

ЦИТРИНИН – ЕДИН МАЛКО ИЗВЕСТЕН МИКОТОКСИН

СТАНОВИЩЕ

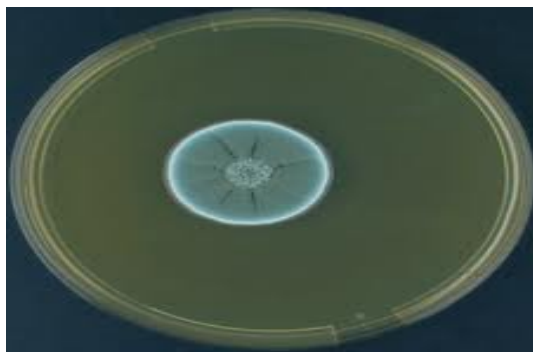
/ПО ЛИТЕРАТУРНИ ДАННИ И СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ/

Доц. д-р Тери Врабчева, дм

София, 2012 г.

ВЪВЕДЕНИЕ.

Микотоксинът цитринин е поликетиден токсичен вторичен метаболит, който е изолиран за първи път от култура на *Penicillium citrinum* /фиг. 1 и фиг. 2/ през 1931 г. По-късно жълто оцветен ориз, внесен от Тайланд в Япония през 1951 г., се установява, че е замърсен с *Penicillium citrinum* и изолатите на този вид са продуцирали цитринин. От тогава редица видове от род *Penicillium* са доказани като продуценти на цитринин, включително *Penicillium verrucosum*. Последният е основен продуцент на охратоксин А в зърнени култури /пшеница и ечемик/. По тази причина не е изненада, че двата микотоксина често се срещат заедно, макар цитринина да се съобщава много по-рядко. В действителност, този факт може да не отразява реалната ситуация, тъй като много често цитринина не се анализира. Други плесени, известни като продуценти на цитринин, включват *Aspergillus terreus*, *A. carneus* and *A. niveus*, а също така и видове от род *Monascus*.



Фиг. 1. Култура на *Penicillium citrinum*.



Фиг. 2. Микроскопско изображение на *Penicillium citrinum*.

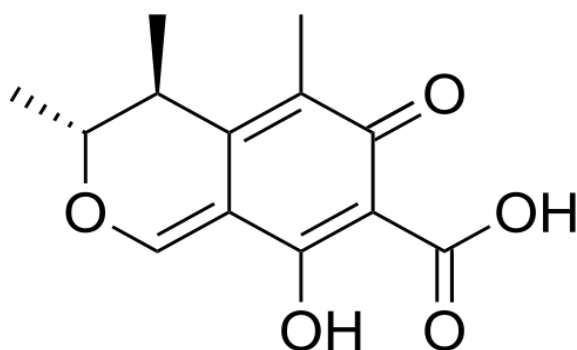
Цитрининът обикновено се образува след прибиране на реколтата, при условия на съхранение и се среща основно в зърнените култури. Той е нежелан замърсител в червения ферментирал ориз (red yeast rice), който се използва като консервант и оцветител на храни в Азия.

Поради антибактериалните си ефекти, цитрининът е изучаван като антибиотик, но изследванията върху неговата токсичност показват, че този микотоксин действа при животните като нефротоксин, увреждайки проксималните тубули на бъбреците. Това дава повод да бъде проучван и като възможен причинител на заболяването Балканска ендемична нефропатия.

Понастоящем няма специфично законодателство за цитринина в света. Основната причина за това е недостига на подходящи аналитични рутинни методи, както и нестабилността на цитринина в хранителните продукти.

ХИМИЧЕСКА СТРУКТУРА И МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ.

Цитрининът ($C_{13}H_{14}O_5$) е киселинен лимонено-жълт кристал, с точка на топене $175^{\circ}C$ /фиг. 3/. Лошо се разтваря във вода, но добре разтворим в повечето полярни органични разтворители. Разгражда се в киселинни и алкални разтвори, както и при нагряване.



Фиг.3. Химическа структура на цитринина.

При температури $100^{\circ}C$ - $130^{\circ}C$ и в присъствие на малко вода, цитрининът се превръща в цитринин H_1 , който има по-силно изразени токсични свойства, докато нагряването при температури по-високи от $140^{\circ}C$ води до образуването на H_2 , съединение със значително по-

слаба цитотоксичност в сравнение с цитринина. Това показва, че цитрининът е нестабилен и термолабилен във водни разтвори, което създава проблеми при неговото определяне в хранителните продукти.

Пробовземането е най-големият източник на вариабилност при анализа на микотоксините, включително и на цитринина, и най-критичната стъпка при получаването на надеждни резултати.

За химическото определяне на цитринина се използват тънкослойно-хроматографски методи (TLC), високо ефективна течна хроматография (HPLC) с UV или флуоресцентна детекция, и имуноензимни методи (EIA). В последните години LC-MS и GC-MS техники се разработват за количествено и качествено определяне на цитринина. Едно от големите предизвикателства в анализа на цитринина е свързано с неговата нестабилност, зависеща от температурата, състава на разтворителите, използвани за подготовката на пробите, мобилната фаза и приготвянето на стандартния разтвор.

Тънкослойно-хроматографските методи (TLC) са изключително лесни, бързи и евтини техники за разделяне, но при тях се постига сравнително ниска чувствителност, в рамките на 10-50 ng/g. Основният проблем при тези методи, е слабата флуоресценция на цитринина. Те се използват главно за качествен анализ. През последните десетилетия високо ефективната течна хроматография (HPLC) стана все по-популярна и често използвана при анализа на микотоксините, включително и на цитринина. Първите проучвания са свързани с използването на обратно-фазова RP-HPLC с UV детекция, приложена за определяне на цитринин в биологични течности. На по-късен етап се разработва RP-HPLC с флуоресцентна детекция, което значително подобрява чувствителността, която вече е в рамките на 0.1-10 ng/g. За съжаление прилагането на тези методи към сложни матрици на храни или фуражи, изисква много време за пречистване на екстрактите, а понякога се наблюдава и недостатъчна специфичност. Тези недостатъци бяха преодолени с разработването на HPLC-MS анализа през 2001 г. Този метод е предпочитан за едновременно определяне на голям брой микотоксини в храни и фуражи, но не всички подобни методи включват и цитринина.

Имуноензимните методи (EIA) бяха разработени за много микотоксини като бърза алтернатива на хроматографските. Тези методи са високо специфични, тъй като се основават на реакцията антиген-антитяло. Но при тях може да се наблюдава кръстосана реакция със структурно подобни съединения. По тази причина положителните резултати трябва да бъдат

потвърдени с друга аналитична техника, например HPLC. При цитринина, този проблем не е толкова значим и имуноензимната техника дава ясна индикация за присъствие на микотоксина в матрицата. Поради бързината и сравнително ниската цена, тези методи са широко приложими като скрининг методи в контролните и изследователски лаборатории. Като се има предвид нестабилността на цитринина и малките количества в храните, неговото определяне остава предизвикателство. Това изисква създаването на подходящи аналитични критерии.

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ В ХРАНИТЕЛНИ ПРОДУКТИ И ФУРАЖИ.

Едно от първите сериозни изследвания върху разпространението на цитринина, е направено в Канада през 1968 г. от Scott et al. (1972). Зърнени проби, свързани с белодробни проблеми при фермерите и операторите на силози, са били анализирани. От 29 проби в 13 е бил открит цитринин в количества от 0.07 до 80 mg/kg. Всички проби, положителни за цитринин, са съдържали и охратоксин А.

В Европа проучвания върху цитринина са правени основно на Балканския полуостров, където се среща тежкото бъбречно заболяване Балканска Ендемична Нефропатия /БЕН/. Но като цяло броя на изследванията, занимаващи се с разпространението на цитринина в храни и фуражи, е малък в сравнение с изследванията на други микотоксини. Съобщаваните концентрации на цитринин в зърнени култури варират широко – до 420 µg/kg /предназначени за консумация от хората/ и до 998 µg/kg при фуражите. След като се среща в зърнените култури, това предполага наличието на цитринин и в продуктите на зърнена основа, където нивата достигат 42 µg/kg /Molinie et al., 2005/. Авторите установяват за закуските на зърнена основа, че ако цитринин и охратоксин А присъстват в тях, концентрацията на цитринина е винаги по-висока. Микотоксина се открива също в ябълки – до 920 µg/kg /Martins et al., 2002/, билки – до 355 µg/kg /Santos et al., 2009/ и в плодови и зеленчукови сокове – до 0.2 µg/L /Dietrich et al., 2001/. В Англия Jarvis (1983) изследва 44 проби плесенясало сирене и в 17 от тях открива цитринин до 50 µg/kg. El Adlouni et al. (2006) в Мароко доказват микотоксина в черни маслини в концентрации от 0.2 до 0.5 µg/kg (LOD = 0.2 µg/kg), докато Neperkan et al. /2006/ в Турция го откриват в количества от 75 до 350 µg/kg. Повечето изследвани проби за съдържание на цитринин в различните краища на света показват нива по-ниски от LOD или

LOQ. В положителните за цитринин проби често се открива охратоксин А /в зърнени/ или патулин /в плодови и зеленчукови сокове/. Оплесеняването на хранителните продукти с видове *Penicillium* /фиг. 4/, не означава обезателно, че те съдържат цитринин. За образуването му са необходими много фактори, като щам-продуцент, температура, влага, рН и др.



Фиг. 4. *Penicillium citrinum* в хляб.

През последните години сериозен интерес има към червения ферментирал ориз /red yeast rice/, който се получава от ориз, чрез ферментация с червени дрожди *Monascus purpureus* /фиг. 5/. Тези дрожди и техните ферментационни продукти се използват от векове в Азия и Ориента като оцветители на храни, подобрители на вкуса, за консервиране на месо и ферментация на виното. Понастоящем те се използват в много страни като хранителни добавки, поради тяхната способност да намаляват нивата на холестерола и триглицеридите, кръвното налягане и наличие на антиоксидантни свойства. Някои търговски *Monascus* продукти са под формата на червен ферментирал ориз, докато други са под формата на капсули /фиг. 6/ или таблетки, в които ферментираният ориз е смесен с някои нутриенти или стабилизатори. През 1995 г. Blanc et al., (1995a, 1995b) демонстрираха, че един от пигментите, продуцирани от *Monascus* е идентичен по структура на цитринин. Sabater-Vilar et al., (1999) съобщават, че цитринин е открит в екстракти от *Monascus* продукти, доставени в Холандия. Така той бе открит в някои традиционни азиатски храни, съдържащи ориз. Концентрациите му варират между 0.2 и 17.1 ppm.



Фиг. 5. Червен ферментирал ориз.



Фиг. 6. Капсулни форми на *Monascus* продуктите.

Liu et al., (2005) установяват, че оризовата форма на *Monascus* продуктите обикновено съдържат по-високи нива на цитринин, в сравнение с капсулните и таблетни форми. Това може би се дължи на по-слабия качествен контрол при производството на оризовата форма и на факта, че тя претърпява по-малко преработка след процеса на ферментация.

При интерпретирането на такива резултати, трябва да се има предвид, че повечето от традиционните *Monascus* продукти се използват в много малки количества, основно като оцветители на храни. Засега използването на тези продукти като добавки към храните, не е разрешено в ЕС. В Тайван концентрация на цитринина в *Monascus* продуктите от 2 ppm се приема за безопасна, което превърнато в дневна доза е 2 g червен ферментирал ориз за човек с тегло 65 kg и височина 170 cm.

ТОКСИЧНОСТ И ОЦЕНКА НА РИСКА.

Цитрининът се елиминира главно чрез бъбречна екскреция. Експериментални данни показват, че остатъци от цитринин могат да се открият в месото и яйцата на животни, хранени с фуражи, съдържащи високи нива на цитринин. Острата орална летална доза (LD₅₀) при мишки и зайци е от порядъка на 100 mg/kg телесно тегло. Бъбреците са основният таргетен орган за цитринина. Плъхове, захранвани с високи дози цитринин /1 000 mg/kg фураж в продължение на 80 седмици/, показват хистопатологични промени и високо разпространение на аденоми в бъбреците.

Опити *in vitro* и *in vivo* дават ясни доказателства за репродуктивна токсичност, тератогенност и ембриотоксичност на цитринина. Микотоксинът не е мутагенен в конвенционалните бактериални тестове с или без метаболитна активация. Няма изследвания за възможни канцерогенни свойства на цитринина. Наличните данни показват, че цитрининът при ниски нива, не усилва токсичните ефекти на други микотоксини. Комбинираното действие на цитринина и охратоксин А е кумулативно.

Много малко проучвания има върху вредните ефекти на цитринина при свине, зайци, птици и кучета. На свине е давано количество 20 µg цитринин/kg телесно тегло на ден и не е наблюдаван никакъв ефект. EFSA разглежда тази стойност на приема като NOAEL /ниво, при което не се наблюдава вреден ефект/. При зайците умерени здравни ефекти са наблюдавани при захранване с фуражи, съдържащи цитринин в количество 15 mg/kg в продължение на 60 дни, но не е изчислен NOAEL. Съобщаваните ефекти при птиците варират широко като вид и сила на ефекта в зависимост от вида на птиците, възраст и дизайна на проучването, но поради липса на повече данни, тези резултати са се оказали неподходящи за характеризиране на риска и определяне на NOAEL. Наличните данни за кучета не могат да се използват за оценка на риска поради ко-експозиция с охратоксин А. Предполага се, че цитрининът се разгражда и метаболизира чрез микробиална активация в стомаха на преживните животни.

Най-нови изследвания в Тайван върху мъжки плъхове, захранвани с червен ферментирал ориз, съдържащ 200 ppm цитринин, в течение на 90 дни, не установяват никакви токсични ефекти (Lee et al., 2010). Параметрите на клиничната химия и хистопатологичните находки /в бъбреците и черния дроб/ не показват никаква токсичност. На базата на това проучване EFSA идентифицира NOAEL за нефротоксичност при прием 20 µg цитринин/kg телесно тегло на ден. Липсата на данни за експозиция при хората не позволява изчисляването на MOE

/граници на експозиция/, което се предлага от EFSA като подход за характеризиране на риска при генотоксични и канцерогенни съединения. EFSA решава да характеризира риска от цитринин на основата на наличните данни за нефротоксичност. Като се приложи фактор за неопределеност 100 към NOAEL от 20 µg цитринин/kg телесно тегло на ден, се получава NOAEL за нефротоксичност при хората от 0.2 µg цитринин/kg телесно тегло на ден. При това ниво обаче, не може да се изключи безпокойството за генотоксичност и канцерогенност.

Поради отсъствието на подходящи данни за експозиция при хората, характеризирането на риска от цитринин като замърсител на храни, се основава на изчисляването на критични концентрации на цитринина в зърнени храни и продукти на зърнена основа, които биха довели до експозиция, еквивалентна на NOAEL за нефротоксичност. Консумирането на зърнени и продукти на зърнена основа са избрани от EFSA за този подход, тъй като наличните аналитични резултати от литературата са главно по отношение на тези групи хранителни продукти, а също така те са основни в храненето на хората.

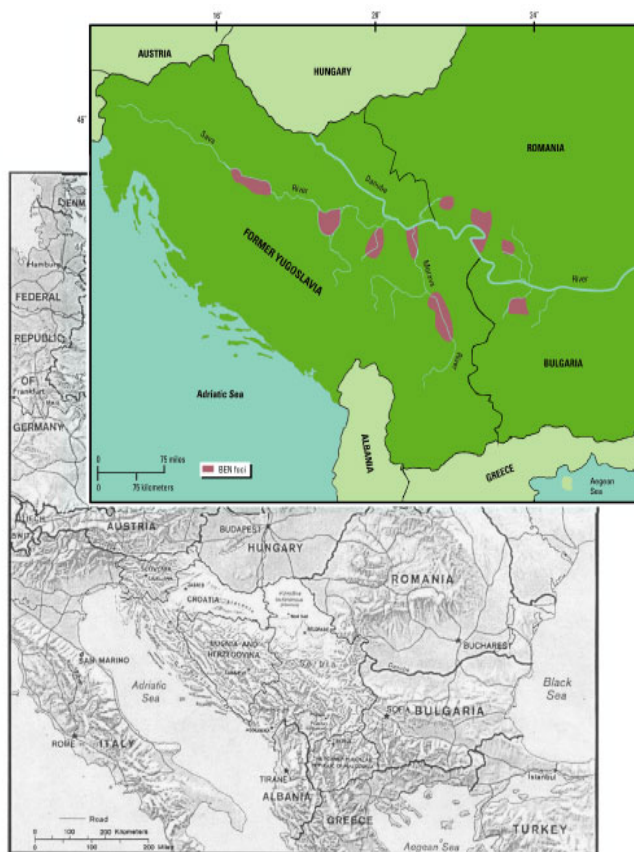
За големите консуматори на зърнени храни и продукти на зърнена основа /деца на възраст между 3 и 9 години, възрастни/ критичните концентрации на цитринин в тях са между 9 и 53 µg/kg, а при умерените консуматори – между 19 и 100 µg/kg.

При свинете критичните концентрации на цитринин са между 640 и 1 173 µg/kg в зърнени храни, използвани за фураж. Малко вероятно е свинете да консумират зърнени храни, които надхвърлят критичните концентрации за цитринин дневно за един продължителен период.

ДАНИ ЗА БЪЛГАРИЯ. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ БАЛКАНСКАТА ЕНДЕМИЧНА НЕФРОПАТИЯ.

Редица публикации през 50-те години на 20-ти век описват бъбречно заболяване в България, бивша Югославия и Румъния /фиг. 7/, известно като Балканска ендемична нефропатия /БЕН/. Открита и описана за първи път от д-р Йото Танчев и екип от болницата във Враца през 1956 година. В началото я наричат врачански нефрит. Впоследствие е дефинирана от Световната здравна организация като „...прогресивно и постепенно развиващо се поражение на бъбреците с неясно начало...”. БЕН се характеризира с тубуларна дегенерация, интерстициална фиброза и хиалинизация на гломерулите, съпроводено с понижена бъбречна функция. По-късно бе открита връзка между БЕН и туморите на бъбречните легенчета и уретера и проблема на БЕН

стана не само нефрологичен, но също и онкологичен. Основно заболяването се среща в селата, започва в ранна възраст, но се проявява едва във възрастта между 50 и 60 години, а тумори могат да бъдат диагностицирани и по-късно. Циганите от ендемичните села не боледуват от БЕН. Размерът на бъбреците намалява /при БЕН се наблюдават най-малките бъбреци в човешката патология/, развива се анемия, кожата на лицето е бледо-бакърена, а дланите и ходилата са с жълтеникава оцветка, няма високо кръвно налягане за разлика от нефритите, на болните се прилага хемодиализа. Болестта има подчертан наследствен характер, защото загиват цели семейства. За да се намали заболеваемостта, някои от тези села са изселени. Въпреки това изселените боледуват по същият начин, ако са живели в ендемичния район до 10-15 год. възраст. В родените след преселването деца обаче, не са открити такива с БЕН!



Фиг. 7. Карта на разпространение на БЕН в България, бивша Югославия и Румъния.

Съществуват няколко хипотези относно етиологията на БЕН. Фамилният характер на болестта предполага участието на предиспозиращи гени, но се открива и намесата на фактори от външната среда. Към тези фактори се отнасят: тежки метали и минерали, бактерии, лептоспири и вируси, гъбни токсини, радиация и др. През 1972 г. на основата на серия от епидемиологични наблюдения, руският учен Ахметели изказва предположение за участието на гъбните токсини в етиологията на БЕН. Krogh (1972) открива много сходства между БЕН и охратоксин А-индуцираната нефропатия при свинете в Дания и свързва този микотоксин с развитието на БЕН при хората. Цитрининът проявява подобна на охратоксин А токсикология и патология. Двата токсина се откриват често заедно в зърнените култури, което предполага синергистично или подпомагащо действие между тях евентуално в етиологията на БЕН.

В България са правени няколко проучвания относно съдържанието на охратоксин А и цитринин в зърнени храни, събрани от регионите с БЕН. Petkova-Vocharova et al. (1991) изследват проби царевица от тези региони с тънко-слойна хроматографска техника (LOD = 15 - 20 µg/kg) за цитринин. Те откриват честота на замърсяване с цитринин на съхранявана царевица от ендемичните и неендемичните райони, съответно 27-44% и 10-15%. Концентрациите на цитринина са били в границите от 50 до 1500 µg/kg за ендемичните и от 50 до 380 µg/kg за неендемичните райони. Подобна е била находката и при фасула, изследван също с TLC (LOD = 15 – 20 µg/kg). Честотата на замърсяване с цитринин в ендемичните райони е била от 27 до 40 %, с концентрации 20 - 1000 µg/kg и в неендемичните райони от 10 до 12 %, с концентрации 20 - 200 µg/kg.

Десет години по-късно Vrabcheva et al. (2000a) проучват разпространението на охратоксин А и цитринин в зърнени култури, предназначени за използване като храна /царевица и пшеница/ и фураж /ечемик, пшеничени трици и овес/ в български села, където се среща БЕН. Пробите са били анализирани за цитринин, използвайки ELISA техниката с LOD = 5 µg/kg, високо чувствителен метод, базиран на използването на моноклонални антитела. Изследвани са проби, събрани от 3 села с БЕН и от едно контролно село без БЕН в региона на Враца. Повечето проби са били местно производство. Авторите отбелязват като интересна находка отсъствието на охратоксин А и цитринин в пробите царевица, общо изследвани 23 проби, докато замърсяването на пшеницата и пшеничените трици е било по-често /табл. 1/.

Табл. 1. Обобщени резултати за съдържание на охратоксин А и цитринин в проби зърнени култури, събрани от ендемични и неендемични села в България / Vrabcheva et al., 2000a/.

Общ брой проби/Брой положителни за охратоксин А и цитринин проби					
Зърнена култура	Контролно село	Ендемично село 1	Ендемично село 2	Ендемично село 3	Контролни проби от софийски регион
Пшеница	5 (2)	9 (3)	8 (0)	10 (5)	5 (1)
Царевица	5 (0)	5 (0)	8 (0)	5 (0)	0 (-)
Ечемик	5 (0)	0 (-)	0 (-)	1 (0)	0 (-)
Овес	0 (-)	2 (0)	5 (5)	2 (2)	0 (-)
Пшеничени трици	5 (5)	5 (3)	9 (4)	5 (5)	0 (-)

В пробите овес /9 проби/ откриват висока честота на замърсяване с охратоксин А /достигащо концентрации 140 µg/kg/ и отсъствие на цитринин. Общо, процентът на цитринин-положителните проби е бил съответно 5 /за контролното село/, 14 /село 1 ендемично/, 3 /село 2 ендемично/ и 13 /село 3 ендемично/. При две от ендемичните села /1 и 3/ е била отбелязана по-висока честота на разпространение на цитринина в сравнение с контролното село. Средните стойности на концентрациите на цитринина в положителните проби са били съответно 6.1 µg/kg /за контролното село/, 180 µg/kg /село 1 ендемично/, 10 µg/kg /село 2 ендемично/ и 84 µg/kg /село 3 ендемично/. Тези резултати се различават от получените в изследването на Petkova-Vocharova et al. (1991), които съобщават по-висока честота на разпространение и по-високи нива на цитринин в царевица и фасул от ендемичните райони за периода 1984-1990.

В проучването на Vrabcheva et al. (2000a) могат да се отбележат и други интересни находки. Всички проби с по-високи нива на охратоксин А (>5 ng/g) или цитринин (>10 ng/g) са от трите ендемични села. Всички проби, с изключение на една, в които е открит цитринин, са от ендемичните области. Също така авторите установяват, че максималните нива, намерени за цитринина, надхвърлят максималните нива за охратоксин А. Две от 3 цитринин-положителни проби пшеница (от общо 37 проби) са също положителни за охратоксин А, и концентрациите на цитринина са 2 до 200 пъти по-високи от тези на охратоксин А. Максималната

концентрация на цитринина (420 µg/kg) е определена в проба пшеница, предназначена за консумация от хората и същата тази проба съдържа най-високата определена концентрация за охратоксин А (39 µg/kg). Дневната консумация на 100 грама от този продукт от човек с тегло 75 kg ще има за резултат среден дневен прием на охратоксин А от 40-50 ng/kg телесно тегло, което е около 3 пъти по-високо от най-високата съобщавана стойност за допустим дневен прием на охратоксин А.

Цитринин и охратоксин А не са открити в 6 изследвани проби ечемик, предназначен за фураж. В същото време 66% от всички проби, предназначени за фураж от ендемичните села са положителни за охратоксин А и/или цитринин, като пшеничените трици са най-поразени, докато само 17% от всички проби, предназначени за консумация от човека от ендемичните райони са положителни за охратоксин А или цитринин. Като се има предвид, че цитрининът е не само нефротоксичен, но също притежава и генотоксичен потенциал, високите концентрации на този микотоксин, открити в няколко проби, могат да повлияят върху човешкото здраве, което е било подценявано в миналото.

Охратоксин А е бил винаги най-често цитираният микотоксин във връзка с Балканската ендемична нефропатия, но последните проучвания на български изследователи показват, че цитрининът се среща често в зърнените култури заедно с охратоксин А в ендемични райони на България. С цел да се получат първи данни за експозицията на хората към цитринина от ендемичните села, през 1999 г. бе проведено обширно проучване, финансирано чрез проект на НАТО (Vrabcheva et al., 2000b, Vrabcheva et al., 2004). Подбрани са две села, в които се наблюдава висок риск от поява на БЕН сред населението – Горно Пещене и Бели Извор, разположени в северо-западна България /Врачанска област/. В изследването са включени 7 души от Горно Пещене и 9 – от Бели Извор. Всички участват на доброволни начала и са избрани да бъдат здрави, на възраст между 20 и 30 години, с клинично нормална биохимия на кръвта, хематологични показатели и показатели от изследване на урината, както и отрицателни резултати за хепатит Б. Никой от тях не страда от някакво бъбречно, чернодробно или метаболитно заболяване, а също така от сърдечно-съдово или гастроинтестинално смущение.

Доброволците са помолени да запазват аликуотна част от дневното си меню /закуска, обед и вечеря/ в продължение на 4 седмици, а също така да записват всеки ден всички съставки, използвани за приготвянето на всяко ядене за този период от 1 месец. Аликуотната част за

всеки ден се смесва, хомогенизира и се претегля, след което се съхранява в хладилник. В края на седмицата, всички проби, събрани за 7 дни, отново се смесват, хомогенизират и се съхраняват при - 20°C. Така за всеки участник се получават по 4 проби /по една за всяка седмица/. Пробите са анализирани за цитринин чрез ELISA метод в лаборатория на университета в Мюнхен. Те представляват много сложни аналитични матрици, но въпреки това бе достигнат LOD = 1 ng/g. Получените резултати показват, че цитринин при нива >1 ng/g се среща поне веднаж в пробите на 11 от всичко 16 участващи в проучването /Табл. 2/.

Табл. 2. Цитринин в хомогенизирани седмични проби на доброволци от селата Бели Извор и Горно Пещене, с висок риск за поява на БЕН (Vrabcheva et al., 2000b).

Номер на лицето	Концентрация на цитринин в ng/g			
	Седмица 1	Седмица 2	Седмица 3	Седмица 4
Село Бели Извор				
B 02	< 1	< 1	< 1	< 1
B 03	1.3	< 1	< 1	1.4
B 05	< 1	< 1	< 1	< 1
B 06	< 1	< 1	< 1	< 1
B 07 /живее с B 08/	4.0	5.3	2.8	3.1
B 08 /живее с B 07/	4.9	3.6	3.8	5.9
B 09	< 1	5.8	< 1	< 1
B 11	< 1	< 1	< 1	< 1
B 12	< 1	< 1	2.0	< 1
Село Горно Пещене				
G 01	< 1	1.1	< 1	2.2
G 02	1.6	< 1	< 1	< 1
G 03	< 1	< 1	< 1	< 1
G 04	1.8	1.0	< 1	< 1
G 05	2.0	< 1	< 1	2.5
G 06	< 1	< 1	1.2	< 1
G 09	< 1	< 1	1.0	< 1

Нивата на цитринина надхвърлят 1 ng/g в 2 или повече седмични проби при 6 от участниците. Двама от участниците, които живеят в едно домакинство от село Бели Извор, имат високи нива на цитринин в диетата си през всичките 4 седмици, с концентрации от 2.8 до 5.9 ng/g. Седмичният прием на цитринин при тези 2-ма доброволци бе изчислен на 9 000 до 32 000 ng. Друг участник /В 09/ има калкулиран седмичен прием от 40 000 ng цитринин през 2-рата седмица, но през другите 3 седмици нивата на цитринина в седмичните проби не надхвърлят 1 ng/g. От описанието на доброволците за състава на приготвената от тях храна, могат да се проследят източниците на контаминиране: царевица, боб, пшеница, картофи, които са от личното стопанство на участниците. Тези резултати са в синхрон с предишните изследвания на Petkova-Vocharova et al. (1991) и Vrabcheva et al., (2000a), които показват високи стойности на цитринин в зърнени храни и фуражи от ендемични села.

Споменатите проучвания очертават значимостта на цитринина като евентуален синергист на охратоксин А в етиологията на Балканската ендемична нефропатия. Те могат да служат като основа за по-нататъшни интензивни изследвания в тази насока, които да дадат по-пълна информация за наличието на цитринин в зърнени храни, фуражи и в диетата на хора от ендемичните райони на България. Данните за количествата на цитринин в храната, непосредствено консумирана от населението, дават по-коректна представа за риска от този микотоксин, в сравнение с данните за изходните продукти, от които се приготвя храната.

Според проф. Драга Тончева, ръководител на Катедра по медицинска генетика към МУ-София, в България намалява интересът към Балканската ендемична нефропатия, но не защото тя изчезва, а защото трудно се разпознава като отделна клинична единица. Обикновено БЕН минава под шапката на клинична бъбречна недостатъчност. Пациентите търсят лекарска помощ, когато вече е късно. Има признаци за намаляване честотата на заболяването, но за сметка на това се отбелязва увеличение на клиничните прояви на уроепителните тумори. Досега няма окончателно становище за причините, предизвикващи това изключително тежко бъбречно заболяване. Има единодушие, че няколко различни фактора играят роля в провокирането на патологичния процес. Безспорна е водещата роля на наследствеността.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Съществува сериозен недостиг на информация за съдържанието на цитринин в храни и фуражи в България. По-честата находка на микотоксина във фуражите насочва към необходимостта от изследване на храни от животински произход /свинско месо и кръвен серум/ за цитринин като възможен източник в експозицията на хората.

Има необходимост от сертифицирани референтни материали и определени критерии при анализа на цитринина в храни и фуражи. С оглед опазване на общественото здраве трябва да се разработят по-чувствителни и точни аналитични методи за определяне на цитринин, а също така трябва да се установят международни критерии за качествен контрол на продукти, замърсени с цитринин.

Необходими са добре обосновани и структурирани токсикологични изследвания при лабораторни животни за по-задълбочено разкриване на токсикологичния потенциал на цитринина и за характеризиране на взаимовръзката доза-отговор.

Недостатъчно е проучено прехвърлянето на цитринина от фуражите в животинските продукти, предназначени за консумация от хората.

Макар и ограничени като брой резултати, проучванията върху цитринина в България показват значимостта на определянето му при мониторинга за нефротоксични микотоксини.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Akhmeteli M, *Epidemiology of endemic nephropathy*. In: Puhlev A., I. Dinev, B. Milev, D. Doichinov (eds), *Endemic Nephropathy (Proceedings of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy, 9-12 November 1972, Sofia, Bulgarian Academy of Sciences, p. 19-23)*.
2. Blanc P, Laussac J, Le Bars J, Le Bars P, Loret M, Pareilleux A, Prome D, Prome J, Santerre A and Goma G, *Characterization of monascidin A from Monascus as a citrinin*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1995a, 27, 201-213.
3. Blanc P, Loret M and Goma G, *Production of citrinin by various species of Monascus*. *Biotechnol. Lett.*, 1995b, 17, 291-294.
4. Dietrich R, Schmid A and Märtlbauer E, *Citrinin in fruit juices*. *Mycotoxin Research*, 2001, 17, 156-159.
5. El Adlouni C, Tozlovanu M, Naman F, Faid M and Pfohl-Leszkowicz A, *Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2006, 50, 507-512.
6. Heperkan D, Meric B, Sismanoglu G, Dalkiliç G and Güler F, *Mycobiota, mycotoxigenic fungi, and citrinin production in black olives*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2006, 571, 203-210.
7. Jarvis B, *Mould and mycotoxins in mouldy cheeses*. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, 1983, 1, 187-191.
8. Krogh P, *Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy*. In: Puhlev A., I. Dinev, B. Milev, D. Doichinov (eds), *Endemic Nephropathy (Proceedings of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy, 9-12 November 1972, Sofia, Bulgarian Academy of Sciences, p. 266-270)*.
9. Lee C, Lee C and Pan T, *A 90-d toxicity study of monascus-fermented products including high citrinin level*. *Journal of Food Science*, 2010, 75, T91-97.
10. Liu B, Wu T, Su M, Chung C and Yu F, *Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in Monascus fermentation products*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 170-175.

- 11.** Martins M, Gimeno A, Martins H and Bernardo F, *Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots*. Food Additives and Contaminants, 2002, 19, 568-574.
- 12.** Molinié A, Faucet V, Castegnaro P and Pfohl-Leszkowicz A, *Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B-1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin*. Food Chemistry, 2005, 92, 391-400.
- 13.** Petkova-Bocharova T, Castegnaro M, Michelon J and Maru V, *Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria*. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Eds Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky I and Bartsch H. IARC Scientific Publications, 1991, 83-87.
- 14.** Sabater V, Maas R and Fink G. J, *Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination*. Mutat. Res., 1999, 444, 7-16.
- 15.** Santos L, Marin S, Sanchis V and Ramos A, *Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89, 1802-1807.
- 16.** Scott P, Van Walbeek W, Kennedy B and Anyeti D, *Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1972, 20, 1103-1109.
- 17.** Vrabcheva T, E. Usleber, R. Dietrich, E. Martlbauer, *Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy*, "Journal of Agricultural and Food Chemistry", 2000a, vol. 48, N 6, 2483-2488.
- 18.** Vrabcheva T, E. Usleber, T. Petkova-Bocharova, I. Nikolov, I. Chernozemsky, R. Dietrich, E. Martlbauer, *Citrinin in the diet of young and healthy persons living in Balkan endemic nephropathy areas*, 22. Mykotoxin Workshop, Bonn, Germany, "Mycotoxin Research", 2000b, vol. 16A, N 2, 150-153.
- 19.** Vrabcheva T, T. Петкова-Бочарова, И. Николов, И. Черноземски, S. Dragacci, F. Grosso, M. Castegnaro, E. Usleber, R. Dietrich, E. Martlbauer, *Съдържание на микотоксини /охратоксин А и цитринин/ в храната на млади и здрави хора от села с Балканска ендемична нефропатия*, "Съвременна медицина", 2004, N 1, 23-29.

РЕЗЮМЕ: Цитрининът е токсичен вторичен метаболит, образуван от няколко вида филаментозни гъби от родовете *Penicillium*, *Aspergillus* и *Monascus*, който се открива като естествен замърсител в зърнени култури /пшеница, царевица, ориз и ечемик/, други растителни продукти като фасул, плодове, плодови и зеленчукови сокове, билки и подправки, в плесенявали млечни храни, фуражи, както и в биологични течности. Този токсин се среща също като нежелан замърсител в *Monascus* ферментирани продукти /обикновено описвани като червен ферментирал ориз / red yeast rice/, които са били използвани в Азия от векове за консервиране на месото и като оцветител на храните. Инструменталните техники за анализ на цитринин включват флуориметрични, хроматографски и имунохимични методи. До днес високо ефективната течна хроматография с флуоресцентна детекция /HPLC-FLD/ е метод за избор при рутинните анализи. Цитрининът проявява остра нефротоксичност при сравнително високи дози в мишки и плъхове, зайци, свине и птици, предизвиквайки подуване и евентуална некроза в бъбреците и в по-малка степен промяна в чернодробната функция. Той се свързва със заболявания при хората, като болестта „жълт ориз” в Япония и Балканската ендемична нефропатия, когато се среща в храните с други микотоксини, особено с охратоксин А. Балканската ендемична нефропатия е невъзпалително двустранно бъбречно заболяване, което поражда селското население в някои региони на бивша Югославия, България и Румъния. Неговата етиология е все още неизяснена, но няколко изследвания насочват към микотоксините /охратоксин А и цитринин/. Проби зърнени култури, събрани през 1998 г. от български села с и без БЕН, са били анализирани за охратоксин А и цитринин чрез ELISA. Най-високи нива на токсините са били открити в пшеница, пшеничени трици и овес. Нивата на цитринина са били 2-200 пъти по-високи от тези на охратоксин А. В друго проучване проби от седмичното меню, събирани 4 седмици от 16 млади и здрави хора, живеещи в две села с висок риск от поява на БЕН, са били анализирани също за охратоксин А и цитринин. Резултатите от двете изследвания показват, че хората, живеещи в ендемичните райони, са експонирани към охратоксин А и цитринин при значителни нива.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: цитринин, разпространение, токсикология, Балканска ендемична нефропатия.

ABSTRACT: Citrinin is a toxic secondary metabolite produced by several filamentous fungi of the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus*, which has been encountered as a natural contaminant in grains (wheat, corn, rice and barley), other plant products such as beans, fruits, fruit and vegetable juices, herbs and spices, in spoiled dairy products, feedstuffs, as well as biological fluids. This mycotoxin is known to occur also as an undesirable contaminant in *Monascus* fermentation products (generally described as red yeast rice (RYR)), which have been used in Asia for centuries for meat preservation and food colouring. Instrumental techniques for citrinin analysis include fluorimetric, chromatographic and immunochemical techniques. To date, high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) is the method of choice for routine analysis. Citrinin is acutely nephrotoxic at relatively high doses in mice and rats, rabbits, pigs and poultry, causing swelling and eventual necrosis of the kidneys and affecting the liver function at a lesser extent. It may be implicated in human disease, such as "yellow rice" disease in Japan and Balkan Endemic Nephropathy (BEN) when present with other mycotoxins, in particular OTA. Balkan endemic nephropathy is a noninflammatory bilateral kidney disease that affects rural populations in a few regions of former Yugoslavia, Bulgaria and Romania. Its etiology is still not understood, but several studies implicated mycotoxins (ohratoxin A and citrinin). Cereal samples collected in 1998 from Bulgarian villages with and without a history of BEN, were analyzed for OTA and citrinin by ELISA. Highest toxin levels were found in wheat, wheat bran and oats. Citrinin levels were 2-200 times higher than those of OTA. In another study samples of weekly-mixed food representing four weeks of meals from 16 young and healthy persons living in two villages with a high risk of BEN, were analyzed again for OTA and citrinin. All results from both studies demonstrated that people living in high-risk nephropathy areas were exposed to dietary OTA and citrinin at considerable levels.

KEY WORDS: citrinin, occurrence, toxicology, Balkan Endemic Nephropathy.