Pojedinačni i kombinirani učinci mikotoksina (okratoksina a i citrinina) i antioksidansa resveratrola na ekspresiju prijenosnika organskih aniona u bubrezima štakora

Micek, Vedran

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:387492

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Vedran Micek

POJEDINAČNI I KOMBINIRANI UČINCI MIKOTOKSINA (OKRATOKSINA A I CITRININA) I ANTIOKSIDANSA RESVERATROLA NA EKSPRESIJU PRIJENOSNIKA ORGANSKIH ANIONA U BUBREZIMA ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2023

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Vedran Micek

POJEDINAČNI I KOMBINIRANI UČINCI MIKOTOKSINA (OKRATOKSINA A I CITRININA) I ANTIOKSIDANSA RESVERATROLA NA EKSPRESIJU PRIJENOSNIKA ORGANSKIH ANIONA U BUBREZIMA ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Davorka Breljak
Komentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2023

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Vedran Micek

INDIVIDUAL AND COMBINED EFFECTS OF MYCOTOXINS (OCHRATOXIN A AND CITRININ) AND RESVERATROL ANTIOXIDANT ON THE EXPRESSION OF ORGANIC ANION TRANSPORTERS IN RAT KIDNEYS

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2023

Mentor: dr. sc. Davorka Breljak

Doktorski rad obranjen je dana 10. ožujka 2023. god. na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Stribor Marković, predsjednik
2. prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac, član
3. prof. dr. sc. Roberto Antolović, član

Hvala Davorki i Deanu…

SAŽETAK

Dugotrajna izloženost niskim dozama mikotoksina predstavlja rizik za pojavu bubrežnih oboljenja. U javnozdravstvenom smislu najznačajniji su mikotoksini koje proizvode plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, koji kontaminiraju namirnice za prehranu ljudi i životinja te uzrokuju pojavu mikotoksikoza. Ulazak mikotoksina u epitelne stanice proksimalnih kanalića (PK) bubrega posredovan je membranskim prijenosnicima organskih aniona (Oat), a nakupljanje mikotoksina u PK preduvjet je njihova toksičnog učinka. Kako su namirnice najčešće kontaminirane različitim mikotoksinima, cilj ovog rada je istražiti pojedinačne i združene učinke okratoksina A (OTA) i citrinina (CIT) nakon 21-dnevnog tretmana te mogući protektivni/reparatorni učinak resveratrola (RSV) na ekspresiju *housekeeping* (rNa/K-ATPaze i rβ-aktina) i Oat proteina (rOat1, rOat2, rOat3 i rOat5) u bubrezima štakora metodama western i imunocitokemijske analize. OTA (0,125 mg/kg tj.m. ili 0,250 mg/kg tj.m.) je u ovisnosti o dozi smanjio ekspresiju rOat1, ali ne rOat3 i rOat5 proteina, dok se ekspresija proteina rOat2 smanjila višom dozom OTA (0,250 mg/kg tj.m). Tretman CIT (20 mg/kg tj.m.) je smanjio je ekspresiju rOat2 i rOat5, ali ne rOat1 i rOat3 proteina. Smjesa mikotoksina (0,250 mg/kg tj.m. OTA+20 mg/kg tj.m. CIT) smanjila je ekspresiju rOat1, rOat2 i rOat5, a povećala ekspresiju rOat3 proteina. Tretman OTA ili CIT, kao i njihovom smjesom nisu mijenjali ekspresiju *housekeeping* proteina, izuzev smjese mikotoksina s višom dozom OTA koja je smanjila ekspresiju rβ-aktina. Tretman RSV (0,250 mg/kg tj.m. OTA+20 mg/kg CIT+20 mg/kg tj.m. RSV) nije umanjio nefrotoksične učinke mikotoksina. Dobiveni podatci ukazuju na važnost interakcija mikotoksina u regulaciji ekspresije proteina rOat u bubrezima štakora.

Ključne riječi: *imunocitokemijska analiza, mikotoksini, nefrotoksičnost, proksimalni kanalići, Rattus norvegicus, obitelj Slc22, western analiza*

SUMMARY

Prolonged exposure to low doses of mycotoxins poses a risk for kidney disease. The most important mycotoxins which contaminate foodstuffs for human and animal consumption and cause mycotoxicosis are produced by molds of the genera *Aspergillus, Penicillium* and *Fusarium*. The entry of mycotoxins into the renal proximal tubules (PT) epithelial cells is mediated by organic anions transporters (Oat), and the accumulation of mycotoxins in the PT is a prerequisite for their toxic effect. The aim of this study was to investigate the individual and combined effects of ochratoxin A (OTA) and citrinin (CIT) after 21 day exposure and the possible protective/reparative effect of resveratrol (RSV) on expression pattern of housekeeping (rNa / K- ATPase and rβ-actin) and Oat protein (rOat1, rOat2, rOat3 and rOat5) in rat kidneys by western and immunocytochemical analysis. OTA (0.125 mg/kg bw or 0.250 mg/kg bw) reduced the expression of rOat1 but not rOat3 and rOat5 protein, depending on the dose, while the expression of rOat2 protein decreased with a higher dose of OTA (0.250 mg/kg bw). CIT treatment (2 mg/kg bw) reduced the expression of rOat2 and rOat5, but not rOat1 and rOat3 proteins. A mixture of mycotoxins (0.250 mg/kg bw OTA + 2 mg/kg bw CIT) decreased rOat1, rOat2 and rOat5 expression and increased rOat3 protein expression. Treatment with OTA or CIT, as well as their mixture, did not alter the expression of housekeeping protein, except for a mixture of mycotoxins with a higher dose of OTA that reduced rβ-actin expression. RSV treatment (0.250 mg/kg bw OTA + 2 mg/kg CIT + 20 mg/kg bw RSV) did not reduce the nephrotoxic effects of mycotoxins. The data obtained indicate the importance of mycotoxin interactions in the regulation of rOat protein expression in rat kidneys.

Key words: *immunofluorescence, mycotoxins, nephrotoxicity, proximal tubules, Rattus norvegicus, Slc22 family, western analysis*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Hipoteza i ciljevi istraživanja 3

2. LITERATURNI PREGLED 5

2.1 Mikotoksini 5

2.1.1 Okratoksin A (OTA) 8

2.1.1.1 Toksikološki značaj OTA 9

2.1.1.2 Toksikokinetika OTA 11

2.1.2 Citrinin (CIT) 13

2.1.2.1 Toksikološki značaj CIT 14

2.1.2.2 Toksikokinetika CIT 15

2.2 Nefrotoksičnost mikotoksina 17

2.2.1 Nefrotoksičnost OTA 18

2.2.2 Nefrotoksičnost CIT 23

2.2.3 Istovremena izloženost kombinaciji OTA i CIT 25

2.3 Resveratrol 26

2.4 Obitelj membranskih prijenosnika otopljenih tvari 22 29

2.4.1 Prijenosnici organskih aniona smješteni u BLM PK 33

2.4.1.1 Prijenosnik organskih aniona Oat1/Slc22a6 33

2.4.1.2 Prijenosnik organskih aniona Oat3/Slc22a8 35

2.4.2 Prijenosnici organskih aniona smješteni u ČM PK 36

2.4.2.1 Prijenosnik organskih aniona Oat2/Slc22a7 36

2.4.2.2 Prijenosnik organskih aniona Oat5/Slc22a19 36

3. MATERIJALI I METODE 38

3.1 Materijali 38

3.1.1 Pokusne životinje 38

3.1.2 Puferi, otopine i kemikalije 38

3.1.2.1 Mikotoksini i resveratrol 38

3.1.2.2 Anestezija 38
3.1.2.3 Izdvajanje ukupnih staničnih membrana 38
3.1.2.4 Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina 39
3.1.2.5 Elektroforeza proteina i western analiza 39
3.1.2.6 Rezanje tkiva kriomikrotomom 40
3.1.2.7 Imunofluorescencijska analiza 40
3.1.3 Laboratorijska oprema i potrošni materijal 43
3.1.4 Računalni programi 44
3.2 Metode 45
3.2.1 Uzgoj pokusnih životinja 45
3.2.2 Tretman pokusnih životinja 45
3.2.3 Određivanje ekspresije proteina 46
3.2.3.1 Izdvajanje ukupnih staničnih membrana 46
3.2.3.2 Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za western analizu 46
3.2.3.3 Elektroforeza proteina i western analiza 47
3.2.4 Određivanje stanične lokalizacija proteina 48
3.2.4.1 Fiksacija i rezanje tkiva kriomikrotomom 48
3.2.4.2 Imunofluorescencijska analiza i mikroskopija 49
3.2.5 Statistička analiza i prikaz rezultata 50

4. REZULTATI 51

4.1 Ispitivanje primarnih protutijela 51
4.1.1 Ispitivanje protutijela za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora 51
4.1.2 Ispitivanje protutijela za detekciju housekeeping proteina u bubrezima štakora 53
4.2 Učinci mikotoksina i resveratrola na ekspresiju proteina u bubrezima štakora
4.2.1 Pojedinačni učinci mikotoksina 55

4.2.1.1 Učinak OTA na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora 55
4.2.1.2 Učinak CIT na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora 59
4.2.1.3 Učinak OTA na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 u bubrezima štakora……62
4.2.1.4 Učinak CIT na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 u bubrezima štakora……65
4.2.1.5 Učinak OTA na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora……68
4.2.1.6 Učinak CIT na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora……71
4.2.2 Združeni učinci mikotoksina 74
4.2.2.1 Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora 74
4.2.2.2 Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju rOat1 i rOat3 proteina u bubrezima štakora 78
4.2.2.3 Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora 81
4.2.3 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola 84
4.2.3.1 Združeni učinci OTA, CIT i RSV na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora 84
4.2.3.2 Združeni učinci OTA, CIT i RSV na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 ububrezima štakora……..87
4.2.3.3 Združeni učinci OTA, CIT i RSV na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora……..90

5. RASPRAVA 93

5.1 Ispitivanje primarnih protutijela 93

5.2 Učinci mikotoksina i resveratrola na ekspresiju proteina u bubrezima štakora……94

6. ZAKLJUČCI 105

6.1 Specifičnost primarnih protutijela 105

6.1.1 Specifičnost protutijela za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora……...105

6.1.2 Specifičnost protutijela za detekciju housekeeping proteina u bubrezima štakora 106

6.2 Pojedinačni učinci mikotoksina (ili OTA ili CIT) 106

6.2.1 Pojedinačni učinci OTA 107

6.2.1.1 Pojedinačni učinci OTA na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora..... 107

6.2.1.2 Pojedinačni učinci OTA na ekspresiju housekeeping proteina u bubrezima štakora 107

6.2.2 Pojedinačni učinci CIT 108

6.2.2.1 Pojedinačni učinci CIT na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora..... 108

6.2.2.2 Pojedinačni učinci CIT na na ekspresiju housekeeping proteina u bubrezima štakora 108

6.3 Združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT)..... 108

6.3.1 Združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT) na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora..... 109

6.3.2 Združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT) na ekspresiju housekeeping proteina u bubrezima štakora..... 109

6.4 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) 110

6.4.1 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora..... 110

6.4.2 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) na ekspresiju housekeeping proteina u bubrezima štakora 111

7. LITERATURA 114

8. POPIS KRATICA 140

9. ŽIVOTOPIS 144

10. PRILOZI 152

1. UVOD

Prema zaključcima radne skupine Europske agencije za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*, EFSA), globalni klimatski poremećaji u vidu porasta prosječnih temperatura, povišene relativne vlažnosti zraka, povećane količine oborina i porasta koncentracije ugljikova dioksida, mogli bi za posljedicu imati nastanak optimalnih uvjeta za pojačani rast i razvoj plijesni na uzgajanim poljoprivrednim kulturama, u postupku njihova skladištenja te u različitim fazama pri proizvodnji namirnica namijenjenih prehrani ljudi i životinja (https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins).

Podatci EFSA-e i Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO), ukazuju da su s javnozdravstvenog stajališta najznačajniji rodovi plijesni *Aspergillus*, *Penicillium, Fusarium* i *Monascus sp.,* koji kontaminiraju sirovine i namirnice koje se koriste u prehrani (žitarice, sušeno voće, začinsko bilje, grožđe, sir, meso, mlijeko, vino i dr.) te uzrokuju pojavu mikotoksikoza kako u ljudi, tako i u različitih životinjskih vrsta (https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins; https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins).

U odgovarajućim uvjetima, plijesni tijekom svoga razvoja stvaraju sekundarne metabolite, tzv. mikotoksine koji nakon unosa u organizam mogu izazvati mikotoksikoze (Bennett i Klich 2003.). U Skandinavskim zemljama, Južnoj Africi i zemljama Dunavskog sliva, u namirnicama kontaminiranim plijesnima često je utvrđena zajednička prisutnost dvaju mikotoksina uključujući okratoksin A (OTA) i citrinin (CIT). Većina mikotoksina uključujući OTA i CIT, u sisavaca, uz primarnu nefrotoksičnost iskazuje također i hepatotoksični, kardiotoksični, imunotoksični i neurotoksični učinak (Fink-Gremmels 1999.; Peraica i sur. 1999.; Gayathri i sur. 2015.; Malir i sur. 2016.; Gupta i sur. 2017.). Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da konzumacija namirnica kontaminiranih kombinacijom tih mikotoksina, tj. dugotrajna izloženost niskim koncentracijama OTA i CIT predstavlja značajan etiološki čimbenik u razvoju balkanske endemske nefropatije (BEN) te značajan zdravstveni rizik za razvoj bubrežnih oboljenja uključujući povišenu incidenciju nastanka tumora urotela u ljudi i životinja (Krogh i sur., 2009.; Stoev, 2017.).

Osnovni preduvjet nefrotoksičnog učinka mikotoksina jest njihov ulazak i nakupljanje u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića (PK) bubrega. Kako su mikotoksini organski anioni (OA), njihov ulazak u stanicu posredovan je specifičnim membranskim prijenosnicima za OA, tzv. proteinima Oat/OAT (eng. *Organic anion transporter;* OAT u čovjeka/Oat u životinja) koji pripadaju velikoj obitelji prijenosnika otopljenih tvari (eng. *Solute Carriers*; SLC u čovjeka/Slc u životinja) (Sekine i sur., 2000.; Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.; Sekine i sur., 2006.; Nigam, 2018.). Pojedini pripadnici SLC/Slc obitelji, uključujući Oat1/OAT1 (*Slc22a6/SLC22A6*) i Oat3/OAT3 (*Slc22a8/SLC22A8*) smješteni su u bazolateralnoj membrani (BLM), dok su Oat2 (*Slc22a7*; ortolog *OAT2/SLC22A7* u ljudi je smješten u BLM) i Oat5 (*Slc22a19*; ortolog OAT5 u ljudi ne postoji) smješteni u četkastoj membrani (ČM) epitelnih stanica PK bubrega (Sekine i sur., 2000.; Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.; Sekine i sur., 2006.; Nigam, 2018.). Objavljeni literaturni podatci nedvojbeno ukazuju da su membranski prijenosnici Oat/OAT ključni za unos mnogobrojnih OA u epitelne stanice PK bubrega uključujući i mikotoksine te da su ujedno i ciljno mjesto ispoljavanja njihova toksičnog učinka (Tsuda i sur., 1999.; Jung i sur., 2001.; Zhang i sur., 2004.; Tachampa i sur., 2008.; Žlender i sur., 2009.). Također, važno je ovdje naglasiti razloge i značaj provedbe ovog i budućih *in vivo* istraživanja na odgovarajućim eksperimentalnim *in vivo* modelima. Naime, funkcionalna karakterizacija niza različitih, do sada istraživanih prijenosnika, nažalost iskazuje određena ograničenja. Drugim riječima, podatci dobiveni *in vitro* istraživanjima ne mogu se na jednostavan način preslikati na *in vivo* sustave; maksimalna stopa prijenosa (J_{max}) i omjer stope prijenosa i afiniteta prijenosnika (J_{max}/K_m) za određeni supstrat prvenstveno ovisi o broju funkcionalnih prijenosnika eksprimiranih u staničnoj membrani epitelnih stanica PK. Broj eksprimiranih prijenosnika u nekom od *in vitro* sustava značajno se razlikuje od njihova broja u određenom *in vivo* modelu. Također, brojnost i zastupljenost pojedinih prijenosnika OA u epitelnim stanicama PK bubrega, mijenja se ovisno o tome radi li se o S1, S2 ili S3 odsječku nefrona. Dodatno, situaciju komplicira spoznaja o njihovoj drugačijoj akutnoj i kroničnoj regulaciji u *in vivo* sustavima te postojanje spolnih (jedinke muškog spola *vs.* jedinke ženskog spola) i vrstnih (lat. *species*) razlika (Burckhardt, 2012).

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeni su različiti uzroci nastanka bubrežnih oštećenja uslijed intoksikacije mikotoksinima uključujući deregulaciju transkripcije, inhibiciju sinteze proteina, nepovoljne interakcije s metaboličkim enzimima, poremećaje u prijenosu staničnih signala, kočenje staničnog ciklusa, indukciju apoptoze, aktivaciju autofagije te indukciju oksidativnog stresa (Kőszegi i Poór, 2016.; Zhao i sur., 2017.). Jedan od dobro poznatih antioksidansa koji štiti stanice sisavaca od oksidativnog stresa i slobodnih radikala je polifenol resveratrol (RSV). Brojnim istraživanjima utvrđeno je da RSV uz izraziti antioksidativni potencijal iskazuje i protuupalna, kardioprotektivna, imunomodulatorna, neuroprotektivna te antitumorska svojstva (Kalantari i Das, 2010.; Salehi i sur., 2018.). Također, utvrđeno je da RSV i brojni drugi prirodni spojevi međudjeluju s nizom membranskih prijenosnika pripadnika obitelji SLC/Slc i ABC/Abc (eng. *ATP-Binding Cassette*), zastupljenih u različitim tkivima sisavaca. Karakter tih zbivanja, u smislu moguće modulacije funkcije prijenosnika i/ili afiniteta za prijenos supstrata, nedovoljno je istražen (Jia i sur., 2016.; Salehi i sur., 2018.; Zha, 2018.).

Obzirom da su namirnice najčešće istovremeno kontaminirane s više različitih mikotoksina, pažnju istraživača unazad nekoliko godina privlače istraživanja združenih učinaka mikotoksina u različitim pokusnim modelima *in vitro* i *in vivo*. Prema objavljenim literaturnim podatcima dosada nisu opisani združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju i staničnu lokalizaciju membranskih prijenosnika za OA (rOat1/Slc22a6, rOat2/Slc22a7, rOat3/Slc22a8 i rOat5/Slc22a19) u bubrezima štakora, niti mogućnost umanjenja njihova nefrotoksičnog učinka primjenom antioksidansa RSV.

1.1 Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteza je ovog istraživanja da će 21-dnevni tretman štakora smjesom mikotoksina (OTA+CIT), inducirati promjene u ekspresiji membranskih prijenosnika za OA smještene u BLM (rOat1 i rOat3) ili ČM (rOat2 i rOat5) PK bubrega štakora, te da će se združeni nefrotoksični učinci OTA i CIT umanjiti tretmanom s antioksidansom RSV.

Cilj je ovog doktorskog rada, istražiti pojedinačne i združene učinke mikotoksina (OTA i CIT) na ekspresiju i staničnu lokalizaciju membranskih prijenosnika za OA (rOat1, rOat2, rOat3 i rOat5) i *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin) u bubrezima štakora. Također, istražit će se može li polifenol RSV umanjiti nefrotoksične učinke istraživanih

mikotoksina u pokusnom modelu štakora. U tu svrhu će se u ukupnim staničnim membranama (USM) izdvojenim iz bubrega i fiksiranim narescima bubrega upotrebom western i imunofluorescencijske analize istražiti:

1. Specifičnost primarnih protutijela (eng. *Antibody,* Ab) za:
- **a)** detekciju proteina rOat (Oat1-Ab, Oat2-Ab, Oat3-Ab i Oat5-Ab)
- **b)** detekciju *housekeeping* proteina (Na/K-ATPaza-Ab i β-aktin-Ab)

2. Pojedinačni učinci OTA na proteinsku ekspresiju i staničnu lokalizaciju:
- **a)** membranskih prijenosnika OA smještenih u BLM PK bubrega štakora (rOat1 i rOat3)
- **b)** membranskih prijenosnika OA smještenih u ČM PK bubrega štakora (rOat2 i rOat5)
- **c)** *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin) u bubrezima štakora

3. Pojedinačni učinci CIT na proteinsku ekspresiju i staničnu lokalizaciju:
- **a)** membranskih prijenosnika OA smještenih u BLM PK bubrega štakora (rOat1 i rOat3)
- **b)** membranskih prijenosnika OA smještenih u ČM PK bubrega štakora (rOat2 i rOat5)
- **c)** *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin) u bubregu štakora

4. Združeni učinci mikotoksina (OTA+CIT) na proteinsku ekspresiju i staničnu lokalizaciju:
- **a)** membranskih prijenosnika OA smještenih u BLM PK bubregu štakora (rOat1 i rOat3)
- **b)** membranskih prijenosnika OA smještenih u ČM PK bubrega štakora (rOat2 i rOat5)
- **c)** *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin) u bubregu štakora

5. Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA+CIT+RSV) na proteinsku ekspresiju i staničnu lokalizaciju:
- **a)** membranskih prijenosnika OA smještenih u BLM PK bubrega štakora (rOat1 i rOat3)
- **b)** membranskih prijenosnika OA smještenih u ČM PK bubrega štakora (rOat2 i rOat5)

c) *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin) u bubregu štakora

Ovim istraživanjem utvrdit će se pojedinačni i združeni učinci mikotoksina (OTA i CIT) te mogući protektivni/reparatorni učinak antioksidansa RSV na ekspresiju i lokalizaciju membranskih prijenosnika OA (rOat1/Slc22a6, rOat2/Slc22a7, rOat3/Slc22a8 i rOat5/Slc22a19) i *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin) u bubregu štakora, kao učestalo rabljenog pokusnog modela u toksikološkim studijama. Nove spoznaje o pojedinačnim i združenim učincima OTA, CIT i RSV u pokusnom modelu štakora doprinijeti će boljem razumijevanju mehanizama nastanka poremećaja bubrežnih funkcija u budućim istraživanjima te bi se mogle koristiti kao smjernice pri planiranju strategija za kontrolu, nadzor i praćenje mikotoksina u sirovinama i namirnicama.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Mikotoksini

Mikotoksini predstavljaju brojnu skupinu kemijski i toksikološki heterogenih organskih spojeva niske molekularne mase (50-500 Da), koji nakon unosa u organizam mogu izazvati mikotoksikoze (Bennett 1987.; Bennett i Klich, 2003.). Termin mikotoksin usvojen je 1962. god., nakon incidenta u okolici Londona u Engleskoj, pri kojem je uginulo oko 100 000 komada peradi (Turkey X bolest), i za koji se utvrdilo da je uzrokovan konzumacijom hrane kontaminirane aflatoksinima, sekundarnim metabolitima vrste *A. flavus* i *A. parasiticus* (Blount, 1961.). Do danas je identificirano približno 400 mikotoksina, dok su u javnozdravstvenom smislu najznačajniji mikotoksini koje proizvode plijesni rodova *Aspergillus, Fusarium, Penicillium i Monascus sp.* (Bennett 1987.; Bennett i Klich, 2003.; Tola i Kebede, 2016.; Eskola i sur., 2020.).

Pojava plijesni i mikotoksina u biljnim sirovinama i namirnicama prati ljudsku vrstu od samih početaka poljoprivredne proizvodnje. Skladištenje proizvedenih sirovina omogućilo je ljudskoj vrsti tranziciju od populacije lovaca-sakupljača do proizvođača, no istodobno, uzrokovalo je i pojavu razvoja plijesni i mikotoksina u skladištenim sirovinama (Pitt i Miller, 2017.). Ergotizam u ljudi, uzrokovan konzumacijom sklerocija *Claviceps purpurea,* poznat je još iz razdoblja srednjeg vijeka, kada je bio uzrokom pomora tisuća ljudi diljem Europe. Nadalje, akutni srčani beriberi (bolest žute riže ili *shoshin-kakke,* jap.)

uzrokovan citreoviridinom kojeg stvara plijesan *P. citreonigrum* na riži, poznat je još od 17. stoljeća u Japanu (Uraguchi, 1969.; Bennett 1987.; Peraica i sur., 1999.; Bennett i Klich, 2003.; Pitt i Miller, 2017.). Poznato je da akutna i kronična izloženost mikotoksinima izaziva niz štetnih zdravstvenih učinaka kod ljudi i životinja, stoga možemo ustvrditi da mikotoksini predstavljaju iznimno važne poljoprivredne zagađivače. Unatoč brojnim istraživanjima te usvajanju dobrih poljoprivrednih i proizvođačkih praksi, pojavnost mikotoksina u sirovinama i namirnicama i danas predstavlja globalni problem, ponajviše prisutan u zemljama u razvoju (Eskola i sur., 2020.). Također, s prisutnošću mikotoksina u sirovinama i hrani, povezani su i značajni gospodarsko-ekonomski gubici uslijed uništavanja usjeva i sirovina kontaminiranih mikotoksinima, te zbog umanjene produktivnosti životinja u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji (Wu i Mitchell, 2016.; Pitt i Miller, 2017.). Toksikogene plijesni koje su od značaja u poljoprivrednoj djelatnosti, ugrubo su podijeljene na tzv. poljske plijesni koje se razvijaju na usjevima prije žetve, i tzv. skladišne plijesni koje koloniziraju sirovine u procesu skladištenja. Iz skupine poljskih plijesni najznačajniji su biljni patogeni rodova *Fusarium* (*F. graminearum* - proizvodi deoksinivalenol, *F. verticillioides* - proizvodi fumonizin), zatim rodova *Aspergillus* (*A. flavus* - proizvodi aflatoksin) koje se razvijaju na ostarjelim usjevima ili biljkama koje su izložene značajnim stresnim čimbenicima, te rodova *Penicillium* (*P. verrucosum* - proizvodi okratoksin) koje u poljima koloniziraju usjeve prije žetve, a izraženije stvaraju mikotoksine u procesu skladištenja (Tola i Kebede, 2016.).

Biosinteza mikotoksina u plijesnima genetski je određena i u uskoj je svezi s primarnim metabolizmom aminokiselina i masnih kiselina, dok je stupanj kontaminacije sirovina i namirnica mikotoksinima, najvećim dijelom određen sastavom, teksturom, temperaturom i vlagom sirovina koje se prerađuju (Fink-Gremmels, 1999.). Razne biljne vrste koje se koriste kao sirovine u proizvodnji namirnica u uvjetima izraženijeg stresa (suša, pretjerano navodnjavanje, invazije insektima i tretman herbicidima) predstavljaju idealnu podlogu za razvoj plijesni. Na rast i razvoj plijesni te stupanj stvaranja mikotoksina utječe niz čimbenika: temperatura okoliša, vlažnost, pH, aktivnost vode (a_v), dostupnost hranjivih tvari, stupanj inokulacije, karakteristike supstrata, fiziološko stanje plijesni i mikrobiološka aktivnost. Uobičajeni uvjeti za rast i razvoj plijesni su temperatura u rasponu od 10-40 ^oC, pH 8,4, i a_v iznad 0,7. Poljske plijesni za aktivan rast zahtjevaju

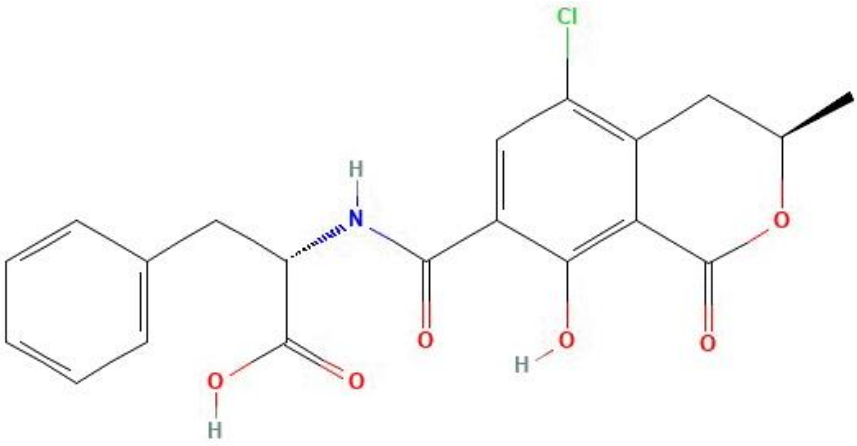
70-90 % relativne vlažnosti, temperaturu od 20-25 ^{o}C te a_v iznad 0,85. Skladišne plijesni prilagođene su razvoju na nižem stupnju vlažnosti i višim temperaturama (Rodrigues i sur., 2012.; Aldars-García i sur., 2018.). Mikotoksini su ponajviše prisutni u žitaricama, orašastim plodovima, kikirikiju, sušenom voću, kavi, sjemenkama uljarica, voću, začinima, grožđu, vinu i pivu (Ayalew, 2010.; Rodrigues i sur., 2012.; Marin i sur., 2013.; Varzakas, 2016.; Alshannaq i Yu, 2017.; Aldars-García i sur., 2018.; Welke, 2019.; Agriopoulou i sur., 2020.). Do njihove pojave u sirovinama ili namirnicama može doći u bilo kojem trenutku proizvodnog procesa (prije ili tijekom žetve, tijekom obrade sirovina ili prilikom njihova skladištenja) pri čemu se ljudi i životinje izlažu riziku unosa kontaminiranih proizvoda i pojavi mikotoksikoza (Winter i Pereg, 2019.).

Mikotoksikoze su akutna ili kronična oboljenja koja nastaju kao posljedica izloženosti mikotoksinima najčešće alimentarnim putem, no moguća je i izloženost inhalacijom ili putem kože (Bennett 1987.; Bennett i Klich, 2003.; Tola i Kebede, 2016.; Agriopoulou i sur., 2020.). Pri direktnoj izloženosti ljudi i životinja, mikotoksini mogu ispoljavati kancerogeni, mutageni, hepatotoksični, nefrotoksični, imunotoksični, teratogeni, neurotoksični i kardiotoksični učinak (Fink-Gremmels, 1999.; Peraica i sur., 1999.; Bennett i Klich, 2003.; Malir i sur., 2013.; Gayathri i sur., 2015.; Gupta i sur., 2017.). Uslijed nemogućnosti da se pojava mikotoksina u poljoprivrednoj proizvodnji i proizvodnji namirnica u potpunosti izbjegne, te s obzirom da se termičkom obradom sirovina i namirnica ne uspijevaju ukloniti svi mikotoksini, danas se s ciljem sprječavanja pojave mikotoksina u sirovinama i namirnicama u industrijskoj proizvodnji hrane, koriste razne strategije prevencije pojava plijesni i detoksikacija različitim biološkim, fizikalnim i kemijskim postupcima (Kumar i sur., 2017.; Ben Taheur i sur., 2019.). Prihvatljive količine mikotoksina u hrani regulirane su globalno od strane krovnih stručnih organizacija poput WHO (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins), EFSA (https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins), Američke agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration,* FDA) (https://www.fda.gov/food/chemicals-metals-pesticides-food/natural-toxins-and-mycotoxins) i Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng. *Food and Agriculture Organization of the United Nation,* FAO) (https://www.fao.org/common-pages/search/en/?q=mycotoxins). Nadalje, Europski sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (eng. *Rapid Alert System*

for Food and Feed, RASFF) (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff-food-and-feed-safety-alerts_hr) na tjednoj osnovi nadzire kontaminaciju sirovina i hrane mikotoksinima, čime je državama članicama omogućena pravovremena provedba odgovarajućih mjera s ciljem sprječavanja izlaganja ljudi i životinja proizvodima kontaminiranim mikotoksinima. Mikotoksini se redovito nalaze unutar 10 najznačajnijih prijetnji sigurnosti sirovina u proizvodnji hrane (Rodrigues i sur., 2012.). Prema izvještaju WHO-e iz 2016. god., u zemljama u razvoju, na dnevnoj osnovi prirodnim otrovima, uključujući mikotoksine, izloženo je više od 500 miliona ljudi (IARC, 2016.).

2.1.1 Okratoksin A (OTA)

Prema nomenklaturi IUPAC (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*), OTA je: L-fenilalanin-*N*-[(5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1*H*-2-benzopiran-7-il)karbonil]-(*R*)-isokumarin) ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) (slika 1) (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-A/). Otkriven je u Južnoj Africi 1965. god. kao toksični metabolit vrste *A. ochraceus* u kukuruzu inokuliranom tom vrstom plijesni (van der Merwe i sur., 1965.). Danas je poznato da OTA u poljoprivrednim kulturama i proizvodnim sirovinama proizvode različite vrste plijesni iz rodova *Penicillium* (*P. verrucosum, P. citrinum, P. aurantiogriseum, P. viridicatum i P. nordicum*) u umjerenim i hladnim klimatskim područjima, i *Aspergillus* (*A. ochraceus, A. niger i A. carbonarius*) u toplim i tropskim područjima (Rizzo i sur., 2002.; Ostry i sur., 2013.; Malir i sur., 2016.). Plijesni koje proizvode OTA najzastupljenije su u sušenom ili nagnjilom voću i povrću, sjemenju žitarica, orašastim plodovima, kavi, riži, začinima i grožđu. Nadalje, prisutnost OTA uslijed njegova dugog poluvijeka eliminacije ($T_{1/2}$) utvrđena je i u životinjskom mesu i mesnim prerađevinama podrijetlom od životinja hranjenih krmivima kontaminiranim mikotoksinima (Petzinger i Ziegler, 2000.; Malir i sur., 2016.).



Slika 1. Kemijska struktura okratoksina A, preuzeto s PubChem: (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-A/)

Osobitost OTA je njegova visoka stabilnost i otpornost na visoku temperaturu i kiseline, stoga, kada se sirovina njime kontaminira, praktički ga je nemoguće u potpunosti ukloniti (Petzinger i Ziegler, 2000.; El Khoury i Atoui, 2010.). Sterilizacijom vodenom parom pri 120 ^{o}C tijekom 3 h nije moguće ukloniti OTA iz sirovina (Trivedi i sur., 1992.), dok ga izloženost temperaturi pri 250 ^{o}C uništava samo djelomično (Boudra i sur., 1995.). Nadalje, ishodišna molekula OTA, kakvu stvaraju plijesni, može se tijekom vremena skladištenja sirovine ili prilikom prerade, uslijed bioloških ili kemijskih reakcija, ili kao posljedica metaboličke pretvorbe izmjeniti, čega posljedica može biti povećana toksičnost i/ili povećana izloženost toksičnim spojevima (El Khoury i Atoui, 2010.; Berthiller i sur., 2013.). Tako je uz OTA identificirano 28 njegovih derivata, koji nastaju prirodnim ili umjetnim putem, ili se formiraju u tijelu nakon njegove biotransformacije; neki od njih su deklorinirani analozi, etil esteri, hidroksilirani ili konjugirani, npr. sa glutationom, glukuronskom kiselinom ili pentozom (El Khoury i Atoui, 2010.; Malir i sur., 2016.).

2.1.1.1 Toksikološki značaj OTA

Iz zaključaka radne skupine EFSA-e, razvidno je da klimatski poremećaji sa posljedičnim porastom prosječnih temperatura, povišenom relativnom vlažnošću zraka, povećanjem količine oborina i porastom koncentracije ugljikova dioksida, osiguravaju

optimalne uvjete za pojačani rast i razvoj plijesni na uzgajanim poljoprivrednim kulturama, u postupku njihova skladištenja te u različitim proizvodnim fazama pri proizvodnji namirnica (https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins). U prehrani ljudi i životinja, na globalnoj razini, žitarice predstavljaju glavni izvor hranjivih tvari. Godišnji prinos žitarica u svijetu iznosi 2 milijarde tona, s tendencijom rasta proizvodnje (FAO, 1993.; FAO/WHO, 2001.; Eskola, 2002.). Prema podatcima Eskole i sur. (2020), incidencija OTA-pozitivnih uzoraka žitarica na globalnoj razini iznosi nešto manje od 50 %. Nadalje, Lee i Ryu (2017), u desetogodišnjem su razdoblju utvrdili incidenciju OTA u uzorcima neprerađenih sirovina (kukuruz, riža, ječam i pšenica), i to 20 % za Europu te 42 % za SAD. Unazad dvadesetak godina, razvojem suvremenih analitičkih metoda, utvrđeno je da 10-15 % ukupnog dnevnog unosa OTA u ljudi, dolazi od konzumacije vina (Otteneder i Majerus, 2000.; Cabañes i sur., 2002.; Shephard i sur., 2003.). U nekim vinima, moštovima i sokovima od grožđa utvrđene su koncentracije do 7 µg/L OTA (Zimmerli i Dick, 1996.; Bejaoui i sur., 2006.).

Kao posljedica navedenog, EFSA je 2020. godine na zahtjev Europske komisije pristupila izradi revidiranog mišljenja iz 2006. godine o zdravstvenim rizicima u prehrani, povezanima s prisutnošću i izloženošću OTA u sirovinama i namirnicama. Naime, dosadašnja istraživanja nedvojbeno su pokazala da je OTA nefrotoksičan, hepatotoksičan, embriotoksičan, teratogen, neurotoksičan, imunotoksičan, genotoksičan i kancerogen u mnogih vrsta sisavaca uz izražene spolne i vrstne razlike u osjetljivosti, pri čemu u glodavaca OTA uzrokuje razvoj tumora bubrega (Sava i sur., 2006.; Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007.; Malir i sur., 2013.). Na temelju istraživanja provedenih na različitim animalnim modelima, OTA je odlukom Međunarodne agencije za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer,* IARC) 1993. godine klasificiran kao potencijalni kancerogen u ljudi (skupina 2B) (IARC, 1993).

Potreba za izradom ažuriranog mišljenja stručne radne skupine nastala je zbog nedovoljno jasnih i nedvosmislenih podataka vezanih uz mehanizme nastanka tumora mokraćnog sustava, prvenstveno bubrega, bilo da se radi o direktnom ili indirektnom genotoksičnom učinku. Za procjenu zdravstvenog rizika u ljudi, problemu izloženosti OTA konzumacijom hrane, pristupilo se putem utvrđivanja prihvatljive granice izloženosti (eng.

Margin Of Exposure, MOE). Pri karakterizaciji patoloških promjena koje nisu neoplastične, utvrđena je $BMDL_{10}$ doza (eng. *Benchmark dose lower confidence limit*) od 4,73 µg/kg tjelesne mase (tj.m.) na osnovu lezija opaženih u bubrezima svinja, dok je pri karakterizaciji neoplastičnih učinaka utvrđena doza od 14,5 µg/kg tj.m. na osnovu tumorskih promjena u bubrezima laboratorijskih štakora. Prema podatcima EFSA-e (2020), procijenjeni prosječni kronični unos OTA u ljudi iznosi 0,6-17,8 ng/kg tj.m. Usporedbom količine OTA kojoj su pri kroničnoj izloženosti alimentarnim putem izloženi ljudi, sa $BMDL_{10}$ utvrđenoj na osnovu promjena koje nisu neoplastične, dolazi se do doze 200 puta niže od granice prihvatljive izloženosti, ukazujući tako na nizak zdravstveni rizik. Pri usporedbi s $BMDL_{10}$ utvrđenoj na osnovu neoplastičnih promjena, dolazi se do doze 10 000 puta niže od granice prihvatljive izloženosti; napomena je radne skupine da je nesigurnost ove procjene visoka te da je rizik moguće podcijenjen (EFSA, 2020).

2.1.1.2 Toksikokinetika OTA

Istraživanja provedena u različitih životinjskih vrsta, pokazala su da se OTA nakon oralnog unosa vrlo brzo apsorbira te da vršnu koncentraciju u krvi doseže u razdoblju od nekoliko sati. Na Sprague-Dawley štakorima muškog spola utvrđeno je, da je nakon jednokratne oralne adminitstracije OTA (doza: od 0,2 mg/kg tj.m.,), vršna koncentracija od 1,9 µg OTA/mL krvne plazme postignuta za 4,8 h, nakon čega je uslijedio pad koncentracije s poluvijekom eliminacije od 76 h (Han i sur., 2013.). Sustavna bioraspoloživost OTA u organizmu nakon pasivne difuzije iz želuca i proksimalnog jejunuma posljedica je njegova visokog afiniteta za nekovalentno vezivanje na proteine plazme, poglavito albumine. Nakon oralne administracije OTA (doza: 50 ng/g tj.m.) samo je 0,02 % OTA u ljudskoj, 0,08 % u krvi majmuna, te 0,1 % u krvi miša i svinja ostalo nevezano, dok je u krvi riba ostalo nevezano 22 % OTA (Hagelberg i sur., 1989.). Visok afinitet OTA za vezivanje na proteine plazme odgađa njegovu eliminaciju i ekskreciju te je uzrok njegovom dugom poluvijeku eliminacije u organizmu. Nakon jednokratne oralne administracije ^{3}H-OTA, brza eliminacija iz ljudske plazme s poluvijekom eliminacije od 20 h opažena je tijekom prvih 6 dana, nakon čega je uslijedila znatno sporija eliminacija s poluvijekom eliminacije od 35 dana (Studer-Rohr i sur., 2000.). Nadalje, u svom istraživanju, Mantle (2008) je utvrdio značajne razlike u trajanju poluvijeka eliminacije

OTA u različitih sojeva laboratorijskih štakora; u štakora soja Fischer vrijeme poluvijeka eliminacije OTA iznosilo je 8-10 dana, dok je u štakora soja Dark Agouti vrijeme poluvijeka eliminacije OTA iznosilo 2-3 dana. Istraživanje Kumagaija (1985) pokazalo je direktnu povezanost duljine trajanja poluvijeka eliminacije OTA s vezivanjem OTA na proteine plazme; u štakora s deficitom albumina vrijeme poluvijeka eliminacije OTA bilo je znatno skraćeno i koncentracija OTA u žuči i urinu bila je 20-70 puta viša u odnosu na koncentraciju u kontrolnih životinja.

Po unosu, OTA se distribuira po cijelom organizmu s time da koncentracija toksina u tkivima ovisi o vrsti životinje, apliciranoj dozi i dizajnu kinetičke studije. U većini provedenih istraživanja, najviše koncentracije toksina utvrđene su u bubrezima, zatim jetri i mišićima. U istraživanju Zepnika i sur. (2003), nakon jednokratne aplikacije OTA (doza: 0,5 mg/kg tj.m.), koncentracije OTA utvrđene u bubrezima štakora u tri vremenske točke (24, 48 i 72 h) bile su 40, 100 i 270 puta više od koncentracija utvrđenih u jetri. Nadalje, Han i sur. (2013) su utvrdili najvišu koncentraciju OTA u bubrezima, zatim plućima, jetri, srcu, slezeni i mozgu nakon jednokratne oralne administracije OTA (doza: 0,2 mg/kg tj.m.). U istraživanju na Dark Agouti štakorima oba spola, izloženih različitim koncentracijama OTA u hrani (2,5 do 100 μg/kg hrane) tijekom 28 dana, najviša koncentracija OTA nađena je u plućima, zatim jetri i najniža u bubrezima (Hadjeba-Medjdoub i sur., 2012.). Istraživanjem procjene transplancentarnog prijenosa ^{3}H-OTA *in vitro*, Woo i sur. (2012), utvrdili su da je transplacentarni prijenos OTA zanemariv. S druge pak strane, nekoliko studija pokazalo je da u štakora, miša i svinja dolazi do prijenosa OTA *in utero* (Ringot i sur., 2006.). Utvrđene razlike u prijenosu OTA *in utero* u različitim fazama graviditeta upućuju na važnost razvojnog stadija same placente koja posreduje prijenos OTA. Također, prisutnost OTA utvrđena je i u mlijeku ženki u laktaciji, ali u zanemarivim količinama (Ringot i sur., 2006.). U kravljem mlijeku koje se koristi u prehrani ljudi OTA je prisutan u tragovima, što je posljedica efikasne degradacije OTA putem mikroflore u probavnom sustavu preživača (Fink-Gremmels, 2008.).

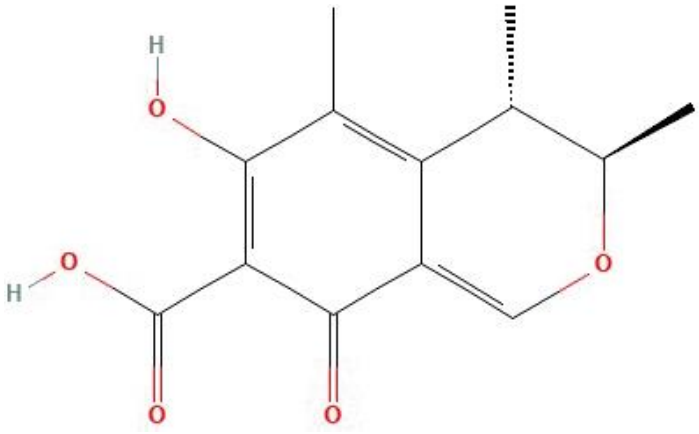
Glavni metabolit OTA je OTalfa (OTα), koji nastaje hidrolizom amidne veze između fenilalanina i dihidroizokumarinske kiseline, te se ne smatra toksičnim. Prvotno je utvrđen u cekumu i sadržaju debelog crijeva štakora. Vjeruje se da glavninom nastaje kao

posljedica djelovanja crijevnog mikrobioma u nepreživača i ljudi (Ali i sur., 2017.). Degradacija OTA u OTα katalizirana je brojnim hidrolazama, od kojih karboksipeptidaza A iskazuje najveću aktivnost. Iako se OTα djelomice resorbira u crijevima, ne akumulira se u bubrezima već se brzo izlučuje kao glukuronid putem urina (Wu i sur., 2011.). Hidroksilacija posredovana citokromom P450 pri kojoj nastaju 4-hidroksi-OTA i 10-hidroksi OTA, također je jedan od metaboličkih puteva OTA. Povrh navedenog, identificirani su i sljedeći metaboliti; OP-OTA, spoj koji iskazuje veću toksičnost od ishodišne OTA molekule, OTB, hidrokinon/kinon redoks par, te različiti konjugati (glutation-S konjugat te konjugati s heksozom, pentozom i glukuronskom kiselinom (Xiao i sur., 1996.; Li i sur., 2000.; Calcutt i sur., 2001.; Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2012.; Yang i sur., 2015.).

OTA i njegovi metaboliti izlučuju se primarno urinom i fecesom. U ljudi, glavni put izlučivanja je urinom, dok je u štakora glavni put izlučivanja preko žuči i fecesa (Dietrich i sur., 2005.). Oba načina izlučivanja su spora, zbog vezivanja OTA na proteine plazme te zbog niskog stupnja njegove metaboličke pretvorbe. Uslijed vezivanja na proteine plazme OTA se iz bubrega izlučuje prvenstveno tubularnom sekrecijom, nakon čega slijedi njegova ponovna reapsorpcija u distalnim dijelovima nefrona (Ringot i sur., 2006.). Jutabha i sur. (2011), utvrdili su da je prijenos OTA na BLM epitelnih stanica PK posredovan prijenosnicima Oat1 i Oat3, te da je njegovo izlučivanje na apikalnoj strani posredovano prijenosnicima MRP2 (eng. *Multidrug resistance-associated protein* 2) i NPT4 (eng. *Sodium-dependent phosphate transport protein 4*) znatno slabije, što doprinosi njegovom nakupljanju unutar stanice i posljedičnom razvoju nefrotoksičnosti.

2.1.2 Citrinin (CIT)

Prema IUPAC-u, CIT je: (3R, 4S)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3H2-benzopiran-7-karboksilna kiselina ($C_{13}H_{14}O_5$) (slika 2) (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citrinin). Citrinin uglavnom sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* (P*. citrinum, P. viridicatum, P. expansum i P. notatum*) te rodova *Aspergillus* i *Monascus* (Bennett 1987.; Bennett i Klich, 2003.).



Slika 2. Kemijska struktura citrinina, preuzeto s PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citrinin)

Citrinin je izoliran 1931. godine iz plijesni *P. citrinum,* te je zbog svojih izraženih antimikrobnih svojstava predložen za upotrebu u liječenju kao antibiotik (Hetherington i Raistrick, 1931.). Kasnijim istraživanjima na životinjama utvrđeno je da je nefrotoksičan, stoga je ideja o njegovom korištenju u terapijske svrhe napuštena (Ambrose i DeEds, 1946.). CIT najvećim dijelom nastaje nakon žetve u skladištenim žitaricama, ali može se pojaviti i u drugim proizvodima biljnog podrijetla; grahu, voću, voćnim sokovima, začinima te pokvarenim mliječnim proizvodima (EFSA, 2020). Za razliku od OTA, CIT je termolabilan te se pri temperaturi od 70 ^{o}C, termički razgrađuje na citrinin H1, koji iskazuje veću toksičnost od ishodišne molekule i citrinin H2, koji ne iskazuje značajnu citotoksičnost (Trivedi, 1993.; Trivedi i sur., 1993.; Xu i sur., 2006.).

2.1.2.1 Toksikološki značaj CIT

Prvo sveobuhvatno istraživanje o pojavnosti CIT provedeno je 1968. god. u Kanadi, na uzorcima žitarica povezanih sa respiratornim problemima otkrivenim kod radnika u postupcima skladištenja i obrade sirovine. Utvrđeno je da je 13 od 29 uzoraka žitarica sadržavalo CIT (0,07-80 mg/kg), te da su svi uzorci pozitivni na nalaz CIT bili ujedno kontaminirani i s OTA (Scott i sur., 1972.). Na području Jugoistočne Europe, gdje je CIT povezivan sa razvojem BEN-e, u ispitivanim uzorcima žitarica utvrđene su

koncentracije CIT i do 200 puta više od koncentracije OTA (Vrabcheva i sur., 2000). Nadalje, u uzorcima kukuruza iz endemskih područja u Bugarskoj utvrđena je kontaminacija s CIT u koncentracijama od 50-1500 µg/kg (Petkova-Bocharova i sur. 1991.). Također, u uzorcima različitih žitarica s područja Rusije namjenjenih proizvodnji stočne hrane, utvrđene su kontaminacije CIT u rasponu od 144-953 µg/kg (Kononenko i Burkin 2008.). Na području Zapadne Europe, istraživanja o pojavnosti CIT provedena su u Švicarskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu; koncentracije CIT u uzorcima pšeničnog brašna kretale su se u rasponu 0,3-0,7 µg/kg, dok su u uzorcima žitarica detektirane maksimalne koncentracije od 10 µg/kg (Dick i sur., 1988.; Scudamore i Hetmanski, 1995.). Nadalje, u Indiji, CIT je utvrđen u uzorcima riže u rasponu 12-55 µg/kg (Reddy i sur., 1983.), te u Africi, u uzorcima ječma u prosječnoj koncentraciji od 64 µg/kg (El-Sayed, 1996.). Osim u žitaricama, CIT je često utvrđen i u namirnicama poput graha (Petkova-Bocharova i sur., 1991.; Aziz i sur., 2006.), voću i voćnim sokovima (Ciegler i sur., 1977.; Vinas i sur., 1993.; Dietrich i sur., 2001.; Pepeljnjak i sur., 2002.), sirevima (Jarvis, 1983.), crnim maslinama (El Adlouni i sur., 2006.) i začinskom bilju (Saxena i Mehrotra, 1989.; Santos i sur., 2009.). Unatoč relativno malom broju studija o pojavnosti CIT pri usporedbi s drugim toksikološki značajnijim mikotoksinima, nedvojbeno se može zaključiti kako CIT predstavlja prijetnju ispravnosti sirovina u procesu skladištenja i naknadnoj proizvodnji namirnica i krmiva namijenjenih prehrani ljudi i hranidbi životinja.

Uz alimentarnu, moguća je i izloženost CIT putem inhalacije i/ili putem kože, osobito u zatvorenim prostorima. Opseg mogućih štetnih zdravstvenih posljedica uzrokovanih nekim od tih alternativnih puteva uglavnom je nepoznat (Mayer i sur., 2008). U studiji Tuomi i sur. (2000), pri analizi uzoraka različitih materijala korištenih u gradnji zatvorenih prostora (tapete, karton, drvo, gipsane ploče, pijesak, linoleum, poliuretanska izolacija i boje) s visokim postotokom vlage u zraku, uz CIT, utvrđeni su i brojni drugi mikotoksini poput sterigmatocistina, satratoksina, diacetoksiscirpenola, deoksinivalenola, verukarola i T-2-tetraola.

2.1.2.2 Toksikokinetika CIT

Specifični podatci o toksikokinetici CIT pri alimentarnoj izloženosti nisu dostupni. Po unosu u organizam, CIT se izlučuje uglavnom putem urina. U istraživanju Reddy i sur.

(1982) upotrebom ^{14}C-CIT, utvrđeno je da je eliminacija CIT bifazična; vrijeme poluvijeka eliminacije CIT u alfa fazi (brza) iznosilo je 1,95 h, a u beta fazi (spora) 39,7 h, tj. ~74 % radioaktivnosti utvrđeno je u uzorcima urina u prvih 24 h (Reddy i sur. 1982.). U zamoraca, akutna supkutana aplikacija CIT (doze: 50, 75 ili 100 mg/kg tj.m.) uzrokovala je uginuća uz kliničku sliku teške dispneje pri čemu su utvrđene brojne patološke promjene uključujući nekrozu bubrežnih tubula, akutni miokarditis i nekrozu sluznice želuca (Ambrose i DeEds, 1946.). U zečeva, utvrđena je LD_{50} (eng. *Letal Dose 50%*) od 20 mg/kg tj.m. uz izraženo suzenje i salivaciju te blage histopatološke promjene u bubrezima, dok su pri višim dozama (50-75 mg/kg tj.m.) utvrđena znatna oštećenja bubrežnih struktura (Ambrose i DeEds, 1946.). U miševa, Phillips i Hayes (1978) utvrdili su promjene u vidu masne degeneracije jetre uz pojačanu mitozu stanica jetrenog parenhima nakon tretmana s CIT (doza: 35 mg/kg tj.m.). U pokusnom modelu štakora utvrđen je LD_{50} pojedinačne supkutane aplikacije CIT koji iznosi 67 mg/kg tj.m. (Ambrose i DeEds, 1946). U štakora soja Sprague Dawley pri intraperitonealnoj aplikaciji CIT (doza: 50 mg/kg tj.m.), unutar 3 h nastupile su glukozurija i hematurija, a unutar 48 h degenerativne promjene u bubrezima (Jordan i sur., 1978b).

Mnogobrojne toksikološke studije provedene na različitim pokusnim modelima životinja, ukazale su na nedvojbenu nefrotoksičnost CIT u sisavaca. U zamoraca je pri oralnoj administraciji CIT tijekom 14 dana utvrđena LD_{50} od 43 mg/kg tj.m. za jedinke oba spola (Thacker i sur., 1977.). Također, nakon kratkotrajne ponovljene izloženosti CIT (doza: 50 mg/kg tj.m., i.p.), tri od pet zamoraca uginulo je nakon druge aplikacije, a histopatološki nalaz potvrdio je degenerativne promjene u bubrezima dužinom cijelog nefrona, izuzev glomerula (Carlton i Szczech, 1978.). U štakora izloženih hrani kontaminiranoj CIT (doza: nema podataka), utvrđene su degenerativne promjene PK bubrega (Friis i sur., 1969.; Krogh i sur., 1970.). Nasuprot tome, u istraživanju u kojem su štakori bili izloženi CIT tijekom 5 dana (doza: 18 mg/kg tj.m.), u bubrezima nisu opažene kliničke ni patohistološke promjene (Mantle i McHugh, 1993.). U pasa pasmine bigl hranjenih suhom hranom, u čijem se sastavu nalazilo 50 % riže kontaminirane CIT u koncentraciji 100 mg/kg, nakon 30 dana utvrđena je dehidracija i polidipsija uslijed poremećene funkcije bubrega (Carlton i sur., 1974.). Najznačajni pokazatelj toksičnog učinka CIT u pasa oralno tretiranih CIT (doza: 5 mg/kg tj.m./dan) bila je izrazito visoka

aktivnost laktat dehidrogenaze u urinu, prije pojave kliničkih znakova zatajenja bubrega (Carlton i sur., 1974.). U studiji subkronične toksičnosti, koja je za cilj imala utvrditi sigurnu koncentraciju CIT pri alimentarnoj izloženosti prehrambenom dodatku RMR (eng. *red mold rice*) koji se dobiva fermentacijom soja plijesni *M. ruber* (NTU 505) koja proizvodi CIT, štakori Wistar soja izloženi su putem hrane različitim dozama CIT (1, 2, 10, 20 i 200 mg/kg) tijekom 90 dana (Lee i sur., 2010.). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da dodatak RMR, koji sadrži 200 mg CIT/kg RMR-a (ekvivalent dozi od 20 µg CIT/kg tj.m./dan) nije nefrotoksičan, te je za štakore utvrđena tzv. NOAEL doza (engl. *No-observed-adverse-effect-level)* koja iznosi 20 µg CIT/kg tj.m./dan. (Lee i sur., 2010).

Dakle, CIT nedvojbeno iskazuje nefrotoksični učinak u sisavaca, a stupanj nefrotoksičnosti ovisi o nizu različitih čimbenika tijekom provedbe istraživanja; izboru pokusnog modela (vrsta, soj, spol i dob jedinki), doza CIT, način administracije (oralni, supkutani, intramuskularni i.p. i dr.), te frekvencija (jednokratna/ponovljena) i duljina trajanja izloženosti (akutna, subakutna, subkronična ili kronična,).

Uz opisane nefrotoksične učinke, utvrđeni su i toksični učinci CIT na imunološki sustav (Jordan i sur., 1978b.; Gupta i sur., 1983.; Mehdi i sur., 1983.; Reddy i sur., 1988.; Wichmann i sur., 2002.; Carvalho i sur. 2005.; Tammer i sur., 2007.), genotoksični i potencijalno kancerogeni učinci (Shinohara i sur.,1976.; Thust i Kneist, 1979.; Arai i Hibino, 1983.; Martin i sur., 1986.; Pfeiffer i sur. 1998.; Sabater-Vilar i sur., 1999.; Knasmüller i sur., 2004.; Dönmez-Altuntas i sur., 2007.), toksični učinci na reproduktivni sustav, te toksični učinci tijekom graviditeta odnosno u razdoblju razvoja fetusa (Hood i sur., 1976.; Vesela i sur., 1983.; Singh i sur., 2006., 2007.; Chan and Shiao, 2007.; Qingqing i sur. 2010.).

2.2 Nefrotoksičnost mikotoksina

Bubreg je, uz osnovnu funkciju regulacije tjelesne homeostaze, primarno ekskretorni organ kojeg se funkcije ispoljavaju putem: a) glomerularne filtracije, b) sekrecije različitih spojeva iz epitelnih stanica nefrona i c) reapsorpcije spojeva iz lumena bubrežnih kanalića u epitelne stanice odgovarajućih topografskih zona nefrona. Uslijed

složenosti bubrežnih funkcija, rana klinička dijagnostika nefropatija uzrokovanih mikotoksinima je teška, skoro pa i nemoguća. Stoga se razvojem suvremenih molekularno-bioloških i drugih analitičkih postupaka, pokušava u *in vitro* i *in vivo* uvjetima razjasniti način djelovanja mikotoksina, s naglaskom na vrstne i spolne razlike u nefrotoksičnosti karakterističnoj za nefropatije uzrokovane mikotoksinima. Važan čimbenik u nastanku nefrotoksičnosti uzrokovane mikotoksinima su specifični membranski prijenosnici obitelji SLC22/Slc22, tzv. OAT/Oat proteini koji posreduju prijenos niza endogenih (vitamini, hormoni, žučne soli, urati, metaboliti neurotransmitera i dr.) i egzogenih (lijekovi i njihovi metaboliti, teški metali, različiti toksini i mikotoksini) spojeva u formi OA, a koji u slučaju pretjeranog nakupljanja, mogu izazvati štetne učinke (Sekine i sur., 2000.; Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.; Sekine i sur., 2006.; Nigam, 2018.). Većina spomenutih prijenosnika lokalizirana je u epitelnim stanicama PK bubrega, čime taj odsječak nefrona predstavlja mjesto izrazito visokog rizika za ispoljavanje toksičnih učinaka različitih toksina uključujući i mikotoksine (Gekle i sur., 1998.; Tsuda i sur., 1999.; Jung i sur., 2001.; Zhang i sur., 2004.; Tachampa i sur., 2008.; Žlender i sur., 2009.).

Gotovo svi poznati mikotoksini iskazuju određeni nefrotoksični potencijal. U većini slučajeva nefrotoksičnost ovisi o dizajnu pokusa koji uključuje pokusni model (različite *in vitro* stanične linije *vs.* različiti animalni modeli *in vivo*), dozu mikotoksina, način administracije mikotoksina (oralni, supkutani, intramuskularni, intraperitonealni i dr.) te trajanje izloženosti (akutno, subakutno, kronično, subkronično i dr.), dok je u nekim slučajevima nefrotoksičnost sekundarna u odnosu na učinke mikotoksina u drugim tkivima, organima ili organskim sustavima (Bennett 1987.). U ovom radu istraženi su učinci OTA i CIT, za koje je brojnim provedenim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima pouzdano utvrđeno da svoj toksični učinak ispoljavaju u bubrezima.

2.2.1 Nefrotoksičnost OTA

OTA iskazuje relativno nisku akutnu toksičnost, uz značajne vrstne razlike u osjetljivosti; vrijednosti oralne LD_{50} kreću se u rasponu od 20-46 mg/kg tj.m. u štakora, te do 58 mg/kg tj.m. u miša, dok se u svinje, mačke, zeca i psa te vrijednosti kreću u rasponu 0,2-1 mg/kg tj.m. (FAO/WHO, 2001). S druge pak strane, od iznimnog su značaja

subkronična i kronična izloženost mikotoksinima u farmskih životinja u kojih se izloženost OTA smatra glavnim uzrokom nefropatija u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji (Krogh i sur., 1976.; Stoev i sur., 1998a.). Tako je u svinja opisana progresivna atrofija bubrežnih kanalića uz proliferativne promjene vezivnog tkiva i endotela krvnih žila, te je oboljenje nazvano Danska nefropatija svinja uzrokovana mikotoksinima (Krogh i sur., 1976.). Također, u svinja, uslijed izloženosti OTA, utvrđene su promjene različitih mjerenih parametara kao što su povišena koncentracija glukoze i proteina u urinu, povišena vrijednost leucil-aminopeptidaze i gama-glutamil transferaze, snižena razina kolesterola i proteina u serumu te snižen klirens kreatinina i specifične težine urina (Stoev i sur., 1998b.).

Nadalje, kronična izloženost OTA, smatra se i jednim od etioloških čimbenika u razvoju BEN-e i urotelnih tumora. BEN je kronična progresivna bolest bubrega, prvi put opisana kao endemska pojava 1950-ih godina u balkanskim zemljama Dunavskog sliva (Bugarska, Rumunjska i zemlje bivše Jugoslavije) (Pfohl-Leszkowicz i sur., 2007.; Stoev, 2017.). Prema podatcima WHO (1965), BEN je progresivan i postepeni gubitak funkcije bubrega s izrazito pogubnim ishodom, bez razvoja nefrotičnog sindroma i hipertenzije. Uz izraženu anemiju i blagu proteinuriju, javlja se i znatno umanjen kapacitet bubrega za koncentriranjem urina. Nadalje, BEN se opisuje kao intersticijska nefropatija neupalnog podrijetla, s teškim oštećenjima epitela kanalića, i tek u kasnijoj fazi bolesti prisutnim oštećenjima glomerula, koja mogu dovesti i do ekstremnog smanjenja mase bubrega. Terminalni stadij oboljenja uključuje izraženu fibrozu, posebice u kori bubrega gdje se mogu uočiti potpuni gubitak kanalića i mnogi fibrozni glomeruli (WHO, 1965.).

Sličnosti u patološkim promjenama opaženim pri BEN-i, tumorima urotela u ljudi i onih opaženih u svinja kronično izloženih OTA, potakle su provedbu brojnih istraživanja s ciljem rasvjetljavanja povezanosti izloženosti OTA i nastanka bubrežnih oboljenja. Dvogodišnjim istraživanjem na štakorima potvrđena je uzročno posljedična povezanost izloženosti OTA i nastanka tumora u bubrežnoj kori; u 60 % mužjaka utvrđeni su karcinomi bubrega te različite patološke promjene u ravnim odsječcima PK (odsječci S3), dok je u ženki utvrđena značajno niža incidencija tumora (6 %) uz niži opseg oštećenja ravnih odsječaka PK (Boorman, 1989.; Boorman i sur., 1992.; Rasonyi i sur., 1999.).

Hiperplastične promjene uočene su nakon devet mjeseci izloženosti, dok je dugotrajnija izloženost rezultirala malignim promjenama, najčešće obostrano i na više različitih mjesta u kori bubrega, dok u prijelaznom epitelu bubrežne zdjelice i okolnim strukturama nisu utvrđeni tumori urotela i/ili preneoplastična oštećenja (Boorman, 1989.; Boorman i sur., 1992.; Rasonyi i sur., 1999.). Za razliku od štakora, u miševa izloženih OTA tijekom 2 god. (doza: 4800 mg/kg tj.m./dan), tumori su utvrđeni u 28 % mužjaka, dok je kod ženki pojava tumora izostala (Bendele i sur., 1985.).

Točan mehanizam toksičnog djelovanja OTA, kao i pozadina uočenih vrstnih i spolnih razlika trenutno još nisu razjašnjeni. Ranija istraživanja pokazala su da je OTA supstrat za prijenos putem membranskih prijenosnika Oat/Slc22 (Stein i sur., 1985.; Sokol i sur., 1988.). Naknadna istraživanja Groves i sur. (1988) pokazala su da je nakupljanje OTA u epitelnim stanicama PK zeca, posljedica kombinacije pasivne difuzije, nespecifičnog vezivanja kao i prijenosa putem različitih specifičnih prijenosnika. Studija provedena na stanicama PK bubrega miša, stabilno transfeciranih s hOAT1 i hOAT3, pokazala je da je nakupljanje ^{3}H-OTA saturabilan, o dozi i vremenu ovisan proces, koji se odvija na BLM epitelnih stanica PK (odsječci S2 i S3) (Jung i sur., 2001); K_m vrijednosti utvrđene za hOAT1 i hOAT3 u ovom istraživanju bile su 2-3 puta više u odnosu na one objavljene u ranijim studijama Grovesa i sur. (1988). Daljna istraživanja pokazala su postojanje alternativnih sustava prijenosa visokog afiniteta i kapaciteta za ulazak OTA u stanice sisavaca, uz već postojaći sustav prijenosa posredovan membranskim prijenosnicima obitelji SLC22/Slc22. Tako su Heussner i sur. (2002) pokazali da se u prisustvu kompetirajućih spojeva onemogućava vezivanje ^{3}H-OTA na OAT, iako se detektira visoka unutarstanična koncentracija ^{3}H-OTA u homogenatima bubrega sisavaca. Nadalje, potvrđene su vrstne razlike u kapacitetu nakupljanja OTA unutar stanice, koji je u korelaciji sa stupnjem toksičnosti, pri čemu je onaj u čovjeka najviši, nakon kojeg slijede štakor, svinja i miš (Heussner i sur., 2002.). U istraživanju O'Brien i sur. (2001), utvrđeno je da primarne stanične linije PK podrijetlom od svinja i štakora, nakupljaju više OTA od kontinuiranih linija istog tipa stanica. Nadalje, u istoj studiji utvrđeno je da primarna stanična linija epitela PK podrijetlom od ljudi, nakuplja 10-15 puta više OTA od drugih staničnih linija (LLC-PK1, NRK-52E, NRK-49F) (O'Brien i sur. 2001). Osobita je zanimljivost navedenog istraživanja ta da je stanična linija NRK-49F (fibroblasti

bubrega štakora), nakupila količine OTA usporedive s onima nakupljenim u staničnoj liniji NRK-52E (epitelne stanice bubrega štakora), s time da je linija NRK-49F pokazala relativnu neosjetljivost na učinak OTA. Zaključak je autora istraživanja, da su fibroblasti refraktorni na toksični učinak OTA, dok su epitelne stanice bubrežnih kanalića znatno osjetljivije, čega je posljedica izražena proliferacija fibroblasta koja dovodi do postepene i progresivne zamjene oštećenih kanalića fibroznim tkivom karakterističnim za BEN (O'Brien i sur. 2001).

Podatci o molekularnim mehanizmima toksičnosti OTA još uvijek nisu dostatni u smislu izvođenja jasnih i nedvosmislenih zaključaka. Dostupna literatura opisuje širok spektar zbivanja na molekularnoj razini, kao potencijalnih uzroka razvoja ranije opisanih oštećenja epitelnih stanica PK. Brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama utvrđene su nakon tretmana OTA promjene u staničnim signalnim putevima uključujući modulaciju MAPK (eng. *Mitogen-activated protein kinases*), osobito ERK 1/2 (eng. *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*), JNK (eng. *c-Jun*-NH2 terminal kinase) i p38 koji su uključeni u regulaciju upalnih, apoptotskih i fibrotičnih procesa (Sauvant i sur., 2005.; Wang i sur., 2012.; Darif i sur., 2016.; Huang i Chan, 2016.; Raghubeer i sur. 2017.). U svinja tretiranih OTA u hrani, uz snižen antioksidativni kapacitet, povišenu aktivnost p38, pojačanu fosforilaciju ERK 1/2, utvrđena je i povišena ekspresija gena uključenih u procese autofagije (Gan i sur., 2017.). U bubrezima štakora i miša, utvrđena je o dozi OTA ovisna stimulacija stanične proliferacije (Rached i sur., 2007.; Qi i sur., 2014.; Bondy i sur., 2015.; Zhu i sur., 2016.), a pojačan proliferativni odgovor povezan je s promjenama u ekspresiji gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i oštećenja DNA (Rached i sur., 2007.; Adler i sur., 2009.; Taniai i sur., 2014.). Nadalje, u mnogim studijama istraživani su učinci OTA na promjene u ekspresiji različitih gena, osobito onih uključenih u upalne i fibrotične procese, te u procese maligne transformacije i epitelno-mezenhimalne tranzicije; u stanicama HepG2 opažena je pojačana ekspresija gena povezanih s upalnim odgovorom, oksidativnim stresom, staničnim metabolizmom i metabolizmom ksenobiotika (Hundhausen i sur., 2008.). U analizi transkriptoma stanica PK ljudi i štakora, Jennings i sur. (2012) utvrdili su promjene ekspresije velikog broja gena povezanih s citoskeletom, regulacijom nukleosoma, translacijom, transkripcijom, ubikvitinacijom i staničnim ciklusom. Istraživanje Arbillaga i sur. (2008), provedeno na

štakorima tretiranim OTA, pokazalo je da su promjene u ekspresiji gena u bubrezima izraženije od onih utvrđenih u jetri; razina ekspresije gena uključenih u oksidativni stres te homeostazu kalcija, bila je niža, dok je razina ekspresije gena usmjerenih ka preživljenju stanice i proliferaciju bila viša. U procjeni čimbenika uključenih u citotoksičnost OTA korišten je između ostalih i proteomski pristup pri čemu su utvrđeni porast ekspresije mitohondrijskih proteina uključenih u prijenos elektrona, sintezu proteina, odgovor na stres, apoptozu i modulacija proteina uključenih u upalni proces (Ferrante i sur., 2006.; Shen i sur., 2013.). U nastanku oštećenja stanica uzrokovanih toksičnim učinkom OTA značajnu ulogu ima i oksidativni stres. U staničnoj liniji PK bubrega svinje (LLC-PK1), OTA je povisio vrijednosti reaktivnih kisikovih spojeva, te snizio aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i ekspresiju glutation s-tranferaze (GST) povezane sa sniženom aktivacijom Nrf-2 (eng. *Nuclear factor erythroid 2-related factor*) (Bosch-Saadatmandi i sur., 2008., 2009.). U staničnoj liniji PK15 bubrega svinja tretiranoj sa OTA, Klarić i sur. (2014) utvrdili su sniženje omjera glutation (GSH)/glutation disulfida (GSSG) i ukupnih tiola. Oksidativni stres utvrđen je u svinja i štakora u vidu promjene aktivnosti SOD, povišenih vrijednosti proteinskih karbonila i modulacije ekspresije gena uključenih u odgovor na oksidativni stres te sniženje ekspresije gena za markere upalnog odgovora (interleukin (IL)-6, IL-8, IL-12, IL-17A, IL-18 – kolon; IL-17A i IL-10-bubreg) (Domijan i sur., 2006.; Zhang i sur., 2016.). Nadalje, utvrđena je povezanost oksidacijskog stresa i gubitka membranskog potencijala mitohondrija s posljedičnom apoptozom (Liang i sur., 2015.; Wang i sur., 2017). Također, istraživanja Marin i sur. (2017a,b) pokazala su pozitivnu korelaciju modulacije ekspresije gena funkcionalno povezanih sa nekrozom, proliferacijom, displazijom, hipoplazijom i zatajenjem bubrega. Iz navedenog, može se zaključiti da su epitelne stanice PK osobito osjetljive na toksični učinak OTA, ponajprije zbog postojanja sustava aktivnog prijenosa OTA u unutrašnjost stanica putem membranskih prijenosnika OA (Slc22/Oat), ali i uslijed promjena u ekspresiji gena/proteina uključenih u procese regulacije signalnih puteva povezanih s apoptotskim, upalnim i fibrotičnim odgovorima stanica na stres, te onih uključenih u procese proliferacije, diobe, preživljenja i smrti stanice.

2.2.2 Nefrotoksičnost CIT

U istraživanju Arai i Hibino (1983), u kojem su ispitivani učinci CIT pri kroničnoj izloženosti štakora, utvrđene su značajne degenerativne promjene u bubrezima. Spolno zreli štakora soja F344 izloženi su CIT putem hrane za glodavce *ad libitum* (doza: 1000 mg/kg hrane); unos hrane u količini od 20 g/dan/životinji odgovarao je unosu od 70 mg CIT/kg tj.m. Tijekom periodičkih usmrćivanja (nakon 32, 40, 60 i 80 tjedana) uočen je gubitak tjelesne mase, te porast omjera mase bubrega i jetre naspram mase tijela u životinja izloženih CIT, dok je u kontrolnih životinja izloženih uobičajenoj hrani takav učinak izostao. Uz povećanje mase bubrega utvrđena je opsežna dilatacija PK, koloidni odljevci u lumenu bubrežnih kanalića, intersticijska fibroza kao posljedica intersticijskog nefritisa i žarišna hiperplazija kanalića. Nakon četrdesetog tjedna izloženosti, u svih životinja utvrđeni su žarišna hiperplazija epitela kanalića i mali adenomi. Veći benigni adenomi bubrega utvrđeni su nakon šezdesetog tjedna izloženosti, uz pojavu bistre i tamne stanične citoplazme, s dilatacijama glatkog i grubog endoplazmatskog retikuluma dok u kontrolnih životinja tumori bubrega ili drugih organa nisu utvrđeni (Arai i Hibino, 1983.).

Klinički, zatajenje bubrega kao posljedica toksičnog djelovanja CIT, manifestira se pojačanim lučenjem razrijeđenog urina, uslijed poremećaja funkcionalnog kapaciteta bubrega za postizanjem optimalne koncentracije urina. Nadalje, prisutne su i promjene u vidu smanjenog stupnja glomerularne filtracije i smanjenog protoka krvi kroz bubreg, čega je posljedica povišenje vrijednosti određenih biokemijskih parametara u krvi (urea, laktat dehidrogenaza, alanin aminotransferaza i isocitrat dehidrogenaza). Uz navedeno, prisutni su i proteinurija, glukozurija, niža specifična težina urina te nalaz nekrotičnih stanica u sedimentu urina (Jordan i sur.,1978a; Lockard i sur.,1980.; Kogika i sur.,1996.). Opisane funkcionalne promjene povezane su sa razvojem akutne tubularne nekroze. Lokalizacija najizraženijih promjena u bubrežnim kanalićima razlikuje se u ovisnosti o vrsti na kojoj je provedeno *in vivo* istraživanje. U miša i hrčka, patološkim promjenama prvenstveno su zahvaćeni distalni kanalići (Jordan i Carlton, 1977.; Jordan i sur., 1978a), dok se u štakora, zeca, zamorca i svinja najizraženije promjene primjećuju u PK bubrega (Ambrose i DeEds,1946.; Krogh i sur.,1973.; Thacker i sur.,1977.; Jordan i sur.,1978b.; Lockard i sur.,1980.). Unatoč razlikama u lokalizaciji primarnih promjena u bubrežnim

kanalićima, histopatološki nalazi u svih vrsta pokazuje slične promjene; nekrozu i deskvamaciju epitela kanalića, zadebljanje bazalne membrane, dilataciju kanalića i proliferativne promjene intersticija. Istraživanje Hanika i Carltona (1983) provedeno na zečevima, pokazalo je, da oštećenje bubrežnih struktura nije progresivno, te da je reverzibilno. Regenerativne promjene bubrežnih kanalića, opažene su trećeg dana po prestanku izloženosti, dok je potpuni oporavak oštećenih struktura nastupio nakon 7 dana (Hanika i Carlton, 1983.). Osobito je zanimljivo opažanje Jordana i Carltona (1977), da je brojnost i intenzitet degenerativnih promjena izazvanih CIT u pozitivnoj korelaciji sa primjenjenom dozom, s time da višestruka aplikacija iste doze, ne uzrokuje promjene u broju, intenzitetu i karakteru opaženih promjena te ne uzrokuje porast mortaliteta pokusnih životinja. Hanika i Carlton (1983.) za ovaj su fenomen ponudili dva moguća tumačenja; prvo je da su stanice osjetljive na CIT pri administraciji inicijalne doze uništene, stoga svaka sljedeća doza u tom smislu neće imati učinka, dok drugo, vjerojatnije tumačenje, ide u smjeru indukcije regulacijskih enzimskih sustava potrebnih za detoksikaciju i bržu metaboličku pretvorbu i izlučivanje CIT.

Istraživanja molekularnih mehanizama toksičnosti CIT glavninom su provedena u *in vitro* sustavima. Inhibicija sinteze RNA (eng. *Ribonucleic acid*) i DNA (eng. *Deoxiribonucleic acid*) pri izloženosti CIT utvrđena je u različitim staničnim linijama sisavaca (Yoneyama i Sharma, 1987.; Wasternack i Weisser, 1992.). Uz inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina, glavnim uzrocima nastanka oštećenja u biološkim sustavima uslijed izloženosti CIT *in vitro*, smatraju se oksidativni stres te modifikacije ekspresije gena/proteina uključenih u antioksidativni i proupalni odgovor (Ribeiro i sur., 1997.; Johannessen i sur., 2007.; Máté i sur., 2014.). U stanicama kvasca i staničnim linijama *in vitro*, CIT uzrokuje pojavu reaktivnih kisikovih spojeva i superoksidnog aniona te apoptozu povezanu s poremećajima funkcije mitohondrija (Chagas i sur., 1995.; Pelicano i sur. 2003.). U staničnoj liniji promijelocitne leukemije ljudi (HL-60) i bubrega svinje (PK15), CIT je uzrokovao apoptozu povezanu sa aktivacijom kaspaze -3, -6, -7 i -9, te apoptozu povezanu sa poremećajima prijenosa kalcija unutar mitohondrija (Šegvić i sur., 2012. Na stanicama kvasaca, CIT je inducirao porast ekspresije različitih gena uključenih u antioksidativni odgovor (Vanacloig-Pedros i sur., 2016.). Na embrionalnim matičnim stanicama (ESC-B5), CIT je uzrokovao apoptozu putem pojačanog stvaranja reaktivnih

kisikovih spojeva, povećanjem omjera Bax/Bcl-2 proteina te gubitkom membranskog potencijala mitohondrija (Chan, 2007.). Porast vrijednosti različitih markera oksidativnog stresa (reaktivnih kisikovih spojeva, proteinskih karbonila, pojačanu ekspresiju p53, p21/waf1, pojačanu aktivnost kaspaze 9) utvrđen je i u staničnoj liniji kože miševa nakon jednokratne topikalne aplikacije CIT (Kumar i sur., 2011.). Sumarno, iz dostupne literature može se zaključiti da CIT iskazuje toksičnost djelovanjem na niz staničnih procesa kao što su inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, promjene u funkciji mitohondrija, povećanje proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva, deregulacija unutarstaničnih signalnih puteva te aktivacija kaspaznih sustava odgovornih za apoptozu stanica.

2.2.3 Istovremena izloženost kombinaciji OTA i CIT

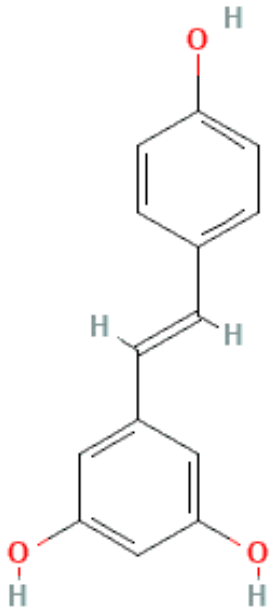
Karakteristika je mnogih *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta (prvenstveno *A. ochraceus* i *P. verrucosum*) istovremeno stvaranje OTA i CIT, a u ovisnosti o okolišnim čimbenicima i karakteristikama supstrata na kojem se plijesan razvija. Kako se u prirodnim uvjetima iznimno rijetko pojavljuje isključivo jedan mikotoksin, nameću se pitanja o međudjelovanju istovremeno prisutnih mikotoksina, te učincima tih međudjelovanja u smislu njihova nefrotoksičnog potencijala. Začeci istraživanja toksikoloških koncepata sinergizma (aditivnosti i potencijacije) i antagonizma mikotoksina, započeli su 1976. god. istraživanjem o istovremenoj izloženosti mikotokisna (OTA+CIT) u pokusnom modelu miševa; smrtnost u miševa izloženih trodnevnoj intraperitonealnoj aplikaciji kombinaciji mikotoksina bila je viša od smrtnosti pri izloženosti pojedinačnom mikotoksinu (Sansing i sur., 1976.). Nasuprot tome, istraživanja u eksperimentalnoj tumorigenezi ukazuju na izostanak sinergističkih učinaka mikotokisna (OTA+CIT) (Kanisawa, 1984.). Nadalje, objavljeni podatci ukazuju da se sinergizam pri interakciji OTA i drugih mikotoksina može javiti kao aditivni učinak ili kao antagonizam, a u ovisnosti o biološkom sustavu koji je rabljen kao pokusni model (Pohland i sur. 1992.). U istraživanju Braunberga i sur. (1994) ispitani su pojedinačni i združeni učinci CIT i OTA na prijenos iona tetraetilamonija (TEA) i para-aminohipurata (PAH) te sintezu proteina iz ^{3}H-leucina u kori bubrega *in vitro*; dobiveni rezultati bili su nekonzistentni, te nisu išli u prilog tezi o sinergističkom učinku CIT pri kombinaciji OTA i CIT. Istraživanja Heussner i sur. (2006) pokazala su da

sinergistički učinak mikotokisna (OTA+CIT) na staničnoj liniji bubrega (LLC-PK) *in vitro* nastupa samo pri visokim dozama CIT. U istraživanju Bouslimi i sur. (2008a) istraženi su pojedinačni i združeni učinci OTA i CIT na kromosomske aberacije u stanicama koštane srži miša nakon i.p. administracije dozama koje odgovaraju 2, 4 ili 8 % njihove LD_{50} vrijednosti. Utvrđeno je, da je odgovor na učinak kombinacije mikotoksina (OTA+CIT) pri najnižoj dozi jednak zbroju vrijednosti odgovora na učinke pri pojedinačnoj izloženosti (aditivni učinak), dok je pri višim dozama odgovor na potencijalno sinergistički učinak kombinacije mikotoksina izostao, čak štoviše, nisu postignute niti vrijednosti odgovora koje bi išle u prilog aditivnosti utvrđenoj pri najnižoj dozi (Bouslimi i sur., 2008a). Ista skupina autora utvrdila je sinergistički učinak mikotoksina (OTA+CIT) u vidu porasta vrijednosti malondialdehida (MDA) i ekspresije Hsp 70 (eng. *Heat shock protein 70*) te inhibiciju vijabilnosti stanične linije bubrega (Vero) *in vitro* (Bouslimi i sur., 2008b). U istraživanju provedenom na staničnoj liniji epitela PK ljudi (HK-2), Schulz i sur. (2018) pokazali su da izloženost stanica kombinaciji mikotokisna (OTA+CIT) pri nanomolarnim koncentracijama dovodi do porasta glasničke RNA (eng. *messenger ribonucleic acid;* mRNA) i proteina za TNF (eng. *Tumor necrosis factor)*, sniženja mRNA/proteina za COX-2 (eng. *Cyclooxygenase-2*), sniženja proteina E-kadherina te porast proteina vimentina i α-SMA (eng. *alpha Smooth muscle actin*). Nadalje, utvrđene su morfološke promjene stanica, u vidu epitelno-mezenhimalne tranzicije, odnosno promjene oblika stanice iz okruglastog u vretenasti oblik, te porast ekspresije unutarstaničnog i izvanstaničnog kolagen 3 proteina (Schulz i sur., 2018.). Navedeni podatci ukazuju da učinci kombinacije mikotoksina (OTA+CIT) nisu jasni i jednoznačni, što upućuje na potrebu provedbe daljnjih istraživanja združenih učinaka mikotoksina s ciljem potpunijeg razumijevanja etiopatogeneze nefropatija nastalih kao posljedica izloženosti mikotoksinima.

2.3 Resveratrol

Prema nomenklaturi IUPAC, RSV je: 5-[(*E*)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol ($C_{14}H_{12}O_3$) (slika 3) (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol). RSV je polifenol koji pripada skupini stilbenoida (3,4′,5-trihidroksi-trans-stilben), prvi put je izoliran iz čemerike *Veratrum grandiflorum* 1940. god., a kasnije je pronađen u više od 70 biljnih vrsta od kojih je najveća koncentracija pronađena u biljci japanski dvornik

(*Polygonum cuspidatum*) (Salehi i sur., 2018.). Utvrđeno je da oštećeni i ultraljubičastim zrakama izloženi dijelovi biljaka stvaraju RSV u visokim koncentracijama te da spojevi poput stilbena biljkama pružaju određeni stupanj mikrobiološke zaštite (Langcake i McCarthy, 1979.; Bavaresco i sur., 1997.).



Slika 3. Kemijska struktura resveratrola, preuzeto s PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol/)

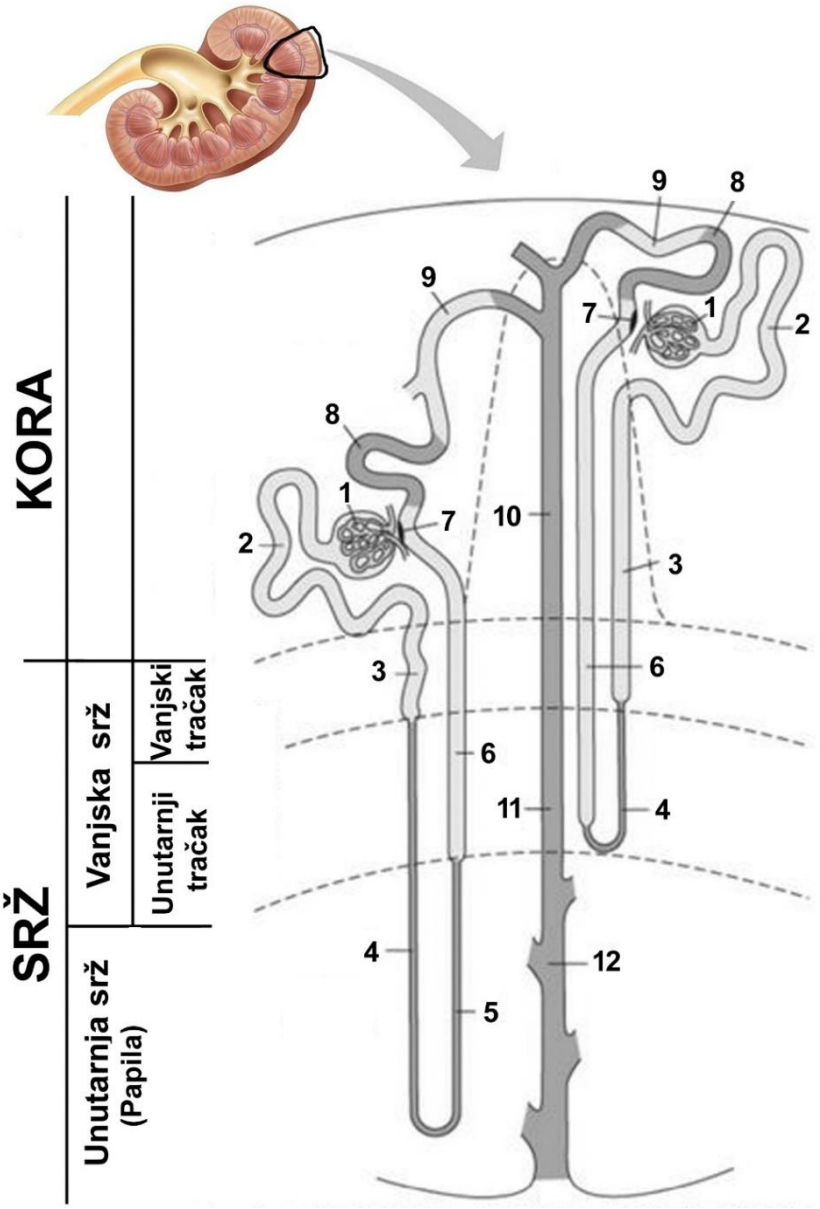
Unazad tridesetak godina, interes istraživača usmjeren ka istraživanju RSV je porastao uslijed njegova farmakološkog potencijala, posebice nakon što je njegova prisutnost utvrđena u vinovoj lozi (*Vitis vinifera*), odnosno grožđu i crnom vinu (Siemann i Creasy, 1992.; Salehi i sur., 2018). Takozvani „Francuski paradoks“, opažanje koje karakterizira niska stopa oboljenja i smrtnosti stanovnika juga Francuske od srčanih i krvožilnih bolesti, unatoč prehrani bogatoj zasićenim mastima, povezuje se sa svakodnevnom konzumacijom crnog vina (dvije-tri čaše) bogatog RSV (koncentracije od 0,1–14,3 mg/L) (Constant, 1997.). Stoga se brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama nastoji procijeniti blagotvorni učinak RSV u različitim patofiziološkim procesima u stanicama sisavaca. Iako se RSV u prirodi pojavljuje kao *cis* i *trans* izomer, u većini provedenih studija korišten je *trans*-RSV uslijed nestabilnosti molekule *cis*-RSV; cis-izomerizacija

javlja se kao posljedica izloženosti *trans*-RSV umjetnom ultraljubičastom ili dnevnom svjetlu (Ribeiro i sur., 1999.). I u ovom doktorskom radu istraživan je učinak *trans*-RSV, pa će se u daljnjem tekstu skraćenica RSV odnositi na *trans*-izomer osim ako nije drugačije navedeno. Istraživanjima je utvrđena sposobnost RSV da inhibira peroksidaciju lipida stanične membrane, snižava koncentraciju lipoproteina niske gustoće i inhibira agregaciju trombocita (Kimura i sur., 1985.; Frankel i sur., 1993.; Fauconneau i sur., 1997.). Također, utvrđeno je da RSV iskazuje kemoprotektivni učinak i inducira apoptozu kod leukemije i karcinoma mliječne žlijezde (Jang i sur., 1997.; Mgbonyebi i sur., 1998.; Lu i Serrero, 1999.). Kimura i sur. (1985) utvrdili su da RSV inhibicijom ciklo-oksigenaze-1 i hidroksiperoksidaze iskazuje protuupalna svojstva. Unatoč brojnim opisanim pozitivnim biološkim učincima, primjena RSV ograničena je uslijed njegove niske topivosti i stabilnosti, visokog stupnja metaboličke konverzije te niske biodostupnosti (Amri i sur., 2012.; Gescher i Steward, 2003.). Bertelli i sur. (1996) utvrdili su značajne koncentracije RSV u plazmi i ostalim tkivima štakora pri kratkotrajnoj i dugotrajnijoj izloženosti crnom vinu sa poznatom koncentracijom RSV (6,5 mgL^{-1}); utvrđeno je da se RSV brzo apsorbira i doseže vršnu koncentraciju nakon otprilike 60 min po administraciji. Intragastričnom aplikacijom ^{3}H-RSV u štakora, Soleas i sur. (2001) utvrdili su slabi pad razine radioaktivnosti u serumu sugerirajući time postojanje različitih metabolita RSV. Istraživanja apsorpcije i metabolizma RSV na izoliranim tankim crijevima štakora, pokazala su da se RSV prilikom prelaska iz crijeva u krv dijelom apsorbira u formi glukuronida (Andlauer i sur., 2000.; Kuhnle i sur., 2000.). Nedugo potom, Marier i sur. (2002) potvrđuju ulogu crijeva u presistemskoj glukuronidaciji, značaj enterohepatičke recirkulacije konjugata RSV i farmakološke aktivnosti tih konjugata. U Wistar štakora izloženih različitim koncentracijama RSV u hrani (doza: 50-300 mg/kg tj.m./dan) tijekom 8 tjedana, utvrđena je metabolička konverzija RSV, tj. prisutnost različitih metabolita RSV (RSV-3-sulfat, RSV-49-sulfat, RSV-3,5-disulfat, RSV-3,49-disulfat, RSV-3,49,5-trisulfat, RSV-3-O-b-D-glukuronid i RSV-aglikon). U štakora tretiranih najnižom dozom RSV (50 mg/kg tj.m./dan), utvrđen je porast ukupne antioksidativne aktivnosti (19 %) te izostanak kemopreventivnog učinka za enzime faze 1 i faze 2 biotransformacije (Wenzel i sur., 2005.). Između ostalog, utvrđeno je da RSV u visokim dozama iskazuje nefrotoksičan učinak u bubrezima štakora izloženih dozama RSV od 300, 1000 i 3000 mg/kg tj.m./dan

tijekom 4 tjedna; spomenutim istraživanjem utvrđena je NOAEL doza za štakore od 300 mg/kg tj.m./dan (Crowell, 2004.).

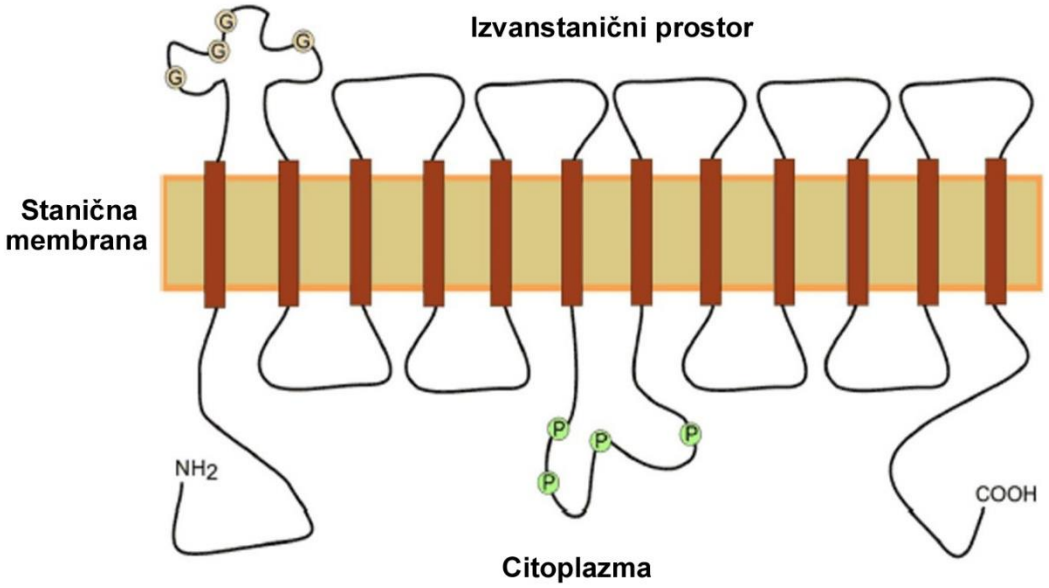
2.4 Obitelj membranskih prijenosnika otopljenih tvari 22

Primarna uloga bubrega, uz održavanje tjelesne homeostaze, jest učinkovito uklanjanje suvišnih produkata metabolizma i ksenobiotika iz cirkulacije, ograničavajući time izloženost organizma štetnim učincima različitih toksičnih i potencijalno toksičnih spojeva neovisno o njihovu podrijetlu. Izlučivanje suvišnih endogenih i egzogenih spojeva putem bubrega, u prvom redu podrazumijeva funkcije glomerularne filtracije i sekrecije koja se odvija u odgovarajućim kanalićima nefrona razmještenim u specifičnim zonama bubrega (slika 4.). Spojevi molekularne mase 50-65 kDa uspješno prolaze glomerularno sito pri formiranju primarnog urina, dok se veći i/ili nabijeni spojevi uklanjaju sekrecijom posredovanom specifičnim membranskim prijenosnicima (Koepsell i Endou, 2004.; Brater i Hall, 2008.; Nigam, 2018.) smještenim u epitelnim stanicama zavijenih PK (odsječci S1 i S2) u bubrežnoj kori i ravnih PK (odsječci S3) u vanjskom tračku vanjske srži bubrega (slika 4). U bubrezima sisavaca pronađeni su membranski prijenosnici koji pripadaju različitim obiteljima unutar glavne obitelji prijenosnika MFS (eng. *Major facilitator superfamily*) (Koepsell i Endou, 2004.; Wright i Dantzler, 2004.).



Slika 4. Shematski prikaz poprečnog presjeka bubrega. Osnovne građevne jedinice bubrega su nefroni. Prikazana su dva nefrona: jukstamedularni (lijevo) i kortikalni (desno). Nefroni formiraju glavne zone bubrega uključujući koru i srž. Srž bubrega dijeli se na vanjsku i unutarnju srž (papila), a u vanjskoj srži dodatno razlikujemo vanjski i unutarnji tračak. Odsječci nefrona označeni su brojevima: 1 – glomeruli, 2 – zavijeni proksimalni kanalići (odsječci S1 i S2), 3 – ravni proksimalni kanalići (odsječci S3), 4 – tanki silazni kraci Henleove petlje, 5 – tanki uzlazni kraci Henleove petlje, 6 – debeli uzlazni kraci Henleove petlje, 7 – gusta pjega, 8 – zavijeni distalni kanalići, 9 – vezni kanalići, 10 – sabirni kanalići kore, 11 - sabirni kanalići vanjske srži, 12 – sabirni kanalići unutarnje srži. Preuzeto i modificirano prema Kriz i sur. (1988.).

Jedna od njih jest obitelj SLC22/Slc22 koju sačinjava više od 20 različitih članova eksprimiranih u bubrezima, jetri, crijevima i ostalim tkivima sisavaca, a koji su svrstani u nekoliko podobitelji kao što su a) prijenosnici za OA (Oat), b) prijenosnici koji sliče Oat-ovima (eng. *OAT-like*), c) prijenosnici koji pokazuju povezanost s Oat-ovima (eng. *OAT-related*), d) prijenosnici za organske katione (OK), tzv. Oct (eng. *Organic cation transporter*), e) prijenosnici za organske katione/karnitin, tzv. Octn (eng. *Organic cation/carnitine transporter*) i f) prijenosnici koji pokazuju povezanost s Oct/Octn-ovima (eng. *OCT/OCTN-related*) (Nigam, 2018). Navedeni prijenosnici prema predloženoj topologiji formiraju 12 transmembranskih domena (TMD) i jednu veliku izvanstaničnu petlju između TMD1 i TMD2 na kojoj se nalazi 3-6 glikozilacijskih mjesta, dok se fosforilacijska mjesta nalaze na velikoj unutarstaničnoj petlji između TMD6 i TMD7 (slika 5) (Koepsell i Endou, 2004.; Mor i sur. 2018.).



Slika 5. **Shematski prikaz sekundarne strukture proteina SLC obitelji.** Članovi SLC obitelji su integralni membranski proteini koji se sastoje od 12 transmembranskih domena s NH_2- i COOH-krajevima smještenim u citoplazmi stanice. Sadrže 6 izvanstaničnih petlji od kojih prva posjeduje nekoliko glikozilacijskih mjesta (G) i 5 unutarstaničnih petlji od kojih treća posjeduje nekoliko fosforilacijskih mjesta (P). Preuzeto i prilagođeno prema Mor i sur. (2018).

Mnogobrojni endogeni i egzogeni spojevi koji se trebaju izlučiti bubrezima, uključujući i mikotoksine, mogu biti negativno nabijeni OA, pozitivno nabijeni OK ili pak dvojni ioni, tzv. dipoli (njem. *Zwitterion*). Prvi korak u procesu sekrecije tih iona (OA, OK i dipola) je njihov prijenos iz krvi peritubularnih kapilara u epitelnu stanicu PK. Po unosu u stanice, ti spojevi bit će izlučeni u lumen/ultrafiltrat PK posredstvom specifičnih prijenosnika zastupljenih u ČM, ili će se posredstvom prijenosnika zastupljenih u BLM ponovo reapsorbirati u krvotok. Spojevi izlučeni i prisutni u ultrafiltratu PK, nadalje mogu biti ponovo reapsorbirani ili će se izlučiti iz tijela putem urina. Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima, reaktivnosti i sklonosti tih spojeva za vezivanjem na unutarstanične strukture, oni se mogu zadržati i unutar stanice. Promjene u stopi i opsegu unosa različitih spojeva u stanice, nasuprot njihovu izlučenju, mogu utjecati na netto koncentraciju tih spojeva i proces stvaranja metabolita neovisno radi li se o endogenim spojevima ili ksenobioticima (George i sur., 2017). Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da prijenosnici SLC/22Slc22 obitelji reguliraju ključne metaboličke puteve i razine signalnih molekula (npr. produkte crijevnog mikrobioma, žučne kiseline, intermedijarne produkte Krebsova ciklusa, prehrambene flavonoide i druge nutrijente, prostaglandine, vitamine, masne kiseline, urate), te razine toksina prisutnih uslijed same izloženosti toksičnim spojevima, ili onih nastalih kao posljedica određenih bolesti.

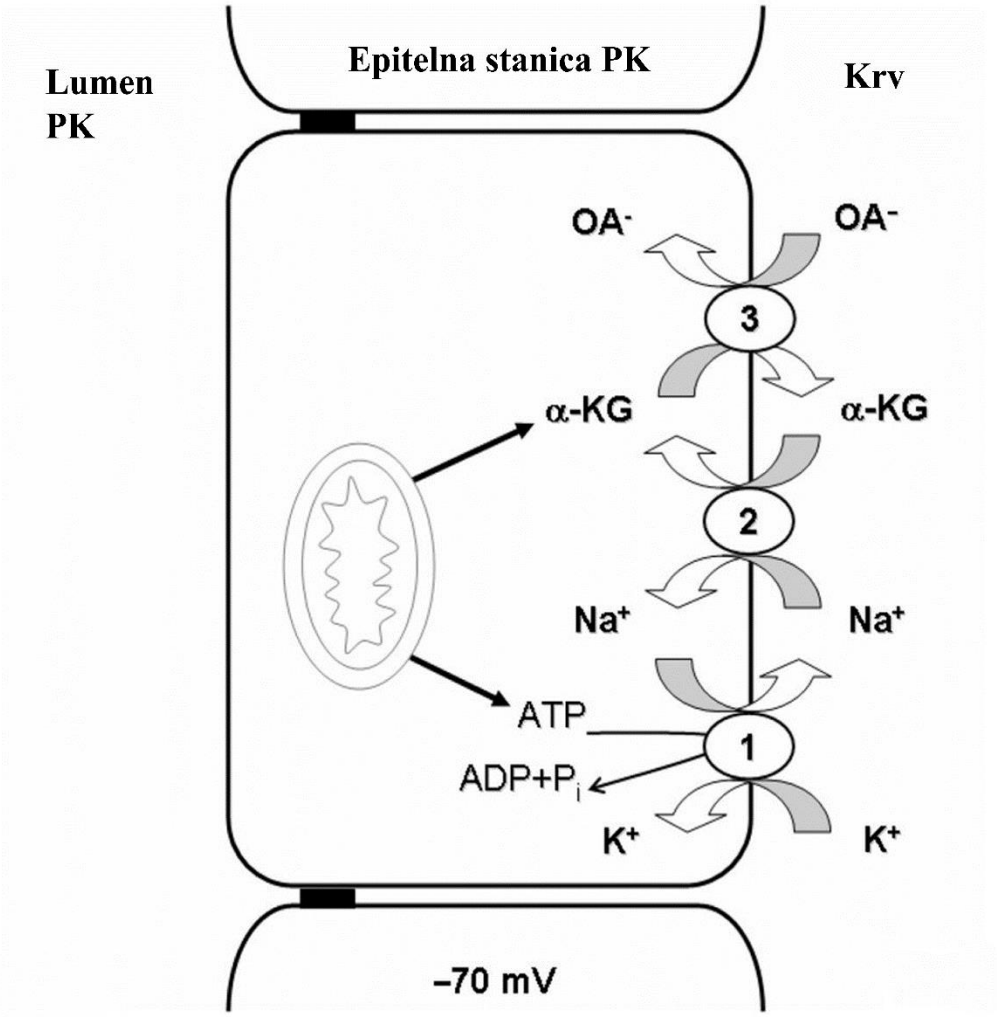
Polarizirane epitelne stanice PK bubrega sadrže nekoliko prijenosnika iz SLC/Slc obitelji koji su smješteni u BLM PK i posreduju unos spojeva u stanice, uključujući Oat, Oct, Octn i polipeptid Oatp (eng. *organic anion transporting polypeptide*). Nasuprot unosu, izlučivanje spojeva iz epitelnih stanica PK odvija se posredstvom prijenosnika pripadnika Abc i Slc obitelji, smještenih u ČM PK; predstavnici Abc obitelji su Mdr1 (eng. *Multidrug resistance protein* 1/AbcB1), Mrp2, 4 (eng. *Multidrug resistance-associated protein 2, 4*/AbcC2, 4) i Bcrp (eng. *Breast cancer resistance protein*/AbcG2), dok su predstavnici Slc obitelji Mate1, 2-K, (eng. *Multidrug and toxin extrusion* 1, 2-/*SLC47A1,2*) (George i sur., 2017.). Suvremena biološka znanost, članove SLC/Slc i ABC/Abc obitelji smatra ključnim čimbenicima interorganske i stanične komunikacije, koji zajedno sa neuroendokrinim i ostalim homeostatskim sustavima reguliraju homeostazu u sisavaca (Nigam, 2018.).

2.4.1 Prijenosnici organskih aniona smješteni u BLM PK

2.4.1.1 Prijenosnik organskih aniona Oat1/Slc22a6

Prvi otkriveni prijenosnik za OA (Oat1/Slc22a6) identificiran je funkcionalnim kloniranjem 1997. god. u štakora i iverka, kada je utvrđeno da se radi o ranije identificiranom ortologu u miša (Sekine i sur., 1997.; Sweet i sur., 1997.; Wolff i sur., 1997.). Nedugo potom, izolirani su i ortolozi u zeca, svinje i čovjeka (Reid i sur., 1998., Cihlar i sur.,1999.; Hosoyamada i sur., 1999.; Race i sur., 1999.; Bahn i sur., 2002.; Hagos i sur., 2002.). U bubrezima štakora, miševa i čovjeka, OAT1/Oat1 je imunofluorescencijski lokaliziran u BLM epitelnih stanica PK (odsječci S1, S2 i S3) (Kojima i sur., 2002.; Ljubojević i sur., 2004., Breljak i sur., 2013.; Breljak i sur., 2016.), gdje posreduje prijenos različitih endogenih i egzogenih OA. Proces prijenosa OA iz peritubularnih prostora u unutrašnjost epitelnih stanica PK bubrega, složen je i podrazumijeva spregnutu aktivnost nekoliko različitih prijenosnika (slika 6). Naime, ulazak negativno nabijenih spojeva, u jednako tako nabijeno unutarstanično okruženje (-70 mV), energetski je nepovoljan proces, osobito u slučaju kada spojevi u stanicu ulaze protivno koncentracijskom gradijentu. Inicijalna energija za početak prijenosa dolazi od aktivnosti Na/K-ATPaze (primarno aktivan prijenos), gdje se uz utrošak ATP iz stanice izbacuju ioni Na^+ u zamjenu za ione K^+, pri čemu elektrokemijski gradijent Na^+, usmjeren ka unutrašnjosti stanice, djeluje kao sila pokretanja kotransporta Na^+ i dikarboksilata (eng. *dicarboxylates*, DC) αlfa-ketoglutarata (α-KG) putem membranskog prijenosnika NaDC3 (eng. *Sodium-coupled high-affinity dicarboxylate transporter*) (sekundarno aktivan prijenos), te dovodi do nakupljanja α-KG u unutrašnjosti stanice. Nakupljanjem α-KG u stanici stvara se njegov koncentracijski gradijent usmjeren ka izvanstaničnom prostoru te se α-KG putem DC/OA prijenosnika (tercijarno aktivan prijenos) izlučuje iz stanice, uz istodobni ulazak OA u unutrašnjost stanice (Wright i Dantzler, 2004.; Sweet, 2005.). Funkcionalnom karakterizacijom Oat1 utvrđena je o dozi ovisna *cis*-inhibicija i *trans*-stimulacija unosa PAH sa glutaratom (nemetabolizirana zamjena za α-KG), čime je potvrđena njegova uloga izmjenjivača DC/OA na bazolateralnoj domeni epitelnih stanica PK (Pritchard, 1988.). Sweet i sur. (1997) kasnijim istraživanjem potvrđuju ulogu Oat1 kao izmjenjivača DC/OA, pokusom pri kojem je depolarizacija stanične membrane umanjila opseg

olakšane difuzije spojeva na apikalnoj domeni stanice, ali uz izostanak sličnog učinka na prijenos OA putem Oat1 na BLM epitelnih stanica PK bubrega.



Slika 6. **Shematski prikaz aktivnog prijenosa organskih aniona u bubrezima.** Prijenos organskih aniona (OA) iz cirkulacije u unutrašnjost stanice posredovan je spregom različitih prijenosnika u bazolateralnoj membrani epitelnih stanica PK. Inicijalna energija za početak prijenosa potječe od aktivnosti Na/K-ATPaze (primarno aktivan prijenos), gdje se uz utrošak ATP iz stanice izbacuju ioni Na^+ u zamjenu za ione K^+, pri čemu elektrokemijski gradijent Na^+, usmjeren ka unutrašnjosti stanice, djeluje kao sila pokretanja kotransporta iona Na^+ i dikarboksilata (DC) αfa-ketoglutarata (α-KG) putem prijenosnika NaDC3 (eng. *Sodium-coupled high-affinity dicarboxylate transporter*) (sekundarno aktivan prijenos). Nakupljanjem α-KG u stanici, stvara se njegov koncentracijski gradijent usmjeren ka izvanstaničnom prostoru te se α-KG putem DC/OA prijenosnika (tercijarno aktivan prijenos) izlučuje iz stanice, uz istodobni ulazak OA u unutrašnjost stanice. Preuzeto i prilagođeno prema Sweet (2005).

Po ulasku u stanicu, OA se mogu vezati na različite stanične strukture, čega posljedica može biti nefrotoksičnost uslijed nakupljanja visokih razina toksičnih spojeva, njihove bioaktivacije i stvaranja toksičnih metabolita (Miller i sur., 1993). Mnogobrojne funkcionalne studije, pokazale su da membranski prijenosnik OAT1/Oat1 međudjeluje sa više od 100 različitih supstrata koji imaju formu OA uključujući: a) endogene spojeve (dikarboksilati, vitamini, ciklički nukleotidi, prostaglandini i urat i dr.), b) ksenobiotike različitog podrijetla poput lijekova i njihovih metabolita (antibiotici, nesteroidni protuupalni lijekovi, diuretici, antineoplastici i dr.) i c) razne spojeve iz okoliša (pesticidi, industrijska otapala, teški metali i mikotoksini) (Sekine i sur., 2000.; Sekine i sur., 2006.). Nadalje, utvrđeno je da, regulirajući unos i promet OA na BLM stanice, Oat1 posredno sudjeluje i u regulaciji sekrecije/reapsorpcije OA iz unutrašnjosti stanice u lumen PK i obrnuto (Koepsell i Endou, 2004.).

2.4.1.2 Prijenosnik organskih aniona Oat3/Slc22a8

Prijenosnik OAT3/Oat3 je po prvi puta kloniran iz mozga štakora (Kusuhara i sur., 1999.), a potom iz bubrega različitih vrsta sisavaca uključujući miša, štakora, zeca, svinju, majmuna i čovjeka (Kusuhara i sur., 1999.; Cha i sur., 2001.; Sweet i sur., 2002.; Zhang i sur., 2004., Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.). Osim u bubrezima, ekspresija mRNA za Oat3 utvrđena je u jetri i koroidnom pleksusu miševa i štakora (Buist i sur., 2002.; Kobayashi i sur., 2002a.; Sweet i sur., 2002.). Imunofluorescencijskom analizom OAT3/Oat3 je lokaliziran u BLM epitelnih stanica PK (odsječci S1, S2 i S3) u bubrezima miševa, štakora i čovjeka (Kojima i sur., 2002., Ljubojević i sur., 2004., Breljak i sur., 2013.; Breljak i sur., 2016.), gdje posreduje prijenos visokog afiniteta za estron sulfat, DC, OTA, PAH, razne lijekove pa čak i kationski lijek cimetidin (Sekine i sur., 2006.). Poput proteina OAT1/Oat1, prijenosnik OAT3/Oat3 ima ulogu izmjenjivača DC/OA te dijeli zajedničke supstrate s OAT1/Oat1 (Sweet i sur., 2002.; Sweet i sur., 2003.; Sweet, 2005.). Također, za oba navedena prijenosnika, smještena u BLM PK bubrega, utvrđene su spolne razlike u njihovoj ekspresiji kod spolno zrelih štakora i miševa pri čemu je ekspresija Oat1 i Oat3 u mužjaka izraženija u odnosu na ženke, dok u ljudi ekspresija proteina OAT1 i OAT3 nije ovisna o spolu (Ljubojević i sur., 2004.; Breljak i sur., 2013., Breljak i sur., 2016.).

2.4.2 Prijenosnici organskih aniona smješteni u ČM PK

2.4.2.1 Prijenosnik organskih aniona Oat2/Slc22a7

Član Slc obitelji, Oat2, prvotno je izoliran iz jetre štakora kao novi prijenosnik specifičan za jetru (eng. *Novel liver-specific transporter,* NLT), pri čemu nisu opisane njegove funkcionalne karakteristike (Simonson i sur., 1994.). Nekoliko godina kasnije, Sekine i sur. (1998), analizom homologije slijeda aminokiselina utvrdili su da se radi o članu Oat podobitelji koji posreduje prijenos OA, te ga nazivaju Oat2/Slc22a7. Ekspresija mRNA za OAT2/Oat2 utvrđena je u bubrezima i jetri miševa, štakora i čovjeka te u koroidnom pleksusu miševa i štakora (Sekine i sur., 1998.; Sun i sur., 2001.; Buist i sur., 2002.; Enomoto i sur., 2002.; Kobayashi i sur., 2002a,b; Sweet i sur., 2002.). U bubrezima miševa i štakora, protein Oat2 je imunofluorescencijski lokaliziran u ČM ravnih PK (S3 odsječci) (Ljubojević i sur., 2007.), dok je u bubrezima čovjeka protein OAT2 lokaliziran u BLM PK (Enomoto i sur. 2002b.; Breljak i sur. 2016.). Također, uočene su spolne razlike u ekspresiji mRNA/proteina Oat2 u bubrezima i jetri pokusnih životinja. Tako je u miševa ekspresija mRNA za Oat2 opažena u jetri isključivo ženki, iako niža od one u bubregu (Kobayashi i sur., 2002b.), dok je u štakora bubrežna ekspresija Oat2 na razini mRNA i proteina utvrđena u oba spola, pri čemu je ekspresija izraženija u ženskih jedinki (Buist i sur., 2002.; Kobayashi i sur., 2002a.; Ljubojević i sur., 2007). Za razliku od miševa i štakora, ekspresija proteina OAT2 u bubrezima ljudi nije ovisna o spolu (Breljak i sur. 2016.). Funkcionalnom karakterizacijom prijenosa OA u miša i štakora, utvrđeno je da prijenos OA posredstvom Oat2 nije o Na^+ ovisan, te da *trans*-stimulacija dikarboksilatima nema učinka, pa je jednoznačno zaključeno da Oat2 posreduje olakšanu difuziju OA u lumen kanalića na apikalnoj domeni epitelnih stanica PK (Sekine i sur., 1998.; Kobayashi i sur., 2002b.).

2.4.2.2 Prijenosnik organskih aniona Oat5/Slc22a19

Ekspresija mRNA za Oat5 utvrđena je Northern analizom u bubrezima miševa i štakora dok ortolog OAT5 u ljudi nije detektiran (Youngblood i Sweet, 2004.). U miševa i štakora, imunohistokemijskom analizom lokalizacija proteina Oat5 utvrđena je u ČM ravnih PK (S3 odsječci), u vanjskom tračku vanjske srži bubrega (Anzai i sur., 2005.; Breljak i sur., 2010.). Pri funkcionalnoj karakterizaciji utvrđeno je da prijenos OA

posredovan Oat5 ne pokazuje osjetljivost na *cis*-inhibiciju dikarboksilatima i *trans*-stimulaciju glutaratom, sugerirajući time drugačije mehanizme prijenosa od onih utvrđenih kod DC/OA prijenosnika Oat1 i Oat3 (Youngblood i Sweet, 2004.; Anzai i sur., 2005.). Također, utvrđeno je da Oat5 eksprimiran u oocitama žabe *X. laevis* podržava unos i nakupljanje OTA (Youngblood i Sweet, 2004.). Također, pokazano je da depolarizacija stanične membrane nema učinka na prijenos OA putem prijenosnika Oat5 te da se prijenos ne odvija olakšanom difuzijom (Youngblood i Sweet, 2004.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Pokusne životinje

Istraživanja su provedena na spolno zrelim štakorima (*Rattus norvegicus*, soj WistarHan) muškog spola, starosne dobi 3 mjeseca i prosječne tj.m. 250 g ± 10 %, uzgojenim u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Zagreb, Hrvatska).

3.1.2 Puferi, otopine i kemikalije

3.1.2.1 Mikotoksini i resveratrol

- Okratoksin A (Sigma, USA)
- Citrinin (Sigma, USA)
- Resveratrol (Sigma, USA)

3.1.2.2 Anestezija

- Narketan (Chassot AG, Švicarska)
- Xylapan (Chassot AG, Švicarska)

3.1.2.3 Izdvajanje ukupnih staničnih membrana

- Homogenizirajući pufer za izdvajanje ukupnih staničnih membrana; pH 7,4:
    - 300 mM manitol (Sigma, SAD)
    - 5 mM EGTA (Sigma, SAD)
    - 12 mM Tris-HCl (Sigma, SAD)
    - PMSF (eng. *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* – fenil-metil-sulfonil fluoride); 200 mM otopina u etanolu (Sigma, SAD)
    - Tablete inhibitora proteaza (smjesa: AEBSF + EDTA + bestatin + E-64 + leupeptin + aprotinin) (Sigma, SAD)

3.1.2.4 Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina

- Boja Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Njemačka)
- Protein BSA (eng. *Bovine Serum Albumin* – albumin goveđeg seruma) (Sigma, SAD)
- 98-100 % mravlja kiselina (Kemika, Hrvatska)

3.1.2.5 Elektroforeza proteina i western analiza

- Pufer za pripremanje uzoraka membranskih frakcija (Laemmli pufer):
    - 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 (22% v/v) (Sigma, SAD)
    - 30 % SDS (12% v/v) (Sigma, SAD)
    - 80 % glicerol (54% v/v) (Merck, Njemačka)
    - Zasićena otopina bromfenol modrila (12% v/v) (BioRad, SAD)
- Otopina akrilamida/bisakrilamida:
    - 30 g akrilamida (Fisher Scientific, SAD)
    - 0,8 g bis-akrilamid (Fisher Scientific, SAD)
    - 100 mL deH_2O
- APS (eng. *Ammonium persulfate* – amonijev persulfat): 14 % otopina u deH_2O (BioRad, SAD)
- Pufer za pripremu 10 % gela za razdvajanje (donji pufer): 0,5 M Tris-HCl; pH 8,9
- Pufer za pripremu 4 % gela za sabijanje (gornji pufer): 1,5 M Tris-HCl; pH 6,8
- SDS (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate* – natrij dodecilsulfat); 10 % otopina u deH_2O (Sigma, SAD)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-etan-1,2-diamin) (Sigma, SAD)
- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer za elektroforezu proteina:
    - 25 mM Tris (Sigma, SAD)
    - 0,2 M glicin (Sigma, SAD)
    - 1 % SDS (Sigma, SAD)
- Metanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer za prijenos proteina:
    - 15,6 mM Tris; pH 8,3 (Sigma, SAD)

    - 120 mM glicin (Sigma, SAD)
    - 20 % metanol (Kemika, Hrvatska)
- Otopina za odbojavanje (metanol : octena kiselina : deH_2O u omjeru 5:1:4)
- Otopina za bojanje proteina: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Njemačka) u otopini za odbojavanje
- Pufer za blokiranje; pH 7,4:
    - 5 % nemasno mlijeko u prahu (različiti proizvođači)
    - 150 mM NaCl (Kemika, Hrvatska)
    - 1 % Triton-X-100 (Merck, Njemačka)
    - 20 mM Tris-HCl (Sigma, SAD)
    - 0,02 % $NaNO_3$ (Fisher Scientific, SAD)
- BCIP (eng. 5-*Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate – 5-bromo-4-kloro-3'-indolilfosfat p-toluidinska* sol) (Sigma, SAD)
- NBT (eng. *Nitro Blue Tetrazolium chloride* – nitro-plavi tetrazolijski klorid) (Sigma, SAD)
- Tris pufer: 20 mM $(HOCH_2)_3CNH_2$ u deH_2O; pH 9 (Sigma, SAD)
- Najlonska membrana: *Immobilon PVDF* (eng. *Polyvinylidene fluoride - polivinilidenfluorid*); 0,45 µm (Milipore, SAD)
- Proteinski biljeg (eng. *Molecular Weight Markers*, MWM: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific, SAD)

3.1.2.6 Rezanje tkiva kriomikrotomom

- Saharoza: 30 % otopina u fosfatnom puferu PBS (Fisher Scientific, SAD)
- Polimerni medij za uklapanje: *Compound 4583 O.C.T.* (Vector Labs, SAD)
- Predmetna stakalca *Superfrost/Plus* (Fisher Scientific, SAD)

3.1.2.7 Imunofluorescencijska analiza

- PBS (eng. *Phosphate-Buffered Saline* – fosfatni pufer); pH 7,4:
    - 140 mM NaCl (Kemika, Hrvatska)
    - 4 mM KCl (Kemika, Hrvatska)
    - 8 mM K_2HPO_4 (Kemika, Hrvatska)

    - 2 mM KH_2PO_4 (Kemika, Hrvatska)
- HS-PBS (eng. *High Salt*-PBS):
    - PBS
    - 1,8 % (g/v) NaCl (Kemika, Hrvatska)
- SDS: 1 % otopina u deH_2O (Sigma, SAD)
- NaN_3 (natrijev azid) (Fisher Scientific, SAD)
- Paraformaldehid: 4 % otopina u PBS puferu (Sigma, SAD)
- Ksilol (Kemika, Hrvatska)
- Etanol: 96 %, 75 % i 60 % otopina u deH_2O (Kemika, Hrvatska)
- Citratni pufer: 10 mM limunska kiselina/Tris; pH 3, pH 6 i pH 8 (Sigma, SAD)
- Triton-X-100: 0,1 %; 0,5 % i 2 % otopina u puferu PBS (Merck, Njemačka)
- BSA: 1 % otopina u puferu PBS (Sigma, SAD)
- Otopina za očuvanje fluorescencije: *Vectashield* (Vector Laboratories, SAD)
- Protutijela za western i imunofluorescencijsku analizu:

    - Primarna protutijela:

Za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora rabljena su specifična poliklonska kunićja protutijela čija je proizvodnja i karakterizacija detaljno opisano u prethodnim istraživanjima (Oat-Ab; tablica 1), a za detekciju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora rabljena su komercijalna mišja monoklonska protutijela (β-aktin-Ab i Na/K-ATPaza-Ab; tablica 1).

Tablica 1. Primarna protutijela (Ab)

Protutijelo	Protein	Kataloški broj (proizvođač)	Literatura
Oat1-Ab	**rOat1**	Nije primjenjivo*****	Kojima i sur. (2002) Ljubojević i sur. (2004)
Oat2-Ab	**rOat2**	Nije primjenjivo*****	Kojima i sur. (2002) Ljubojević i sur. (2007)
Oat3-Ab	**rOat3**	Nije primjenjivo*	Kojima i sur. (2002) Ljubojević i sur. (2004)
Oat5-Ab	**rOat5**	Nije primjenjivo*****	Anzai i sur. (2005) Breljak i sur. (2010)
***β*-aktin-Ab**	**r*β*-aktin**	sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology, SAD)	Breljak i sur. (2013) Breljak i sur. (2016)
Na/K-ATPaza-Ab	***α*-podjedinica Na/K-ATPaze**	sc-48345 (Santa Cruz Biotechnology, SAD)	Breljak i sur. (2016)

*****Dobiveno ljubaznošću dr. N. Anzai, Department of Pharmacology, Chiba University Graduate School of Medicina (Chiba, Japan).

- Sekundarna protutijela:

Rabljena su odgovarajuća sekundarna protutijela koja su za potrebe western analize konjugirana enzimom alkalnom fosfatazom (AP), a za potrebe imunofluorescencijske analize konjugirana su fluorescencijskim bojama uključujući cijanin 3 (CY3) ili fluorescein-izotiocijanatom (FITC) (tablica 2).

Tablica 2. Sekundarna protutijela

Protutijelo	Karakteristike	Kataloški broj (proizvođač)
GAM-AP (eng. *Goat Anti Mouse-Alkaline Phosphatase*)	Kozje Ab protiv mišjeg IgG obilježeno s alkalnom fosfatazom	115-055-003 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)
GAR-AP (eng. *Goat Anti Rabbit-Alkaline Phosphatase*)	Kozje Ab protiv kunićjeg IgG obilježeno s alkalnom fosfatazom	111-055-003 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)
GAM-FITC (eng. *Goat Anti Mouse-Fluorescein Isothiocyanate*)	Kozje Ab protiv mišjeg IgG obilježeno s fluorescein-izotiocijanatom	02-18-15 (Kirkegaard & Perry Laboratories, SAD)
GAR-CY3 (eng. *Goat Anti Rabbit-CY3*)	Kozje Ab protiv kunićjeg IgG obilježeno sa cijaninom 3	111-165-003 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)

3.1.3 Laboratorijska oprema i potrošni materijal

- Centrifuge:
  - Mikro-centrifuga s hlađenjem: 5417 R (Eppendorf, Njemačka)
  - Centrifuga *minispin* (Eppendorf, Njemačka)
  - Centrifuga s hlađenjem: Sorvall RC2B, rotor SS-34 (Sorvall Instruments, SAD)
- Spektrofotometar CECIL 9000 (Cambridge, Velika Britanija)
- Termoblok: *Thermomixer Comfort* 1,5 mL (Eppendorf , Njemačka)
- Električni homogenizator (Omni International, Velika Britanija)
- Sustav za vertikalnu elektroforezu proteina: *Mini Protean III Cell* (BioRad, SAD)
- Sustav za prijenos proteina: *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad, SAD)
- Izvor struje *Power Supply*: *Power Pac Basic* (BioRad, SAD)

- Kriomikrotom: Leica CM 1580 (Leica Instruments, Njemačka)
- Fluorescencijski mikroskop: OPTON III RS (Opton Feintechnik, Njemačka)
- Digitalna kamera: Spot RT (Diagnostic Instruments, SAD)
- Automatske pipete s promjenjivim volumenom (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL i 100-1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Hamilton šprice s promjenjivim volumenom (1-10 µL, 1-25 µL i 1-50 µL) (Hamilton, SAD)
- Kivete za spektrofotometar (Sarstedt, Njemačka)
- Digestor
- Tehnička vaga
- Analitička vaga
- Vibracijska miješalica: Genie 2 Vortex (Fisher Scientific, SAD)
- Zibalica: Rocking Shaker 35 (Labnet, Finska)
- Zibalica: Big Bill Digital Orbital Shaker (Marshall Scientific, SAD)
- Mikrovalna pećnica Moulinex compact
- Hladnjaci (4°C) i zamrzivači (-20°C i -80°C) (različiti proizvođači)
- Skener: Canon 5600F
- Računalo: Dell
- Mikrotubice (1,5 mL i 2 mL) (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Polipropilenske tubice s čepom (5, 15 i 50 mL) (Falcon, Njemačka)

3.1.4 Računalni programi

- Adobe Photoshop 6.0 (http://www.adobe.com)
- ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/)
- STATISTICA 12 (StatSoft, SAD)

3.2 METODE

3.2.1 Uzgoj pokusnih životinja

Štakori soja WistarHan uzgojeni su u standardiziranim mikroklimatskim uvjetima (ciklus svjetla i tame 12 h/12 h, temperatura zraka 20 - 24 ^{o}C, relativna vlažnost zraka 50-70%, uz slobodan pristup hrani i vodi) sukladno smjernicama i preporukama *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition* (National Research Council, 2011). Pokusni postupci na životinjama odobreni su od Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu (br. 100-21/14-7 of 11-06-2014) i Uprave za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva RH (br. 525-10/0255-15-4 of 08-09-2015) prigodom odobravanja provedbe znanstvenog projekta "*Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina Aspergillus vrsta"*-MycotoxA (HrZZ: IP-09-2014-5982; voditeljica: prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić).

3.2.2 Tretman pokusnih životinja

Ukupno 40 životinja razvrstano je u 8 pokusnih skupina (n = 5 životinja/skupini) kojima su ispitivani spojevi apli cirani *per os,* intragastričnom sondom svakodnevno tijekom 21 dana zasebno ili u kombinaciji kako slijedi:

1. voda
2. otapalo (51 mM $NaHCO_3$)
3. OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m.)
4. OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.)
5. CTN (20 mg kg^{-1} tj.m.)
6. OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m.) + CTN (2 mg kg^{-1} tj.m.)
7. OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) + CTN (2 mg kg^{-1} tj.m.)
8. OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) + CTN (2 mg kg^{-1} tj.m.) + RSV (20 mg kg^{-1} tj.m.)

Mikotoksini (OTA i CIT) su otopljeni u otapalu 51 mM $NaHCO_3$, a RSV u etanolu (5 % EtOH). Životinje su po završetku tretmana usmrćene iskrvarenjem presijecanjem vratnih krvnih žila (*a.carotis, v.jugularis*) u općoj anesteziji induciranoj kombinacijom anestetika: Narketan (80 mg kg^{-1} tj.m., i.p.) + Xylapan (12 mg kg^{-1} tj.m., i.p.).

3.2.3 Određivanje ekspresije proteina

3.2.3.1 Izdvajanje ukupnih staničnih membrana

Ukupne stanične membrane (eng. *Total Cell Membrane*, USM), izdvojene su iz tkiva bubrega metodom diferencijalnog centrifugiranja. Neposredno nakon usmrćivanja životinja, uzorkovano je tkivo bubrega koje je isprano u hladnom puferu PBS te uronjeno u hladni homogenizirajući pufer kojemu su prema uputama proizvođača dodani PMSF (Sigma, SAD) i tablete inhibitora proteaza (Sigma, SAD). Potom su uzorci tkiva homogenizirani električnim homogenizatorom (Omni International, Velika Britanija) pri maksimalnoj brzini (1 min homogenizacije, 2 min pauza, 1 min homogenizacije) na ledu (4 °C). Dobiveni 10 % homogenati su zatim centrifugirani na 5000 x g tijekom 15 min pri 4 °C u centrifugi s hlađenjem Sorvall RC2B (Sorvall Instruments, SAD). Nastali talog je bačen, a supernatant nadalje centrifugiran (47800 x g/60 min/4 °C) upotrebom iste centrifuge. Dobiveni talozi s membranskim frakcijama otopljeni su u 100-200 µL homogenizirajućeg pufera koji je razrijeđen s deH_2O u omjeru 1:1 te pohranjeni pri -20 °C do daljnje upotrebe.

3.2.3.2 Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za western analizu

Koncentracija proteina u uzorcima USM izmjerena je spekrofotometerijski upotrebom spektrofotometra CECIL 9000 (Cambridge, Velika Britanija) na 595 nm (Bradford, 1976.) Baždarni pravac (odnos OD i koncentracije proteina) dobiven je mjerenjem OD uzoraka serijskih razrjeđenja proteina BSA poznate koncentracije u rasponu od 0,2 do 1,2 mg/mL, a mjerenje uzoraka USM provedeno je u linearnom dijelu baždarnog pravca. Tijekom mjerenja rabljena je slijepa proba koja je sadržavala sve sastojke (za pripremu uzoraka za western analizu) osim membranskih frakcija bubrežnog tkiva. Na temelju baždarnog pravca i izmjerene OD određene su koncentracije proteina u uzorcima USM. Uzorci USM su potom denaturirani u puferu Laemmli pri 65 °C tijekom 15 min u nereducirajućim uvjetima. Tako pripremljeni uzorci USM pohranjeni su pri -20 °C do upotrebe.

3.2.3.3 Elektroforeza proteina i western analiza

U uzorcima USM proteini su razdvojeni denaturirajućom elektroforezom proteina u poliakrilamidnom gelu (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) koja se provodila pri naponu od 100 V u sustavu za vertikalnu elektroforezu proteina *Mini Protean III Cell* (BioRad, SAD) prema uputama proizvođača. U tu svrhu pripremljeni su 10 % poliakrilamidni gel za razdvajanje (donji gel) i 4 % poliakrilamidni gel za sabijanje (gornji gel) (tablica 3). Elektroforeza je zaustavljena nakon što je bromfenol modrilo doseglo dno gela (~2 h). Nakon provedene elektroforeze, prijenos razdvojenih proteina iz gela na membranu provodio se u puferu za transfer proteina pri stalnom naponu od 100 V tijekom 2 h u sustavu za prijenos proteina *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad, SAD). Neposredno prije prijenosa, hidrofobne najlonske membrane *Immobilon PVDF* (Milipore, SAD) isprane su u metanolu (~15 s), te su inkubirane u puferu za prijenos (~15 min). Uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu provjerena je kratkotrajnim (~15 s) bojanjem membrana/gelova u otopini *Coomassie Brilliant Blue*. Nakon toga membrane su isprane u otopini za odbojavanje i deH_2O te inkubirane u puferu za blokiranje pri sobnoj temperaturi (4 x 10 min).

Tablica 3. Smjesa za pripremu poliakrilamidnih gelova

	10 % gel za razdvajanje	**4 % gel za sabijanje**
Sastojci smjese	Volumen	Volumen
Akrilamid/Bisakrilamid	3 mL	0,52 mL
Tris-HCl	2,25 mL (pH 8,8)	1 mL (pH 6,8)
10 % SDS	90 µL	40 µL
deH_2O	3,21 mL	2,2 mL
14% APS	450 µL	240 µL
TEMED	2,4 µL	1,6 µL
Ukupni volumen	9 mL	4 mL

APS, amonijev persulfat; SDS, natrij-dodecil sulfat; TEMED, N,N,N',N' tetrametil-etan 1,2 diamin; Tris, (tris(hidroksimetil) aminometan).

Membrane su potom inkubirane s primarnim Ab (Na/K-ATPaza-Ab, β-aktin-Ab, Oat1-Ab, Oat2-Ab, Oat3-Ab ili Oat5-Ab; tablica 1) tijekom 18 h pri 4 °C uz stalno miješanje na zibalici *Big Bill Digital Orbital Shaker* (Marshall Scientific, SAD). Primarna Ab razrijeđena su u puferu za blokiranje u razrjeđenju kako slijedi: Na/K-ATPaza-Ab (1:1000), β-aktin-Ab (1:250), Oat1-Ab (1:1000), Oat2-Ab (1:500), Oat3-Ab (1:500) i Oat5-Ab (1:500). Potom su membrane isprane u puferu za blokiranje na sobnoj temperaturi (4 x 10 min) te inkubirane s odgovarajućim sekundarnim Ab (GAR-AP ili GAM-AP; tablica 2) tijekom 1 h na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje na zibalici *Rocking Shaker* 35 (Labnet, Finska). Sekundarna Ab razrijeđena su u puferu za blokiranje u razrjeđenju kako slijedi: GAR-AP (1:1000) i GAM-AP (1:1000). Nakon inkubacije sa sekundarnim Ab, membrane su isprane u puferu za blokiranje (4 x 10 min), puferu PBS (2 x 5 min) i puferu Tris (5 min) uz stalno miješanje na zibalici *Rocking Shaker* 35 (Labnet, Finska) te inkubirane u otopini kromogenih supstrata (BCIP + NBT) pri čemu nastaje tamno-ljubičasto obojenje koje omogućava vizualizaciju proteinskih pruga. Relativna molekulska masa (eng. *relative molecular mass, Mr*) istraživanih proteina određena je pomoću komercijalnog proteinskog biljega poznatih molekulskih masa *Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific, SAD). Membrane s proteinskim prugama skenirane su skenerom, a intenzitet njihova obojenja izmjeren je pomoću računalnog programa *ImageJ* (http://imagej.nih.gov/ij/). Izmjerene gustoće pojedinih proteinskih pruga (intenzitet obojenja) prikazane su kao relativne vrijednosti u odnosu na izmjerenu gustoću najjače pruge (=1) iz odgovarajuće kontrolne skupine.

3.2.4 Određivanje stanične lokalizacija proteina

3.2.4.1 Fiksacija i rezanje tkiva kriomikrotomom

Nakon usmrćivanja životinja, uzorci bubrežnog tkiva isprani su u hladnom puferu PBS i fiksirani u 4 % paraformaldehidu tijekom 24 h pri 4 °C te isprani u puferu PBS (3 x 20 min) na sobnoj temperaturi. Fiksirani uzorci bubrežnog tkiva pohranjeni su u puferu PBS koji je sadržavao 0,02 % NaN_3 te skladišteni pri 4 °C do upotrebe. Neposredno prije rezanja, inkubirani su u 30 % saharozi tijekom noći te uklopljeni u polimerni medij za

uklapanje tkiva *Compound 4583 O.C.T*. (Vector Labs, SAD) pri -25 °C. Zamrznuti uzorci su potom rezani na nareske debljine 4 µm u kriomikrotomu Leica CM 1580 (Leica Instruments, Njemačka) pri -25 °C. Dobiveni naresci tkiva lijepljeni su na predmetna stakalca *Superfrost/Plus* (Fisher Scientific, SAD), osušeni na sobnoj temperaturi te pohranjeni pri 4 °C do upotrebe.

3.2.4.2 Imunofluorescencijska analiza i mikroskopija

U svrhu otkrivanja epitopa za efikasno vezanje primarnih Ab, rabljene su različite tehnike otkrivanja antigena (eng. *antigen retrieval*) koje su uključivale upotrebu alkohola, deterdženata i zagrijavanje pri visokim temperaturama u citratnom puferu različitih pH (pH 3, pH6, pH 8) (Brzica i sur., 2011). Za svako od primarnih Ab koje je rabljeno u ovom istraživanju, optimalni uvjeti otkrivanja antigena uključivali su kuhanje bubrežnih narezaka u citratnom puferu pH 6 (mikrovalna pećnica: 4 x 5 min, 800 W), hlađenje tijekom 20 min na sobnoj temperaturi, ispiranje u puferu PBS (3 x 5 min), inkubiranje s deterdžentima (15 min u 0,5 % Triton-X-100; 30 min u 2 % Triton-X-100) te ispiranje u puferu PBS (5 min). Nespecifično vezanje protutijela spriječeno je inkubacijom tkivnih preparata s 1 % BSA tijekom 30 min na sobnoj temperaturi. Naresci tkiva su zatim inkubirani s primarnim Ab (Na/K-ATPaza-Ab, β-aktin-Ab, Oat1-Ab, Oat2-Ab, Oat3-Ab ili Oat5-Ab; tablica 1) tijekom ~18 h pri 4°C. Potom su isprani u 0,1 % Triton-X-100 (10 min) i puferu PBS (2 x 5 min) te inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim Ab (GAR-CY3 ili GAM-FITC; tablica 2) tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Sva primarna i sekundarna Ab razrjeđivana su u puferu PBS koji je sadržavao 0,02 % NaN_3. Razrjeđenja primarnih protutijela bila su kako slijedi: 1:100 (Na/K-ATPaza-Ab), 1:100 (β-aktin-Ab), 1:1000 (Oat1-Ab), 1:500 (Oat2-Ab), 1:250 (Oat3-Ab), 1:250 (Oat5-Ab), a sekundarnih: 1:800 (GAR-CY3) i 1:100 (GAM-FITC). Nakon ispiranja u 0,1 % Triton-X-100 (10 min) i puferu PBS (2 x 5 min), tkivni naresci su prekriveni otopinom za očuvanje fluorescencije *Vectashield* (Vector Laboratories, SAD) i pokrovnim stakalcem, analizirani fluorescencijskim mikroskopom *OPTON III RS (*Opton Feintechnik, Njemačka*)* te snimljeni digitalnom kamerom *SPOT RT* (Diagnostic Instruments, SAD) povezanom s mikroskopom.

3.2.5 Statistička analiza i prikaz rezultata

Za statističku analizu podataka rabljeni su Student t-test i ANOVA/Duncan test u okviru računalnog programa STATISTICA12 (StatSoft, SAD) pri čemu je razina vjerodostojnosti postavljena na $p<0,05$. Dobiveni rezultati western analize (skenovi) i imunofluorescencijske analize (fotografije) obrađeni su računalnim programom *Adobe Photoshop 6.0.* (http://www.adobe.com) u odgovarajuće panele i slike.

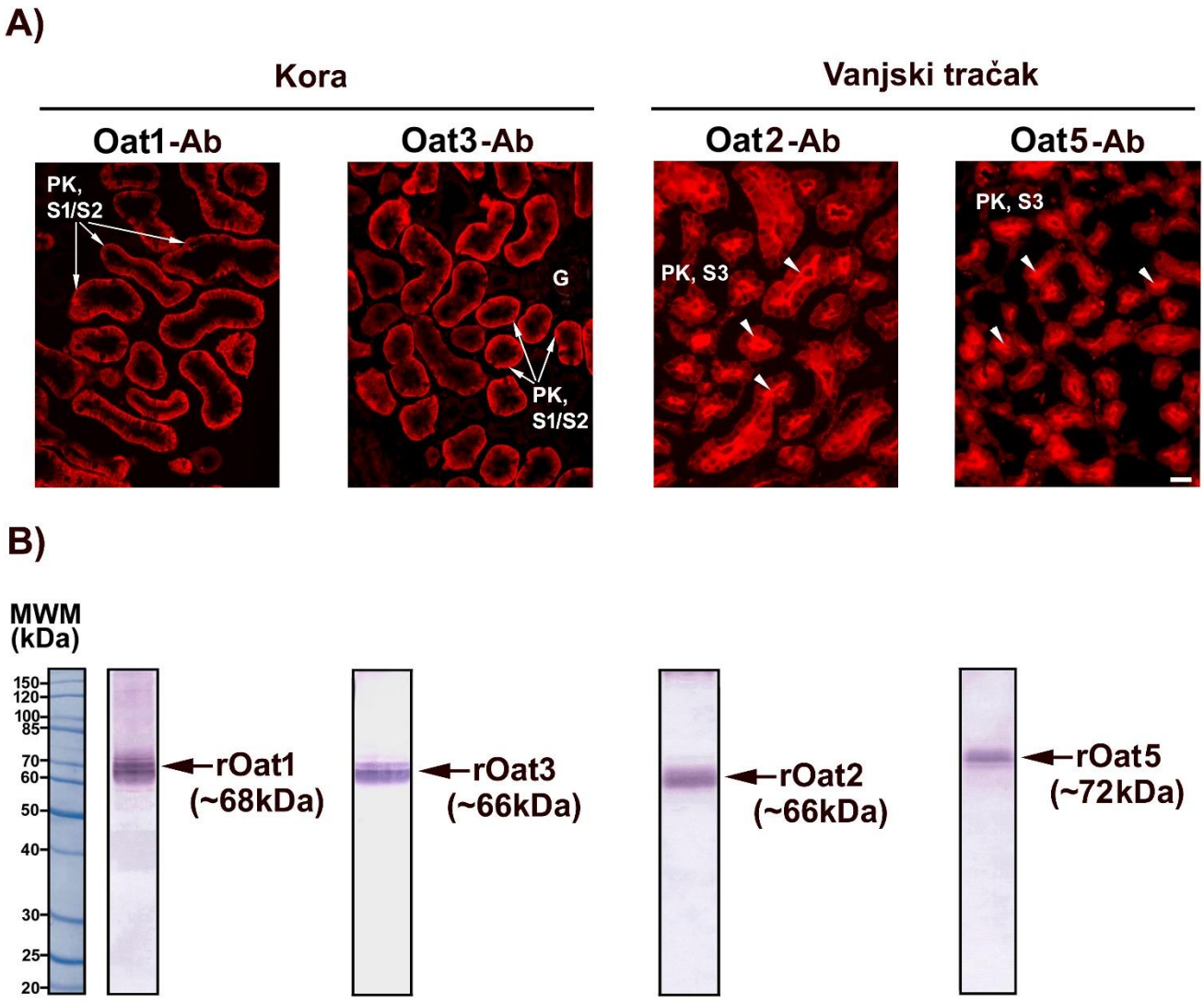
4. REZULTATI

4.1 Ispitivanje primarnih protutijela

Kako bi istražili pojedinačne i združene učinke mikotoksina (OTA i/ili CIT) i polifenola RSV na proteinsku ekspresiju i staničnu lokalizaciju membranskih prijenosnika za OA i *housekeeping* proteina u bubrezima štakora, prvotno su ispitana odgovarajuća primarna protutijela koja predstavljaju ključan alat za specifičnu detekciju proteina tijekom imunofluorescencijske i western analize. U tu svrhu provedena je imunofluorescencijska mikroskopija na kriostatskim narescima bubrega štakora i western analiza na uzorcima USM izdvojenih iz bubrega štakora.

4.1.1 Ispitivanje protutijela za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora

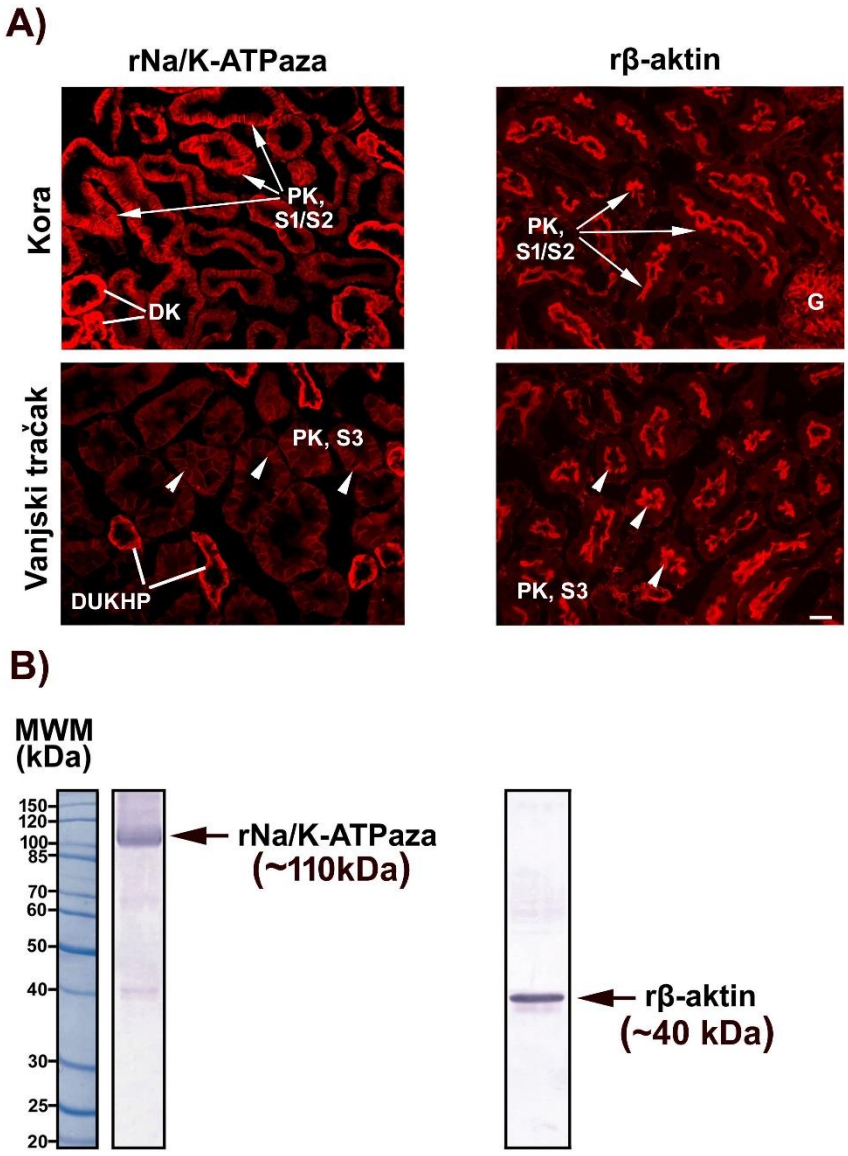
Kako bi optimalizirali vezivanje primarnih anti-Oat protutijela (tablica 1) na specifične epitope tijekom imunofluorescencijske analize, ispitane su različite metode otkrivanja antigena (Brzica i sur., 2011.) u kriostatskim narescima tkiva bubrega (rezultati nisu prikazani). Protokol otkrivanja antigena koji je dao optimalan imunofluorescencijski signal uključivao je obradu narezaka tkiva alkoholima i deterdžentima te zagrijavanje u citratnom puferu pH 6 (poglavlje 3.2.4.2.) pa je stoga rabljen za određivanje stanične lokalizacije svih istraživanih proteina rOat u ovom doktorskom radu. Imunofluorescencijsko bojenje za rOat1 (Oat1-Ab) i rOat3 (Oat3-Ab) u bubrezima štakora detektirano je u BLM epitelnih stanica zavijenih PK (odsječci S1 i S2) smještenih u kori (slika 7A; kora), a za proteine rOat2 (Oat2-Ab) i rOat5 (Oat5-Ab) u ČM ravnih PK (odsječci S3) smještenih u vanjskom tračku (slika 7A; vanjski tračak). Rezultati western analize pokazali su da anti-Oat protutijela specifično prepoznaju jednu proteinsku prugu za rOat1 (~68 kDa; Oat1-Ab), rOat2 (~66 kDa, Oat2-Ab), rOat3 (~66 kDa, Oat3-Ab) i rOat5 (~72 kDa, Oat5-Ab) (slika 7B) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora. Dakle, rezultati imunofluorescencijske (slika 7A) i western (slika 7B) analize jasno su pokazali da nekomercijalna anti-Oat protutijela (tablica 1) specifično prepoznaju proteine rOat u bubrezima štakora te stoga predstavljaju adekvatno oruđe za istraživanje stanične lokalizacije i proteinske ekspresije membranskih prijenosnika OA u pokusnom modelu štakora.



Slika 7. Ispitivanje protutijela za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora. Metodama imunofluorescencijske i western analize ispitana su protutijela za detekciju proteina rOat smještenih na BLM (rOat1 i rOat3) ili ČM (rOat2 i rOat5) PK u bubrezima štakora. **A**. **Imunofluorescencijska analiza.** U fiksiranim narescima bubrega štakora prikazano je imunofluorescencijsko bojenje u dvije zone bubrega (kora i vanjski tračak). Protutijela Oat1-Ab i Oat3-Ab obojila su BLM zavijenih PK (S1/S2 odsječci) u kori, a protutijela Oat2-Ab i Oat5-Ab obojila su ČM ravnih PK (S3 odsječci) u vanjskom tračku bubrega. Mjera = 20 µm. G – glomerul. **B. Western analiza.** U USM izdvojenim iz bubrega štakora, anti-Oat protutijela obojila su jednu proteinsku prugu od ~68 kDa (rOat1), ~66 kDa (rOat3), ~66 kDa (rOat2) i ~72 kDa (rOat5). Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. MWM – biljeg molekulskih masa proteina.

4.1.2 Ispitivanje protutijela za detekciju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora

Rabeći optimalni protokol otkrivanja antigena (tretman alkoholima i deterdžentima uz kuhanje u citratnom puferu pH 6) (poglavlje 3.2.4.2.), ispitana su primarna komercijalna protutijela (Na/K-ATPaza-Ab i β-aktin-Ab; tablica 1) za detekciju *housekeeping* proteina u kriostatskim narescima tkiva bubrega štakora. Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su specifičnu lokalizaciju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u različitim epitelnim stanicama nefrona štakora. U kori bubrega, imunofluorescencijski signal za rNa/K-ATPazu detektiran je u BLM zavijenih PK (odsječci S1 i S2), distalnim zavijenim kanalićima (DK) i debelom uzlaznom kraku Henleove petlje (DUKHP) (slika 8A; Na/K-ATPaza-Ab, kora) te preostalim kanalićima kore bubrega (rezultati nisu prikazani). U vanjskom tračku bubrega, imunofluorescencijski signal za rNa/K-ATPazu uočen je u BLM epitelnih stanica u ravnim PK (odsječci S3), DUKHP (slika 8A; Na/K-ATPaza-Ab, vanjski tračak) te preostalim kanalićima vanjskog tračka (rezultati nisu prikazani). Također, specifično bojenje za rNa/K-ATPazu uočeno je u ostalim dijelovima nefrona smještenim u unutarnjem tračku i papili (rezultati nisu prikazani). Nadalje, protein rβ-aktin je imunolokaliziran u različitim staničnim strukturama bubrega uključujući ČM PK smještenih u kori (odsječci S1 i S2) (slika 8A; β-aktin-Ab, kora) i vanjskom tračku (odsječci S3) (slika 8A; β-aktin-Ab, vanjski tračak). Također, specifično imunofluorescencijsko bojenje za rβ-aktin detektirano je u podocitima koji oblažu glomerularno klupko. Rezultati western analize provedene u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora pokazali su specifične proteinske pruge za α-podjedinicu rNa/K-ATPaze (~110 kDa) (slika 8B; Na/K-ATPaza-Ab) i rβ-aktin (~40 kDa) (slika 8B; β-aktin-Ab). Dakle, rezultati imunofluorescencijske (slika 8A) i western (slika 8B) analize nedvojbeno su pokazali da komercijalna monoklonska protutijela (Na/K-ATPaza-Ab i β-aktin-Ab; tablica 1) specifično prepoznaju proteine rNa/K-ATPazu i rβ-aktin u bubrezima štakora te su stoga prikladna za daljnja istraživanja stanične lokalizacije i ekspresije *housekeeping* proteina u pokusnom modelu štakora.



Slika 8. Ispitivanje protutijela za detekciju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora. Metodama imunofluorescencijske i western analize ispitana su protutijela za detekciju proteina rNa/K-ATPaze (Na/K-ATPaza-Ab) i rβ-aktina (β-aktin-Ab) u bubrezima štakora. **A**. **Imunofluorescencijska analiza.** U fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora prikazano je imunofluorescencijsko bojenje u dvije zone bubrega (kora i vanjski tračak). Protutijelo Na/K-ATPaza-Ab obojilo je BLM PK u kori (odsječci S1/S2) i vanjskom tračku (odsječci S3) te BLM distalnih dijelova nefrona uključujući zavijene distalne kanaliće (DK) i debeli uzlazni krak Henleove petlje (DUKHP). Protutijelo β-aktin-Ab obojilo je ČM PK (odsječci S1/S2) u kori i vanjskom tračku (odsječci S3) te podocite koji oblažu glomerularno klupko. Mjera = 20 µm. G – glomerul. **B. Western analiza.** U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega štakora, protutijela Na/K-ATPaza-Ab i β-aktin-Ab obojila su jednu proteinsku prugu od ~110 kDa (rNa/K-ATPaza) i ~40 kDa (rβ-aktin). Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. MWM – biljeg molekulskih masa proteina.

4.2 Učinci mikotoksina i resveratrola na ekspresiju proteina u bubrezima štakora

U pokusnom modelu štakora najprije su istraženi pojedinačni učinci mikotoksina (ili OTA ili CIT), zatim združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT) te u konačnici združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) na proteinsku ekspresiju membranskih prijenosnika OA (rOat1, rOat2, rOat3 i rOat5) i *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaze i rβ-aktina) u bubrezima.

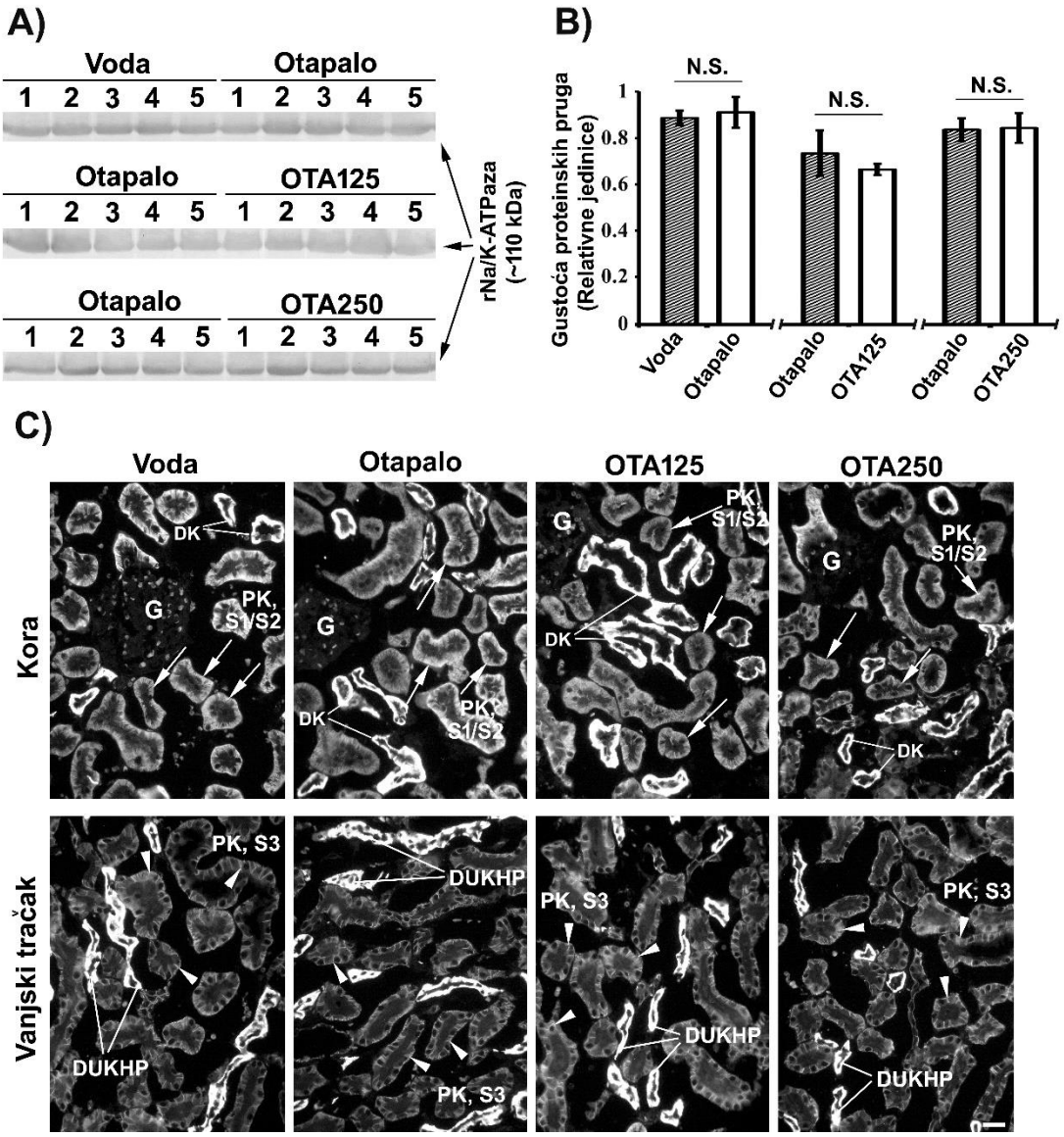
4.2.1 Pojedinačni učinci mikotoksina

Kako bi istražili pojedinačne učinke mikotoksina, spolno zreli mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* ili OTA ili CIT tijekom 21 dana, a kontrolne životinje ili vodom za piće ili otopinom rabljenom za otapanje mikotoksina, tzv. otapalom, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Životinje su nakon tretmana usmrćene, a iz tkiva bubrega izdvojene su USM metodom diferencijalnog centrifugiranja (poglavlje 3.2.3.1.), te je provedena fiksacija bubrežnog tkiva (poglavlje 3.2.4.1.). Stanična lokalizacija i ekspresija membranskih prijenosnika OA i *housekeeping* proteina u bubrezima štakora istražena je upotrebom specifičnih protutijela metodama western (poglavlje 3.2.3.3.) i imunofluorescencijske (poglavlje 3.2.4.2.) analize. Prikazani su rezultati ekspresije tri skupine proteina uključujući *housekeeping* proteine (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin), membranske prijenosnike OA smještene u BLM (rOat1 i rOat3) ili ČM PK (rOat2 i rOat5) bubrega štakora.

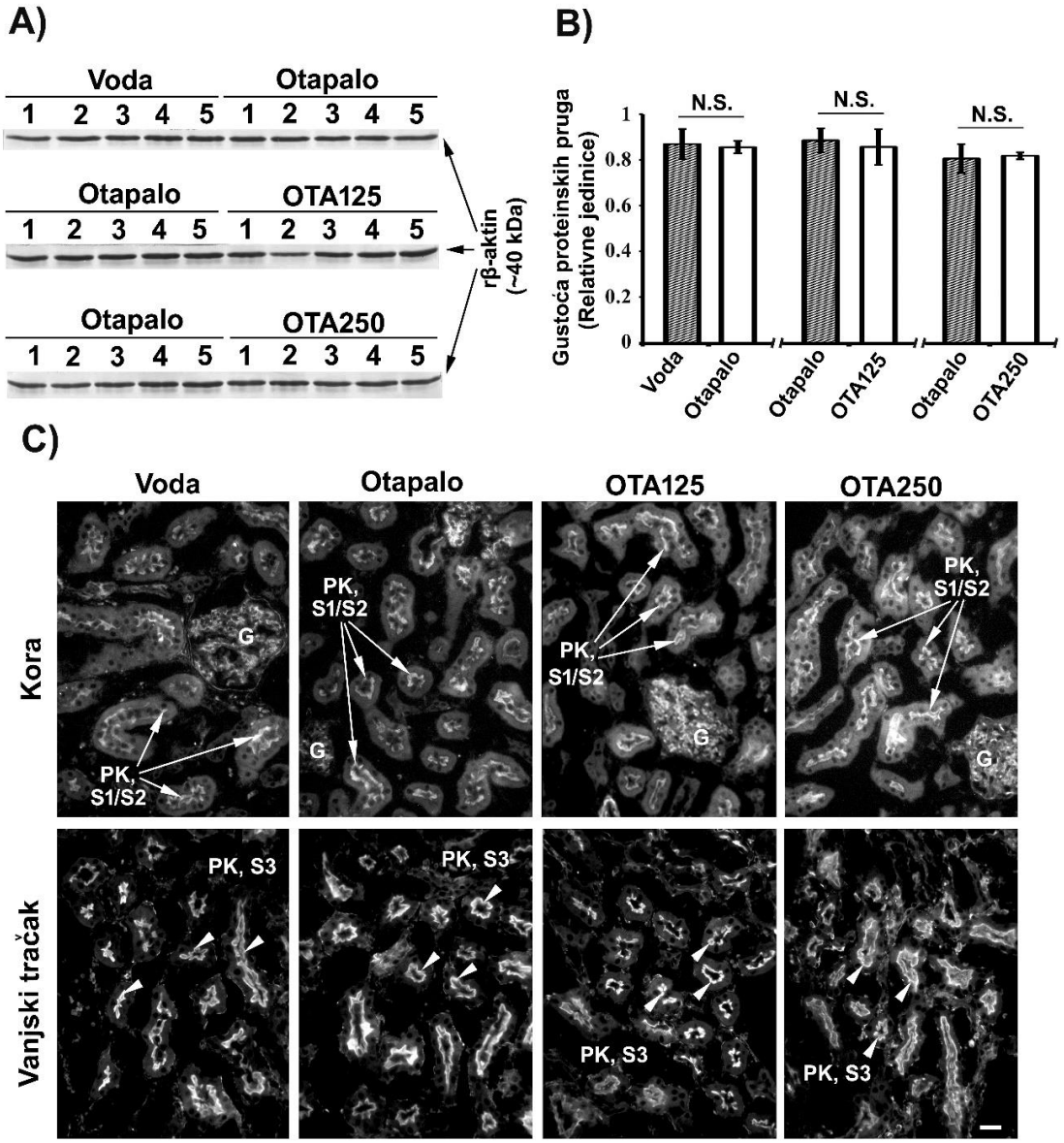
4.2.1.1 Učinak OTA na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da tretman s obje doze OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. i 0,250 mg kg^{-1} tj.m.) nije promijenio ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora (slika 9A i B; otapalo *vs.* OTA125, otapalo *vs*. OTA250). Također, tretman životinja s otopinom koja je rabljena kao otapalo za OTA (51 mM $NaHCO_3$) nije promijenio proteinsku ekspresiju rNa/K-ATPaze u bubrezima u odnosu na kontrolne životinje

tretirane vodom za piće (slika 9A i B; voda *vs.* otapalo). Drugim riječima, količina proteina rNa/K-ATPaze (~110 kDa) u uzorcima USM iz bubrega štakora bila je podjednaka u svih pokusnih skupina životinja (slika 9A i B). Rezultati imunofluorescencijske analize bili su usklađeni s rezultatima western analize; imunofluorescencijski signal za rNa/K-ATPazu bio je sličnog intenziteta u narescima tkiva bubrega svih pokusnih skupina životinja (slika 9C). Nadalje, tretman s obje doze OTA nije doveo do morfoloških oštećenja bubrežnih kanalića; nisu bila vidljiva oštećenja u BLM epitelnih stanica zavijenih PK (odsječci S1 i S2) i ravnih PK (odsječci S3) te DK smještenih u kori i vanjskom tračku bubrega (slika 9C; otapalo *vs.* OTA125, otapalo *vs*. OTA250). Morfološka oštećenja bubrežnih kanalića nisu uočena ni u ostalim dijelovima nefrona smještenim u unutarnjem tračku i papili (rezultati nisu prikazani). Slično rezultatima prikazanim na Slici 3, ekspresija proteina rβ-aktina u bubrezima štakora nije se mijenjala nakon tretmana s obje doze OTA (slika 10A i B; otapalo *vs.* OTA125, otapalo *vs.* OTA250) ili otopinom 51 mM $NaHCO_3$ (slika 10A i B; voda *vs.* otapalo). Drugim riječima, količina proteina rβ-aktina (~40 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora bila je podjednaka u svih pokusnih skupina životinja (slika 10A i B). Slični rezultati dobiveni su imunofluorescencijskom analizom; specifično bojenje za rβ-aktin je bilo sličnog intenziteta u narescima tkiva bubrega svih pokusnih skupina životinja (Slika 10C). Također, nisu uočena oštećenja u ČM epitelnih stanica zavijenih PK (odsječci S1 i S2) (Slika 10C; kora) i ravnih PK (odsječci S3) (slika 10C; vanjski tračak).



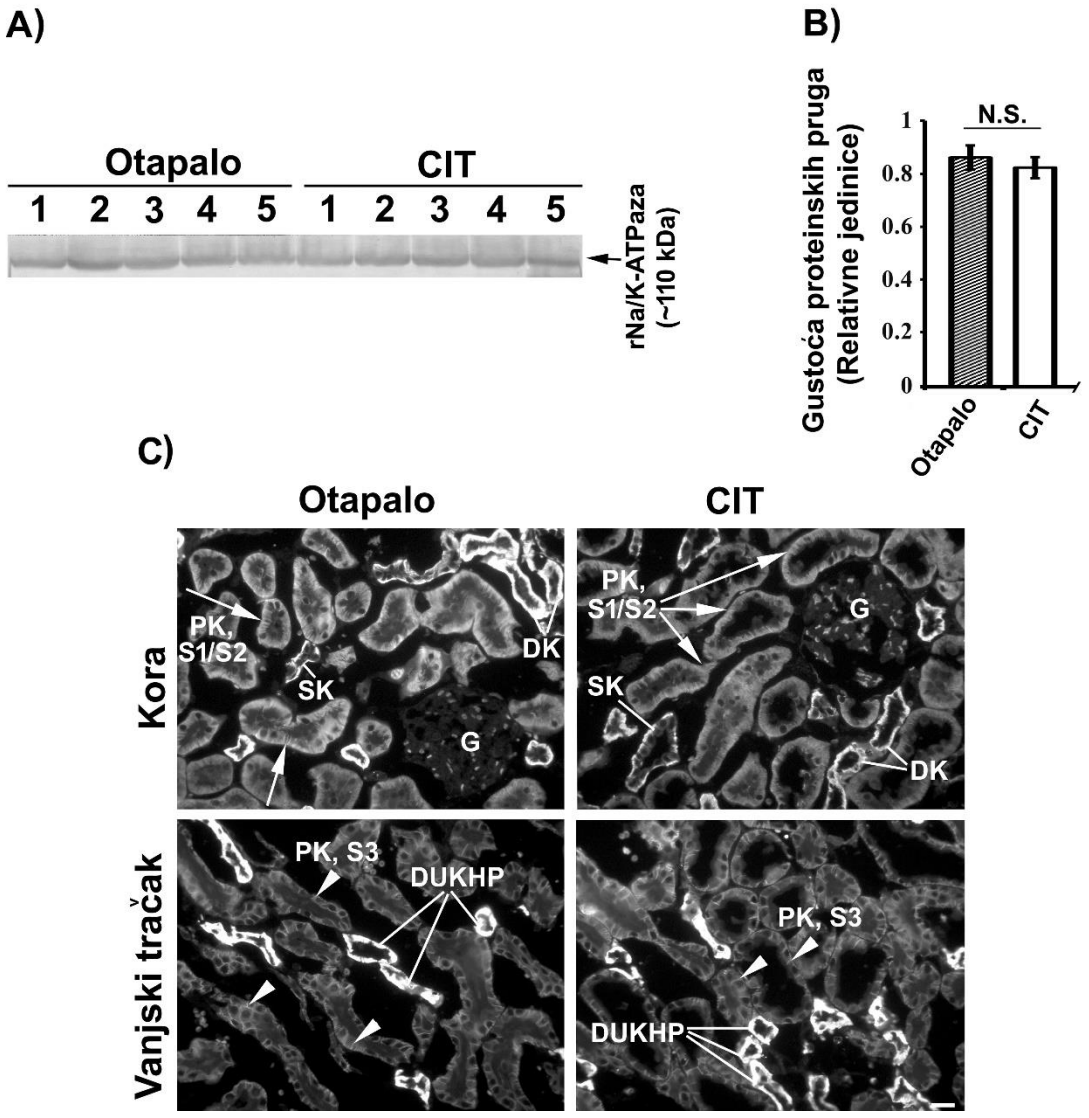
Slika 9. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar, tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom okratoksina A (OTA) u dvije doze: 0,125 mg kg^{-1} tj.m. (OTA 125) i 0,250 mg kg^{-1} tj.m. (OTA250), a kontrolne životinje vodom ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rNa/K-ATPazu (~110 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rNa/K-ATPazu u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. DK - zavijeni distalni kanalić, DUKHP - debeli uzlazni krak Henleove petlje, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci). N.S. - bez statističke značajnosti



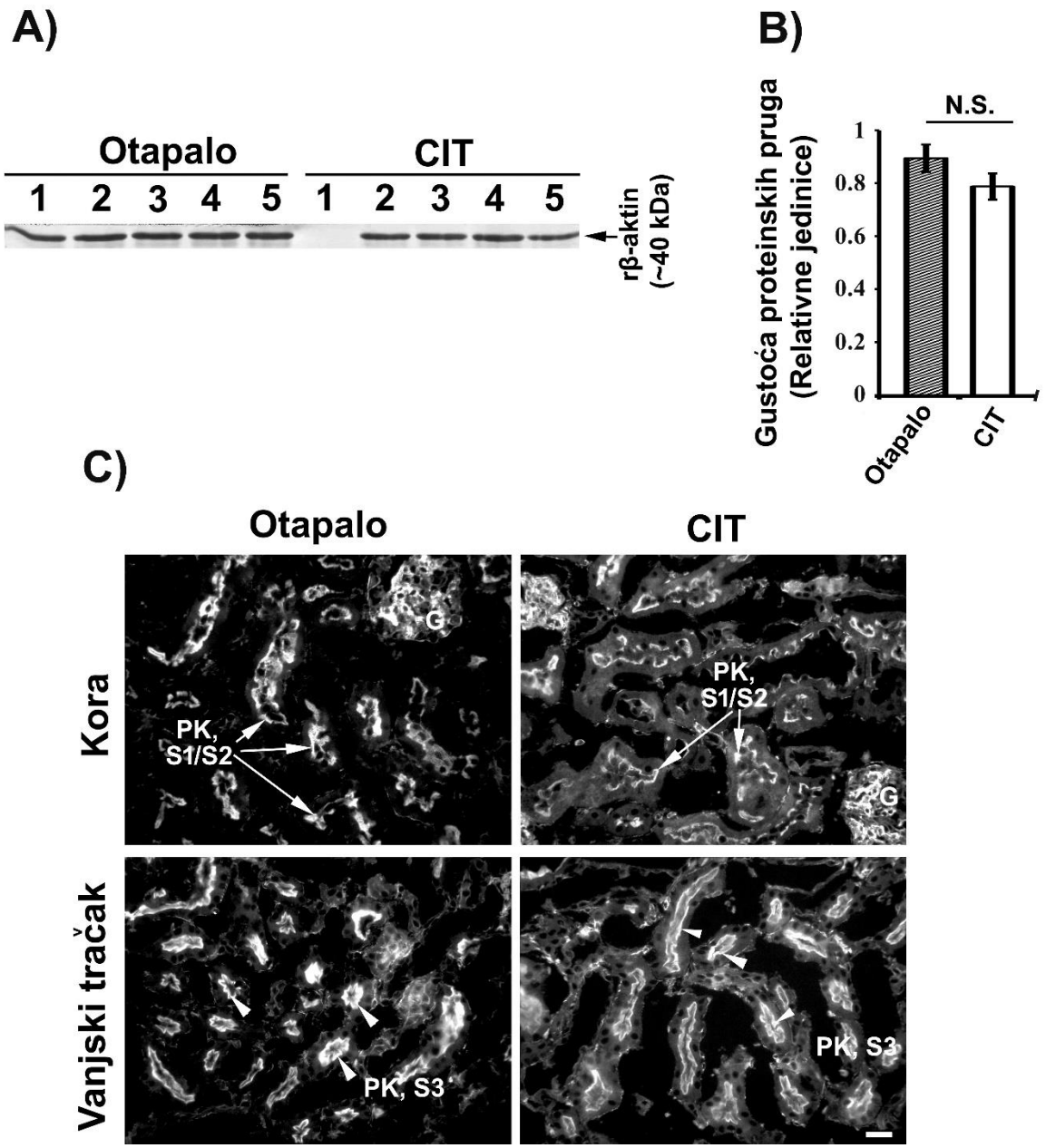
Slika 10. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom okratoksina A (OTA) u dvije doze: 0,125 mg kg^{-1} tj.m. (OTA 125) ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m. (OTA250), a kontrolne životinje vodom ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rβ-aktina u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rβ-aktin (~40 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rβ-aktin u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci). N.S. - bez statističke značajnosti

4.2.1.2 Učinak CIT na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da 21-dnevni tretman sa CIT (20 mg kg^{-1} tj.m.) nije promijenio ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze (slika 11A i B) i rβ-aktina (slika 11A i B) u bubrezima štakora. Drugim riječima, količina proteina rNa/K-ATPaze (~110 kDa) i rβ-aktina (~40 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora bila je podjednaka u svih pokusnih skupina životinja (slika 11A i B, slika 12A i B). Nadalje, rezultati imunofluorescencijske analize potvrdili su rezultate western analize; intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rNa/K-ATPazu (slika 11C) i rβ-aktin (slika 12C) bio je podjednak u narescima tkiva bubrega svih pokusnih skupina životinja. Slično učinku OTA, 21-dnevni tretman štakora sa CIT (20 mg kg^{-1} tj.m.) nije uzrokovao morfološka oštećenja bubrežnih kanalića, te nisu uočena oštećenja BLM (slika 11C) i ČM PK (slika 12C) smještenih u kori (odsječci S1 i S2) i vanjskom tračku (odsječci S3) bubrega. Također, tretman štakora s CIT nije uzrokovao morfološka oštećenja kanalića koji čine distalne dijelove nefrona uključujući one u unutarnjem tračku i papili (rezultati nisu prikazani).



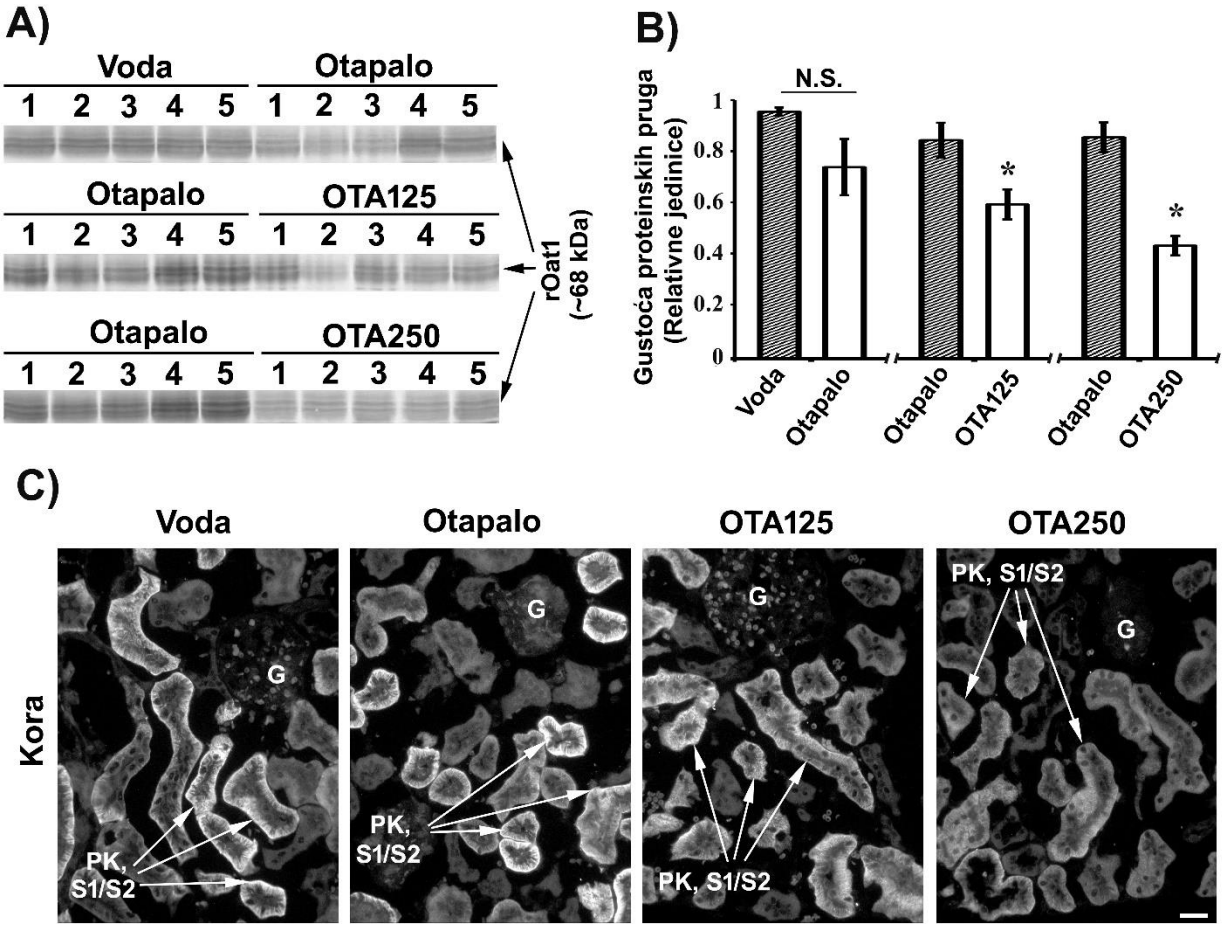
Slika 11. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom citrinina (CIT) (20 mg kg^{-1} tj.m.), a kontrolne životinje otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rNa/K-ATPazu (~110 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rNa/K-ATPazu u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 μm. DUKHP - debeli uzlazni krak Henleove petlje, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci), SK - sabirni kanalići, DK - zavijeni distalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti



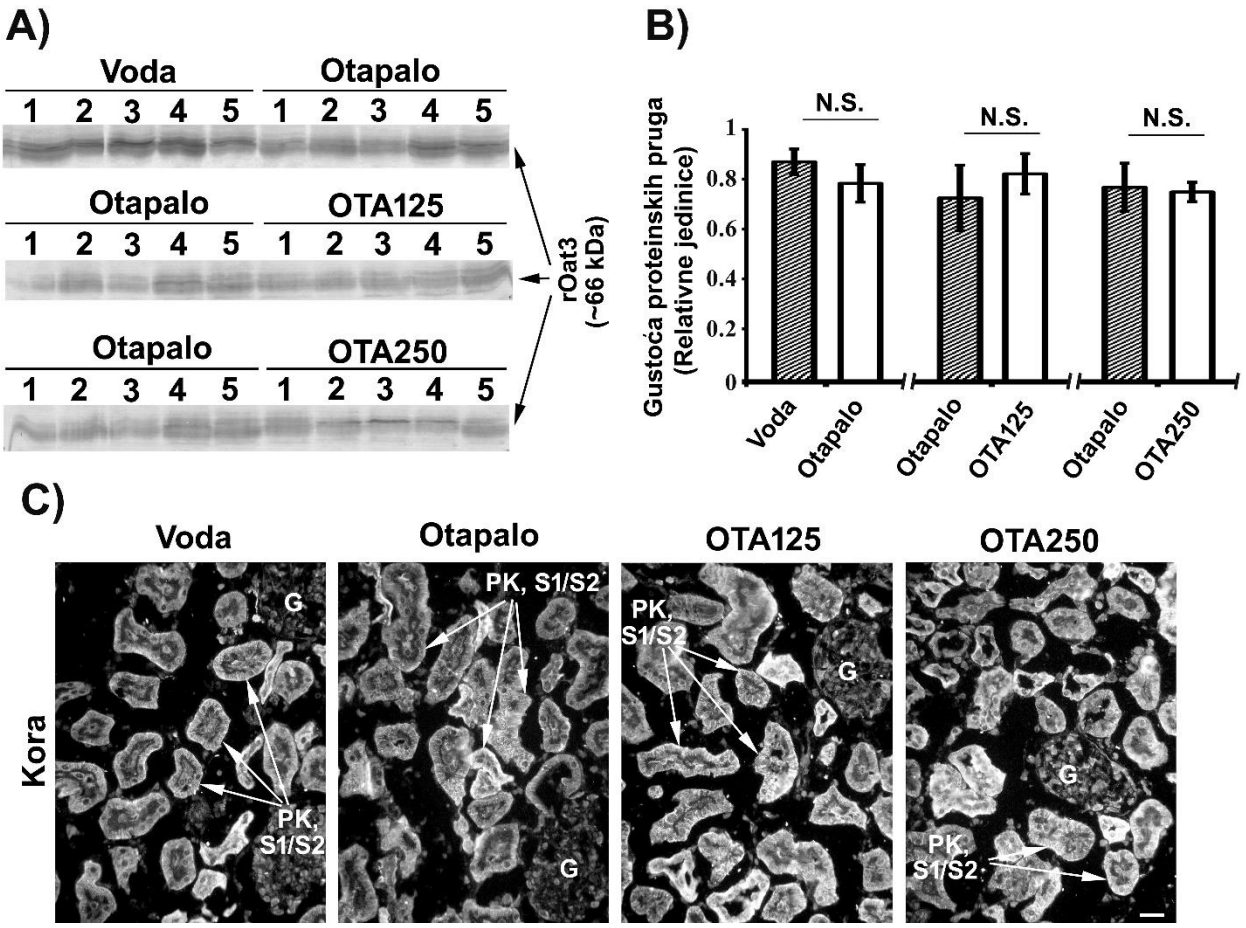
Slika 12. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom citrinina (CIT) (20 mg kg^{-1} tj.m.), a kontrolne životinje otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rβ-aktina u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rβ-aktin (~40 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rβ-aktin u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci). N.S. - bez statističke značajnosti

4.2.1.3 Učinak OTA na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da je 21-dnevni tretman s OTA značajno smanjio količinu proteina rOat1 (~68 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora, pri čemu je uočena ovisnost učinka o dozi (slika 13A i B). Tako je niža doza OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m.) značajno smanjila količinu proteina rOat1 u bubrezima štakora (~30%) (slika 13A i B; otapalo *vs.* OTA125) dok je veća doza OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) dodatno smanjila njegovu ekspresiju (~50%) (slika 13A i B; otapalo *vs.* OTA250). Također, tretman s otapalom (51 mM $NaHCO_3$) nije promijenio količinu proteina rOat1 (~68 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora u odnosu na kontrolne životinje tretirane vodom za piće (slika 13A-B; voda *vs.* otapalo). Nadalje, rezultati imunofluorescencijske analize bili su usklađeni s rezultatima western analize; OTA je smanjio intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rOat1 u životinja tretiranih OTA u odnosu na kontrolne životinje tretirane ili vodom ili otapalom (slika 13C). Za razliku od inhibitornog učinka OTA na ekspresiju proteina rOat1, rezultati western (slika 14A i B; otapalo *vs.* OTA125, otapalo *vs.* OTA250) i imunofluorescencijske (slika 14C; otapalo *vs.* OTA125, otapalo *vs.* OTA250) analize su pokazali da tretman štakora s obje doze OTA nije promijenio ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora. Također, ekspresija rOat3 proteina u tkivu bubrega nije se promijenila nakon tretmana životinja s otapalom (51 mM $NaHCO_3$) u odnosu na kontrolne životinje tretirane vodom za piće (slika 14A-C; voda *vs.* otapalo).



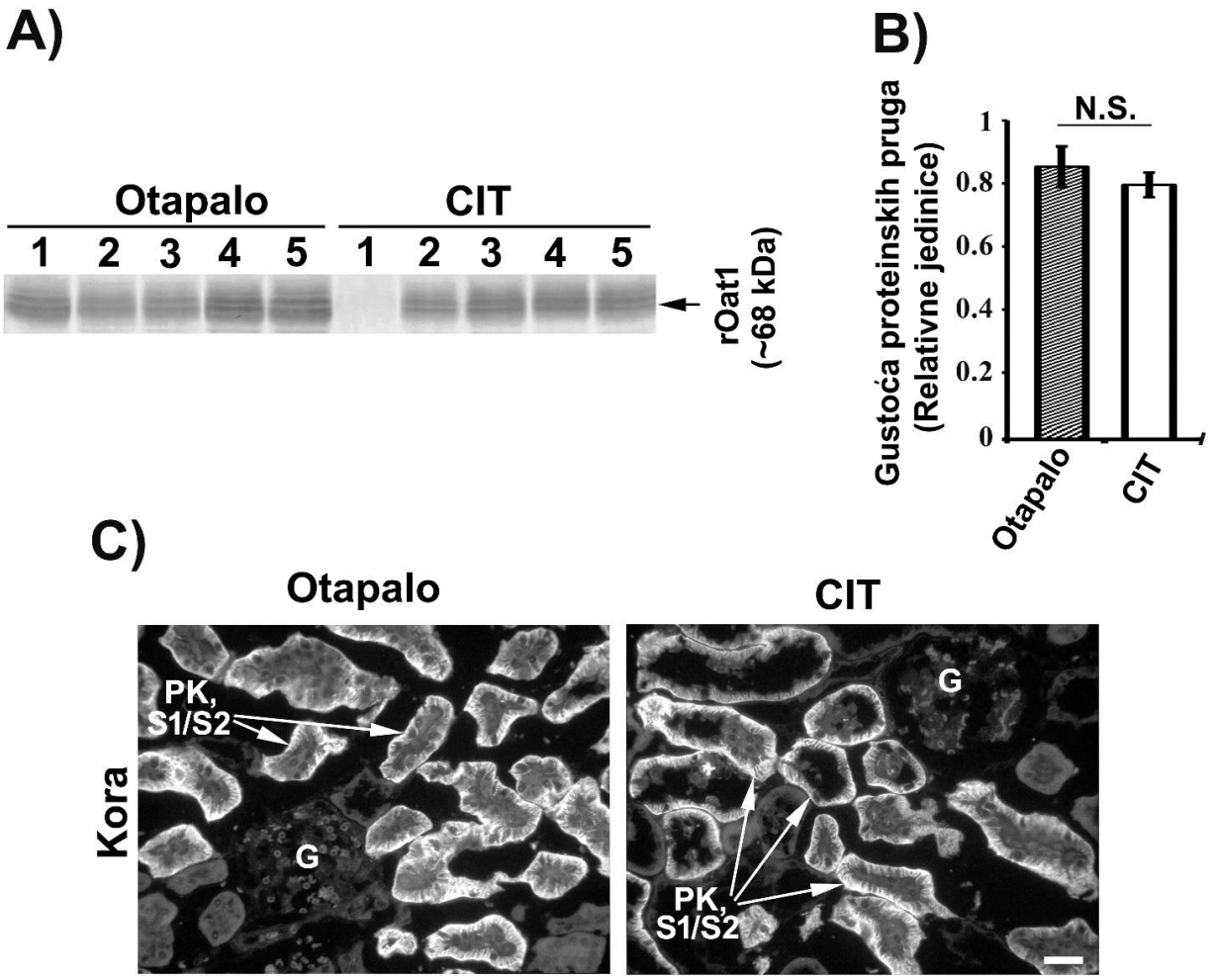
Slika 13. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom okratoksina A (OTA) u dvije doze: 0,125 mg kg^{-1} tj.m. (OTA 125) ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m. (OTA250), a kontrolne životinje vodom (H_2O) ili otapalom (51 mM $NaHCO_3$). Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat1 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat1 (~68 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat1 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 µm, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti, ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)



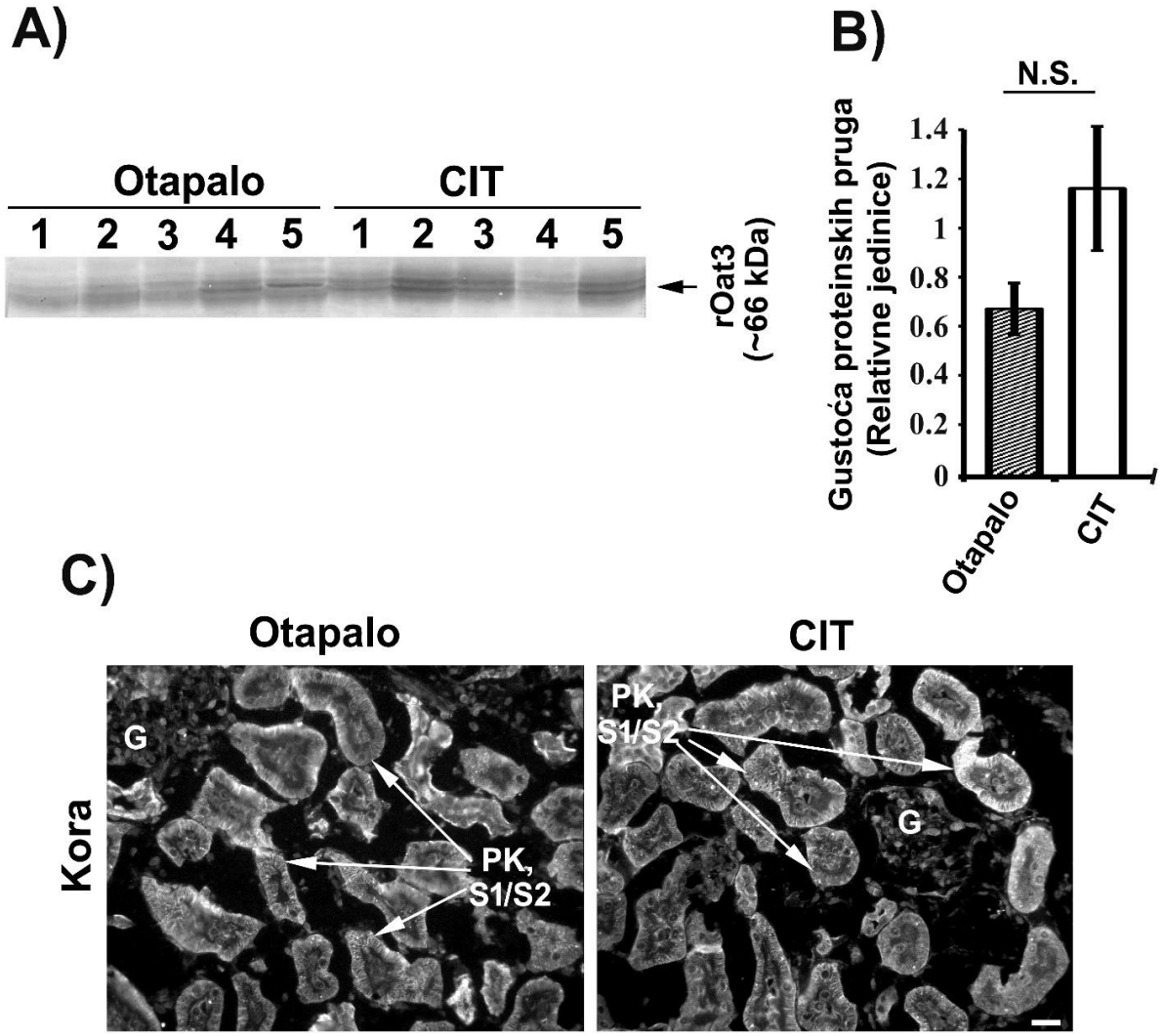
Slika 14. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom okratoksina A (OTA) u dvije doze: 0,125 mg kg^{-1} tj.m. (OTA 125) ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m. (OTA250), a kontrolne životinje vodom (H_2O) ili otapalom (51 mM $NaHCO_3$). Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat3 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat3 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat3 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 µm, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti

4.2.1.4 Učinak CIT na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da 21-dnevni tretman štakora s CIT (20 mg kg^{-1} tj.m.) nije promijenio količinu proteina rOat1 (~68 kDa) (slika 15A i B) i rOat3 (~66 kDa) (slika 16A i B) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega. Rezultati imunofluorescencijske analize provedeni na narescima tkiva bubrega bili su usklađeni s rezultatima western analize; intenzitet imunofluorescencijskog bojenja u BLM PK (odsječci S1 i S2) za rOat1 (slika 15C) i rOat3 (slika 16C) bio je podjednak u svih pokusnih skupina životinja.



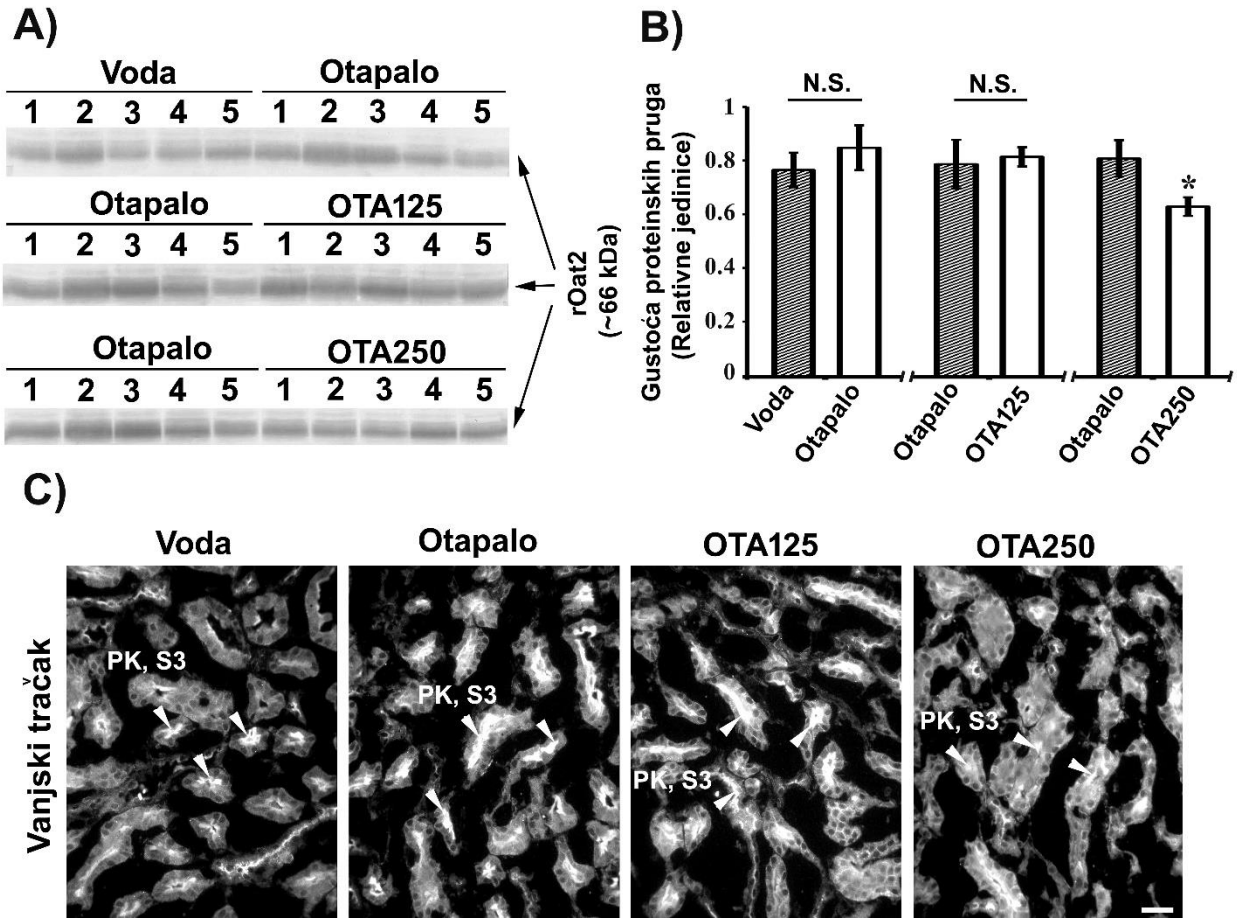
Slika 15. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom citrinina (CIT) (20 mg kg^{-1} tj.m.), a kontrolne životinje otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat1 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat1 (~68 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat1 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 μm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti



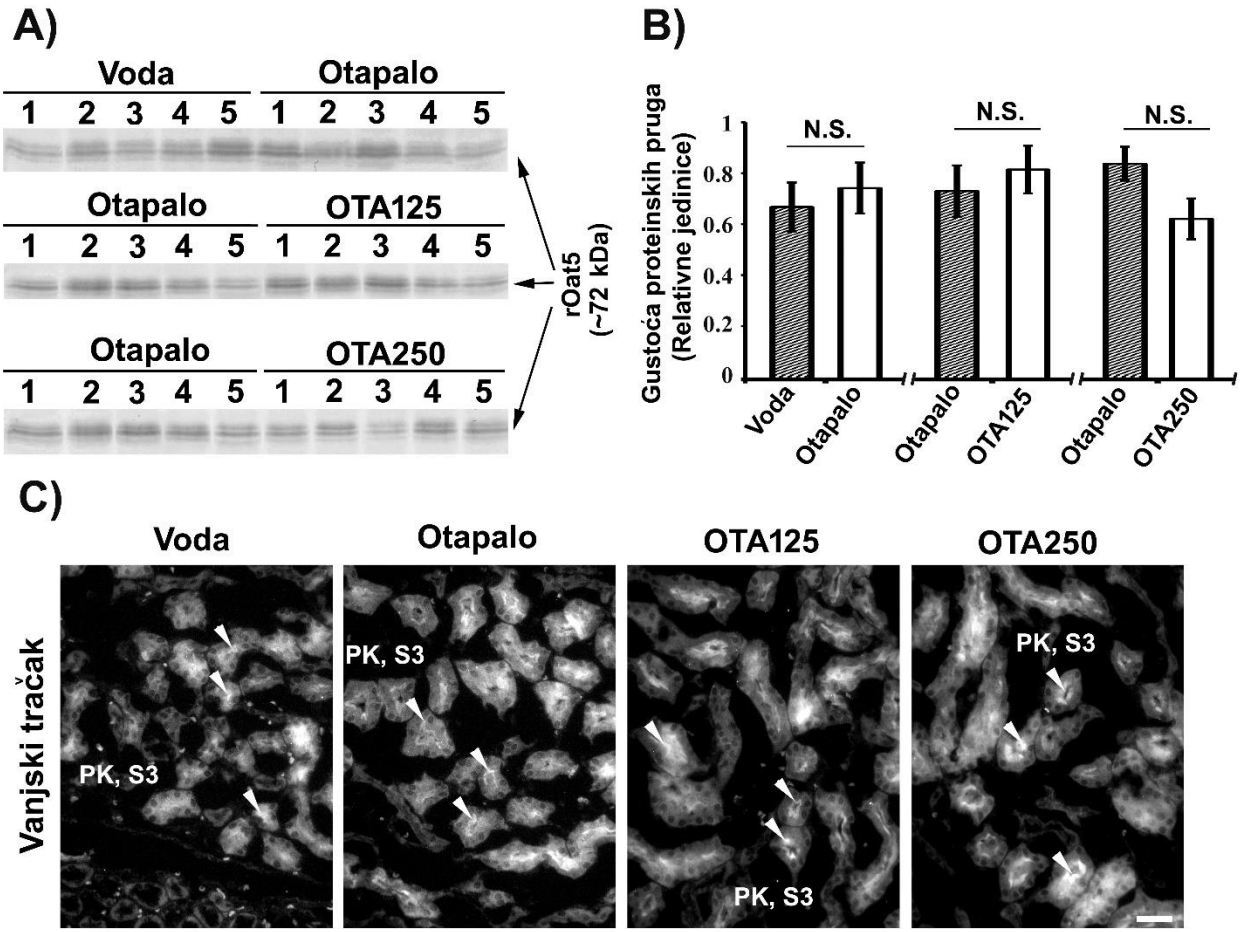
Slika 16. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom citrinina (CIT) (20 mg kg^{-1} tj.m.), a kontrolne životinje otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat3 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat3 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat3 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 μm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti

4.2.1.5 Učinak OTA na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da 21-dnevni tretman s manjom dozom OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m.) nije promijenio količinu proteina rOat2 (~66 kDa) (slika 17A i B; otapalo *vs.* OTA125) i rOat5 (~72 kDa) (slika 18A i B; otapalo *vs.* OTA125) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora. Također, tretman štakora s otapalom (51 mM $NaHCO_3$) nije izmijenio ekspresiju rOat2 (slika 17A i B; voda *vs.* otapalo) niti rOat5 (slika 18A i B; voda *vs.* otapalo) proteina u bubrezima. Međutim, tretman s većom dozom OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), u bubrezima štakora značajno je smanjio (~22%) količinu proteina rOat2 (~66 kDa) (slika 17A i B; otapalo *vs.* OTA250), ali ne i proteina rOat5 (~72 kDa) (slika 18A i B; otapalo *vs.* OTA250). Slični fenomeni uočeni su u narescima tkiva bubrega tijekom imunofluorescencijske analize; imunofluorescencijsko bojenje za rOat2 u ČM PK (odsječci S3) bilo je smanjeno nakon tretmana s većom dozom OTA (slika 17C; otapalo *vs.* OTA250) dok je imunofluorescencijsko bojenje za rOat5 u ČM PK (odsječci S3) bilo sličnog intenziteta u svih pokusnih skupina životinja (slika 18C).



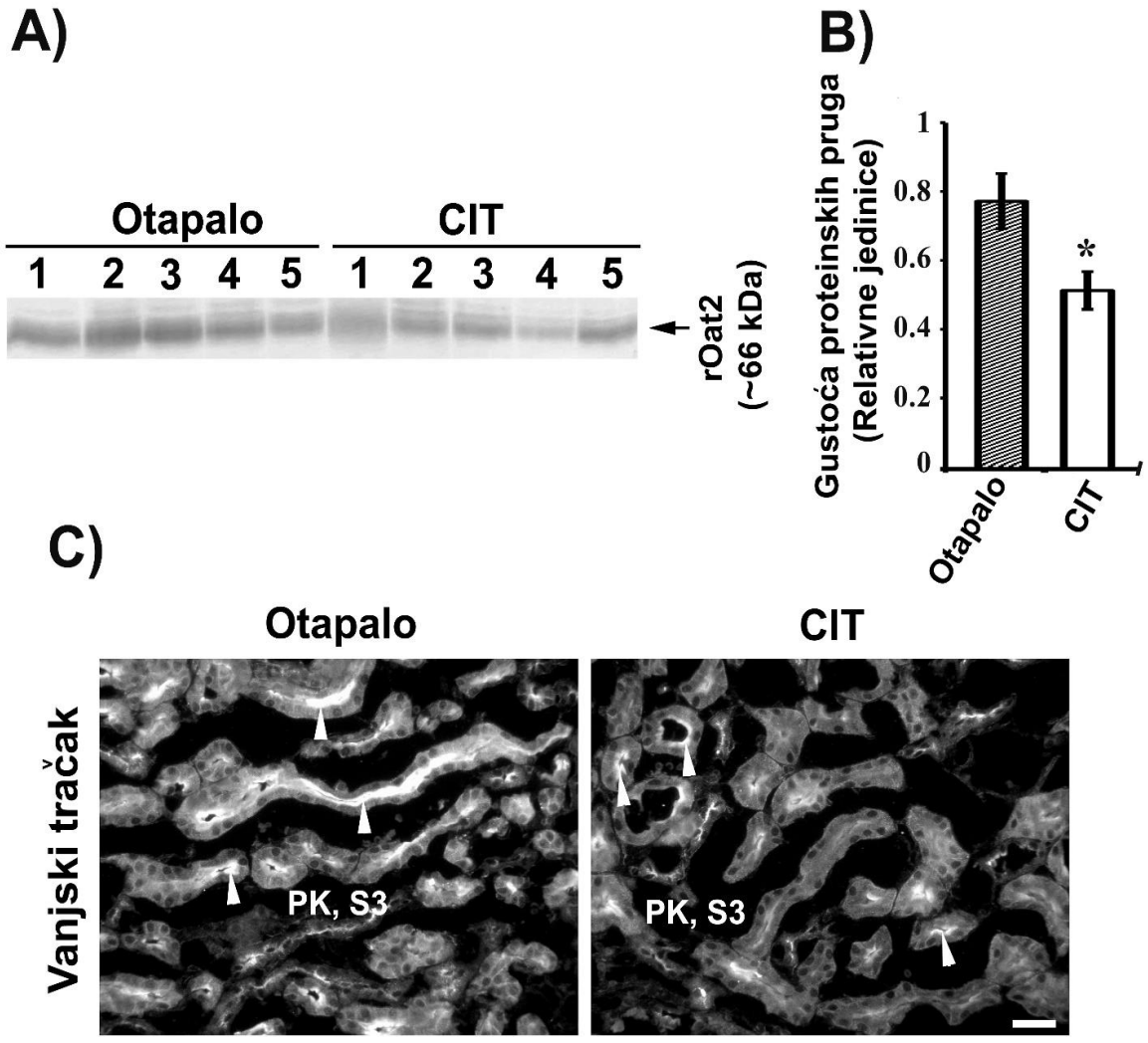
Slika 17. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom okratoksina A (OTA) u dvije doze: 0,125 mg kg^{-1} tj.m. (OTA 125) ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m. (OTA250), a kontrolne životinje vodom (H_2O) ili otapalom (51 mM $NaHCO_3$). Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat2 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat2 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat2 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 µm, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti, ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)



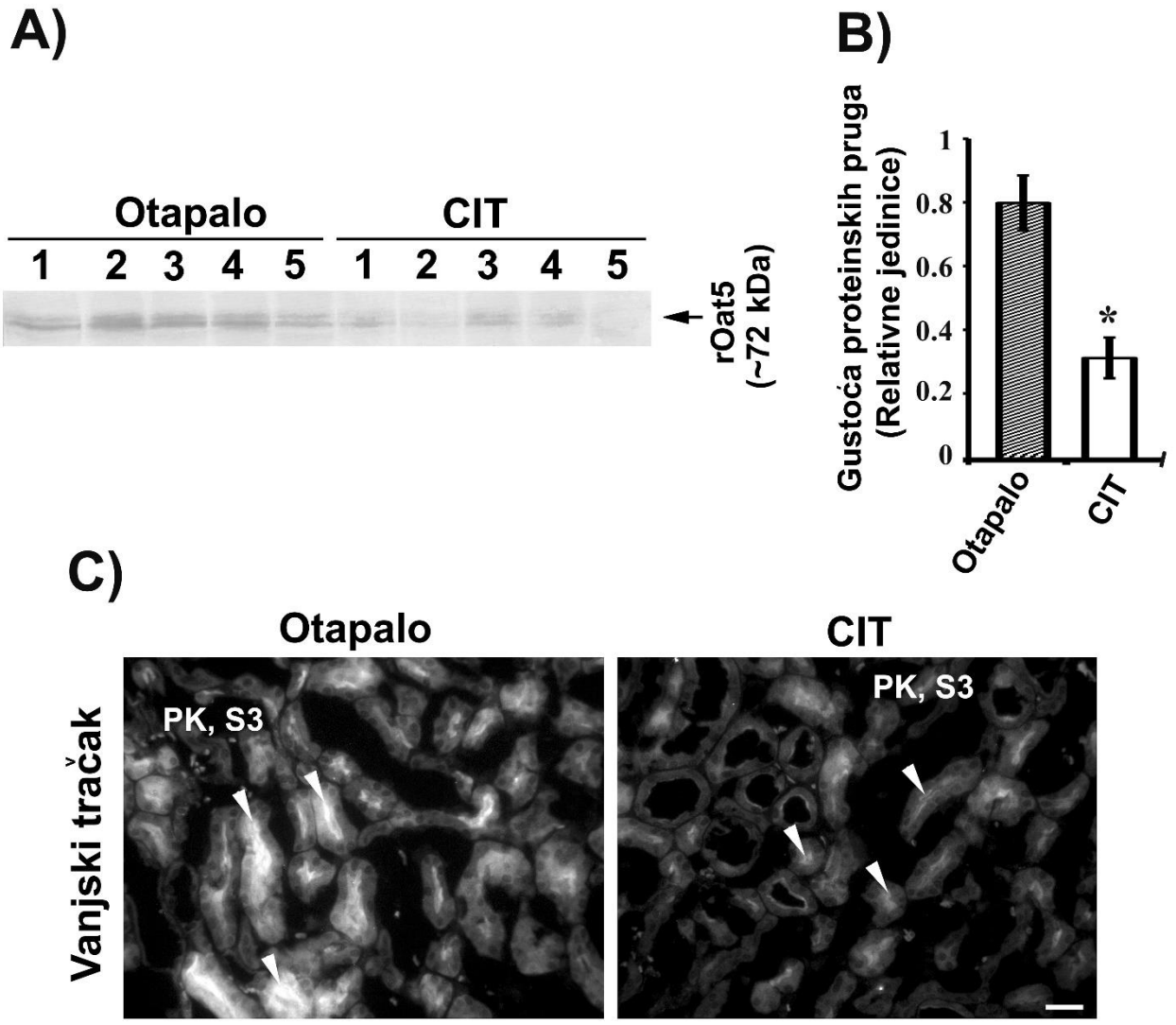
Slika 18. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom okratoksina A (OTA) u dvije doze: 0,125 mg kg^{-1} tj.m. (OTA 125) ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m. (OTA250), a kontrolne životinje vodom (H_2O) ili otapalom (51 mM $NaHCO_3$). Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat5 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat5 (~72 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat5 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 µm, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti

4.2.1.6 Učinak CIT na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da je 21-dnevni tretman štakora s CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.) značajno smanjio količinu proteina u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega; ekspresija proteina rOat2 (~66 kDa) smanjila se za ~34% (slika 19A i B; otapalo *vs.* CIT), a ekspresija proteina rOat5 (~72 kDa) za ~61% (slika 20A i B; otapalo *vs.* CIT). Rezultati imunofluorescencijske analize bili su usklađeni s rezultatima western analize; 21-dnevni tretman štakora s CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.) umanjio je intenzitet specifičnog imunofluorescencijskog bojenja za rOat2 (slika 19C; otapalo *vs.* CIT) i rOat5 (slika 20C; otapalo *vs.* CIT) u narescima tkiva bubrega.



Slika 19. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom citrinina (CIT) (2 mg kg^{-1} tj.m.), a kontrolne životinje otapalom (50 mM $NaHCO_3$). Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat2 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat2 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat2 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 μm. G - glomerul, N.S. - bez statističke značajnosti, PK - proksimalni kanalići, ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)



Slika 20. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana otopinom citrinina (CIT) (2 mg kg^{-1} tj.m.), a kontrolne životinje vodom (H_2O) ili otapalom (50 mM $NaHCO_3$). Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat5 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat5 (~72 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat5 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 μm. G - glomerul, N.S. - bez statističke značajnosti, PK - proksimalni kanalići. * - statistički značajno ($p < 0,05$)

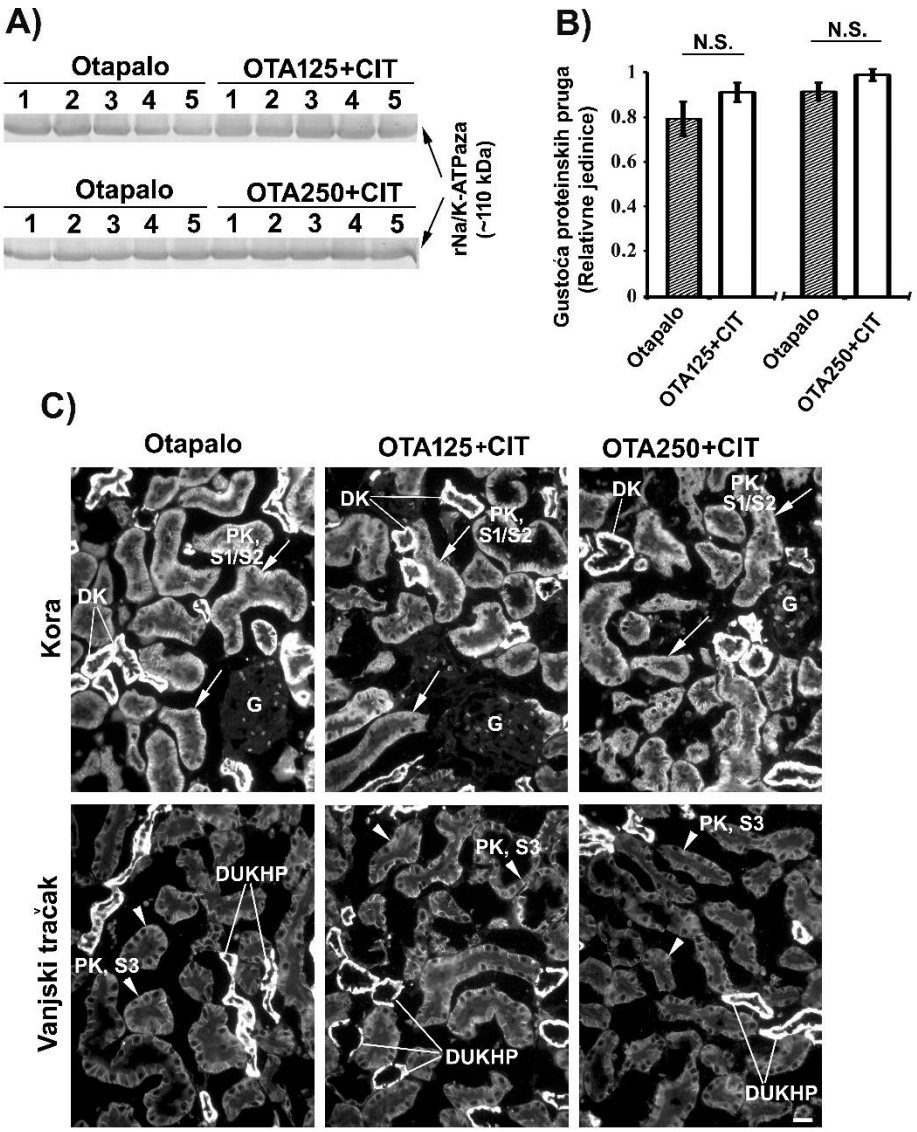
4.2.2 Združeni učinci mikotoksina

Kako bi istražili združene učinke mikotoksina, spolno zreli mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* smjesom mikotoksina (OTA + CIT) tijekom 21 dana, a kontrolne životinje vodom ili otapalima kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Životinje su nakon tretmana usmrćene, a iz bubrežnog tkiva izdvojene su USM metodom diferencijalnog centrifugiranja (poglavlje 3.2.3.1.) te je provedena fiksacija bubrežnog tkiva (poglavlje 3.2.4.1.). Stanična lokalizacija i ekspresija membranskih prijenosnika OA i *housekeeping* proteina u bubrezima štakora istražena je upotrebom specifičnih protutijela metodama western (poglavlje 3.2.3.3.) i imunofluorescencijske (poglavlje 3.2.4.2.) analize. Budući da su rezultati western i imunofluorescencijske analize pokazali da je ekspresija istraživanih proteina u bubrezima kontrolnih životinja tretiranih vodom bila slična ekspresiji u životinja tretiranim otapalom korištenim u pripremi otopina mikotoksina (slike 9-18; voda *vs.* otapalo), daljnja statistička analiza i tumačenje rezultata provedeno je usporedbom uzoraka tkiva bubrega životinja tretiranih smjesom mikotoksina (OTA + CIT) u odnosu na uzorke tkiva bubrega životinja tretiranih otapalom. Prikazani su rezultati ekspresije tri grupe proteina uključujući *housekeeping* proteine (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin), membranske prijenosnike OA smještene ili u BLM (rOat1 i rOat3), ili u ČM PK (rOat2 i rOat5) bubrega štakora.

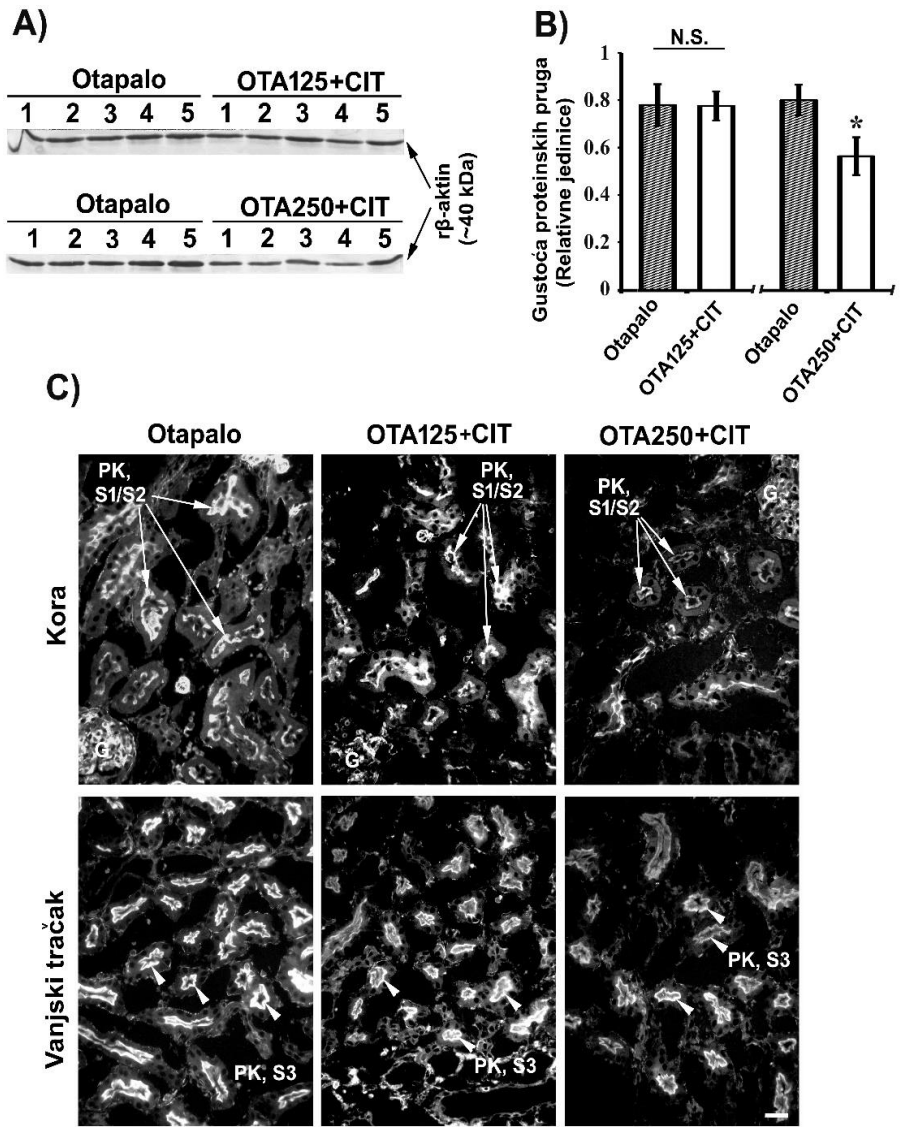
4.2.2.1 Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da 21-dnevni tretman smjesom dva mikotoksina (OTA+CIT), koja je sadržavala manju dozu OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA i 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), nije mijenjao ekspresiju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora uključujući rNa/K-ATPazu (slika 21A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo) i rβ-aktin (slika 22A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo). Međutim, tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala veću dozu OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA i 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT) značajno je smanjio (~30%) količinu proteina rβ-aktina (~40 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora (slika 22A i B; OTA250+CIT *vs.* otapalo) dok je količina proteina rNa/K-ATPaze (~110 kDa) ostala nepromijenjena (slika 21A i B; OTA250+CIT *vs.* otapalo). Slični

fenomeni uočeni su imunofluorescencijskom analizom u narescima tkiva bubrega štakora; tretman smjesom (OTA+CIT) koja je sadržavala veću dozu OTA smanjio je intenzitet specifičnog bojenja za rβ-aktin (slika 22C; OTA250+CIT *vs.* otapalo), ali ne i rNa/K-ATPazu (slika 21C; OTA250+CIT *vs.* otapalo) dok tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala manju dozu OTA, nije mijenjao intenzitet imunofluorescencije niti za rNa/K-ATPazu (slika 21C; OTA125+CIT *vs.* otapalo) niti za rβ-aktin (slika 22A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo).



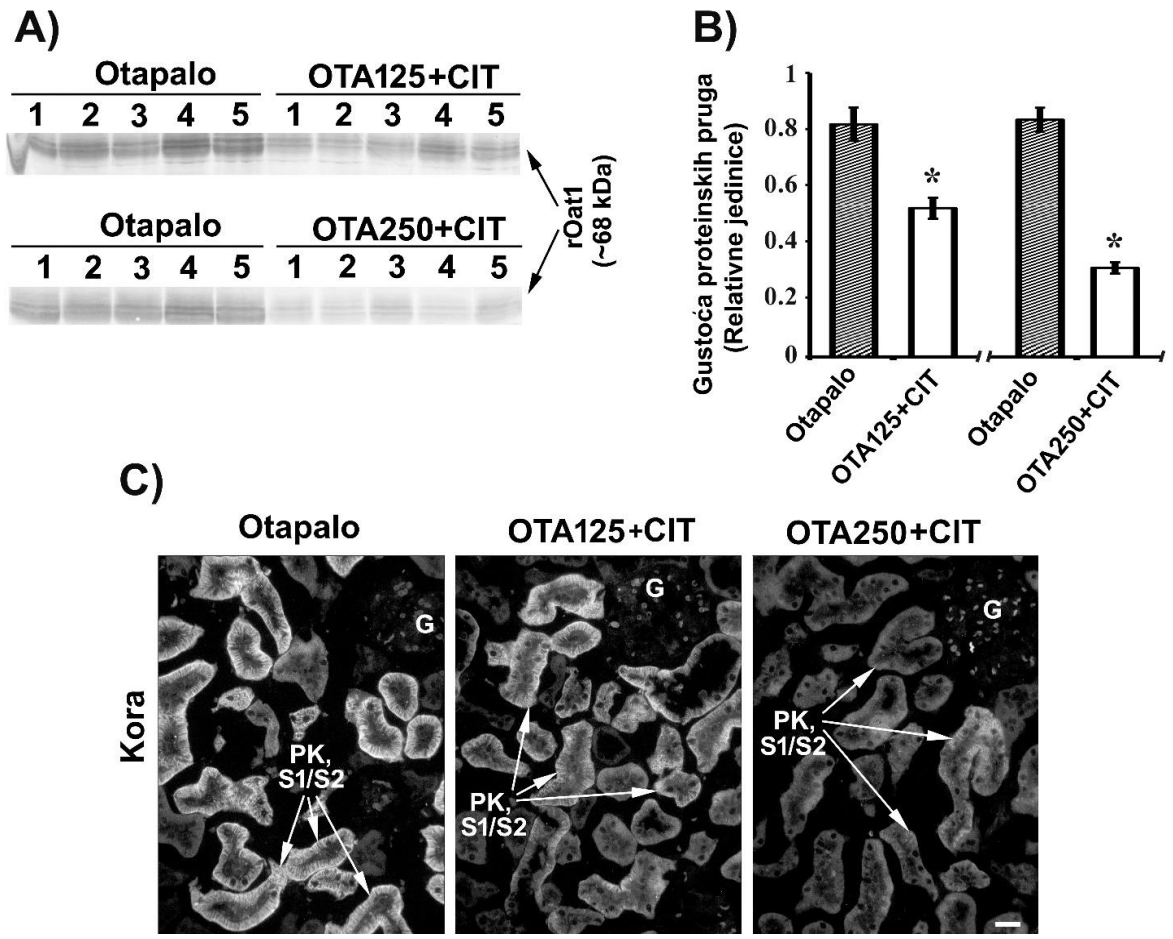
Slika 21. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana s dvije smjese mikotoksina: 1) 0,125 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA125+CIT) ili 2) 0,250 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA250+CIT), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rNa/K-ATPazu (~110 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rNa/K-ATPazu u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. DUKHP - debeli uzlazni krak Henleove petlje, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci), DK - zavijeni distalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti



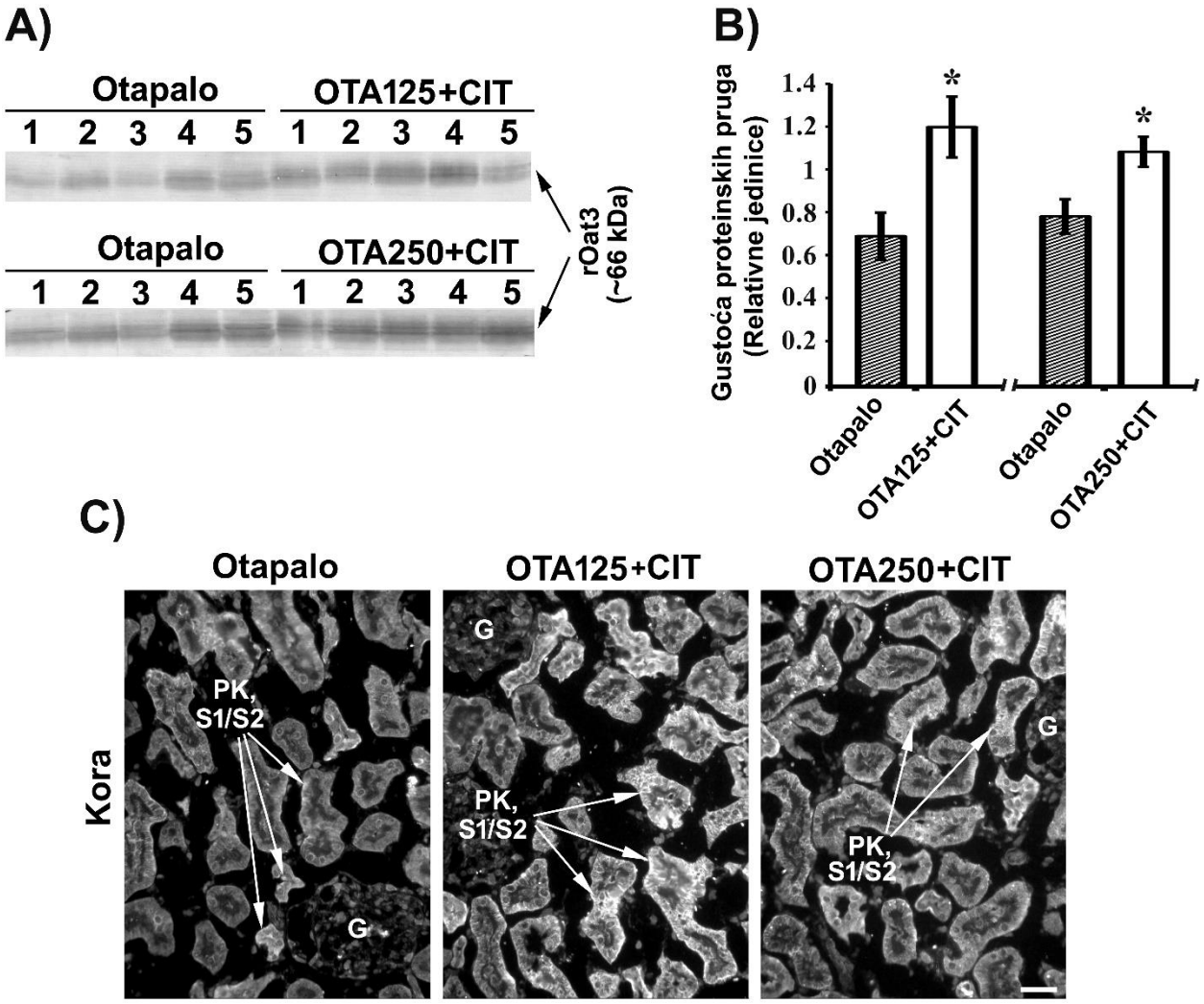
Slika 22. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana s dvije smjese mikotoksina: 1) 0,125 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA125+CIT) ili 2) 0,250 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA250+CIT), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rβ-aktina u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rβ-aktin (~40 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rβ-aktin u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci). N.S. - bez statističke značajnosti, ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)

4.2.2.2 Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju rOat1 i rOat3 proteina u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da je 21-dnevni tretman smjesom dva mikotoksina (OTA+CIT) smanjio količinu proteina rOat1 (~68 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora, pri čemu je uočena ovisnost učinka o dozi; smjesa mikotoksina s manjom dozom OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA i 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT) značajno je smanjila (~37%) ekspresiju proteina rOat1 (slika 23A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo), a smjesa mikotoksina s većom dozom OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA i 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT) dodatno je umanjila ekspresiju (~63%) (slika 23A i B; OTA250+CIT *vs.* otapalo). Rezultati imunofluorescencijske analize provedene na narescima tkiva bubrega bili su usklađeni s rezultatima western analize; tretman smjesom dva mikotoksina (OTA+CIT) smanjio je intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rOat1 u BLM PK (odsječci S1 i S2) u odnosu na kontrolne životinje (slika 23C; OTA125+CIT *vs.* otapalo, OTA250+CIT *vs.* otapalo). Za razliku od inhibitornog učinka na ekspresiju proteina rOat1, ekspresija proteina rOat3 (~66 kDa) u bubrezima štakora značajno se povećala (1,74 puta) (slika 24A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo) ili 1,39 puta (slika 24A i B; OTA250+CIT *vs.* otapalo) nakon tretmana istom smjesom mikotoksina. Sukladno rezultatima western analize, intenzitet imunofluorescencijskog signala za rOat3 povećao se nakon tretmana smjesom mikotoksina (OTA+CIT) u odnosu na intenzitet signala utvrđen u narescima tkiva bubrega životinja iz kontrolne skupine (slika 24C; OTA125+CIT *vs.* otapalo, OTA250+CIT *vs.* otapalo).



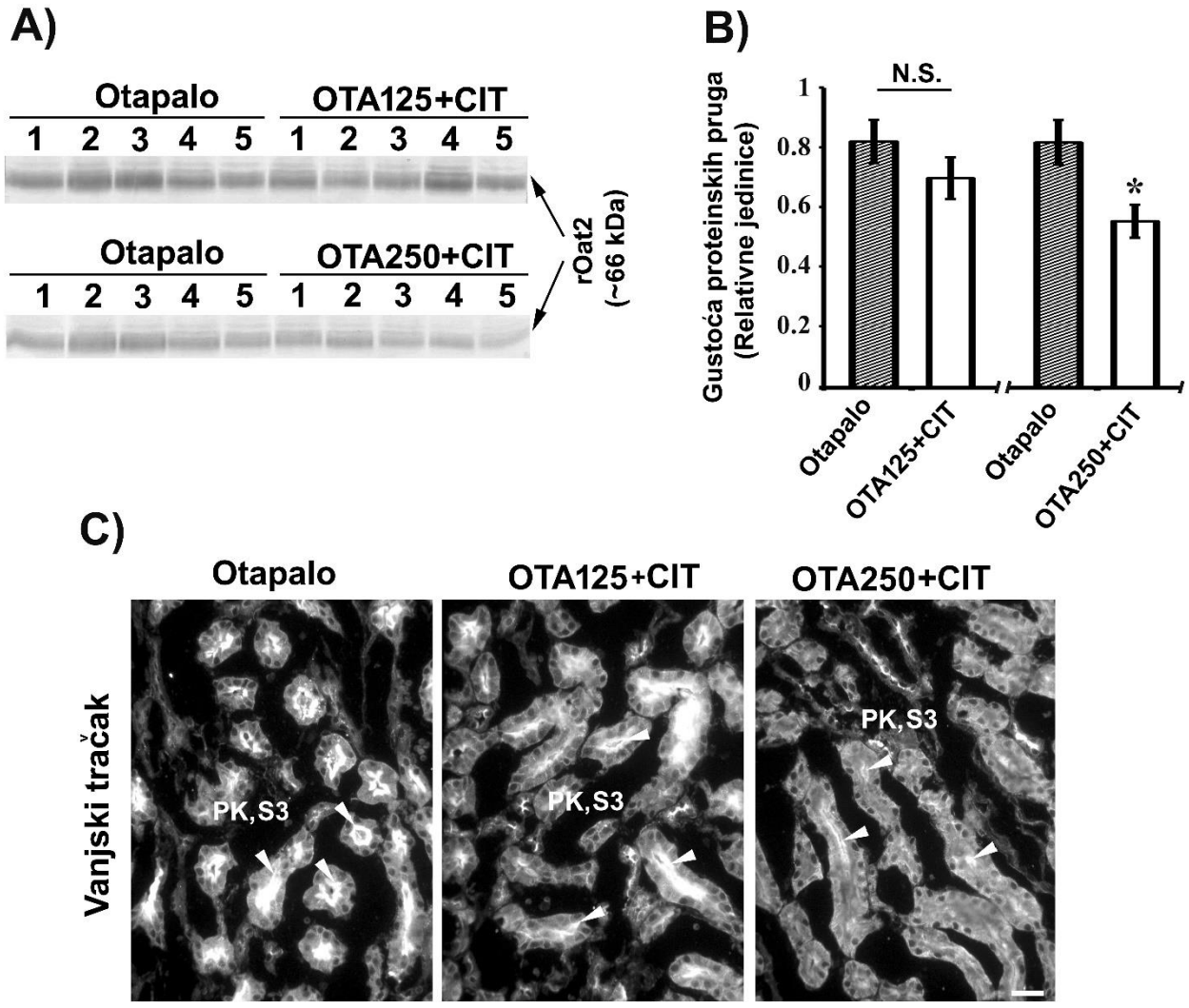
Slika 23. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana s dvije smjese mikotoksina: 1) 0,125 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA125+CIT) ili 2) 0,250 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA250+CIT), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat1 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat1 (~68 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat1 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 µm, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)



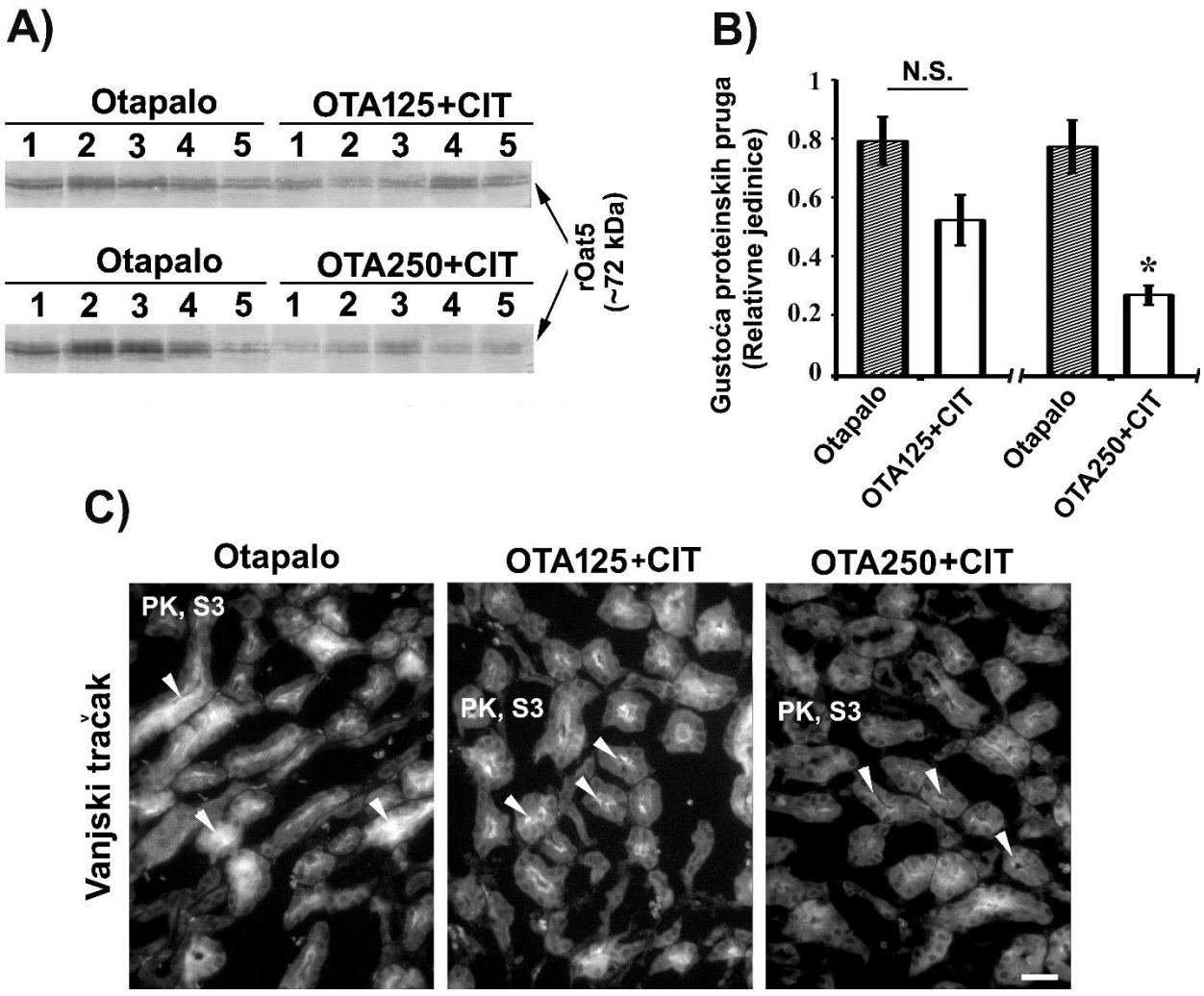
Slika 24. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana s dvije smjese mikotoksina: 1) 0,125 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA125+CIT) ili 2) 0,250 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA250+CIT), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat3 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat3 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat3 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 μm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. * - statistički značajno ($p < 0,05$)

4.2.2.3 Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da 21-dnevni tretman smjesom OTA i CIT koja je sadržavala manju dozu OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA i 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT) nije promijenio ekspresiju niti proteina rOat2 (slika 25A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo) niti proteina rOat5 (slika 26A i B; OTA125+CIT *vs.* otapalo) u bubrezima štakora. Međutim, tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala veću dozu OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA i 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT) značajno je smanjio ekspresiju oba proteina u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora; količina proteina rOat2 (~66 kDa) smanjila se ~32% (slika 25A i B; OTA250+CIT *vs.* otapalo), a količina rOat5 (~72 kDa) smanjila se ~65% (slika 26A i B; OTA250+CIT *vs.* otapalo). Slični fenomeni uočeni su imunocitokemijskom analizom; tretman smjesom mikotoksina (OTA+CIT) koja je sadržavala veću dozu OTA smanjio je intenzitet specifičnog imunofluorescencijskog bojenja u ČM PK (S3 odsječci u vanjskom tračku), uključujući rOat2 (slika 25C; OTA250+CIT *vs.* otapalo) i rOat5 (slika 26C; OTA250+CIT *vs.* otapalo), dok tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala manju dozu OTA nije mijenjao intenzitet imunofluorescencije niti za rOat2 (slika 25C; OTA125+CIT *vs.* otapalo) niti za rOat5 (slika 26C; OTA125+CIT *vs.* otapalo).



Slika 25. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana s dvije smjese mikotoksina: 1) 0,125 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA125+CIT) ili 2) 0,250 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA250+CIT), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat2 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat2 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat2 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 µm, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti, *- statistički značajno ($p < 0,05$)



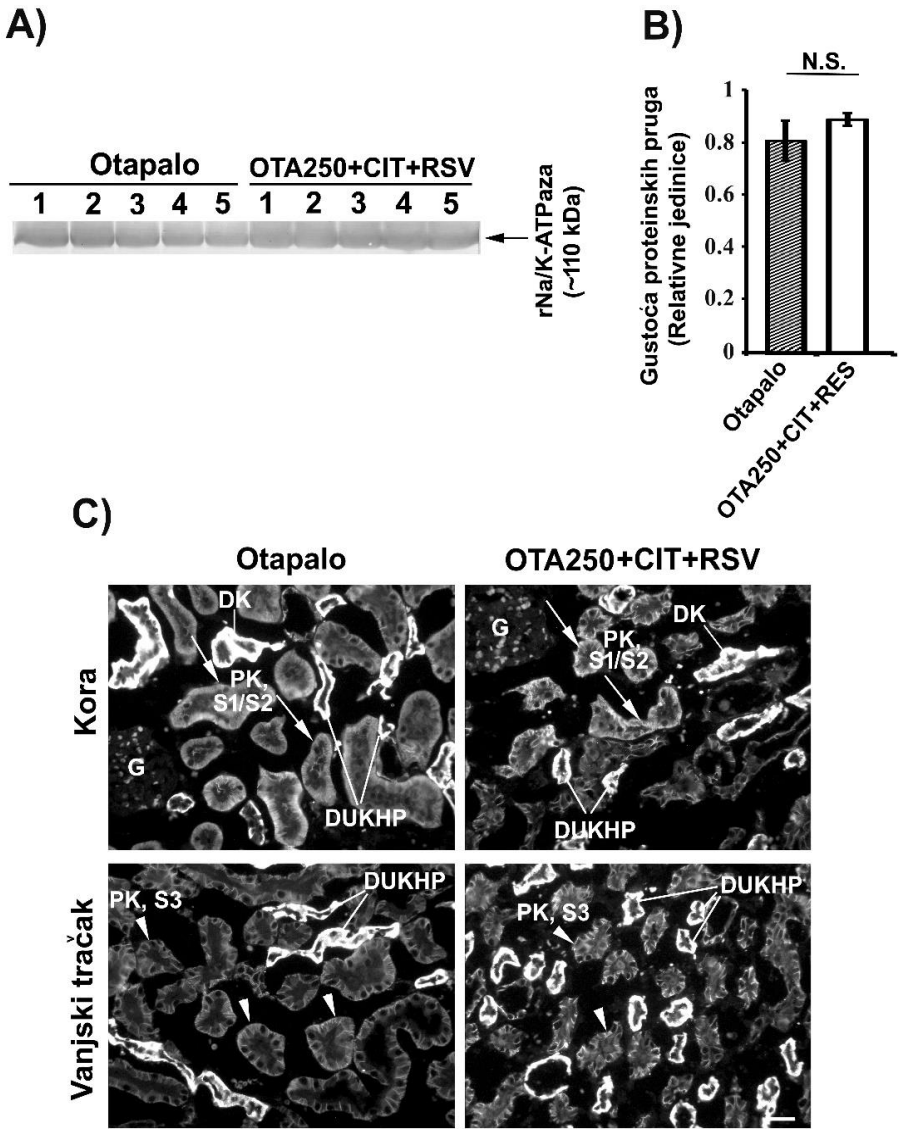
Slika 26. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana s dvije smjese mikotoksina: 1) 0,125 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA125+CIT) ili 2) 0,250 mg kg^{-1} tj.m. okratoksina A i 2 mg kg^{-1} tj.m. citrinina (OTA250+CIT), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat5 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat5 (~72 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat5 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 µm, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti, ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)

4.2.3 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola

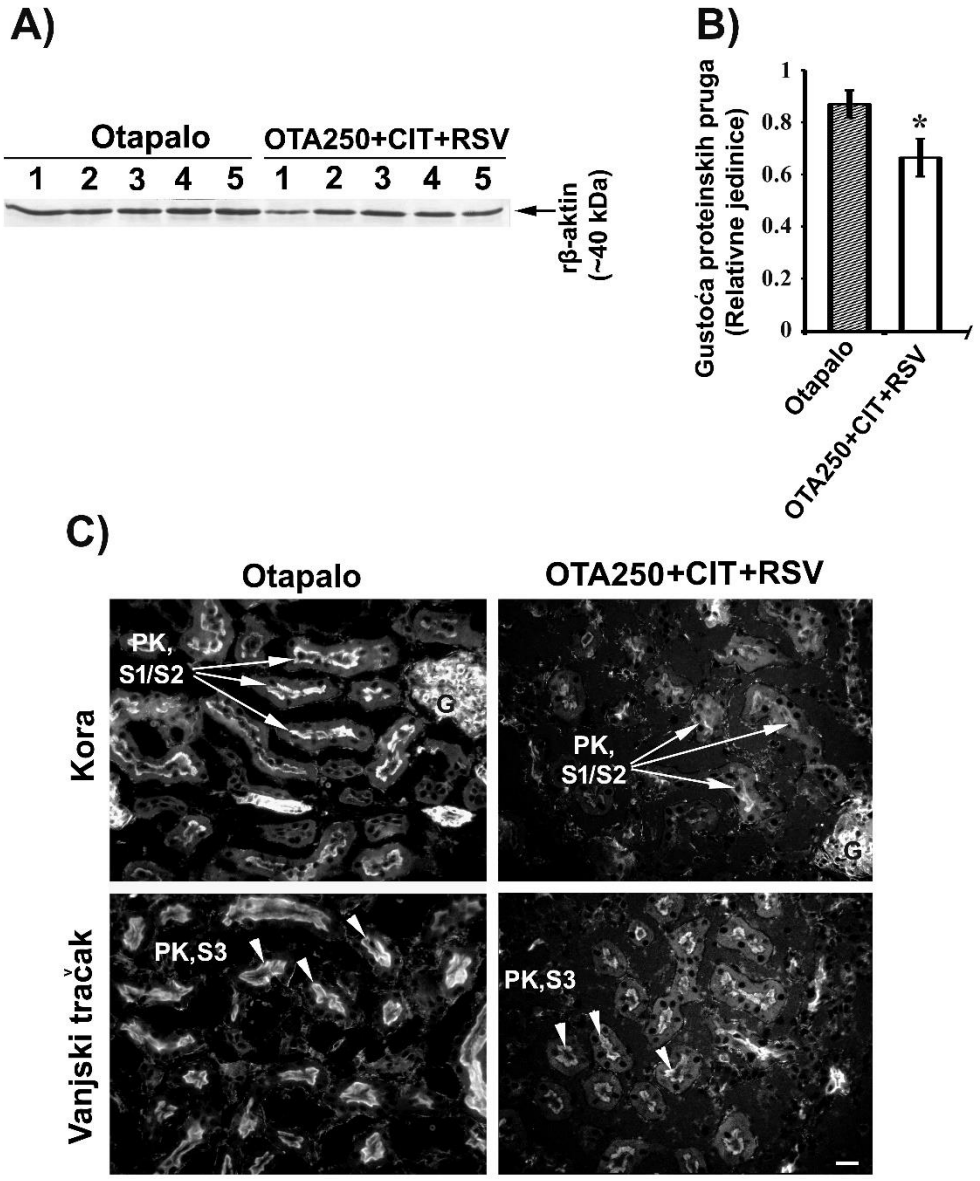
Kako bi istražili združene učinke OTA, CIT i RSV, spolno zreli mužjaci štakora soja Wistar, tretirani su *per os* smjesom mikotoksina i resveratrola (OTA+CIT+RSV) tijekom 21 dana, a kontrolne životinje vodom ili otapalom, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Životinje su nakon tretmana usmrćene, a iz tkiva bubrega izdvojene su USM metodom diferencijalnog centrifugiranja (poglavlje 3.2.3.1.), provedena je fiksacija bubrežnog tkiva (poglavlje 3.2.4.1.), a stanična lokalizacija i ekspresija membranskih prijenosnika OA i *housekeeping* proteina istražena je upotrebom specifičnih protutijela metodama western (poglavlje 3.2.3.3.) i imunofluorescencijske (poglavlje 3.2.4.2.) analize. Prikazani su rezultati ekspresije tri grupe proteina uključujući *housekeeping* proteine (rNa/K-ATPaza i rβ-aktin), membranske prijenosnike OA na BLM (rOat1 i rOat3) ili ČM PK (rOat2 i rOat5) bubrega štakora. Budući da su rezultati western i imunofluorescencijske analize pokazali da je ekspresija istraživanih proteina u bubrezima životinja kontrolne skupine (tretiranih vodom za piće) bila slična onoj u životinja tretiranih otapalom (slike 9-18; voda *vs.* otapalo), statistička analiza i tumačenje rezultata provedeno je usporedbom uzoraka tkiva bubrega životinja tretiranih smjesom mikotoksina i resveratrola (OTA+CIT+RSV) u odnosu na uzorke tkiva bubrega životinja tretiranih otapalom.

4.2.3.1 Združeni učinci OTA, CIT i RSV na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da je 21-dnevni tretman smjesom OTA+CIT+RSV (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT + 20 mg kg^{-1} tj.m. RSV) značajno smanjio ekspresiju proteina rβ-aktina, ali ne i rNa/K-ATPaze; količina proteina rβ-aktina (~40 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora smanjila se ~24% (slika 28A i B; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo) dok je količina proteina rNa/K-ATPaze (~110 kDa) ostala nepromijenjena (slika 27A i B; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo). Slični fenomeni uočeni su imunofluorescencijskom analizom; tretman smjesom OTA+CIT+RSV smanjio je intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rβ-aktin (slika 28C; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo), ali ne i za rNa/K-ATPazu (slika 27C; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo) u narescima tkiva bubrega štakora.



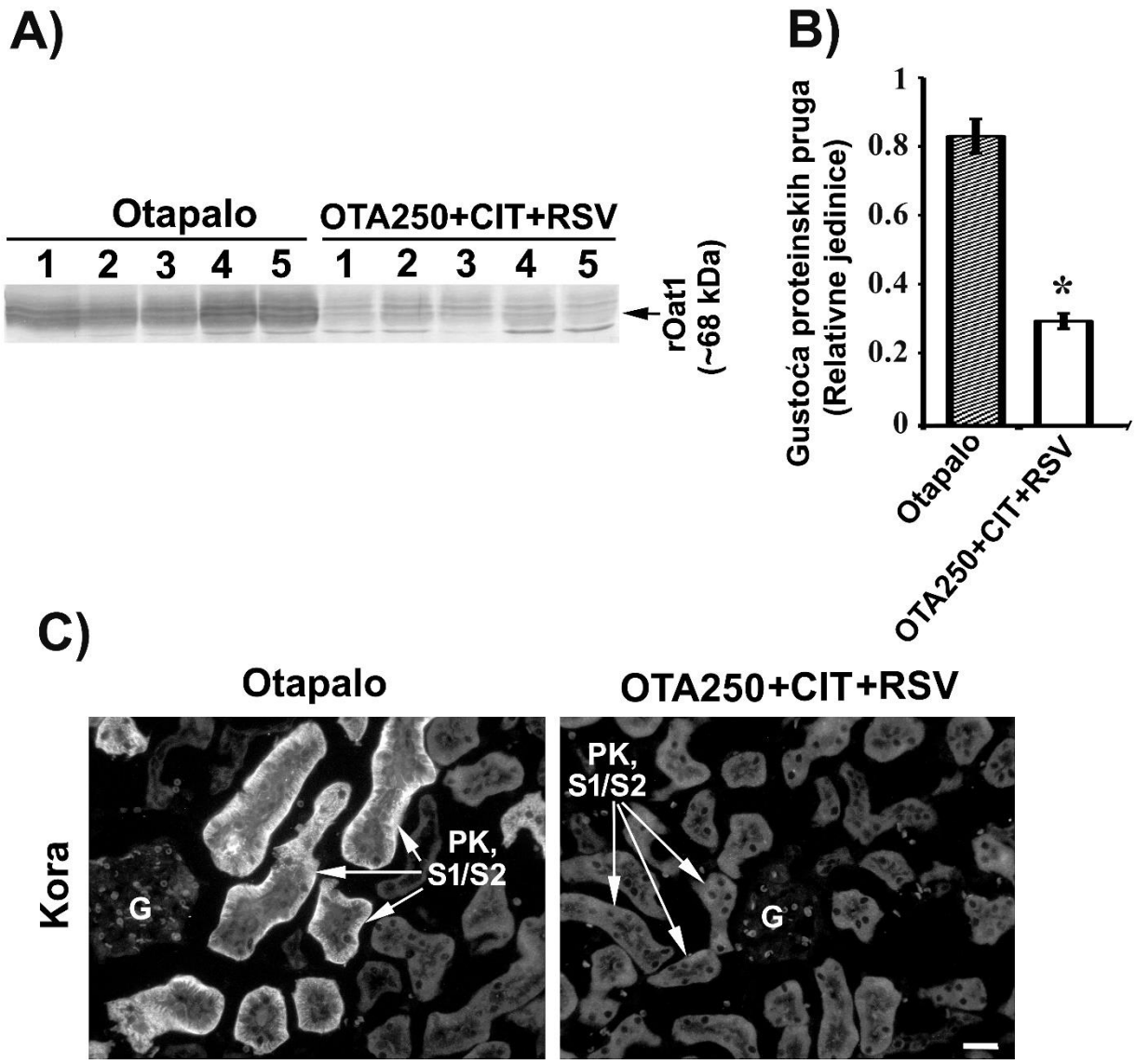
Slika 27. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana smjesom okratoksina A (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), citrinina (2 mg kg^{-1} tj.m.) i resveratrola 20 mg kg^{-1} tj.m.) (OTA250+CIT+RSV), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rNa/K-ATPazu (~110 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rNa/K-ATPazu u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. DK - zavijeni distalni kanalići, DUKHP - debeli uzlazni krak Henleove petlje, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići (strelica - S1/S2 odsječci, vrh strelice - S3 odsječci), SK - sabirni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti



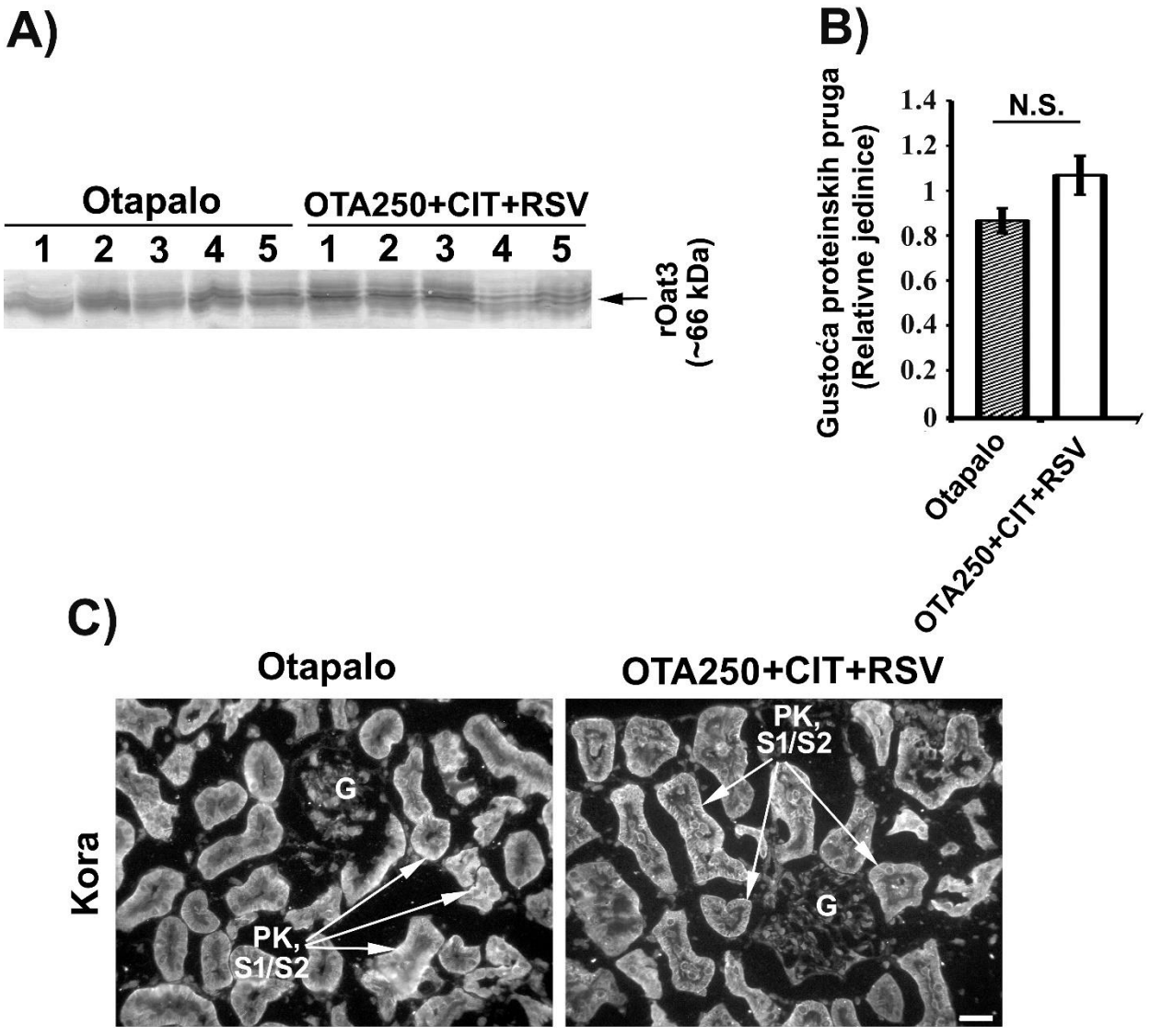
Slika 28. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana smjesom okratoksina A (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), citrinina (2 mg kg^{-1} tj.m.) i resveratrola (20 mg kg^{-1} tj.m.) (OTA250+CIT+RSV), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rβ-aktina u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rβ-aktin (~40 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rβ-aktin u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora i vanjski tračak). Mjera = 20 µm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)

4.2.3.2 Združeni učinci OTA, CIT i RSV na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da je 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina i resveratrola [(OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) + CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.) + RSV (20 mg kg^{-1} tj.m.)] značajno smanjio (~65%) količinu proteina rOat1 (~68 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora (slika 29A i B; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo). Rezultati imunofluorescencijske analize bili su usklađeni s rezultatima western analize; nakon tretmana smjesom OTA+CIT+RSV uočen je smanjeni imunofluorescencijski signal za rOat1 u BLM zavijenih PK (odsječci S1 i S2) smještenih u kori bubrega (slika 29C; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo). Za razliku od inhibitornog učinka na ekspresiju proteina rOat1, rezultati western i imunofluorescencijske analize pokazali su da tretman štakora istom smjesom nije promijenio količinu proteina rOat3 (~66 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega (slika 30A i B), niti je izmijenio intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rOat3 u narescima tkiva bubrega (slika 30C).



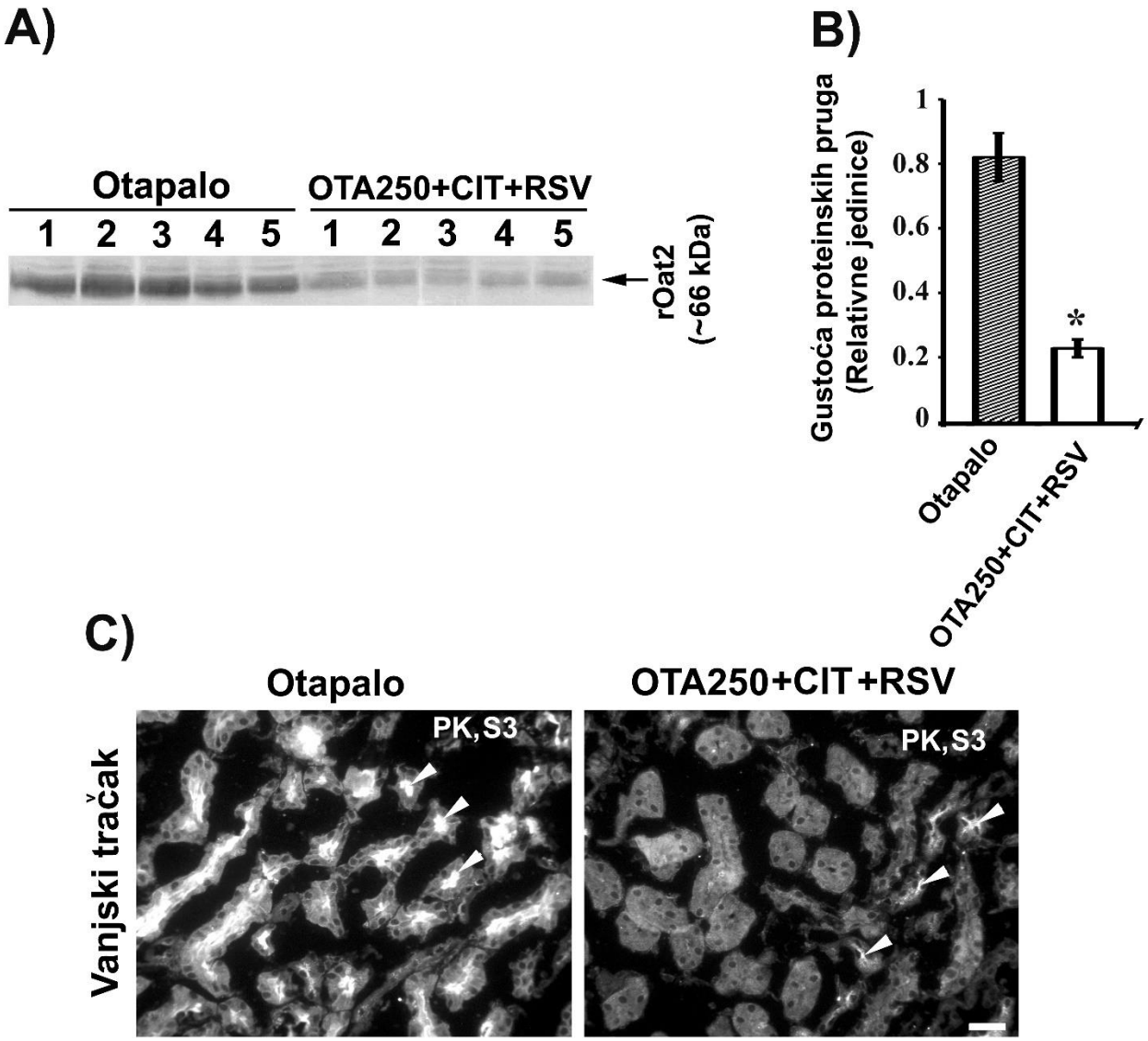
Slika 29. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana smjesom okratoksina A (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), citrinina (2 mg kg^{-1} tj.m.) i resveratrola (20 mg kg^{-1} tj.m.) (OTA250+CIT+RSV), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat1 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat1 (~68 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat1 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 µm, G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)



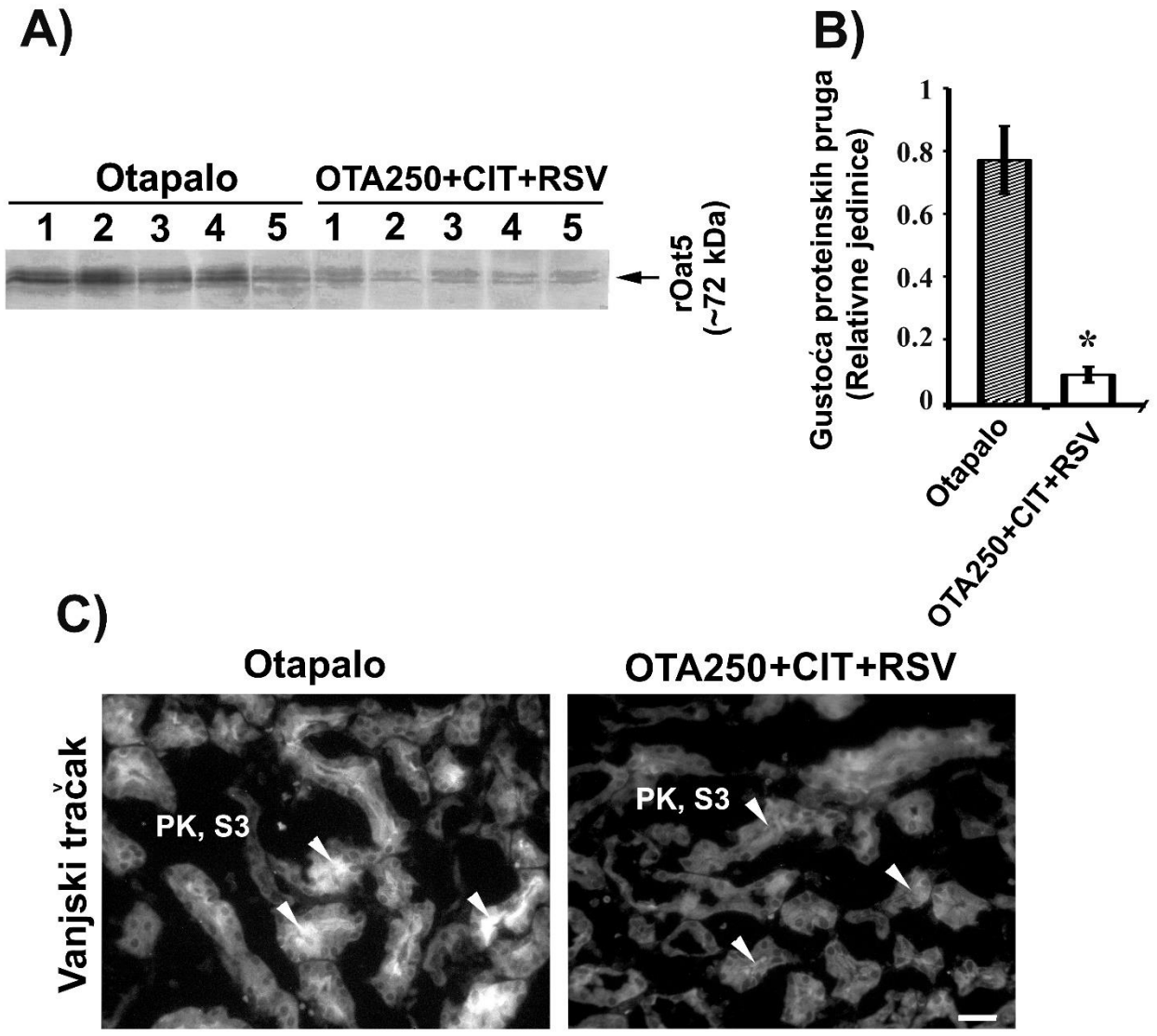
Slika 30. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana smjesom okratoksina A (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), citrinina (2 mg kg^{-1} tj.m.) i resveratrola (20 mg kg^{-1} tj.m.) (OTA250+CIT+RSV), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat3 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat3 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat3 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (kora). Mjera = 20 μm. G - glomerul, PK - proksimalni kanalići. N.S. - bez statističke značajnosti

4.2.3.3 Združeni učinci OTA, CIT i RSV na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5 u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da je 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina i resveratrola [(OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) + CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.) + RSV (20 mg kg^{-1} tj.m.)] u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora značajno smanjio količinu proteina rOat2 (~66 kDa) za ~72% (slika 31A i B; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo). Rezultati imunofluorescencijske analize bili su usklađeni s rezultatima western analize; nakon tretmana smjesom mikotoksina i RSV uočen je smanjen imunofluorescencijski signal za rOat2 u ČM ravnih PK (odsječci S3) smještenih u vanjskom tračku bubrega (slika 31C; OTA250+CIT+RSV *vs.* otapalo). Rezultati daljnje western i imunofluorescencijske analize pokazali su da je tretman štakora istom smjesom smanjio količinu proteina rOat5 (~72 kDa) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega za ~89% (slika 32A i B), te da je smanjio specifično imunofluorescencijsko bojenja za protein rOat5 u ČM PK (slika 32C) bubrega.



Slika 31. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana sa smjesom okratoksina A (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), citrinina (2 mg kg^{-1} tj.m.) i resveratrola (20 mg kg^{-1} tj.m.) (OTA250+CIT+RSV), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat2 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat2 (~66 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat2 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 µm, PK - proksimalni kanalići. ***** - statistički značajno ($p < 0,05$)



Slika 32. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora. Mužjaci štakora soja Wistar tretirani su *per os* tijekom 21 dana sa smjesom okratoksina A (0,250 mg kg^{-1} tj.m.), citrinina (2 mg kg^{-1} tj.m.) i resveratrola (20 mg kg^{-1} tj.m.) (OTA250+CIT+RSV), a kontrolne životinje vodom (H_2O) (nije prikazano) ili otapalom. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rOat5 u bubrezima štakora istražena je metodama western i imunofluorescencijske analize. **A. Western analiza.** Prikazane su proteinske pruge za rOat5 (~72 kDa) u USM izdvojenim iz bubrega štakora. Masa proteina iznosila je 60 µg/jažici. **B. Denzitometrijska analiza.** Prikazane su izmjerene gustoće proteinskih pruga iz panela A, a izražene su u srednjim vrijednostima ± SE iz 5 nezavisnih uzoraka (n = 5). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Prikazano je imunofluorescencijsko bojenje za rOat5 u fiksiranim narescima tkiva bubrega štakora (vanjski tračak). Mjera = 20 µm, PK - proksimalni kanalići. * - statistički značajno ($p < 0,05$)

5. RASPRAVA

5.1 Ispitivanje primarnih protutijela

S obzirom da su primarna protutijela ključni alat za specifičnu detekciju proteina, prvo je metodama imunofluorescencijske i western analize u uzorcima bubrežnog tkiva štakora (kriostatski naresci i USM), ispitana specifičnost svih primarnih protutijela rabljenih u ovom doktorskom radu (tablica 1). Sukladno prethodno objavljenim rezultatima, protutijela za detekciju membranskih prijenosnika za OA specifično su detektirala proteine rOat1, rOat2, rOat3 i rOat5 u bubrezima štakora. Tako su protutijela Oat1-Ab i Oat3-Ab obojila BLM zavijenih PK (odsječci S1 i S2) u kori bubrega te jednu proteinsku prugu od ~68 kDa (Oat1-Ab) i ~66 kDa (Oat3-Ab) u uzorcima bubrežnih USM (Kojima i sur., 2002.; Ljubojević i sur., 2004.), dok su protutijela Oat2-Ab i Oat5-Ab obojila ČM ravnih PK (odsječci S3) u vanjskom tračku vanjske srži bubrega te jednu proteinsku prugu od ~66 kDa (Oat2-Ab) i ~71 kDa (Oat5-Ab) u uzorcima bubrežnih USM (Anzai i sur., 2005.; Ljubojević i sur., 2007.; Breljak i sur., 2010.). Također, potvrđena je i specifičnost protutijela rabljenih za detekciju *housekeeping* proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina. Tako je protutijelo Na/K-ATPaza-Ab obojilo BLM epitelnih stanica svih odsječaka nefrona štakora, te jednu proteinsku prugu od ~110 kDa u uzorcima bubrežnih USM kao što je opisano u Breljak i sur. (2016). Protutijelo β-aktin-Ab obojilo je ČM epitelnih stanica bilo zavijenih PK (odsječci S1 i S2) u kori bubrega, bilo ravnih PK (odsječci S3) u vanjskom tračku vanjske srži bubrega te jednu proteinsku prugu od ~40 kDa u uzorcima bubrežnih USM kao što je opisano u ranijim istraživanjima (Breljak i sur., 2013.; Breljak i sur., 2016.). Unatoč specifičnosti primarnih protutijela rabljenih u ovom doktorskom radu, potvrđenoj u prethodnim istraživanjima, a imajući u vidu spoznaju da se lotovi/šarže protutijela mogu međusobno razlikovati, ispitivanje njihove specifičnosti u optimalnim uvjetima neophodno je, kako bi se izbjegle moguće nespecifične detekcije proteina (Couchman, 2009.; Bordeaux i sur., 2010.; Weller, 2018.).

5.2 Učinci mikotoksina i resveratrola na ekspresiju proteina u bubrezima štakora

Funkcionalne i strukturne promjene bubrega sisavaca uslijed nefrotoksičnih učinaka mikotoksina OTA i CIT opisane su u literaturi unazad četrdesetak i više godina (Berndt i sur., 1980.; Beneth i Klich, 2003). Osnovni preduvjet ispoljavanja toksičnog učinka mikotoksina jest njihov ulazak u epitelne stanice PK bubrega. Kako su mikotoksini OA, njihov unos u stanice PK posredovan je specifičnim membranskim prijenosnicima, pripadnicima obitelji SLC22/Slc22, zastupljenim u različitim odsječcima nefrona (S1, S2 i S3) gdje reguliraju promet niza endogenih i egzogenih spojeva (Sekine i sur., 2000.; Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.; Sekine i sur., 2006.; Nigam, 2018.). Poznato je da su proteini OAT/Oat ključni za unos i nakupljanje OA u epitelnim stanicama PK bubrega, uključujući i mikotoksina, koji po unosu u stanice ispoljavaju različite toksične učinke (Tsuda i sur., 1999.; Jung i sur., 2001.; Zhang i sur., 2004.; Tachampa i sur., 2008.; Žlender i sur., 2009.). Također, nizom dosad objavljenih istraživanja opisano je međudjelovanje mikotoksina sa prijenosnicima OA (Phillips i sur., 1980.; Friis i sur., 1988.; Gekle i sur. 1994.; Gekle i Silbernagl, 1998.; Groves i sur., 1998., 1999; Sauvant i sur., 1998.; Jung i sur., 2001.). Imajući u vidu saznanja o sve izraženijim klimatskim promjenama koje pogoduju razvoju plijesni (https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins; https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins), s posljedično povišenom kontaminacijom sirovina i namirnica, najčešće s više različitih mikotoksina (IARC, 2016.; Tola i Kebede, 2016.; Lee i Ryu, 2017.; Winter i Pereg, 2019.; Eskola i sur., 2020.), možemo zaključiti da su dosadašnja istraživanja o združenim učincima mikotoksina u staničnim linijama *in vitro*, a posebice životinjskim modelima *in vivo* pri izloženosti kombinaciji mikotoksina nedostatna.

Među brojnim dosad objavljenim istraživanjima o nefrotoksičnosti mikotoksina, samo jedno *in vivo* istraživanje opisuje promjene u ekspresiji membranskih prijenosnika OA (rOat/Slc22) u bubrezima štakora pri izloženosti različitim dozama OTA (0,050-0,500 mg kg^{-1} tj.m.) (Žlender i sur., 2009.). Stoga, svrha i cilj ovog doktorskog rada, bili su istražiti pojedinačne i združene učinke mikotoksina OTA i CIT te mogući

protektivni/reparatorni učinak RSV na ekspresiju membranskih prijenosnika rOat/Slc22 u bubrezima štakora kako bi utvrdili njihovu ulogu u razvoju mikotoksinima uzrokovane nefrotoksičnosti. U ovom istraživanju ispitan je učinak svakodnevne oralne izloženosti OTA i CIT u trajanju 21 dan, zasebno (ili OTA ili CIT) ili u kombinaciji (OTA+CIT), na ekspresiju *housekeeping* proteina (rNa/K-ATPaze i rβ-aktina), zatim proteinsku ekspresiju prijenosnika Oat/Slc22 smještenih u BLM (rOat1/Slc22a6 i rOat3/Slc22a8) ili ČM (rOat2/Slc22a7 i rOat5/Slc22a19) epitelnih stanica PK bubrega štakora soja Wistar, te potencijalni protektivni/reparatorni učinak RSV pri nefrotoksičnosti nastaloj uslijed izloženosti kombinaciji mikotoksina (OTA+CIT+RSV).

Pri tumačenju rezultata dobivenih ovim istraživanjem, uvodno valja napomenuti, da se prijenos OA, odvija u svim odsječcima PK, te da uz spolne i vrstne razlike (Ljubojević i sur., 2004.; Ljubojević i sur., 2007.; Breljak i sur., 2010.; Breljak i sur., 2013.; Breljak i sur., 2016.), postoje i određene varijacije u zastupljenosti specifičnih prijenosnika u pojedinim odsječcima PK (Kojima i sur., 2002.; Koepsell i Endou, 2004.; Anzai i sur., 2005.; Sweet, 2005.; Burckhardt, 2012.; Nigam, 2018.). Također, od iznimne je važnosti za razumijevanje i karakterizaciju toksikodinamskih promjena ekspresije specifičnih prijenosnika OA, duljina trajanja izloženosti mikotoksinima (akutna, subakutna, kronična, subkronična i dr.), način njihove administracije (oralni, supkutani, intramuskularni i dr.), te doza mikotoksina, bilo da se radi o pojedinačnoj izloženosti ili izloženosti njihovoj kombinaciji. Poznato je da akutna izloženost OTA ne uzrokuje mjerljive promjene u sustavu prijenosa OA, već da se glavnina patofizioloških poremećaja odvija u postproksimalnim dijelovima nefrona, poglavito sabirnim kanalima gdje se posljedice izloženosti OTA očituju kao smetnje u kapacitetu bubrega za koncentriranjem urina uslijed poremećaja u prometu iona Na^+, K^+, Cl^- i H^+ (Gekle i sur. 1994.). S druge pak strane, dugotrajnija izloženost OTA dovodi do izraženih poremećaja bubrežnih funkcija; značajnog pada kapaciteta bubrega za koncentriranjem urina, smanjenja glomerularne filtracije i protoka krvi u bubregu uslijed povećanja otpora u krvnim žilama glomerula te značajno umanjenog kapaciteta sekrecije OA u PK nefrona, uz istodobno očuvane funkcije reapsorpcije različitih spojeva (prvenstveno glukoze i aminokiselina) iz ultrafiltrata (Gekle i sur. 1994.; Gekle i Silbernagl, 1998).

U brojnim objavljenim eksperimentalnim toksikološkim studijama, kojima se između ostalog, pokušava odgonetnuti mehanizam djelovanja OTA, najčešće su korištene doze koje su značajno više od onih kojima su ljudi ili životinje izložene prirodnim putem (FAO/WHO, 2001.). Opažanja kojima se nastoje tumačiti mehanizmi djelovanja OTA, proizašla iz takvih istraživanja poput direktne i nespecifične inhibicije sinteze makromolekula, peroksidacije lipida, poremećaja u funkciji mitohondrija od toksikološkog su značaja onda kada se radi o izloženosti visokim dozama. Nasuprot tome, pri dugotrajnoj izloženosti niskim dozama mikotoksinima, zbivanja su više specifična, pri čemu promjene u funkciji i fenotipu stanice nisu nužno popraćene promjenama integriteta i vijabilnosti stanice. Naravno da ta specifična zbivanja, u ovom slučaju promjene u ekspresiji prijenosnika sustava koji upravlja prometom niza endogenih i egzogenih OA u epitelu PK, ne isključuju mogućnost kasnije pojave poremećaja integriteta i smanjenja vijabilnosti stanica. Prijašnjim istraživanjima ekspresije gena i proteina u bubrezima štakora izloženih dozi od 0,500 mg kg^{-1} tj.m. OTA, utvrđena je deregulacija ekspresije različitih prijenosnika, a osobito umanjenje ekspresije prijenosnika Oat/OAT iz Slc/SLC obitelji te prijenosnika iz ABC podobitelji na razini mRNA (Marin-Kuan i sur., 2006.; Arbillaga i sur., 2008.; Žlender i sur., 2009.; Pastor i sur., 2018.).

Odabir doza OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. i 0,250 mg kg^{-1} tj.m.) rabljenih u ovom istraživanju, utvrđen je temeljem dostupnih literaturnih podataka o istraživanjima provedenim na štakorima soja Wistar, pri čemu je u istraživanju Žlender i sur. (2009) utvrđena LOAEL doza od 50 mg kg^{-1} tj.m., te je utvrđen pad ekspresije mRNA istraživanih prijenosnika OA tek kod doze više od 0,250 mg kg^{-1} tj.m. Doza CIT (2 mg/kg^{-1} tj.m.) određena je na osnovu istraživanja Mantle i McHugh (1993) u kojem ponovljena izloženost štakora dozi od ~18 mg kg^{-1} tj.m. CIT nije uzrokovala kliničke ni histopatološke promjene u tretiranih životinja. Doza RSV (20 mg/kg tj.m./dan) kojoj su životinje u ovom istraživanju bile izložene, utvrđena je temeljem istraživanja Wenzel i sur. (2005) pri kojem je doza od 50 mg/kg tj.m./dan ispoljila učinak u smislu porasta ukupne antioksidativne aktivnosti. Također, potrebno je napomenuti da su u ovom istraživanju ispitivani spojevi (OTA, CIT i RSV) životinjama aplicirani *per os*, što vjerno odražava korake u razvoju alimentarne intoksikacije nastale uslijed konzumacije namirnica kontaminiranih mikotoksinima (Žlender i sur. 2009.; Karaica i sur., 2020.).

U provedenom istraživanju kontinuirane 21-dnevne izloženosti štakora dvjema različitim dozama OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m.), utvrđeno je o dozi ovisno značajno smanjenje količine proteina rOat1 (~30 do ~50%) u BLM epitelnih stanica PK (odsječci S1 i S2 u kori) i rOat2 (~22%) u ČM PK (odsječci S3 u vanjskom tračku), dok je količina proteina rOat3 u BLM (odsječci S1 i S2 u kori) i rOat5 u ČM (odsječci S3 u vanjskom tračku) PK ostala nepromijenjena, pri čemu su rezultati western analize u potpunosti podudarni s rezultatima dobivenim imunofluorescencijskom analizom. Dobiveni podatci upućuju na različiti stupanj osjetjivosti rOat/Slc22 proteina na učinke OTA (rOat1 > rOat2) uz izostanak učinka OTA na ekspresiju proteina rOat3 i rOat5. Istraživanja Jung i sur. (2001) na različitim segmentima PK bubrega miša (odsječci S1, S2 i S3), ukazuju da prijenosnici koji posreduju transepitelijalni prijenos, tj. unos različitih OA iz krvi u unutrašnjost stanice, a koji su smješteni u BLM epitelnih stanica PK (Oat1 i Oat3), iskazuju o dozi ovisan, saturabilan prijenos visokog afiniteta za OTA (K_m vrijednost od 0,42 mM za Oat1 i 0,75 mM za Oat3), te da na opseg njihova prijenosa, tj. unosa OA izravan utjecaj ima prisutnost drugih kompetirajućih spojeva neovisno o njihovu podrijetlu, a koji predstavljaju supstrat za prijenos/unos putem istog sustava. Tako je istraživanjem funkcionalnih karakteristika uz dodatak različitih inhibirajućih supstrata (PAH, probenecid, piroksikam, oktanoična kiselina i citrinin) utvrđeno da proteini Oat1 i Oat3 iskazuju najviši afinitet za prijenos OTA (Oat1 > Oat3), dok je istovremeno afinitet proteina Oat1 za prijenos CIT najniži (Jung i sur., 2001.). Iz istraživanja Žlender i sur. (2009) razvidno je da alimentarna izloženost OTA u rasponu doza od 0,050-0,250 mg kg^{-1} tj.m. povisuje razinu ekspresije proteina rOat1, rOat2, rOat3, rOat5 u bubrezima štakora, dok izloženost dozi od 0,500 mg kg^{-1} tj.m. iskazuje suprotan učinak, odnosno umanjuje razinu njihove ekspresije. Iako su se u ovom doktorskom radu i istraživanju Žlender i sur. (2009) rabile jednake doze OTA (0,125 i 0,250 mg kg^{-1} tj.m.), opažene razlike u obrascima ekspresije prijenosnika Oat u bubrezima štakora, nastale su vjerojatno uslijed razlika u režimu izloženosti životinja OTA (10-dnevna izloženost svakog drugog dana *vs.* kontinuirana svakodnevna izloženost u trajanju 21 dan). Za pretpostaviti je, da je pri kratkotrajnoj ponovljenoj izloženosti (<7 dana), indukcija ekspresije bubrežnih rOat smještenih u epitelnim stanicama PK, u funkciji potencijalno učinkovitijeg izlučivanja OTA iz organizma, dok dugotrajnija ponovljena izloženost (>21 dan), ili izloženost višim dozama (>0,500 mg

kg^{-1} tj.m.) dovodi do smanjenja ekspresije specifičnih prijenosnika Oat, u ovom slučaju rOat1 (pri obje doze OTA) te rOat2 (pri dozi od 0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA). Nadalje, u pokusnim skupinama izloženim kombinaciji obje doze OTA i CIT, uočavaju se na gore opisane obrasce ekspresije rOat1 i rOat2, blago potencirani učinci u vidu dodatnog smanjenja njihove ekspresije, a koji ukazuju na mogući sinergistički učinak tih dvaju mikotoksina. Iako nisu utvrđene značajne promjene u ekspresiji proteina rOat3 i rOat5 pri izloženosti dvjema različitim dozama OTA, evidentan je, iako ne i statistički značajan porast ekspresije rOat3 pri izloženosti isključivo CIT, te statistički značajan porast ekspresije pri izloženosti kombinaciji mikotoksina (OTA+CIT) pri obje doze OTA (0,125 i 0,250 mg kg^{-1} tj.m.), što također ukazuje na sinergistički učinak njihove kombinacije. Navedenom opažanju u prilog govori istraživanje Jung i sur. (2001) kojim je utvrđeno da je preferirani supstrat za rOat3 upravo CIT, čije nakupljanje unutar stanice dovodi do razvoja citrininom uzrokovane nefrotoksičnosti.

Rezultati ovog doktorskog rada po prvi put opisuju inhibitorne učinke CIT na ekspresiju bubrežnih prijenosnika OA smještenih u ČM epitelnih stanica PK (odsječci S3 u vanjskom tračku bubrega). Podatci dobiveni western analizom pokazali su da je 21-dnevni tretman s CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.), statistički značajno smanjio ekspresiju proteina rOat2 (~34%) i rOat5 (~61%), te su podudarni rezultatima provedene imunofluorescencijske analize, dok je ekspresija proteina rOat1 i rOat3 smještenih u BLM PK (odsječci S1 i S2 u kori) ostala statistički nepromijenjena, ukazujući tako na različit stupanj osjetljivosti membranskih prijenosnika OA na učinke CIT (rOat5 > rOat2), te na izostanak nefrotoksičnog učinka CIT na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3 u bubrezima štakora. Iako su proteini rOat2 i rOat5 nedvojbeno prijenosnici OA, još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno prenose li endogene i egzogene OA aktivnim prijenosom i/ili posredovanom difuzijom (Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.; Burckhardt, 2012.; Nigam, 2018.). Neovisno o mehanizmu prijenosa OA, podatci ovog istraživanja jasno ukazuju da su membranski prijenosnici rOat2 i rOat5 ciljno mjesto toksičnih učinaka mikotoksina, poglavito CIT kojeg je kombinacija sa višom dozom OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) također ukazala na blago potencirani učinak u vidu smanjenja ekspresije navedenih prijenosnika OA.

Kako je već ranije napomenuto, osnovni preduvjet razvoja mikotoksinima uzrokovane nefrotoksičnosti, jest njihov ulazak u epitelne stanice PK (Tsuda i sur., 1999.; Jung i sur., 2001.; Zhang i sur., 2004.; Tachampa i sur., 2008.; Žlender i sur., 2009.). Iako se iz istraživanja Heussner i sur. (2002) može zaključiti da ulazak mikotoksina u epitelne stanice PK nije posredovan isključivo prijenosnicima OA, rezultati ovog istraživanja ukazuju na njihovu ključnu ulogu u prijenosu mikotoksina OTA i CIT. Nadalje, važno je napomenuti da toksikodinamske promjene u obrascima ekspresije prijenosnika OA, koje nastaju kao posljedica kontinuirane izloženosti niskim dozama mikotoksina ovise o nizu čimbenika; dozi i duljini trajanja izloženosti mikotoksinima, njihovim toksikokinetičkim svojstvima, zastupljenosti specifičnih prijenosnika OA u različitim odsječcima nefrona (odsječci S1, S2 i S3), afinitetu i kapacitetu prijenosnika tih mikotoksina te prisutnosti kompetirajućih spojeva u staničnom okruženju funkcionalnog epitela bubrega. (Burckhardt, 2012.; Gekle i sur. 1994.; Gekle i Silbernagl, 1998.; George i sur., 2017.). Također, ovdje treba dodatno naglasiti složeni mehanizam prijenosa endogenih i egzogenih OA, uključujući i mikotoksine, koji je posredovan s prijenosnicima Oat/Slc22 (izmjenjivači DC/OA) na BLM PK bubrega (Pritchard, 1988.; Sweet i sur. 1997.; Wright i Dantzler, 2004.; Sweet 2005.). Iz istraživanja Žlendera i sur. (2009) može se konstatirati da inicijalni porast ekspresije bubrežnih rOat smještenih u BLM ili ČM, koji ima za cilj izlučiti OTA iz organizma, ujedno rezultira i pojačanim neto unosom OTA u epitelne stanice PK te njegovim pretjeranim nakupljanjem, što u konačnici rezultira toksičnim oštećenjem stanica, uslijed djelovanja OTA na neki od ranije opisanih načina. Iz rezultata ovog istraživanja razvidno je da nakupljanje OTA u stanici, pri kontinuiranoj izloženosti, dovodi do smanjenja ekspresije specifičnog rOat izravno povezanog s unosom OTA na BLM epitelnih stanica PK, u ovom slučaju rOat1 te do smanjenja ekspresije rOat2 smještenog u ČM S3 odsječaka nefrona, nastalih kao posljedica toksičnog učinka OTA u stanici. Istodobno, promjene u ekspresiji drugog prijenosnika zastupljenog u BLM koji posreduje unos različitih OA; rOat3, nisu izražene, sve do trenutka kada se u okruženju stanice uslijed izloženosti kombinaciji mikotoksina, ne pojavi i CIT. S toksikološkog stajališta, osobito u smislu procjene zdravstvenih rizika izloženosti sirovinama kontaminiranim različitim mikotoksinima, promjene u ekspresiji rOat3, u vidu porasta, od iznimnog su značaja kada se radi o izloženosti kombinaciji mikotoksina (OTA +CIT), čega

je sigurna posljedica pojačani unos CIT, ali i OTA u epitelne stanice PK. S obzirom na visoki afinitet oba prijenosnika (rOat1 i rOat3) za prijenos OTA (Zingerle i sur. 1997.; Jung i sur., 2001.), te značajno kraće vrijeme poluvijeka eliminacije CIT (Reddy i sur. 1982.; Kumagai, 1985.), porast ekspresije rOat3 pri simultanoj kontinuiranoj izloženosti, imati će za posljedicu i povećan opseg unosa OTA u stanicu, uslijed njegova znatno duljeg poluvijeka eliminacije. Pretjerani unos i nakupljanje tih dvaju mikotoksina u stanici neizbježno će dovesti do ranije opisanih promjena ekspresije drugih prijenosnika OA, smještenih u ČM; rOat2 i rOat5, uslijed niza poremećaja staničnih funkcija poput inhibicije mitohondrijske respiracije i sinteze ATP, izraženijeg stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva, prekida regulacije transkripcije, sinteze proteina i dr. (Adler i sur., 2009.; Bondy i sur., 2015.; Darif i sur., 2016.; Gan i sur., 2017.; Huang i Chan, 2016.; Qi i sur., 2014.; Rached i sur., 2007.; Raghubeer i sur. 2017.; Sauvant i sur., 2005.; Taniai i sur., 2014.; Wang i sur., 2012.; Zhu i sur., 2016.). Također, značajan čimbenik u razvoju nefrotoksičnosti uzrokovane izloženošću mikotoksinima jest i spoznaja da se OTA duž nefrona u velikoj mjeri i reapsorbira; 1/3 u distalnim i/ili sabirnim kanalićima, a 2/3 u ravnim PK (odsječci S3) posredstvom H^+-dipeptid koprijenosnika Slc15a1 (Zingerle i sur. 1997). Dakle, za razliku od prijenosnika rOat1 i rOat3 koji svojim smještajem na BLM PK omogućuju prijenos OA iz međustaničnog prostora (krvi) u epitene stanice PK, prijenosnici rOat2 i rOat5 svojim smještajem na ČM PK omogućavaju sekreciju različitih OA u lumen kanalića formirajući tako primarni urin i/ili njihovu reapsorpciju (Koepsell i Endou, 2004.; Sweet, 2005.; Burckhardt, 2012.; Nigam, 2018.). Slijedom navedenog, lako je zaključiti kako istodobno narušeni mehanizmi izlučivanja OTA i CIT iz krvi u lumen PK, uz njihovo posljedično nakupljanje unutar stanice nekim od alternativnih puteva unosa, te aktivnošću prijenosnika koji osiguravaju njihovu reapsorpciju, doprinose razvoju sve izraženijih toksičnih učinaka. Štoviše, kako su PK bubrega sisavaca intrinzično mjesto aktivne sekrecije i reapsorpcije različitih fizioloških supstrata u formi OA (Burckhardt, 2012.), mikotoksinima inducirana promjena ekspresije rOat proteina doprinosi sve izraženijem razvoju funkcionalnih poremećaja epitelnih stanica PK bubrega i posljedičnom nastanku nefrotoksičnosti.

Blagotvorni učinci RSV opisani su u brojnim provedenim studijama, pri čemu je RSV najčešće okarakteriziran kao spoj visokog antioksidativnog potencijala (Salehi i sur.,

2018.). Dostupni literaturni podatci o međudjelovanju RSV i prijenosnika OA (Oat/Slc22) oskudni su, posebice kada se radi o *in vivo* istraživanjima. U istraživanju Jia i sur. (2016) utvrđeno je u *in vivo* i *in vitro* sustavima, da pri simultanoj administraciji RSV i antireumatika metotreksata, dolazi do značajno smanjenog unosa metotreksata u epitelne stanice bubrega, sugerirajući time inhibitorni učinak RSV na unos metotreksata u navedene stanice, posredovanog prijenosnicima iz Slc (Oat1 i Oat3) i ABC (P-gp i MDRP2) obitelji. Istim istraživanjem, utvrđeno je da je RSV umanjio toksične učinke u stanicama bubrežnog epitela nastale djelovanjem apliciranog metotreksata (Jia i sur., 2016). Nadalje, u istraživanju farmakokinetike antihistaminika feksofenadina (FEX) provedenom na štakorima, Bedada i sur. (2016) utvrdili su da se dodatnim tretmanom RSV značajno produljuje vrijeme izloženosti FEX u smislu povišenja njegove maksimalne koncentracije (C_{max}) u plazmi i površine ispod krivulje plazmatske koncentracije u vremenu (AUC od engl. area under the plasma concentration–time curve), uz istodobno zanemarive promjene poluvijeka eliminacije T1/2 i vršnog vremena T_{max}. Zaključak je autora istraživanja da RSV ispoljava učinak u vidu učinkovite inhibicije prijenosnika P-gp u crijevima, mijenjajući time farmakokinetiku FEX (Bedada i sur., 2016.). Također, istraživanjem učinka RSV na rezistenciju tumorske stanične linije KBv200 pri primjeni citostatika, Quan i sur. (2008), utvrdili su da RSV značajno umanjuje ekspresiju MDR-1, P-gp i Bcl-2 gena, čineći time tumorske stanice podložnim djelovanju citostatika. U prilog tvrdnji Jia i sur. (2016) o inhibitornom učinku RSV na promet OA u bubregu, upućuju u ovom istraživanju utvrđene, značajno povišene koncentracije OTA u bubrezima životinja izloženih kombinaciji više doze OTA, CIT i RSV (Karaica i sur., 2020). Na tragu dosadašnjih spoznaja, kojima je utvrđeno da RSV može kompetitivno inhibirati unos raznih ksenobiotika i modulirati ekspresiju gena koji reguliraju promet različitih OA neovisno o njihovu podrijetlu, uzroke pojačanog nakupljanja OTA u tkivu bubrega možemo tumačiti na sljedeći način; iako bez provedbe detaljnih studija prijenosa ne možemo sa sigurnošću tvrditi radi li se izravno o inhibiciji unosa OA, u ovom slučaju OTA i CIT na BLM epitelnih stanica PK, iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je njihovo izlučivanje putem bubrega znatno umanjeno (Karaica i sur., 2020). Do smanjenog opsega izlučivanja mikotoksina, poglavito OTA, dolazi uslijed djelovanja RSV na neke od prijenosnika (pripadnika Slc/ABC obitelji) OTA, zastupljenih u ČM PK, posredstvom kojih

se OTA izlučuje u ultrafiltrat. Uz pretpostavku da RSV inhibira promet OA na BLM i ČM PK, bilo kompeticijom ili modulacijom ekspresije prijenosnika OA, možemo zaključiti da povišenje koncentracije OTA u tkivu bubrega nastaje kao posljedica smanjenog opsega izlučivanja uz njegov istodobni unos u stanice PK nekim od alternativnih puteva unosa (Heussner i sur., 2002.). U prilog tezi o modulaciji ekspresije prijenosnika OA djelovanjem RSV govori u ovom istraživanju utvrđen inhibitorni učinak RSV na ekspresiju proteina rOat2 i rOat5, u smislu dodatnog smanjenja njihove ekspresije pri simultanoj izloženosti kombinaciji više doze OTA, CIT i RSV. Nadalje, ispitivanjem u uzorcima homogenata bubrežnog tkiva uzorkovanih u ovom istraživanju utvrđen je protektivni učinak RSV, u smislu sniženih vrijednosti MDA, kao pokazatelja peroksidacije lipida (Rašić i sur., 2018.), dok nažalost protektivni i/ili reparatorni učinak RSV na obrasce ekspresije prijenosnika OA (rOat) u bubrezima štakora nije utvrđen (Karaica i sur., 2020.). Štoviše, temeljem rezultata ovog istraživanja možemo zaključiti da je upotreba RSV uslijed njegovih blagotvornih bioloških karakteristika zapravo dvosjekli mač; iako je brojnim prijašnjim, a također i ovim istraživanjem utvrđeno da RSV iskazuje pozitivne učinke u smislu ublažavanja oksidativnog stresa, njegov učinak, ili učinak njegovih metabolita u smislu modulacije ekspresije gena uključenih u različite biološke procese očito nije povoljan i iziskuje provedbu dodatnih istraživanja.

Kao što je ranije napomenuto, promjene u ekspresiji proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora, pri tretmanu s obje doze OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m.), CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.) ili njihovom kombinacijom nisu uočene, što ukazuje na odsutnost funkcionalnih poremećaja i oštećenja stanica PK, a koji nastaju kao posljedica dugotrajnije ponovljene izloženosti mikotoksinima (Berndt i sur., 1980.; Beneth i Klich, 2003). Izloženost pokusnih skupina kombinaciji više doze OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m.) i CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.), te izloženost istoj kombinaciji uz dodatak RSV uzrokovalo je smanjenje ekspresije rβ-aktina, što ukazuje na početak razvoja strukturnih oštećenja epitelnih stanica različitih odsječaka nefrona, uslijed njihova sinergističkog djelovanja. U sličnom *in vivo* pokusnom modelu u kojem je rabljena dvostruko veća doza OTA (0,500 mg kg^{-1} tj.m.) od doze korištene u ovom istraživanju, nakon 15 dana uočena su strukturna oštećenja PK u vidu degenerativnih promjena i nekroze epitelnih stanica, prvenstveno S3 odsječaka u medularnim zrakama i vanjskom tračku bubrega štakora (Žlender i sur.,

2009.). Iz opaženih promjena obrazaca ekspresije rOat/Slc22 prijenosnika pri izloženosti pojedinom mikotoksinu ili njihovoj kombinaciji, uz istodobno manje izražene promjene u ekspresiji *housekeeping* proteina u bubrezima tretiranih životinja, možemo zaključiti da su učinci mikotoksina zasebno ili u kombinaciji specifični, u smislu njihova učinka prvenstveno na prijenosnike OA.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da izloženost niskim koncentracijama mikotoksina ili njihovoj kombinaciji, postepeno dovodi do razvoja homeostatskih poremećaja uslijed kompromitiranih funkcija prijenosa različitih endogenih (vitamini, hormoni, žučne soli, urati, metaboliti neurotransmitera i dr.) i egzogenih (lijekovi i njihovi metaboliti, teški metali, mikotoksini i drugi toksini) OA; prvenstveno poremećaja acidobaznog statusa samih epitelnih stanica, a u širem smislu i opće homeostaze organizma *in toto*, uslijed nemogućnosti epitelnih stanica da posreduju fiziološki prijenos endogenih spojeva koji se sekrecijom u PK izlučuju u ultrafiltrat. Štoviše, istodobno dodatno funkcionalno opterećenje epitelnih stanica raznim ksenobioticima, u ovom slučaju RSV, pogoršava razvoj nefrotoksičnih učinaka mikotoksina.

Na kraju ove rasprave valja napomenuti višestruki značaj rezultata proizašlih iz ovog istraživanja. Prvenstveno, ponuđeni su odgovori na pitanja o nefrotoksičnim učincima mikotoksina pri pojedinačnoj izloženosti, ili izloženosti njihovoj kombinaciji, a koji opisuju složenost pozadinskih zbivanja pri razvoju poremećaja funkcija nefrona. Uslijed njihove kritične uloge pri koordinaciji sekrecije i reapsorpcije ksenobiotika, prijenosnici OA smješteni u BLM i ČM imaju izravan utjecaj na izloženost epitelnih stanica nefrona ksenobioticima i/ili njihovim metabolitima. U ovom istraživanju opisane toksikodinamske promjene ekspresije prijenosnika OA, odnosno njihov međusobni odnos u najvećoj mjeri određuje sudbinu različitih spojeva, u ovom slučaju mikotoksina OTA i CIT te posljedično i brojnih drugih endogenih spojeva u formi OA. Istodobno, navedene promjene u ekspresiji prijenosnika OA imaju izravan utjecaj na opseg toksičnog učinka raznih ksenobiotika i/ili njihovih metabolita koji se najčešće povećava kao izravna posljedica pojave smetnji u prometu različitih OA. Nadalje, rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnost proučavanja međudjelovanja mikotoksina sa prijenosnicima OA pri simultanoj izloženosti, poglavito s obzirom na promjene njihove ekspresije koja se razlikuje ovisno o tome radi li se o izloženosti pojedinom mikotoksinu ili njihovoj kombinaciji. Podatci proizašli iz istraživanja pri izloženosti

pojedinom mikotoksinu ili njihovoj kombinaciji ukazuju na specifičnu osjetljivost određenih prijenosnika OA u vidu izraženih promjena njihove ekspresije, a u ovisnosti o njihovom smještaju (BLM ili ČM) u stanici te apliciranom mikotoksinu. Dobiveni rezultati nadalje ukazuju na potencirani učinak ispitivane kombinacije mikotoksina na pojedine istraživane prijenosnike. Opaženi obrasci ekspresije *housekeeping* proteina smještenih na BLM (rNa/K-ATPaza) ili ČM (rβ-aktin) epitelnih stanica kanalića različitih zona nefrona, također ukazuju na specifične učinke mikotoksina ili njihove kombinacije na ekspresiju prijenosnika OA. Naposljetku, rezultati dobiveni istraživanjem učinaka RSV ukazuju na važnost provedbe daljnjih istraživanja uporabe RSV uslijed nedovoljno jasnih i nedvosmislenih podataka o njegovim biološkim učincima.

Iako je središnji interes ovog istraživanja bio procijeniti nefrotoksične učinke pri kontinuiranoj izloženosti niskim dozama mikotoksina, zasebno ili u njihovoj kombinaciji, te mogući protektivni/ reparatorni učinak RSV u pokusnom modelu štakora, nije suvišno ovdje napomenuti praktičnu vrijednost dobivenih rezultata u smislu njihove primjene i interpretacije u suvremenoj farmakološkoj znanosti. Naime, brojni lijekovi koji se koriste u raznim terapijskim postupcima (ACE inhibitori, diuretici, antineoplastici, *β*-laktamski antibiotici, antidijabetici, imunosupresivi, nesteroidni protuupalni lijekovi i dr.), imajući formu OA, upravo su supstrati ovdje proučavanih Oat/Slc22 prijenosnika te se vrlo često primjenjuju u različitim kombinacijama. Proučavanje međudjelovanja samih lijekova i/ili njihovih metabolita te njihovog međudjelovanja sa raznim prijenosnicima, središnji je interes suvremene farmakološke znanosti i još uvijek vrvi brojnim nepoznanicama.

6. ZAKLJUČCI

6.1 Specifičnost primarnih protutijela

Specifičnost protutijela koja su u ovom doktorskom radu rabljena za detekciju bubrežnih proteina potvrđena je metodama imunofluorescencijske i western analize u pokusnom modelu štakora. U tu svrhu utvrđeni su optimalni uvjeti za specifično vezanje primarnih protutijela za proteine u: a) kriosekcijama bubrega štakora (tretman alkoholima i deterdžentima uz zagrijavanje u citratnom puferu pH 6) i b) uzorcima USM izdvojenih iz bubrega štakora (denaturacija proteina u nereducirajućim uvjetima pri 65 ^{o}C).

6.1.1 Specifičnost protutijela za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora

- Upotrebom imunofluorescencijske analize, protutijela Oat1-Ab i Oat3-Ab specifično su obojila proteine rOat1 i rOat3 u BLM epitelnih stanica PK (odsječci S1 i S2) smještenih u kori, a protutijela Oat2-Ab i Oat5-Ab specifično su obojila proteine rOat2 i rOat5 u ČM epitelnih stanica PK (odsječci S3) smještenih u vanjskom tračku bubrega štakora.
- Upotrebom western analize, protutijela za OA specifično su obilježila proteine rOat u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora detektirajući jednu proteinsku prugu od ~68 kDa (rOat1; Oat1-Ab), ~66 kDa (rOat2; Oat2-Ab), ~66 kDa (rOat3; Oat3-Ab) i ~72 kDa (rOat5; Oat5-Ab).
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno pokazuju da nekomercijalna poliklonska protutijela za OA (Oat1-Ab, Oat2-Ab, Oat3-Ab i Oat5-Ab; **Tablica 1**) specifično prepoznaju proteine rOat (rOat1, rOat2, rOat3 i rOat5) u bubrezima te su stoga prikladna za istraživanja stanične lokalizacije i ekspresije membranskih prijenosnika za OA metodama imunofluorescencijske i western analize u pokusnom modelu štakora.

6.1.2 Specifičnost protutijela za detekciju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora

- Upotrebom imunofluorescencijske analize, protutijelo Na/K-ATPaza-Ab specifično je obojilo BLM epitelnih stanica u različitim kanalićima smještenim u svim zonama nefrona štakora, a protutijelo β-aktin-Ab specifično je obojilo epitelne stanice koje oblažu glomerularno klupko i ČM epitelnih stanica PK smještenih u kori (odsječci S1 i S2) i vanjskom tračku (odsječci S3) bubrega štakora.
- Upotrebom western analize, protutijela za *housekeeping* proteine specifično su obilježila jednu proteinsku prugu od ~110 kDa (α-podjedinica rNa/K-ATPaze; Na/K-ATPaza-Ab) i ~40 kDa (rβ-aktin; β-aktin-Ab) u uzorcima USM izdvojenim iz bubrega štakora.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno pokazuju da komercijalna monoklonska protutijela Na/K-ATPaza-Ab i β-aktin-Ab (**Tablica 1**) specifično prepoznaju proteine rNa/K-ATPazu i rβ-aktin u bubrezima te su stoga prikladna za istraživanja stanične lokalizacije i ekspresije *housekeeping* proteina metodama imunofluorescencijske i western analize u pokusnom modelu štakora.

6.2 Pojedinačni učinci mikotoksina (ili OTA ili CIT)

Pojedinačni učinci mikotoksina na ekspresiju bubrežnih proteina istraženi su upotrebom specifičnih primarnih Ab nakon 21-dnevnog tretmana pojedinačnim mikotoksinima (ili OTA ili CIT) u pokusnom modelu štakora pri čemu je izmjerena količina proteina tijekom western analize bila usklađena s intenzitetom fluorescencijskog bojenja tijekom i imunofluorescencijske analize. Dobiveni rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na različite mehanizme kojima OTA i CIT reguliraju ekspresiju membranskih prijenosnika za OA u bubrezima štakora, ako se primjene u pojedinačnoj formi (ili OTA ili CIT).

6.2.1 Pojedinačni učinci OTA

6.2.1.1 Pojedinačni učinci OTA na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman s dvije doze OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m.) je u ovisnosti o dozi značajno smanjio količinu proteina rOat1 (~30 do ~50%) u BLM PK (odsječci S1 i S2) smještenih u kori i proteina rOat2 (~22%) u ČM PK (odsječci S3) smještenih u vanjskom tračku bubrega štakora, dok je količina proteina rOat3 (bazolateralna membrana, odsječci S1 i S2, kora) i proteina rOat5 (četkasta membrana, odsječci S3, vanjski tračak) ostala nepromijenjena.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na različit stupanj osjetljivosti membranskih prijenosnika OA na učinke OTA (rOat1 *vs.* rOat2) u bubrezima štakora te izostanak nefrotoksičnih učinaka OTA na ekspresiju proteina rOat3 i rOat5.

6.2.1.2 Pojedinačni učinci OTA na ekspresiju housekeeping proteina u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman s dvije doze OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. ili 0,250 mg kg^{-1} tj.m.) nije promijenio ekspresiju, tj. količinu proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora, niti inducirao morfološka oštećenja kanalića u nefronu štakora.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno pokazuju da je regulacija ekspresije proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora neosjetljiva na učinke OTA, u slučaju kada se isti primjeni samostalno.

6.2.2 Pojedinačni učinci CIT

6.2.2.1 Pojedinačni učinci CIT na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman s CIT (20 mg kg^{-1} tj.m.) značajno je smanjio količinu proteina rOat2 (~34%) i rOat5 (~61%) u ČM PK (odsječci S3) koji su smješteni u vanjskom tračku bubrega, dok je količina proteina rOat1 i rOat3 u BLM PK (odsječci S1 i S2) smještenih u kori bubrega, ostala nepromijenjena.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na različit stupanj osjetljivosti membranskih prijenosnika za OA na učinke CIT (rOat2 *vs.* rOat5) u bubrezima štakora te izostanak nefrotoksičnog učinka CIT na ekspresiju proteina rOat1 i rOat3.

6.2.2.2 Pojedinačni učinci CIT na na ekspresiju housekeeping proteina u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman s CIT (2 mg kg^{-1} tj.m.) nije promijenio ekspresiju, tj. količinu *housekeeping* proteina u bubrezima štakora uključujući rNa/K-ATPazu i rβ-aktin, niti je inducirao morfološka oštećenja kanalića u nefronu štakora.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno pokazuju da je regulacija ekspresije istraživanih *housekeeping* proteina rNa/K-ATPaze i rβ-aktina u bubrezima štakora neosjetljiva na učinke CIT, ako se isti primjeni sam.

6.3 Združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT)

Združeni učinci OTA i CIT na ekspresiju bubrežnih proteina istraženi su upotrebom specifičnih primarnih Ab nakon 21-dnevnog tretmana sa smjesom mikotoksina (OTA + CIT) u pokusnom modelu štakora pri čemu je izmjerena količina proteina tijekom western analize bila usklađena s intenzitetom fluorescencijskog bojenja tijekom imunofluorescencijske analize. Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na važnost interakcija mikotoksina u združenoj smjesi (OTA + CIT) koje u bubrezima štakora različito reguliraju mehanizme proteinske ekspresije u odnosu na tretman s pojedinačnim mikotoksinima (ili OTA ili CIT).

6.3.1 Združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT) na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala bilo manju dozu OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), bilo veću dozu OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), značajno je promijenio razinu ekspresije proteina rOat u BLM PK (odsječci S1 i S2) u kori bubrega; u ovisnosti o dozi količina proteina rOat1 se smanjila (~37 do ~63%), a količina proteina rOat3 se povećala (1,39 do 1,74 puta).
- 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala veću dozu OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), značajno je smanjio količinu proteina rOat2 (~32%) i rOat5 (~65%) u ČM PK (odsječci S3) u vanjskom tračku bubrega dok se razina njihove ekspresije nije promijenila tretmanom sa smjesom mikotoksina koja je sadržavala manju dozu OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT).
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na:
    - različit stupanj osjetljivosti membranskih prijenosnika za OA na združene učinke mikotoksina (OTA + CIT) u bubrezima štakora.
    - važnost interakcija mikotoksina u združenoj smjesi (OTA + CIT) koje različito utječu na regulacijske mehanizme ekspresije bubrežnih proteina rOat smještenih u BLM PK (rOat1 *vs.* rOat3).
    - važnost interakcija mikotoksina u združenoj smjesi (OTA + CIT) koje različito reguliraju mehanizme ekspresije membranskih prijenosnika za OA u bubrezima štakora u odnosu na tretman s pojedinačnim mikotoksinima (ili OTA ili CIT).

6.3.2 Združeni učinci mikotoksina (OTA + CIT) na ekspresiju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora:

- 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala veću dozu OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), značajno je smanjio ekspresiju, tj. količinu

proteina rβ-aktina (~30%), ali ne i ekspresiju, tj. količinu proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora, dok se njihova razina ekspresije nije promijenila nakon tretmana smjesom mikotoksina koja je sadržavala manju dozu OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT).

- 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina koja je sadržavala bilo manju OTA (0,125 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), bilo veću dozu OTA (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT), nije inducirao morfološka oštećenja kanalića u nefronu štakora.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na:
    - različitu osjetljivost *housekeeping* proteina na združene učinke mikotoksina (OTA + CIT) u bubrezima štakora (rNa/K-ATPaza *vs.* rβ-aktin).
    - važnost interakcija mikotoksina u združenoj smjesi (OTA + CIT) koje različito utječu na regulacijske mehanizme ekspresije β-aktina u bubrezima štakora u odnosu na tretman s pojedinačnim mikotoksinima (ili OTA ili CIT).

6.4 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV)

Združeni učinci mikotoksina (OTA i CT) i antioksidansa RSV istraženi su metodama western i imunofluorescencijske analize upotrebom specifičnih Ab nakon 21-dnevnog tretmana sa smjesom (OTA + CIT + RSV) u pokusnom modelu štakora pri čemu je izmjerena količina proteina tijekom western analize bila usklađena s intenzitetom fluorescencijskog bojenja tijekom imunofluorescencijske analize. Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na odsustvo protektivnog učinka antioksidanta RSV na smanjenu razinu ekspresije različitih bubrežnih proteina uslijed nefrotoksičnih učinaka OTA i CIT u pokusnom modelu štakora.

6.4.1 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) na ekspresiju membranskih prijenosnika OA u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina i resveratrola (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT + 20 mg kg^{-1} tj.m. RSV) značajno je smanjio ekspresiju, tj.

količinu proteina rOat1 (~65%), rOat2 (~72%) i rOat5 (~89%) u bubrezima štakora, dok je količina proteina rOat3 ostala nepromijenjena.

- Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na:
    - različit stupanj osjetljivosti proteina rOat (rOat1 < rOat2 < rOat5) te odsustvo osjetljivosti proteina rOat3 na združene učinke mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) u bubrezima štakora.
    - odsustvo protektivnog učinka antioksidansa RSV na smanjenu razinu ekspresije membranskih prijenosnika za OA (rOat1, rOat2 i rOat3) u bubrezima uslijed nefrotoksičnih učinaka OTA i CIT u pokusnom modelu štakora.

6.4.2 Združeni učinci mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) na ekspresiju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora

- 21-dnevni tretman smjesom mikotoksina i resveratrola (0,250 mg kg^{-1} tj.m. OTA + 2 mg kg^{-1} tj.m. CIT + 20 mg kg^{-1} tj.m. RSV) značajno je smanjio ekspresiju, tj. količinu bubrežnog proteina rβ-aktina (~24%), ali ne i proteina rNa/K-ATPaze.
- Rezultati ovog doktorskog rada jasno ukazuju na:
    - Različiti stupanj osjetljivosti istraživanih *housekeeping* proteina na tretman sa smjesom mikotoksina i resveratrola (OTA + CIT + RSV) u bubrezima štakora (rNa/K-ATPaza *vs.* rβ-aktin).
    - odsustvo protektivnog učinka RSV na smanjenu razinu ekspresije proteina rβ-aktina u bubrezima uslijed nefrotoksičnih učinaka OTA i CIT u pokusnom modelu štakora.

Rezultati ovog doktorskog rada mogli bi:

- Pridonijeti boljem razumijevanju pojedinačnih (ili OTA ili CIT) i združenih (OTA + CIT) učinaka mikotoksina u pokusnom modelu štakora na regulaciju ekspresije:
    - membranskih prijenosnika za OA (rOat1/*Slc22a6* i rOat3/*Slc22a8*) na BLM epitelnih stanica PK (odsječci S1 i S2) smještenih u kori bubrega.
    - membranskih prijenosnika za OA (rOat2/*Slc22a7* i rOat5/*Slc22a19*) na ČM epitelnih stanica PK (odsječci S3) smještenih u vanjskom tračku bubrega.
    - *housekeeping* proteina na bazolateralnoj (rNa/K-ATPaza) ili četkastoj (rβ-aktin) membrani različitih kanalića u različitim zonama nefrona štakora.
- Ukazati na kompleksnu regulaciju ekspresije membranskih prijenosnika za OA smještenih na obje membranske domene u epitelnim stanicama PK pri nastanku nefrotoksičnosti bilo pojedinačnim (ili OTA ili CIT), bilo združenim (OTA+CIT) mikotoksinima u pokusnom modelu štakora.
- Ukazati na kompleksnu regulaciju ekspresije *housekeeping* proteina smještenih na obje membranske domene u epitelnim stanicama PK pri nastanku nefrotoksičnosti bilo pojedinačnim (ili OTA ili CIT), bilo združenim (OTA+CIT) mikotoksinima u pokusnom modelu štakora.
- Ukazati na važnost interakcija mikotoksina koje u združenoj smjesi (OTA + CIT) različito reguliraju mehanizme ekspresije bubrežnih proteina u odnosu na tretman s pojedinačnim mikotoksinima (ili OTA ili CIT).
- Ukazati na važnost daljnjih istraživanja združenih učinaka OTA i CIT u pokusnom modelu štakora te drugih mikotoksina prisutnih u sirovinama i namirnicama namijenjenih prehrani ljudi i životinja. Međudjelovanje mikotoksina i njihovih prijenosnika može se očitovati promjenama u regulaciji mehanizama ekspresije različitih bubrežnih proteina, te stoga može doprinijeti nastanku i razvoju različitih patofizioloških poremećaja funkcije bubrega.
- Ukazati na odsustvo protektivnog/reparatornog učinka antioksidansa RSV na smanjenu razinu ekspresije bubrežnih *housekeeping* i rOat proteina uslijed nefrotoksičnih učinaka mikotoksina (OTA + CIT) u pokusnom modelu štakora.

- Ukazati na važnost daljnjih istraživanja mogućih učinaka RSV na nefrotoksične učinke mikotoksina u pokusnom modelu štakora rabeći novi dizajn pokusa s drugačijom aplikacijom, dozama i trajanjem tretmana.
- Pridonijeti boljem razumijevanju patofiziologije bubrežnih funkcija u ljudi i životinja pri nastanku nefrotoksičnosti uzrokovane mikotoksinima.
- Pomoći u planiranju budućih mikotoksikoloških istraživanja u štakora kao učestalo rabljenog pokusnog modela u bazičnim i predkliničkim istraživanjima.

7. LITERATURA

[1]Adler M, Muller K, Rached E, Dekant W, Mally A, 2009. Modulation of key regulators of mitosis linked to chromosomal instability is an early event in ochratoxin A carcinogenicity. Carcinogenesis 30:711-719.

[2]Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Varzakas T, 2020. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: prevention and detoxification in foods. Foods 9:137.

[3]Aldars-García L, Berman M, Ortiz J, Ramos AJ, Marín S, 2018. Probability models for growth and aflatoxin B 1 production as affected by intraspecies variability in Aspergillus flavus. Food Microbiol 72:166-175.

[4]Ali N, Muñoz K, Degen GH, 2017. Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults—An assessment of variables in biomarker analysis. Toxicol Lett 275:19-26.

[5]Alshannaq A, Yu JH, 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. Int J Env Res Publ He 14:632.

[6]Ambrose AM, DeEds F, 1946. Some toxicological and pharmacological properties of citrinin. J Pharmacol Exp Ther 88:173-186.

[7]Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C, 2012. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? J Control Release 158:182-193.

[8]Andlauer W, Kolb J, Siebert K, Furst P, 2000. Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. Drugs Exp Clin Res 26:47-55.

[9]Anzai N, Jutabha P, Enomoto A, Yokoyama H, Nonoguchi H, Hirata T, Shiraya K, He X, Cha SH, Takeda M, Miyazaki H, Sakata T, Tomita K, Igarashi T, Kanai Y, Endou H, 2005. Functional characterization of rat organic anion transporter 5 (*Slc22a19*) at the apical membrane of renal proximal tubules. J Pharmacol Exp Ther 315:534-544.

[10]Arai M, Hibino T, 1983. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. Cancer Lett 17:281-287.

[11]Arbillaga L, Vettorazzi A, Gil AG, van Delft JH, Garcia-Jalon JA, Lopez de Cerain A, 2008. Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration. Toxicol Appl Pharmacol 230: 197-207.

[12]Ayalew A, 2010. Mycotoxins and surface and internal fungi of maize from Ethiopia. Afr J Food Agricult Nutrit Develop 10:9.

[13]Aziz NH, Mattar ZA, Mahrous SR, 2006. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. J Food Safety 26:184-201.

[14]Bahn A, Knabe M, Hagos Y, Rodiger M, Godehardt S, Graber-Neufeld DS, Evans KK, Burckhardt G, Wright SH, 2002. Interaction of the metal chelator 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate with the rabbit multispecific organic anion transporter 1 (rbOAT1). Mol Pharmacol 62:1128-1136.

[15]Bavaresco LP, D Cantù, E Fregoni, M Chiusa, G Trevisan Marco, 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by Botrytis cinerea. Vitis 36:77-83.

[16]Bedada, S.K., Yellu, N.R., Neerati, P., 2016. Effect of resveratrol on the pharmacokinetics of fexofenadine in rats: Involvement of P-glycoprotein inhibition. Pharmacological Reports 68, 338–343.

[17]Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A, 2006. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. FEMS Microbiol Lett 255:203-208.

[18]Ben Taheur F, Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Ben Salah-Abbès J, Chaieb K, 2019. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. Toxicon 160:12-22.

[19]Bendele AM, Carlton WW, Krogh EB, Lillehoj EB,1985. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/&J X C*H) F1 mouse. J Natl Cancer Inst 75:733-742.

[20]Bennett JW, 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. Mycopathologia 100:3-5.

[21]Bennett JW, Klich M, 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 16:497-516.

[22]Berndt WO, Hayes AW, Phillips RD, 1980. Effects of mycotoxins on renal function: mycotoxic nephropathy. Kidney Int 18:656-664.

[23]Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP, 1996. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. Int J Tissue React 18:67-71.

[24]Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J, 2013. Masked mycotoxins: A review. Mol Nutr Food Res 57:165-186.

[25]Blout WP, 1961. Turkey "X" disease. J Brit Turk Fed 9:52-61.

[26]Bondy GS, Caldwell DS, Aziz SA, Coady LC, Armstrong CL, Curran IH, Koffman RL, Kapal K, Lefebvre DE and Mehta R, 2015. Effects of chronic ochratoxin A exposure on p53 heterozygous and p53 homozygous mice. Toxicol Path 43:715-729.

[27]Boorman GA, 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 358:1-142.

[28]Boorman GA, McDonald MR, Imoto S, Persing R, 1992. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. Toxicol Pathol 20:236-245.

[29]Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V, Rimm D, 2010. Antibody validation. Biotechniques 48:197-209.

[30]Bosch-Saadatmandi C, Loboda A, Jozkowicz A, Huebbe P, Blank R, Wolffram S, Dulak J, Rimbach G, 2008. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S transferase in cultured kidney tubulus cells. Food Chem Toxicol 46:2665-2671.

[31]Bosch-Saadatmandi C, Wagner AE, Graeser AC, Hundhausen C, Wolffram S, Rimbach G, 2009. Ochratoxin A impairs Nrf2-dependent gene expression in porcine kidney tubulus cells. J Anim Physiol An N 93:547-554.

[32]Boudra H, Le Bars P, Le Bars J, 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. Appl Environ Microb 61:1156-1158.

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

[34]Bouslimi A, Ouannes Z, Golli EE, Bouaziz C, Hassen W, Bacha H, 2008b. Cytotoxicity and Oxidative Damage in Kidney Cells Exposed to the Mycotoxins Ochratoxin A and Citrinin: Individual and Combined Effects, Toxicol Mech Method 18:341-349.

[35]Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54.

[36]Brater DC, Hall SD, 2008. Disposition and Dose Requirements of Drugs in Renal Insufficiency. U: The Kidney Seldin and Giebisch's. Alpern R, Caplan M, Moe O (ur). Elsevier, str. 2763-2791.

[37]Braunberg RC, Barton CN, Gantt OO, Friedman L, 1994. Interaction of citrinin and ochratoxin A. Nat Toxins 2:124-131.

[38]Breljak D, Ljubojević M, Balen D, Žlender V, Brzica H, Micek V, Kušan M, Anzai N, Sabolić I, 2010. Renal expression of organic anion transporter Oat5 in rats and mice exhibits the female-dominant sex differences. Histol Histopathol 25:1385-1402.

[39]Breljak D, Brzica H, Sweet DH, Anzai N, Sabolic I, 2013. Sex-dependent expression of Oat3 (Slc22a8) and Oat1 (Slc22a6) proteins in murine kidneys. Am J Physiol-Renal 304:F1114-11126.

[40]Breljak D, Ljubojević M, Hagos Y, Micek V, Balen Eror D, Vrhovac Madunić I, Brzica H, Karaica D, Radović N, Kraus O, Anzai N, Koepsell H, Burckhardt G, Burckhardt, BC, Sabolić I, 2016. Distribution of organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. Am J Physiol-Renal 311:F227-F238.

[41]Brzica H, Breljak D, Vrhovac I, Sabolić I, 2011. Role of Microwave Heating in Antigen Retrieval in Cryosections of Formalin-Fixed Tissues. U: Microwave Heating. Chandra U (ur). IntechOpen Book Series, str. 41-62.

[42]Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, Hartley DP, Klaassen CD, 2002. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. J Pharmacol Exp Ther 301:145-151.

[43]Burckhardt G, 2012. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). Pharmacology & Therapeutics 136, 106–130.

[44]Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Minguez S, Pons A, 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? Inter J Food Microbiol 79:213–215.

[45]Calcutt MW, Gillman IG, Noftle RE, Manderville RA, 2001. Electrochemical oxidation of ochratoxin A: Correlation with 4-chlorophenol. Chem Res Toxicol 14:1266-1272.

[46]Carlton WW, Sansing G, Szczech GM, Tuite J, 1974. Citrinin mycotoxicosis in beagle dogs. Food Cosmet Toxicol 12:479-490.

[47]Carlton WW, Szczech GM, 1978. Citrinin. U: Mycotoxicoses in Laboratory Animals. Vol 2. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: An Encyclopaedic Handbook. Wyllie TD, Morehouse LG (ur). Marcel Dekker, New York, str. 371.

[48]Carvalho CA, Fernandes B, Freire RB, 2005. Humoral immunosupression caused by citrinin. Arq Bras Med Vet Zoo 57:171-176.

[49]Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H, 2001. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. Mol Pharmacol 59:1277-1286.

[50]Chagas GM, Oliveira MBM, Campello AP, Kluppel MLW, 1995. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca2+ transport. Cell Biochem Funct 13:53-59.

[51]Chan WH, Shiao NH, 2007. Effect of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. Reprod Toxicol 24:120-125.

[52]Chan WH, 2007. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. Biochem J 404:317-326.

[53]Ciegler A, Vesonder RF, Jackson LK, 1977. Production and biological activity of patulin and citrinin from Penicillium expansum. Appl Environ Microb 33:1004-1006.

[54]Cihlar T, Lin D, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB, Sweet DH, 1999. The antiviral nucleoside phosphonates cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. Mol Pharmacol 56:570-580.

[55]Constant J, 1997. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. Coron Artery Dis 8:645-649.

[56]Couchman JR, 2009. Commercial antibodies: the good, bad, and really ugly. J Histochem Cytochem 57:7-8.

[57]Crowell JA, 2004. Resveratrol-Associated Renal Toxicity. Toxicol Sci 82:614-619.

[58]Darif Y, Mountassif D, Belkebir A, Zaid Y, Basu K, Mourad W and Oudghiri M, 2016. Ochratoxin A mediates MAPKactivation, modulates IL-2 and TNF-amRNA expression and induces apoptosis by mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways in human H9 T cells. Journal of Toxicological Sciences, 41: 403–416.

[59]Dick R, Baumann U, Zimmerli B, 1988. Zum vorkommen von citrinin in cerealien (Occurrence of citrinin in cereal grains). Mitteilungen Gebiete Lebensmitte Hygiene, 79:159-164.

[60]Dietrich R, Schmid A, Märtlbauer E, 2001. Citrinin in fruit juices. Mycotoxin Res, 17:156- 159.

[61]Dietrich DR, Heussner AH, O'Brien E, 2005. Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). Food Addit Contam 22:45-52.

[62]Domijan AM, Želježić D, Kopjar N, Peraica M, 2006. Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A - and fumonisinB (1) – treated rats. Toxicology 222:53-59.

[63]Dönmez-Altuntas H, Dumlupinar G, Imamoglu N, Hamurcu Z, Liman BC, 2007. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. J Appl Toxicol 27:337-341.

[64]EFSA, 2020. Risk assessment of ochratoxin A in food; Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), EFSA Journal 18:6113.

[65]El Adlouni C, Tozlovanu M, Naman F, Faid M, Pfohl-Leszkowicz A, 2006. Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin. Mol Nutrit Food Res 50:507-512.

[66]El Khoury A, Atoui A, 2010. Ochratoxin A: general overview and actual molecular atatus. Toxins 2:461-493.

[67]El-Sayed AMAA, 1996. Natural occurrence of ochratoxin A and citrinin in food stuffs in Egypt. Mycotoxin Res 12:41-44.

[68]Enomoto A, Takeda M, Shimoda M, Narikawa S, Kobayashi Y,Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T, Endou H, 2002. Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 301:797- 802.

[69]Eskola M, 2002. Study on Trichothecenes, Zearalenone and Ochratoxin A in finnish cereals: Occurrence and analytical Techniques; Academic dissertation: Skillman, NJ, USA.

[70]Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R, 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. Crit Rev Food Sci 60:2773-2789.

[71]FAO, 1993. Agro-ecological assessment for national planning: The example of Kenya. FAO Soils Bulletin 67.

[72]FAO/WHO, 2001. Ochratoxin A. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives 47:281-387.

[73]Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, and Merillon JM, 1997. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. Life Sci 61:2103-2110.

[74]Ferrante MC, Bilancione M, Raso GM, Esposito E, Iacono A, Zaccaroni A and Meli R, 2006. Expression of COX-2 and hsp72 in peritoneal macrophages after an acute ochratoxin A treatment in mice. Life Sci 79:1242-1247.

[75]Fink-Grernmels J, 1999. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. Vet Quart 21:115-120.

[76]Fink-Gremmels J, 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. Food Addit Contam A 25:172-180.

[77]Frankel EN, Waterhouse AL, and Kinsella JE, 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet 341:1103-1104.

[78]Friis P, Hasselager E and Krogh P, 1969. Isolation of citrinin and oxalic acid from Penicillium viridicatum Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. Acta Pathol Mic Sc 77:559-560.

[79]Friis, C., Brinn, R., Hald, B., 1988. Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. Toxicology 52, 209–217.

[80]Gan F, Hou LL, Zhou YJ, Liu YH, Huang D, Chen XX and Huang KH, 2017. Effects of ochratoxin A on ER stress, MAPK signaling pathway and autophagy of kidney and spleen in pigs. Environmental Toxicology, 32:2277–2286.

[81]Gayathri L, Dhivya R, Dhanasekaran D, Periasamy VS, Alshatwi AA, Akbarsha MA, 2015. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. Food Chem Toxicol 83:151-163.

[82]Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G, Silbernagl S, 1998. Tubulotoxic mechanisms of chratoxin A. Kidney Blood Press R 21:277-279.

[83]Gekle M, Silbernagl S, 1994. The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity in vivo: toxodynamic and toxokinetic aspects. Ren Physiol Biochem 17:40-49.

[84]George B, You D, Joy MS, Aleksunes LM, 2017. Xenobiotic transporters and kidney injury. Adv Drug Deliver Rev 116:73-91.

[85]Gescher AJ, Steward WP, 2003. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. Cancer Epidem Biomar 12:953-957.

[86]Groves CE, Morales M, and Wright SH, 1998. Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules. J Pharmacol Exp Ther 284:943-948.

[87]Groves CE, Nowak G, Morales M, 1999. Ochratoxin A secretion in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. J Am Soc Nephrol 10:13–20.

[88]Gupta M, Sasmal D, Bandyopadhyay S, Bagchi G, Chatterjee T and Dey S, 1983. Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. Toxicology 26:55-62.

[89]Gupta RC, Lasher MA, Mukherjee IRM, Srivastava A, Lall R, 2017. Aflatoxins, Ochratoxins, and Citrinin. U: Reproductive and Developmental Toxicology, Gupta RC (ur.), Elsevier, str. 945-962.

[90]Hadjeba-Medjdoub K, Tozlovanu M, Pfohl-Leszkowicz A, Frenette C, Paugh RJ, Manderville RA, 2012. Structure–activity relationships imply different mechanisms of action for ochratoxin A-mediated cytotoxicity and genotoxicity. Chem Res Toxicol 25, 181-190.

[91]Hagelberg S, Hult K, Fuchs R, 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. J Appl Toxicol 9:91-96.

[92]Hagos Y, Bahn A, Asif AR, Krick W, Sendler M, Burckhardt G, 2002. Cloning of the pig renal organic anion transporter 1 (pOAT1). Biochimie 84:1221-1224.

[93]Han Z, Zhao Z, Shi J, Liao Y, Zhao Z, Zhang D, Wu Y, De Saeger S, Wu A, 2013. Combinatorial approach of LC–MS/MS and LC–TOF-MS for uncovering in vivo kinetics and biotransformation of ochratoxin A in rat. J Chromatogr B 925:46-53.

[94]Hanika C, Carlton WW, 1983. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit. Food Chem Toxicol 21:487-493.

[95]Hetherington AC, Raistrick H, 1931. Studies in the biochemistry of micro-organisms. Part XIV. On the production of and chemical constitution of of a new yellowcoloring matter, citrinin, produced from glucose by Penicillium citrinum. Phil Trans Royal Soc 220:269-295.

[96]Heussner AH, O'Brien E, Dietrich DR, 2002. Species- and sex-specific variations in binding of ochratoxin A by renal proteins in vitro. Exp Toxicol Pathol 54:151-159.

[97]Heussner AH, Dietrich DR and O'Brien E, 2006. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. Toxicol In Vitro 20:332-341.

[98]Hood RD, Hayes AW and Scammell JG, 1976. Effects of prenatal administration of citrinin and viriditoxin to mice. Food Cosmet Toxicol 14:175-178.

[99]Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H, 1999. Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. Am J Physiol-Renal 276:F122-F128.

[100]Huang FJ and Chan WH, 2016. Effects of ochratoxin A on mouse oocyte maturation and fertilization, and apoptosis during foetal development. Environmental Toxicology, 31:724–735.

[101]Hundhausen C, Boesch-Saadatmandi C, Matzner N, Lang F, Blank R, Wolffram S, Blaschek W and Rimbach G, 2008. Ochratoxin a lowers mRNA levels of genes encoding for key proteins of liver cell metabolism. Cancer Genom Proteom 5:319-332.

[102]IARC, 1993. Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Costituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: IARC 56:489-524.

[103]IARC, 2016. New IARC report urges action against widespread mycotoxin contamination in developing countries. IARC 9:2015-2016.

[104]Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 275:218-220.

[105]Jarvis B, 1983. Mould and mycotoxins in mouldy cheeses. Microbiologie Aliments Nutrition 1:187-191.

[106]Jennings P, Weiland C, Limonciel A, Bloch KM, Radford R, Aschauer L, McMorrow T, Wilmes A, Pfaller W, Ahr HJ, Slattery C, Lock EA, Ryan MP and Ellinger-Ziegelbauer H, 2012. Transcriptomic alterations induced by Ochratoxin A in rat and human renal proximal tubular in vitro models and comparison to a rat in vivo model. Arch Toxicol 86:571-589.

[107]Jia Y, Liu Z, Wang C, Meng Q, Huo X, Liu Q, Sun H, Sun P, Yang X, Ma X, Liu K, 2016. P-gp, MRP2 and OAT1/OAT3 mediate the drug-drug interaction between resveratrol and methotrexate. Toxicol Appl Pharm 306:27-35.

[108]Johannessen LN, Nilsen AM, Løvik M, 2007. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. Toxicol Lett 168:103-112.

[109]Jordan WH, Carlton WW, 1977. Citrinin mycotoxicosis in the mouse. Food Cosmet Toxicolol 15:29-34.

[110]Jordan WH, Carlton WW, 1978a. Citrinin mycotoxicosis in the Syrian hamster. Food Cosmet Toxicol 16:355-363.

[111]Jordan WH, Carlton WW and Sansing GA, 1978b. Citrinin mycotoxicosis in the rat. Toxicology and pathology. Food Cosmet Toxicol 16:431-439.

[112]Jung KY, Takeda M, Kim DK, Tojo A, Narikawa S, Yoo BS, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, and Endou H, 2001. Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. Life Sci 69:2123-2135.

[113]Jutabha P, Anzai N, Hayashi K, Domae M, Uchida K, Endou H, Sakurai H, 2011. A novel human organic anion transporter NPT4 mediates the transport of ochratoxin A. J Pharmacol Sci 116:392-396.

[114]Kalantari H, Das DK, 2010. Physiological effects of resveratrol. Biofactors 36:401-6.

[115]Kanisawa M, 1984. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice; simpozij *Toxigenic Fungi - Their Toxins and Health Hazard* 7:245-254.

[116]Karaica D, Micek V, Rašić D, Peraica M, Šegvić Klarić M, Breljak D, 2020. Subchronic exposure to individual and combined ochratoxin A and citrinin affects the expression of rat renal organic anion transporters. Mycotoxin Res 36:339-352.

[117]Kimura Y, Okuda H, and Arichi S, 1985. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. Biochim Biophys Acta 834:275-278.

[118]Klarić MŠ, Medic N, Hulina A, Grubišić TZ and Rumora L, 2014. Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments. Food Chem Toxicol 71:97-105.

[119]Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW and Ehrlich VA, 2004. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. Nutri Cancer 50:190-197.

[120]Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H, Yamamoto T, 2002a. Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. Biochem Biophys Res Commun 290:482-487.

[121]Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, Sasaki T, Tokuyama S, Sekine T, Endou H, Yamamoto T, 2002b. Isolation, characterization and differential gene expression of multispecific organic anion transporter 2 in mice. Mol Pharmacol 62:7-14.

[122]Koepsell H, Endou H, 2004. The SLC22 drug transporter family. Pflug Arch Eur J Phy 447:666-676.

[123]Kogika MM, Hagiwara KM, and Mirandola RMS, 1996. Experimental citrinin nephrotoxicosis in dogs. Vet Human Toxicol 35:136-140.

[124]Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, and Endou H, 2002. Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. J Am Soc Nephrol 13:848-857.

[125]Kononenko GP, Burkin AA, 2008. A survey on the occurrence of citrinin in feeds and their ingredients in Russia. Mycotoxin Res 24:3-6.

[126]Kőszegi T, Poór M, 2016. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. Toxins 8:111.

[127]Kriz W, Bankir L, 1988. A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). Kidney Int 33:1-7.

[128]Krogh P, Hasselager E, Friis P, 1970. Studies on fungal nephrotoxicity. 2. Isolation of two nephrotoxic compounds from Penicillium viridicatum Westling: citrinin and oxalic acid. Acta Pathol Mic Sc 78:401-413.

[129]Krogh P, Hesselager E, Friss P, 1973. Occurrence of ochratoxin A, and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. Acta Pathol Microbiol Scand B 81:689-695.

[130]Krogh P, Elling F, Gyrd-Hansen N, Hald B, Larsen AE, Lillehoj EB, Madsen A, Mortensen HP, and Ravnskov U, 1976. Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. Acta Pathol Microbiol Scand 84:429-434.

[131]Krogh P, Hald B, Pedersen EJ, 2009. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. Acta Path Micro IM B 81:689-695.

[132]Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, and Hahn U, 2000. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. Biochem Biophys Res Commun 272:212-217.

[133]Kumagai S, 1985. Ochratoxin A: Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. Food Chem Toxicol 23:941-943.

[134]Kumar R, Dwivedi PD, Dhawan A, Das M, Ansari KM, 2011. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. Toxicol Sci 122:557-66.

[135]Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG, 2017. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. Front Microbiol 7:2010.

[136]Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, and Endou H, 1999. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. J Biol Chem 274:13675-13680.

[137]Langcake P, McCarthy WV, 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by Botrytis cinerea. *Vitis* 18:244-253.

[138]Lee CH, Lee CL and Pan TM, 2010. A 90-d toxicity study of monascus-fermented products including high citrinin level. J Food Sci 75:91-97.

[139]Lee HJ, Ryu D, 2017. Worldwide cccurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: Public health perspectives of their co-occurrence. J Agric Food Chem 65:7034-7051.

[140]Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, 2000. Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine of rats. Food Chem Toxicol 38:141-152.

[141]Liang R, Shen XL, Zhang B, Li Y, Xu W, Zhao C, Luo Y, Huang K, 2015. Apoptosis signal-regulating kinase 1 promotes ochratoxin A-induced renal cytotoxicity. Sci Rep 5:8078.

[142]Lockard VG, Phillips RD, Wallace Hayes A, Berndt WO, and O'Neal RM, 1980. Citrinin nephrotoxicity in rats: A light and electron microscopic study. Exp Mol Pathol 32:226-240.

[143]Lu R, Serrero G, 1999. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. J Cell Physiol 179:297-304.

[144]Ljubojević M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, and Sabolić I, 2004. Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. Am J Physiol Renal Physiol 287:F124-F138.

[145]Ljubojević M, Balen D, Breljak D, Kušan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G, Sabolić I, 2007. Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. Am J Physiol-Renal 292:F361-F372.

[146]Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Novotna E, 2013. Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity - An overview: Reprotoxicity of ochratoxin. Birth Defects Research B 98:493-502.

[147]Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J, 2016. Ochratoxin A: 50 years of research. Toxins 8:191.

[148]Mantle PG, McHugh KM, 1993. Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. Mycol Res 97:205-212.

[149]Mantle PG, 2008. Interpretation of the pharmacokinetics of ochratoxin A in blood plasma of rats, during and after acute or chronic ingestion. Food Chem Toxicol 46:1808-1816.

[150]Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP, 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. J Pharmacol Exp Ther 302:369-373.

[151]Marin DE, Braicu C, Gras MA, Pistol GC, Petric RC, Berindan Neagoe I, Palade M and Taranu I, 2017a. Low level of ochratoxin A affects genome-wide expression in kidney of pig. Toxicon 136:67-77.

[152]Marin DE, Pistol GC, Gras MA, Palade ML and Taranu I, 2017b. Comparative effect of ochratoxin A on inflammation and oxidative stress parameters in gut and kidney of piglets. Regul Toxicol Pharm 89:224-231.

[153]Marin-Kuan M , Nestler S, Verguet C, Bezençon C, Piguet D, Mansourian R, Holzwarth J, Grigorov M, Delatour T, Mantle P, Cavin C, Schilter B. 2006. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. Toxicol Sci 89:120-34.

[154]Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V, 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem Toxicol 60:218-237.

[155]Martin W, Lorkowski G, Creppy EE, Dirheimer G and Roschenthaler R, 1986. Action of citrinin on bacterial chromosomal and plasmid DNA in vivo and in vitro. Appl Environ Microb 52:1273-1279.

[156]Máté G, Gazdag Z, Mike N, Papp G, Pócsi I, Pesti M, 2014. Regulation of oxidative stress induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.Toxicon 90:155-166.

[157]Mayer S, Engelhart S, Kolk A, Blome H, 2008. The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. Mycotoxin Res 24:151-64.

[158]Mehdi NA, Carlton WW and Tuite J, 1983. Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings. Avian Pathol 12:221-233.

[159]Mgbonyebi OP, Russo J, and Russo IH, 1998. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. Int J Oncol 12:865-869.

[160]Miller DS, Stewart DE, Pritchard JB, 1993. Intracellular compartmentation of organic anions within renal cells. Am J Physiol 264:R882-R890.

[161]Mor AL, Kaminski TW, Karbowska M, Pawlak D, 2018. New insight into organic anion transporters from the perspective of potentially important interactions and drugs toxicity. Review J Physiol Pharmacol 69.

[162]National Research Council, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press, Washington, DC.

[163]Nigam SK, 2018. The SLC22 transporter family: A paradigm for the impact of drug transporters on metabolic pathways, signaling, and disease. Ann Rev Pharmacol Toxicol 58:663-687.

[164]O'Brien E, Heussner AH, and Dietrich D, 2001. Species-, sex- and cell type specific effects of ochratoxin A, and B. Toxicol Sci 63:256-264.

[165]Ostry V, Malir F, Ruprich J, 2013. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. Toxins 5:1574-1586.

[166]Otteneder H, Majerus P, 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. Food Addit Contam 17:793-798.

[167]Pastor L, Vettorazzi A, Enciso JM, González-Peñas E, García-Jalón JA, Monreal JI, López de Cerain A (2018) Sex differences in ochratoxin a toxicity in F344 rats after 7 and 21 days of daily oral administration. Food Chem Toxicol 111:363–373.

[168]Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P, 2003. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. J Biol Chem 278:37832-37839.

[169]Pepeljnjak S, Šegvic M and Ožegović L, 2002. Citrininotoxinogenicity of Penicillium spp. isolated from decaying apples. Brazi J Microbiol 33:134-137.

[170]Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M, 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bull World Health Organ 13:754-766.

[171]Petkova-Bocharova T, Castegnaro M, Michelon J, Maru V, 1991. Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. IARC Sci Publ 115:83-87.

[172]Petzinger E, Ziegler K, 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. J Vet Pharmacol Ther 23:91–98.

[173]Pfeiffer E, Gross K and Metzler M, 1998. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. Carcinogenesis 19:1313-1318.

[174]Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA, 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Mol Nutr Food Res 51:61–99.

[175]Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA, 2012. An Update on Direct Genotoxicity as a Molecular Mechanism of Ochratoxin A Carcinogenicity. Chem Res Toxicol 25:252-262.

[176]Phillips RD, Hayes AW, 1978. Effect of the mycotoxin citrinin on composition of mouse liver and kidney. Toxicon 16:351-359.

[177]Phillips RD, Wallace Hayes A, BerndtWO,Williams WL (1980) Effects of citrinin on renal function and structure. Toxicology 16:123–137.

[178]Pitt JI, Miller JD, 2017. A Concise history of mycotoxin research. J Agric Food Chem 65:7021-7033.

[179]Pohland AE, Nesheim S, Friedman L, 1992. Ochratoxin A: a review - Technical Report. Pure Appl Chem 64:1029-1046.

[180]Pritchard JB, 1988. Coupled transport of p-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles. Am J Physiol-Renal 255:F597-F604.

[181]Qi X, Yu T, Zhu L, Gao J, He X, Huang K, Luo Y and Xu W, 2014. Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. Toxicol Appl Pharmacol 280:543-549.

[182]Qingqing H, Linbo Y, Yunqian G and Shuqiang L, 2010. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice. Exp Toxicol Pathol 64:465-469.

[183]Quan, F., Pan, C., Ma, Q., Zhang, S., Yan, L., 2008. Reversal effect of resveratrol on multidrug resistance in KBv200 cell line. Biomedicine & Pharmacotherapy 62, 622–629.

[184]Race JE, Grassl SM, Williams WJ, Holtzman EJ, 1999. Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). Biochem Biophys Res Commun 255:508-514.

[185]Rached E, Hard GC, Blumbach K, Weber K, Draheim R, Lutz WK, Ozden S, Steger U, Dekant W and Mally A, 2007. Ochratoxin A: 13-week oral toxicity and cell proliferation in male F344/N rats. Toxicol Sci 97:288-298.

[186]Raghubeer S, Nagiah S and Chuturgoon AA, 2017. Acute Ochratoxin A exposure induces inflammation and apoptosis in human embryonic kidney (HEK293) cells. Toxicon 137:48–53.

[187]Rasonyi T, Schlatter J, and Dietrich DR, 1999. The role of a2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. Toxicol Lett 104:83-92.

[188]Rašić D, Mladinić M, Želježić D, Pizent A, Stefanović S, Milićević D, Konjevoda P, Peraica M, 2018. Effects of combined treatment with ochratoxin A and citrinin on oxidative damage in kidneys and liver of rats, Toxicon, 146:99-105.

[189]Reddy R, Hayes A, Berndt W, 1982. Disposition and metabolism of C-14-labeled citrinin in pregnant rats. Toxicology 25:161-174.

[190]Reddy BN, Nusrath M, Kumari CK, Nahdi S, 1983. Mycotoxin contamination in some food commodities from tribal areas of Medak District, Andhra Pradesh. Indian Phytopathol 36:683- 686.

[191]Reddy RV, Taylor MJ, Sharma RP, 1988. Evaluation of citrinin toxicity on the immune functions of mice. J Food Protect 51:32-36.

[192]Reid, G., Wolff, N.A., Dautzenberg, F.M., Burckhardt, G., 1998. Cloning of a human renal p-aminohippurate transporter, hROAT1. Kidney Blood Press R 21:233-237.

[193]Ribeiro SMR, Chagas GM, Campello AP, Kluppel LW, 1997. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. Cell Biochem Funct 15:203-209.

[194]Ribeiro de Lima MT, Waffo-Teguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vercauteren J, Cabanis JC, Mérillon JM, 1999. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. J Agric Food Chem 47:2666-2670.

[195]Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y, 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chem-Biol Interact 159:18-46.

[196]Rizzo A, Eskola M, Atroshi F, 2002. Ochratoxin A in Cereals, Foodstuffs and Human Plasma. U: Mycotoxins in Plant Disease. Logrieco A, Bailey JA, Corazza L, Cooke BM (ur.), Springer Netherlands, Dordrecht, str. 631-637.

[197]Rodrigues P, Venâncio A, Lima N, 2012. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. Food Res Int 48:76-90.

[198]Sabater-Vilar M, Maas RFM, Fink-Gremmels J, 1999. Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutat Res-Gen Tox En Mutagen 444:7-16.

[199]Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Martins N, Sharifi-Rad J, 2018. Resveratrol: a double-edged sword in health benefits. Biomedicine 6:91.

[200]Sansing GA, Lillehoj EB, Detroy RW, Miller MA, 1976. Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice. Toxicon 14:213-220.

[201]Santos L, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ, 2009. Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. J Sci Food Agr 89:1802-1807.

[202]Sauvant C, Silbernagl S, Gekle M, 1998. Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. J Pharmacol Exp Ther 287:13-20.

[203]Sauvant C, Holzinger H, Gekle M, 2005. The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. Cell Physiol Biochem 15:125-134.

[204]Sava V, Reunova O, Velasquez A, Harbison R, Sanchezramos J, 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. Neurotoxicology 27:82-92.

[205]Saxena J, Mehrotra BS, 1989. Screening of spices commonly marketed in India for natural occurrence of mycrotoxins. J Food Compos Anal 2:286-292.

[206]Schulz MC, Schumann L, Rottkord U, Humpf HU, Gekle M, Schwerdt G, 2018. Synergistic action of the nephrotoxic mycotoxins ochratoxin A and citrinin at nanomolar concentrations in human proximal tubule-derived cells. Toxicol Lett 291:149-157.

[207]Scott PM, van Walbeek W, Kennedy B, Anyeti D, 1972. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. J Agric Food Chem 20:1103-1109.

[208]Scudamore KA, Hetmanski MT, 1995. Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. Food Addit Contam 12:377-382.

[209]Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H, 1997. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. J Biol Chem 272:18526–18529.

[210]Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima Y, Endou H, 1998. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. FEBS Lett 429:179-182.

[211]Sekine T, Cha SH, Endou H, 2000. The multispecific organic anion transporter (OAT) family. Pflug Arch Eur J Phy 440:337-350.

[212]Sekine T, Miyazaki H, Endou H, 2006. Molecular physiology of renal organic anion transporters. Am J Physiol-Renal 290:F251-F261.

[213]Shen XL, Zhang Y, Xu W, Liang R, Zheng J, Luo Y, Wang Y, Huang K, 2013. An iTRAQ-based mitoproteomics approach for profiling the nephrotoxicity mechanisms of ochratoxin A in HEK 293 cells. J Proteomics 78:398-415.

[214]Shephard GS, Fabiani A, Stockenström S, Mshicileli N, Sewram V, 2003. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. J Agr Food Chem 51:1102-1106.

[215]Shinohara Y, Arai M, Hirao K, Sugihara S, Nakanishi K, Tsunoda H, Ito N, 1976. Combination effect of citrinin and other chemicals on rat kidney tumourigenesis. Gann 67:147-155.

[216]Siemann EH, Creasy LL, 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. Am J Enol Vitic 43:49-52.

[217]Simonson GD, Vincent AC, Roberg KJ, Huang Y, Iwanij V, 1994. Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. J. Cell Sci 107:1065-1072.

[218]Singh ND, Sharma AK, Dwivedi P, Patil RD, Kumar M, Ahamad DB, 2006. Toxicity of endosulfan and citrinin alone and in combination in pregnant rats: clinico-haematological and serum biochemical alterations. Indian J Vete Pathol 30:27-31.

[219]Singh ND, Sharma AK, Dwivedi P, Patil RD, Kumar M, 2007. Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study. J Appl Toxicol 27:589-601.

[220]Sokol PP, Ripich G, Holohan PD, Ross CR, 1988. Mechanism of ochratoxin A transport in kidney. J Pharmacol Exp Ther 246:460-465.

[221]Soleas GJ, Angelini M, Grass L, Diamandis EP, Goldberg DM, 2001. Absorption of trans-resveratrol in rats Methods Enzymol 335:145-54.

[222]Stein AF, Phillips TD, Kubena LF, Harvey RB, 1985. Renal tubular secretion and reabsorption as factors in ochratoxicosis: Effects of probenecid on nephrotoxicity. J Toxicol and Environ Health 16:593-605.

[223]Stoev SD, Hald B, and Mantle PG, 1998a. Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology. Vet Rec 142:190-194.

[224]Stoev SD, Stoeva JK, Anguelov G, Hald B, Creppy EE, Radic B, 1998b. Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneouscases with different frequency of porcine nephropathy in Bulgaria. Zentralbl Veterinarmed A 45:229-236.

[225]Stoev SD, 2017. Balkan Endemic Nephropathy – still continuing enigma, risk assessment and underestimated hazard of joint mycotoxin exposure of animals or humans. Chem-Biol Interact 261:63-79.

[226]Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR, 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. Arch Toxicol 74:499-510.

[227]Sun W, Wu RR, van Poelje PD, Erion MD, 2001. Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. Biochem Biophys Res Commun 283: 417-422.

[228]Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB, 1997. Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. J Biol Chem 272: 30088–30095.

[229]Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB, Fujiwara Y, Beier DR, Nigam SK, 2002. Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 [Oat3 (Slc22a8)] knockout mice. J Biol Chem 277:26934-26943.

[230]Sweet DH, Chan LMS, Walden R, Yang X, Miller DS, Pritchard JB, 2003. Organic Anion Transporter 3 [Slc22a8] is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na+ gradient. Am J Physiol-Renal 284:F763-F769.

[231]Sweet DH, 2005. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. Toxicol Appl Pharm 204:198-215.

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

[233]Tachampa K, Takeda M, Khamdang S, Noshiro-Kofuji R, Tsuda M, Jariyawat S, Fukutomi T, Sophasan S, Anzai N, Endou H, 2008. Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. J Pharmacol Sci 106:435-443.

[234]Tammer B, Lehmann I, Nieber K and Altenburger R, 2007. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. Toxicol Lett 170:124-133.

[235]Taniai E, Yafune A, Nakajima M, Hayashi SM, Nakane F, Itahashi M, Shibutani M, 2014. Ochratoxin A induces karyomegaly and cell cycle aberrations in renal tubular cells without relation to induction od oxidative stress responses in rats. Toxicol Lett 224:64-72.

[236]Thacker HL, Carlton WW, Sansing GA, 1977. Citrinin mycotoxicosis in the guinea-pig. Food Cosmet Toxicol 15:553-561.

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

[238]Tola M, Kebede B, 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. Cogent Food & Agriculture 2:1191103.

[239]Trivedi AB, Doi E, Kitabatake N, 1992. Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. Biosci Biotech Biochem 56:741-745.

[240]Trivedi AB, 1993. Formation of a new toxic compound, citrinin H I , from citrinin on mild heating in water. J Chem Soc Perkin Trans 1:18.

[241]Trivedi AB, Doi E, Kitabatake N, 1993. Toxic compounds formed on prolonged heating of citrinin under watery conditions. J Food Sci 58:229-232.

[242]Tsuda M, Sekine T, Takeda M, Cha SH, Kanai Y, Kimura M, Endou H, 1999. Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter. J Pharmacol Exp Ther 289:1301-1305.

[243]Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kahkola P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T, 2000. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. Appl Environ Microb 66:1899-1904.

[244]Uraguchi K, 1969. Mycotoxic origin of cardiac beriberi. J Stored Prod Res 5:227-236.

[245]van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ, 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh. Nature 205:1112-1113.

[246]Vanacloig-Pedros E, Proft M, Pascual-Ahuir A, 2016. Different Toxicity Mechanisms for Citrinin and Ochratoxin A Revealed by Transcriptomic Analysis in Yeast. Toxins 8: E273.

[247]Varzakas T, 2016. Quality and safety aspects of cereals (wheat) and their products. Crc Rev Food Sci 56:2495-2510.

[248]Vesela D, Vesely D and Jelinek R, 1983. Toxic effects of achratoxin A and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos. Appl Environ Microb 45:91-93.

[249]Vinas I, Dadon J and Sanchis V, 1993. Citrinin-producing capacity of Penicillium expansum strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). Int J Food Microbiol 19:153-156.

[250]Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Märtlbauer E, 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. J Agric Food Chem 48:2483-2488.

[251]Wang Y, Liu J, Cui J, Xing L, Wang J, Yan X, Zhang X, 2012. ERK and p38 MAPK signaling pathways are involved in ochratoxin A-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells. Toxicol Lett 209:186-192.

[252]Wang H, Chen Y, Zhai N, Chen X, Gan F, Li H, Huang K, 2017. Ochratoxin A-Induced apoptosis of IPEC-J2 cells through ROS-mediated mitochondrial permeability transition pore opening pathway. J Agr Food Chem 65:10630-10637.

[253]Wasternack C, Weisser J, 1992. Inhibition of RNA- and DNA-synthesis by citrinin and its effects on DNA precursor-metabolism in V79-E cells. Comp Biochem Phys C 101:225-230.

[254]Welke JE, 2019. Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. Current Opinion Food Sci 29:7-13.

[255]Weller MG, 2018. Ten Basic Rules of Antibody Validation. Anal Chem Insights 13:1177390118757462

[256]Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V, 2005. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. Mol Nutr Food Res 49:482-494.

[257]WHO, 1965. Memoranda: The Endemic Nephropathy of South-Eastern Europe. WHO 431-448.

[258]Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I, 2002. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. Environ Toxicol 17:211-218.

[259]Winter G, Pereg L, 2019. A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance. Eur J Soil Sci 70:882-897.

[260]Wolff NA, Werner A, Burkhardt S, Burckhardt G, 1997. Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. FEBS Lett 417:287-291.

[261]Woo CSJ, Partanen H, Myllynen P, Vähäkangas K, El-Nezami H, 2012. Fate of the teratogenic and carcinogenic ochratoxin A in human perfused placenta. Toxicol Lett 208:92-99.

[262]Wright SH, Dantzler WH, 2004. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. Physiol Rev 84:987-1049.

[263]Wu F, Mitchell NJ, 2016. How climate change and regulations can affect the economics of mycotoxins. World Mycotoxin J 9:653-663.

[264]Wu Q, Dohnal, V, Huang L, Kuca K, Wang X, Chen G, Yuan Z, 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. Curr Drug Metab 12:1-10.

[265]Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA, Kemppainen BW, 1996. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure–activity relationships. Toxicol Appl Pharm 137:182-192.

[266]Xu B, Jia X, Gu L, Sung C, 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. Food Control 17:271-285.

[267]Yang S, Zhang H, De Saeger S, De Boevre M, Sun F, Zhang S, Cao X, Wang Z, 2015. In vitro and in vivo metabolism of ochratoxin A: a comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 407:3579-3589.

[268]Yoneyama M, Sharma RP, 1987. Biochemical alterations induced by citrinin in cultured kidney epithelial cell systems. Arch Environ Con Tox 16:765-770.

[269]Youngblood GL, Sweet DH, 2004. Identification and functional assessment of the novel murine organic anion transporter Oat5 (Slc22a19) expressed in kidney. Am J Physiol-Renal 287:F236–F244.

[270]Zepnik H, Völkel W, Dekant W, 2003. Metabolism and toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F344 rats. Mycotoxin Res 19:102-107.

[271]Zha W, 2018. Transporter-mediated natural product–drug interactions for the treatment of cardiovascular diseases. J Food Drug Anal 26:S32-S44.

[272]Zhao T, Shen XLi, Chen W, Liao X , Yang J , Wang Y , Zou Y , Fang, 2017. Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of ochratoxin A. Toxin Rev 36:39-44.

[273]Zhang X, Groves CE, Bahn A, Barendt WM, Prado MD, Rodiger M, Chatsudthipong V, Burckhardt G, Wright SH, 2004. Relative contribution of OAT and OCT transporters to organic electrolyte transport in rabbit proximal tubule. Am J Physiol-Renal 287:F999-F1010.

[274]Zhang Z, Gan F, Xue H, Liu Y, Huang D, Khan AZ, Chen X, Huang K, 2016. Nephropathy and hepatopathy in weaned piglets provoked by natural ochratoxin A and involved mechanisms. Exp Toxicol Pathol 68:205-213.

[275]Zhu LY, Yu T, Qi XZ, Gao J, Huang KL, He XY, Luo HS, Xu WT, 2016. Limited link between oxidative stress and ochratoxin A-Induced renal injury in an acute toxicity rat model. Toxins 8:373.

[276]Zingerle M, Silbernagl S, Gekle M, 1997. Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. J Pharmacol Exp Ther 280:220-224.

[277]Zimmerli B, Dick R, 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. Food Addit Contam 13:655-668.

[278]Žlender V, Breljak D, Ljubojević M, Flajs D, Balen D, Brzica H, Domijan AM, Peraica M, Fuchs R, Anzai N, Sabolić I, 2009. Low doses of ochratoxin A upregulate the protein expression of organic anion transporters Oat1, Oat2, Oat3 and Oat5 in rat kidney cortex. Toxicol Appl Pharmacol 239:284-96.

Web izvori:

- http://imagej.nih.gov/ij/
    - ImageJ
- https://op.europa.eu/en/publication-detail
- https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/
- http://www.adobe.com
    - Adobe Photoshop 6.0
- https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins
- https://www.fao.org/common-pages/search/en/?q=mycotoxins
- https://www.fda.gov/food/chemicals-metals-pesticides-food/natural-toxins-and-mycotoxins
- https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins

8. POPIS KRATICA

αKG	**alfa-ketoglutarat**
Ab	*Antibody*; **protutijelo**
ANOVA	*Analysis of variance;* **analiza varijance**
APS	*Ammonium persulfate*; **amonij persulfat**
ABC	*Adenosine triphosphate-binding cassette*
BCIP	*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate;* **5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat**
BEN	**Balkanska endemska nefropatija**
BLM	**Bazolateralna membrana**
BMD	*Benchmark dose*; **granična doza**
BMDL	*Benchmark dose lower confidence limit*; **granična doza s nižom granicom pouzdanosti**
β-aktin	*Beta-actin***; beta-aktin**
BSA	*Bovine serum albumin*; **albumin goveđeg seruma**
DNA	*Deoxyribonucleic acid*; **deoksiribunukleinska kiselina**
cDNA	*Complementary deoxyribonucleic acid*; **komplementarna deoksiribunukleinska kiselina**
CIT	**Citrinin**
COX-2	*cyclooxygenase-2;* **ciklooksigenaza 2**
CY3	*Cyanine dye 3;* **boja cijanin 3**
ČM	**Četkasta membrana**
deH_2O	**Destilirana voda**
DK	**Distalni zavijeni kanalić**
DUKHP	**Debeli uzlazni krak Henleove petlje**
EFSA	*European Food Safety Authority*; **Europska agencija za sigurnost hrane**
ERK 1/2	*Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*

FAO	*Food and Agriculture Organization;* **Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda**
FDA	*Food and Drug Administration;* **Američka agencija za hranu i lijekove**
FEX	antihistaminik feksofenadin
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*; **fluorescein-izotiocijanat**
G	**Glomerul**
GAM-AP	*Goat anti mouse-alkaline phosphatase*; **kozje protutijelo protiv mišjeg imunoglobulina klase G obilježeno enzimom alkalna fosfataza**
GAM-FITC	*Goat anti mouse-fluorescein izotiocijanat*; **kozje protutijelo protiv protiv mišjeg imunoglobulina klase G obilježeno bojom fluorescein-izotiocijanat**
GAR-AP	*Goat anti rabbit-alkaline phosphatase*; **kozje protutijelo protiv kunićjeg imunoglobulina klase G obilježeno enzimom alkalna fosfataza**
GAR-CY3	*Goat anti rabbit-CY3*; **kozje protutijelo protiv kunićjeg imunoglobulina klase G obilježeno bojom cijanin 3 indolil fosfat**
GSH	*Glutathione*; **glutation**
GSSG	*Glutathione disulfide*; **glutation disulfid**
GST	*Glutathione S-transferase*; **glutation S-tranferaza**
HS-PBS	*High salt-phosphate buffered saline;* **fosfatni pufer zasićen s NaCl**
IARC	*International Agency for Research on Cancer;* **Međunarodna agencija za istraživanje raka**
IgG	*Immunoglobulin G*; **Imunoglobulin klase G**
i.p.	**Intraperitonealno**
IL	**Interleukin**
IUPAC	*International Union for Pure and Applied Chemistry*; **Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju**
JNK	*c-Jun*-NH_2 terminal kinase; **c-Jun N-terminalna kinaza**
kDa	**Kilodalton**

LD_{50}	*Lethal dose 50%* **doza koja uzrokuje smrt 50% jedinki**
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases;* **mitogenom aktivirane protein kinaze**
MDA	**Malondialdehid**
MFS	*Major Facilitator Superfamily*; **superobitelj membranskih prijenosnih proteina**
MOE	*Margin of exposure;* **granica izlaganja**
MRP2	*Multidrug resistance-associated protein 2*; **protein višestruke rezistencije na lijekove 2**
Mr	*Relative molecular mass;* **relativna molekularna masa**
mRNA	*Messenger ribonucleic acid*; **glasnička ribonukleinska kiselina**
MWM	*Molecular weight marker*; **proteinski biljeg molekularne mase**
N.S.	*Not significant;* **bez statističke značajnosti**
Na/K-ATPasa	*Sodium-potassium* adenosine *triphosphatase*; **Na/K-adenozin trifosfataza**
NaDC3	*Sodium-coupled high-affinity dicarboxylate transporter;* **XY**
NBT	*Nitro blue tetrazolium chloride*; **nitro plavi tetrazolium klorid**
NOAEL	*No-observed-adverse-effect-level;* **razina bez uočenog štetnog učinka**
NLT	*Novel liver-specific transporter*
NPT4	*Sodium-dependent phosphate transport protein 4;* **prijenosnik natrija i fosfata 4**
Nrf-2	*Nuclear factor erythroid 2-related factor*
OA	*Organic anion*; **organski anioni**
Oat/OAT	*Organic anion transporter;* **prijenosnik organskih aniona; Oat u životinja/OAT u čovjeka**
OD	*Optical density*; **optička gustoća**
OK	**organski kationi**
OTA	**Okratoksin A**
PAH	**Para-aminohipurat**
PBS	*Phosphate buffered saline*; **fosfatni pufer**

PK	**Proksimalni kanalić**
PMSF	*Phenylmethylsulfonyl fluoride*; **fenil-metil-sulfonil fluorid**
PVDF	*Polyvinylidene fluoride*; **poliviniliden fluorid**
RASFF	*Rapid Alert System for Food and Feed;* **Europski sustav brzog uzbunjivanja za sigurnost hrane i hrane za životinja**
RNA	*Ribonucleic acid;* **ribonukleinska kiselina**
RMR	*Red mould rice;* **kolorant hrane proizveden fermentacijom riže pomoću gljivice *Monascus***
RSV	**Resveratrol**
S (1, 2, 3)	*Segment;* **odsječak proksimalnih kanalića**
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*; **natrij dodecil sulfat**
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl dulfate-polyacrylamid gel elektorophoresis*; **natrij dodecil sulfat elektroforeza u gelu poliakrilamida**
SK	**Sabirni kanalić**
Slc22/SLC22	*Solute carrier family 22*; **obitelj membranskih prijenosnika otopljenih tvari (Slc u životinja/SLC u čovjeka)**
SOD	**superoksid dismutaza**
TAE	*Tris-acetate-EDTA*; **tris-acetat-etilendiamin tetraoctena kiselina**
TEA	**Tetraetilamonij**
USM	*Total cell membrane;* **ukupne stanične membrane**
TEMED	*Tetramethylethylenediamine*; **tetra-metil-etilen-diamin**
TNFα	*Tumour necrosis factor alpha*; **faktor nekroze tumora-αlfa**
tj.m.	**Tjelesna masa**
TMD	**Transmembranska domena**
WHO	*World Health Organization;* **Svjetska zdravstvena organizacija**

9. ŽIVOTOPIS

Vedran Micek rođen je 5. ožujka 1978. godine u Zagrebu. Po završetku srednješkolskog obrazovanja upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2005. godine te je od 2006. godine zaposlen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu u Jedinici za laboratorijske životinje. Godine 2013. upisao je doktorski sveučilišni studij „Medicinska kemija“ pri Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. Od 2020. godine uključen je u provedbu edukacije o zdravstvenoj ispravnosti hrane i osobnoj higijeni Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu. Autor je i koautor 40 znanstvenih radova indeksiranih u bibliografskoj bazi podataka *Web of science/Scopus* i više od 70 kongresnih priopćenja. Govori i piše engleski jezik. Član je Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.

Znanstveni i pregledni radovi

Barbir R, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Milić M, Vuković B, Milić M, Ljubojević M, Domazet Jurašin D, Vinković Vrček I, 2019. Protein Corona Modulates Distribution and Toxicological Effects of Silver Nanoparticles In Vivo. // Particle & particle systems characterization, 37, 1900174, 12

Bogović A, Nižetić J, Galić N, Želježić D, Micek V, Mladinić M, 2011. The Effects of Hyaluronic Acid, Calcium Hydroxide, and Dentin Adhesive on Rat Odontoblasts and Fibroblasts. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 62, 2; 155-161

Breljak D, Brzica H, Vrhovac I, Micek V, Karaica D, Ljubojević M, Sekovanić A, Jurasović J, Rašić D, Peraica M, Lovrić M, Schnedler N, Henjakovic M, Wegner W, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolić I, 2015. In female rats, ethylene glycol treatment elevates protein expression of hepatic and renal oxalate transporter sat-(Slc26a1) without inducing hyperoxaluria. // Croatian medical journal, 56, 447-459

Breljak D, Ljubojević M, Balen D, Žlender V, Brzica H, Micek V, Kušan M, Anzai N, Sabolić I, 2010. Renal expression of organic anion transporter Oat5 in rats and mice

exhibits the female-dominant sex differences. // Histology and histopathology, 25, 11; 1385-1402.

Breljak D, Ljubojević M, Hagos Y, Micek V, Balen Eror D, Vrhovac Madunić I, Brzica H, Karaica D, Radovic N, Kraus O, Anzai N, Koepsell H, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolić I, .2016. Distribution of the organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. // American journal of physiology. Renal physiology, 311, 1; F227-F238

Breljak D, Micek V, Gerić M, Gajski G, Kralik Oguić S, Rašić D Karaica D, Vrhovac Madunić I, Ljubojević M Orct T et al. 2022. Long-term effects of melatonin and resveratrol on aging rats: A multi-biomarker approach // Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis, 876–877, 1-11

Breljak D, Micek V, Gerić M, Gajski G, Kralik Oguić S, Rašić D, Karaica D, Vrhovac Madunić I, Ljubojević M, Orct T, 2022. Long-term effects of melatonin and resveratrol on aging rats: A multi-biomarker approach. // Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis, 876–877 (), 1-11

Brzica H, Breljak D, Ljubojević M, Balen D, Micek V, Anzai N, Sabolić I, 2009. Optimal methods of antigen retrieval for organic anion transporters in cryosections of the rat kidney. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 60, 1; 7-18

Ćurlin M, Barbir R, Dabelić S, Ljubojević M, Goessler W, Micek V, Žuntar I, Pavić M, Božičević L, Pavičić I, Vinković Vrček I, 2021. Sex affects the response of Wistar rats to polyvinyl pyrrolidone (PVP)-coated silver nanoparticles in an oral 28 days repeated dose toxicity study. // Particle and Fibre Toxicology, 18, 38, 16

Debeljak Ž, Vinković Vrček I, Drinković N, Micek V, Galić E, Gorup D, Ćurlin M, Mandić D, Bandjak A, Pem B, Kalčec N, Ilić K, et al. 2022, Imaging mass spectrometry differentiates the effects of doxorubicin formulations on non-targeted tissues // Analyst, 147, 3201-3208

Fuchs N, Miljanić A, Katić A, Brajenović N, Micek V, Fuchs R, Brčić Karačonji I, 2019. Optimisation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of tetrahydrocannabinol and its metabolites in rat urine. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 70, 4; 325-331

Herak-Kramberger CM, Breljak D, Ljubojević M, Matokanović M, Lovrić M, Rogić D, Brzica H, Vrhovac I, Karaica D, Micek V, Ivković Dupor J, Brown D, Sabolić I, 2015. Sex-dependent expression of water channel AQP1 along the rat nephron. // American journal of physiology. Renal physiology, 308 8; F809-F821

Jakšić D, Ćurtović I, Kifer D, Rašić D, Kopjar N, Micek V, Peraica M, Šegvić Klarić M, 2020. Single-dose toxicity of individual and combined sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocistin in rat lungs. // Toxins, 12, 734, 11

Karaica D, Breljak D, Lončar J, Lovrić M, Micek V, Vrhovac Madunić I, Brzica H, Herak-Kramberger CM, Ivković Dupor J, Ljubojević M, Smital T ; Vogrinc Ž, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolić I, 2018. Sex-independent expression of chloride/formate exchanger Cfex (Slc26a6) in rat pancreas, small intestine, and liver, and male-dominant expression in kidneys. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 69, 4; 286-303

Karaica D, Micek V, Rašić D, Peraica M, Šegvić Klarić M, Breljak D, 2020. Subchronic exposure to individual and combined ochratoxin A and citrinin affects the expression of rat renal organic anion transporters. // Mycotoxin research, 3, 1-14

Karaica D, Micek V, Rašić D, Peraica M, Šegvić Klarić M, Breljak D, 2022. Subchronic exposure of individual and combined ochratoxin A and citrinin selectively affects the expression of rat renal organic cation transporters. // Mycotoxin research, 38, 1;339-352

Kašuba V, Micek V, Pizent A, Tariba Lovaković B, Želježić D, Milić M, Kopjar N, 2020. DNA damage in kidney and parenchymal and non-parenchymal liver cells of adult Wistar rats after subchronic oral treatment with tembotrione. // Environmental science and pollution research, 27, 1800-1807

Katić A, Kasuba V, Kopjar N, Lovaković Tariba B, Marjanović Čermak AM, Mendaš G, Micek V, Milić M, Pavičić I, Pizent A, Žunec S, Želježić D, 2021. Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. // Chemico-biological interactions, 338, 109287, 55

Klarić TS, Salopek M, Micek V, Gornik Kljaić O, Lauc G, 2020. Post-natal developmental changes in the composition of the rat neocortical N-glycome. // Glycobiology, 31, 5; 636-648

Kopjar N, Fuchs N, Žunec S, Mikolić A, Micek V, Kozina G, Lucić Vrdoljak A, Brčić Karačonji I, 2019. DNA damaging effects, oxidative stress responses and cholinesterase activity in blood and brain of Wistar rats exposed to Δ9-tetrahydrocannabinol. // Molecules, 24, 8; 1560, 18

Kopjar N, Žunec S, Mendaš Starčević G, Micek V, Kašuba V, Mikolić A, Tariba Lovaković B, Milić M, Pavičić I, Marjanović Čermak AM, Pizent A, Lucić Vrdoljak A, Želježić D, 2018. Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. // Chemico-biological interactions, 279, 51-63

Kraljević Pavelić S, Klobučar M, Sedić M, Micek V, Gehrig P, Grossman J, Pavelić K, Vojniković B, 2015. UV-induced retinal proteome changes in the rat model of age-related macular degeneration. // Biochimica et biophysica acta-molecular basis of disease,1852,9;1833-1845

Kraljević Pavelić S, Micek V, Bobinac D, Bazdulj E, Gianoncelli A, Krpan D, Žuvić M, Eisenwagen S, Stambrook PJ, Pavelić K, 2020. Treatment of osteoporosis with a modified zeolite shows beneficial effects in an osteoporotic rat model and a human clinical trial. // Experimental biology and medicine, 246, 529-537

Kraljević Pavelić S, Micek V, Filošević A, Gumbarević D, Žurga P, Bulog A, Orct T, Yamamoto Y, Preočanin T, Plavec J, Peter R, Petravić M, Vikić-Topić D, Pavelić K, 2017. Novel, oxygenated clinoptilolite material efficiently removes aluminium

from aluminium chloride-intoxicated rats in vivo. // Microporous and mesoporous materials, 249, 146-156

Ljubojević M, Orct T, Micek V, Karaica D, Jurasović J, Breljak D, Vrhovac Madunić I, Rašić D, Novak Jovanović I, Peraica M, Gerić M, Gajski G, Kralik Oguić S, Rogić D, Nanić L, Rubelj I, Sabolić I, 2019. Sex-dependent expression of metallothioneins MT1 and MT2 and concentrations of trace elements in rat liver and kidney tissues: effect of gonadectomy. // Journal of trace elements in medicine and biology, 53, 98-108

Lucić Vrdoljak A, Fuchs N, Mikolić A, Žunec S, Brčić Karačonji I, Jurič A, Prester Lj, Micek V, Neuberg M, Čanović S, Mršić G, Kopjar N, 2018. Irinotecan and Δ9-tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: A preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. // Molecules, 23, 6; 1332, 25

Mašek T, Barišić J, Micek V, Starčević K, 2020. Cafeteria diet and high-fructose rodent models of NAFLD differ in the metabolism of important PUFA and palmitoleic acid without additional influence of sex. // Nutrients, 12, 11; 3339, 12

Mataušić Pišl M, Tomičić M, Micek V, Grdiša M, 2011. Influence of earthworm extract G-90 on the haemostasis in Wistar rats. // European review for medical and pharmacological sciences, 15, 1; 71-78

Milić M, Žunec S, Micek V, Kašuba V, Mikolić A, Tariba Lovaković B, Živković Semren T, Pavičić I, Marjanović Čermak AM, Pizent A, Lucić Vrdoljak A, Valencia-Quintana R, Sánchez-Alarcón J, Želježić D, 2018. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 69, 2; 154-168

Mužinić V, Katić A, Kašuba V, Micek V, Milić M, Želježić D, 2021. Assessment of transplacental and lactational genotoxicity of tembotrione in Wistar rats at different developmental stages by alkaline comet assay. // Toxicology, 463, 152983, 23

Orct T, Jurasović J, Micek V, Karaica D, Sabolić I, 2017. Macro- and microelements in the rat liver, kidneys, and brain tissues ; sex differences and effect of blood removal by perfusion in vivo. // Journal of trace elements in medicine and biology, 40, 104-111

Pavić Vulinović M, Turčić P, Micek V, Ljubojević M, 2022. Ferritin light and heavy chain expression in the liver and kidneys of Wistar rats: aging, sex differences, and impact of gonadectomy. // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 73, 48-61

Pem B, Ćurlin M, Domazet Jurašin D, Vrček V, Barbir R, Micek V, Fratila RM, de la Fuente JM, Vinković Vrček I, 2021. Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. // Beilstein journal of nanotechnology, 12, 665-679

Rašić D, Micek V, Šegvić Klarić M, Peraica M, 2019. Oxidative stress as a mechanism of combined OTA and CTN toxicity in rat plasma, liver and kidney. // Human & experimental toxicology, 38, 4; 434-445

Starčević K, Filipović N, Galan A, Micek V, Gudan Kurilj A, Mašek T, 2018. Hepatic lipogenesis and brain fatty acid profile in response to different dietary n6/n3 ratios and DHA/EPA supplementation in streptozotocin treated rats. // Molecular Nutrition and Food Research, 62, 9; 1701007, 9

Tariba Lovaković B, Barbir R, Pem B, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Debeljak Ž, Božičević L, Ilić K, Pavičić I, Gorup D, Vinković Vrček I, 2021. Sex-related response in mice after sub-acute intraperitoneal exposure to silver nanoparticles. // NanoImpact, 23, 100340, 13

Tariba Lovaković B, Kašuba V, Katić A, Kopjar N, Marjanović Čermak AM, Micek V, Milić M, Pavičić I, Pizent A, Žunec S, Želježić D, 2020. Evaluation of oxidative stress responses and primary DNA damage in blood and brain of rats exposed to low levels of tembotrione. // Chemosphere, 253, 126643, 10

Tariba Lovaković B, Pizent A, Kašuba V, Kopjar N, Micek V, Mendaš G, Dvoršćak M, Mikolić A, Milić M, Žunec S, Lucić Vrdoljak A, Želježić D, 2017. Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent

compound/metabolite levels in adult male rats. // Food and chemical toxicology, 108, Part A; 93-103

Zorbaz T, Mišetić P, Probst N, Žunec S, Zandona A, Mendaš G, Micek V, Maček Hrvat N, Katalinić M, Braïki A, Jean L, Renard PY, Gabelica Marković V, Kovarik Z, 2020. Pharmacokinetic evaluation of brain penetrating morpholine-3-hydroxy-2-pyridine oxime as an antidote for nerve agent poisoning. // ACS Chemical Neuroscience,11,7;1072-1084

Zorić L, Drinković N, Micek V, Frkanec L, Türeli AE, Günday-Türeli N, Vinković Vrček I, Frkanec R, 2022. High-Throughput Method for the Simultaneous Determination of Doxorubicin Metabolites in Rat Urine after Treatment with Different Drug Nanoformulations. // Molecules, 27, 4; 1177, 14

Znanstveni radovi u zbornicima skupova

Sabolić I, Ljubojević M, Breljak D, Balen D, Brzica H, Micek V, Radović N, Kraus O, 2009. Sex-related expression of renal organic anion and cation transporters in different species. // Proceedings of the International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology ; Fundamentals of Medicine / Mihelić, Damir ; Šimpraga, Miljenko ; Tkalčić, Suzana (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, Zagreb, 2009. str. 33-40.

Starčević K, Micek V, Filipović N, Galan A, Šperanda M, Đidara M, Mašek T, 2017. Changes in ∆-desaturation and fatty acid composition in rats chronically treated with the sucrose in the drinking water. // Bulgarian journal of veterinary science // Stara Zagora, str. 190-193

Drugi radovi u zbornicima skupova

Sabolić I, Breljak D, Ljubojević M, Vrhovac I, Herak-Kramberger CM, Balen D, Brzica H, Micek V, Radović N Kraus O, 2012. Prijenosnici organskih tvari u bubrezima sisavaca : razlike među spolovima i vrstama. // Simpozij Nefrologija danas - 2012 "Da li su muški i ženski bubrezi isti?", zbornik / Čala, Svjetlana (ur.).

Zagreb: Hrvatski liječnički zbor ; Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, 2012. str. 1.1-1.13.

Poglavlja u knjigama

Kašuba V, Micek V, Pizent A, Tariba Lovaković B, Želježić D, Kopjar N, Milić M, 2021. DNA Damage and Glutathione Peroxidase Activity in Liver and Kidney Cells in Wistar Rats Exposed to Terbuthylazine (TERB) for 28 Consecutive Days. // Rodents / Mulungu, Loth S. (ur.). Rijeka: IntechOpen, 2021. str. 51-66

10. PRILOZI

Popis tablica

Tablica 1. Primarna protutijela (Ab).

Tablica 2. Sekundarna protutijela.

Tablica 3. Smjesa za pripremu poliakrilamidnih gelova.

Popis slika

Slika 1. Kemijska struktura okratoksina A.

Slika 2. Kemijska struktura citrinina.

Slika 3. Kemijska struktura resveratrola.

Slika 4. Shematski prikaz poprečnog presjeka bubrega.

Slika 5. Shematski prikaz sekundarne strukture proteina SLC obitelji.

Slika 6. Shematski prikaz aktivnog prijenosa organskih aniona u bubrezima.

Slika 7. Ispitivanje protutijela za detekciju proteina rOat u bubrezima štakora.

Slika 8. Ispitivanje protutijela za detekciju *housekeeping* proteina u bubrezima štakora.

Slika 9. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora.

Slika 10. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora.

Slika 11. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora.

Slika 12. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora.

Slika 13. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora.

Slika 14. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora.

Slika 15. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora.

Slika 16. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora**.**

Slika 17. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora.

Slika 18. Učinak okratoksina A na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora.

Slika 19. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora.

Slika 20. Učinak citrinina na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora.

Slika 21. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora.

Slika 22. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora.

Slika 23. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora.

Slika 24. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora.

Slika 25. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora.

Slika 26. Združeni učinci okratoksina A i citrinina na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora.

Slika 27. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rNa/K-ATPaze u bubrezima štakora.

Slika 28. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rβ-aktina u bubrezima štakora.

Slika 29. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat1 u bubrezima štakora.

Slika 30. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat3 u bubrezima štakora.

Slika 31. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat2 u bubrezima štakora.

Slika 32. Združeni učinci okratoksina A, citrinina i resveratrola na ekspresiju proteina rOat5 u bubrezima štakora.