52,3	32,2	170,7	20,0	0,0
	3	3474,3	3181,6	135,6	53,2	82,5	144,6	56,9	48,4	36,8	359,7	68,6	0,0
HAH_16	1	2922,5	1709,2	59,5	14,5	45,0	67,7	21,9	23,9	19,5	188,8	30,8	20,0
	2	2600,0	2840,7	111,4	9,0	102,4	214,3	85,0	93,6	31,5	119,2	9,8	0,0
	3	2472,0	8820,0	311,5	277,3	51,4	123,1	35,3	32,5	53,1	1625,7	172,7	0,0
HAH_17	1	1179,9	1602,7	80,7	14,8	69,5	85,1	30,1	29,2	21,5	130,0	23,2	0,0
	2	1070,4	1507,9	62,1	14,4	49,5	86,1	26,2	41,0	14,1	124,8	16,8	0,0
	3	1087,3	3293,9	95,3	62,0	36,5	162,7	68,7	53,2	34,9	384,1	84,8	0,0
HAH_18	1	2645,0	2064,6	60,3	28,0	41,4	137,2	37,6	34,9	59,2	142,6	30,8	0,0
	2	2281,1	2319,1	58,4	28,8	29,6	127,2	30,3	62,9	27,3	243,0	32,2	0,0
	3	3365,0	3600,5	116,3	53,2	65,4	163,4	58,4	55,6	26,4	394,0	65,5	25,0
HAH_19	1	1122,6	1621,0	45,7	7,4	38,3	80,3	33,7	28,5	16,7	182,8	17,4	0,0
	2	2157,5	1441,0	70,0	17,9	52,1	61,9	10,3	14,8	32,5	153,8	29,9	0,0
	3	2063,1	1695,7	64,9	10,6	54,3	65,3	37,5	20,3	1,5	218,0	24,6	0,0
HAH_20	1	1229,0	2130,4	121,4	9,1	114,2	122,6	49,7	43,3	22,4	137,9	14,6	0,0
	2	1225,2	2571,6	116,0	17,3	100,5	168,5	52,5	74,7	33,1	151,1	20,3	0,0
	3	1491,5	2483,9	109,2	56,7	52,5	62,4	34,2	17,0	11,2	401,0	72,3	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_21	1	1261,2	1888,3	95,0	15,6	79,4	138,0	47,0	68,4	18,6	68,0	11,7	0,0
	2	1351,3	2343,7	80,6	20,9	59,7	141,3	22,8	49,5	50,7	197,2	20,8	0,0
	3	1387,1	2719,6	97,4	51,8	46,2	99,9	23,3	30,8	43,4	379,6	55,5	0,0
HAH_22	1	1161,8	1381,3	87,6	9,3	78,3	87,9	11,0	13,5	28,3	62,2	11,1	0,0
	2	1265,4	1586,0	82,9	18,4	64,5	74,4	7,5	14,6	17,4	155,2	33,6	0,0
	3	1408,0	3108,3	131,6	83,9	47,7	76,0	30,1	20,9	24,2	514,5	106,3	0,0
HAH_54	1	1741,8	2306,3	70,7	18,5	55,4	136,1	58,2	37,7	37,9	199,5	20,1	0,0
	2	1272,1	2281,2	95,3	9,9	85,5	146,1	69,5	40,5	23,0	143,0	9,7	0,0
	3	1470,3	2593,4	129,4	43,6	85,8	120,0	68,6	35,7	12,3	260,2	47,5	0,0
HAH_58	1	867,2	386,5	5,3	5,3	0,0	3,9	0,4	0,8	2,7	84,3	15,2	0,0
	2	1392,0	582,9	7,7	7,0	0,7	10,3	1,6	2,0	6,1	117,3	14,0	0,0
	3	1550,9	1623,9	51,5	51,5	0,0	13,0	2,5	1,7	8,7	352,7	68,5	0,0
HAH_59	1	1508,4	1188,7	22,6	22,6	0,0	32,0	3,3	7,2	20,0	213,6	27,7	0,0
	2	1813,8	1587,4	23,0	23,0	0,0	44,6	5,0	9,6	27,2	284,5	43,8	0,0
	3	1581,1	2444,1	58,5	58,5	0,0	48,8	7,3	9,5	30,5	462,0	80,8	8,1
HAH_60	1	1990,9	1816,1	51,8	51,8	0,0	89,2	18,6	33,1	36,9	212,9	51,6	0,0
	2	1906,7	2190,0	33,3	33,3	0,0	65,4	13,3	18,1	33,4	377,4	70,2	5,9
	3	429,1	1929,4	68,5	68,5	0,0	16,8	2,7	2,1	12,0	418,8	95,3	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_61	1	1320,4	2281,1	34,4	34,4	0,0	98,5	9,9	41,3	47,4	257,9	43,6	40,5
	2	1447,1	1239,7	35,0	35,0	0,0	72,7	9,5	14,2	48,1	116,2	19,0	0,0
	3	2264,1	2751,2	93,5	93,4	0,0	103,5	15,8	23,1	64,6	382,6	66,8	0,0
HAH_62	1	2108,6	2048,0	25,5	25,5	0,0	67,4	7,6	15,7	44,1	352,1	50,1	0,0
	2	2150,6	2012,5	28,2	28,2	0,0	79,3	10,4	23,4	43,7	312,7	44,9	0,0
	3	2048,7	2746,5	100,9	100,9	0,0	73,6	11,7	15,5	45,4	451,7	88,7	0,0
HAH_63	1	1305,6	1202,4	46,6	46,6	0,0	51,2	10,1	15,6	25,5	146,3	38,0	0,0
	2	1180,7	1574,5	26,1	26,1	0,0	54,7	7,9	14,0	32,9	259,9	35,1	0,0
	3	1580,8	3396,6	102,9	102,8	0,0	177,7	37,3	46,1	94,3	371,4	76,9	0,0
HAH_64	1	1667,6	1494,5	22,7	22,7	0,0	40,6	5,4	8,5	23,8	196,9	17,6	40,5
	2	921,7	1324,4	27,7	27,7	0,0	73,8	9,8	18,0	44,2	149,5	12,1	0,0
	3	596,6	1543,7	57,2	57,2	0,0	19,3	2,9	2,7	10,8	309,3	62,8	0,0
HAH_65	1	2306,6	1855,9	51,7	51,7	0,0	96,1	11,0	31,1	52,1	206,7	47,9	0,0
	2	2296,9	1266,8	24,3	24,3	0,0	43,2	6,4	9,6	25,1	207,8	37,3	0,0
	3	2295,5	2263,7	87,7	87,7	0,0	39,4	5,6	9,8	21,1	430,4	94,3	0,0
HAH_66	1	2702,7	1749,5	46,9	40,6	6,3	93,1	29,7	22,5	39,9	187,3	61,2	0,0
	2	526,2	642,8	19,0	13,0	6,1	27,1	8,5	7,6	10,7	84,0	21,7	0,0
	3	146,6	1417,5	50,0	50,0	0,0	12,2	2,1	1,6	8,5	305,1	62,6	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugljikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_67	1	3315,4	2292,8	24,0	24,0	0,0	55,8	6,5	13,2	34,0	437,6	81,3	0,0
	2	1628,6	2120,0	35,9	35,9	0,0	91,9	10,5	21,6	57,7	308,2	43,9	0,0
	3	1367,8	3223,0	105,8	105,8	0,0	101,1	20,0	20,8	58,1	513,7	106,3	0,0
HAH_68	1	1122,9	1329,9	26,9	26,8	0,0	55,0	8,4	12,0	32,7	179,1	28,3	8,1
	2	1681,9	1050,8	24,3	24,3	0,0	41,6	4,6	9,3	25,8	153,7	37,9	0,0
	3	753,7	2124,4	61,8	61,8	0,0	44,0	8,0	8,0	25,3	339,0	70,0	32,4
HAH_69	1	2452,5	1015,7	19,5	19,5	0,0	26,2	2,6	5,5	16,7	181,6	24,2	0,0
	2	5948,2	4402,6	200,1	200,1	0,0	137,3	15,5	46,0	75,9	583,1	229,8	25,0
	3	1610,2	1298,1	31,0	30,9	0,0	58,0	17,5	13,9	25,7	106,9	35,3	35,0
HAH_70	1	2026,1	1309,5	25,8	25,8	0,0	47,4	6,0	13,2	28,2	205,1	44,3	0,0
	2	1887,2	1188,6	19,9	19,9	0,0	33,2	4,5	10,4	18,2	213,8	37,2	0,0
	3	770,1	2843,6	90,1	90,0	0,0	89,4	18,4	17,8	53,3	448,9	95,0	8,1
HAH_71	1	1466,3	1212,3	38,9	38,9	0,0	37,6	4,8	10,0	18,6	189,5	41,0	0,0
	2	1572,9	1427,5	44,9	44,9	0,0	52,8	8,5	13,0	27,0	203,1	43,6	0,0
	3	1008,1	2410,5	73,2	73,2	0,0	43,1	6,6	8,5	26,5	395,9	77,8	37,8
HAH_72	1	930,9	1240,1	46,8	46,8	0,0	39,2	6,3	14,0	19,0	136,1	43,0	27,0
	2	887,6	1198,4	47,3	47,3	0,0	68,2	12,4	27,5	28,3	105,3	33,9	0,0
	3	1570,1	2824,9	106,0	105,9	0,0	69,1	13,2	18,8	37,2	430,1	92,4	27,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine bijline (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_74	1	1313,0	2803,0	116,6	49,1	67,5	196,0	38,1	98,4	55,0	148,6	40,1	0,0
	2	1356,9	2907,0	85,8	44,5	43,6	187,1	40,1	98,4	40,7	143,2	30,1	45,0
	3	1279,1	3199,0	101,7	78,3	23,4	83,0	22,4	22,9	34,9	474,2	111,6	47,0
HAH_75	1	1658,6	1891,5	88,8	28,5	60,3	122,7	25,2	67,5	28,4	111,2	23,8	0,0
	2	3007,8	2362,1	69,4	35,9	40,5	173,2	32,3	83,7	54,8	107,7	29,5	10,9
	3	3643,0	4239,5	175,6	86,5	89,1	158,0	57,4	54,3	44,3	533,6	116,8	27,0
HAH_76	1	1216,6	1122,0	41,4	14,6	29,5	56,0	25,9	17,8	9,6	114,4	15,6	0,0
	2	1266,0	1358,0	29,1	29,4	0,2	75,9	10,9	28,1	36,7	147,2	30,6	0,0
	3	1098,6	2989,1	116,5	70,9	45,5	103,8	36,5	26,6	31,9	434,9	105,5	0,0
HAH_77	1	1385,0	1314,3	55,3	20,1	36,9	67,9	27,7	24,4	13,5	121,4	20,4	0,0
	2	902,9	1229,9	31,2	20,7	10,5	66,7	10,8	27,9	25,2	133,2	29,5	0,0
	3	1036,5	2548,5	88,1	55,0	34,0	99,1	46,6	27,7	21,0	359,8	93,0	0,0
HAH_78	1	1884,9	1827,6	104,9	17,2	87,8	83,9	19,6	36,9	24,0	168,4	29,8	0,0
	2	2197,4	1611,3	102,9	8,1	94,8	74,1	24,4	23,1	23,9	137,9	16,8	0,0
	3	2862,1	313,4	119,3	88,6	30,7	53,5	17,5	10,7	20,3	598,9	123,2	0,0
HAH_79	1	1795,6	1759,2	53,4	46,2	7,2	96,6	16,7	40,0	37,4	179,1	43,6	0,0
	2	1608,8	3015,7	49,3	42,3	7,1	136,9	28,5	39,1	67,0	419,6	64,1	0,0
	3	1148,7	1422,9	50,3	50,3	0,0	12,4	2,2	1,6	8,6	305,2	63,1	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine bijline (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_80	1	1537,5	3411,9	204,1	16,1	188,1	265,6	80,2	109,2	75,2	62,1	13,0	0,0
	2	2788,2	2457,6	97,3	27,7	69,6	154,4	38,5	63,2	49,2	120,1	25,3	30,0
	3	3291,8	3777,0	117,8	68,2	49,7	119,2	43,9	48,1	27,2	488,0	88,0	60,0
HAH_81	1	1352,1	1903,6	99,8	10,5	89,3	117,5	30,6	38,4	22,9	118,3	16,8	0,0
	2	1160,2	1719,0	46,0	15,5	35,9	96,3	28,3	31,8	29,6	168,9	18,7	0,0
	3	992,4	3372,1	135,6	58,2	78,0	164,5	60,4	60,8	24,1	362,4	70,4	0,0
HAH_82	1	2334,9	2818,2	122,8	24,4	101,1	181,9	82,2	59,3	31,5	174,0	25,5	0,0
	2	2907,8	3278,9	155,3	39,0	118,0	196,8	72,5	77,9	45,2	205,4	29,5	8,1
	3	4190,9	4164,6	184,3	83,3	101,0	145,7	63,0	52,9	22,5	570,1	102,2	0,0
HAH_83	1	1892,5	1690,9	51,4	14,6	36,9	97,5	31,1	34,2	28,4	160,4	15,3	0,0
	2	2039,2	1569,3	68,9	12,6	56,4	78,1	17,0	26,7	33,2	155,0	15,4	0,0
	3	2483,2	3182,3	104,7	43,2	61,5	151,1	59,9	55,7	38,2	375,3	50,4	0,0
HAH_84	1	2869,4	2283,2	66,6	22,3	44,4	117,8	37,6	51,2	25,1	250,3	23,7	0,0
	2	2934,4	1743,9	53,6	17,6	36,0	108,2	31,6	47,9	27,0	146,8	17,8	0,0
	3	1675,3	2759,5	117,9	63,8	54,2	91,7	35,7	31,9	21,1	381,7	57,1	0,0
HAH_85	1	2101,0	2980,6	83,2	24,7	61,2	194,3	64,7	99,8	27,7	227,9	31,4	0,0
	2	1627,3	2164,0	57,5	15,6	41,9	136,9	31,9	36,9	25,8	185,1	23,0	0,0
	3	1465,3	1921,8	73,9	43,9	30,0	64,2	24,6	22,2	18,3	284,5	59,6	0,0

Tablica 23 Unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana ispitivanja - nastavak

Ispitanik	Dan	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_86	1	1282,3	953,5	66,9	8,2	58,7	50,8	16,8	8,8	6,1	56,8	9,5	0,0
	2	1955,9	2638,6	147,1	6,6	140,5	131,6	55,3	54,3	19,6	221,5	9,4	0,0
	3	2906,8	5436,3	253,1	87,2	165,9	179,0	89,4	62,7	24,7	754,1	109,8	0,0
HAH_87	1	1183,5	2046,4	46,5	13,6	32,9	88,7	17,9	28,9	41,0	152,3	12,7	68,5
	2	966,7	1473,1	34,2	2,7	31,4	60,3	13,9	17,8	14,6	33,9	1,9	94,0
	3	1519,1	3962,5	150,0	69,8	80,2	187,1	26,1	26,4	28,1	429,6	88,6	13,5

U **Tablici 23** prikazan je unos nutrijenata po ispitaniku tijekom tri dana. Izračun unosa nutrijenata proveden je da bi se utvrdio utjecaj različitih načina prehrane na izlučivanje DON-a.

Tablica 24 Prosječan unos nutrijenata svih ispitanika za prva dva dana istraživanja

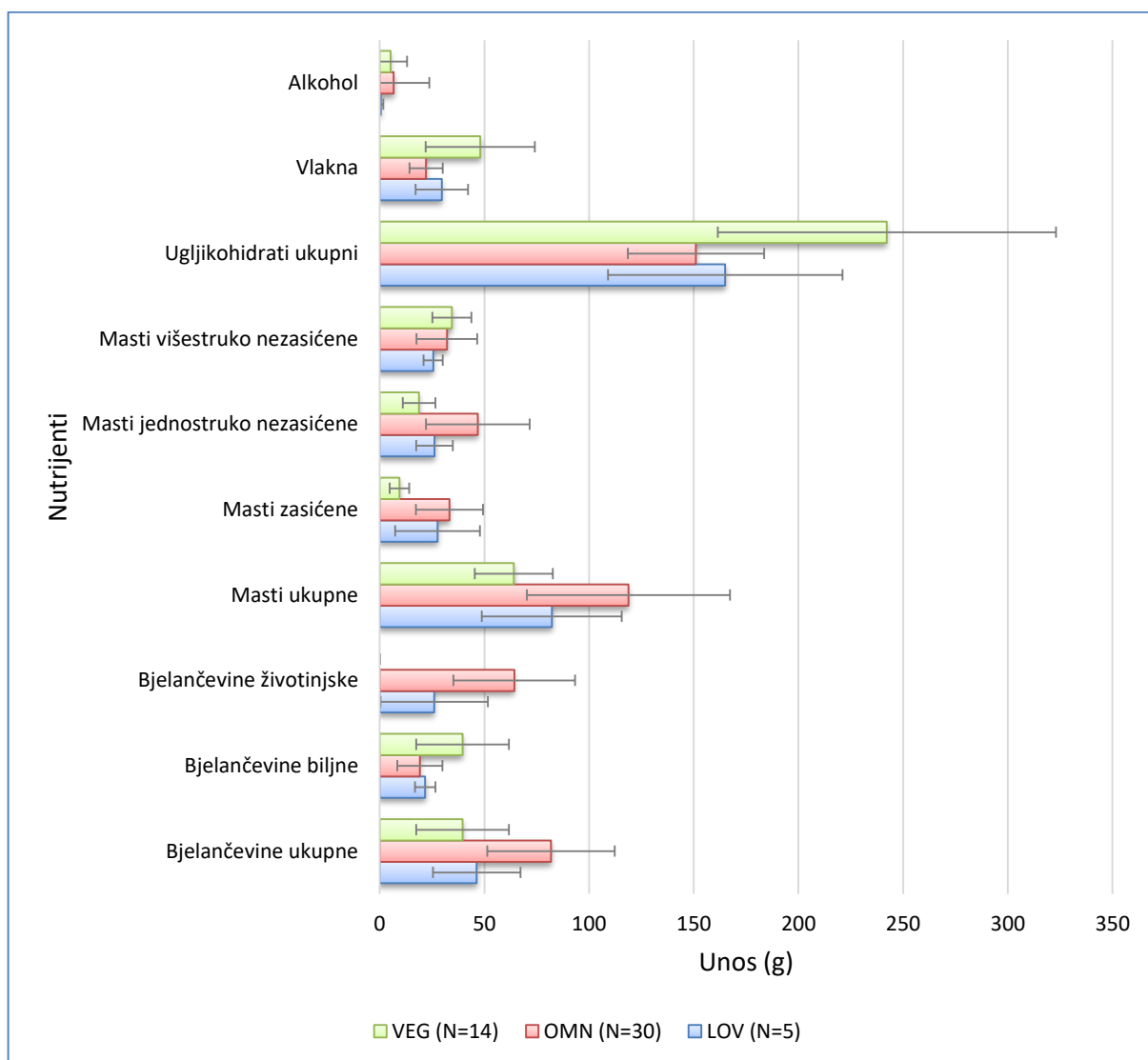
Ispitanik	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_01	2352,1	1851,8	37,1	25,1	15,0	76,6	17,5	27,9	29,6	260,2	44,1	2,7
HAH_02	2378,7	1731,8	63,8	12,2	54,3	92,7	25,4	31,7	27,5	135,3	20,4	15,6
HAH_03	2516,6	2092,2	75,0	11,3	64,1	101,0	27,4	38,3	35,1	147,6	19,4	44,1
HAH_04	1249,4	1547,2	67,0	12,5	58,1	80,6	29,3	27,3	18,1	142,3	17,2	0,0
HAH_05	1654,0	2940,5	96,3	47,0	49,2	207,3	46,6	103,2	58,5	178,3	34,4	0,0
HAH_06	1448,8	1719,2	61,8	15,2	48,9	98,8	35,7	35,8	25,6	150,8	20,9	0,0
HAH_07	1595,6	1947,8	110,2	17,5	96,3	87,5	26,4	34,2	21,6	180,6	32,8	0,0
HAH_09	3410,5	2792,6	89,2	13,1	92,0	185,1	48,7	62,5	66,7	178,9	15,1	0,0
HAH_10	1271,7	1250,0	47,5	15,4	32,1	57,2	16,1	16,4	17,4	142,4	13,4	0,0
HAH_12	2136,0	1939,8	106,1	16,2	91,3	102,1	22,4	34,3	44,3	149,0	29,3	0,0
HAH_14	2687,2	2259,3	56,2	34,1	22,1	131,6	19,9	60,8	49,5	220,9	42,5	2,7
HAH_15	3573,1	2510,1	123,7	34,3	90,5	159,8	51,2	66,7	33,8	148,7	24,0	0,0
HAH_16	2761,2	2274,9	85,5	11,8	73,7	141,0	53,5	58,7	25,5	154,0	20,3	10,0
HAH_17	1125,2	1555,3	71,4	14,6	59,5	85,6	28,2	35,1	17,8	127,4	20,0	0,0
HAH_18	2463,1	2191,9	59,3	28,4	35,5	132,2	34,0	48,9	43,3	192,8	31,5	0,0
HAH_19	1640,1	1531,0	57,8	12,6	45,2	71,1	22,0	21,6	24,6	168,3	23,6	0,0
HAH_20	1227,1	2351,0	118,7	13,2	107,3	145,5	51,1	59,0	27,8	144,5	17,4	0,0
HAH_21	1306,2	2116,0	87,8	18,2	69,5	139,6	34,9	59,0	34,6	132,6	16,2	0,0
HAH_22	1213,6	1483,7	85,2	13,8	71,4	81,2	9,3	14,1	22,8	108,7	22,3	0,0

Tablica 24 Prosječan unos nutrijenata svih ispitanika za prva dva dana istraživanja - nastavak

Ispitanik	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugljikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_54	1507,0	2293,8	83,0	14,2	70,4	141,1	63,9	39,1	30,4	171,2	14,9	0,0
HAH_58	1129,6	484,7	6,5	6,1	0,3	7,1	1,0	1,4	4,4	100,8	14,6	0,0
HAH_59	1661,1	1388,1	22,8	22,8	0,0	38,3	4,1	8,4	23,6	249,0	35,8	0,0
HAH_60	1948,8	2003,1	42,5	42,5	0,0	77,3	16,0	25,6	35,1	295,2	60,9	3,0
HAH_61	1383,8	1760,4	34,7	34,7	0,0	85,6	9,7	27,7	47,7	187,1	31,3	20,3
HAH_62	2129,6	2030,3	26,8	26,8	0,0	73,4	9,0	19,5	43,9	332,4	47,5	0,0
HAH_63	1243,1	1388,4	36,3	36,3	0,0	53,0	9,0	14,8	29,2	203,1	36,6	0,0
HAH_64	1294,6	1409,4	25,2	25,2	0,0	57,2	7,6	13,2	34,0	173,2	14,8	20,3
HAH_65	2301,8	1561,3	38,0	38,0	0,0	69,7	8,7	20,4	38,6	207,2	42,6	0,0
HAH_66	1614,4	1196,2	33,0	26,8	6,2	60,1	19,1	15,1	25,3	135,6	41,4	0,0
HAH_67	2472,0	2206,4	29,9	29,9	0,0	73,8	8,5	17,4	45,9	372,9	62,6	0,0
HAH_68	1402,4	1190,4	25,6	25,6	0,0	48,3	6,5	10,6	29,2	166,4	33,1	4,1
HAH_69	4200,4	2709,2	109,8	109,8	0,0	81,7	9,0	25,8	46,3	382,3	127,0	12,5
HAH_70	1956,6	1249,1	22,9	22,9	0,0	40,3	5,3	11,8	23,2	209,4	40,8	0,0
HAH_71	1519,6	1319,9	41,9	41,9	0,0	45,2	6,6	11,5	22,8	196,3	42,3	0,0
HAH_72	909,3	1219,3	47,1	47,1	0,0	53,7	9,4	20,7	23,6	120,7	38,5	13,5
HAH_74	1335,0	2855,0	101,2	46,8	55,5	191,6	39,1	98,4	47,9	145,9	35,1	22,5
HAH_75	2333,2	2126,8	79,1	32,2	50,4	148,0	28,7	75,6	41,6	109,4	26,7	5,5
HAH_76	1241,3	1240,0	35,2	22,0	14,8	66,0	18,4	23,0	23,2	130,8	23,1	0,0

Tablica 24 Prosječan unos nutrijenata svih ispitanika za prva dva dana istraživanja - nastavak

Ispitanik	Voda (g)	Energija (kcal)	Bjelančevine ukupne (g)	Bjelančevine biljne (g)	Bjelančevine životinjske (g)	Masti ukupne (g)	Masti zasićene (g)	Masti jednostruko nezasićene (g)	Masti višestruko nezasićene (g)	Ugjikohidrati ukupni (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)
HAH_77	1143,9	1272,1	43,2	20,4	23,7	67,3	19,3	26,2	19,4	127,3	24,9	0,0
HAH_78	2041,1	1719,4	103,9	12,6	91,3	79,0	22,0	30,0	24,0	153,2	23,3	0,0
HAH_79	1718,8	2209,8	50,5	50,5	0,0	99,3	22,8	35,7	39,7	295,3	58,6	0,0
HAH_80	2162,9	2934,7	150,7	21,9	128,8	210,0	59,3	86,2	62,2	91,1	19,2	15,0
HAH_81	1256,1	1811,3	72,9	13,0	62,6	106,9	29,4	35,1	26,2	143,6	17,8	0,0
HAH_82	2621,4	3048,5	139,0	31,7	109,6	189,4	77,3	68,6	38,4	189,7	27,5	4,1
HAH_83	1965,8	1630,1	60,2	13,6	46,6	87,8	24,0	30,5	30,8	157,7	15,4	0,0
HAH_84	2901,9	2013,5	60,1	20,0	40,2	113,0	34,6	49,5	26,0	198,5	20,8	0,0
HAH_85	1864,1	2572,3	70,4	20,1	51,6	165,6	48,3	68,3	26,7	206,5	27,2	0,0
HAH_86	1619,1	1796,0	107,0	7,4	99,6	91,2	36,1	31,6	12,9	139,1	9,5	0,0
HAH_87	1075,1	1759,8	40,3	8,2	32,2	74,5	15,9	23,3	27,8	93,1	7,3	81,3



Slika 18 Unos pojedinih nutrijenata ovisno o tipu prehrane za prva dva dana istraživanja ($g \pm SD$)

Prosječne vrijednosti unosa nutrijenata ovisno o tipu prehrane za prva dva dana istraživanja prikazane su na **Slici 18**. Za daljnju obradu podataka korištena su samo ta dva dana pripremnog perioda jer, unatoč eliminaciji žitarica iz prehrane, bolje odražavaju uobičajene prehrabne navike ispitanika u odnosu na dan intervencijske prehrane i prikupljanja uzoraka urina.

Izračunat je prosječni unos ukupnih bjelančevina, bjelančevina biljnog, te onih životinjskog porijekla. Statistički značajna razlika u unosu ukupnih bjelančevina utvrđena je između LOV i OMN podskupina ($p = 0,012$) i OMN i VEG podskupina ($p = 0,00002$) (**Slika 18**), uz viši unos kod OMN. VEG su pak unosili otprilike dvostruko više bjelančevina biljnog porijekla u odnosu na

LOV ($p = 0,0083$) i OMN ($p = 0,00007$), dok su OMN imali veći unos bjelančevina životinjskog porijekla od LOV podskupine ($p = 0,017$).

Procijenjen je i unos ukupnih, zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masti. Statističkom obradom utvrđen je značajno viši unos ukupnih masti OMN podskupine u odnosu na LOV ($p = 0,040$) i VEG podskupinu ($p = 0,00004$). OMN su unosili i više zasićenih masti u odnosu na LOV ($p = 0,005$) i VEG ($p = 0,000003$), kao i više mononezasićenih masti u odnosu na VEG ($p = 0,00005$). Nije utvrđena statistički značajna razlika kod unosa višestruko nezasićenih masti između OMN i VEG.

Očekivano najveći unos ugljikohidrata i vlakana bio je u podskupini VEG (**Slika 18**), uz gotovo dvostruko manji unos vlakana u OMN i LOV podskupinama. Statistički značajna razlika utvrđena je između OMN i VEG podskupina u unosu ugljikohidrata ($p = 0,00009$) i vlakana ($p = 0,00002$).

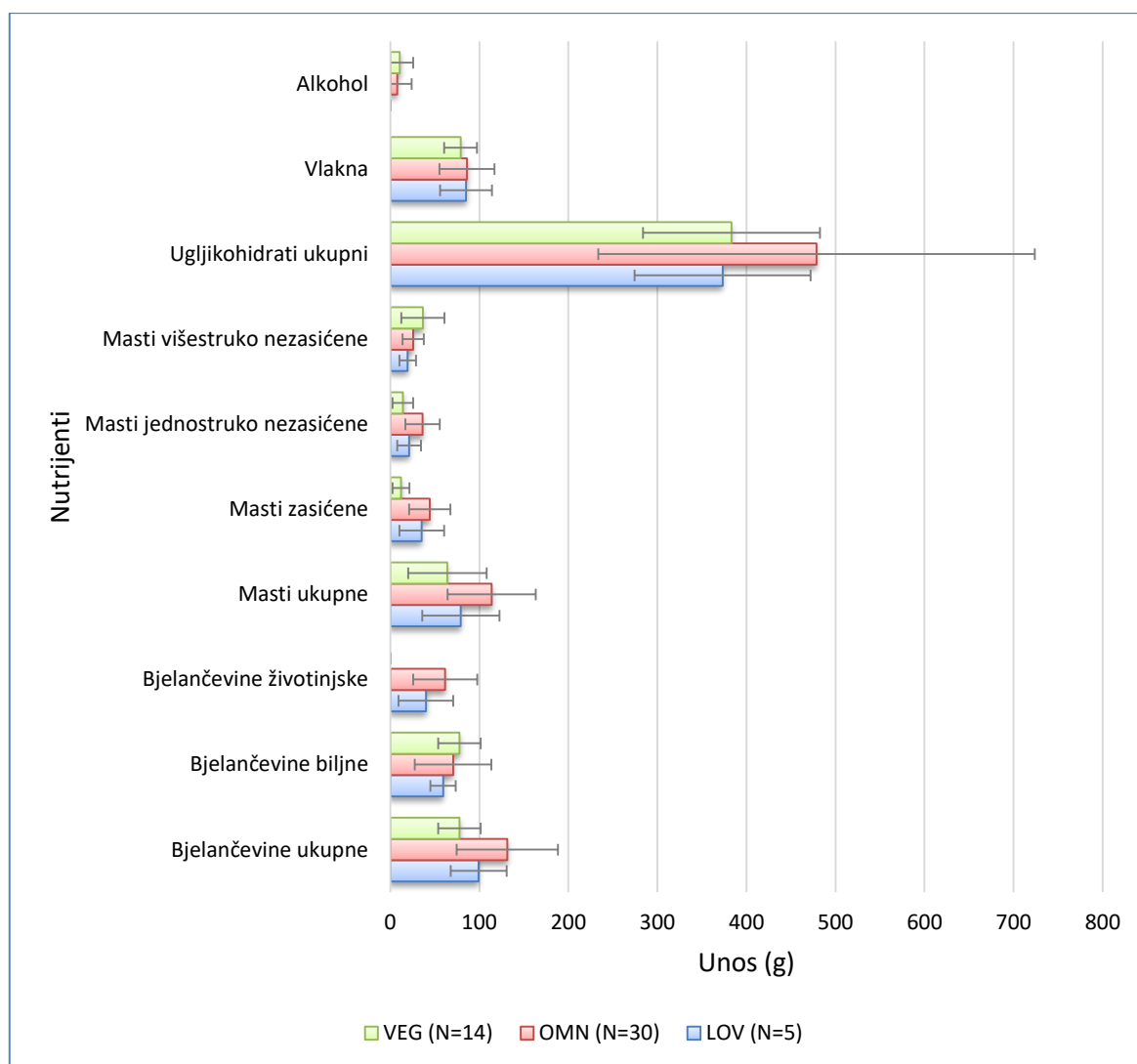
OMN i VEG ispitanici su unosili znatno više alkohola u odnosu na LOV podskupinu (**Slika 18**), bez statistički značajne razlike.

Doprinos proteina, ukupnih i zasićenih masti dnevnom unosu kalorija (%E) kod OMN je bio veći u odnosu na VEG. Primjerice, ovdje su OMN unosili 16 ± 5 %E u obliku proteina, a VEG 9 ± 3 %E ($p < 0,001$). Unos ukupnih masti OMN je činio 50 ± 10 %E odnosno 34 ± 6 %E kod VEG ($p = 0,000003$). Doprinos zasićenih masti unosu energije bio je 6 ± 2 %E kod OMN, te 2 ± 1 %E kod VEG ($p = 0,000002$). Suprotno je utvrđeno za ukupni unos ugljikohidrata (VEG: 57 ± 9 %E, OMN: 32 ± 12 %E; $p = 0,000001$).

Razlike utvrđene u promatranim karakteristikama prehrane se mogu objasniti temeljnim značajkama ovih tipova prehrane. Na primjer, prehrana OMN se od ostalih podskupina razlikuje po činjenici da uključuje meso i proizvode te ostale namirnice životinjskog porijekla. LOV prehrana od namirnica životinjskog porijekla uključuje samo mlijeko i proizvode te jaja, dok se prehrana VEG zasniva isključivo na namirnicama biljnog porijekla. Isključivanje žitarica iz prehrane tijekom pripremnog perioda je dovelo do kompenzacije drugim namirnicama poput voća te škrobnog i neškrobnog povrća, naročito krumpira i mahunarki kod VEG, te namirnica životinjskog podrijetla kod OMN. Na ovaj zaključak navode vrijednosti doprinosa

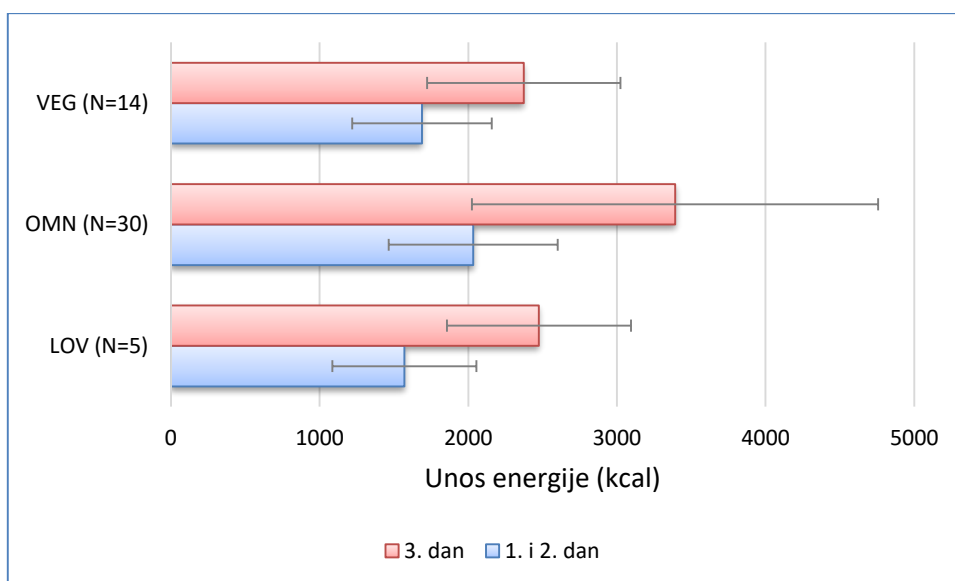
ključnih nutrijenata dnevnom unosu energije (%E). Time je prehrana tijekom pripremnog perioda naglasila razlike koje i inače postoje između OMN i VEG tipa prehrane.

Slične rezultate dobili su i Clarys i sur. (2014) koji su istraživali razlike u nutritivnom unosu VEG, vegetarijanaca i OMN. U istraživanju je sudjelovalo 1475 ispitanika od čega je bilo 104 VEG, 573 vegetarijanca, 155 OMN, dok su ostali ispitanici spadali u različite oblike vegetarijanske prehrane (pesko-vegetarijanci i sl.). Kao i u ovom istraživanju, OMN su unosili značajno više ukupnih proteina, ukupnih, zasićenih i mononezasićenih masti u odnosu na VEG, u apsolutnim i relativnim (%E) vrijednostima. S druge strane, VEG su unosili veće količine višestruko nezasićenih masti, za razliku od rezultata prezentiranih ovdje. Apsolutni unos ukupnih ugljikohidrata se nije razlikovao između podskupina, dok su u ovom radu VEG unosili značajno više. Ipak, doprinos ugljikohidrata dnevnom unosu energije je kod VEG iz tog istraživanja bio značajno veći u odnosu na OMN (57 prema 44 %E), baš kao i ovdje. Također sukladno rezultatima ovog rada, VEG su unosili znatno više vlakana od OMN. Autori su ustanovili i manju konzumaciju alkohola od strane VEG u odnosu na OMN, što u ovom istraživanju nije bio slučaj.



Slika 19 Unos pojedinih nutrijenata ovisno o tipu prehrane za treći dan istraživanja ($g \pm SD$)

Prosječne vrijednosti unosa pojedinih nutrijenata ovisno o tipu prehrane za treći dan istraživanja prikazane su na **Slici 19**. Za razliku od prva dva dana pripremnog perioda, unos ugljikohidrata, vlakana i bjelančevina biljnog porijekla u trećem danu je bio znatno veći, što je posljedica intervencijske prehrane bogate žitaricama koju su ispitanici konzumirali. Najveća razlika se vidi kod OMN i LOV podskupina koje su se manje oslanjale na biljne namirnice prilikom nadomještanja kalorija koje obično unose putem žitarica i proizvoda. Statističkom obradom kod OMN je utvrđen veći unos ukupnih proteina ($p = 0,0002$), ukupnih masti ($p = 0,003$), zasićenih masti ($p = 0,0008$) i jednostruko nezasićenih masti ($p = 0,0001$) u odnosu na VEG.



Slika 20 Prosječan unos energije tijekom prva dva dana i treći dan prehrane ovisno o tipu prehrane (kcal \pm SD)

Slika 20 pokazuje razlike u prosječnom unosu energije između prva dva dana pripremnog perioda i treći dan intervencijske prehrane za različite tipove prehrane. Iz rezultata je vidljivo da je energetska unos kod svih tipova prehrane bio najveći za treći dan intervencijske prehrane kad su konzumirane namirnice koje su podijeljene ispitanicima (polubijeli kruh, *bran flakes*, pšenične mekinje). Unos kruha i pahuljica potreban za prosječnu dnevnu izloženost DON-u u ovom istraživanju od 1,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. je za osobu od 65 kg podrazumijevao unos 263 g polubijelog kruha i 162 g *bran flakes*-a. Time je samo konzumacijom ovih namirnica ispitanik unio oko 1200 kcal. OMN podskupina je imala značajno veći unos energije od VEG podskupine tijekom prva dva dana pripreme prehrane ($p = 0,031$), dok su treći dan intervencijske prehrane OMN ispitanici unosili značajno više energije od LOV ispitanika ($p = 0,040$), kao i od VEG ispitanika ($p = 0,003$) (**Slika 18**).

Clarys i sur. (2014) su određivali unos ukupne energije između VEG, vegetarijanaca i OMN i utvrdili su statistički značajno veći unos energije OMN u odnosu na LOV i VEG.

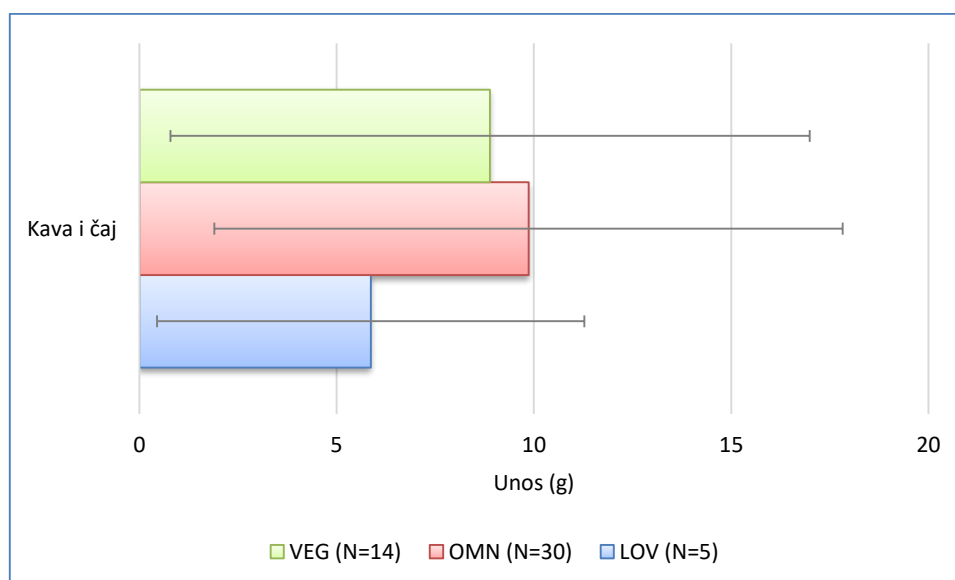
Tablica 25 Prosječan unos voća i povrća te kave i čaja ispitanika za prva dva dana istraživanja

	Kava i čaj (g)	Voće i povrće (g)
HAH_01	8,5	815,2
HAH_02	10,1	770,0
HAH_03	6,9	669,8
HAH_04	29,7	409,5
HAH_05	7,6	628,5
HAH_06	12,7	766,7
HAH_07	19,6	1052,2
HAH_09	28,1	576,3
HAH_10	8,5	205,0
HAH_12	5,9	1245,7
HAH_14	1,7	882,1
HAH_15	9,3	550,9
HAH_16	7,8	516,0
HAH_17	21,3	610,4
HAH_18	9,9	1032,9
HAH_19	1,2	966,8
HAH_20	6,8	432,7
HAH_21	13,1	310,7
HAH_22	6,5	786,6
HAH_54	3,6	270,7
HAH_58	0,0	732,3
HAH_59	8,2	795,7
HAH_60	1,8	1613,5
HAH_61	5,6	654,1
HAH_62	12,2	1297,3
HAH_63	0,0	403,8
HAH_64	14,7	112,6
HAH_65	13,1	1420,7
HAH_66	1,7	1631,7
HAH_67	14,0	2023,3
HAH_68	14,8	680,4
HAH_69	4,9	809,1
HAH_70	2,4	1126,6
HAH_71	29,4	592,5
HAH_72	0,0	454,4
HAH_74	8,2	450,1
HAH_75	6,5	476,4
HAH_76	14,2	692,9
HAH_77	1,5	693,4
HAH_78	1,7	737,5

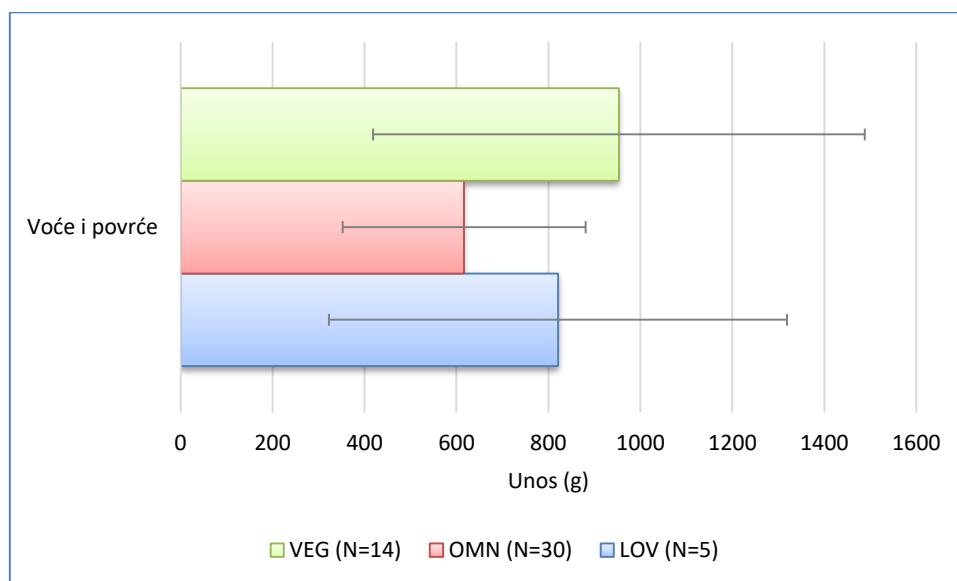
Tablica 25 Prosječan unos voća i povrća te kave i čaja ispitanika za prva dva dana istraživanja
- nastavak

	Kava i čaj (g)	Voće i povrće (g)
HAH_79	3,4	1362,5
HAH_80	9,8	703,7
HAH_81	7,2	460,0
HAH_82	28,7	667,4
HAH_83	8,2	270,0
HAH_84	4,2	463,6
HAH_85	2,7	718,8
HAH_86	8,6	329,7
HAH_87	3,3	74,3

U **Tablici 25** prikazan je prosječan unos kave i čaja te voća i povrća za prva dva dana istraživanja. Rezultati za kavu i čaj izraženi su u gramima jer je prilikom određivanja prosječnog unosa u obzir uzeta suha tvar, a ne količina pripremljenog napitka. Raspon minimalnog i maksimalnog unosa kave i čaja kretao se od 0 do 29,7 g/dan, uz prosjek od 9,2 g/danu. Od 49 ispitanika njih 3 (6%) nisu bili konzumenti kave i čaja. Unos voća i povrća kretao se u rasponu od 74,3 – 2023,3 g/danu, uz prosjek od 733,6 g/danu.



Slika 21 Prosječan unos kave i čaja ovisno o tipu prehrane za prva dva dana istraživanja (g ± SD)



Slika 22 Prosječan unos voća i povrća ovisno o tipu prehrane za prva dva dana istraživanja (g \pm SD)

Prosječni unosi kave i čaja te voća i povrća ovisno o tipu prehrane za prva dva dana istraživanja prikazani su na **Slici 21** odnosno **Slici 22**. Rezultati pokazuju da u unosu kave i čaja nema značajne razlike, dok je kod unosa voća i povrća utvrđena značajna razlika između VEG i OMN ($p = 0,043$).

Kava i čaj potiču aktivnost metaboličkih enzima (UGT enzima) (Kalthoff i sur., 2010), što može dovesti do pojačanog izlučivanja glukuronidnih oblika DON-a. Također, VEG tip prehrane općenito je povezan s povećanim unosom vlakana, nezasićenih masnoća i brojnih fitokemikalija (Mehta, 2017). Fitokemikalije aktivacijom transkripcijskog faktora Nrf2 i sličnih molekula potiču sustave obrane od toksikanata poput metaboličkih enzima druge faze, uključujući UGT-ove (Gopalakrishnan i Kong, 2008).

Tablica 26 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom prva dva dana pripremnog perioda s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu

	N	Spearman R	p-vrijednost
ENERGIJA (kcal)			
slobodni DON (%)	49	-0,04	0,810
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,25	0,088
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,33	0,019
izlučeni DON (%)		0,08	0,565
DON (μg/g kreatinina)		-0,12	0,429
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,11	0,455
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,28	0,048
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,18	0,216
BJELANČEVINE (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,01	0,964
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,41	0,003
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,44	0,002
izlučeni DON (%)		-0,06	0,690
DON (μg/g kreatinina)		-0,04	0,798
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,20	0,160
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,37	0,009
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,21	0,157
BJELANČEVINE BILJNE (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,06	0,694
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,26	0,066
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,24	0,094
izlučeni DON (%)		0,17	0,241
DON (μg/g kreatinina)		0,10	0,507
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,01	0,970
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		0,24	0,099
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		0,18	0,207
BJELANČEVINE ŽIVOTINJSKE (g)			
slobodni DON (%)	35	0,03	0,818
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,40	0,005
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,42	0,002
izlučeni DON (%)		-0,05	0,721
DON (μg/g kreatinina)		-0,07	0,629
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,13	0,366
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,37	0,009
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,24	0,093

Tablica 26 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom prva dva dana pripremnog perioda s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
MASTI (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,02	0,903
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,31	0,031
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,37	0,009
izlučeni DON (%)		0,03	0,853
DON (µg/g kreatinina)		-0,16	0,283
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,08	0,580
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		-0,39	0,005
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		-0,29	0,040
MASTI ZASIĆENE (g)			
slobodni DON (%)	49	0,01	0,938
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,34	0,016
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,42	0,003
izlučeni DON (%)		0,001	0,995
DON (µg/g kreatinina)		-0,13	0,368
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,07	0,629
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		-0,44	0,001
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		-0,33	0,021
MASTI JEDNOSTRUKO NEZASIĆENE (g)			
slobodni DON (%)	49	0,04	0,765
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,28	0,055
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,36	0,010
izlučeni DON (%)		-0,01	0,946
DON (µg/g kreatinina)		-0,10	0,480
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,07	0,653
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		-0,41	0,004
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		-0,31	0,032
MASTI VIŠESTRUKO NEZASIĆENE (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,24	0,090
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,18	0,215
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,14	0,343
izlučeni DON (%)		0,15	0,303
DON (µg/g kreatinina)		-0,21	0,156
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,19	0,196
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		-0,04	0,800
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		0,01	0,975

Tablica 26 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom prva dva dana pripremnog perioda s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
UGLIKOHIDRATI (g)			
slobodni DON (%)	49	0,06	0,668
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,19	0,191
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,07	0,636
izlučeni DON (%)		0,26	0,068
DON (µg/g kreatinina)		0,20	0,177
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,15	0,316
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		0,35	0,015
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		0,36	0,012
VLAKNA (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,002	0,989
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,32	0,026
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,29	0,041
izlučeni DON (%)		0,22	0,128
DON (µg/g kreatinina)		0,23	0,113
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,12	0,406
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		0,48	0,001
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		0,46	0,001
ALKOHOL (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,26	0,070
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,20	0,170
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,08	0,575
izlučeni DON (%)		-0,04	0,767
DON (µg/g kreatinina)		-0,26	0,067
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,05	0,720
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		-0,12	0,411
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		-0,08	0,586
ČAJ I KAVA (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,18	0,211
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,13	0,369
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,05	0,731
izlučeni DON (%)		0,07	0,637
DON (µg/g kreatinina)		-0,10	0,500
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,22	0,128
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		0,05	0,722
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		0,08	0,608

Tablica 26 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom prva dva dana pripremnog perioda s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
VOĆE I POVRĆE (g)			
slobodni DON (%)	49	0,15	0,317
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,27	0,058
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,21	0,152
izlučeni DON (%)		0,15	0,309
DON (µg/g kreatinina)		0,36	0,011
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,17	0,244
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		0,49	<0,001
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		0,51	<0,001

*Crveno označene vrijednosti su značajne pri $p < 0,05$

Utjecaj unosa promatranih nutritivnih karakteristika ispitanika na izlučivanje DON-a i udjele DON-a i metabolita za prva dva dana istraživanja prikazan je u **Tablici 26**. Koeficijenti korelacije ukazuju na postojanje slabe do umjerene negativne veze između razine urinarnog DON-15-GlcA, izraženog kao % ekvivalenata ili u µg/g kreatinina, i dnevnog unosa energije, ukupnih bjelančevina, animalnih bjelančevina, ukupnih masti, zasićenih masti, te jednostruko nezasićenih masti. S druge strane, unos ugljikohidrata, vlakana te voća i povrća bio je u pozitivnoj vezi s izlučivanjem ovog glukuronida. Pojačano izlučivanje 3-glukuronida DON-a u postocima ekvivalenata bilo je korelirano s unosom bjelančevina, animalnih bjelančevina, kao i ukupnih te zasićenih masti. Korekcija koncentracija DON-3-GlcA na gram kreatinina uklonila je povezanost ovih varijabli. Koncentracija slobodnog DON-a u µg/g kreatinina je bila povezana samo s unosom voća i povrća uz statističku značajnost (**Tablica 26**). Postotak izlučenog DON-a se jedino u slučaju unosa ugljikohidrata približio značajnoj pozitivnoj korelaciji, dok je suma ekvivalenata korigirana prema sadržaju kreatinina rasla skupa s konzumacijom ugljikohidrata, vlakana, te voća i povrća. Istovremeno, unos ukupnih, zasićenih, te jednostruko nezasićenih masti je bio u negativnoj vezi sa sumom ekvivalenata DON-a u urinu.

S obzirom na uočene razlike u unosu prehrambenih parametara između VEG i OMN podskupine, povezanost istih s pokazateljima metabolizma i izlučivanja DON-a (u µg/g kreatinina) je ispitana i odvojeno, unutar samih podskupina. U obje podskupine utvrđena je pozitivna veza između unosa voća i povrća i razina DON-a i metabolita u urinu. Primjerice, kod OMN je koeficijent korelacije s razinama nepromijenjenog DON-a bio 0,52 ($p = 0,003$), s

ukupnim glukuronidima je bio 0,45 ($p = 0,012$), a sa sumom ekvivalenata je bio 0,47 ($p = 0,009$). Koeficijenti korelacije kod VEG su bili na samoj granici statističke značajnosti u slučaju veze s ekvivalentima DON-a iz DON-15-GlcA ($r = 0,53$; $p = 0,054$), s ukupnim glukuronidima ($r = 0,49$; $p = 0,078$) te sa sumom ekvivalenata ($r = 0,52$; $p = 0,059$). (Napomena: rezultati nisu prikazani).

Općenito, rezultati podupiru zaključak po kojem biljna prehrana potiče glukuronidaciju i ukupno izlučivanje DON-a, dok obrnuto vrijedi za nutrijente čiji povišen unos je vezan uz OMN tip prehrane (ukupne bjelančevine, bjelančevine životinjskog porijekla, ukupne masti, zasićene masti, te mononezasićene masti).

Fitokemikalije koje su prisutne u biljnoj hrani potiču produkciju metaboličkih enzima (UGT) koji povezuju toksikante s glukuronskom kiselinom. Nastali glukuronidi su biološki manje aktivne molekule koje povećavaju topljivost konjugiranih proizvoda u vodi, što olakšava njihovo izlučivanje iz organizma putem urina i smanjuje toksičnost metabolizirane tvari (Krajka-Kuźniak i sur., 2014).

Tablica 27 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom intervencijskog dana s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu

	N	Spearman R	p-vrijednost
ENERGIJA (kcal)			
slobodni DON (%)	49	-0,004	0,980
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,16	0,267
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,15	0,289
izlučeni DON (%)		-0,01	0,966
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,06	0,706
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,12	0,425
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,10	0,482
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,009	0,952
BJELANČEVINE (g)			
slobodni DON (%)	49	0,14	0,341
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,20	0,167
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,26	0,066
izlučeni DON (%)		0,01	0,946
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,02	0,899
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,04	0,798
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,28	0,053
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,18	0,229
BJELANČEVINE BILJNE (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,12	0,403
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,08	0,567
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,21	0,151
izlučeni DON (%)		0,15	0,293
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,10	0,474
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,01	0,948
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,25	0,081
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,21	0,138
BJELANČEVINE ŽIVOTINJSKE (g)			
slobodni DON (%)	35	0,28	0,055
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,20	0,164
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,35	0,015
izlučeni DON (%)		-0,13	0,384
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,12	0,409
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,01	0,959
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,36	0,011
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,26	0,076

Tablica 27 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom intervencijskog dana s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
MASTI (g)			
slobodni DON (%)	49	0,04	0,764
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,23	0,109
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,26	0,066
izlučeni DON (%)		-0,04	0,764
DON (μg/g kreatinina)		-0,03	0,819
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,11	0,432
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,23	0,109
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,12	0,422
MASTI ZASIĆENE (g)			
slobodni DON (%)	49	0,22	0,122
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,18	0,215
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,31	0,033
izlučeni DON (%)		-0,09	0,535
DON (μg/g kreatinina)		0,16	0,286
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,11	0,457
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,24	0,100
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,12	0,427
MASTI JEDNOSTRUKO NEZASIĆENE (g)			
slobodni DON (%)	49	0,06	0,661
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,24	0,100
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,29	0,043
izlučeni DON (%)		-0,02	0,878
DON (μg/g kreatinina)		-0,01	0,975
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,12	0,395
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,26	0,067
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,15	0,319
MASTI VIŠESTRUKO NEZASIĆENE (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,32	0,023
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,07	0,655
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,15	0,312
izlučeni DON (%)		0,24	0,099
DON (μg/g kreatinina)		-0,23	0,110
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,16	0,267
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		0,16	0,273
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		0,19	0,181

Tablica 27 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom intervencijskog dana s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
UGLIKOHIDRATI (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,06	0,672
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,003	0,983
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,11	0,473
izlučeni DON (%)		0,12	0,424
DON (μg/g kreatinina)		-0,02	0,897
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,10	0,502
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		0,20	0,168
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		0,22	0,138
VLAKNA (g)			
slobodni DON (%)	49	0,03	0,837
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		-0,08	0,606
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,12	0,403
izlučeni DON (%)		0,03	0,848
DON (μg/g kreatinina)		0,10	0,492
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,08	0,572
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		0,24	0,095
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		0,27	0,062
ALKOHOL (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,32	0,025
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,13	0,366
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,02	0,894
izlučeni DON (%)		-0,05	0,713
DON (μg/g kreatinina)		-0,23	0,106
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,12	0,422
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		0,02	0,893
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		0,03	0,818
ČAJ I KAVA (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,21	0,146
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,14	0,335
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		-0,04	0,776
izlučeni DON (%)		-0,07	0,653
DON (μg/g kreatinina)		-0,21	0,146
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (μg/g kreatinina)		0,15	0,302
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (μg/g kreatinina)		-0,05	0,751
Σ ekvivalenata DON-a (μg/g kreatinina)		-0,06	0,703

Tablica 27 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica ispitanika tijekom intervensijskog dana s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
VOĆE I POVRĆE (g)			
slobodni DON (%)	49	-0,21	0,142
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (%)		0,03	0,851
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (%)		0,10	0,514
izlučeni DON (%)		0,30	0,036
DON (µg/g kreatinina)		-0,10	0,487
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA (µg/g kreatinina)		0,07	0,627
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA (µg/g kreatinina)		0,15	0,303
Σ ekvivalenata DON-a (µg/g kreatinina)		0,13	0,358

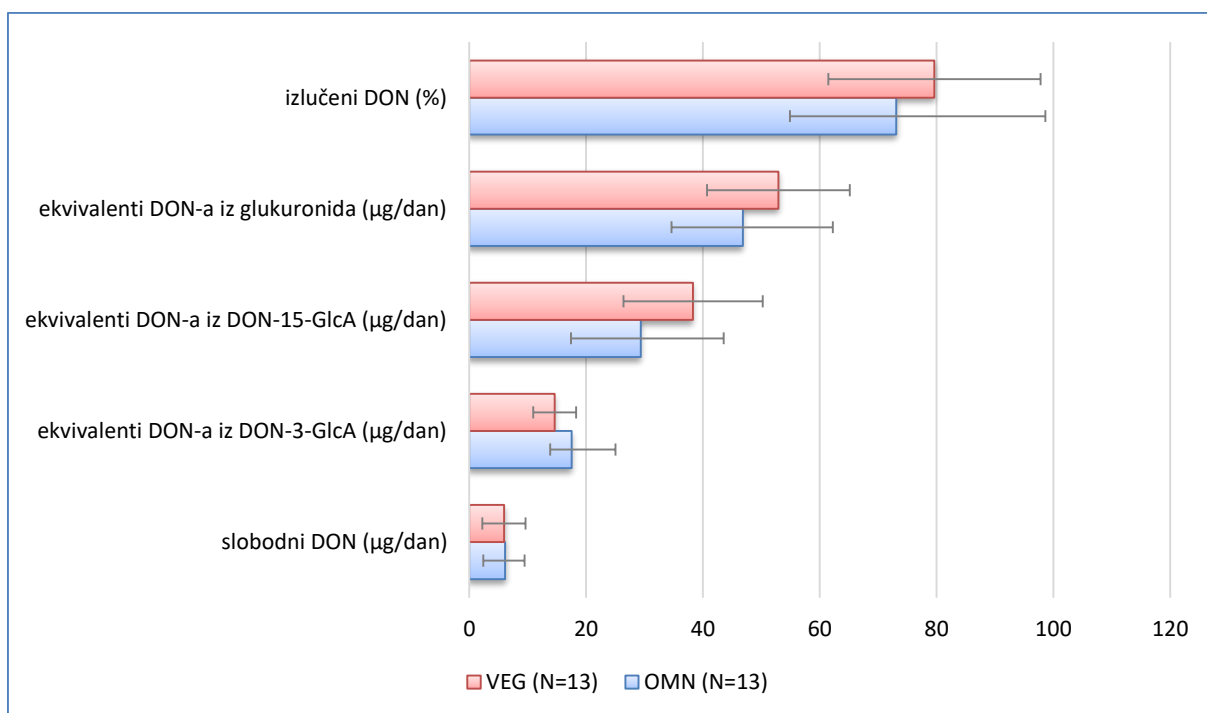
U **Tablici 27** prikazan je utjecaj unosa nutrijenata na izlučivanje DON-a i udjele DON-a i metabolita za treći dan intervensijske prehrane. S obzirom na činjenicu da je intervensijska prehrana podrazumijevala unos najvećeg dijela kalorija namirnicama s poznatom koncentracijom DON-a, unos drugih namirnica je bio reduciran. Ovo je najvjerojatniji razlog zašto su nestale korelacije utvrđene između unosa nutrijenata i razina DON-a i metabolita u urinu (µg/g kreatinina) za prva dva dana pripremnog perioda. Indukcija enzima i transportnih proteina izazvana fitokemikalijama tijekom prva dva dana ispitivanja je odredila razinu njihove aktivnosti i tijekom trećeg dana.

Namirnice koje nisu bile izvor DON-a su imale minimalni modulatorni utjecaj na metabolizam i izlučivanje ovog toksina tijekom trećeg dana, te je u daljnjim statističkim analizama korišten skupni unos nutrijenata za sva tri dana istraživanja.

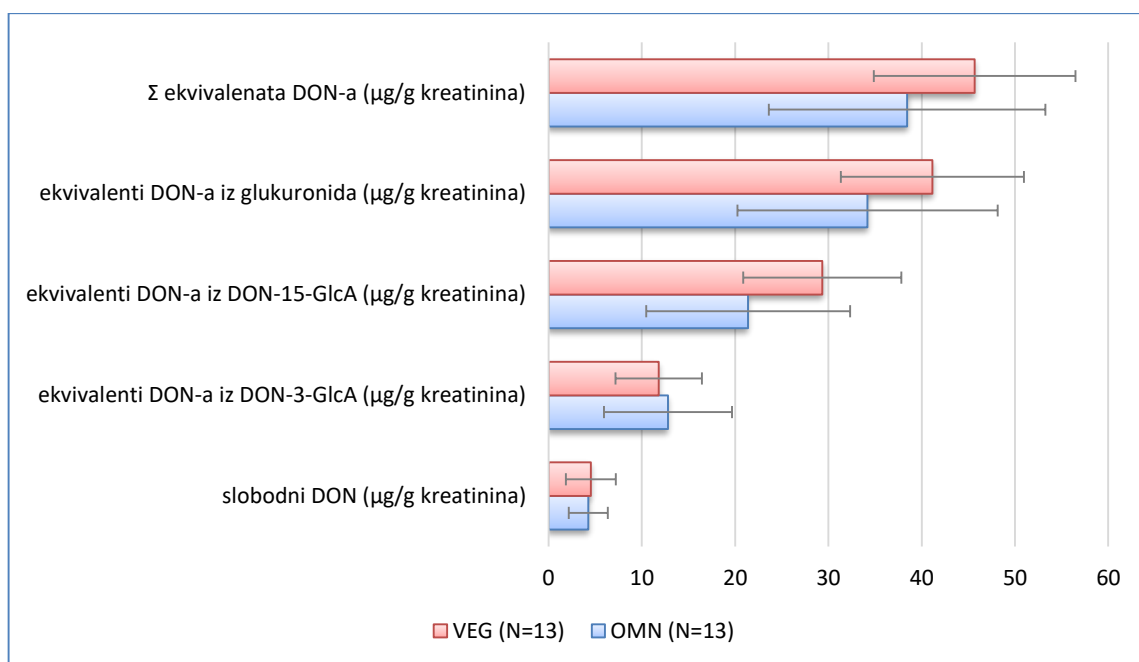
4.2.3. Uparivanje OMN i VEG ispitanika

Usporedba postotka izlučivanja DON-a između različitih podskupina pokazala je da postoji statistički značajna razlika između podskupina OMN i VEG, te je u ovom koraku napravljena usporedba samo između te dvije podskupine uparivanjem ispitanika. Podskupine uOMN i uVEG su usklađene prema udjelu spolova, BMI-ju, dobi i pušenju, tako da je na osnovi navedenih parametara svaki ispitanik u podskupini uVEG dobio svoj par iz podskupine uOMN, dok su ostali ispitanici isključeni iz daljnje obrade. Na taj način se pokušao izbjeći učinak neravnomjernog udjela pušača, spolova, BMI-ja i dobi na usporedbu utjecaja ova dva tipa prehrane na metabolizam DON-a.

U podskupini uOMN prosječna dob bila je $30,3 \pm 5,2$ godine, BMI $22,6 \pm 4,8$, a mjesečna primanja bila su $5519 \pm 3160,8$ HRK, dok je u podskupini uVEG prosječna dob bila $30,5 \pm 4,6$ godina, BMI $22,1 \pm 1,3$, a mjesečna primanja $3292 \pm 1394,3$ HRK. Razlike su bile značajne samo u slučaju primanja, pri čemu je prosjek bio značajno viši u uOMN skupini ($p = 0,031$).



Slika 23 Ukupno izlučeni DON i metaboliti u urinu uVEG i uOMN ispitanika tijekom 24 sata ($\mu\text{g}/\text{dan} \pm \text{SD}$)

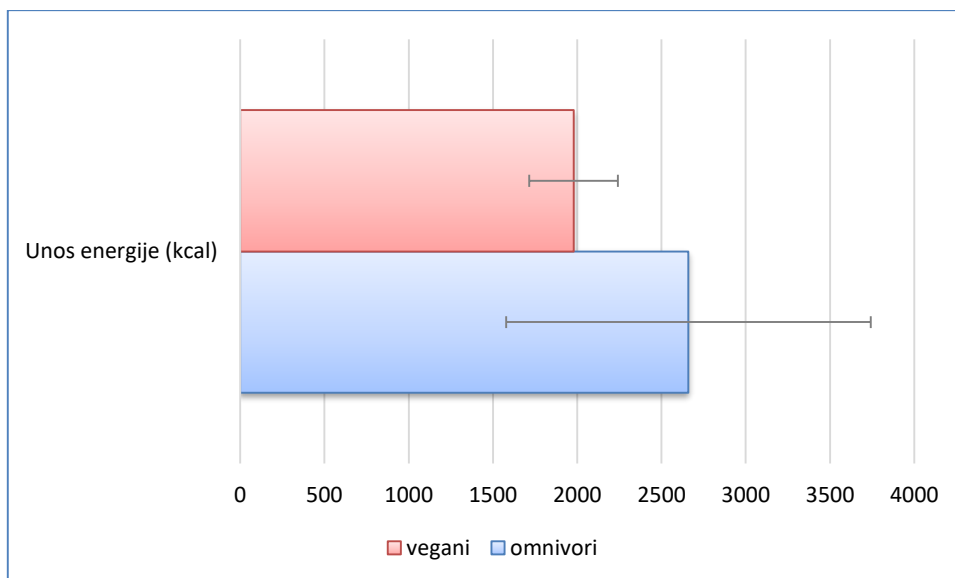


Slika 24 Udjeli DON-a i metabolita u urinu uVEG i uOMN ispitanika izraženi na gram kreatinina ($\mu\text{g/g}$ kreatinina \pm SD)

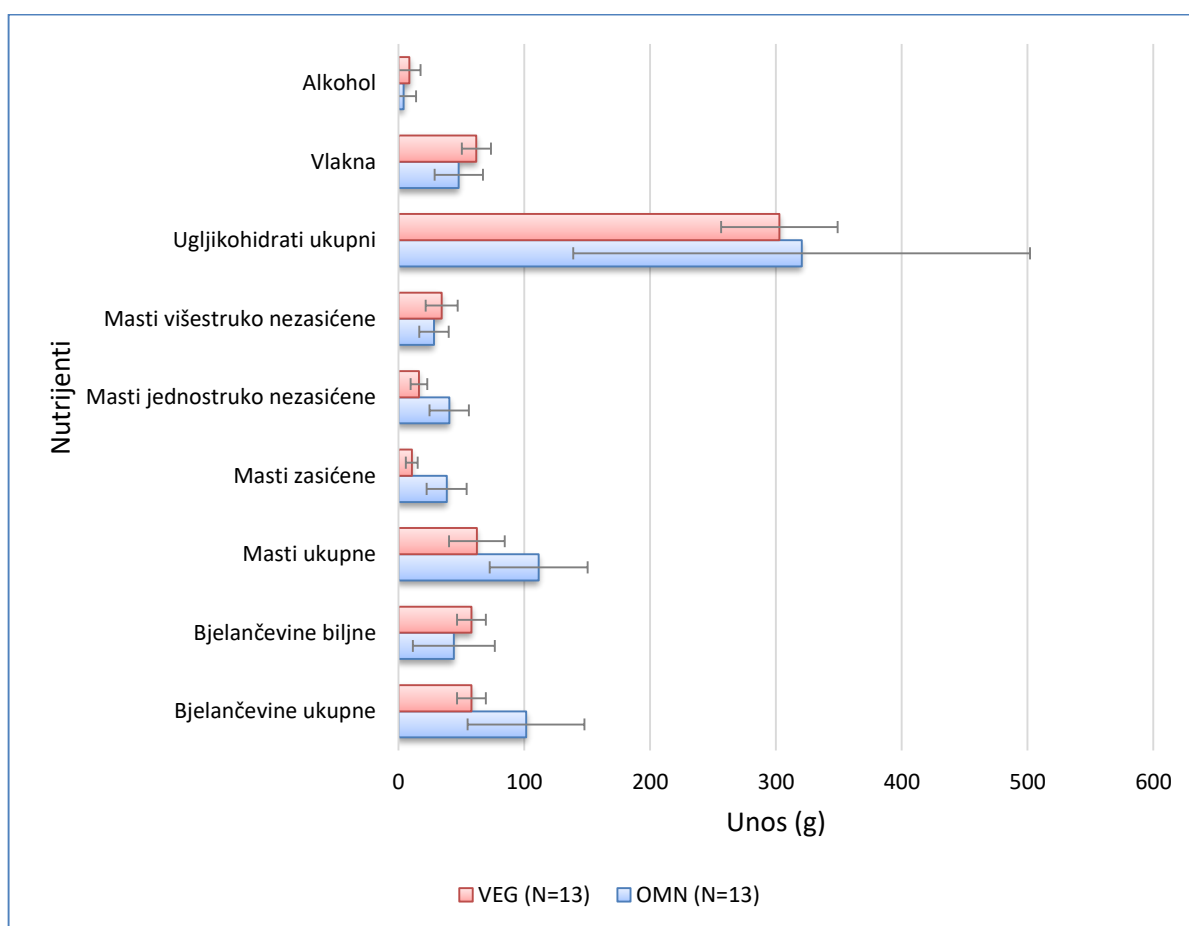
Slike 23 i 24 prikazuju rezultate ispitivanja utjecaja tipa prehrane na metabolizam DON-a te na ukupnu količinu DON-a izlučenu urinom. Rezultati su prikazani kao udjeli DON-a i metabolita na dan (**Slika 23**), te udjeli DON-a i metabolita na gram kreatinina (**Slika 24**).

Izražavanjem količine urinarnog DON-a i metabolita po danu (**Slika 23**) utvrđen je statistički značajan utjecaj VEG tipa prehrane na povećanje udjela DON-15-GlcA u odnosu na uOMN ($p = 0,040$).

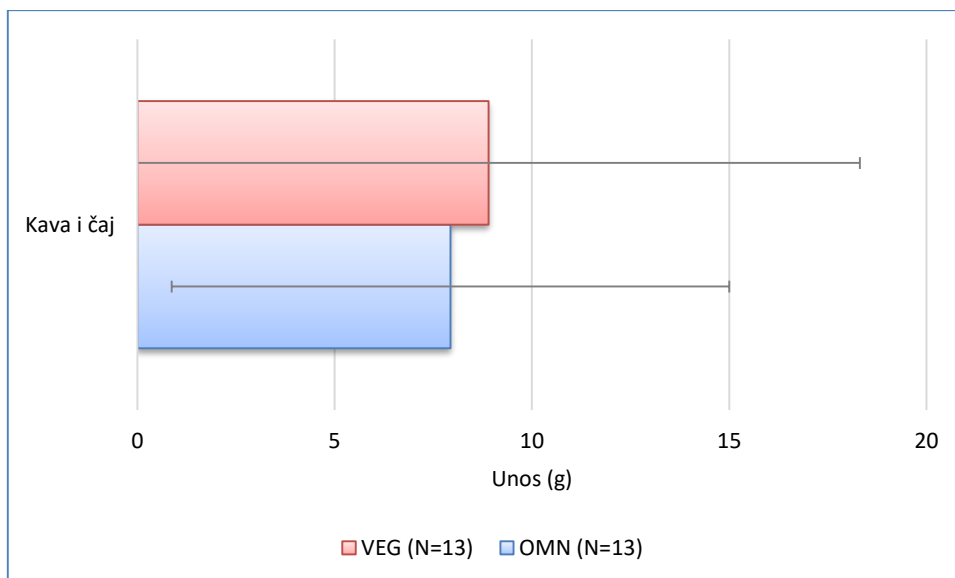
Korekcijom rezultata za DON i metabolite u urinu prema sadržaju kreatinina (**Slika 24**), ponovno je utvrđen značajno veći udio DON-15-GlcA u urinu uVEG u odnosu na uOMN ($p = 0,040$). VEG podskupina je imala i veći prosjek sume ekvivalenata u urinu u odnosu na uOMN ($p = 0,151$) a što govori u prilog utjecaju prehrambenih navika i upućuje na poticanje glukuronidacije na 15. C atomu DON-a.



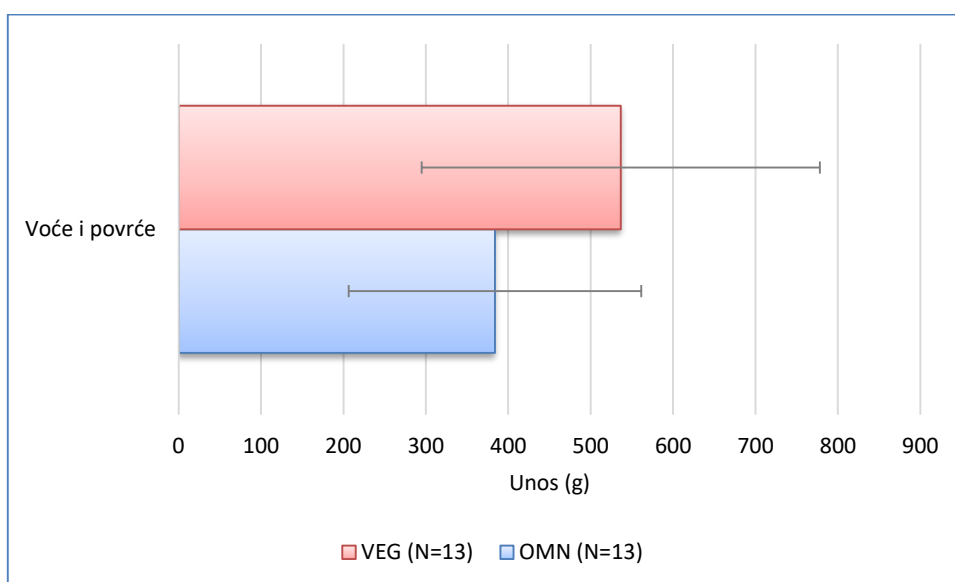
Slika 25 Prosječan unos energije tijekom tri dana ispitivanja kod uOMN i uVEG podskupina



Slika 26 Unos pojedinih nutrijenata uOMN i uVEG ispitanika tijekom tri dana ispitivanja ($g \pm SD$)



Slika 27 Prosječan unos kave i čaja uOMN i uVEG za sva tri dana istraživanja (g ± SD)



Slika 28 Prosječan unos voća i povrća uOMN i uVEG za sva tri dana istraživanja (g ± SD)

Slikama 25, 26, 27 i 28 prikazan je prosječan unos energije, nutrijenata, kave i čaja te voća i povrća OMN i VEG skupina tijekom sva tri dana istraživanja. Utvrđena je značajna razlika ($p = 0,014$) u prosječnom unosu energije za sva tri dana ispitivanja između uOMN i uVEG skupina (**Slika 25**). Za većinu nutrijenata dobiveni su slični rezultati kao u prvom dijelu istraživanja prije uparivanja OMN i VEG (**Slika 26**). OMN su imali viši unos ukupnih bjelančevina ($p = 0,001$), ukupnih masti ($p = 0,001$), zasićenih masti ($p = 0,0003$) i jednostruko nezasićenih masti ($p = 0,0005$). Razlika u unosu višestruko nezasićenih masti i alkohola ponovno nije bila statistički

značajna. I nakon uparivanja, VEG su unosili više biljnih bjelančevina ($p = 0,004$) i vlakana ($p = 0,014$). Jedino odstupanje utvrđeno je za unos ukupnih ugljikohidrata koje su svi VEG unosili značajno više od uOMN tijekom prva dva dana, dok usporedba uparenih skupina za sva tri dana nije ustanovila značajnu razliku. Ni ovaj put nisu utvrđene razlike u unosu kave i čaja (**Slika 27**), dok je utvrđen veći unos voća i povrća (**Slika 28**) uVEG skupine, ali razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,065$).

Kako je već komentirano u poglavlju 4.2.2., prehrana tijekom pripremnog i intervencijskog perioda je naglasila razlike koje i inače postoje između OMN i VEG tipa prehrane. Stoga je valjano pozivanje na slične rezultate usporedbe VEG i OMN tipa prehrane drugih istraživača poput spomenute studije Clarysa i sur. (2014). Larsson i Johansson (2002) su također određivali prehrambeni unos uVEG i uOMN. U istraživanju je sudjelovalo 30 VEG i 30 OMN koji su upareni prema spolu i dobi. VEG su imali niži unos proteina i zasićenih masti, a veći unos ugljikohidrata, višestruko nezasićenih masti i vlakana od uOMN. Ustanovili su i veći unos povrća i mahunarki kod VEG, što je u skladu s rezultatima prezentiranim ovdje (mahunarke su računane kao povrće).

Tablica 28 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica u podskupinama uOMN i uVEG s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu izraženim na kreatinin

	N	Spearman R	p-vrijednost
ENERGIJA (kcal)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,21	0,303
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,23	0,250
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,44	0,024
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,26	0,208
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,24	0,237
BJELANČEVINE (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,24	0,247
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,29	0,157
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,55	0,004
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,33	0,101
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,30	0,135
BJELANČEVINE BILJNE (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,16	0,426
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,11	0,584
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,08	0,696
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,17	0,399
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,17	0,410
MASTI (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,15	0,456
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,21	0,295
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,49	0,011
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,32	0,112
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,29	0,147
MASTI ZASIĆENE (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,03	0,883
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,20	0,336
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,44	0,023
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,28	0,160
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,25	0,226
MASTI JEDNOSTRUKO NEZASIĆENE (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,19	0,350
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,14	0,498
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,52	0,006
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,37	0,064
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,35	0,084

Tablica 28 Povezanost unosa energije, nutrijenata i namirnica u podskupinama uOMN i uVEG s pokazateljima izlučivanja DON-a u urinu izraženim na kreatinin - nastavak

	N	Spearman R	p-vrijednost
MASTI VIŠESTRUKO NEZASIĆENE (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,22	0,287
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,28	0,159
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,02	0,922
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,13	0,519
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,12	0,562
UGLJIKOHIDRATI (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,13	0,517
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,06	0,759
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,12	0,559
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,12	0,571
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,10	0,633
VLAKNA (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	0,04	0,836
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,08	0,709
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,20	0,331
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,27	0,175
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,28	0,166
ALKOHOL (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,33	0,101
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,17	0,399
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,02	0,908
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,10	0,623
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,08	0,694
KAVA I ČAJ (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	-0,50	0,010
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,33	0,099
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,35	0,077
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,22	0,272
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,28	0,173
VOĆE I POVRĆE (g)			
DON ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)	26	0,46	0,017
ekvivalenti DON-a iz DON-3-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		-0,12	0,557
ekvivalenti DON-a iz DON-15-GlcA ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,51	0,008
ekvivalenti DON-a iz glukuronida ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,37	0,060
Σ ekvivalenata DON-a ($\mu\text{g/g}$ kreatinina)		0,39	0,048

*Crveno označene vrijednosti su značajne pri $p < 0,05$

Utjecaj promatranih nutritivnih karakteristika OMN i VEG na izlučivanje DON-a i metabolita izraženih na g kreatinina za sva tri dana istraživanja prikazan je u **Tablici 28**. Koeficijenti korelacije ukazuju na postojanje umjerene negativne veze između razine urinarnog DON-15-GlcA i dnevnog unosa energije, ukupnih bjelančevina, ukupnih masti, zasićenih masti, te jednostruko nezasićenih masti. OMN ispitanici su imali znatno veće unose svih promatranih nutritivnih karakteristika te je vjerojatnija interpretacija po kojoj ova korelacija ne otkriva učinak samog nutrijenta na metabolizam i izlučivanje, nego općenite navike u prehrani. S druge strane, unos voća i povrća bio je u pozitivnoj vezi s izlučivanjem ovog glukuronida, kao i slobodnog DON-a te sume ekvivalenata DON-a. Nije ustanovljena povezanost unosa biljnih bjelančevina, višestruko nezasićenih masti, ugljikohidrata, vlakana i alkohola s bilo kojim od promatranih parametara. Suprotno rezultatima Kalthoffa i sur. (2010), konzumacija kave i čaja bila je u umjerenom negativnoj vezi s razinama nepromijenjenog DON-a u urinu. Ovakav rezultat bi mogao ukazivati na inhibiciju glukuronidacije i/ili indukciju intestinalnih transportnih proteina sastojcima kave i čaja (Jeon i sur., 2011).

Prikazani rezultati (**Tablica 28**) potvrđuju vezu većeg unosa voća i povrća u sklopu VEG tipa prehrane s pojačanim izlučivanjem sume ekvivalenata DON-a i glavnog glukuronidnog metabolita, DON-15-GlcA. Kako je već prethodno napomenuto, ovo se može pripisati istovremenom povećanom unosu fitokemikalija i njihovom modulacijskom učinku na metabolizam toksikanata općenito (Gopalakrishnan i Kong, 2008; Harris i sur., 2003), a time i DON-a. S obzirom na uočenu korelaciju indikatora izlučivanja DON-a s unosom kave i čaja kod OMN i VEG, postoji potreba dodatnih istraživanja učinka njihovih sastojaka na ove procese.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Procjena izloženosti populacije RH DON-u i derivatima

- Prilikom određivanja koncentracije DON-a i derivata u namirnicama, DON je detektiran u skoro svim analiziranim uzorcima (71/81; 88%), 3-Ac-DON je sadržavao mjerljive koncentracije samo u jednom uzorku zobnih pahuljica, dok 15-Ac-DON nije detektiran ni u jednom uzorku. D3G je izmjeren u koncentracijama iznad LOQ-a u 38% uzoraka, a srednja koncentracija je iznosila 1,5 µg/kg. Prosječni doprinos D3G-a ukupnoj količini DON-a u uzorcima je bio 1,7%. Najviši udio (19%) je zabilježen u uzorku pločica od žitarica;
- Ukupna izloženost populacije DON-u putem proizvoda na bazi žitarica pri LB odnosno UB vrijednostima bila je znatno niža od utvrđenog grupnog TDI-ja za DON i derivate. Od ukupnog broja konzumenata, njih 24 (1,2%) je bilo izloženo koncentraciji DON-a i derivata višoj od utvrđenog grupnog TDI-ja, iako nijedan analizirani proizvod nije premašio propisanu MDK vrijednost za DON;

2. Studija izlučivanja DON-a i glukuronidnih metabolita na ispitanicima

- Analiza urina ispitanika detektirala je DON-15-GlcA u svim uzorcima te je ovaj metabolit imao i najveću prosječnu koncentraciju, za razliku od nepromijenjenog mikotoksina ili DON-3-GlcA koji su detektirani u 86% odnosno 4% uzoraka. Time je glukuronidacija na 15. C atomu DON-a potvrđena kao glavni put metabolizma ovog mikotoksina u organizmu. Utvrđena stopa izlučivanja DON-a je bila 75%, a stopa konjugacije s glukuronskom kiselinom bila je 89%;
- Pušenje ima utjecaj na izlučivanje DON-a samo u podskupini VEG gdje nepušači imaju značajno veće izlučivanje DON-a u obliku 15-glukuronida kao i sume ekvivalenata DON-a. Korelacijom sa spolom je utvrđeno da se kod žena izlučuje više DON-a u obliku DON-3-GlcA. Korelacije između DON-a i metabolita u urinu s dobi, BMI-jem, edukacijom i primanjima ispitanika također nisu bile značajne, iako rezultati ukazuju na tendenciju pojačane glukuronidacije na 15. C atomu DON-a uz viši BMI;
- Ispitanici s VEG tipom prehrane izlučivali su značajno više DON-15-GlcA u urinu tijekom 24 sata i uz korekciju prema sadržaju kreatinina u urinu u odnosu na OMN. Ovaj učinak se može pripisati ustanovljenoj 30% većoj konzumaciji voća i povrća

bogatih fitokemikalijama koje potiču detoksikacijske sustave organizma, poput transkripcijskog faktora Nrf2;

- Isključivanje žitarica iz prehrane tijekom pripremnog perioda je dovelo do kompenzacije drugim namirnicama poput voća te škrobnog i neškrobnog povrća, naročito krumpirom i mahunarkama kod VEG, te namirnicama životinjskog podrijetla kod OMN. Unosi energije, ukupnih bjelančevina, bjelančevina životinjskog porijekla, ukupnih masti, zasićenih masti i jednostruko nezasićenih masti, koji su bili značajno veći kod OMN, bili su u negativnoj korelaciji s izlučivanjem DON-a, dok su veći unosi ugljikohidrata, vlakana, voća i povrća kod VEG bili u pozitivnoj korelaciji. Rezultati potvrđuju poticanje glukuronidacije i ukupnog izlučivanja DON-a biljnom prehranom, dok obrnuto vrijedi za OMN tip prehrane;
- Uparivanjem OMN i VEG ispitanika potvrđena je značajno veća koncentracija DON-15-GlcA u urinu VEG;
- Povećani unos kalorija i nutrijenata kod OMN tipa prehrane (ukupne bjelančevine, ukupne masti, zasićene masti i jednostruko nezasićene masti) smanjuju izlučivanje DON-a u obliku DON-15-GlcA, dok povećan unos voća i povrća povećava izlučivanje slobodnog DON-a, DON-15-GlcA i ukupno izlučenog DON-a.
- Rezultati ukazuju na redukciju rizika od mikotoksina uz biljnu prehranu bogatu fitokemikalijama. Primjerice, vegetarijanci su obično izloženiji ovom mikotoksinu, ali dovoljan simultani unos voća i povrća može umanjiti zadržavanje u tijelu i potencijal štete. S druge strane, tipična zapadnjačka prehrana bi mogla povećavati rizik vezan uz izloženost deoksinivalenolu.

6. LITERATURA

- Ali N, Blaszkevicz M, Degen GH: Assessment of deoxynivalenol exposure among Bangladeshi and German adults by a biomarker-based approach. *Toxicology Letters* 258:20-28, 2016.
- Aniołowska M, Steininger M: Determination of trichothecenes and zearalenone in different corn (*Zea mays*) cultivars for human consumption in Poland. *Journal of Food Composition and Analysis* 33:14-19, 2014.
- Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL: Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environmental Health Perspectives* 13:192-200, 2005.
- Berthiller F, Krska R, Domig KJ, Kneifel W, Juge N, Schuhmacher R, Adam G: Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicology Letters* 206:264-267, 2011.
- Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research* 27:165-186, 2013.
- Bertuzzi T, Rastelli S, Mulazzi A, Donadini G, Pietri A: Mycotoxins occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control* 22:2059-2064, 2011.
- Boutigny AL, Richard-Forget F, Barreau C: Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121:411-423, 2008.
- Brera C, de Santis B, Debegnach F, Miano B, Moretti G, Lanzone A, Del Sordo G, Buonsenso D, Chiaretti A, Hardie L, White K, Brantsæter AL, Knutsen H, Eriksen GS, Sandvik M, Wells L, Allen S, Sathyapalan T: Experimental study of deoxynivalenol biomarkers in urine. *EFSA supporting publication* 2015:EN-818, 2015.
- Brill MJE, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker JN, Knibbe CAJ: Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clinical Pharmacokinetics* 51:277-304, 2012.
- Cano-Sancho G, Valle-Algarra FM, Jiménez M, Burdaspal P, Legarda TM, Ramos AJ, Sanchis V, Marin S: Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control* 22:490-495, 2011.
- Castillo MA, Montes R, Navarro A, Segarra R, Cuesta G, Hernández E: Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:423-427, 2008.
- Clarys P, Deliens T, Huybrechts I, Deriemaeker P, Vanaelst B, De Keyzer W, Hebbelinck M, Mullie P: Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. *Nutrients* 6:1318-1332, 2014.
- Court MH: Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system. *Drug Metabolism Reviews* 42:209-224, 2010.

- Ćosić J, Vrandečić K, Svitlica B: *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda* 10, 1; 5-8, 2004.
- Ćosić J, Drezner G, Vrandečić K, Španić V, Poštić J: Effect of *Fusarium culmorum* head blight on yield and DON accumulation. *Cereal Research Communications* 36, Suppl.B; 481-482, 2008a.
- Ćosić J, Jajić I, Vrandečić K, Jurković D, Poštić J: *Fusarium graminearum* Schw. – pathogenicity to wheat seedlings and ears and ability to produce DON. *Cereal Research Communications* 36, Suppl.B; 483-484, 2008b.
- De Boevre M, Jacxsens L, Lachat C, Eeckhout M, Di Mavungu JD, Audenaert K, Maene P, Haesaert G, Kolsteren P, De Meulenaer B, De Saeger S: Human exposure to mycotoxins and their masked forms through cereal-based foods in Belgium. *Toxicology Letters* 218:281-292, 2013.
- De Irala-Estévez J, Groth M, Johansson L, Oltersdorf U, Prättälä R, Martínez-González MA: A systematic review of socio-economic differences in food habits in Europe: consumption of fruit and vegetables. *European Journal of Clinical Nutrition* 54:706-714, 2000.
- Dos Santos JS, Souza TM, Ono EYS, Hashimoto EH, Bassoi MC De Miranda MZ, Itano EN, Kawamura O, Hirooka EY: Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. *Food Chemistry* 138:90-95, 2013.
- Dubowitz T, Heron M, Bird CE, Lurie N, Finch BK, Basurto-Dávila R, Hale L, Escarce JJ: Neighborhood socioeconomic status and fruit and vegetable intake among whites, blacks, and Mexican Americans in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 87:1883–1891, 2008.
- EFSA, European Food Safety Authority: General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA Journal* 7(12):1435, 2009.
- EFSA, European Food Safety Authority: Deoxynivalenol in food and Feed: occurrence and exposure. *EFSA Journal* 11(10):3379, 2013.a
- EFSA, European Food Safety Authority: Statement on the risks for public health related to a possible increase of the maximum level of deoxynivalenol for certain semi-processed cereal products. *EFSA Journal* 11(12):3490, 2013.b
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific Opinion on the risk for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal* 12(12):3916, 2014.
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of deoxynivalenol, metabolites of deoxynivalenol and masked deoxynivalenol in food and feed. *EFSA Journal* 15(9):4718, 2017.

- EK, Europska komisija: *Uredba komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani*. Službeni list Europske unije, 2006.
- Fung F, Clark RF: Health effects of mycotoxins: A toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 42:217-234, 2004.
- Galaverna G, Dall'Asta C, Mangia M, Dossena A, Marchelli R: Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech Journal of Food Sciences* 29:S89-S92, 2009.
- Gonzales-Osnaya L, Cortés C, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J: Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food Chemistry* 124:156-161, 2011.
- Gopalakrishnan A, Kong AT: Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: Cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- κ B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 46:1257–1270, 2008.
- Harris RZ, Jang GR, Tsunoda S: Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clinical Pharmacokinetics* 42:1071-1088, 2003.
- Heyndrickx E, Sioen I, Huybrechts B, Callebaut A, De Henauw S, De Saeger S: Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environment International* 84:82–89, 2015.
- Hrvatski sabor: *Zakon o kontaminantima*. Narodne novine 39/13, 2013.
- International Agency for Research on Cancer (IARC): *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Vol. 56. Some naturally-occurring substances: Some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC, 1993.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety: *Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food*. Environmental Health Criteria 240. FAO i WHO, 2009.
- Jeon TI, Seo YK, Osborne TF: Gut bitter taste receptor signalling induces ABCB1 through a mechanism involving CCK. *Biochemical Journal* 438:33-37, 2011.
- Ji F, Xu J, Liu X, Yin X, Shi J: Natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Jiangsu province, China. *Food Chemistry* 157:393-397, 2014.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report*. WHO Technical Report Series 906. FAO i WHO, 2001.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report*. WHO Technical Report Series 959. FAO i WHO, 2011.
- Jurišić N, Schwartz-Zimmermann HE, Kunz-Vekiru E, Reisinger N, Klein S, Caldwell D, Fruhmann P, Schatzmayr D, Berthiller F: Deoxynivalenol-3-sulphate is the major metabolite of dietary deoxynivalenol in eggs of laying hens. *World Mycotoxin Journal* in press <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2429>, 2019.

- Kaić-Rak A, Antonić K: Tablice o sastavu namirnica i pića. Zavod za zaštitu zdravlja Hrvatske, Zagreb, 1990.
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP: Coffee induces expression of glucuronosyltransferases by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. *Gastroenterology* 139:1699-1710, 2010.
- Kanižai Šarić G, Milaković Z, Krstanović V: Toksičnost *Fusarium* toksina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 6:112-116, 2011.
- Klapec T, Šarkanj B, Banjari I, Strelec I: Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food and Chemical Toxicology* 50:4487–4492, 2012.
- Kovač M, Šubarić D, Bulaić M, Kovač T, Šarkanj B: Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69:196-214, 2018.
- Krajka-Kuźniak V, Krysztofiak A, Paluszczak J: Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1A by naturally occurring phytochemicals in human hepatoma cells. *Journal of Medical Science* 3:209-214, 2014.
- Kroon LA: Drug interactions and smoking: Raising awareness for acute and critical care providers. *Critical Care Nursing Clinics of North America* 18:53–62, 2006.
- Kushiro M: Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 9:2127-2145, 2008.
- Kuzdraliński A, Solarska E, Muszyńska M: Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control* 29:22-24, 2013.
- Larsson CL, Johansson GK: Dietary intake and nutritional status of young vegans and omnivores in Sweden. *American Journal of Clinical Nutrition* 76:100–106, 2002.
- Lépine J, Bernard O, Plante M, Têtu B, Pelletier G, Labrie F, Bélanger A, Guillemette C: Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphosphoglucuronosyltransferases expressed in endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89:5222–5232, 2004.
- Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R: Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A* 1362:145-156, 2014.
- Maresca M: From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* 5:784-820, 2013.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V: Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60:218-238, 2013.

- Martins HM, Almeida I, Marques MF, Guerra MM: Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 46:2585-2587, 2008.
- Maul R, Warth B, Schebb NH, Krska R, Koch M, Sulyok M: *In vitro* glucuronidation kinetics of deoxynivalenol by human and animal microsomes and recombinant human UGT enzymes. *Archives Of Toxicology* 89:949–960, 2015.
- McCormic SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ: Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3:802-801, 2011.
- Mehta V: Vegetarian diet: A boon or bane for health? *Journal Of Medical Research And Innovation*, 2(1), 2017.
- Meky FA, Turner PC, Ashcroft AE, Miller JD, Qiao YL, Roth MJ, Wild CP: Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology* 41:265-273, 2003.
- Miners JO, Mackenzie PI: Drug glucuronidation in humans. *Pharmacology & Therapeutics* 51:347-369, 1991.
- Mishra S, Ansari KM, Dwivedi PD, Pandey HP, Das M: Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. *Food Control* 30:549-555, 2013.
- Miyauchi E, Tachikawa M, Declèves X, Uchida Y, Bouillot JL, Poitou C, Oppert JM, Mouly S, Bergmann JF, Terasaki T, Scherrmann JM, Lloret-Linares C: Quantitative atlas of cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase, and transporter proteins in jejunum of morbidly obese subjects. *Molecular Pharmaceutics* 13:2631–2640, 2016.
- Montes R, Segarra R, Castillo MA: Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. *Journal of Food Composition and Analysis* 27:38-44, 2012.
- Nielsen JKS, Vikström AC, Turner P, Knudsen LE: Deoxynivalenol transport across the human placental barrier. *Food and Chemical Toxicology* 49:2046-2052, 2011.
- Njumbe Ediage E, Di Mavungu JD, Song S, Wu A, Van Peteghem C, De Saeger S: A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 741:58-69, 2012.
- Ok HE, Kim HJ, Cho TY, Oh KS, Chun KS: Determination of deoxynivalenol in cereal-based foods and estimation of dietary exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 72:1424–1430, 2009.
- Omurtag GZ, Beyoğlu D: Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. *Food Control* 18:163-166, 2007.
- Peršič N, Pleadin J, Vulić A, Zadavec M, Mitak M: Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica* 42:335-345, 2011.
- Petska JJ, Clark ES, Schwartz-Zimmermann HE, Berthiller F: Sex is a determinant for deoxynivalenol metabolism and elimination in the mouse. *Toxins* 9:240, 2017.

- Pieters MN, Bakker M, Slob W: Reduced intake of deoxynivalenol in The Netherlands: a risk assessment update. *Toxicology Letters* 153:145-153, 2004.
- Raad F, Nasreddine L, Hilan C, Bartosik M, Parent-Massin D: Dietary exposure to aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol from a total diet study in an adult urban Lebanese population. *Food and Chemical Toxicology* 73:35-43, 2014.
- Rodríguez-Carrasco Y, Ruiz MJ, Font G, Berrada H: Exposure estimates to *Fusarium* mycotoxins through cereals intake. *Chemosphere* 93:2297-2303, 2013.
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N: Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including „masked“ mycotoxins. *Mycotoxin Research* 30:197-205, 2014.
- Schwartz GG: Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Cause Control* 13:91-100, 2002.
- Schwartz-Zimmermann HE, Fruhmann P, Dänicke S, Wiesenberger G, Čaha S, Weber J, Berthiller F: Metabolism of deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in broiler chickens, pullets, roosters and turkeys. *Toxins* 12:4706-4729, 2015.
- Senta A, Pucarín-Cvetković J, Doko Jelinić J: *Kvantitativni modeli namirnica i obroka*. Medicinska naklada, 2004.
- Serrano AB, Font G, Ruiz MJ, Ferrer E: Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry* 135:423-429, 2012.
- Simsek S, Burgess K, Wjitney KL, Gu Y, Qian SY: Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. *Food Control* 26:287-292, 2012.
- Sirot V, Fremy JM, Leblanc JC: Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology* 52:1-11, 2013.
- Sudakin DL: Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143:97-107, 2003.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu, 2010.
- Šarkanj B, Warth B, Uhlig S, Abia WA, Sulyok M, Klapac T, Krska R, Banjari I: Urinary analysis reveals high deoxynivalenol exposure in pregnant women from Croatia. *Food and Chemical Toxicology* 62:231-237, 2013.
- Šarkanj B, Ezekiel CN, Turner PC, Abia AW, Rychlik M, Krska R, Sulyok M, Warth B: Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Analytica Chimica Acta* 1019:84-92, 2018.
- Škrbić B, Živančev J, Đurišić-Mladenović N, Godula M: Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. *Food Control* 25:389-396, 2012.

- Thanner S, Czeglédi L, Schwartz-Zimmermann HE, Berthiller F, Gutzwiller A: Urinary deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) as biomarkers of DON and ZEA exposure of pigs. *Mycotoxin research* 32:69-75, 2016.
- Turner PC, Burley VJ, Rothwell JA, White KLM, Cade JE, Wild CP: Dietary wheat reduction decreases the level of urinary deoxynivalenol in UK adults. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 18:392-399, 2008.a
- Turner PC, Rothwell JA, White KLM, Gong YY, Cade JE, Wild CP: Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives* 116:21-25, 2008.b
- Turner PC, Taylor EF, White KLM, Cade JE, Wild CP: A comparison of 24h urinary deoxynivalenol with recent v. average cereal consumption for UK adults. *British Journal of Nutrition* 102:1276-1279, 2009.
- Turner PC, White KLM, Burley VJ, Hopton RP, Rajendram A, Fisher J, Cade JE, Wild CP: A comparison of deoxynivalenol intake and urinary deoxynivalenol in UK adults. *Biomarkers* 15:553-562, 2010.
- Turner PC, Hopton RP, White KLM, Fisher J, Cade JE, Wild CP: Assessment of deoxynivalenol metabolite profiles in UK adults. *Food and Chemical Toxicology* 49:132-135, 2011.
- Vendl O, Crews C, MacDonald S, Krska R, Berthiller F: Occurrence of free and conjugated *Fusarium* mycotoxins in cereal-based food. *Food Additives and Contaminants* 27:1148-1152, 2010.
- Vidal A, Marín S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V: Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology* 53:133-138, 2013.
- Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, Fruhmann P, Hametner C, Adam G, Fröhlich J, Krska R: Direct quantification of deoxynivalenol glucuronide in human urine as biomarker of exposure to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401:195-200, 2011.
- Warth B, Sulyok M, Fruhmann P, Berthiller F, Schuhmacher R, Hametner C, Adam G, Fröhlich J, Krska R: Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method. *Toxicology Letters* 211:85-90, 2012.
- Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, Krska R: New insights into the human metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicology Letters* 220:88-94, 2013.
- Warth B, Fruhmann P, Wiesenberger G, Kluger B, Šarkanj B, Lemmens M, Hametner C, Fröhlich J, Adam G, Krska R, Schumacher R: Deoxynivalenol-sulfates: identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:1033-1039, 2015.

-
- Warth B, Del Favero G, Wiesenberger G, Puntischer H, Woelflingseder L, Fruhmann P, Sarkanj B, Krska R, Schuhmacher R, Adam G, Marko D: Identification of a novel human deoxynivalenol metabolite enhancing proliferation of intestinal and urinary bladder cells. *Scientific Reports* 6:33854, 2016.
- Wells L, Hardie L, Williams C, White K, Liu Y, De Santis B, Debegnach F, Moretti G, Greetham S, Brera C, Papageorgiou M, Thatcher NJ, Rigby A, Atkin SL, Sathyapalan T: Deoxynivalenol biomarkers in the urine of UK vegetarians. *Toxins* 9:196, 2017.
- Woelflingseder L, Warth B, Vierheilig I, Schwartz-Zimmermann H, Hametner C, Nagl V, Novak B, Šarkanj B, Berthiller F, Adam G, Marko D: The *Fusarium* metabolite culmorin suppresses the in vitro glucuronidation of deoxynivalenol. *Archives of Toxicology* in press (<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02459-w>) 2019.
- Wu X, Murphy P, Cunnick J, Hendrich S: Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology* 45:1846-1855, 2007.

7. PRILOZI

Prilog 1 Anketni listić za ispitanike

Prezime i ime						
Dob						
Visina						
Težina						
BMI						
Mjesto stanovanja						
Tip prehrane	Svejed	<input type="checkbox"/>	Vegetarijanac	<input type="checkbox"/>	Vegan	<input type="checkbox"/>
Pušenje	Da			Ne		
	Trajanje navike u godinama:			Cigareta dnevno:		
Stupanj obrazovanja						
Primanja po članu kućanstva						
<i>Napomene</i>						

Prilog 2 Primjer uputa o provedbi istraživanja

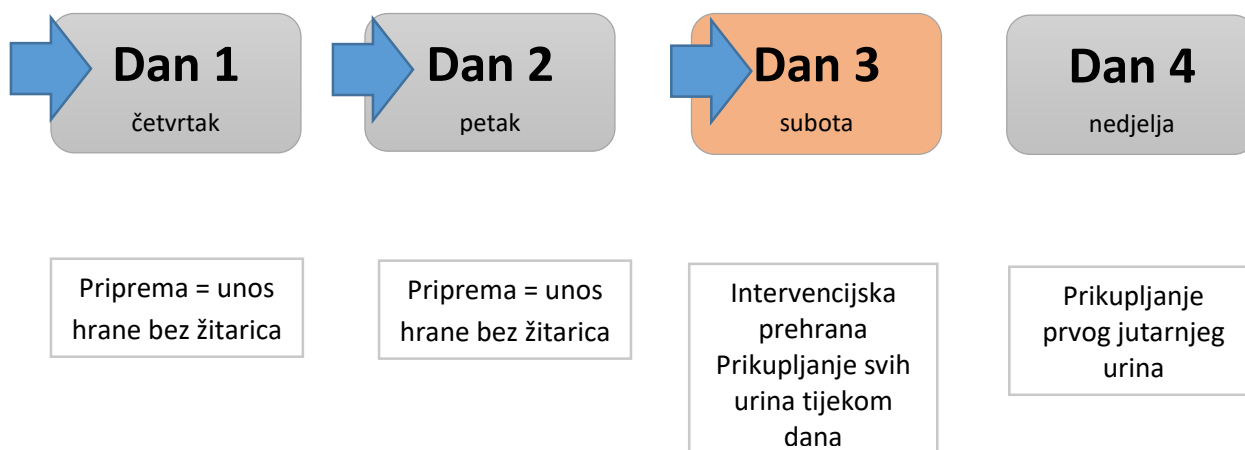
Poštovani ispitanici,

Vaša šifra u istraživanju pod nazivom *Sudbina deoksinivalenola u ljudskom tijelu* je **HAH_XX**. U nastavku su dane detaljne upute za provedbu istraživanja u kojem sudjelujete. Molimo da ih pažljivo pročitate i oko svih nedoumica kontaktirate Vašeg koordinatora čiji kontakt podaci su navedeni dolje. Još jednom zahvaljujemo na vremenu i trudu kojeg ćete uložiti.

VAŠ KOORDINATOR

Ime i prezime koordinatora: broj telefona

Vaše aktivnosti tijekom četiri dana istraživanja mogu se slikovito prikazati sljedećom ilustracijom:

**PREHRANA**

Prvi i drugi dan su priprema za intervencijsku prehranu te biste trebali potpuno isključiti unos svih namirnica i hrane koja u sastavu ima žitarice i soju. Ovo podrazumijeva:

- **zrno, mekinje (posije), klice i proklijalo zrno** sljedećih vrsta: **pšenica, ječam, kukuruz, riža, zob, heljda, raž, sirak (sorgum), proso, triticales, kvinoja (quinoa), pir, purpur pšenica, amarant,**
- proizvode i jela od žitarica: **kruh i ostali pekarski proizvodi (npr. burek, pizza), brašno, griz (krupica), krušne mrvice, bulgur, sejtan, kus-kus, palenta (žganci), tjestenina (lazanje), palačinke, mlinci, žitne pahuljice (i corn flakes), muesliji, keksi, kolači (uključujući kore za savijače i lisnato tijesto), grickalice, tortilla i čips s brašnom od žita, kokice, Čokolino, pudinzi, zobeno ili rižino mlijeko, i sl.,**
- namirnice i jela u kojima su proizvodi od žita jedan od sastojaka:

jela sa zaprškom, panirana jela, čokolada s keksima, juhe, umaci i druga jela iz vrećice, i sl.

- pivo,
- zrno, prženo zrno, klice i prokljalo zrno **soje**,
- prerađevine i proizvode od soje ili proizvode koji u sastavu imaju soju:

brašno, kruh, pahuljice, sojini proteini (sojini komadići, ljuspice, salame), proteinski izolat, tofu, tempeh, sojin umak, napitci od soje, sojino mlijeko u prahu, pudinzi i sladoledi od soje, i dr.

Možete po želji i bez količinskih ograničenja konzumirati mlijeko i mliječne proizvode, meso, jaja, svo voće i povrće, gljive, orašaste plodove i sva bezalkoholna i alkoholna pića osim piva i napitaka od soje ili žitarica. Ne morate ograničavati konzumaciju masti i ulja, pa niti onih od klica žitarica ili od soje.

Općenito će isključivanje žitarica iz prehrane smanjiti Vaš dnevni unos ugljikohidrata. Ukoliko smatrate da Vam je unos ugljikohidrata nizak, odnosno povećan Vam je osjećaj gladi, predlažemo unos krumpira, batata (slatkog krumpira), bundeve, graha, graška, leće, slanutka i orašastih plodova (npr. oraha, kikirikija, lješnjaka, badema, pistacija), kao dobrih izvora ugljikohidrata a koji neće naškoditi svrsi studije.

Pripremni period počinje u četvrtak nakon što se probudite.

Treći dan uključuje tzv. intervencijsku prehranu te biste trebali konzumirati namirnice koje su Vam dostavljene u vrećicama s oznakom obroka, prema sljedećem vremenskom rasporedu:

DORUČAK – od buđenja do 9 h,

RUČAK – između 13 i 15 h,

VEČERA – između 18 i 20 h.

Manja (do 1 h) odstupanja od rasporeda konzumacije ne predstavljaju problem. Osim intervencijskih namirnica koje trebate konzumirati u cijelosti, možete po želji i bez količinskih ograničenja konzumirati sve namirnice koje su gore navedene.

Molimo Vas također da tijekom prva tri dana bilježite količinu i vrstu sve hrane i pića koju ćete konzumirati pored hrane koja Vam je dostavljena. Dovoljno je navesti vrstu namirnice ili jela i opisati količinu korištenjem standardnih veličina porcije (npr. 1 tanjur pileće juhe, 2 kriške rukom rezanog tvrdog sira, 1 velika jušna žlica (uzvrh) svježeg sira, 1 šalica kave (2,5 dcl), 1 odrezak pilećeg bijelog mesa, 3 mandarine veličine šake, 1 zdjelica zelene salate, ½ zdjelice svježeg ribanog kupusa s ½ rajčice, 1 zdjelica (ili ½ tanjura) krumpir pirea, 2 velike žlice (za salatu) krumpira pečenog u rerni s vrhnjem (12% mm), 2 jaja pečena na oko, cvjetača i brokula

kuhana na lešo: 2 velike žlice za salatu uzvrh ili 2 cvijeta cvjetače i 2 cvijeta brokule (kao 2 srednje grabilice za juhu), itd.).

Obrasce i primjer popunjavanja možete vidjeti u nastavku.

HAH_XX

Dan 1

Obrok	Namirnica/jelo	Količina
Doručak vrijeme		
Međuobrok vrijeme		
Ručak vrijeme		
Međuobrok vrijeme		
Večera vrijeme		
Kasni obrok vrijeme		

HAH_XX

Dan 2

Obrok	Namirnica/jelo	Količina
Doručak vrijeme		
Međuobrok vrijeme		
Ručak vrijeme		
Međuobrok vrijeme		
Večera vrijeme		
Kasni obrok vrijeme		

HAH_XX

Dan 3 (intervencija)

Obrok	Namirnica/jelo	Količina
Doručak vrijeme		
Međuobrok vrijeme		
Ručak vrijeme		
Međuobrok vrijeme		
Večera vrijeme		
Kasni obrok vrijeme		

Primjer popunjenog upitnika:

HAH_XY

Dan 2

Obrok	Namirnica/jelo	Količina
Doručak oko 8 h	Jabuka, velika	1 cijela
	Jogurt ab kultura sa šumskim voćem, 0,1% mm	1 bočica (300 g)
	Kava instant s 2,5% mm mlijekom, pola/pola	3 dcl
	Lješnjaci, proprženi	1 šaka, 10-15 kom.
Međuobrok oko 11 h	Mandarina, srednje veličine	4 komada
	Čokolada, mliječna (pola čokolade od 80 g)	40 g
Ručak 14:30 h	Juha od buče (hokaido bundeva 2/3, 1/3 krumpir) 1 L vode, 200 ml mlijeko 2,5% mm, crveni luk dinstan na bučinom ulju	2 tanjura ili 4 srednje grabilice
	Salata od matovilca s maslinovim uljem i aceto balsamico	200 g
	Pileći batak i nadbatak, okoštano, pečeno na grill tavi bez masnoće	1 batak + 1 nadbatak
	Krumpir, pržen na ulju (pomfri)	2 šake ili 1 mali tanjur
	Brokula, kuhana na lešo	1 velika žlica za salatu
Međuobrok oko 18 h	Kava s mlijekom (kao i ujutro)	3 dcl
	Ananas, svježi	2 velike kriške debljine palca
Večera 20 h	Jogurt ab kultura	150 g
	Šunka, dimljena	4 kriške
	Sir, tvrdi, dimljeni (Dimsi, četvrtasti)	1 kriška rukom rezana
	Svježi krastavac salatar (veliki), samo posoljeno	1 cijeli
Kasni obrok 23 h	Kikiriki, prženi	2 šake

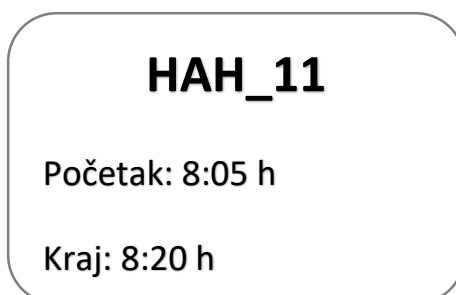
PRIKUPLJANJE UZORAKA URINA

Uzorke urina počinjete prikupljati **trećeg dana** istraživanja. Dio prvog jutarnjeg urina trećeg dana (subota) je potrebno prikupiti u označenu posudicu koja će Vam biti dostavljena. Zatim u posebnu bocu prikupljate sve sljedeće urine tijekom dana i prvi jutarnji urin **četvrtog dana** istraživanja (nedjelja). Posude za prikupljanje urina je nužno čuvati zatvorene u hladnjaku do kraja istraživanja.

Detaljne upute su navedene u nastavku.

1. Treći dan istraživanja (subota), odmah po buđenju, dio prvog jutarnjeg urina izmokrite u posudicu za urin koja Vam je donesena. Prikupljate srednji mlaz prvog urina do otprilike polovice posudice. Molimo da na naljepnicu na posudi upišete točno vrijeme mokrenja;
2. Od tog vremena, tijekom sljedećih 24 sata prikupljate sav urin u istu bocu koju ste dobili. Zbog uskog otvora boce dobit ćete plastičnu čašu u koju biste trebali mokriti te sadržaj bez gubitaka prelići u bocu. Važno je da sav urin koji izmokrite tijekom dana i noći pohranite u istu bocu. Također Vas molimo da na naljepnicu na boci upišete točno vrijeme mokrenja prvog urina;
3. Zadnji urin koji prikupljate je prvi jutarnji urin sljedećeg dana (nedjelja). Prilikom prikupljanja ovog zadnjeg urina u 24-satnom ciklusu trebali biste mokriti u isto ili približno isto vrijeme. Molimo da na naljepnicu na boci upišete točno vrijeme mokrenja zadnjeg urina;
4. Nakon što prikupite urin, javite to Vašem koordinatorskom osoblju koji će u kratkom roku doći preuzeti uzorke.

Izgled naljepnice na boci s 24-satnim urinom:



Važne napomene:

Tijekom prikupljanja 24-satnog urina bilo bi dobro da svoje kretanje ograničite u smislu da u svakom trenutku kada imate potrebu za mokrenjem budete u svom domu ili drugoj lokaciji gdje ćete biti u mogućnosti urin adekvatno skupiti i pohraniti u bocu.

Ukoliko imate potrebu za pražnjenjem crijeva a istovremeno imate potrebu i za mokrenjem, molimo da ove dvije radnje odvojite da se spriječi gubitak urina koji mora rezultirati eliminacijom čitavog 24-satnog uzorka.

Molimo da koordinatora izvijestite o svim odstupanjima od uputa.

Prilog 3 Obavijest za ispitanike i Suglasnost za sudjelovanje**OBAVIJEST ZA ISPITANIKU**

RADNI NAZIV ISTRAŽIVANJA: Sudbina deoksinivalenola u ljudskom tijelu

VRIJEME TRAJANJA: Tri dana

USTANOVE: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska agencija za hranu

Poštovane/i, pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem će se ispitati sudbina (apsorpcija, razgradnja i izlučivanje) jednog toksina plijesni (mikotoksina) iz hrane u ljudskom tijelu. Riječ je o segmentu šireg istraživanja koje će utvrditi i izloženost hrvatske populacije mikotoksinu deoksinivalenolu (DON) i njegovim derivatima iz različitih proizvoda na bazi žitarica. Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija je svrha pomoći Vam odlučiti želite li sudjelovati u ovom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest. Ukoliko u ovoj obavijesti ne razumijete neke izraze, slobodno upitajte za pojašnjenje.

Dosadašnje spoznaje o ovom problemu: DON i njegovi derivati su mikotoksini koje proizvode plijesni roda *Fusarium* i uglavnom se mogu pronaći u proizvodima na bazi žitarica (brašno, žitne pahuljice, hrana za dojenčad, slad, pivo, itd.). Visoke doze unesene putem hrane uglavnom se povezuju s epidemijama bolesti probavnog trakta, uz povraćanje kao glavni simptom. Nema podataka o unosu DON-a i derivata za populaciju Hrvatske osim nedavne neizravne procjene izloženosti trudnica s područja istočne Hrvatske na temelju koncentracije DON-a i njegovih metabolita u urinu. Rezultati su upućivali na relativno visoku izloženost, iako nije bilo nikakvih naznaka štetnog djelovanja. Ukoliko se apsorbiraju, DON i derivati se brzo razgrađuju i izlučuju iz organizma, ali se ne zna puno o faktorima (dob, spol, pušenje, prehrana, i dr.) koji na to utječu.

CILJ /SVRHA ISTRAŽIVANJA

Provest će se analiza uzoraka urina dobrovoljaca nakon konzumacije proizvoda s poznatom koncentracijom DON-a i derivata da bi se utvrdila količina izlučenog DON-a i metabolita u urinu tijekom 24 sata.

Ispitivanjem utjecaja različitih faktora (doza, tjelesna težina, spol, pušenje, tip prehrane, i dr.) na njegovo izlučivanje (ukupnu količinu izlučenu urinom, udio i omjer metabolita) dobit će se bolji uvid u rizike vezane uz izloženost ovom mikotoksinu.

PROTOKOL ISTRAŽIVANJA

Dva dana prije prikupljanja uzoraka urina biste trebali isključiti unos namirnica koje sadrže DON i derivate. Točan popis namirnica ćete dobiti od koordinatora istraživanja. Oni će Vam dostaviti i namirnice s poznatom koncentracijom DON-a i derivata koje ćete konzumirati u okviru tri glavna obroka tijekom trećeg dana istraživanja. Također ćete dobiti detaljne upute vezane za konzumaciju svih ostalih

namirnica čiji unos (vrstu namirnice i opis veličine obroka) trebate zabilježiti. Ispunit ćete i kratki upitnik o Vašim antropometrijskim podacima, prehrambenim navikama, i drugim osobinama. Tijekom trećeg dana prikupljate uzorke urina u kojima će se vršiti analiza. Riječ je o 24-satnom uzorku, od 7 h trećeg dana, do prvog jutarnjeg urina četvrtog dana istraživanja. Skupni uzorak je nužno čuvati u hladnjaku u posudama koje ćete dobiti, do trenutka preuzimanja od strane koordinatora istraživanja (odmah po završetku 24-satnog perioda).

VAŠA ULOGA U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU

Od Vas se očekuje da se pridržavate uputa o prehrani koje ćete dobiti od koordinatora te da skupite sav urin tijekom trećeg dana istraživanja.

KOJE SU PREDNOSTI I/ILI RIZICI VAŠEG SUDJELOVANJA?

Prednost je spoznaja o apsorpciji, metabolizmu i izlučivanju DON-a i derivata u tijelu. Koncept brzih ili sporih metabolizatora pojedinih toksikanata je poznat u toksikologiji i spoznaje o sudbini istraživnog mikotoksina u Vašem organizmu mogu Vam pomoći u oblikovanju prehrane s ciljem eliminacije rizika.

Rizici uslijed unosa namirnica s poznatom razinom DON-a i derivata koje ćete konzumirati u ovom istraživanju minimalni su. Sve namirnice sadržavat će znatno manje koncentracije od zakonski dozvoljenih, a ukupni unos je otprilike 100 puta niži od razine koja nije izazvala nikakve štetne učinke pokusnim životinjama u kontekstu dugotrajne izloženosti.

MORA LI SE SUDJELOVATI?

Na Vama je da odlučite želite li sudjelovati ili ne. Ako odlučite sudjelovati dobit ćete na potpis ovu obavijest (jedan primjerak zadržite). Vaše sudjelovanje dobrovoljno je i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje, molimo da o tome na vrijeme obavijestite voditelja istraživanja.

POVJERLJIVOST I UVID U DOKUMENTACIJU

Vaši će se osobni podaci obrađivati elektronički, a voditelj istraživanja će se pridržavat interne procedure za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka bit ćete uneseni pomoću koda (šifre). Vašu medicinsku dokumentaciju i sve druge osobne podatke pregledavati će voditelj istraživanja. Vaše ime nikada neće biti otkriveno.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podaci dobiveni ovim istraživanjem koristit će se za izradu znanstvenih radova i jedne doktorske radnje.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Istraživanje je pregledalo i odobrilo Etičko povjerenstvo vezano za istraživanje na ljudima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući **Opću**

deklaraciju o bioetici i ljudskim pravima (UNESCO), Osnove dobre kliničke prakse (NN 175/03) i Helsinšku deklaraciju.

KOGA KONTAKTIRATI ZA DALJNJE OBAVIJESTI?

Ako trebate dodatne podatke, slobodno se obratite voditelju istraživanja:

Ime i prezime: prof. dr. sc. Tomislav Klapec

Adresa: F. Kuhača 18, 31000 Osijek

Broj telefona: 031 / 224-387

O PISMENOJ SUGLASNOSTI ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

Presliku dokumenta (potpisne stranice) koji ćete potpisati ako želite sudjelovati u istraživanju, dobit ćete Vi i voditelj istraživanja. Originalni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati voditelj istraživanja.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

prof. dr. sc. Tomislav Klapec

SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE

1. Potvrđujem da sam pročitao/la obavijest za znanstveno istraživanje pod radnim nazivom **Sudbina deoksinivalenola u ljudskom tijelu**, te sam imao/la priliku postavljati pitanja vezana uz istraživanje kako bih lakše donio/donijela odluku;
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica;
3. Razumijem da mojim osobnim podacima imaju pristup odgovorni pojedinci, tj. voditelj istraživanja i njegovi suradnici. Dajem dozvolu tim pojedincima za pristup mojoj osobnim podacima;
4. Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanice/ka:


Ime i prezime (velikim slovima): _____

Potpis: _____

Datum: _____

Osoba koja je voditelj istraživanja:

Ime i prezime (velikim slovima): TOMISLAV KLAPEC

Potpis: 

Datum: _____