Učinak oksidacijskog stresa u mehanizmu toksičnosti okratoksina A i citrinina

Rašić, Dubravka

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:170687

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Dubravka Rašić

UČINAK OKSIDACIJSKOG STRESA U MEHANIZMU TOKSIČNOSTI OKRATOKSINA A I CITRININA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013

Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Dubravka Rašić

THE SIGNIFICANCE OF OXIDATIVE STRESS IN THE MECHANISM OF TOXICITY OF OCHRATOXIN A AND CITRININ

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Dubravka Rašić

UČINAK OKSIDACIJSKOG STRESA U MEHANIZMU TOKSIČNOSTI OKRATOKSINA A I CITRININA

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Dr. sc. Maja Peraica, dr. med., znanstvena savjetnica

Zagreb, 2013

Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Dubravka Rašić

THE SIGNIFICANCE OF OXIDATIVE STRESS IN THE MECHANISM OF TOXICITY OF OCHRATOXIN A AND CITRININ

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Maja Peraica, PhD, MD, Scientific advisor

Zagreb, 2013

Ovaj rad izrađen je u Jedinici za toksikologiju, Jedinici za mutagenezu i Jedinici za analitičku kemiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, a u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske br. 022-0222148-2142 pod vodstvom znanstvene savjetnice dr. sc. Maje Peraica, dr. med.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva.

Izradu ovog doktorskog rada omogućili su dragi ljudi svojim znanjem i stručnošću.

Hvala...

Voditeljici projekta i mojoj dragoj mentorici dr. sc. Maji Peraica, voditeljici Jedinice za toksikologiju na svakodnevnim dobronamjernim savjetima, usmjeravanju i kreativnim znanstvenim i neznanstvenim raspravama.

Svim bivšim i sadašnjim suradnicima Jedinice za toksikologiju na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći, a posebno gospođi Jasni Mileković, višoj tehničkoj suradnici, koja je svoje slobodne vikende odvajala kako bi pokusi na životinjama bili besprijekorno obavljeni.

Dr. sc. Alici Pizent, dr. sc. Marinu Mladiniću i dr. sc. Davoru Želježiću koji su svojim znanjem i vještinama pridonijeli eksperimentalnom izvođenju dijela ovog doktorskog rada te na sugestijama tijekom pisanja rada.

Srdjanu Stefanoviću, dr. vet. med. s Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu na otkrivanju tajni UPLC-MS/MS-a i ekspresnoj analizi uzoraka.

Mojim dragim bivšim i sadašnjim kolegama s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada koji oko sebe šire pozitivnu energiju i više nego dobrodošlu u pojedinim trenucima.

Svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog doktorskog rada.

Mojoj obitelji na podršci.

Posebno hvala mojem dragom suprugu Nikoli koji je svojim računalnim vještinama i pedantnošću pridonio da ovaj doktorski rad poprimi konačan oblik te na beskrajnoj ljubavi i toleranciji.

Sadržaj

1 UVOD ... 3
1.1 Okratoksin A ... 5
1.1.1 Kemijska svojstva ... 5
1.1.2 Biosinteza ... 6
1.1.3 Metabolizam i mehanizam djelovanja OTA ... 7
1.1.4 Toksični učinci ... 9
1.1.5 Izloženost ljudi ... 11
1.2 Citrinin ... 14
1.2.1 Kemijska svojstva ... 14
1.2.2 Povijest ... 14
1.2.3 Pigmenti roda Monascus ... 15
1.2.4 Toksikokinetika ... 15
1.2.5 Toksični učinci ... 16
1.2.6 Izloženost ljudi ... 18
1.3 Zajedničko djelovanje OTA i CTN i vrste koje proizvode oba mikotoksina ... 20
1.3.1 Zajedničko pojavljivanje okratoksina A i citrinina u hrani ... 20
1.4 Oksidacijski stres ... 24
1.4.1 Malondialdehid ... 24
1.4.2 Glutation ... 25
1.4.3 Superoksid dismutaza ... 26
1.4.4 Katalaza ... 26
1.4.5 Glutation peroksidaza ... 27
1.5 Antioksidansi ... 27
1.5.1 Resveratrol ... 28
2 OBRAZLOŽENJE TEME ... 33
3 MATERIJALI I METODE ... 34
3.1 Kemikalije ... 34
3.2 Instrumenti ... 35
3.3 Puferi i otopine ... 36
3.3.1 Otopine mikotoksina i resveratrola za tretman pokusnih životinja ... 37
3.4 Životinje ... 38
3.4.1 Tretman životinja ... 38

3.4.2 Metode ... 40
4 STATISTIČKA OBRADA ... 50
5 REZULTATI ... 51
5.1 Opće stanje životinja ... 51
5.2 Mjerenje koncentracije mikotoksina ... 57
5.2.1 OTA u urinu, bubregu i jetri u preliminarnom pokusu ... 57
5.2.2 Mjerenje koncentracije OTA i CTN-a u buregu, jetri i mozgu ... 58
5.3 Oksidacijsko oštećenje ... 62
5.3.1 Malondialdehid ... 62
5.3.2 Glutation ... 67
5.3.3 Superoksid dismutaza ... 71
5.3.4 Katalaza ... 74
5.3.5 Glutation peroksidaza ... 76
5.3.6 hOGG1 ... 77
6 RASPRAVA ... 83
7 ZAKLJUČCI ... 93
8 POPIS KORIŠTENIH KRATICA ... 95
9 LITERATURA ... 96
10 SAŽETAK ... 114
11 SUMMARY ... 116
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA ... 118
BASIC DOCUMENTARY CARD ... 119
ŽIVOTOPIS ... 120

1 UVOD

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koje nalazimo u hrani biljnog i životinjskog porijekla. Hrana i krmivo obično je istovremeno kontaminirana s različitim plijesnima koje proizvode različite mikotoksine. Mikotoksini i njihovi metaboliti mogu se naći u hrani životinjskog porijekla (meso, mlijeko, jaja, sir) ako su životinje izložene kontaminiranom krmivu (Peraica i sur., 2002).

Bolesti uzrokovane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze. U povijesti su mikotoksini uzrokovali velike epidemije ljudi i životinja zbog kojih je uginulo više desetaka tisuća životinja i umrlo više stotina tisuća ljudi (Peraica i Rašić, 2012).

Mikotoksini su molekule različitih struktura – od jednostrukih heterocikličkih prstenova molekulske mase od jedva 50 Da do nepravilno uređenih struktura koje se sastoje od šest ili osam povezanih prstenova molekulske mase veće od 500 Da. Budući da takve malene molekule ne potiču odgovor imunološkog sustava jer ih on ne raspoznaje kao strane molekule, one se distribuiraju u organima sisavaca uzrokujući toksične učinke (Pitt, 2000). Simptomi mikotoksikoza su različiti – od preosjetljivosti kože, oštećenja bubrega, jetre i drugih organa do imunodeficijencije ili indukcije tumora.

Najveći broj vrsta plijesni koji proizvode mikotoksine, a povezani su s proizvodnjom hrane dolaze iz tri roda: *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Neke vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* su patogeni ili komensali na biljkama, no češće su te vrste povezane s onečišćenjem hrane tijekom sušenja i skladištenja. Proizvodnja mikotoksina ovisi o genskom potencijalu plijesni, temperaturi i vlažnosti okoliša. Ne zna se koja je uloga mikotoksina u rastu i razvoju plijesni (Pitt, 2000).

Okratoksini su skupina strukturno sličnih mikotoksina koji su metaboliti plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium.* U tropskim i suptropskim područjima okratoksin A (OTA) uglavnom proizvode plijesni roda *Aspergillus,* a u umjerenim područjima to su uglavnom plijesni roda *Penicillium* (Krogh, 1987). OTA je glavni i najčešći predstavnik okratoksina koji jedini ima

značajno karcinogeno djelovanje (Wang i Groopman, 1999). Otkriven je 1965. godine kao toksični metabolit plijesni *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe i sur., 1965).

U Danskoj je 1928. godine otkrivena povezanost između nefropatije svinja i njihove prehrane pljesnivom hranom (Krogh, 1972). Slična bolest pojavljuje se endemski i kod ljudi na području nekih država na Balkanskom poluotoku te je zbog toga nazvana endemskom nefropatijom (EN). To je kronična obostrana bolest bubrega otkrivena pedesetih godina dvadesetog stoljeća u seoskim dijelovima Bosne i Hercegovine, Bugarske, Hrvatske, Kosova, Rumunjske i Srbije. Obilježja EN-a su da je to neupalna intersticijska bolest s neprimjetnim početkom koja polako napreduje do zatajenja bubrega. Nekad se javljala u mlađoj životnoj dobi, a danas kod starijih osoba koje zbog napretka medicine obično dožive normalni životni vijek (Miletić Medved i sur., 2005). U području EN-a javljaju se češće tumori urotela pa se smatra da je uzrok tih tumora isti kao i EN-a.

S obzirom na sličnosti endemske nefropatije i mikotoksinske nefropatije koja zahvaća svinje i perad te na prisutnost OTA u hrani životinja koje su oboljele od nefropatije i u hrani ljudi u endemskom kraju, Krogh je pretpostavio da je uzročnik tih bolesti isti (Krogh, 1974). Tijekom proljeća 1980. godine Hult i suradnici su u krvi stanovnika endemskih sela na području zapadne brodske Posavine prvi puta izmjerili OTA (Hult i sur., 1982). U brojnim istraživanjima prije i nakon toga OTA je utvrđen u mnogobrojnim uzorcima hrane i krvi iz toga područja i to u značajno višim koncentracijama nego u hrani i krvi stanovnika područja u kojima nema endemske nefropatije, no nikada nije dokazano da je bolest uzrokovana tim mikotoksinom (Pavlović i sur., 1979). Na pokusnim je životinjama dokazano da OTA ima nefrotoksično, hepatotoksično, hematotoksično, imunosupresivno i teratogeno djelovanje (Marquardt i Frolich, 1992; Castegnaro i sur., 1998; Obrecht-Pflumio i Dirheimer, 2000; Obrecht-Pflumio i Dirheimer, 2001), a Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer - IARC) ga je svrstala u skupinu 2B - mogući karcinogen za ljude (IARC, 1983).

Citrinin (CTN) je mikotoksin kojeg proizvode plijesni iz rodova *Aspergillus, Penicillium* i *Monascus.* Izolirali su ga Hetherington i Raistrick 1931. godine kao sekundarni metabolit vrste *Penicilium citrininum* (Hetherington i Raistrick, 1931). Iako je davno otkriven, nije mu pridavana velika pažnja do nedavno kada je postao zanimljiv zbog pretpostavke da bi

zajedno s OTA mogao uzrokovati EN (Stoev i sur., 1998a, Stoev i sur., 1998b, Stoev, 2008). Neke vrste plijesni koje proizvode CTN mogu proizvoditi OTA i patulin. CTN najčešće kontaminira žitarice nakon žetve i tijekom skladištenja, no nalazi se i na drugim proizvodima biljnog porijekla kao što su grah, voće, voćni i povrtni sokovi, aromatično bilje i začini te na pokvarenim mliječnim proizvodima (Fink-Gremmels, 1991). CTN kontaminira i crvenu rižu koja se boji pigmentom monascidinom koji nastaje iz plijesni *Monascus* (Blanc i sur., 1995a; Blanc i sur., 1995b).

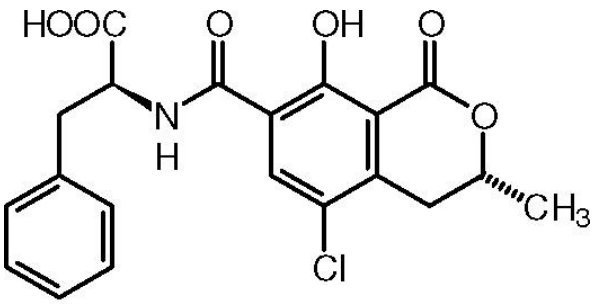
Ciljni organ djelovanja CTN-a je bubreg, a u manjoj mjeri oštećuje jetru i koštanu srž (Gupta i sur., 1983). CTN ima antibiotski učinak za Gram-pozitivne bakterije, no zbog nefrotoksičnosti nikada nije korišten kao antibiotik (Raistrick i Smith, 1941). Međunarodna agencija za istraživanje raka svrstala je citrinin u skupinu 3 – nije dokazano karcinogen za ljude (IARC, 1983).

Hesseltine je 1986. godine poredao mikotoksine po važnosti te je okratoksin A smjestio na sam vrh, a citrinin na dno ljestvice (Hesseltine, 1986).

1.1 Okratoksin A

1.1.1 Kemijska svojstva

Prema IUPAC-u naziv OTA je L-fenilalanin-N-((5-kloro-3,4-dihidro-8hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-7-il)karbonil)-(R)-izokumarin (slika 1-1). 7-karboksi-5-klor 3,4-dihidro-3R-metil izokumarin amidno je vezan s L-fenilalaninom preko karboksilne skupine na položaju 7 kumarinske jezgre. Empirijska formula mu je $C_{20}H_{18}O_6NCl$, a molekulska masa 403,82. Bezbojna je kristalinična tvar dobro topljiva u polarnim organskim otapalima, slabo topiva u vodi, a topiva u vodenoj otopini natrijevog hidrogenkarbonata. OTA ima maksimum apsorpcije kod 333 nm, a emisije kod 467 nm (u 96%-tnom etanolu), a pod UV svjetlom (366 nm) flourescira plavo (Kuiper-Goodman i Scott., 1989; Ringot i sur., 2005).



Slika 1-1 Kemijska struktura okratoksina A

OTA je slaba kiselina kojoj je pKa vrijednost u rasponu od 4,2 do 4,4 za karboksilnu skupinu fenilalaninskog dijela molekule i od 7,0 do 7,3 za fenolnu hidroksilnu skupinu izokumarinskog dijela. Kiseli dijelovi molekule imaju ključnu ulogu u apsorpciji OTA. U uvjetima fiziološke pH vrijednosti u tankom crijevu OTA je prisutan u obliku monoaniona (OTA^-) i diaoniona (OTA^{2-}), a u potpuno protoniranom obliku nalazi se uglavnom u gornjim dijelovima gastrointestinalnog trakta gdje je pH nizak (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007; Ringot i sur., 2005). OTA ima atom klora na mjestu C5 dihidro-metil-izokumarinskog prstena te on zajedno s fenolnom –OH skupinom povećava toksičnost. Amidna je veza između fenilalaninskog i dihidroizokumarinskog dijela vrlo stabilna te se ova molekula ne raspada na visokoj temperaturi niti hidrolizira (Petzinger i Ziegler, 2000). Razgrađuje ga UV zračenje.

1.1.2 Biosinteza

Proizvodnja OTA ovisi o genskim svojstvima i fiziologiji plijesni na koju utječu različiti čimbenici kao što su temperatura, aktivnost vode i sastav hranidbene podloge. U hladnim i umjerenim područjima *Penicillium verrucosum* obično kontaminira žitarice, a *P. nordicum* obično kontaminira meso tijekom sušenja i sir (Dwivedi i Burns, 1986; Fink-Gremmels i sur., 1995; Föllmann i sur., 1995; Gareis i sur., 1988). U tropskim i suptropskim predjelima OTA obično proizvodi vrsta *Aspergillus ochraceus* i to na orasima, kikirikiju, grahu, začinima, zelenoj kavi, sušenom voću, ali i na mesu i dimljenoj i usoljenoj ribi (Kozakiewicz, 1989; Pardo i sur., 2005; WHO/FAO, 2001). Osim ove vrste roda *Aspergillus*, OTA proizvode i vrste *A. niger* var *niger* (žitarice i uljarice) i *A. carbonarius* (grožđe, grožđice i kava) (Abarca i sur.,

1994; Belli i sur., 2004). Neke druge vrste iz roda *Aspergillus* (*A. lacticoffeatus, A. sclerotioniger* i *A. alliaceus*) te vrsta *Petromyces alliaceus* mogu proizvoditi OTA u laboratorijskim uvjetima (Samson i sur., 2004; Lillehoj i sur., 1978; Moss, 1996; Bayman i sur., 2002; Varga i sur., 2003).

1.1.3 Metabolizam i mehanizam djelovanja OTA

Kod većine životinja OTA se pasivno apsorbira u neioniziranom obliku (OTA^0) ili obliku monoaniona (OTA^-) u želucu i u proksimalnom jejunumu (Ringot i sur., 2000). Metabolizam OTA do sada nije detaljno razjašnjen, no budući da se akumulira u bubrezima, pretpostavlja se da je njegov mehanizam složeniji nego što je trenutno poznato (EFSA, 2006). Toksikokinetički čimbenici znatno utječu na toksičnost OTA. Nakon apsorpcije u probavnom sustavu OTA se veže za proteine plazme, a stupanj vezanja različit je u različitim životinjskim vrstama. Jačina vezanja OTA za proteine plazme određuje vrijeme njegovog zadržavanja u organizmu. Toksikokinetika OTA proučavana je u pokusima na šaranima, prepelicama, miševima, štakorima, svinjama i majmunima. Životinje su tretirane peroralno (po) ili intravenozno (iv) s OTA (50 ng kg^{-1} tm) te im je uzimana krv u različitim vremenskim razmacima (Hagelberg i sur., 1989). Vrijeme polovične eliminacije (t ½) OTA iz plazme bilo je dulje kod svih životinja u pokusu nakon iv aplikacije nego nakon po aplikacije jer se nakon po aplikacije OTA djelomično eliminira putem jetre prije dolaska u krvotok. Najduži t ½ eliminacije OTA bilo je kod majmuna (840 sati nakon iv aplikacije, odnosno 510 sati nakon po), a najkraći kod šarana (8,3 sata nakon iv aplikacije, odnosno 0,68 sati nakon po). Kod ostalih životinja u pokusu t ½ eliminacije nakon iv aplikacije iznosilo je od 12 sati (prepelica) do 170 sati (štakor), a nakon po aplikacije od 6,7 sati (prepelica) do 120 sati (štakor) (Hagelberg i sur., 1989). U ljudi t ½ eliminacije OTA iz plazme nakon po aplikacije iznosi 35,55 dana (853,2 sata) te je veća negoli u majmuna (510 sati) (Studer-Rohr i sur., 2000).

Vrijeme polovične eliminacije OTA iz krvi veće je od t ½ eliminacije iz pojedinih organa vjerojatno zbog vezanja OTA na proteine plazme (Ringot i sur., 2005). OTA se iz crijeva reapsorbira u cirkulaciju i zatim krvotokom ponovo dolazi u jetru iz koje se sa žuči izlučuje u crijevo (enterohepatička cirkulacija) što pogoduje dugom zadržavanju OTA u organizmu

(Fuchs i sur., 1988a; Roth i sur., 1988). Osim toga, OTA se u glomerulu izlučuje urinom, a zatim se reapsorbira u proksimalnim i distalnim kanalićima bubrega. Raspodjela OTA u organizmu ovisi o vrsti životinje, načinu primjene, dozi OTA, prehrani i zdravstvenom statusu životinje. Uglavnom se nakuplja u bubrezima, jetri i mišićima (Fuchs i sur., 1986; Fuchs i sur., 1988a; Fuchs i sur., 1988b; Ringot i sur., 2000; Corcuera i sur., 2012), no pronađen je i u ostalim organima. Nakupljanje OTA u organizmu istraživano je na nekoliko životnjskih vrsta (štakor, miš, pastrva i prepelica). OTA je u različitim koncentracijama pronađen najviše u krvi, a zatim u srcu, mozgu, žlijezdama slinovnicama, škrgama, plućima, timusu, tankom i debelom crijevu, jetri, žuči, bubregu (u kori i srži; pronefros i opistonefros kod riba), slezeni, gušterači, jajnicima, maternici, testisima, urinu, koštanoj srži, mišićima, koži i smeđem masnom tkivu (Breitholtz Emanuelsson i sur., 1991; Fuchs i sur., 1986; Fuchs i sur., 1988a; Fuchs i sur., 1988b).

OTA je toksičan djelomično zbog strukturne homologije okratoksina A i fenilalanina zbog koje OTA inhibira sintezu proteina zbog kompeticije s fenilalaninom za fenilalanin tRNA sintetazu (Creppy i sur., 1983). Uzrokuje i lomove DNA, inhibiciju glukoneogeneze, inhibiciju zgrušavanja krvi i apoptozu (Petzinger i Ziegler, 2000). Mehanizam toksičnosti OTA uključuje i oksidacijsko oštećenje povećanjem produkcije slobodnih radikala što uzrokuje povećanje lipidne peroksidacije (Domijan i sur., 2004a). Osim toga OTA inhibira stanično disanje u mitohondriju jer je kompetitivni inhibitor nosača na unutarnjoj strani mitohondrijske membrane pa utječe na mehanizam kojim se stvara energija (Stoev i sur., 2002; Petzinger i Ziegler, 2000).

Način eliminacije iz organizma ovisi o putu unosa OTA, dozi, stupnju vezanja OTA s proteinima plazme i njegovoj enterohepatičkoj cirkulaciji. Kod svih životinjskih vrsta važnu ulogu u eliminaciji toksina iz organizma imaju i urinarna i fekalna ekskrecija. Razina ekskrecije nekim od tih putova ovisi o putu unošenja toksina u organizam, dozi, stupnju vezanja za proteine i enterohepatičkoj citkulaciji (Ringot i sur., 2006). Eliminaciju urinom otežava reapsorpcija OTA u svim dijelovima nefrona uz pomoć organskih anionskih transportera (OAT) (Žlender i sur., 2009). Bubrežna reapsorpcija OTA pridonosi njegovoj akumulaciji u bubregu i nefrotoksičnosti. Uz izlučivanje urinom i fecesom, kod sisavaca je važno izlučivanje majčinim mlijekom (Ringot i sur., 2006). Taj je način izlučivanja važan jer je majčino mlijeko hrana za dojenčad na čije zdravlje OTA može posebno štetno utjecati.

1.1.4 Toksični učinci

Ciljni organ toksičnog djelovanja OTA je bubreg. Nađeno je da je nefrotoksičan za sve pokusne i domaće životinje osim za goveda. OTA je mikotoksin s kancerogenim, genotoksičnim, teratogenim, imunotoksičnim i nefrotoksičnim svojstvima (Domijan i Peraica, 2010). OTA oštećuje proksimalne kanaliće bubrega pri čemu se u urinu može naći povećana katalitička aktivnost ezima četkaste prevlake (Domijan i sur., 2004b). Sam OTA je organski anion (OA) i supstrat je za različite bubrežne OAT-e koji su većim dijelom smješteni na bazolateralnoj i luminalnoj membrani proksimalnog kanalića bubrega (Žlender i sur., 2009). Povećano nakupljanje OTA u proksimalnim kanalićima bubrega primijećeno je u različitim životinjskim modelima (štakor, svinje, kokoši) te se smatra da je djelomično odgovoran za dokazanu nefrotoksičnost OTA. Uz ostale simptome nefrotoksičnosti (smanjenje funkcionalnosti proskimalnih kanalića, glukozurija, proteinurija, oštećenje strukture kanalića, apoptoza, nekroza i adenomi i karcinomi stanica kanalića), OTA utječe na aktivnost i ekspresiju bubrežnih OAT-a. U bubrezima sisavaca OTA se prenosi putem OAT1, OAT2, OAT3, OAT4 (nije pristutan u glodavaca) i OAT5 (nije prisutan u ljudi). U našem istraživanju u kojem su muški štakori 10 dana tretirani s OTA (250 i 500 µg kg^{-1} tm) vidljivo je oštećenje proksimalnih kanalića bubrega i upregulacija OAT-a u cijelom proksimalnom kanaliću. Najveće oštećenje primijećeno je u S3 segmentu proksimalnog kanalića te je pretpostavljeno da stanice u ovom dijelu kanalića imaju najučinkovitiji mehanizam nakupljanja OTA ili najneučinkovitiji mehanizam njegove eliminacije. Budući da je oksidacijski stres jedan od predloženih mehanizama nefrotoksičnosti OTA, pretpostavljamo da ovaj dio kanalića ima nisku koncentraciju „hvatača“ staničnih ROS-ova koji bi mogli zaštititi stanicu od oksidacijskog stresa uzrokovanog s OTA.

Genotoksični, mutageni i kancerogeni učinci OTA su istraživani u pokusima *in vivo* i *in vitro*, no dobiveni rezultati nisu jednoznačni (WHO/IPCS, 2001).

1.1.4.1 Citotoksičnost, mutagenost, genotoksičnost, kancerogenost i teratogenost

Citotoksičnost, genotoksičnost i mutagenost OTA istraživana je na stanicama fibroblasta miša. Na tri vrste ovih staničnih linija koje su bile izložene okratoksinu A osam sati (10-200 µM) nije nađen citotoksični učinak. Iako je nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (Reactive oxygen species - ROS) u odnosu na kontrolnu skupinu bio značajno veći (Simarro Doorten i sur., 2005). Ta je razlika bila još izraženija nakon 24 sata izloženosti. U homogenatu stanica izloženih OTA došlo je do oštećenja DNA što je dokazano kometskim testom (povećanjem duljine i smanjenjem repa kometa). Mehanizam citotoksičnosti OTA je i dalje nerazjašnjen, no smatra se da je jedan od mehanizama povećanje proizvodnje ROS-ova.

Dokazano je da je OTA karcinogen za miševe i štakore te da su mužjaci štakora osjetljiviji od ženki na djelovanje OTA. Nastanak tumora kod štakora induciran je malom dozom OTA (70 µg kg^{-1} tm) kojoj su životinje bile izložene dvije godine (Boorman, 1989; IARC, 1993). Postoje nekoliko pretpostavki o mehanizmu nastanka karcinoma. OTA bi mogao biti kancerogen zbog izravnog oštećenja DNA (genotoksičnost) ili neizravno poticanjem citotoksičnosti, oksidacijskog oštećenja ili zbog poticanja diobe stanica kao posljedica oštećenja tkiva (Kamp i sur., 2005). U prilog citotoksičnog mehanizma nastanka karcinoma su rezultati pokusa na stanicama i laboratorijskim životinjama u kojima je dokazano da OTA uzrokuje povećanu apoptozu stanica bubrega i tubulo-intersticijalnu nefropatiju (Krogh i sur., 1988; Kamp i sur., 2005, Petrik et al., 2003, Domijan i sur., 2004b). Nakon tretmana s OTA pronađeni su adukti OTA na DNA u bubregu, jetri i slezeni koji su bili ovisni o dozi i duljini tretiranja (Pfohl-leszkowicz i sur., 1993).

Iako se dugo mislilo da nije genotoksičan, u novije je vrijeme genotoksičnost OTA dokazana istraživanjima na kulturi ljudskih stanica. Utvrđeno je da OTA utječe na ekspresiju citokroma P450s, popravak DNA, povećava izmjenu sestrinskih kromatida i jednolančanih lomova. Utvrđena je i neplanirana sinteza DNA koja je znak aktivacije protoonkogena (Wang i Groopman, 1999). U pokusu u kojem su PK15 stanice tretirane s OTA utvrđeno je povećanje broja mikronukleusa (Šegvić Klarić i sur., 2008). Creppy i sur. (1985) su genotoksičnost OTA istraživali *in vitro* na stanicama slezene i *in vivo* na miševima kojima su nakon pokusa istraživali oštećenje DNA u slezeni, bubregu i jetri. U oba su pokusa utvrđeni jednolančani lomovi DNA.

OTA iz organizma majke može prijeći placentalnu barijeru, nakupljati se u fetalnom tkivu i uzrokovati oštećenja središnjeg živčanog sustava. Dokazano je teratogen kod miševa, štakora, hrčaka, pilića i zečeva (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007).

1.1.5 Izloženost ljudi

Srednji je dnevni unos OTA u ljudi u Europi 1-2 ng kg^{-1} tm dok je dozvoljeni dnevni unos koju je predložila Svjetska zdravstvena organizacija 16 ng kg^{-1} tm dnevno (WHO/FAO, 2001). Ljudi su najviše izloženi ovom mikotoksinu konzumiranjem žitarica i proizvoda od žitarica, no OTA se može unijeti u organizam i konzumiranjem kave, vina, piva, svinjetine i proizvoda od svinjskog mesa i krvi te začinima.
Budući da je dokazano da je uzročnik svinjske nefropatije u Danskoj OTA, Krogh je pretpostavio da bi isti mikotoksin mogao biti uzročnik EN-a (Krogh, 1972). Zbog toga su provedena mnogobrojna istraživanja o izloženosti ljudi tom mikotoksinu.

1971. godine osnovan je tim stručnjaka iz Danske i Hrvatske koji su u okolici Slavonskog Broda trebali proučiti etiologiju endemske nefropatije zbog pretpostavke da je ta bolest uzrokovana mikotoksinima. Sakupljani su uzorci hrane iz tog područja tijekom pet godina te je istraživana prisutnost OTA u hrani i to uglavnom žitaricama (kukuruz, pšenica, ječam i pšenični kruh). Analizirano je ukupno 768 uzoraka, a okratoksin A je jedini dokazani okratoksin. Udio kontaminiranih uzoraka bio je 0-42,9%, a zanimljivo je da je OTA izmjeren i u 18,8% analiziranih uzoraka pšeničnog kruha (Pavlović i sur., 1979).

Okratoksin A je u ljudskoj krvi prvi dokazao Hult i sur. analizirajući spektrofluorimetrijskom metodom uzorke krvi sakupljene u endemskim selima Brodske Posavine (Hult i sur., 1982.). U tim su selima istom metodom Radić i sur. istraživali OTA u serumima ljudi sakupljanim tijekom 10 godina (ukupno 6.909 uzoraka) (Radić i sur., 1997). Broj pozitivnih uzoraka (0,2-4%) i koncentracija OTA (2-50 ng mL^{-1}) razlikovala se ovisno o godini sakupljanja uzoraka i odgovarala je klimataskim prilikama pojedine godine. Kasnije su provedena istraživanja visokoućinskom tekućinskom kromatografijom (HPLC) širom svijeta i niske koncentracije OTA nađene su u mnogim zemljama u kojima nema nefropatije. U Hrvatskoj je HPLC-om mjerena koncentracija OTA u plazmi dobrovoljaca iz pet gradova (Osijek, Zagreb, Varaždin, Rijeka,

Split) tijekom sva četiri godišnja doba (Peraica i sur., 2001). Sakupljeno je približno 50 uzoraka u svakom gradu tijekom svakog godišnjeg doba, ukupno 983 uzorka. Najveća koncentracija OTA u svim je regijama izmjerena u lipnju, a najmanja u prosincu dok je po regijama najveća koncentracija OTA i najveći broj pozitivnih uzoraka nađen u Osijeku, a najmanje u Rijeci. U Rijeci je također učestalost pozitivnih uzoraka bila najmanja.

Okratoksin A je izmjeren u majčinom mlijeku u Norveškoj, Italiji, Švedskoj, Slovačkoj i Brazilu (Skaug i sur., 2001; Micco i sur., 1995; Thuvander i sur. 2001; Dostal i sur., 2008; Navas i sur., 2005). Iako su koncentracije OTA niske, njegova bi prisutnost mogla negativno utjecati na novorođenčad koja je posebno osjetljiva na toksine.
Dugotrajnim istraživanjima nije dokazano da OTA uzrokuje EN, no učestali nalaz tog mikotoksina u krvi ljudi i u namirnicama iz endemskog kraja upućuju da bi taj nefrotoksični mikotoksin mogao zajedno s drugim nefrotoksičnim mikotoksinima biti uzročnik EN-a. Drugi nefrotoksični mikotoksini su citrinin, fumonizin B1 i penicilična kiselina.

1.1.5.1 OTA u hrani biljnog i životinjskog porijekla

1.1.5.1.1 Vino

Prvi su OTA u vinu našli Zimmerli i Dick 1995. godine analizirajući 18 uzoraka vina (dva bijela, 10 crnih i 6 rosè) (Zimmerli i Dick, 1995). Godinu dana kasnije analizirali su 24 bijela, 15 rosè, 79 crnih i 15 desertnih vina i sok od grožđa. Najviše koncentracije OTA nađene su u crnom, a najniže u bijelom vinu. Visconti i sur. su istraživali OTA u komercijalnim i vinima proizvedenim u obiteljskim vinarijama (38 crnih, 8 rosè, 9 bijelih i jedno desertno) te pronašli da su sva vina proizvedena u obiteljskim vinarijama sadržavala OTA (Visconti i sur., 1999). Najveći postotak pozitivnih uzoraka bio je u crnom vinu te su zaključili da crno i rosè vino više pridonosi ukupnom unosu OTA u organizam, nego bijelo vino.
I u drugom je istraživanjima nađeno da bijelo vino obično sadrži manje OTA nego rosè i crno, da koncentracija OTA ovisi o geografskom porijeklu grožđa i da su vina iz južnih regija više kontaminirana OTA nego ona iz sjevernih (Ottender i Majerus, 2000; Pascale i Visconti, 2001).

Istraživanjem OTA u vinima u Hrvatskoj dobiveni su slični rezultati. U istraživanju koje je provedeno 2004. godine sva istraživana crna vina sadržava su OTA za razliku od bijelih vina (Domijan i Peraica, 2005b). U svim vinima proizvedenim u južnom dijelu Hrvatske pronađen je OTA za razliku od vina proizvedenih u sjevernim regijama. U drugom istraživanju određivana je koncentracija OTA u (crnom) moštu i vinu dobivenom iz toga mošta (Flajs i sur., 2009). Nađeno je da je koncentracija OTA u moštu viša nego u vinu. U oba istraživanja je nađeno da je koncentracija OTA u vinima iz Hrvatske niža od vina proizvedenih u svijetu.

1.1.5.1.2 Grah

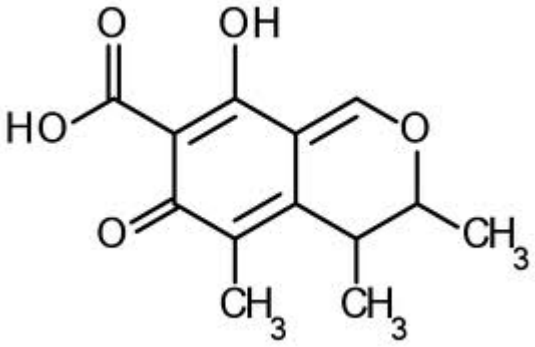
Prvi su podaci o OTA u grahu u Hrvatskoj objavljeni 1989. godine kada su analizirana četiri uzorka graha iz endemskog područja. U tom je istraživanju kontaminacija OTA bila označena kao intenzitet kontaminacije koji je u sva četiri uzorka bio slab (Cvetnić i Pepeljnjak, 1989). OTA u grahu pronađen je i u području zahvaćenom EN-om u ukupno pet uzoraka (Radić i sur., 1997). Domijan i sur. su istraživali OTA u uzorcima graha sakupljenim u 13 županija u Hrvatskoj koje su raspodijelili u četiri regije: sjevernu, istočnu, središnju i južnu (Domijan i sur., 2005a). Od sakupljenih 45 uzoraka, u 17 je pronađen OTA i to najviše u sjevernoj regiji dok u uzorcima iz južne regije OTA nije nađen. Koncentracija OTA u svim je uzorcima bila niska.

Istražuju se, za sada na pokusnim životinjama, metode zaštite od djelovanja mikotoksina koje se temelje na poznavanju mehanizma djelovanja mikotoksina. Tako su životinje koje su dobivale OTA kao zaštitu od njegovog djelovanja dobivale fenilalanin, vitamin E, selen i ekstrakt artičoke (Stoev i sur., 2000; Galvano i sur., 2001; Creppy i sur., 1995).

1.2 Citrinin

1.2.1 Kemijska svojstva

CTN je prema IUPAC-u (3R, 4S)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3H-2-benzopiran-7-karboksilna kiselina (slika 1-2). To je kristalinična tvar žute boje molekulske mase 250,25 s maksimumom apsorpcije na 250 i 333 nm (UV). Netopljiv je u hladnoj vodi, a otapa se u vodenoj otopini natrijevog hidroksida, natrijevog karbonata ili natrijevog acetata te u metanolu, acetonitrilu, etanolu i većini ostalih polarnih organskih otapala (Xu i sur., 2006).



Slika 1-2 Kemijska struktura citrinina

1.2.2 Povijest

CTN je izoliran 1931. godine iz plijesni *Penicillium citrininum*, a 1941. godine otkrivena su njegova antibiotska svojstva, no zbog nefrotoksičnog djelovanja nije korišten kao antibiotik (Hetherington i Raistrick, 1931, Raistrick i Smith, 1941). Osim vrste *P. citrininum*, CTN proizvode mnogobrojne vrste plijesni iz rodova *Penicillium, Aspergillus* i *Monascus*. CTN je metabolit mnogih vrsta plijesni pa se pojavljuje zajedno s patulinom, oksalnom kiselinom i OTA.

1.2.3 Pigmenti roda Monascus

U orijentalnoj kuhinji tradicionalno se kao bojila za hranu upotrebljavaju sekundarni metaboliti plijesni iz roda *Monascus*. Riječ je o sekundarnim metabolitima vrsta *M. pilosus, M. purpureus, M. ruber* i *M. froridanus* koji su stoljećima (Sabater-Vilar i sur., 1999) upotrebljavani pri fermentiranju crnog vina, proizvodnji crvenog sira od soje, bojenju hrane, konzerviranju mesa te kao poboljšivači okusa (EFSA, 2012). Proizvodnja pigmenata ovih plijesni detaljno je proučena i patentirana u Tajvanu, Japanu, SAD-u i Francuskoj, a njihova je primjena široko rasprostanjena po državama Azije i Europe iako je njihova primjena dopuštena samo u Japanu te služe kao zamjena za uobičajene aditive (E-249, E-252, E-120) koji se koriste za bojenje mesa (Sabaret Vilar i sur., 1999).

Donedavno su se ovi pigmenti koristili i kao dodaci prehrani zato što imaju sposobnost snižavanja razine kolesterola u krvi i snižavanja krvnog tlaka kao i antioksidacijska svojstva (EFSA, 2012). Važno otkriće dogodilo se 1995. godine kada su Blanc i sur**.** iz različitih vrsta roda *Monascus* izolirali pigment monascidin A i otkrili da ima identičnu strukturu kao mikotoksin citrinin otkriven davne 1931. godine kao metabolit različitih vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Blanc i sur., 1995).

Iako se bojila za hranu dobivena iz plijesni roda *Monascus* koriste stoljećima, do sada nisu zabilježeni štetni učinci. No, ipak bi trebalo izbjegavati kontaminaciju hrane CTN-om jer je nefrotoksičan i mutagen nakon metaboličke aktivacije (Sabater-Vilar i sur., 1999).

1.2.4 Toksikokinetika

Istraživanja toksikokinetike CTN-a do sada nisu provedena (EFSA, 2012). Nekoliko sati nakon intravenozne i oralne aplikacije (3-6 sati), CTN je pronađen u jetri i bubrezima (Reddy i sur., 1982a). Apsorbirani se CTN eliminira iz organizma uglavnom putem bubrega jer je nađeno da je 74% CTN-a izlučeno u urinu tijekom 24 sata. Manji se dio izlučuje fecesom. Nakon oralne aplikacije, maksimalna koncentracija CTN-a u serumu je nađena nakon tri sata, a oko 20% CTN-a je bilo vezano za albumin u serumu. Citrinin brzo nestaje iz plazme s maksimumom eliminacije nakon 12 sati. 72 sata kasnije u serumu je bilo samo 0.9% od unesene doze.

Proces eliminacije CTN-a može se opisati modelom s dvije faze (brza faza α i sporija faza β). Vrijeme polovične eliminacije CTN-a u bržoj fazi je 1,95 sati, dok je to u sporijoj fazi 39,7 sati. CTN vjerojatno prolazi proces enterohepatičke cirkulacije budući da je u ranoj fazi eliminacije tek mala količina CTN-a pronađena u fecesu.

Nakon tretmana radioaktivno obilježenim CTN-om izmjerena je količina CTN-a u pojedinim organima: jetra (9,5%), probavni sustav-želudac, tanko i debelo crijevo (6,8%, od kojih je najveći udio pronađen u tankom crijevu), bubreg (3,5%), maternica (0,4%), fetusi (0,26%). U svim je organima maksimalna koncentracija bila 30-60 minuta nakon tretmana. Nakon 72 sata tretmana koncentracije CTN-a u organima bile su skoro nemjerljive (Reddy, 1982b). CTN prolazi kroz placentu i u malim se koncentracijama može naći u fetusima što je u skladu s njegovim fetotoksičnim učinkom.

Miševi soja CD-1 tretirani su ip CTN-om (0,12, 0,6 i 3 mg kg^{-1} tm) svakodnevno tijekom dva do četiri tjedna. Nakon dvotjednog tretmana CTN-om dozom od 3 mg kg^{-1} tm primijećeno je povećanje bubrega (Reddy i sur., 1988b).

Metaboliti CTN-a (osim dihidrocitrinona) nisu opisani. Od ukupne primijenjene doze CTN-a na gravidnim štakoricama, oko 15% se metabolizira u dihidrocitrinon, dok se oko 43% citrinina izluči u nepromijenjenom obliku. Nisu nađeni drugi metaboliti CTN-a (Sabater-Vilar i sur., 1999; Frank, 1992).

1.2.5 Toksični učinci

1.2.5.1 Nefrotoksičnost

Kod odraslih štakora za nefrotoksičnost je vjerojatno odgovorna osnovna nemetabolizirana molekula CTN-a (Berndt i Hayes, 1982). Nađeno je, naime, da se u pokusu u kojem su životinje tretirane probenicidom koji blokira organski anionski transport CTN-a u kori bubrega smanjuje mortalitet pokusnih životinja i poboljšava bubrežna funkcija (mjerena kao bubrežni transport).

1.2.5.2 Imunološka reakcija

Nakon dvotjednog tretmana miševa CTN-om (3 mg kg^{-1} tm) ip primijećeno je smanjenje broja perifernih leukocita i povećanje broja limfocitnih blasta u slezeni što ukazuje da CTN ne smanjuje sintezu DNA (Reddy i sur., 1988b). Pri tim dozama CTN stimulira humoralnu imunost miševa.

1.2.5.3 Genotoksičnost, citotoksičnost i mutagenost

Rezultati istraživanja genotoksičnosti i mutagenosti CTN-a nisu jednoznačni. Genotoksičnost CTN-a istraživana je na bakterijama i stanicama sisavaca *in vitro* i na miševima *in vivo*. CTN nije bio genotoksičan za sojeve vrste *Salmonella typhimurium* (Wehner i sur., 1978; Sabater-Vilar i sur., 1999; Knasmüller i sur., 2004). Kod vrste *Escherichia coli* CTN je uzrokovao jednolančane lomove kromosomske DNA (Martin i sur., 1986). Oštećenje DNA otkriveno je korištenjem kometskog testa u pokusu na Vero stanicama koje su bile izložene CTN-u 24 sata, dok istim testom nije otkrivena genotoksičnost na jetrenim stanicama (HEPG2) i bubrežnim stanicama ljudskog embrija (HEK232) (Bouslimi i sur., 2008; Knasmüller i sur., 2004; Liu i sur., 2003).

Genotoksičnost CTN-a potvrđena je na PK15 stanicama u kojima se nakon izloženosti CTN-u povećao broj mikronukleusa (Šegvić Klarić i sur., 2012). Isti učinak nakon tretmana CTN-om primijećen je i na HEPG2 stanicama, humanim limfocitima i V79 stanicama hrčka (Knasmüller i sur., 2004; Dömnez-Altuntas i sur., 2007; Pfeiffer i sur., 1998).

Pfohl-Leszkowicz i sur. našli su DNA adukte u stanicama ljudskog bubrega (HK2) koje su bile izložene CTN-u, a isti su adukti primijećeni i u tumorskom tkivu bubrega (Pfohl-Leszkowicz i sur., 2007).

Genotoksičnost CTN-a istraživana je *in vivo* na vrlo mladim miševima na čijim su stanicama koštane srži primijećene kromosomske abnormalnosti (hipoploidija, sljepljivanje i stvaranje nakupina kromosoma) nakon što su miševi osam tjedana tretirani CTN-om dozama 5-20 mg kg^{-1} (Jeswal 1996).

1.2.5.4 Teratogenost

Teratogenost CTN-a ispitivana je na gravidnim štakoricama tretiranim subkutano jednokratnom dozom (35 mg kg^{-1} tm) i žrtvovanim dvadesetog dana skotnosti (Reddy i sur., 1982b). Taj je treman uzrokovao 50% smrtnosti u štakorica koje su CTN dobile u pojedine dane gravidnosti iako je subkutani LD50 za odrasle štakorice daleko viši (67 mg kg^{-1} tm). Tretman CTN-om nije utjecao na broj fetusa, no fetusi štakorice tretiranih CTN-om bili su manji nego u kontrolnoj skupini. Nisu zabilježene značajne malformacije kostura, no primjećeni su povećani bubrezi, hidrocefalus i rascjep nepca. Tretman CTN-om tijekom razdoblja nastanka organa uzrokovao je smanjenje broja živih i povećanje broja resorbiranih fetusa, a vrste malformacije ovisile su o danu gestacije kada su životinje tretirane. U tkivima fetusa nisu nađeni metaboliti CTN-a što upućuje na izravan učinak CTN-a (a ne metabolita) na fetus, poglavito na bubrege (Reddy i sur., 1982a).

1.2.5.5 Kancerogenost

Kancerogena svojstva CTN-a ispitivana su u malobrojnim istraživanjima. Istraživanje na štakorima koji su tijekom 80 tjedana dobivali CTN u hrani ukazala su na njegovu tumorogenost zbog pojave adenoma bubrega (Arai i Hibino, 1983). U tom razdoblju nije zabilježena pojava karcinoma.

Kancerogenost nije primijećena niti nakon pokusa na vrsti *Oryzias latipes* (medaka - japanska ukrasna ribica) koja je tretirana CTN-om 24 tjedna (Hatanaka i sur., 1982).

Na temelju provedenih ustraživanja IARC je svrstao CTN u skupinu 3 – nema karcinogeni učinak na ljude (IARC , 1986).

1.2.6 Izloženost ljudi

Radna skupina EFSA-e donijela je 2012. znanstveno mišljenje o prisutnosti CTN-a u hrani i procjenu rizika izloženosti CTN-u na ljudsko zdravlje (EFSA, 2012). Jedno od malobrojnih

istraživanja u kojima se spominje izloženost ljudi CTN-u putem hrane provedeno je u područjima u kojima se javlja EN. Istraživana je prehrana 15 obitelji, a CTN je pronađen u tri obitelji što nije dovoljno da se zaključi kolika je izloženost ljudi CTN-u (Pfohl-Leszkowicz i sur., 2007). Iako je CTN pronađen u žitaricama, voću i aromatičnim travama, nema podrobnijih istraživanja o njegovom utjecaju na ljudsko zdravlje.

1.2.6.1 CTN u hrani

U usporedbi s OTA postoji jako malo istraživanja o pojavi CTN-a u hrani. Među prvima je istraživanje provedeno u Kanadi. U tom je istraživanju određena koncentracija CTN-a u pšenici, zobi, ječmu i raži. CTN je otkriven u 13 od 29 uzoraka, a u svim uzorcima koji su bili kontaminirani s CTN-om, nađen je i OTA (Scott i sur., 1972).

Veći dio istraživanja kontaminiranosti žitarica CTN-om u Europi proveden je u jugoistočnoj Europi, u područjima u kojima se pojavljuje EN. Petkova-Bocharova i sur. našli su da je učestalost nalaza i koncentracija CTN-a u kukuruzu i grahu veća u endemskom kraju od uzoraka iz krajeva u kojem nema te bolesti (Petkova-Bocharova i sur., 1991).

U Aziji je CTN istraživan u riži, kukuruzu i šećernoj trski, no pronađen je samo u uzorcima riže i to onima koji su sakupljani tijekom kišnih razdoblja (Reddy i sur., 1983; Nguyen i sur., 2007). U riži je CTN otkriven i u Africi, ali i u i ječmu i kukuruzu, dok u uzorcima pšenice nije nađen (El-Sayed, 1996; Abd-Allah i Ezzat, 2005).

Osim u žitaricama, CTN je nađen i u jabukama. Pepeljnjak i sur. su otkrili CTN u 19% uzoraka jabuka skupljenih u Hrvatskoj (Pepeljnjak i sur., 2002). Osim ovog nalaza, CTN je u jabukama nađen i u jabukama iz Portugala i Njemačke (Martinis i sur., 2002; Dietrich i sur., 2001).

CTN je nađen i u začinima iz Indije i ljekovitom bilju u Španjolskoj u kojem je zajedno s CTN-om nađen i OTA, aflatoksin B1, zearalenon, T-2 toksin i deoksinivalenol (Kumari i Nusrath, 1987; Saxena i Mehrotra, 1989; Santos i sur, 2009). Iako su koncentracije CTN-a male, one mogu pridonijeti ukupnom unosu CTN-a u organizam.

1.2.6.2 Razgradnja CTN-a tijekom prerade hrane

Jako je malo dostupnih podataka o sudbini CTN-a tijekom pripreme hrane (EFSA, 2012). Kao i u svim ostalim istraživanjima o CTN-u, rezultati o razgradnji CTN-a nisu jednoznačni.

Većina se istraživača slaže da se CTN razgrađuje na temperaturi višoj od 175 °C bez prisustva vlage, dok Lee (2007) nije primijetio razgradnju CTN-a na toj temperaturi (Kitabatake i sur., 1991; Betina 1989; Lee, 2007). Iako se koncentracija CTN-a nije smanjila fermentacijom kukuruza, kuhanje fermentiranog kukuruza ipak razgrađuje CTN (Kpodo i sur., 1996). Krogh je još 1974. godine primijetio da se CTN koji je dodan u slad brže razgrađuje od OTA tijekom prerade piva i ne nalazi se u značajnim količinama u sladnoj kaši. Očito je da razgradnja CTN-a u hrani ovisi o temperaturi i sadržaju vlage (Krogh, 1974).

1.3 Zajedničko djelovanje OTA i CTN i vrste koje proizvode oba mikotoksina

Jedna od vrsta plijesni koje proizvode CTN je i *Penicillium verrucosum* koju možemo naći na žitaricama poput pšenice i ječma. Kako je ta vrsta poznata kao značajan proizvođač OTA, nije neobično da se ova dva mikotoskina često mogu naći zajedno iako je učestalost nalaza CTN-a mnogo manja (Bragulat i sur. 2008). Dokazano je da OTA ima nefrotoksično, karcinogeno, genotoksično, teratogeno i imunotoksično djelovanje, dok je CTN dokazano nefrotoksičan, a rezultati istraživanja njegove genotoksičnosti i mutagenosti su oprečna. Budući da se ta dva mikotoksina često pojavljuju zajedno, važno je istražiti kakav je zajednički toksični učinak ta dva mikotoksina.

1.3.1 Zajedničko pojavljivanje okratoksina A i citrinina u hrani

Istovremena kontaminacija žita s OTA i CTN zabilježena je još 1972. godine u pokrajinama Alberta i Ontario u Kanadi. Većina tada analiziranih uzoraka sadržavala je OTA (18 od 32 pregledana uzorka), a CTN je pronađen u 13 od tih 18 uzoraka u kojima je nađen OTA.

Pronađene su i plijesni koje proizvode oba mikotoksina i to u ukupno 22 uzorka, a to znači da u nekim uzorcima plijesni nisu proizvele mikotoksine (Scott i sur., 1972). Bragulat i sur. su istraživali učestalost zajedničkog pojavljivanja ovih mikotoksina, njihovu prisutnost u žitaricama i životinjskoj hrani te vrste plijesni iz roda *Penicillium* koje ih proizvode (Bragulat i sur., 2008). Analizirali su 178 uzoraka žitarica i komercijalne hrane za životinje iz kojih su izolirane plijesni roda *Penicillium* koje su uključene u daljnju studiju. U izolatima je otkriveno da se u 11 uzoraka nalazi plijesan *P. verrucosum* koja je proizvodila OTA, dok je CTN pronađen u 14 uzoraka (proizvodile su ga plijesni *P. verrucosum* i *P. citrininum*). Iako je broj uzoraka u kojima su pronađena oba mikotoksina bio mali, potvrđena je mogućnost kontaminacije žita s OTA i CTN-om u slučaju neprimjerenog skladištenja žita.

Istovremena kontaminacija žitarica s OTA i CTN-om istraživana je i na riži u Vijetnamu. Od ukupno 100 uzoraka riže, OTA je pronađen u 35, a CTN u 13 uzoraka. Osim ova dva mikotoksina, u ovim je uzorcima pronađen i aflatoksin B1 (u 51 uzorku). Uzorci su uzimani tijekom dvije sezone (sušne i kišne) i primijećeno je da je tijekom kišne sezone kontaminacija mikotoksinima češća. Budući da je u Aziji riža važna namirnica (a i izvozi se u ostale dijelove svijeta), a koncentracija mikotoksina u nekim je uzorcima bila iznad dozvoljene granice, konzumacija takve riže znantno pridonosi ukupnom unosu tih mikotoksina (Nguyen i sur., 2007). Zajednički nalaz OTA i CTN-a u žitaricama (kukuruz, ječam i riža) pronađen je i u Egiptu (Abd Alla, 1996).

Zajedničko pojavljivanje OTA i CTN-a zabilježeno je i u Bugarskoj u uzorcima pšenice, zobi i pšeničnim mekinjama u području zahvaćenom EN-om (22% analiziranih uzoraka) i kontrolnom području u 14% analiziranih uzoraka (Vrabceva i sur., 2000).

Zbog čestog istovremenog nalaza OTA i CTN-a u žitaricama i pretpostavke da su ljudi i životinje istovremeno izloženi tim toksinima, provedeni su mnogi pokusi o zajedničkom utjecaju tih mikotoksina *in vitro* i *in vivo*. OTA i CTN su nefrotoksični mikotoksini te istraživanja o njihovom zajedničkom djelovanju uglavnom pokazuju sinergistički učinak povezan s nefrotoksičnošću (Speijers i Speijers, 2004).

1.3.1.1 Zajedničko djelovanje OTA i CTN-a *in vitro*

Citotoksični i genotoksični učinak OTA, CTN-a i zajedničkog djelovanja ova dva mikotoksina istraživan je na nekoliko vrsta stanica**.** Creppy i sur. su još 1980. godine istraživali zajednički učinak OTA i CTN-a na kulturi stanica hepatoma (Creppy i sur., 1980). Nakon pojedinačnog i zajedničkog tretmana s OTA i CTN-om, zaključili su da je inhibicija sinteze RNA i proteina učinkovitija nakon tretmana s oba mikotoksina nego nakon zasebnog tretmana. Na kulturi stanica ljudskih bubrega koje su bile istovremeno izložene različitim koncentracijama OTA i CTN-a mjerena je aktivnost kaspaze-3, ključnog proteina u nastanku apoptoze (Schwerdt i sur., 1999). Taj je protein odgovoran za kaskadnu aktivaciju drugih proteina koji uzrokuju nastanak fragmentacije DNA i kondenziranje kromatina. Poznato je da niska koncentracija OTA aktivira kaspazu-3 u ovim stanicama, no istovremeni tretman kulture stanica ljudskih bubrega s OTA i CTN-om dalo je nekoliko različitih učinaka. Najmanje upotrijebljene koncentracije CTN-a (0,25 i 1 µmol L^{-1}) u kombinaciji s OTA (25 i 50 nmol L^{-1}) nisu utjecale na aktivnost kaspaze-3, više koncentracije (2,5 i 5 µmol L^{-1}) su u kombinaciji s OTA djelovale antagonistički, dok su najviše koncentracije (7,5 i 15 µmol L^{-1}) imale aditivni učinak na aktivnost kaspaze-3 (Knecht i sur., 2005).

U pokusu na Vero stanicama (epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna) istraživan je zajednički citotoksični učinak OTA i CTN-a i uspoređen s citotoksičnošću pojedinog mikotoksina (Bouslimi i sur., 2008). Nakon tretmana pojedinim mikotoksinima primijećeno je da je citotoksični učinak (MTT test) CTN-a mnogo manji nego učinak OTA, dok je nakon tretmana s oba mikotoksina citotoksični učinak bio sinergistički. Fragmentacija DNA nađena je nakon tretmana vrlo niskom koncentracijom oba mikotoksina za razliku od tretmana pojedinačnim mikotoksinom gdje je primijećena samo kod visoke koncentracije CTN-a.

Citotoksični, genotoksični i apoptotski zajednički učinak OTA i CTN-a primijećen je i u pokusu na PK15 stanicama koje su tretirane ovim mikotoksinima pojedinačno i s oba mikotoksina istovremeno (Šegvić Klarić i sur., 2012). Primijećen je aditivan citotoksični učinak kao rezultat zajedničkog djelovanja mikotoksina (MTT test). Iako nije povećan broj mikronukleusa, učinak na povećanje stanica u apoptozi bio je sinergističan, broj nukleoplazmatskih mostova kao i broj nuklearnih pupoljaka bio je značajno veći dok je preživljavanje stanica bilo sinergistički smanjeno. Zajednički učinak više mikotoksina istraživan je i na bubrežnim stanicama svinje

(LLC-PK1) MTT testom (Heussner i sur., 2006). U pokusu u kojem su korišteni mikotoksini OTA, okratoksin B, patulin i CTN primijećeno je da su najčešće interakcije CTN-a s drugim mikotoksinima. Nakon zajedničkog tretmana stanica s OTA i CTN-om nađeno je da je toksični učinak OTA i CTN-a veći od pretpostavljenog pa je zaključeno da ta dva mikotoksina imaju sinergistično djelovanje. Istraživanje zajedničke toksičnosti proveli su i Pfohl-Leskowicz i sur. na nekoliko vrsta plućnih i bubrežnih kultura ljudskih stanica te *in vivo* na štakorima (Pfohl-Leskowicz i sur., 2008). Preživljavanje stanica nakon zajedničkog tretmana s OTA i CTN-om ovisilo je o omjeru ova dva mikotoksina. Ako je koncentracija CTN-a bila niža od koncentracije OTA, učinak na preživljavanje stanica bio je antagonistički, dok je singergistički učinak primijećen ako je koncentracija CTN-a bila ista ili viša od koncentracije OTA. Osim toga, primjećena je češća pojava OTA-DNA adukata nakon tretmana s oba mikotoksina u odnosu na tretman samo sa OTA.

Embriotoksičnost je istraživana na pilećim embrijima koji su istovremeno tretirani s OTA i CTN-om. Primijećen je aditivni učinak s obzirom na smrtnost i oštećenje organa (Vesela i sur., 1983).

Za razliku od većine rezultata istraživanja mutagenosti OTA i CTN-a te njihovog zajedničkog djelovanja, Würgler i sur. nisu utvrdili mutageno djelovanje tih mikotoksina korištenjem bakterija *Salmonella typhimurium* TA102 (Würgler i sur., 1991). Razlog negativnom rezultatu ovog testa je vjerojatno antibiotsko djelovanje CTN-a. U tom je pokusu pozitivna kontrola bio H_2O_2 koji je imao mutageno djelovanje. Pojačani citotoksični učinak ovih mikotoksina nakon zajedničkog tretmana nije primijećen niti na epitelnim stanicama mokraćnog mjehura svinje (Föllmann i sur., 2000).

1.3.1.2 Zajedničko djelovanje okratoksina A i citrinina *in vivo*

Genotoksično djelovanje OTA i CTN-a istraživano je na stanicama koštane srži (BALB/C) miševa koji su tretirani intraperitonealno (Bouslimi i sur., 2008). Iz rezultata ovih istraživanja vidljivo je da OTA i CTN uzrokuju kromosomske aberacije ovisno o dozi, no isto tako da je njihov zajednički učinak aditivan ili čak sinergistički u odnosu na tretman pojedinačnim mikotoksinom.

Kako bi se istražilo moguće prenatalno djelovanje OTA i CTN-a, skotne su štakorice subkutano tretirane tim mikotoksinima, pojedinačno i zajedno. Štakorice su žrtvovane dvadesetog dana gravidnosti, a fetusi su pregledani kako bi se otkrila moguća oštećenja. Fetusi štakorica koje su tretirane s oba mikotoksina imali su značajno više malformacija u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su tek neznatne malformacije primijećene kod fetusa koji su bili izloženi pojedinačnom mikotoksinu. Promjene su bile najizraženije na unutrašnjim organima, kosturu i glavi, a ovisile su o danu tretmana tijekom gravidnosti (Mayura i sur., 1984).

Kancerogeno djelovanje OTA i CTN-a istraživano je u pokusu na miševima koji su tijekom 70 tjedana bili izloženi tim mikotoksinima (Kanisawa, 1984). Tumori bubrežnih stanica pojavili su se nakon tretmana s OTA (25 mg kg^{-1} hrane) te nakon tretmana s OTA i CTN-om (25 i 200 mg kg^{-1} hrane). U pokusima u kojima su miševi bili tretirani samo s CTN-om ili naizmjence s OTA i CTN-om, pojava tumora je izostala. Isto tako nije bilo pojave tumora na jetri što upućuje na izraženu nefrotoksičnost oba mikotoksina.

Glahn i sur. su istraživali bubrežne funkcije pilića starih 12 tjedana te pokušali odrediti mijenja li se diuretski učinak CTN-a u akutnoj okratoksikozi (Glahn i sur., 1987). Pilići su dva dana intramuskularno tretirani s OTA, a treći su dan životinje anestezirane te su intravenozno tretirane s CTN-om. Nije otkriven aditivan diuretički učinak tijekom prvih 48 sati.

Speijers i Speijers su u preglednom članku (2004) saželi istraživanja toksičnog zajedničkog učinka OTA i CTN-a. U najvećem broju istraživanja *in vitro* i *in vivo* primijećen je sinergistički učinak tih mikotoksina.

1.4 Oksidacijski stres

1.4.1 Malondialdehid

Peroksidacija lipida je složen proces koji se odvija u životinjama i biljkama. Uključuje stvaranje i poticanje daljnjeg nastanka lipidnih radikala, preraspodjelu dvostrukih veza u nezasićenim mastima i moguće razaranje membranskih lipida pri čemu nastaju različiti

produkti kao što su alkoholi, ketoni, aldehidi i eteri. Membrane su bogate nezasićenim masnim kiselinama i okružene staničnom tekućinom bogatom kisikom i metalima pa su zato podložne peroksidaciji.

Peroksidacija lipida obično započinje otpuštanjem vodika nezasićene masne kiseline zbog čega nastaje lipidni radikal. Preraspodjela dvostrukih veza rezultira stvaranjem konjugiranih diena. Napad molekulskog kisika stvara lipid peroksi radikal koji će ili izdvojiti atom vodika iz susjedne molekule lipida stvarajući lipidni hidroperoksid ili će nastati lipidni endoperoksid. Stvaranje lipidnog endoperoksida koji sadrži barem tri isprekidane metilenske dvostruke veze može dovesti do stvaranja malondialdehida (MDA) kao produkta oštećenja (Buege i Aust, 1977).

1.4.2 Glutation

Glutation (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicine) je tiol male molekulske mase kojeg nalazimo u biljakama i životinjama (Meister i Anderson, 1984). Jedna od njegovih najvažnijih funkcija unutar stanica je detoksikacija slobodnih radikala i peroksida (Kleinman i Richie, 2000). Unutar stanice sudjeluje u sustavu signaliziranja (reverzibilno se veže na –SH skupinu unutar proteina što može aktivirati i inaktivirati sam protein), modulira staničnu diobu (povećana koncentracija GSH u stanici je povezana s pojačanom diobom stanica) i apoptozu (njegova koncentracija u stanici je snižena tijekom apoptoze) (Lu, 2012).

Sintetizira se iz aminokiselina L-glutamata, L-cisteina i glicina, a reakcije kataliziraju enzimi γ-glutamilcistein sintetaza i GSH sintetaza (Griffith, 1999).

L-glutamat + L-cistein + MgATP → L-γ-glutamil-L-cistein + MgADP + Pi

L-γ-glutamil-L-cistein + glicin + MgATP → glutation + MgADP + Pi

U stanicama je glutation u reduciranom obliku kao tiol (GSH) i kao reducirani disulfid (GSSG), no GSH je dominantan oblik te ga ima >98% od ukupnog glutationa. U eukariotskim stanicama GSH se nalazi u citoplazmi (80-85%), mitohondrijima (10-15%) i endoplazmatskom retikulumu (Sies, 1999).

GSH može biti transportiran kroz biološke membrane pa zato može sudjelovati u vrlo složenom sustavu transporta među organima. Sintetizira se većinom u jetri iz koje se transportira u krvotok kako bi se opskrbila druga tkiva. Isto vrijedi i za GSSG koji prolazi membrane jetrenih kanalića i izlučuje se jetrom.

1.4.3 Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD; E.C. 1.15.1.1.) je enzim koji katalizira reakciju razgradnje superoksida (O^{2-}) u kisik i vodikov peroksid te tako štiti stanicu od toksičnih produkata aerobnog disanja. Superkosid se proizvodi tijekom mnogih procesa u organizmu kao što su aerobni metabolizam, oksidativna fosforilacija i fotosinteza, a njegova reakcija s SOD-om prikazana je rekacijama na slici. Budući da SOD ima ključnu funkciju kontrole razine ROS-ova u organizmu, SOD bi mogao koristitit u terapiji bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Perry i sur., 2010; Liochev i Fridovich, 2010).

$$M^{(n+1)+}\text{-SOD}+O_2^{\bullet -} \longrightarrow M^{n+}\text{-SOD}+O_2$$

$$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$$

Slika 1-3 Reakcija enzima superoksid dismutaze i superoksida

1.4.4 Katalaza

Katalaze (CAT; 1.11.1.6) su skupina citoplazmatskih enzima koji kataliziraju raspad vodikovog peroksida na kisik i vodu. U toj skupini nalaze se enzimi koji sadrže Fe vezano uz hem i Mn enzimi (zvani katalaze-peroksidaze). Sastoje se od četiri polipeptidna lanca od kojih svaki ima od više od 500 aminokiselina (Nicholls, 2012). Svaki je lanac vezan uz hem koji omogućuje da enzim reagira s vodikovim peroksidom.

1.4.5 Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaze (GPx; 1.11.1.9) su skupina filogenetski srodnih enzima. Evolucijski su glutation peroksidaze svrstane u tri skupine: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 i GPx4/GPx7/GPx8. Glutation peroksidaze 1-4 javljaju se u svih sisavaca i po kemijskom su sastavu selenoproteini sa selenocisteinom u katalitičkom središtu. Poznato je da kataliziraju redukciju vodikovog peroksida ili organskih peroksida do vode ili pripadajućih alkohola koristeći glutation kao reducens. Ovi enzimi imaju antioksidacijsku funkciju u različitim dijelovima stanice (Brigelius-Flohe i Maiorino, 2012).

1.5 Antioksidansi

Antioksidansi su skupina spojeva koji organizam štite od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Osim što ih organizam sam proizvodi, unosimo ih i hranom kao proizvode sekundarnog metabolizma biljaka (Robards i sur., 1999). Po kemijskom su sastavu polifenoli, odnosno organske molekule koje se sastoje od jednog ili više aromatskih prstenova na koje je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Oni čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 8.000 različitih spojeva. Ovisno o kemijskoj strukturi polifenoli se dijele na: jednostavne fenole i benzokinone (C5), fenolne kiseline (C6-C1), acetofenone i feniloctene kiseline (C6-C2), hidroksicimetne kiseline, kumarine, izokumarine i kromone (C6-C3), naftokineone (C6-C4), ksantone (C6-C1-C6), stilbene (u koje spada resveratrol) i antrakinone (C6-C2-C6), flavonoide (C6-C3-C6), lignane i neolignane (C6-C3)2, biflavonoide (C6-C3-C6)2, lignine (C6-C3)n, kateholne melanine (C6)n i kondenzirane tanine (C6-C3-C6)n. Flavonoidi čine najveću skupinu polifenola (broj novo otkrivenih polifenola stalno se povećava), a u prirodi se često nalaze u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera što pridonosi velikoj raznolikosti i velikom broju tih spojeva. Vezanje šećera na flavonoide povećava polarnost molekule što je potrebno za pohranjivanje tih spojeva u vakuolama biljnih stanica. Najpoznatiji antioksidansi su askorbinska kiselina (vitamin C), tokoferoli (vitamin E), beta-karoten i resveratrol.

1.5.1 Resveratrol

Iako je resveratrol (RSV) dugo poznat, interes za njegovo djelovanje na organizam se povećao devedesetih godina prošloga stoljeća kada je pronađen u crnom vinu te je pretpostavljeno da ima ulogu u „francuskom paradoksu“ (Siemann i Creasy, 1992). Naime, Francuzi su poznati po konzumaciji hrane bogate zasićenim masnim kiselinama, ali i po konzumaciji vina. Usprkost konzumiranju hrane bogate zasićenim masnim kiselinama, postotak smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti je među najnižima u svijetu. Pretpostavljeno je da bi RSV, odnosno umjerena konzumacija crnog vina mogla biti odgovorna za taj fenomen (Constant, 1997).

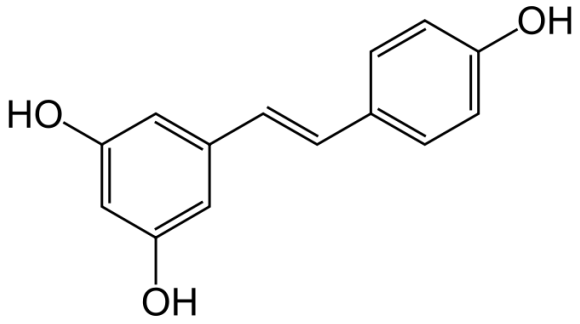
RSV (3,4',5-trihidroksistilben) je pripadnik porodice stilbena među fenolnim spojevima. Pronađen je u mnogim biljkama, a uglavnom u vinovoj lozi. Sintetizira se iz fenilalanina u tkivu lišća vinove loze kao odgovor na gljivičnu infekciju (fitoaleksin). Osim u grožđu, možemo ga naći i u kikirikiju, pistacijama, bobičastom voću i tamnoj čokoladi. U grožđu se nalazi u sjemenkama i koži te ga zbog procesa proizvodnje vina ima više u crnom nego u rozè i bijelom vinu. Njegova biosinteza ovisi o mnogobrojnim čimbenicima kao što su vrsta grožđa, geografsko područje, klima, uvjeti biljnog stresa (biotički ili abiotički), agronomski čimbenici i enološka praksa (Fernandez-Mar i sur., 2012; Olas i Holmsen, 2012).

Biosinteza RSV-a odvija se putem šikiminske kiseline iz fenilalanina. Najvažniji enzimi u ovom procesu su fenilalanin amonij-ligaza, koenzim A ligaza i stilben sintetaza. Stres može potaknuti sintezu tih enzima (Fernandez-Mar i sur., 2012). Stilben sintetaza je enzim koji nije eksprimiran u uvjetima kada nema stresa, no u uvjetima stresa ovaj enzim je otkriven šest sati nakon pojave stresa, a svoj maksimun doseže nakon 30 sati (Soleas i sur., 1997).

U plazmi je najviše RSV-a izmjereno jedan sat nakon oralnog tretmana te ponovo nakon šest sati vjerojatno zbog enterohepatičke cirkulacije konjugiranih metabolita. RSV se izlučuje urinom, ali i fecesom što upućuje na enterohepatičku cirkulaciju ako je aplikacija bila iv (Cottart i sur., 2010). Glavni metabolit je resveratrol-3-O-sulfat.

1.5.1.1 Kemijska svojstva resveratrola

Na sobnoj temperaturi RSV je krutina prljavo bijele boje molekulske mase 228,25 g mol^{-1} i temperature tališta pri 253 °C. Slabo je topljiv u vodi, no topljiv je u mastima i etanolu. U prirodi je uglavnom prisutan u stabilnijem trans- obliku dok pod utjecajem UV zračenja prelazi u cis- oblik.



Slika 1-4 Kemijska struktura resveratrola

Antioksidacijska svojstva RSV-a povezana su s hidroksiklnom skupinom (OH^-) koja "hvata" slobodne radikale proizvedene u živom organizmu (Queiroz i sur., 2009).

1.5.1.2 Mehanizam djelovanja

Budući da se RSV veže za albumine, pretpostavlja se da bi albumini mogli biti prirodno spremište polifenola *in vivo*. U organizmu se brzo metabolizira te do tkiva dolaze njegovi metaboliti, no ljudski enzimi te metabolite mogu lako ponovo pretvoriti u RSV (Rotches-Ribalta i sur., 2012). Najviša koncentracija metabolita RSV-a u plazmi izmjerena je nakon 2-2,5 sati nakon konzumiranja crnog vina. Nakon osam sati primijećeno je drugo povećanje koncentracije zbog čega se pretpostavlja da RSV prolazi enterohepatičku cirkulaciju. Većina metabolita RSV-a u urinu je pronađena 4-8 sati nakon konzumiranja crnog vina (Rotches-Ribalta i sur., 2012).

Mnogobrojna istraživanja potvrdila su korisno djelovanje RSV-a na organizam. Ima protuupalno i antitumorsko djelovanje, štiti od bolesti srca i krvnih žila, djeluje kao regulator za sve tri faze malignih promjena – nastanak, promociju i širenje. Poznato je i njegovo povoljno djelovanje na zdravlje u kombinaciji s nekim drugim antioksidansima. U kombinaciji s kvercetinom i elagičnom kiselinom sinergistički potiče apoptozu leukemijskih stanica (Mertens-Talcott i Percival, 2005), dok u kombinaciji s vitaminom E sprječava lipidnu peroksidaciju (Fang i sur., 2002). Muški štakori tretirani su oralno tijekom 28 dana 1000 puta većom dozom (20 mg kg^{-1}) od one koju čovjek unosi u organizam, no nisu primijećeni nikakvi štetni učinci (Juan i sur., 2002).

Gehm i sur. pretpostavili su da RSV štiti srce i krvne žile zbog svoje estrogenske aktivnosti (Gehm i sur., 1997). Ovu hipotezu su provjerili Slater i sur. pokusom na ovariektomiziranim štakoricama koje su dobivale RSV (Slater i sur., 1999). Njima su mjerili težinu uterusa, HDL kolesterol u plazmi i mineralnu gustoću kostiju. Budući da se niti jedan od mjerenih parametara nije promijenio u odnosu na pozitivnu kontrolu, zaključili su da za zaštitini učinak RSV-a na srce i krvne žile nije odgovorna estrogenska aktivnost.

1.5.1.3 Antioksidacijsko djelovanje

RSV povećava antioksidacijski kapacitet plazme i smanjuje lipidnu peroksidaciju. Istraživanja su provedena na štakorima, svinjama i ljudima, no je li mehanizam njegovog djelovanja izravan ili neizravan, još nije poznato (Wenzel i sur., 2005; Baur i sur., 2006).

1.5.1.4 Kardioprotektivno djelovanje

Postoji nekoliko mehanizama kojima RSV štiti srce i krvne žile od aterosklerotskih promjena. Najvažniji je inhibicija apoptoze, a na taj način i zaštita od različitih bolesti (oštećenje miokarda, ateroskleroza i ventrikularne aritmije). RSV modulira metaboliozam lipida i lipoproteina te na taj način može smanjiti lipidnu peroksidaciju (Das i Das, 2007). RSV

smanjuje agregaciju trombocita *in vitro* i *in vivo* koja ima veliki značaj u nastanku ateroskleroze te olakšava širenje krvnih žila (vazodilataciju) stimuliranjem Ca^{2+}-aktiviranih K kanala povećanjem signalizacije dušikovom oksidom u endotelu krvnih žila (Bertelli i sur., 2007; Wang i sur, 2005). Čini se da je povećanje koncentracije dušikovog (II) oksida (povećanjem ekspresije NO-sintaze i smanjenje inaktivacije NO slobodnim radikalima) glavni mehanizam njegovog kardioprotektivnog djelovanja (Li i sur., 2006; Orallo i sur., 2002).

1.5.1.5 Antitumorsko djelovanje

Antitumorsko djelovanje RSV-a temelji se na inhibiciji enzimske aktivnosti ciklooksigenaze čija je aktivnost rizik za nastanak mnogih vrsta tumora. Osim toga, RSV može suzbiti nastanak tumora zaustavljenjem staničnog ciklusa i poticanjem apoptoze (Aggarwal i sur., 2004). Iako povezanost umjerene konzumacije crnog vina i sprječavanja nastanka karcinoma nije dokazana, studije *in vivo* jasno pokazuju antitumorski potencijal ove molekule. RSV je smanjio rast CaCo-2 stanica i usporio rast tumora dojke te smanjio širenje metastaza (Athar i sur., 2007; La Vecchia i Bosetti, 2006).

1.5.1.6 Ostali korisni učinci resveratrola

Budući da RSV može prijeći krvno-moždanu barijeru, ima i jak neuroprotektivni učinak te može suzbiti disfunkciju neurona kod Huntingtonove bolesti, Alzheimerove bolesti i usporiti napredovanje Parkinsonove bolesti (Parker i sur., 2005; Karlsson i sur., 2000). Dokazano je da RSV produljuje životni vijek vrsta *Saccharomyces cerevisiae* i *Drosophila melanogatser* te da je značajno produžio život miševa koji su hranjeni hranom visoke kalorične vrijednosti (Howitz i sur., 2003; Valenzano i sur., 2006; Baur i sur., 2006). Pretpostavlja se da ima ulogu i u prevenciji dijabetesa i komplikacija dijabetesa (Harikumar i Aggarwal, 2008).

1.5.1.7 Pokusi na životinjskim modelima

Nakon što su štakori tretirani s 4 mL crnog vina koje je sadržavalo 6,5 µg mL^{-1} RSV-a, RSV je pronađen u plazmi i urinu, ali i u srcu, jetri i bubregu (Bertelli i sur., 1996; Fernandez-Mar i sur., 2012). Isto istraživanje napravljeno i na ljudima, a RSV je pronađen u organizmu nakon 15 dana. Zaključeno je da je dovoljno 450 mL crnog vina kako bi koncentracija RSV-a u plazmi ljudi bila između 0,1 i 1 µM (Bertelli i Das, 2009). RSV ima antikancerogeno djelovanje kod koncentracija od 5 do 100 mM, dok je koncentracija koja je dovoljna za zaštitu od kardiovaskularnih bolesti između 0,1 i 1 µM (Bertelli, 2007). Znači da svaka osoba koja umjereno konzumira crno vino u organizam unosi dovoljno RSV-a za zaštitu od kardiovaskularnih bolesti.

Bez obzira na opisana istraživanja, teško je donijeti konačni zaključak o koristi RSV-a. Postoje velike razlike u načinu provođenja pokusa, istraživanja na ljudima provedena su na malom broju ispitanika koji su RSV dobivali kratkotrajno, a razlikuju se i pripravci RSV-a, no RSV bi mogao imati veliko značenje u prevenciji različitih bolesti.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Dosadašnja istraživanja OTA bila su potaknuta njegovom mogućom ulogom u nastanku EN-a pa je to jedan od najčešće istraživanih mikotoksina. Podrobno je istraživana izloženost ljudi iz endemskog kraja tom mikotoksinu, provedena su mnogobrojna istraživanja mehanizma toksičnosti, mutagenosti i kancerogenosti no mehanizam toksičnosti nije u potpunosti razjašnjen. CTN je jedan od najranije otkrivenih mikotoksina, no budući da u razmjerno malobrojnim istraživanjima u odnosu na druge mikotoksine nije otkriveno značajno toksično i kancerogeno djelovanje, novija su istraživanja toksičnog djelovanja CTN-a rijetka. Dosadašnja su istraživanja mogućih učinaka CTN-a usmjerena ispitivanju mutagenih i genotoksičnih svojstava na kulturama stanica, a na pokusnim je životinjama ispitivana njegova teratogenost. Mehanizam toksičnosti CTN-a do sada je istraživan isključivo na kulturama stanica. Iako je hrana rijetko kontaminirana pojedinačnim mikotoksinom, istraživanja provedena na pokusnim životinjama s više mikotoksina su rijetka. Zbog čestog istovremenog pojavljivanja OTA i CTN-a u hrani, ta se je kombinacija mikotoksina više proučavala, no rezultati istraživanja nisu jednoznačni.

Cilj istraživanja bio je utvrditi na pokusnim životinjama sudjeluje li oksidacijski stres u mehanizmu toksičnosti CTN-a, povećava li se oksidacijski stres pri istovremenoj izloženosti životinja tim mikotoksinima te može li se učinak ovih mikotoksina spriječiti primjenom RSV-a. Budući da genotoksičnost CTN-a, za razliku od OTA, nije jednoznačno dokazana, cilj istraživanja bio je i istražiti povećava li se oksidacijsko oštećenje DNA ako su životinje istovremeno izložene djelovanju oba mikotoksina.

Učinak OTA i CTN-a istraživan je u tkivima odraslih muških Wistar štakora koji su tretirani oralno. Oksidacijski stres procijenjen je praćenjem:

1. oštećenja lipida mjerenjem koncentracije MDA,
2. promjene koncentracije GSH, staničnog tiola s antioksidacijskim djelovanjem,
3. promjene katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT i GPx),
4. specifičnog oksidacijskog oštećenja DNA pomoću hOGG1 komet testa.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Kemikalije

- 1, 1, 3, 3 – tetrametoksi propan, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoat (DTNB), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Agaroza, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Boja za proteine 'Serva-Blue G', Serva, Heidelberg, Njemačka
- Butilirani hidroksitoluen (BHT), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Citrinin, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Etanol, CH_3CH_2OH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etidijev bromid, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Etil acetat, $C_4H_8O_2$, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Fosforna kiselina, H_3PO_4, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glutation (GSH), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Gvanidin hidroklorid, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Haemiglobincyanide standard, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Nizozemska
- 8-oksogvanin-DNA-glikozilaza 1 (hOGG1) enzim, Trevigen, Maryland, USA
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH2PO4, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev hidroksid, KOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, HCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Ksantin oksidaza (E.C. 1.17.3.2), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Metafosforna kiselina (MPA), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Metanol HPLC čistoće, CH_3OH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na_2EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x $2H_2O$, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev dihidrogenfosfat dodekahidrat, Na_2HPO_4 x 12 H_2O, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenkarbonat, $NaHCO_3$, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, Na_2CO_3, Kemika, Zagreb, Hrvatska

- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Okratoksin A, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Pufer fosfatni 0,01 M, pH 7,0 (Ransod Sample Diluent), Randox, Crumlin, UK
- Pufer 50 mM, pH 10.2 CAPS/ 0,94 mM EDTA, Randox, Crumlin, UK
- Ransod reagensi, Randox, Crumlin, UK
- Resveratrol, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Tiobarbituratna kiselina, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Trikloroctena kiselina, CCl_3COOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- TRIS, tris(hidroksimetil)aminoetan, $C_4H_{11}NO_3$, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Triton X-100, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Voda HPLC čistoće, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.2 Instrumenti

- Analitička vaga, Mettler Toledo, XN105DR
- Analitička vaga, Mettler Toledo, AE 200
- Spektrofotometar Cecil 9000
- Spektrofotometar Varian Cary 50
- Termostatirani spektrofotometar Varian-CARY 50 Scan
- HPLC sistem, Shimadzu, Kyoto, Japan
    - Degaser (uređaj za uklanjanje otopljenih plinova) DGU 20A3
    - Gradijentna pumpa LC 20AD SP
    - UV-VIS detektor SPD 20AV
    - Fluorescentni detektor RF 20A
    - Termostat za kolonu CTO 20A
    - Autosampler – automatski uzorkivač SIl 20 AC HT
    - Komunikator s računalom CBM 20A
- UPLC-MS/MS sistem, Waters Acquity TQD, Waters, SAD
- pH metar, SevenEasy, Mettler Toledo
- Uređaj za elektroforezu, Life technologies – Applied biosystems, Carlsbad, CA, SAD

- Epifluorescencijski mikroskop, Olympus, Tokio, Japan

3.3 Puferi i otopine

- Fiziološka otopina (0,9% otopina natrijevog klorida)
- Otopina za lizu
    - 2,5 M natrijev klorid
    - 100 mM Na_2EDTA
    - 10 mM TRIS baza
    - 1% natrij lauril sarkozinat
    - 1% Triton X-100
    - pH 10 – podešeno s 10 M NaOH

- Alkalna otopina za denaturaciju i elektroforezu
    - 5 mL 200 mM Na_2EDTA
    - 980 mL H_2O
    - 87,66 g NaCl
    - pH 12,10 – podešeno s 10 M NaOH

- Homogenizacijski pufer
    - 75 mM NaCl
    - 24 mM Na_2EDTA
    - pH 7,4 podešeno s 10 M NaOH

- Neutralizacijski pufer (TRIS HCl)
    - 48,5 g TRIS baza otopljeno u 1L vode
    - pH 7,5 – podešeno s 1M HCl

- 0,3 M fosfatni pufer (PBS)
    - 800 g NaCl
    - 20 g KCl

- 57,72 g Na_2HPO_4 otopljeno u 500 mL vode
- 24,40 g NaH_2PO_4 otopljeno u 500 mL vode
- pH 7,4, po potrebi se podešava s 1M HCl ili 10 M NaO

- Pufer FLARE (Trevigen) 25x
  - 20 mM HEPES
  - 2 M KCl
  - 150 mM Na2EDTA
  - pH 7,4 (ne podešava se jer se pufer kupuje gotov)

- Pufer FLARE™ (Trevigen) 1x
  - 4 ml stock otopine pufera FLARE™ (Trevigen) 25x
  - 96 ml redestilirane vode

- hOGG1 reakcijska otopina
  - otopina 1: 32 µL pufer FLARE™ (Trevigen) 25x + 768 µL redestilirane vode
  - otopina 2: 32 µL pufer FLARE™ (Trevigen) 25x + 767,2 µL redestilirane vode + 0,8 µL hOGG1 enzima

3.3.1 Otopine mikotoksina i resveratrola za tretman pokusnih životinja

Mikotoksini okratoksin A i citrinin te antioksidans resveratrol nabavljeni su od proizvođača Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

Okratoksin A: Mr=403,81, čistoće >=98% iz *Petromyces albertensis*. Prije tretmana otopljen je u 51 mM $NaHCO_3$ i napravljene su koncentracije 125 i 250 µg mL^{-1}. Životinje su tretirane dozama od 125 i 250 µg OTA kg^{-1} tjelesne mase (tm).

Citrinin: Mr=250,25, čistoće >=98% iz *Penicillium citrinum*. Prije tretmana otopljen je u 50 mM Na_2CO_3 razrijeđen u finalnoj koncentraciji od 20 mg mL^{-1}. Životinje su tretirane dozom od 20 mg CTN kg^{-1} tm.

Resveratrol: Mr=228,24, čistoće >99%. Prije tretmana je otopljen u 5% etanolu do koncentracije 10 mg mL^{-1}. Životinje su tretirane dozom od 10 mg RSV-a kg^{-1} tm.

3.4 Životinje

U pokusima su korišteni mužjaci štakora soja Wistar stari deset tjedana i mase 230-270 grama na početku pokusa. Štakori su nasumce raspoređeni u skupine. Životinje su tijekom pokusa držane u makrolonskim kavezima sa sterilnom steljom te su imale neograničeni pristup hrani (Mucedola, Settimo, Italija) i vodi. Svaki treći dan su boravile u metaboličkom kavezu 24 sata bez pristupa hrani, a pristup vodi bio je neograničen. Kavezi su bili u prostoriji s kontroliranom temperaturom (22 ˚C) uz ciklus izmjene svjetla i tame od 12 sati. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Postupak sa životinjama u potpunosti je bio u skladu sa svim propisima Zakona o dobrobiti životinja.

3.4.1 Tretman životinja

Pokusi su provedeni u četiri zasebna dijela, a životinje su toksine i RSV dobivale gastričnom sondom.

1. Pokus okratoksin A

Štakori su raspodijeljeni u tri skupine (n=4) koje su dobivale:

A) otapalo (51 mM $NaHCO_3$),

B) OTA (125 µg kg^{-1} tm) i

C) OTA (250 µg kg^{-1} tm).

Životinje su tretirane dnevno 21 dan u isto doba dana.

2. Pokus citrinin

Štakori su podijeljeni u dvije skupine (n=4) koje su dobivale:

A) otapalo (50 mM Na_2CO_3) i

B) CTN (20 µg kg^{-1} tm).

Životinje su tretirane dnevno dva dana u isto doba dana. Oralna LD50 vrijednost za štakora je 50 mg kg^{-1} (Sakai, 1955 u Dunn i sur., 1983). U većini dostupnih istraživanja, životinje su jednokratno tretirane visokim dozama CTN-a (Berndt i Hayes, 1977). Odlučeno je da će životinje biti tretirane ukupnom nižom dozom CTN-a od one koja je korištena u literaturi zbog istovremenog tretmana s OTA. Doza je primijenjena u dva dana kako životinje ne bi uginule tijekom pokusa. Budući da se CTN vrlo brzo eliminira iz organizma, a za djelovanje OTA je potrebna njegova akumulacija u organizmu, odabrana su posljednja dva dana pokusa za tretman CTN-om kako bi bio vidljiviji zajednički učinak OTA i CTN-a te kako bi bilo moguće izmjeriti koncentraciju CTN-a u pojedinim tkivima.

3. Pokus okratoksin A + citrinin

Štakori su podijeljeni u tri skupine (n=6) koje su dobivale:

A) otapalo (51 mM $NaHCO_3$),

B) OTA (125 µg kg^{-1} tm) i CTN (20 mg kg^{-1} tm)

C) OTA (250 µg kg^{-1} tm) i CTN (20 mg kg^{-1} tm).

Životinje su tretirane dnevno s OTA 21 dan u isto doba dana, a zadnja dva dana pokusa i s CTN-om.

4. Pokus okratoksin A + citrinin + resveratrol

Štakori su podijeljeni u četiri skupine (n=6) koje su dobivale:

A) otapalo (51 mM $NaHCO_3$),

B) RSV (10 mg kg^{-1} tm),

C) OTA (125 µg kg^{-1} tm), CTN (20 mg kg^{-1} tm) i RSV (10 mg kg^{-1} tm).

D) OTA (250 µg kg^{-1} tm), CTN (20 mg kg^{-1} tm) i RSV (10 mg kg^{-1} tm).

Životinje su tretirane s OTA i RSV-om dnevno tijekom 21 dana u isto doba dana. Štakori iz obje tretirane skupine tretirani su i s CTN-om tijekom zadnja dva dana pokusa.

Svaki treći dan štakori su bili u metaboličkom kavezu tijekom 24 sata te je sakupljan urin.

Nakon završetka pokusa životinje su žrtvovane te su sakupljeni uzorci krvi (iz srca), bubrezi, jetra i mozak. Krv je zaleđena do analize kao puna krv, plazma i eritrociti. Dio jetre i bubrega potreban za određivanje oksidacijskog oštećenja DNA (komet test) sakupljen je odmah te je isti dan napravljen pokus. Mozak i ostatak jetre i bubrega zaleđeni su do analize.

3.4.2 Metode

3.4.2.1 Homogeniziranje tkiva

Neposredno prije analize odvagana je potrebna masa jetre i bubrega te je napravljen 10%-tni homogenat u fiziološkoj otopini. 10%-tni homogenati mozga su napravljeni od polovice mozga prerezanog po uzdužnoj osi.

3.4.2.2 Mjerenje koncentracije OTA u urinu i tkivima

Esktrakcija OTA

Urin

Estrakcija OTA iz urina napravljena je po metodi koju su opisali Breitholtz-Emanuelsson i sur. (1993).

1 mL urina

5 mL metanola

500 µL 1M HCl

5 mL kloroforma

Smjesa je miješana na rotacijskoj mješalici, a nakon toga dva puta ekstrahirana kloroformom i isprana vodom.

Tkiva

Estrakcija OTA iz tkiva napravljena je po modificiranoj metodi koju su opisali von Bauer i sur. (1984).

10% homogenat tkiva

10 mL kloroforma

35 mL smjese 0,05M HCl i 0,5M $MgCl_2$

Smjesa je miješana na rotacijskoj mješalici, a nakon toga dva puta ekstrahirana kloroformom i isprana s $NaHCO_3$.

Kloroform u kojem se nalazio ekstrahirani OTA uparen je do suha u struji dušika i injektiran u HPLC.

3.4.2.3 Mjerenje koncentracije OTA metodom visokoučinske tekućinske kromatografije

Koncentracija OTA u urinu i tkivima izmjerena je metodom visokoučinske tekućinske kromatografije kao što je opisano u radu Flajs i sur. (2009). Upareni uzorak OTA otopljen je u 200 µL mobilne faze koja se sastojala od metanola, vode i octene kiseline (70:30:2). Protok mobilne faze bio je 0,5 mL min^{-1}, a valna duljina emisije i ekscitacije na fluorecentnom detektoru namješrena je na 336, odnosno 464 nm. Upotrijebljavana je pretkolona (4,0x4,0 mm) i kolona (125,x4,0 mm, Merck, Darmstadt, Njemačka), a analiza je izvršena na HPLC-u koji se sastojao od uređaja za uklanjanje zraka, izokratne pumpe, uređaja za održavanje stalne temperature kolone i fluorescentnog detektora (Shimadzu, Kyoto, Japan). Limit detekcije za ovu metodu bio je 5 ng L^{-1}.

3.4.2.4 Mjerenje koncentracije OTA i CTN-a u tkivima pomoću UPLC-MS/MS-a

Priprema uzoraka

Odvagano je dva grama tkiva bubrega, jetre ili mozga i pomiješano sa smjesom koja je sadržavala metanol i vodu u omjeru 80:20 (v/v), 1% octene kiseline, 4 g Na2SO4 i 1 g CH3COONa. Smjesa je miješana na rotacijskoj mješalici 30 minuta te nakon toga centrifugirana. 5 µL supernatanta injektirano je u UPLC-MS/MS.

Analiza je napravljena na koloni reverzne faze Hibar Purospher STAR HR 50x2.1mm, veličine čestica 2 µm, a mobilna faza sastojala se od vodene otopine 0,1% octene kiseline i metanola. Protok je bio 0,53 mL min-1, a analiza se odvijala po sljedećem pogramu:

0.1% CH3COOH = A
CH3OH = B

0. min - 95%A - 5%B
0.61 min - 95%A - 5% B
4.5 min - 5% A - 95% B
5. min - 95% A - 5%B

3.4.2.5 Mjerenje koncentracije MDA u tkivima i plazmi

Zbog oštećenja polinezasićenih masnih kiselina nastaje MDA koji je pouzdan pokazatelj peroksidacije lipida. Koncentracija MDA određivana je izvornom metodom koju su opisali Drury i sur. (1997) za određivanje MDA u plazmi te prilagođena za određivanje MDA u homogenatima tkiva. Metoda se temelji na vezanju MDA s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje ružičasti spoj koji apsorbira svjetlost valne duljne od 538 nm. Kao standard za baždarnu krivulju korišten je 1,1,3,3-tetraetoksi propan. Daljnja oksidacija spriječena je dodavanjem butiliranog hidroksitoluena (BHT).

Postupak:

50 µL uzorka (plazme ili homogenata tkiva)

5 µL BHT (0,2%, w/v)

750 µL fosforne kiseline (1%, v/v)

250 µL TBA (0,6%, w/v)

445 µL vode

Uzorci s reagensima su promiješani i inkubirani u kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Reakcija je zaustavljena hlađenjem u vodi i 20 µL uzorka injektirano je u HPLC.

HPLC

Visokoučinski tekućinski kromatograf sastoji se od uređaja koji uklanja otopljene plinove, izokratne i gradijentne pumpe, termostatiranog prostora za kolonu, UV i fluorescentnog detektora (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Pretkolona i analitička kolona su C-18 obrnute faze (LiChrospher, Merck, Darmstadt, Njemačka) s česticama veličine 5 µm. Dimenzije pretkolone su 4,0 x 4,0, a kolone 4,0 x 125,0 mm.

Iz mobilne faze koja se sastojala od 50 mM KH_2PO_4 i metanola (60:40, v/v, pH 6,8) uklonjen je otopljeni zrak u ultrazvučnoj kupelji (15 minuta). Protok mobilne faze bio je 1 mL min^{-1}. MDA je mjeren UV detektorom pri valnoj duljini od 532 nm. Injektirano je 20 µm uzorka, a temperature kolone je bila 32 °C. Pri tim uvjetima vrijeme zadržavanja MDA na koloni bilo je 2,5 minute.

3.4.2.6 Određivanje koncentracije glutationa (GSH)

Koncentracija glutationa mjerena je izvornom spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (1958) u plazmi, bubrezima, jetri i mozgu.

Metoda se temelji na vezanju glutationa (tiola) s 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoičnom kiselinom (DTNB). U ovoj brzoj reakciji cijepa se disulfidna veza te nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat (NTB^-), koji se ionizira do NTB^{2-} koji je žute boje i apsorbira svjetlost valne duljine od 412 nm.

Postupak

Homogenati tkiva (10%) centrifugirani su 10 minuta pri 10.000 G. U 300 µL supernatanta dodano je 100 µL TCA (5%-tne otopine). Smjesa je promiješana na tresilici i centrifugirana 10 minuta na 10.000 G. Pripremljene su otopine slijepe probe, standarda GSH i uzoraka za mjerenje apsorbancije na 412 nm:

100 µL H_2O/100 µL standarda/100 µL homogenata tkiva ili plazme

850 µL fosfatnog pufera

50 µL DTNB

Apsorbancija GSH mjerena je u triplikatu. DTNB je dodan neposredno prije mjerenja apsorbancije svakog uzorka jer je razmjerno nestabilan pri sobnoj temperaturi. Svaki uzorak promiješan je na vortex mješalici. Mjerenje je provedeno tako da se paralelno mjerila apsorbancija slijepe probe i standarda ili pojedinih uzoraka. Koncentracija GSH iz uzoraka izračunata je iz formule Lamber-Beerovog zakona, prema kojem je apsorbancija jednaka umnošku ekstinkcijskog koeficijenta (ε) (mjera sposobnosti neke tvari da apsorbira i raspršti zračenje), širine kivete (b) i koncentracije tvari (c): $A = \varepsilon\ b\ c$ ili iz baždarnog dijagrama.

3.4.2.7 Određivanje koncentracije hemoglobina

Hemoglobin (Hb) u punoj krvi i eritrocitima mjeren je spektrofotometrijski pri valnoj duljini apsorbancije od 540 nm standardiziranom cijanomethemoglobin metodom koristeći Haemiglobincyanide standard.

3.4.2.8 Određivanje katalitičke aktivnosti enzima

3.4.2.8.1 Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a

3.4.2.8.1.1 Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a u eritrocitima

Katalitička aktivnost SOD-a u eritrocitima mjerena je prema Europskoj standardiziranoj metodi (EC-FLAIR) (Belsten i Wright, 1995b) korištenjem komercijalnog Ransod reagensa prema uputama proizvođača. Ksantin oksidaza odgovorna je za pretvorbu ksantina u mokraćnu kiselinu pri čemu se kao nusprodukt stvara superoksidni anion. Superoksidni anion raspoloživ je za redukciju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolij klorida (INT) u obojeni formazon (A505), dok se dio superoksidnog aniona, usporedno, katalitički razgrađuje djelovanjem enzima SOD-a. Što je u uzorku veća aktivnost SOD-a to je inhibicija redukcije INT-a veća.

Postupak:

- Isprani eritrociti hemolizirani su i načinjeno je radno razrjeđenje (100 puta).

- U predinkubiranu reakcijsku smjesu dodan je razrijeđeni uzorak. Reakcija otpočinje dodavanjem otopine ksantin oksidaze pri čemu nastaju superoksidni radikali koji u reakciji s INT-om stvaraju obojeni formazon.

- Aktivnost SOD-a mjerena je spektrofotometrom (Cary 50, Varian) pri valnoj duljini od 505 nm i temperaturi od 37 °C. Što je aktivnost SOD-a veća, to je manja koncentracija nastalog produkta.

- Početna apsorbancija A30 mjerena je nakon 30 s, a konačna apsorbancija A210 nakon 210 s, iz čega je izračunata ΔA, a potom i postotak inhibicije.

- Rezultati mjerenja apsorbancije poznatih koncentracija korišteni su za baždarni pravac u lin-log mjerilu.

- Dobivena vrijednost aktivnosti enzima u hemolizatu izražena se jedinicom U mL^{-1} krvi. Aktivnost SOD-a podijeljena je s koncentracijom hemoglobina i izražena kao aktivnost u gramu hemoglobina (U g^{-1} Hb).

3.4.2.8.1.2 Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a u plazmi

Postupak

680 µL supstrata (predinkubiran u termobloku pri 37 °C, 15 min)

20 µL uzorka/standarda

100 µL ksantin oksidaze (predinkubirana u termobloku pri 37 °C, 15 min)

Nakon dodavanja ksantin oksidaze uzorak je odmah promiješan uz istovremeno započeto mjerenje.

3.4.2.8.2 Određivanje katalitičke aktivnosti glutation peroksidaze

Za određivanje aktivnosti GPx-a u krvi korištena je Europska standardizirana metoda (Belsten i Wright, 1995a). T-butil hidroperoksid oksidira glutation što se mjeri spektrofotometrijskim praćenjem smanjenja koncentracije β-NADP pri apsorbanciji od 340 nm. Jedna jedinica aktivnosti GPX-a je broj mikromolova β-NADPH oksidiranih u minuti. Rezultati su izraženi kao količnik jedinice aktivnosti i masene koncentracije hemoglobina.

3.4.2.8.3 Određivanje katalitičke aktivnosti CAT-a

Katalitička aktivnost CAT mjerena je izvornom spektrofotometrijskom metodom (Aebi, 1984). Metoda se temelji na spekrofotometrijskom mjerenju razgradnje H_2O_2 zbog čega dolazi do pada apsorbancije na valnoj duljini od 240 nm (UV područje). Razlika u apsorbanciji u jedinici vremena jest mjera katalitičke aktivnosti katalaze. Što je više katalaze u uzorku, to će razlika u apsorbanciji unutar nekog vremenskog razdoblja biti veća jer se razgrađuje više H_2O_2.

Postupak:

- Uzorak homogenata jetre ili bubrega, odnosno hemolizata krvi razrijeđen je fosfatnim puferom (50 mM, pH 7,0) 2.000 ili 1.000 puta.
- Razrijeđeni uzorak (2 mL) pomiješan je s 1,0 mL H_2O_2 (30 mM).
- Apsorbancija svakog uzorka mjerena je prema svojoj slijepoj probi koja sadrži 2,0 razrijeđenog uzorka i 1,0 mL fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,0).
- Pad apsorbancije praćen je tijekom 30 sekundi pri valnoj duljini od 240 nm i temperaturi od 25 °C.
- Katalitička aktivnost katalaze izračunata je pomoću molarnog ekstinkcijskog koeficijenta 40 $mM^{-1}cm^{-1}$.

3.4.2.9 Komet test

hOGG1 komet test napravljen je prema metodi koju su opisali Mladinić i sur. 2009. Ovaj test temelji se na izoliranju pojedinih stanica iz tkiva homogenizacijom te denaturacije tijekom koje dolazi do pucanja vodikovih veza i razmatanja komplementarnih lanaca DNA. Uslijed narušene strukture na mjestu oštećenja DNA i napetosti koja se javlja uslijed rotacije (tijekom denaturacije) na tom istom mjestu lanac DNA puca. Tijekom elektroforeze, a zbog oštećenja koja su nastala u kemijskoj strukturi DNA, gubi se visoka organizacija kvarterne strukture DNA i ona se opušta (engl. relax/relaxed loops). U takvoj DNA, s opuštenim regijama unutar DNA i oslobođenim slobodnim krajevima fragmenata lanaca DNA koji su nastali uslijed loma, izloženoj električnom polju tijekom elektroforeze, relaksirane regije i oslobođeni krajevi putuju prema anodi i polako izlaze iz nukleoida. Nukleoid s neoštećenom DNA izgleda pravilno okruglo, poput sfere, a nukleoid s oštećenom DNA iz sfere ima izduženu tvorbu koju tvore izvučene relaksirane regije i krajevi fragmenata lanaca DNA koji su nastali zbog loma. Sferični dio koji predstavlja nukleoid naziva se glava kometa, a tvorba iza glave rep kometa.

Preparati komet testa analizirani su pomoću programskog paketa za analizu. Preparat je stavljen pod epifluorescencijski mikroskop, obasjan UV svjetlošću točno određene valne duljine (koje), sliku hvata kamera spojena na računalo s programskim paketom. Program mjeri dužinu repa počevši od središta glave do najudaljenijeg dijela genomske DNA koji je migrirao u električnom polju iz nukleoida. Dužina repa označava maksimalnu udaljenost na koju su dijelovi DNA zahvaćeni oštećenjem migrirali u gelu. Što je više oštećenja, rep je duži. Intenzitet repa određuje se usporedbom intenziteta fluorescencije područja repa kometa s intenzitetom fluorescencije glave kometa i korigira se s obzirom na pozadinsku fluorescenciju. U kometu je DNA raspoređena tako da je dio u glavi, a dio u repu i zajedno čine 100% genoma. Zbroj intenziteta fluorescencije glave i fluorescencije repa vrednuje se vrijednošću 100. Stoga udio intenziteta fluorescencije koji otpada na područje repa odgovara postotku genomske DNA koja je iz nukleoida migrirala u rep. Time intenzitet fluorescencije izravno predstvalja% genomske DNA koja tvori rep i koja je zahvaćena oštećenjima.

Nakon žrtvovanja životinja uzorkovan je 0,1 g tkiva jetre i bubrega. Tkivo je isprano u homogenizacijskom puferu i u 1 ml istog pufera mehanički homogenizirano. Od svakog uzorka organa (homogenata) izrađena su dva preparata. 10 µl homogenata resuspendirano je u 100 µl 1% otopine agaroze niske temperature tališta u PBS-u (Trevigen). Agaroza je bila na temperaturi od 37 °C. Suspenzija je nanešena na predmetna stakalca prethodno uronjena u 1% otopinu agaroze normalne temperature tališta i osušena. Suspenzija je pokrivena predmetnim stakalcem i ostavljena na ledu 10 minuta.

Predmetno stakalce je uklonjeno, a preparat uronjen u pufer za lizu stanica koji je ohlađen na 4 °C te ostavljeno 24 sata.

Postupak:

- Od svakog uzorka izrađena su 2 preparata. Jedan je tretiran s 50 µL pufera, a drugi istovremeno s 50 µL otopine enzima hOGG1.
- Preparati su isprani tri puta FLARE™ puferom.
- Inkubirani su na 37 °C 10 minuta te nakon toga uronjeni u alkalnu otopinu za denaturaciju i elektroforezu tijekom 15 minuta uz jednu izmjenu otopine svježom.

- Preparati su premješteni u kadicu za elektroforezu s alkalnom otopinom za denaturaciju i elektroforezu. Elektroforeza je trajala 20 minuta, pri stalnom naponu 21 V i jakosti struje od 300 mA.
- Preparati su ispirani:
    - tri puta s TRIS HCl puferom u trajanju od pet minuta.
    - 70%-tnim etanolom i ostavljeni 10 minuta.
    - 96%-tnim etanolom i ostavljeni 10 minuta.
- Preparati su osušeni i obojeni otopinom etidijevog bromida (20 g mL^{-1})
- Svako stakalce je pregledano pod povećanjem od 250 puta na epifluorescencijskom mikroskopu (Olympus, Tokio, Japan)

Na svakom je stakalcu analizirano 100 nukleoida te su izmjereni duljina i intenzitet repa (% DNA u repu) koristeći Comet Assay IV analysis system (Perceptive Instruments, Suffolk, Velika Britanija). Oksidacijsko oštećenje DNA prikazano je kao razlika srednje vrijednosti mjerenih parametara između preparata tretiranih hOGG1 enzimom i onih tretiranih FLARE puferom.

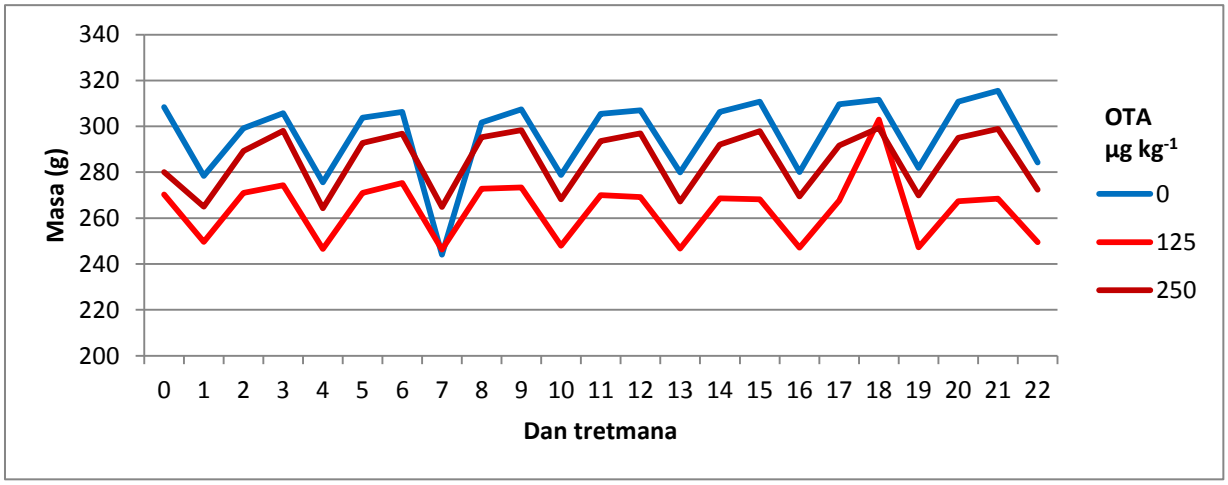
4 STATISTIČKA OBRADA

Rezultati dobiveni mjerenjem volumena urina izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama aritmetičke sredine (n=4 i n=6). Rezultati mjerenja koncentracija MDA i GSH i katalitičke aktivnosti SOD-a, CAT-a i GPx-a prikazani su kao postotna vrijednost u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu (n=4 i n=6). Rezultati mjerenja duljine i intenziteta repa kometa izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama aritmetičke sredine (n=4 i n=6) te kao postotna vrijednost u odnosu na skupinu tretiranu puferom. Testiranje značajnosti promjena u tretiranim skupinama životinja u odnosu na kontrolne te promjena izazvanih djelovanjem pojedinačnih mikotoksina u odnosu na njihove kombinacije provedeno je analizom varijance (ANOVA on Ranks) i Tukey post testom multiple komparacije na razini značajnosti $p<0,05$. Za statističku obradu podataka korišten je program STATISTICA 10.0.

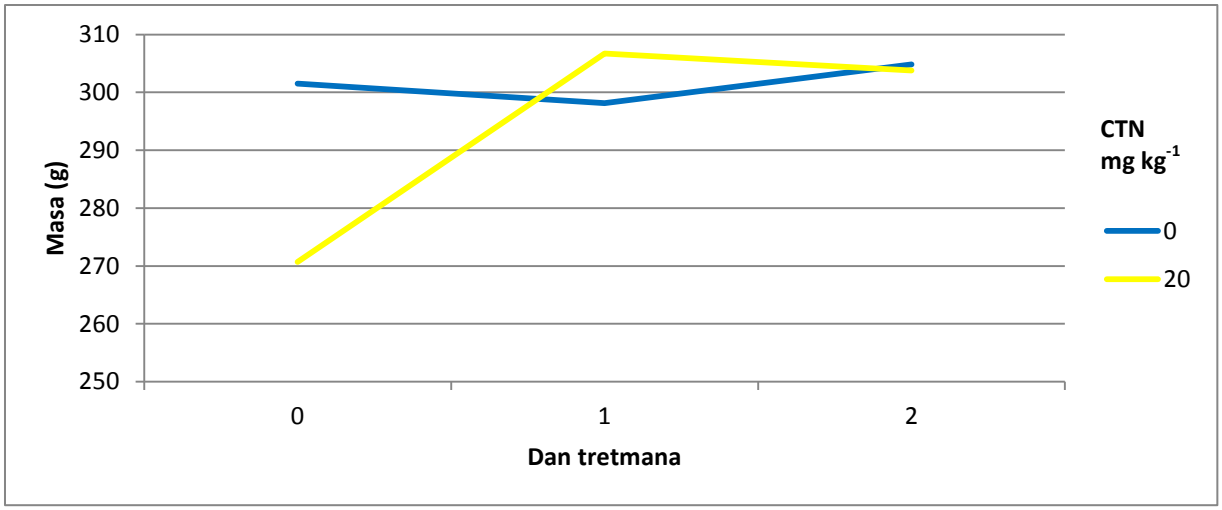
5 REZULTATI

5.1 Opće stanje životinja

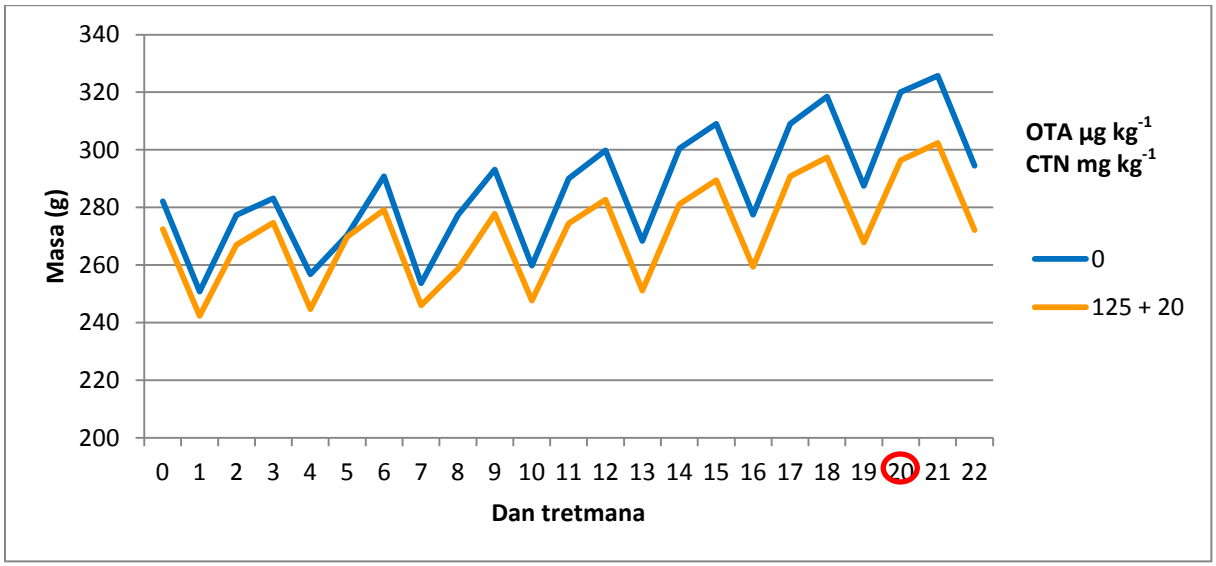
Tijekom trajanja pokusa kontrolne i tretirane životinje bile su dobrog općeg stanja bez znakova trovanja. U promatranom razdoblju nije došlo do ugibanja životinja. Životinje su držane po skupinama u makrolonskim kavezima, a prije prvog tretmana i svaki treći dan stavljane su zasebno u metaboličke kaveze radi sakupljanja urina tijekom 24 sata. Životinje su vagane svaki dan neposredno prije tretmana i na dan žrtvovanja. Mase životinja prikazane su na slikama od 5-1 do 5-6.



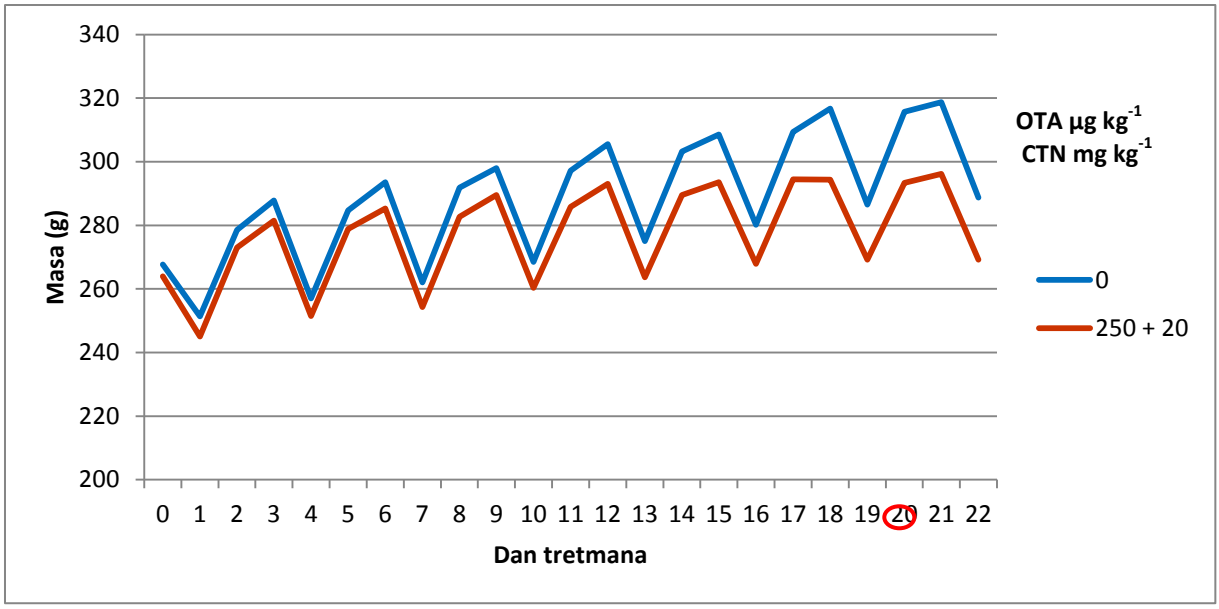
Slika 5-1 Mase kontrolnih životinja (0; n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mase skupine.



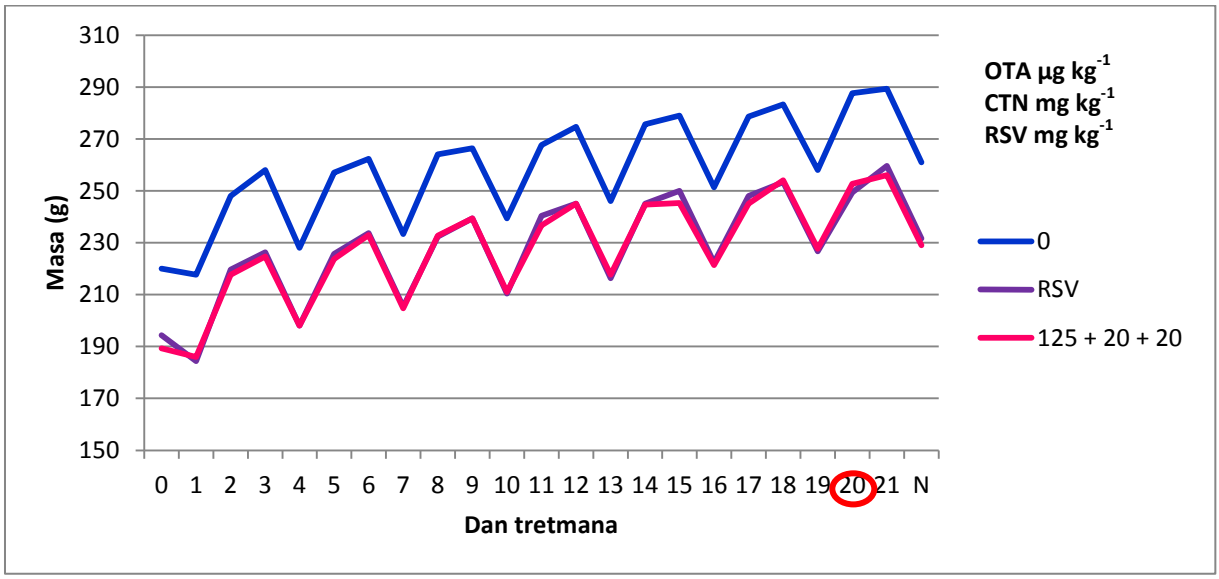
Slika 5-2 Mase kontrolnih životinja (0; n=4) i životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom dva dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mase skupine.



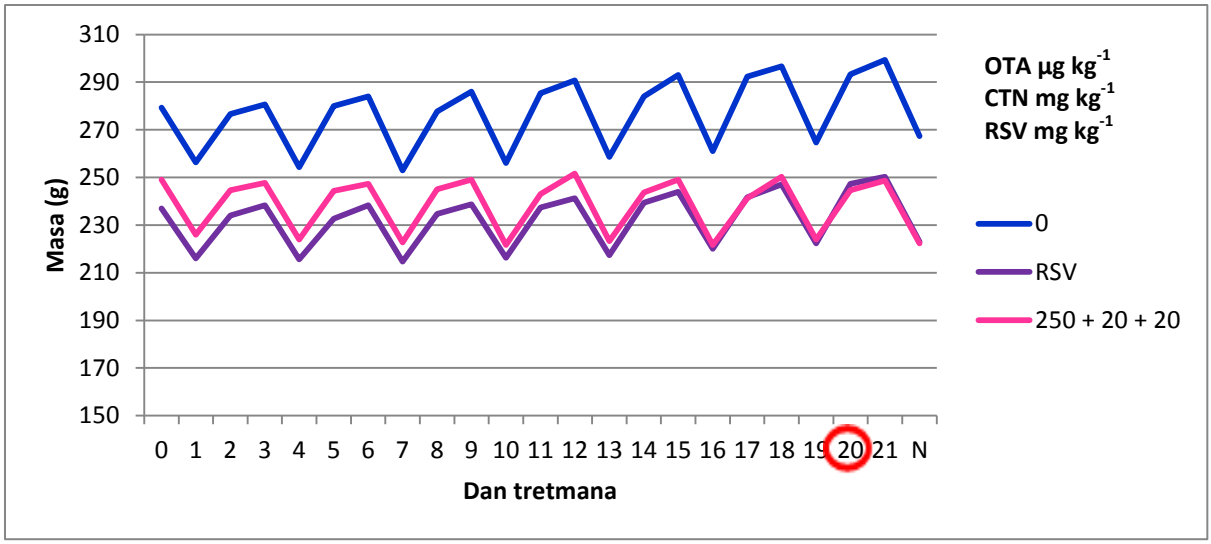
Slika 5-3 Mase kontrolnih životinja (0; n=6) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 µg kg^{-1} tm; n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=6) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mase skupine.



Slika 5-4 Mase kontrolnih životinja (0; n=6) i životinja tretiranih okratoksinom A (250 µg kg^{-1} tm; n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=6) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mase skupine.



Slika 5-5 Mase kontrolnih životinja (0; n=4), životinja tretiranih resveratrolom (RSV; n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 µg kg^{-1} tm; n=4) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mase skupine.



Slika 5-6 Mase životinja u kontrolnoj skupini (0; n=4), životinja tretiranih resveratrolom (RSV; n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (250 µg kg^{-1} tm; n=4) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mase skupine.

Rezultati mjerenja mase životinja ukazuju da promjena mase životinja nije ovisila o spoju s kojim su životinje tretirane. Masa životinja se smanjivala (20-30 g) tijekom boravka u metaboličkom kavezu kada nisu imale pristup hrani. Nakon povratka u makrolonske kaveze njihova se masa povećala. Nakon dva dana boravka u zajedničkim kavezima sa slobodnim pristupom hrani i vodi, masa im se povećala za nekoliko grama (2-10). Tijekom tretmana od 21 dan masa svih životinja je jednoliko rasla (10-30 grama).

Urin svih životinja sakupljan je tijekom 24 sata prije početka pokusa, a zatim svaki treći dan. Izmjereni volumeni urina prikazani su u tablicama 5-1 – 5-4.

Tablica 5-1 Volumen urina kontrolnih životinja (0; n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan. Rezultati volumena urina prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tretman	Dan tretmana							
OTA (µgkg^{-1})	0	3	6	9	12	15	18	21
	Volumen urina (mL)							
0	25±13	22±9	26±21	16±7	17±6	16±7	16±6	18±7
125	30±11	22±12	23±8	22±7	21±9	17±6	23±6	21±5
250	30±7	20±8	20±3	18±2	16±2	15±2	16±2	15±2

Tablica 5-2 Volumen urina kontrolnih životinja (0; n=4) i životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom dva dana. Rezultati volumena urina prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tretman	Dan tretmana	
CTN (mgkg^{-1})	1	2
	Volumen urina (mL)	
0	18±8	12±2
20	15±4	13±2

Tablica 5-3 Volumen urina kontrolnih životinja (0; n=6) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm; n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=6) posljednja dva dana pokusa. Rezultati volumena urina prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tretman	Dan tretmana							
OTA (µgkg^{-1}) + CTN (mgkg^{-1})	0	3	6	9	12	15	18	21
	Volumen urina (mL)							
0	32±17	24±12	17±7	15±5	17±6	17±6	24±12	19±6
125 + 20	27±13	23±7	18±3	19±5	16±5	19±4	22±7	19±3
0	24±5	26±11	23±10	23±8	20±6	20±6	20±6	22±6
250 + 20	19±8	26±4	25±5	23±7	20±6	20±6	20±5	21±7

Tablica 5-4 Volumen urina kontrolnih životinja (0; n=4), životinja tretiranih resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati volumena urina prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

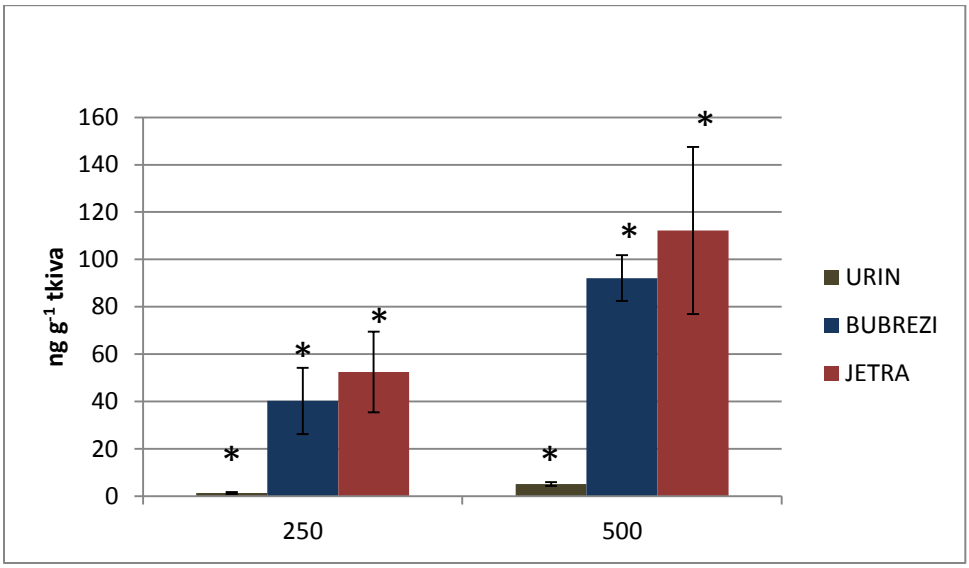
Tretman	Dan tretmana							
OTA (µgkg^{-1}) + CTN (mgkg^{-1}) + RSV (mgkg^{-1})	0	3	6	9	12	15	18	21
	Volumen urina (mL)							
0	32±2	15±4	16±4	11±2	15±3	13±3	16±8	21±6
RSV 20	11±16	20±3	22±2	19±2	22±6	18±4	21±5	16±4
125 + 20 + 20	31±14	16±5	21±10	18±6	19±5	13±4	19±3	22±11
0	21±8	22±14	32±7	23±2	27±6	21±4	19±6	19±3
RSV 20	16±6	21±10	21±12	18±11	24±7	20±8	19±5	17±3
250 + 20 +20	13±6	28±16	22±10	19±9	20±7	19±10	17±9	22±12

Iz prikazanih rezultata mjerenja volumena urina vidljivo je da količina izlučenog urina nije povezana s tretmanom.

5.2 Mjerenje koncentracije mikotoksina

5.2.1 OTA u urinu, bubregu i jetri u preliminarnom pokusu

Koncentracija OTA mjerena je u urinu, bubrezima i jetri pokusnih životinja tretiranih s OTA (250 i 500 µg kg^{-1} tm) i uspoređena s vrijednostima u kontrolnim životinjama.



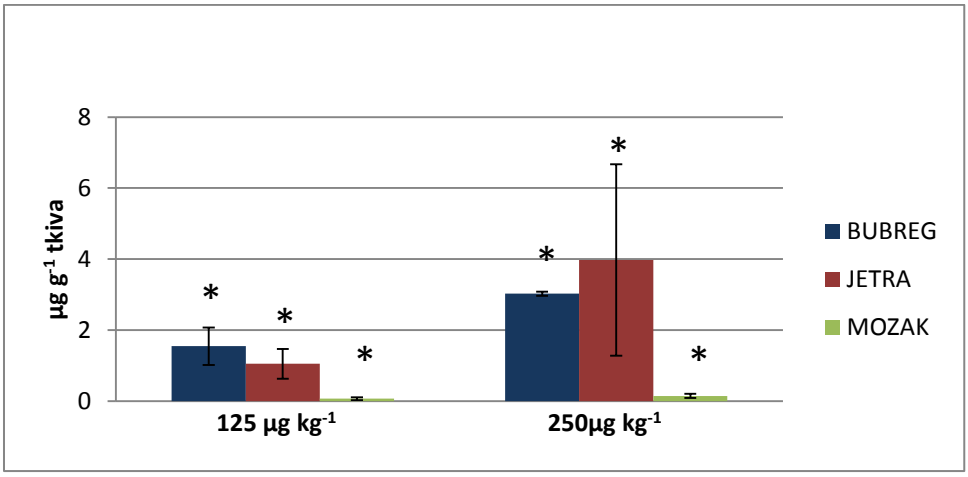
*različito od kontrole, p<0,05

Slika 5-7 Koncentracija okratoksina A u urinu, bubregu i jetri kontrolnih životinja (0; n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (250 i 500 µg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 10 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Nakon tretmana s OTA (250 i 500 µg kg^{-1} tm tijekom 10 dana) izmjerena je koncentracija OTA u urinu, bubrezima i jetri (Slika 5-7). Promjena koncentracije OTA u bila je značajna u urinu i oba mjerena organa (5,10±0,80, 92,10±6,64 i 112,21±35,36 ng g^{-1} tkiva) životinja koje su tretirane višom dozom OTA u odnosu na kontrolu (0). U preliminarnom pokusu životinje su bile tretirane s OTA 10 dana svaki drugi dan dozom od 250 i 500 µg kg^{-1} tm. Budući da se koncentracija MDA povećala samo nakon tretmana od 500 µg kg^{-1} tm, zaključeno je da bi trebalo istražiti utjecaj svakodnevnog tretmana s OTA na oksidacijski stres te zbog toga sniziti doze OTA.

5.2.2 Mjerenje koncentracije OTA i CTN-a u buregu, jetri i mozgu

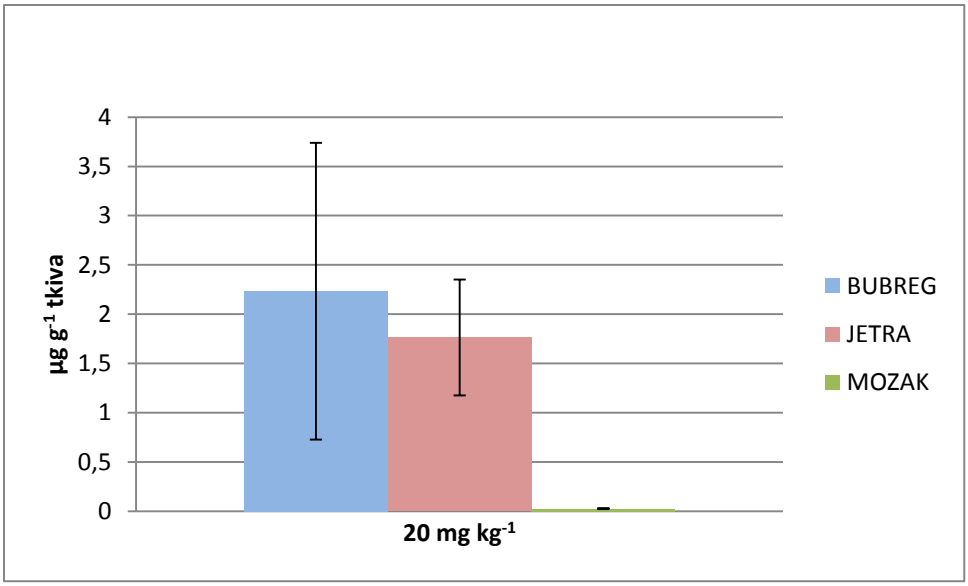
Koncentracija OTA i CTN-a mjerena je u bubregu, jetri i mozgu pokusnih životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm), CTN-om (20 mg kg^{-1}), zajedničnim tretmanom s oba mikotoksina te zajedničkim tretmanom s oba mikotoksina i RSV-om (20 mg kg^{-1}) i uspoređena s vrijednostima u kontrolnim životinjama. Životinje su s OTA i RSV-om tretirane tijekom 21 dan, a s CTN-om posljedna dva dana pokusa.



*različito od kontrole, p<0,05

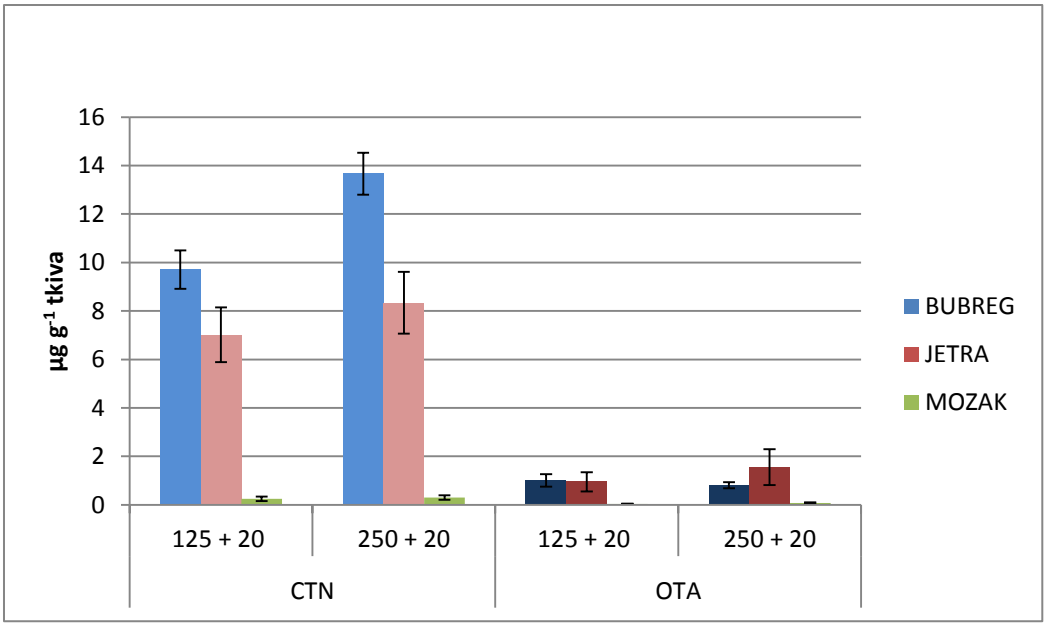
Slika 5-8 Koncentracija okratoksina A u bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

U bubregu, jetri i mozgu životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan izmjerena je koncentracija OTA. U kontrolnih životinja nije utvrđen OTA u pojedinim organima. U bubregu životinja koncentracija OTA iznosila je 1,55±0,53 i 3,03±0,06 µg g^{-1} tkiva, u jetri 1,05±0,42 i 3,96±0,27 µg g^{-1} tkiva, a u mozgu 0,07±0,04 i 0,15±0,06 µg g^{-1} tkiva.



Slika 5-9 Koncentracija citrinina u bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja i životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1}) tijekom dva dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

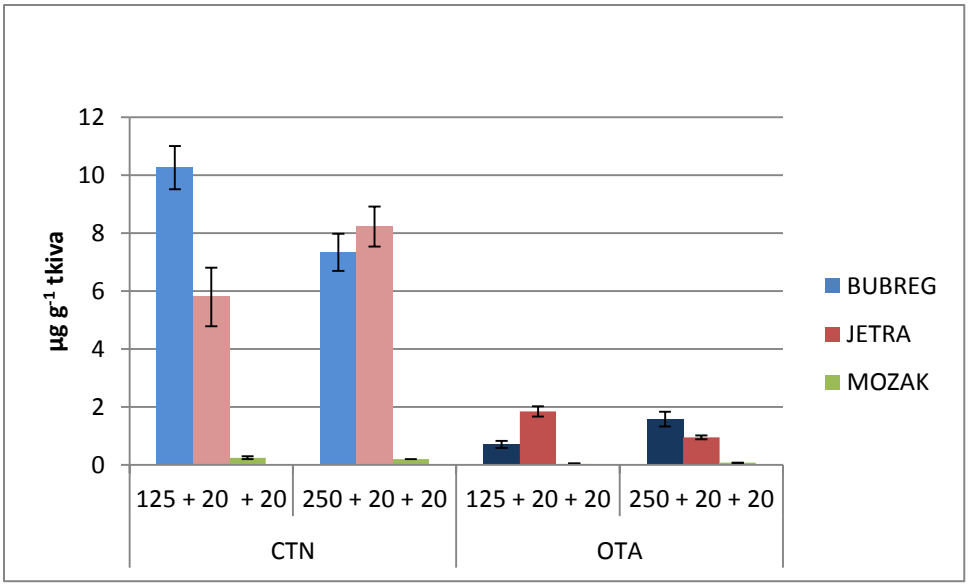
U bubregu, jetri i mozgu životinja tretiranih s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom dva dana izmjerena je koncentracija CTN-a. U kontrolnih životinja nije utvrđen CTN u pojedinim organima. U bubregu životinja koncentracija CTN-a iznosila je 2,23±1,50 µg g^{-1} tkiva, u jetri 1,76±0,59 µg g^{-1} tkiva, a u mozgu 0,03±0,006 µg g^{-1} tkiva.



Slika 5-10 Koncentracije citrinina i okratoksina A u bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja i životinja tretiranih s okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1}) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Koncentracije OTA i CTN-a izmjerene su u bubregu, jetri i mozgu životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1}) posljednja dva dana pokusa. U kontrolnim životinjama nije uvrđena prisutnosti OTA i CTN-a. Najveća koncentracija CTN-a izmjerena je u bubregu (9,71±0,79 i 13,67±0,87 µg g^{-1} tkiva), u jetri je koncentracija CTN-a iznosila 7,02±1,13 i 8,33±1,28 µg g^{-1} tkiva, a u mozgu 0,25±0,09 i 0,30±0,09 µg g^{-1} tkiva.

Koncentracija OTA izmjerena u bubregu iznosila je 1,00±0,26 i 0,80±0,12 µg g^{-1} tkiva, u jetri 0,94±0,40 i 1,56±0,74 µg g^{-1} tkiva, a u mozgu 0,04±0,001 i 0,08±0,03 µg g^{-1} tkiva.



Slika 5-11 Koncentracije citrinina i okratoksina A u bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja i životinja tretiranim s okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i resveratrolom (20 mg kg^{-1}) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1}) tijekom posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

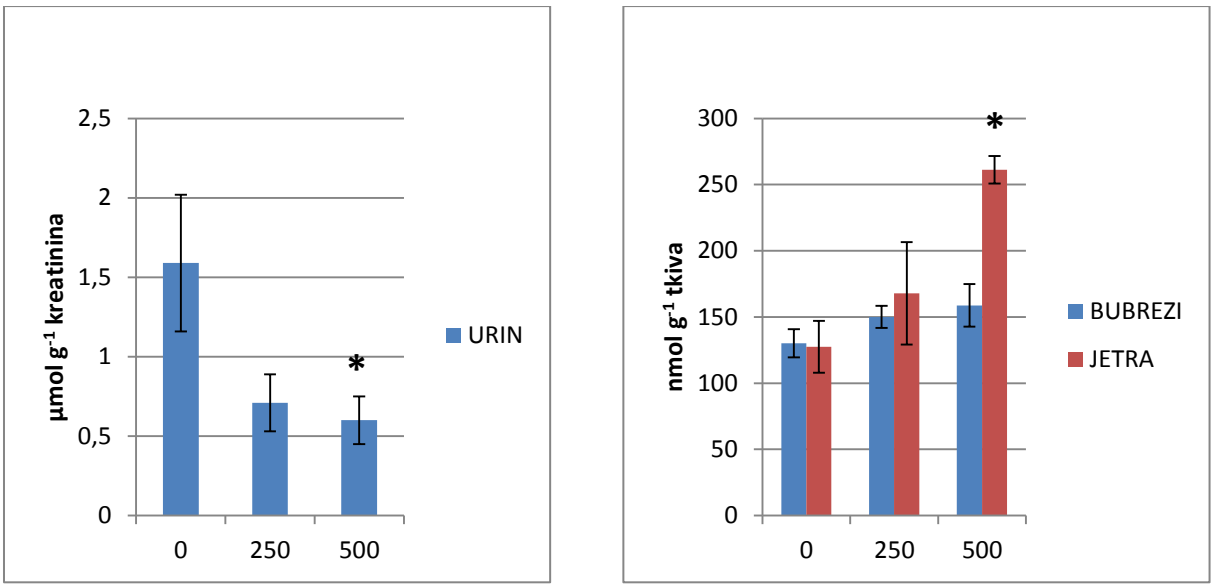
Koncentracije OTA i CTN-a izmjerene su u bubregu, jetri i mozgu životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1}) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1}) posljednja dva dana pokusa. U kontrolnim životinjama nije uvrđena prisutnosti OTA i CTN-a. Koncentracija CTN-a izmjerena je u bubregu iznosila je 10,26±0,75 i 7,33±0,64 µg g^{-1} tkiva, u jetri 5,79±1,01 i 8,22±0,69 µg g^{-1} tkiva, a u mozgu 0,24±0,05 i 0,20±0,004 µg g^{-1} tkiva.

Koncentracija OTA izmjerena u bubregu iznosila je 0,70 ±0,13 i 1,57±0,25 µg g^{-1} tkiva, u jetri 1,84±0,18 i 0,95±0,06 µg g^{-1} tkiva, a u mozgu 0,03±0,02 i 0,07±0,005 µg g^{-1} tkiva.

5.3 Oksidacijsko oštećenje

5.3.1 Malondialdehid

Koncentracija malondialdehida (MDA) u preliminarnom pokusu mjerena je u urinu, bubregu i jetri pokusnih životinja tretiranih s OTA (250 i 500 µg kg^{-1} tm) i uspoređena s vrijednostima u kontrolnim životinjama.

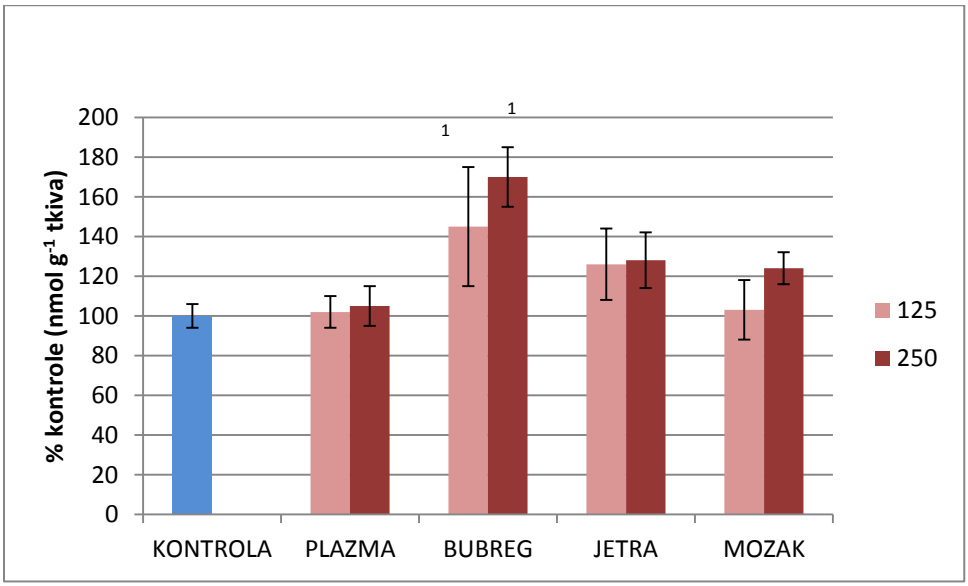


*različito od kontrole, p<0,05

Slika 5-12 Koncentracija malondialdehida u preliminarnom pokusu u urinu, bubregu i jetri kontrolnih životinja (0; n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (250 i 500 µg kg^{-1} tm; n=4). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Nakon tretmana s OTA (250 i 500 µg kg^{-1} tm tijekom 10 dana) izmjerena je koncentracija MDA u urinu, bubregu i jetri (Slika 5-12). Koncentracija MDA bila je značajno promijenjena u urinu (0,60±0,15 µmol g^{-1} kreatinina) te jetri (261,23±10,30 nmol g^{-1} tkiva) nakon tretmana s višom koncentracijom OTA u odnosu na kontrolu (1,59±0,43 µmol g^{-1} kreatinina i 127,57±19,61 nmol g^{-1} tkiva).

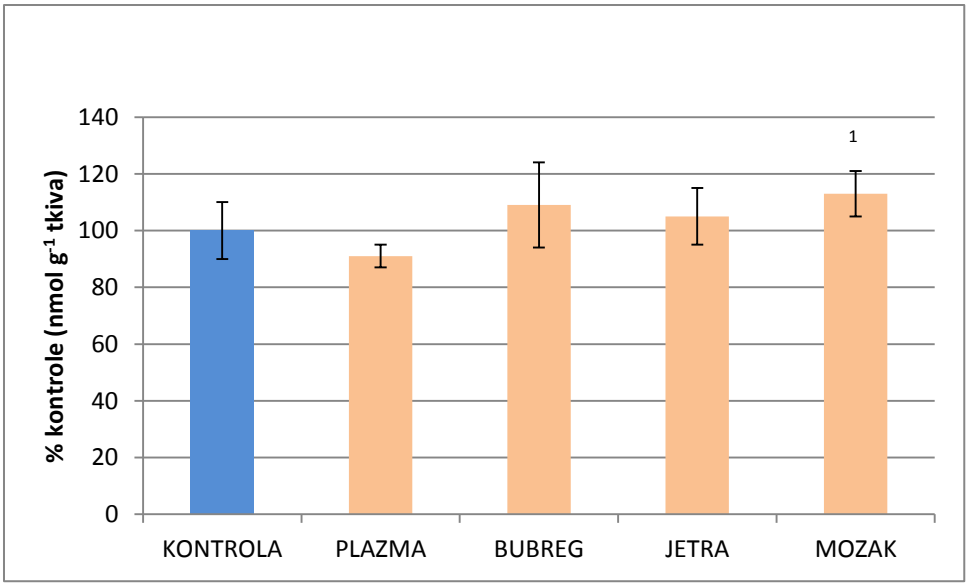
Koncentracija MDA mjerena je u plazmi, bubregu, jetri i mozgu pokusnih životinja tretiranih s OTA, CTN-om i RSV-om i uspoređena s vrijednostima u kontrolnim životinjama.



[1] različito od koncentracije MDA u kontroli ($p<0,05$)

Slika 5-13 Koncentracija malondialdehida u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm; n=4) tijekom 21 dan. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

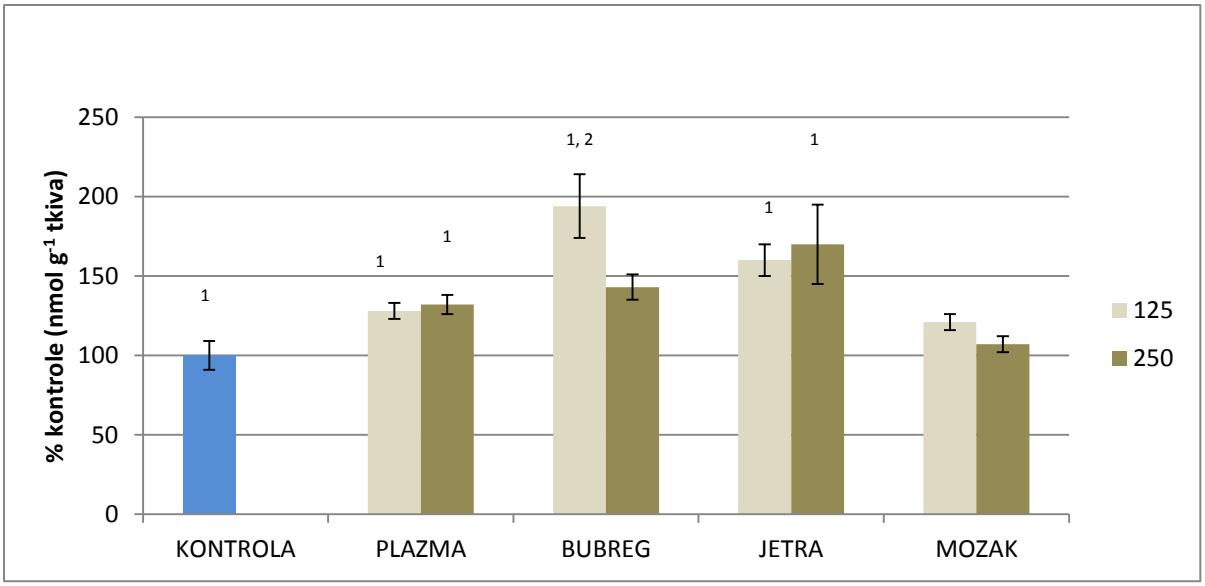
Nakon tretmana s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm tijekom 21 dan) izmjerena je koncentracija MDA u plazmi, bubregu, jetri i mozgu (Slika 5-13). Značajna promjena koncentracije MDA ($p<0,05$) nađena je u bubregu životinja koje su tretirane s obje doze OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) (145 odnosno 170%) u odnosu na kontrolne životinje u kojima je koncentracija MDA iznosila 24,95±2,46 nmol g^{-1} tkiva.



[1] različito od koncentracije MDA u plazmi, $p<0,05$

Slika 5-14 Koncentracija malondialdehida u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=4) i životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm; n=4) tijekom dva dana. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

Rezultati pokusa u kojem su životinje tretirane CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom dva dana prikazani su na slici 5-14 Značajno viša koncentracija MDA izmjerena je u mozgu životinja koje su tretirane s CTN-om (20 mg kg^{-1}) u odnosu na plazmu (113, odnosno 91% u usporedbi s kontrolnim životinjama).

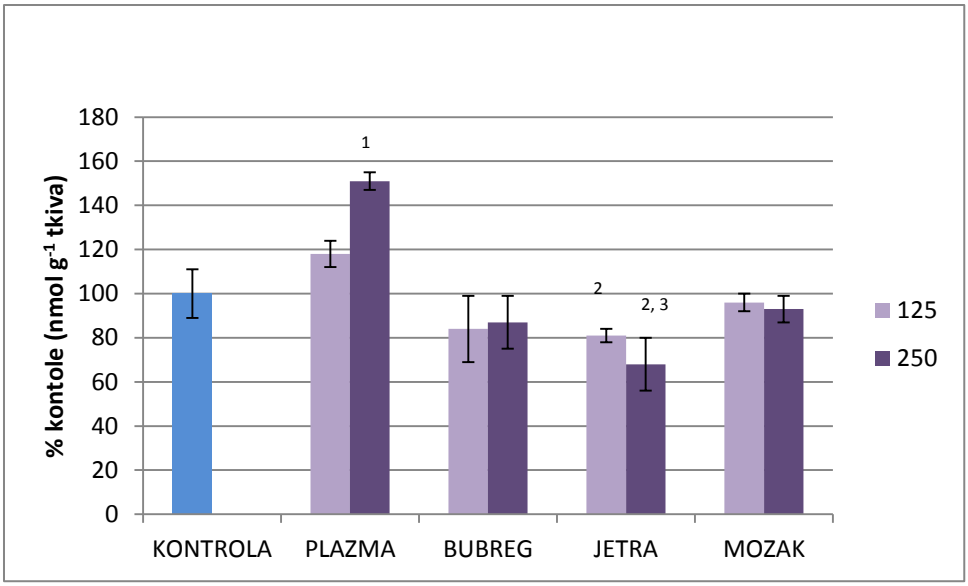


[1] različito od koncentracije MDA u kontroli, p<0,05
[2] različito od koncentracije MDA u mozgu životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA, p<0,05

Slika 5-15 Koncentracija malondialdehida u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=6) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) tijekom posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

Nakon zajedničkog tretmana životinja s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) posljednja dva dana pokusa primijećen je porast koncentracije MDA u plazmi (128%), bubregu (194%) i jetri (160%) životinja tretiranih sa 125 µg OTA kg^{-1} i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te u plazmi (132%) i jetri (170%) životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} tm OTA. Koncentracija MDA u kontralama iznose 15,8±18, 14,1±2,7 i 10,72±2,65 nmol g^{-1} tkiva (plazma, bubreg i jetra).

Povećana je i koncentracija MDA u bubregu životinja (tretiranih sa 125 µg OTA kg^{-1}) u odnosu na koncentraciju MDA u mozgu životinja tretiranih s 250 µg OTA kg^{-1}.



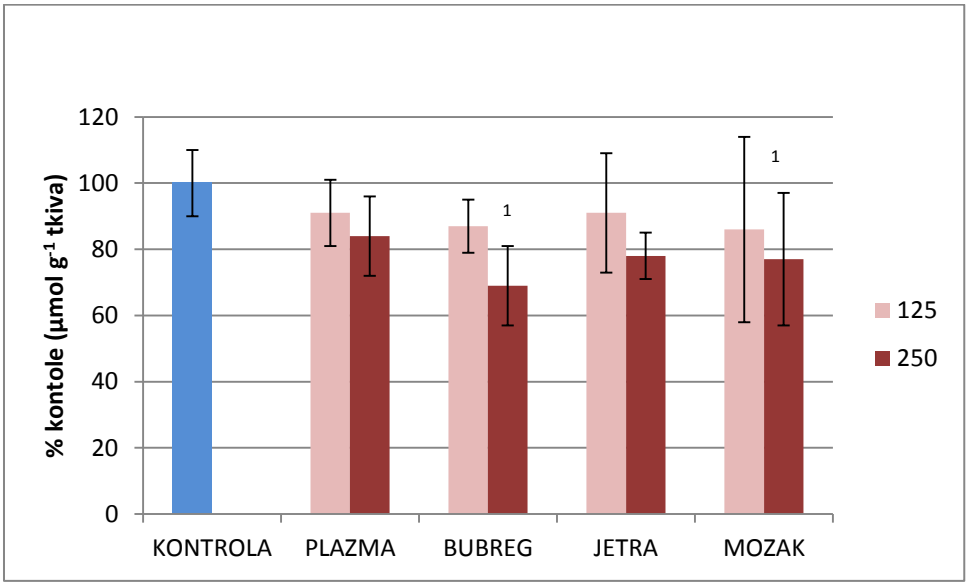
[1] različito od koncentracije MDA u kontroli, p<0,
[2] različito od koncentracije MDA u plazmi životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA, RSV-om i CTN-om 250, p<0,05
[3] različito od koncentracije MDA u plazmi životinja tretiranih s 125 µg kg^{-1} OTA, RSV-om i CTN-om, p<0,05

Slika 5-16 Koncentracija malondialdehida u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=6) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) tijekom posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

U pokusu u kojem su životinje tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan te CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) posljednja dva dana pokusa, mjerena je koncentracija MDA u plazmi, jetri, bubregu i mozgu. Koncentracija MDA značajno se razlikovala samo u plazmi životinja koje su tretirane s OTA (250 µg kg^{-1} tm), CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) u odnosu na kontrolne životinje (151%). Koncentracija MDA u plazmi kontrolnih životinja iznosila je 2,21±0,53 nmol g^{-1} tkiva. Značajno niža koncentracija MDA primijećena je i u jetri u odnosu na koncentraciju MDA u plazmi.

5.3.2 Glutation

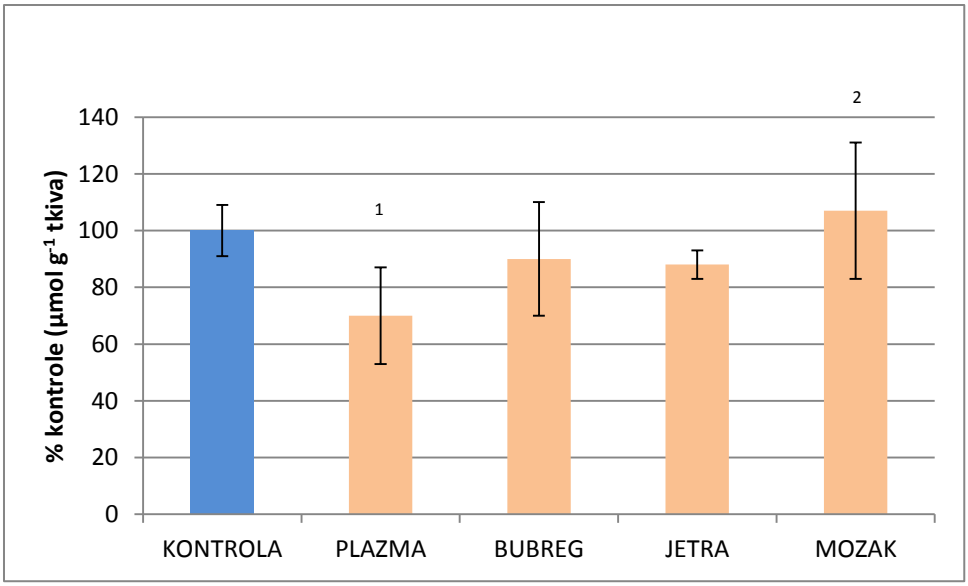
Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) mjerena je u plazmi, bubregu, jetri i mozgu pokusnih životinja tretiranih s OTA, CTN-om i RSV-om i uspoređena s vrijednostima u kontrolnim životinjama.



[1] različito od koncentracije GSH u kontroli, p<0,05

Slika 5-17 Koncentracija glutationa u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=4) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

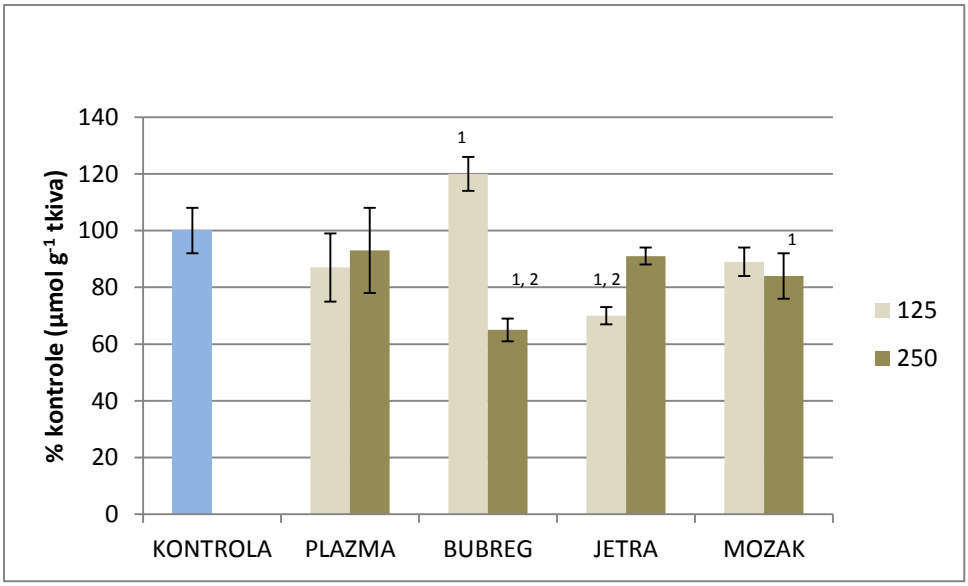
Koncentracija GSH izmjerena je u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja i životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm). U bubregu i mozgu životinja tretiranih s OTA (250 µg kg^{-1} tm) izmjereno je značajno sniženje koncentracije GSH U odnosu na kontolne životinje (69, odnosno 77%). Koncentracija GSH u bubregu i mozgu kontrolnih životinja iznosila je 0,22±0,02 i 0,46±0,10 µmol g^{-1} tkiva.



[1] različito odkoncentracije GSH u kontroli, p<0,05
[2] različito od koncentracije GSH u plazmi, p<0,05

Slika 5-18 Koncentracija glutationa u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=4) i životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 2 dana. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

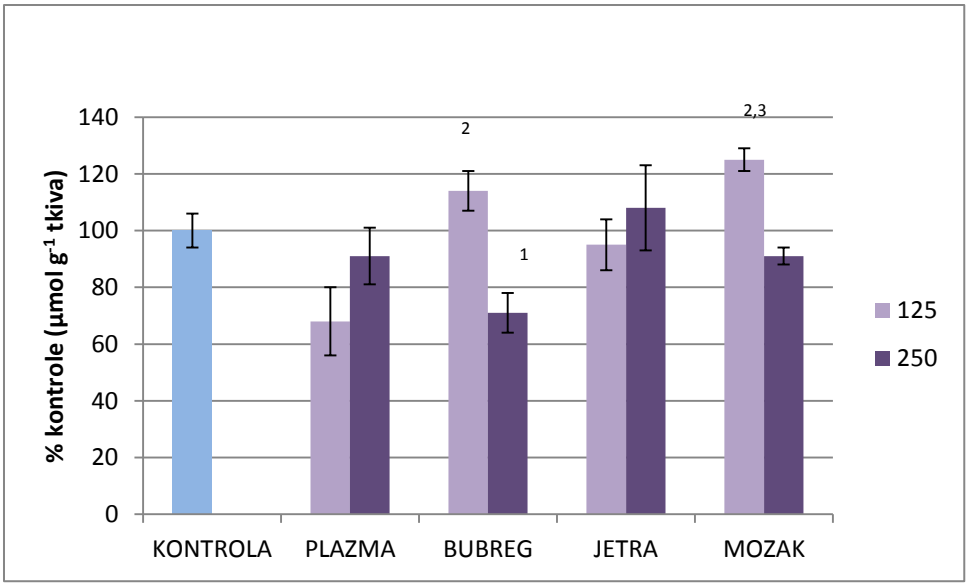
Koncentracije GSH mjerena je u plazmi, bubregu, jetri i mozgu životinja tretiranih s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom dva dana. Taj tretman uzrokovao je značajno sniženje koncentracije GSH u plazmi tretiranih životinja (70%) u odnosu na kontrole. Koncentracija GSH u plazmi kontrolnih životinja iznosila je 0,20±0,03 µmol g^{-1} tkiva.



[1] različito od koncentracije GSH u kontroli, p<0,05
[2] različito od koncentracije GSH u bubregu životinja tretiranih s 125 µg kg^{-1} OTA i CTN-om, p<0,05

Slika 5-19 Pokus okratoksin A + citrinin. Koncentracija glutationa u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=6) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) tijekom posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

Koncentracije GSH mjerena je u plazmi, bubregu, jetri i mozgu životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom posljednja dva dana pokusa. Taj tretman uzrokovao je značajno povećanje koncentracije GSH u bubregu životinja tretiranih s OTA (125 µg kg^{-1} tm) i CTN-om u odnosu na kontrole (120%) i sniženje koncentracije GSH u bubregu (66%) i mozgu (85%) životinja tretiranih s OTA (250 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te jetri (70%) životinja tretiranih s OTA (125 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) u odnosu na kontrolu. Koncentracija GSH u bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja iznosila je 0,25±0,04, 0,80±0,04 i 0,73±0,08 µmol g^{-1} tkiva.

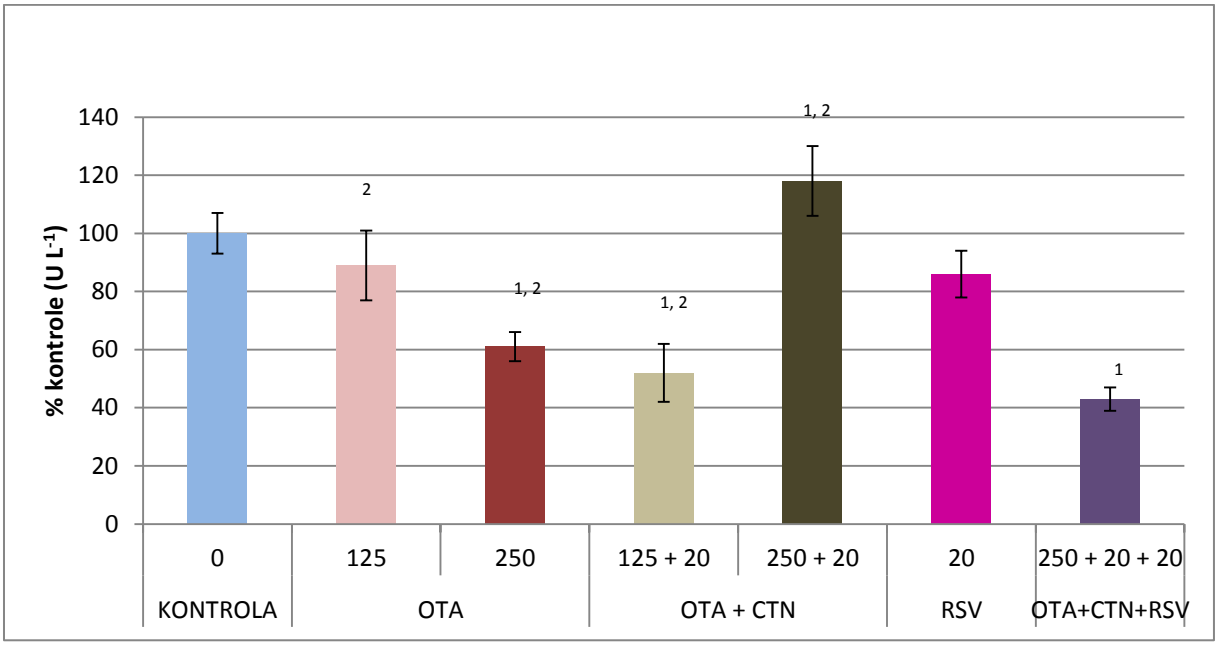


[1]različito od koncentracije GSH u kontroli, p<0,05
[2]različito od koncentracije GSH u plazmi, p<0,05
[3] različito od koncentracije GSH u bubregu životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA, RSV-om i CTN-om, p<0,05

Slika 5-20 Koncentracija glutationa u plazmi, bubregu, jetri i mozgu kontrolnih životinja (0, n=4) i životinja tretiranih OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm, n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

U životinja koje su tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom zadnja dva dana pokusa izmjerena je koncentracija GSH u plazmi, bubregu, jetri i mozgu. Značajno povećanje koncentracije GSH izmjereno je u bubregu i mozgu životinja tretiranih s OTA (125 µg kg^{-1} tm), RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) u odnosu na kontrolu. Koncentracija GSH bila je snižena (71%) u bubregu životinja tretiranih s (250 µg kg^{-1} tm), RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) u odnosu na kontrolu. Koncentracija GSH u bubregu i mozgu kontrolnih životinja iznosila je 0,30±0,05 i 0,09±0,02 µmol g^{-1} tkiva.

5.3.3 Superoksid dismutaza



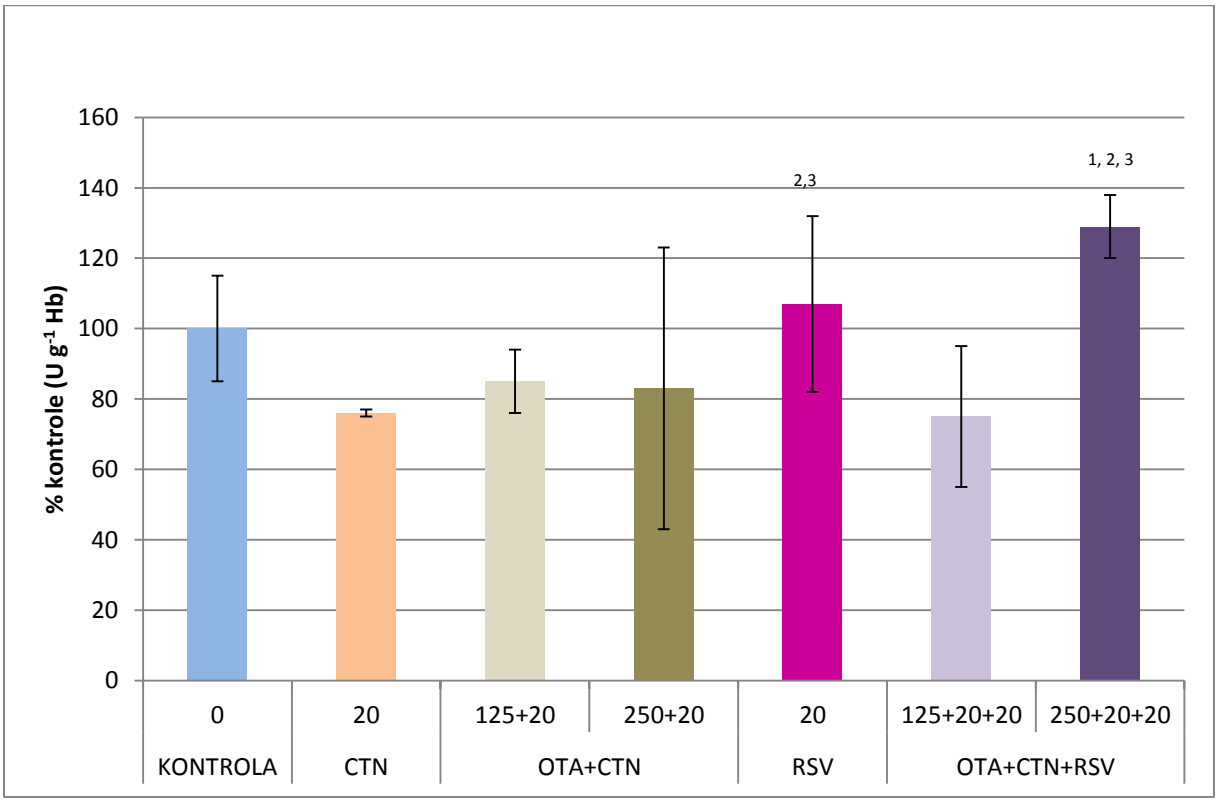
[1] različito od katalitičke aktivnosti SOD-a u kontroli; p<0,05
[2]različito od katalitičke aktivnosti SOD-a u plazmi životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA i CTN-om; p<0,05

Slika 5-21 Katalitička aktivnost superoksid dismutaze u plazmi u kontrolnih životinja (KONTROLA, n=4) životinja tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=4) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

Katalitička aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) izmjerena je u plazmi životinja koje su 21 dan tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm), 21 dan tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i posljednja dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) i posljednja dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te je uspoređena s kontrolnim životinjama.

Katalitička aktivnost SOD-a smanjila se u plazmi životinja koje su tijekom 21 dan tretirane s OTA (250 µg kg^{-1} tm) (61%), u onih koje su zajednički tretirane s OTA (125 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg-1 tm) (52%) te plazmi onih životinja (43%) koje su zajednički tretirane s OTA (250 µg kg^{-1} tm), CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) i RSV–om (20 mg kg^{-1} tm) u odnosu na kontrolu. U životinja koje su tretirane s OTA (250 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) katalitička

aktivnost SOD-a bila je povećana u odnosu na životinje koje su tretirane samo s OTA (250 µg kg^{-1} tm), istovremeno s OTA (125 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te istovremeno s OTA (250 µg kg^{-1} tm), CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm). Katalitička aktivnost SOD-a u plazmi kontrolnih životinja iznosila je 2.888±92 U L^{-1}.



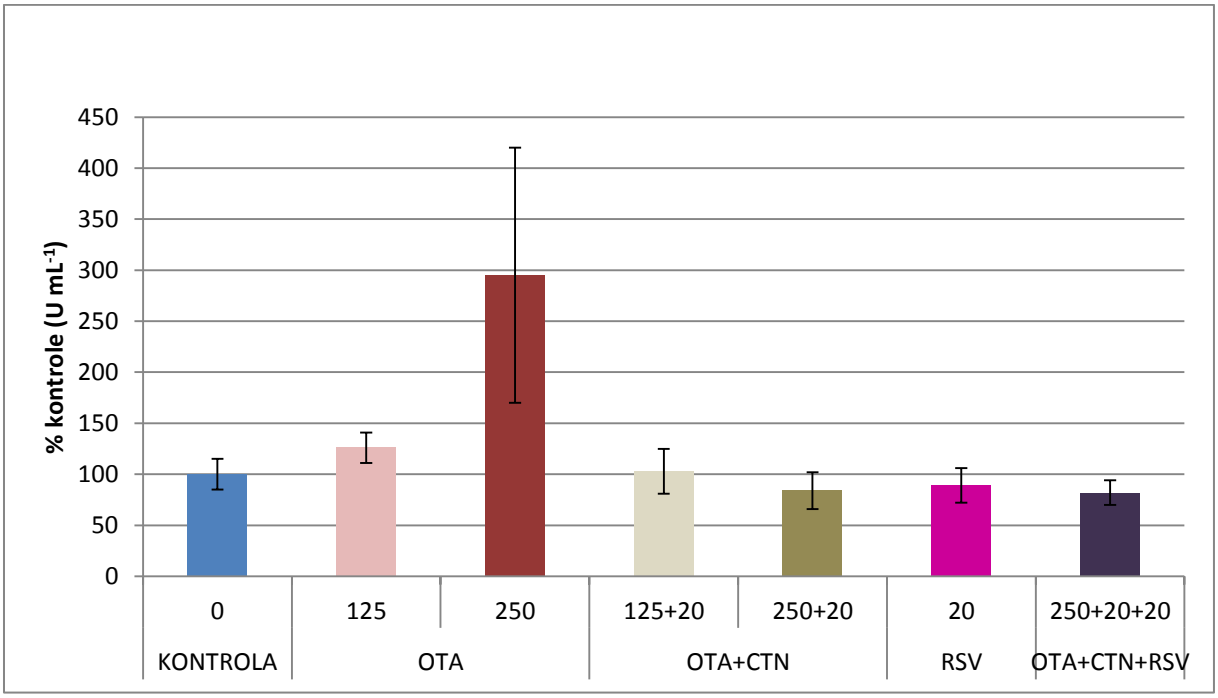
[1] različito od katalitičke aktivnosti SOD-a u kontroli, p<0,05
[2] različito od katalitičke aktivnosti SOD-a u eritrocitima životinja tretiranih s CTN-om; p<0,05
[3] različito od katalitičke aktivnosti SOD-a u eritrocitima životinja tretiranih sa 125 µ kg^{-1} OTA, RSV-om i CTN-om; p<0,05

Slika 5-22 Katalitička aktivnost superoksid dismutaze u eritrocitima kontrolnih životinja (KONTROLA, n=4), životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 2 dana, životinja istovremeno tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=6) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm, n=6) posljednja dva dana pokusa te životinja istovremeno tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=4) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan te CTN-om (20 mg kg^{-1} tm, n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

Katalitička aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) izmjerena je u eritrocitima životinja koje su dva dana tretirane CTN-om (20 mg kg^{-1} tm), 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) te dva dana CTN-om i 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm) te zadnja dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) i uspoređena s kontrolnim životinjama.

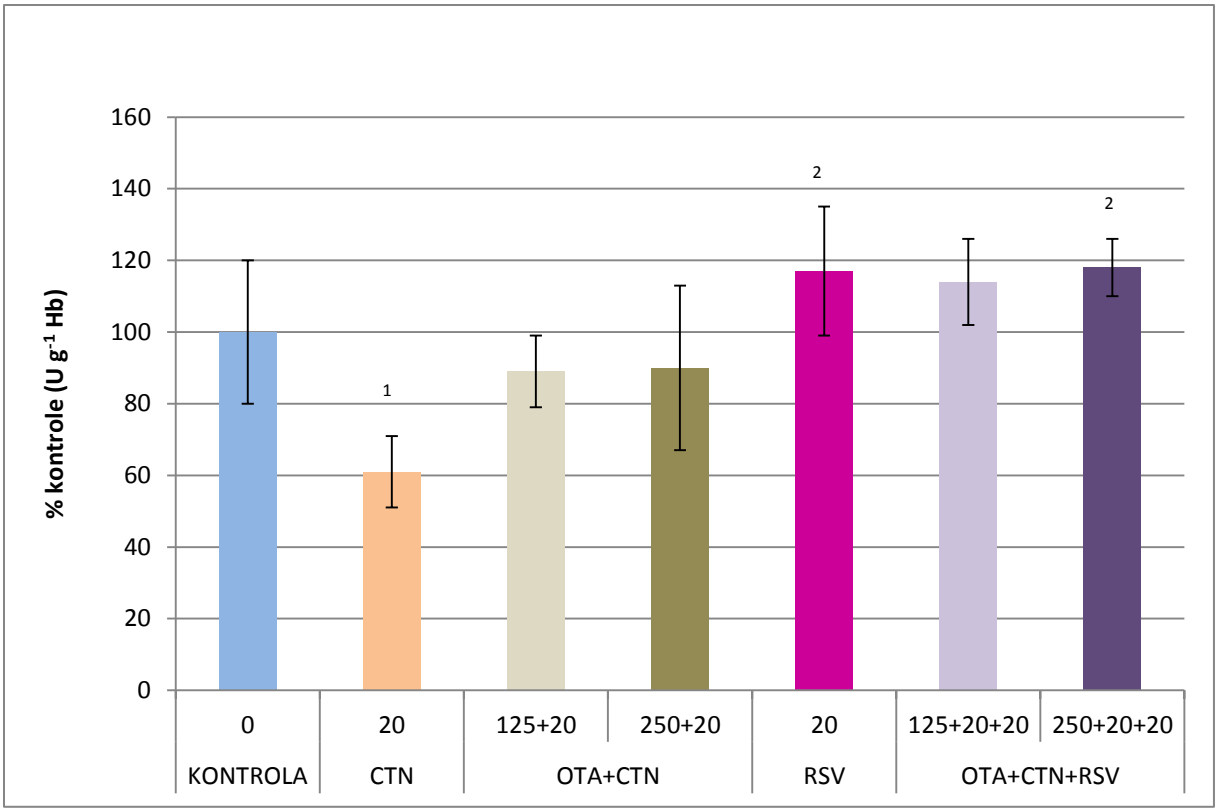
Povećana katalitička aktivnost SOD-a u izmjerena je u eritrocitima životinja koje su istovremeno tretirane s OTA (250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) (107%) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) (129%) posljednja dva dana pokusa u odnosu na kontrolne životinje. Katalitička aktivnost SOD-a u eritrocitima kontrolnih životinja iznosila je 4.382±171 U g^{-1}.

5.3.4 Katalaza



Slika 5-23 Katalitička aktivnost katalaze u plazmi kontrolnih životinja (KONTROLA, n=4), životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 2 dana, životinja istovremeno tretiranih s okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) posljednja dva dana pokusa te životinja istovremeno tretiranih s okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=4) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) posljednja dva dana pokusa. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

Katalitička aktivnosti katalaze (CAT) izmjerena je u plazmi životinja koje su 21 dan tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm), 21 dan tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i posljednja dva dana s CTN-om te 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) i zadnja dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te uspoređena s kontrolnim životinjama. Nije primijećena statistička značajnost katalitičke aktivnosti katalaze između pojedinih tretiranih skupina.

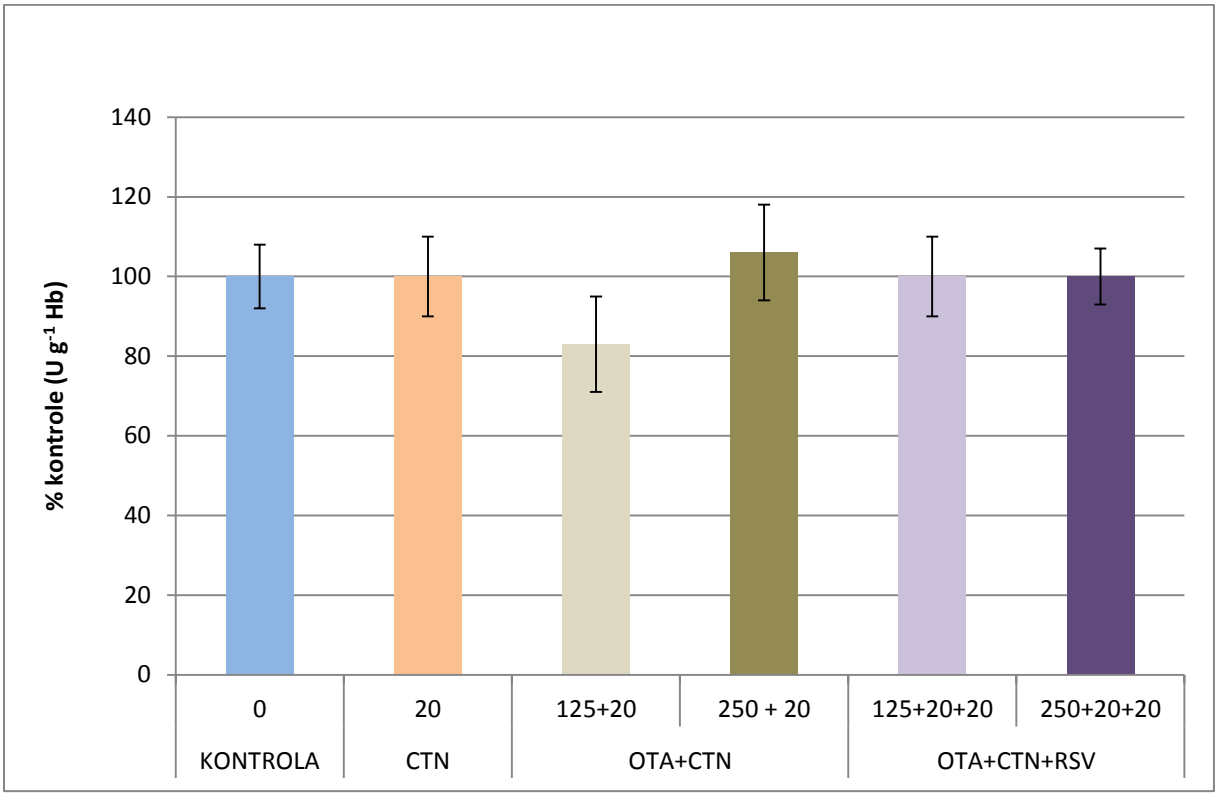


[1]različito od katalitičke aktivnosti katalaze u eritrocitima kontrola, $p<0,05$
[2] različito od katalitičke aktivnosti katalaze u eritrocitima životinja tretiranih s CTN-om, $p<0,05$

Slika 5-24 Katalitička aktivnost katalaze u eritrocitima kontrolnih životinja (KONTROLE), životinja dva dana tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm), životinja istovremeno 21 dan tretiranih okratoksinom A (125 µg kg^{-1} tm) i posljednja dva dana citrininom (20 mg kg^{-1} tm) te životinja istovremeno tretiranih 21 dan okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm) i posljednja dva dana citrininom (20 mg kg^{-1} tm). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolu.

U eritrocitima pokusnih životinja koje su dva dana tretirane CTN-om (20 mg kg^{-1} tm), istovremeno 21 dan tretirane s OTA (125 µg kg^{-1} tm) i posljednja dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te životinja istovremeno tretiranih 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm), RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1}) tm izmjerena je katalitička aktivnost CAT-a te je uspoređena s kontrolnim životinjama. Smanjena katalitička aktivnost katalaze (61%) primijećena je u eritrocitima životinja tretiranih s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) u odnosu na kontrole. Katalitička aktivnost katalaze u eritrocitima kontrola iznosila je 33,30 U g^{-1} Hb.

5.3.5 Glutation peroksidaza



Slika 5-25 Katalitička aktivnost glutation peroksidaze u krvi kontrolnih životinja (KONTROLA, n=4) i životinja tretiranih citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4), istovremeno tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µ kg^{-1} tm, n=6) i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) te istovremeno tretiranih okratoksinom A (125 i 250 µ kg^{-1} tm, n=4), citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm, n=4).

Katalitička aktivnost glutation peroksidaze (GPx) izmjerena je u plazmi životinja koje su tretirane dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm), 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) i 21 dan s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) i dva dana s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) te je uspoređena s kontrolnim životinjama. Katalitička aktivnost GPx-a nije se promijenila niti u jednoj od tretiranih skupina.

5.3.6 hOGG1

Oštećenje DNA mjereno je hOGG1 komet testom koji je specifičan za mjerenje oksidacijskog oštećenja baza u DNA. Kao paramatri razine oštećenja mjereni su duljina i intenzitet repa kometa na nukleoidima stanica bubrega i jetre.

Tablica 5-5 Duljina i intenzitet repa kometa u stanicama bubrega i jetre životinja koje su tretirane okratoksinom A (125 i 250 µg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan dobiveni primjenom komet testa uz primjenu hOGG1.

		Duljina repa (µm) ± S.D.			% DNA u repu (intenzitet) ± S. D.		
Tkivo	Skupina	Pufer	hOGG1 enzim	Razlika	Pufer	hOGG1 enzim	Razlika
Bubreg	Kontrola	11.1±5.4	11.6±2.9	0.5±2.6	1.3±3.2	1.9±6.9	0.5±3.7
	125	12.6±3,0	12.79±5.99	0.2±3.0	1.8±5.2	2.37±4.36	0.5±0.86
	250	13.0±2.6	13.3±6.18	0.3±3.6	2.05±2.3	2.6±5.96	0.55±3.6
Jetra	Kontrola	12,0±3.5	13.0±1.9	1.06±1.56	0.79±6.2	1.3±1.69	0.5±4.49
	125	12.1±3,0	15.05±2.08	2.9±0.9	1.9±4.78	1.5±1.1	0.57±3.67
	250	12.5±4.5	14.75±4.99	2.3±0.5	2.1±2.0	2.55±1.89	0.4±0.1

U pokusu u kojem su životinje tretirane samo s OTA nije primijećena značajna razlika u vrijednosti duljine i intenziteta repa kometa u stanicama bubrega i jetre između kontrolnih životinja i životinja tretiranih s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm).

Tablica 5-6 Duljina i intenzitet repa kometa u stanicama bubrega i jetre životinja tretiranih CTN-om (20 mg kg^{-1} tm, n=4) dva dana dobiveni primjenom komet testa uz primjenu hOGG1.

		Duljina repa ± S.D.			% DNA u repu (intenzitet) ± S. D.		
Tkivo	Skupina	Pufer	hOGG1	Razlika	Pufer	hOGG1	Razlika
Bubreg	Kontrola	11,31±0,36	13,48±0,81	2,17±1,17	1,09±1,33	1,81±2,35	0,72±1,02
	20	11,51±2,11	15,25±4,63	3,74±2,52	1,14±0,51	2,79±0,83	1,65±0,32*
Jetra	Kontrola	10,48±1,46	12,82±3,05	2,34±1,59	1,03±0,29	2,09±0,69	1,06±0,40
	20	12,35±1,52	15,24±3,49	2,89±1,90	1,15±0,35	2,17±0,57	1,02±0,22

*Različito od kontrole ($p<0,05$).

U pokusu u kojem su životinje tretirane samo s CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) uočeno je značajno povećanje intenziteta repa kometa u bubrezima tretiranih životinja u odnosu na kontrolne (1,65±0,32% i 0,72±1,02%; p<0,05). Duljina repa kometa nije bila različita u tretiranih životinja u odnosu na kontrole. U stanicama jetre nisu nađene razlike u vrijednosti intenziteta i duljine repa kometa u tretiranih životinja u usporedbi s kontrolama.

Tablica 5-7 Duljina i intenzitet repa kometa u stanicama bubrega i jetre kontrolnih životinja (0) i životinja tretiranih okratoksinom A (125 µg kg^{-1} tm, n=6) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=6) tijekom posljednja dva dana pokusa dobiveni primjenom komet testa uz primjenu hOGG1.

		Duljina repa (µm) ± S.D.			% DNA u repu (intenzitet) ± S. D.		
Tkivo	Skupina	Pufer	hOGG1 enzim	Razlika	Pufer	hOGG1 enzim	Razlika
Bubreg	Kontrola	12,3±0,2	12,6±0,5	0,34±0,3	1,51±0,67	1,99±0,65	0,48±0,02
	125	11,9±1,4	14,3±1,5*	2,37±0,1*	1,4±1,04	5,3±1,6**	3,9±0,5**
	Kontrola	18,3±6,3	18,7±5,8	0,40±0,5	1,4±5,1	1,90±5,80	0,50±0,70
	250	24,0±10,2	25,8±11,1	1,8±0,9	9,0±9,5	14,6±10,1**	5,6±0,6**
Jetra	Kontrola	12,5±1,03	12,5±1,04	0,00±0,01	0,72±0,10	1,04±0,11	0,32±0,01
	125	12,9±0,8	13,3±0,8	0,44±0,01	0,98±0,68	4,10±0,82**	3,1±0,14**
	Kontrola	20,4±6,6	21,2±4,2	0,80±2,40	1,40±6,20	1,80±3,40	0,40±2,80
	250	24,8±10,6	37,4±9,3**	12,6±1,3**	5,9±10,0	35,0±9,9**	29,1±0,1**

*Različito od kontrole (p<0,05).

**Različito od kontrole (p<0,001).

U pokusu u kojem su životinje su istovremeno tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) uočen je značajan porast vrijednosti parametara hOGG1 komet testa u odnosu na kontrolnu skupinu. Duljina repa kometa izmjerena u stanicama bubrega životinja koje su tretirane s OTA (125 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 g kg^{-1} tm) bila je značajno viša (14,3±1,5 µm), nego u kontrolnim životinjama (12,6±0,5 µm; p<0,05). Duljina repa kometa bila je značajno viša (37,4±9,3 µm) u stanicama jetre životinja koje su tretirane višom dozom OTA (250 µg kg^{-1} tm) i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) od duljine repa kometa u kontrolnim životinjama (21,2±04,2 nm; p<0,001). Duljina repa kometa nije se značajno povećala u stanicama bubrega životinja koje su tretirane s 250 µg OTA kg^{-1} tm i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) kao niti u stanicama jetre životinja koje su tretirane sa 125 µg OTA kg^{-1} tm i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm).

U stanicama bubrega životinja koje su tretirane s 125 i 250 µg kg^{-1} tm i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) intenzitet repa kometa bio je značajno viši (5,3±1,5% i 14,6±10,1%, p<0,001), negoli u kontrola (2,0±0,6% i 1,9±5,8%, p<0,001). Intenzitet repa kometa u stanicama jetre životinja tretiranih s navedenim dozama OTA i CTN-a (4,1±0,8% i 35,0±9,9%) bio je također značajno veći (p<0,001) u odnosu na kontrolne životinje (1,0±0,1% i 1,8±3,4%).

Tablica 5-8 Duljina i intenzitet repa kometa u stanicama bubrega i jetre kontrolnih životinja (0), životinja tretiranih resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan, životinja tretiranih okratoksinom A (250 µg kg^{-1} tm, n=4) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom 21 dan i citrininom (20 mg kg^{-1} tm, n=4) tijekom dva dana dobiveni primjenom komet testa uz primjenu hOGG1.

		Duljina repa (µm) ± S.D.			% DNA u repu (intenzitet) ± S. D.		
Tkivo	Skupina	Pufer	hOGG1 enzim	Razlika	Pufer	hOGG1 enzim	Razlika
Bubreg	Kontrola	15,7±3,3	19,3±3,8	3,6±0,5	0,7±1,8	2,2±2,8	1,5±1,0
	RSV	14,6±1,6	17,4±2,2	2,8±0,6	0,3±0,5	1,3±1,0	1,0±0,5
	125	15,0±1,4	16,0±5,4	1,0±4,0	0,3±0,5	1,5±4,4*	1,2±3,9*
	Kontrola	15,9±2,2	18,0±2,8	2,1±0,6	0,9±1,9	1,7±2,4	0,8±0,5
	RSV	16,7±2,6	17,1±2,1	0,4±0,5	0,8±1,3	1,4±1,4	0,6±0,1
	250	16,9±2,7	25,1±3,1*	8,2±0,4*	3,5±2,7	14,9±5,8**	11,4±3,1**
Jetra	Kontrola	16,2±2,2	17,0±2,7	0,8±0,5	0,4±0,6	0,9±1,4	0,5±0,8
	RSV	16,0±2,5	18,5±2,3	2,5±0,2	0,2±0,6	1,2±0,8	1,0±0,2
	125	16,0±2,4	16,4±3,1	0,4±0,7	0,3±0,6	0,7±1,1	0,4±0,5
	Kontrola	18,0±3,3	21,6±3,2	3,6±0,1	0,7±1,3	1,3±1,4	0,6±0,1
	RSV	17,1±2,4	18,4±2,5	1,3±0,1	0,6±1,1	1,5±1,3	0,9±0,2
	250	14,8±3,2	21,0±2,8**	6,2±0,4**	0,6±1,7	3,9±3,0*	3,3±1,3*

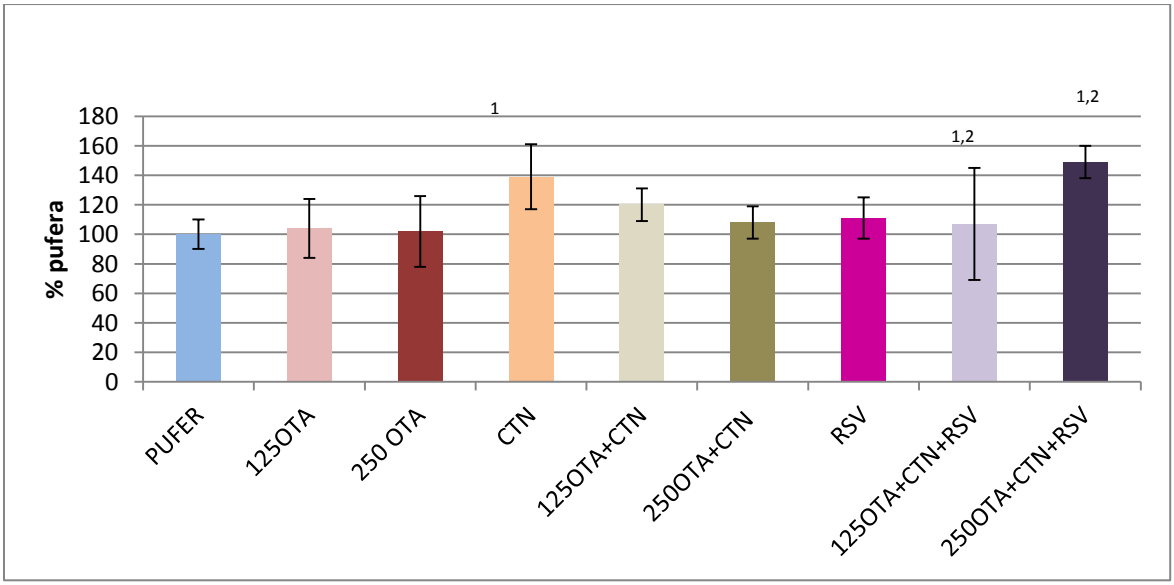
*Različito od kontrole (p<0,05).

**Različito od kontrole (p<0,001).

U pokusu u kojem su životinje tretirane s OTA, CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) duljina repa kometa u stanicama bubrega bila je značajno veća (p<0,05) u životinja koje

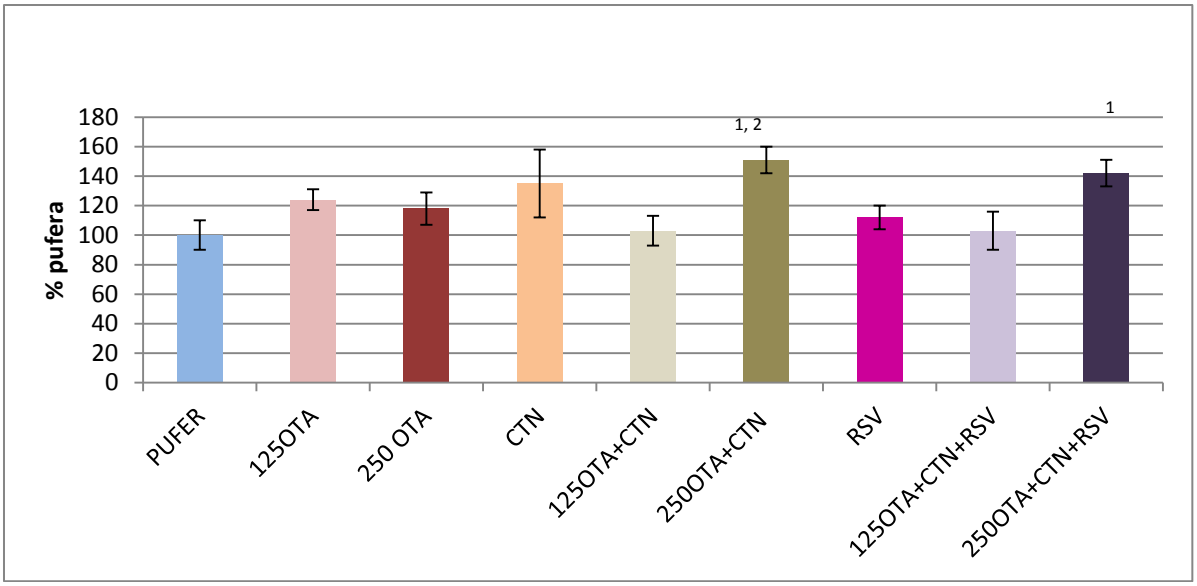
su tretirane višom dozom OTA (25,1±3,1 µm), negoli u kontrolnih životinja (18,0±2,8 µm). U jetri je značajna razlika (p<0,001) nađena također u životinja koje su bile tretirane većom dozom OTA, CTN-om i RSV-om (21,0±2,8 µm), nego u kontrolnim životinjama (21,6±3,2 µm).

Srednja vrijednost intenzitet repa kometa u stanicama bubrega životinja koje su tretirane sa 125 µg OTA kg^{-1} tm, CTN-om i RSV-om bila je (1,5±4,4%) značajno viša u odnosu na kontrole (p<0,05). Značajnost razlike bila je veća (p<0,001) u stanicama bubrega životinja koje su tretirane uz CTN i RSV većom dozom OTA (14,9±5,8%) u usporedbi s kontrolom (1,7±2,4%). U jetri je srednja vrijednost intenziteta repa kometa bila značajno viša (p<0,05) kod životinja koje su tretirane višom dozom OTA, CTN-om i RSV-om (3,9±3,0%) od kontrola (1,3±1,4%).



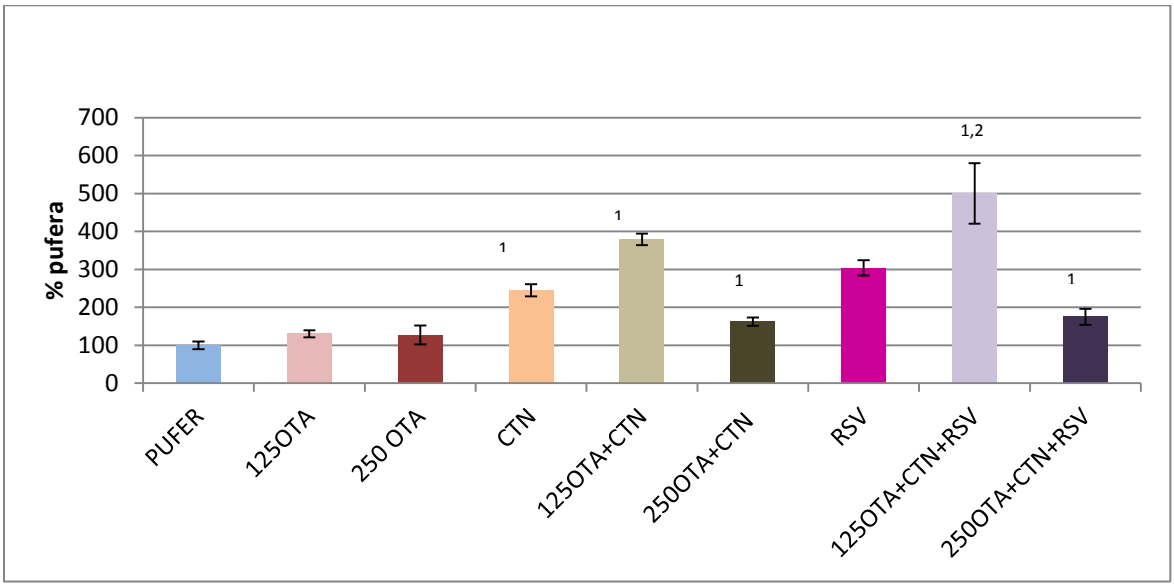
[1] različito od pufera, p<0,05
[2] različito od duljine repa kometa u stanicama bubrega životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA, p<0,05

Slika 5-26 Usporedba duljine repa kometa u stanicama bubrega između pojedinih skupina tretiranih mikotoksinima i resveratrolom u odnosu na tretman puferom.



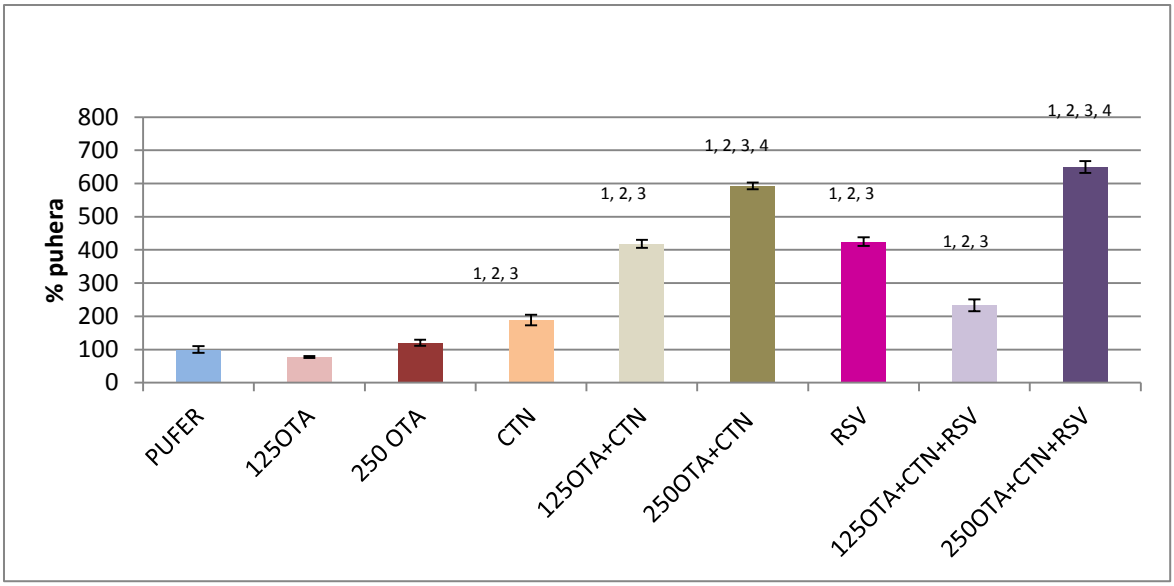
[1] različito od pufera, p<0,05
[2] različito od duljine repa kometa u stanicama bubrega životinja tretiranih sa 125 µg kg^{-1} OTA, CTN-om i RSV-om, p<0,05

Slika 5-27 Usporedba duljine repa kometa u stanicama jetre između pojedinih skupina tretiranih mikotoksinima i resveratrolom u odnosu na tretman puferom.



[1] različito od pufera, p<0,05
[2] različito od duljine repa kometa u stanicama bubrega životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA, p<0,05

Slika 5-28 Usporedba intenziteta repa kometa u stanicama bubrega između pojedinih skupina tretiranih mikotoksinima i resveratrolom u odnosu na tretman puferom.



[1] različito od pufera
[2] različito od duljine repa kometa u stanicama bubrega životinja tretiranih s 125 µg kg^{-1} OTA, $p<0,05$
[3] različito od duljine repa kometa u stanicama bubrega životinja tretiranih s 250 µg kg^{-1} OTA, $p<0,05$
[4] različito od duljine repa kometa u stanicama bubrega životinja tretiranih s CTN-om, $p<0,05$

Slika 5-29 Usporedba intenziteta repa kometa u stanicama jetre između pojedinih skupina tretiranih mikotoksinima i resveratrolom u odnosu na tretman puferom.

6 RASPRAVA

OTA pripada najviše proučavanim i najtoksičnijim mikotoksinima za razliku od CTN-a koji je među najmanje proučavanim mikotoksinima, a po toksičnosti je na samom dnu ljestvice (Hesseltine, 1986). Za OTA je utvrđeno da uzrokuje svinjsku nefropatiju (Krogh, 1972), a zbog sličnosti patohistoloških nalaza bubrega svinja oboljelih od svinjske nefropatije i ljudi oboljelih od BEN-a pretpostavljeno je da bi OTA mogao biti uzročnik BEN-a kao i tumora gornjeg dijela mokraćnog sustava koji se daleko češće pojavljuju u području s BEN-om, negoli u drugim krajevima Hrvatske. Ta je pretpostavka potaknula istraživanja mehanizma djelovanja i izloženosti ljudi tom mikotoksinu, a u Hrvatskoj je, osim u žitaricama, pronađen u grahu (Cvetnić i Pepeljnjak, 1989; Domijan i sur., 2005a) i vinu (Domijan i Peraica, 2005b; Flajs i sur., 2009). Dokazano je da je nefrotoksičan i da uzrokuje maligne tumore bubrega u štakora (NTP, 1989). Na temelju tog i drugih istraživanja IARC je procijenio da je OTA sigurni kancerogen za pokusne životinje (IARC, 1993). Zbog nedostatka epidemioloških istraživanja svrstan je kao mogući kancerogen za ljude u skupinu 2B.

CTN je ponovo dobio na važnosti kada je primijećeno da OTA i CTN sintetiziraju isti rodovi plijesni *(Aspergillus* i *Penicillium)* te da se pojavljuju zajedno u žitaricama za ljudsku i životinjsku prehranu (Scott i sur., 1972; Abd Alla, 1996; Nguyen i sur., 2007; Bragulat i sur., 2008; Šegvić Klarić, 2012). Dokazano je da je CTN nefrotoksičan u svim ispitnim vrstama (Hanika i Carlton, 1994; Carlton i Tuite, 1977). Zbog nefrotoksičnosti i zajedničkog pojavljivanja s OTA pretpostavljeno je da je jedan od uzročnika BEN-a (Krogh 1974, Stoev, 2008). Zbog zajedničkog nalaza u uzorcima hrane, kao i zbog pretpostavke da bi ta dva mikotoksina mogla imati sinergistički i nefrotoksični učinak i uzrokovati BEN, istraživan je zajednički učinak OTA i CTN u uvjetima *in vitro* i *in vivo.*

U većini istraživanja *in vitro* na stanicama sisavaca primijećeno je da je citotoksično djelovanje OTA i CTN-a sinergistično (Creppy i sur., 1980, Heussner i sur., 2006, Bouslimi i sur., 2008, Šegvić Klarić i sur., 2012). Pojačani citotoksični učinak ovih mikotoksina nakon zajedničkog tretmana nije primijećen na epitelnim stanicama mokraćnog mjehura svinje (Föllmann i sur., 2000).

U preglednom članku Speijers i Speijers (2004) navode mnoštvo radova u kojima su istraženi učinci OTA i CTN-a uglavnom na kulturama stanica i pilećem embriju, a rjeđe na pokusnim životinjama (Speijers i Speijers, 2004). Rezultati tih istraživanja nisu jednoznačni jer su neki istraživači našli da OTA i CTN imaju aditivno, drugi sinergističko, a neki čak i antagonističko djelovanje. U navedenim pokusima istraživana je citotoksičnost, genotoksičnost, kancerogenost i teratogenost navedenih mikotoksina. Autori su istraživali njihov učinak na proteinsku sintezu, ionski transport, histološku strukturu bubrega i smrtnost pokusnih životinja, no ne i oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti.

U dosadašnjim je istraživanjima primijećeno morfološko oštećenje bubrega koje je ovisilo o dozi OTA s kojom su tretirane životinje (Žlender i sur., 2009, Kumar i sur., 2007, Gekle i sur., 1993). U istraživanju kojeg smo proveli na odraslim muškim štakorima primijetili smo dominantno oštećenje S3 segmenta proksimalnog kanalića bubrega, no oštećenje je bilo vidljivo u cijelom nefronu (Žlender i sur., 2009). U ovom smo pokusu mjerili i koncentraciju OTA u urinu, bubrezima i jetri koja je ovisila o dozi s kojom su životinje tretirane. Najveću koncentraciju OTA primijetili smo u jetri što je u skladu s enterohepatičkom cirkulacijom (Fuchs i sur., 1988a). Budući da je oksidacijski stres jedan od predloženih mehanizama toksičnosti OTA, mjerili smo i koncentraciju MDA (urin, jetra i bubrezi) kao parametra peroksidacije lipida. Značajno povećana koncentracija MDA izmjerena je samo u jetri životinja tretiranih višom dozom OTA (500 µg kg^{-1} tm). Ovaj rezultat može se objasniti duljinom tretmana (10 dana) i time da je jetra zbog enterohepatičke cirkulacije u tako kratkom vremenu vjerojatno bila najizloženija djelovanju OTA.

U istraživanjima *in vitro* na stanicama sisavaca za oba mikotoksina je utvrđeno da uzrokuju oksidacijski stres (Schaaf i sur. 2002; Ribeiro i sur. 1997; Johannessen i sur. 2007).

Mehanizam djelovanja CTN-a je nepoznat, podaci o zajedničkom djelovanju OTA i CTN-a su proturječni, a istraživanja provedenih na životinjama je malo. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog rada bio utvrditi važnost oksidacijskog stresa u mehanizmu toksičnosti CTN-a u pokusnim životinjama. Budući da je poznato da je jedan od mehanizama djelovanja OTA povećanje nastanka ROS-ova i oksidacijski stres, a neki autori smatraju da bi to mogao biti i mehanizam djelovanja CTN-a drugi je cilj istraživanja bio istražiti uzrokuje li istovremena izloženost ovim mikotoksinima potencirajuće toksično djelovanje. Učinak pojedinačnog i zajedničkog djelovanja OTA i CTN-a na oksidativni stres u tkivima životinja određen je na tri načina: mjerenjem koncentracije GSH i katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD,

CAT i GPx) kao izravnog pokazatelja obrane stanice protiv oksidacijskog stresa, mjerenjem koncentracije MDA kao pokazatelja peroksidacije lipida i mjerenjem razine oksidacijskog oštećenja baza DNA (komet test uz korištenje enzima popravka hOGG1).

RSV je poznati antioksidans čija je učinkovitost dokazana *in vitro* i *in vivo* (Bertelli, 2007). Da bi se istražilo njegovo moguće djelovanje u sprečavanju nastanka oksidacijskog oštećenja uzrokovanog s OTA i CTN-om, skupine životinja koje su tretirane tim mikotoksinima tretirane su i RSV-om.

Bubrezi i jetra su primarni organi citotoksičnog djelovanja OTA i CTN-a i kancerogenog djelovanja OTA. Citotoksični učinak OTA primijećen je i u mozgu pokusnih životinja (Belmadani i sur. 1999). Stoga su parametri oksidacijskog stresa – MDA i GSH praćeni u plazmi, bubrezima, jetri i mozgu. Aktivnost antioksidacijskih enzima mjerena je u punoj krvi, plazmi i eritrocitima, a oksidacijsko oštećenje DNA u stanicama bubrega i jetre.

Dva najvažnija enzima koji sudjeluju u detoksikaciji superoksid radikala su superoksid dismutaza i glutation peroksidaza. SOD katalizira reakciju dismutacije superoksid radikala ($O_2\cdot^-$) u vodikov peroksid (H_2O_2) dok GPx katalizira redukciju (u ovom slučaju detoksikaciju) vodikovog peroksida u vodu i istovremenu oksidaciju reduciranog oblika glutationa (GSH) u oksidirani oblik (GSSG). Većina katalitičke aktivnosti SOD-a u krvi odvija se u eritrocitima dok je u serumu i plazmi aktivnost ovog enzima znatno manja (Sun i sur., 1988). Katalitičku aktivnost enzima SOD-a inhibira povećana koncentracija superoksidnih radikala u stanici.

Glutation peroksidaze su skupina filogenetski srodnih enzima koji kataliziraju redukciju H_2O_2 ili organske vodikove perokside u vodu ili pripadajući alkohol koristeći GSH kao reducens (Brigelius-Flohé i Maiorino, 2012). Katalitička se aktivnost GPx-a u prisutnosti povećane koncentracije vodikovog peroksida smanjuje, a tijekom te reakcije GSH se oksidira u GSSG.

Katalaza je enzim koji se u životinja nalazi najvećim dijelom u peroksisomima, a malo je ima u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. Najveći dio redukcije H_2O_2 odvija se u peroksisomima pri čemu se aktivnost katalaze smanjuje.

U našim prijašnjim istraživanjima upotrebnom standardnog i Fpg-mogificiranog (formamidopirimidin-DNA-glikozilaza) komet testa nađeno je da čak i male doze OTA (5, 50 i 500 ng kg^{-1} tm) uzrokuju oksidacijsko oštećenje DNA, no oksidacijski stres nije jedini mehanizam uključen u genotoksičnost i kancerogenost DNA (Domijan, i sur., 2006). hOGG1 je, za razliku od Fpg modificiranog komet testa, specifičan za 8-oksoGua (hidroksideoksogvanin) i metil FapiGua (formamidogvanin). hOGG1 popravlja ove oksidirane

baze samo kada su u paru s citozinom zbog čega je hOGG1 specifičniji nego Fpg koji prepoznaje 8-oksoGua sparene s citozinom, gvaninom ili timidinom (Smith i sur., 2006). U pokusima prikazanima u ovom doktorskom radu za dokazivanje specifičnog oksidacijskog oštećenja DNA korišten je hOGG1 komet test u životinja koje su bile izložene pojedinačnom i zajedničkom djelovanju OTA i CTN-a.

U dvogodišnjem istraživanju na miševima svakodnevno izlaganima 40 µg OTA kg^{-1} tm, svih 50 tretiranih mužjaka razvilo je simptome nefropatije, a 31 karcinome ili adenome. Kada je isti broj ženki tretiran s OTA, samo je kod malog broja nađena nefropatija, a kod nijedne karcinom ili adenom (Bendele i sur. 1985). U dvogodišnjem istraživanju na štakorima, pri svakodnevnim dozama OTA od 210 µg kg^{-1} tm ili 70 µg kg^{-1} tm, 72% mužjaka i 16% ženki, odnosno 39% mužjaka i 4% ženki razvilo je renalne adenome ili karcinome (Boorman 1989). Budući da su mužjaci štakora znatno osjetljiviji na nefrotoksično djelovanje OTA nego ženke, naše istraživanje provedeno je na odraslim mužjacima.

Primijenjene doze oba mikotoksina daleko su veće od dnevnog unosa tih mikotoksina europskog stanovništva što je primjereno za istraživanje mehanizma njihovog toksičnog djelovanja. U našem su istraživanju životinje dobivale 125 i 250 µg OTA kg^{-1} tm jer je u našim prijašnjim istraživanjima nađeno da pri toj dozi primijenjenoj 21 dan dolazi do promjena nekih parametara oksidacijskog stresa. Dnevna doza RSV-a (20 mg kg^{-1} tm) odabrana je prema literaturnim podacima.

Mikotoksini su u organizam unošeni oralno jer su ljudi i životinje ovim mikotoksinima najčešće izloženi kontaminiranom hranom.

Različito trajanje tretmana s OTA i CTN-om odabrano je zbog razlike u toksikokinetici. Naime, OTA se dobro apsorbira i dugotrajno zadržava u organizmu zbog vezanja na albumine plazme i druge proteine kao i zbog enterohepatičke cirkulacije, a toskični se učinci razvijaju sporo (Chu i sur. 1971; Fuchs i sur. 1988b). Za razliku od OTA, samo se manji dio CTN-a apsorbira u probavnom sustavu i brzo se izlučuje iz organizma (Hesseltine, 1986).

U našim smo pokusima tijekom tretmana od 21 dan svakodnevno mjerili masu životinja, a budući da su oba korištena mikotoksina nefrotoksični spojevi, svaki smo treći dan mjerili i volumen izlučenog urina. Tijekom pokusa nije bilo ugibanja životinja, a masa životinja postepeno je rasla što je u skladu s našim prijašnjim istraživanjima (Domijan i sur., 2004a). Porast tjelesne mase životinja ovisio je o njihovoj masi na početku pokusa. U životinja kojima je masa na početku pokusa bila oko 300 grama porasla je tijekom tri tjedna pokusa za 10-20

grama pa su dosegli uobičajenu tjelesnu masu štakora u odrasloj dobi. Štakori koji su na početku pokusa imali manju tjelesnu masu (270-290 grama), imali su veći porast tjelesne mase do kraja pokusa te su tada dostigli masu od 310-320 grama. Najveći porast tjelesne mase zabilježen je u životinja koje su na početku pokusa imale 230-250 grama, dok su krajem pokusa dostigle masu od oko 300 grama.

Arai i Hibino (1983) pratili su promjenu tjelesne mase muških štakora tretiranih CTN-om tijekom 80 tjedana te primijetili da je povećanje tjelesne mase životinja tretiranih CTN-om manje od povećanja tjelesne mase kontrolnih životinja. U našem istraživanju nije nađena razlika u masi tretiranih i kontrolnih životinja jer je pokus prekratko trajao da bi se tretman mogao odraziti na njihovu masu.

Domijan i sur. (2004a) su u istraživanju provedenom na štakorima tretiranim ip s 500 µg OTA kg^{-1} tm tijekom četiri tjedna primijetili povećanje volumena urina dvanaesti dana tretmana, nakon čega se vratio na početne vrijednosti do kraja tretmana. U ovom je doktorskom radu, 24-satni urin sakupljan svaki treći dan pokusa, počevši s danom prije prvog tretmana toksinima, a zadnji je uzorak urina sakupljan tijekom 24 sata prije žrtvovanja životinja. Nije primijećena pravilnost u izlučivanju urina tijekom tretmana, a niti razlika u kontrolnim i tretiranim skupinama. Razlika u izlučivanju urina u ovom radu i prije opisanom radu Domijan i sur. (2004a) vjerojatno je nastala zato što su u ovom istraživanju korištene manje doze OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) a pokus je trajao kraće pa nisu mogla nastati oštećenja bubrega koja bi se očitovala promjenom izlučivanja urina.

U ovom istraživanju izmjerena je koncentracija OTA i CTN-a u bubregu, jetri i mozgu životinja nakon različitih tretmana. Nakon tretmana pokusnih životinja s OTA i CTN-om (Slika 5-10) koncentracija OTA u bubregu i jetri bila je niža nego u životinja koje su tretirane samo s OTA (Slika 5-8) dok je koncentracija CTN-a bila viša nego u životinja koje su dobile sam CTN. Budući da se nakon zajedničkog tretmana koncentracija CTN-a znatno povećava ovisno o dozi primijenjenog OTA, može se pretpostaviti da OTA omogućava ulazak CTN-a u stanice.

Meki i Hussein su nakon tretmana štakora 250 OTA µg kg^{-1} tm gastričnom sondom dnevno tijekom četiri tjedna našli povećanu koncentraciju MDA u serumu, jetri i bubrezima u odnosu na kontrolnu skupinu (Meki i Hussein, 2001).

Petrik i sur. (2003) tretirali su štakore s OTA (120 µg kg^{-1} tm) tijekom 10, 30 i 60 dana te je proučavan učinak OTA na lipidnu peroksidaciju. Povćana koncentracija MDA pronađena je u tkivu bubrega životinja koje su tretirane 60 dana.

Hoehler i sur. (1996) hranili su tri tjedna štakore hranom kontaminiranom s OTA od 5 mg kg^{-1}, što prema procjeni odgovara unosu od 500 µg kg^{-1} tm OTA. Nije pronađen porast MDA u plazmi, bubrezima ili jetri štakora. Iako su doze OTA bile veće od primijenjenih u prethodnom pokusu, u tom istraživanju nije nađen učinak na lipidnu peroksidaciju što se može objasniti mogućom smanjenom apsorpcijom OTA iz kontaminirane hrane.

U dostupnoj literaturi nema podataka o učinku CTN-a kao i učinka OTA i CTN-a na koncentraciju MDA u tkivima pokusnih životinja.

U ovom istraživanju nađena je povećana koncentracija MDA u bubregu nakon svakodnevnog izlaganja štakora OTA dozi od 250 µg kg^{-1} tm tijekom tri tjedna čime je potvrđeno da je povećanje lipidne peroksidacije mogući mehanizam nefrotoksičnosti OTA. Sam CTN nije uzrokovao povećanje koncentracije MDA u niti jednom organu tretiranih životinja. Međutim, kada su životinje tretirane nižom dozom OTA (125 µg kg^{-1}) i CTN-om koncentracija MDA bila je značajno veća ne samo u bubregu nego i u plazmi i mozgu. Nakon tretmana višom dozom OTA (250 µg kg^{-1}) i CTN-om značajno viša koncentracija MDA u odnosu na kontrole nađena je u plazmi, bubregu i jetri.

Kada su životinje istovremeno tretirane s OTA i RSV-om tijekom 21 dan i CTN-om posljednja dva dana pokusa značajno viša koncentracija MDA nađena je samo u jetri životinja tretiranih nižom dozom OTA. U životinja tretiranih višom dozom OTA, CTN-om i RSV-om nije nađena razlika u koncentraciji MDA u ijednom tkivu tretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Smanjenje koncentracije MDA nakon tretmana RSV-om potvrđuje da je mehanizam toksičnog djelovanja OTA i CTN-a oksidacijski stres koji se smanjuje zbog poznatih antioksidacijskih svojstava RSV-a.

U ovom je radu istraživan učinak OTA i CTN-a na koncentraciju GSH u plazmi, bubregu, jetri i mozgu životinja. GSH se sintetizira u jetri i plazmom dolazi u druge stanice gdje štiti stanicu od slobodnih radikala. Povećana koncentracija slobodnih radikala uzrokuje smanjenje koncentracije GSH.

U literaturi je opisan učinak OTA na koncentraciju GSH ispitivan na kulturama stanica i na pokusnim životinjama.

Na primarnim stanicama bubrežnih tubula štakora nađeno je da OTA povećava koncentraciju reaktivnih kisikovih spojeva i smanjuje koncentraciju GSH (Schaaf i sur., 2002). Primjenom antioksidacijskih spojeva alfa-tokoferola i n-acetil-L-cisteina povećala se koncentracija GSH u

stanicama. Smanjenje koncentracije GSH nađeno je u bubregu i jetri štakora koji su tretirani četiri tjedna s OTA svakodnevno gastričnom sondom (250 µg kg^{-1}) (Meki i Hussein, 2001).

Na kulturama ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549 nađeno je da subtoksične koncentracije CTN-a uzrokuju smanjenje razine unutarstaničnog GSH (Johannessen i sur. (2007.). Učinak CTN-a na koncentraciju GSH u organima pokusnih životinja nije opisan u dostupnoj literaturi.

U dostupnoj literaturi nema podataka ni o zajedničkom učinku OTA i CTN-a na koncentraciju GSH.

U ovom istraživanju kada su životinje izložene samo OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) smanjenje koncentracije GSH primijećeno je u plazmi i svim analiziranim organima (plazma, bubrezi, jetra, mozak) ovisno o dozi. To je smanjenje bilo značajno samo u bubrezima i mozgu životinja koje su tretirane višom dozom OTA. U skladu s prethodnim istraživanjima, ovi rezultati ukazuju na vjerojatnu ulogu oksidacijskog stresa u mehanizmu nefrotoksičnog učinka OTA.

Tretman životinja CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) u dva uzastopna dana uzrokovao je značajno sniženje koncentracije GSH u plazmi tretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Budući da je GSH pokazatelj koji u pravilu brzo odražava oksidacijski stres, moguće je da bi duže izlaganje CTN-u rezultiralo promjenama MDA.

Učinak obje doze OTA bio je povećanje oksidacijskog stresa kada su životinje bile tretirane i s CTN-om. Pri manjoj dozi OTA nađeno je značajno sniženje koncentracije GSH u jetri, a pri višoj u bubregu, jetri i mozgu. Rezultati mjerenja koncentracije GSH u ovom pokusu ukazuju da CTN pojačava učinak OTA na oksidacijski stres u različitim organima.

Kada su životinje tretirane RSV-om zajedno s mikotoksinima značajno niža koncentracija GSH nađena je samo u bubregu životinja tretiranih višom dozom OTA (250 µg kg^{-1} tm) i CTN-om. Rezultat upućuje na znatno antioksidacijsko djelovanje RSV-a.

Nakon izlaganja životinja OTA i CTN-u, bez obzira jesu li mikotoksini dani pojedinačno ili zajedno, mjereni parametri oksidacijskog stresa u mozgu su bili nedosljedni. Takav je rezultat vjerojatno posljedica slabog ulaska mikotoksina u mozak, što je u suglasnosti s rezultatima dobivenim autoradiografijom (Fuchs i sur. 1988b).

Katalitička aktivnost enzima SOD-a, CAT i GPx-a dobri su pokazatelji oksidacijskog stresa u stanicama. U dosadašnjim je istraživanjima nađeno da tretman malim koncentrcijama OTA (5 ng i 50 µg kg^{-1}) tijekom dva tjedna ne uzrokuje smanjenje katalitičke aktivnosti SOD-a i CAT-a

(Domijan et al., 2007). Drugi su autori mjerili aktivnosti SOD-a, CAT-a, GPx-a, glutation reduktaze (GR) i glutation-S-transferaze (GST) u bubrezima i jetri štakora koji su oralno dnevno četiri tjedna tretirani s višom dozom OTA (250 µg kg^{-1} tm) (Meki i Hussein, 2001). Nakon tog tretmana u jetri i bubrezima štakora došlo je do smanjenja koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu kao i značajnog smanjenja aktivnosti enzima SOD-a, CAT-a, GPx-a, GR-a i GST-a. Autori smatraju da je oksidacijski stres glavni mehanizam toksičnog učinka OTA.

Učinak OTA (120 µg kg^{-1} tm) na promjenu katalitičke aktivnosti SOD-a proučavan je na štakorima koji su tretirani ovim mikotoksinom tijekom 10, 30 i 60 dana (Petrik i sur., 2003). Povećana katalitička aktivnost SOD-a izmjerena je u tkivu bubrega životinja koje su tretirane 60 dana.

Učinak CTN-a na nastanak ROS-ova i katalitičku aktivnost enzima SOD-a, CAT-a i GPx-a istraživan je na kulturi stanica jetre (Ribeiro i sur., 1997). Iako je nađeno povećanje proizdvodnje ROS-ova, nije bilo promjene aktivnosti SOD-a, CAT-a i GPx-a. U tom je istraživanju nađeno znatno povećanje stvaranje ROS-ova, smanjenje aktivnosti GSSG-reduktaze i transhidrogenaze pa autori smatraju da je uz oksidacijski stres važni mehanizam nastanka toksičnog učinka CTN-a poremećaj permeabilnosti membrana mitohondrija.

U ovom su istraživanju SOD i CAT mjereni u plazmi i eritrocitima životinja dok je GPx mjerena u punoj krvi. Aktivnost SOD-a bila je smanjena u plazmi životinja tretiranih višom dozom OTA, nižom dozom OTA i CTN-om te višom dozom OTA, CTN-om i RSV-om. Zanimljivo je da je aktivnost eritrocitnih enzima SOD-a i CAT-a bila smanjena samo u životinja tretiranih CTN-om. Katalitička aktivnost CAT-a u plazmi nije se promijenila nakon ijednog tretmana. Katalitička aktivnost GPx-a u plazmi smanjila se nakon tretmana nižom dozom OTA i CTN-om, dok se aktivnost GPX-a u punoj krvi nije smanjila nakon ijednog tretmana. Iako ovi rezultati nisu u potpunosti konzistentni, ipak upućuju na to da je oksidacijski stres jedan od mehanizama njihove toksičnosti.

Nađeno je da OTA i CTN djeluju sinergistički na inhibiciju sinteze DNA, RNA i proteina u kulturi stanica hepatoma (Creppy i sur. 1980). Sinergističko djelovanje OTA i CTN nađeno je MTT testom na bubrežnim stanicama LLC-PK1 (Heusner i sur. 2006) i na Vero stanicama (Bouslimi i sur. 2008). Na kulturi Vero stanica, uz smanjenje vijabilnosti, dokazano je da OTA i CIT uzrokuju značajno povećanje fragmentacije DNA (Bouslimi i sur. 2008). Isti su autori našli

da izloženost miševa ovim mikotoksinima značajno povećava broj kromosomskih aberacija u koštanoj srži.

Dok su neki autori našli na psima kao pokusnim životinjama da OTA i CTN imaju sinergističko djelovanje na oštećenje funkcije bubrega (Kitchen i sur. 1977), drugi autori su na kokošima našli da su OTA i CTN antagonisti, jer predtretman s OTA smanjuje učinak CTN-a (Glahn i sur. 1988).

U našem istraživanju u kojem su životinje istovremeno izlagane OTA i CTN-u, u životinja koje su tretirane nižom dozom došlo je do značajnog smanjenja koncentracije GSH u i jetri, dok je u životinja koje su tretirane višom dozom to smanjenje bilo značajno u bubrezima, jetri i mozgu. Nakon takvog izlaganja došlo je i do značajnog povećanja koncentracije MDA u tim organima. Budući da je sniženje koncentracije GSH i povišenje koncentracije MDA znak oksidacijskog stresa koji nije nađen kada su OTA i CTN davani životinjama odvojeno, može se zaključiti da CTN pojačava djelovanje OTA nastankom oksidacijskog stresa u ciljnim organima.

Razina oksidacijskog štećenje DNA mjerena je u stanicama bubrega i jetre štakora hOGG1 komet testom. Mjereni su duljina i intenzitet repa kometa u životinja tretiranim s OTA, CTN-om i RSV-om pojedinačno i zajedno. Nakon tretmana s OTA nije zabilježena promjena duljine i intenziteta repa kometa u stanicama bubrega i jetre, dok je nakon tretmana CTN-om zabilježena samo promjena intenziteta repa kometa na stanicama bubrega. Intenzitet repa kometa bolji je pokazatelj oksidacijskog oštećenja DNA, nego duljina repa kometa.

Nakon tretmana s oba mikotoksina zajedno značajno povećanje vrijednosti duljini repa kometa primijećeno je u stanicama bubrega životinja koje su tretirane nižom dozom OTA i CTN-om te u stanicama jetre životinja koje su tretirane višom dozom OTA i CTN-om. Značajno povećanje intenziteta repa kometa primijećeno je u stanicama oba organa životinja tretiranih i s nižom i s višom dozom OTA i CTN-om. U svim navedenim pokusima promjena intenziteta repa kometa nađena je pri nižim dozama negoli duljina repa kometa što je posljedica veće osjetljivosti intenziteta repa kao pokazatelja oštećenja DNA uslijed oksidacijskog stresa.

U životinja tretiranih s OTA, CTN-om i RSV-om značajno povećanje duljine repa kometa zabilježeno je u stanicama bubrega i jetre životinja tretiranim višom dozom OTA, CTN-om i RSV-om dok pri nižoj dozi OTA nije nađena razlika u odnosu na kontrole. Intenzitet repa kometa bilo je značajno viši u brubrezima životinja koje su dobile višu i nižu dozu

OTA+CTN+RSV, dok je u jetri bio viši samo pri višoj dozi OTA+CTN+RSV. U ovom je pokusu uočen manji zaštitni učinak RSV-a na oksidacijsko oštećenje DNA negoli je bio učinak na GSH i lipidnu peroksidaciju što ukazuje da bi osim oksidacijskog oštećenja mikotoksini mogli dovoditi do oštećenja genetičkog materijala i drugim mehanizmima poput stvaranja adukata ili epigenetičkim djelovanjem.

7 ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata mjerenja koncentracije antioksidacijskog spoja GSH, parametra lipidne peroksidacije (MDA) i antioksidacijskih enzima (SOD, CAT i GPx) u pokusima u kojima su štakori bili tretirani s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm), CTN-om (20 mg kg^{-1} tm), kombinacijom tih dvaju mikotoksina te mikotoksinima i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) može se zaključiti sljedeće:

1. Budući da tretman s OTA i CTN-om nije utjecao na tjelesnu masu životinja niti uzrokovao njihovo ugibanje, primjenjene doze nisu imale opći toksični učinak.
2. Primjenjene doze mikotoksina bilo da su primjenjivane pojedinačno ili zajedno ne uzrokuju oštećenja bubrega koja bi dovela do promjene volumena urina.
3. Iako primijenjena doza CTN-a ne uzrokuje promjenu koncentracije MDA u plazmi, bubregu i jetri, a doza od 125 µg kg^{-1} OTA povećava njegovu koncentraciju samo u bubregu, zajednička primjena OTA i CTN-a uzrokuje povećanu lipidnu peroksidaciju u plazmi, bubregu i jetri pa se može zaključiti da CTN potencira toksični učinak OTA.
4. Budući da nakon tretmana životinja RSV-om dolazi do smanjenja lipidne peroksidacije u svim organima osim u plazmi pri dozi od 250 µg kg^{-1} OTA i CTN-u (20 mg kg^{-1} tm) može se zaključiti da RSV ima protektivno antioksidacijsko djelovanje pri ovim dozama OTA i CTN-a.
5. U životinja tretiranih CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) snižena je koncentracija GSH, katalitička aktivnost katalaze u eritrocitima te je povećan intenzitet repa kometa u stanicama jetre. Na temelju promjene ovih parametara može se zaključiti da je oksidacijski stres jedan od mehanizama toksičnosti CTN-a.
6. Pojedinačni tretman pokusnih životinja mikotoksinima smanjuje koncentraciju GSH u pojedinim organima (doza od 250 µg kg^{-1} OTA smanjuje koncentraciju GSH u bubregu i mozgu, a CTN u plazmi) dok je koncentracija GSH u životinja tretiranih s OTA (250 µg kg^{-1}) i CTN-om smanjena u bubregu, jetri i mozgu. Ti rezultati ukazuju na potencirajući učinak CTN-a na toksičnost OTA.
7. Nakon tretmana životinja s OTA, CTN-om i RSV-om snižena koncentracija GSH izmjerena je samo u bubrezima životinja tretiranih s OTA (250 µg kg^{-1}), CTN-om i RSV-om. Može se zaključiti da RSV ima značajan antioksidacijski zaštitni učinak.

8. Iako se katalitička aktivnost enzima SOD, CAT i GPx smanjuje u plazmi i eritrocitima tretiranih mikotoksinima, rezultati nisu jednoznačni.
9. Primijenjene doze OTA nisu uzrokovale oksidacijsko oštećenje DNA, a primijenjena doza CTN-a uzokovala je povećanje oksidacijskog oštećenja DNA u stanicama bubrega. Zajednička primjena OTA (125 i 250 µg kg^{-1}) i CTN-a uzrokovala je oksidacijsko oštećenje u stanicama bubrega i jetre tretiranih životinja što ukazuje na značajni potencirajući učinak CTN-a.
10. Potencirajuće djelovanje CTN-a na OTA najbolje je izraženo kod oksidacijskog oštećenja DNA u stanicama jetre i bubrega.
11. Učinak primjenjene doze RSV-a bio je značajno smanjenje oksidacijskog oštećenja DNA samo u jetri životinja tretiranih s OTA (125 µg kg^{-1}) i CTN-om što ukazuje na primjetan, ali nedovoljan zaštitni učinak RSV-a na oksidacijsko oštećenja DNA.
12. Ovim istraživanjem dokazano je da oksidacijski stres sudjeluje u mehanizmu toksičnosti CTN-a koji potencira toksičnost OTA. CTN naročito potencira genotoksičnost OTA izmjerenu kao oksidacijsko oštećenje DNA. Oksidacijski stres uzrokovan zajedničkom primjenom OTA i CTN-a može se znatno umanjiti primijenjenom dozom RSV-a.

8 POPIS KORIŠTENIH KRATICA

CAT - katalaza

CTN – citrinin

GPx – glutation peroksidaza

GSH – glutation

hOGG1 - 8-oksogvanin-DNA-glikozilaza 1 (hOGG1) enzim

MDA – malondialdehid

OTA – okratoksin A

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (reactive oxigen species)

RSV – resveratrol

SOD – superoksid dismutaza

9 LITERATURA

1. Abarca ML, Bragualt MR, Castella G, Cabanes FJ. (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var *niger*. Appl Environ Microbiol 60:2650-2652.
2. Abd Alla ESAM. (1996) Natural occurrence of ochratoxin A and citrinin in food stuffs in Egypt. Mycotoxin Research 12:41-44.
3. Abd-Allah EF, Ezzat SM. (2005) Natural occurrence of citrinin in rice grains and its biocontrol by Trichoderma hamatum. Phytoparasitica 33:73-84.
4. Aebi H. (1984) Catalase *in Vitro*. Method Enzym 105:121-126.
5. Aggarwal B, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer:preclinical and clinical studies. Anticancer Research 24:2783-2840.
6. Arai M, Hibino T. (1983) Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. Cancer Lett 17:281-287.
7. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR. (2007) Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. Toxicol Appl Pharmacol 224:274–83.
8. Bauer von J, Gareis M, Gedek B. (1984) Zum Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A bei Schlachtschweinen. Berl Münch Tierärztl Wschr 97:279-283.
9. Baur JA, Oearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 444:337-342.
10. Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailidis TJ, Mahoney NE. (2002) Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. Appl Environ Microbiol 68:2326-2329.
11. Belli N, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. (2004) Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *nigri* obtained from grapes. Int J Food Microbiol 96:19-27.
12. Belmadani A, Steyn PS, Tramu G, Betbeder AM, Baudrimont I, Creppy EE. (1999) Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions. Arch Toxicol 73:108-114.

13. Belsten JL, Wright AJ. (1995b) European community - FLAIR common assay for erythrocyte superoxide dismutase (SOD); results of an inter-laboratory trial. Eur J Clin Nutr 49:928-931.
14. Belsten JL, Wright AJ. (1995a) European Community – FLAIR common assay for whole-blood glutathione peroxidase (GSH-Px); results of an inter-laboratory trial. Eur J Clin Nutr 49:921-927.
15. Bendele AM, Carlton WW, Krogh P, Lillehoj EB. (1985) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57B1/6J x C3H) F1 mouse. J Nat Cancer Int 75:733-742.
16. Berndt WO, Hayes AW. (1982) The effect of probenicid on Citrinin-induced nephrotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 64:118-124.
17. Bertelli AAE, Das DK. (2009) Grapes, wines, resveratrol and heart health. J Cardiovasc Pharm 54:468-476.
18. Bertelli AAE, 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. Internat J Tissue Reaction 18:67-71.
19. Bertelli AAE. (2007) Wine, research and cardiovascular disease: instructions for use. Aterosclerosis 195:242-247.
20. Betina V. (1989) Citrinin. In: Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 174-191.
21. Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. (1995a) Characterisation of monascidin A from *Monascus* as a citrinin. Int J Food Microbiol 27:201-213.
22. Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. (1995) Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. Int J Food Microbiol 27:201-213.
23. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. (1995b) Production of Citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnology Lett 17:291-294.
24. Boorman GA. (1989) Toxicology and carcinogenesisi studies of ochratoxin A in F344/N rats. NTP Tehnical Report 358, NIH Publication No. 89-2813.
25. Bouslimi A, Bouaziz C, Ayed-Boussema I, Hassen W, Bacha H. (2008) Individual and combined effect of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in

cultured Vero cells and on chromosome aberration in mice bone marrow cells. Toxicology 251:1-7.

26. Bragulat MR, Martinez E, Castella G, Cabanes FJ. (2008) Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. Internat J Food Microbiol 126:43-48.

27. Breitholtz Emanuelsson A, Fuchs R, Hult K, Appelgren LE. (1991) Distribution of 14C-ochratoxin A and 14C-ochratoxin B in rats: a comparison based on whole-body autoradiography. In Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract tumors (ed. Castegnaro M, Pleština R, Dirheimer G, Cgernozemsky IN i Bartsch H), Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp 201-203. IARC, 1991.

28. Breitholtz-Emanuelsson A, Olsen M, Oskarsson A, Palminger I, Hult K. (1993) Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. J AOAC Int 76:842-846.

29. Brigelius-Flohe R i Maiorino M. (2012) Glutathione peroxidases. Biochim Biophys Acta (article in press).

30. Buege JA, Aust SD. (1977) Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 52:302-310.

31. Carlton WW, Tuite J. (1977) Metabolites of *P. viridicatum* toxicology. U: Rodricks J. V., Hesseltine D. W., Mehlman M. A. (Ur.) Mycotoxins in human and animal health. Illinois, Pathotox Publications Inc., str. 525-555.

32. Castegnaro M, Mohr U, Pfohl-Leszkowicz A, Estève J, Steinmann J, Tillmann T, Michelon J, Azemar B, Bartsch H. (1998) Strain- and sex-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. Int J Cancer 77:70–5.

33. Chu FS. (1971) Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumine. Arch Biochem Biophys 147:359-366.

34. Constant J. (1997) Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. Clin Cardiol 20:420-424.

35. Corcuera LA, Vettorazzi A, Arvillaga L, González-Peñas E, López de Cerain A. (2012) An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. Food Chem Toxicol 50:3440-3446.

36. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguiller-Morizot C, Beaudeux, JL. (2010) Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. Mol Nutr Food Res 54:7-16.

37. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Mycotoxins, economic and health riskc. Report No. 116. Ames, Iowa: CAST; 1980.

38. Creepy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S, Frayssinet C. (1985) Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. Toxicol Lett 28:29-35.

39. Creppy EE, Baudrimont I, Betbeder AM. (1995) Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. Toxicol Lett 83:869-877.

40. Creppy EE, Lorkowski G, Berck G, Röschenthaler, Dirheimer G. (1980) Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells. Toxicol Lett 5:375-380.

41. Creppy EE, Stormer FC, Kern D, Roschenthaler R, Dorheimer G. (1983) Effects of ochratoxin Ametabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and *in vivo* protein synthesis of hepatoma cells. Chem-Biolog Interacti 47:239-247.

42. Cvetnić Z, Pepeljnjak S. (1989) Toksikogenost sojeva Aspergillus ochraceus nefropatičnog i anefropatičnog područja SR Hrvatske (Poseban otisak), Sarajevo 1989, Posebna izdanja, Knjiga LXXXIX, odjeljenje medicinskih nauka, Knjiga 14.

43. Cvjetković B, Jurjević Ž. Zaštita pšenice od Fusariuma primjenom fungicida i utjecaj na mikotoksine (The control of Fusarium on wheat by fungicides and its influence on mycotoxins, in Croatian). In: Plijestić S, editor. Zbornik radova 13. Međunarodnog savjetovanja tehnologa sušenja i skladištenja (Proceedings of the 13th International symposium of tehnologiss for drying and storing) 22-24 Jan 1997; Stubičke Toplice, Croatia. Zagreb: Faculty of Agriculture, University of Zagreb; 1997. P.1-23.

44. Das S, Das DK. (2007) Anty-inflammatory responses of resveratrol. Inflammation and Allergy: Drug Targets 6:168-173.

45. Dietrich R, Schmid A, Märtlbauer E. (2001) Citrinin in fruit juices. Mycotoxin Res 17:156-159.

46. Domijan AM, Peraica M, Ferenčić Ž, Čužić S, Fuchs R, Lucić A, Radić B. (2004b) Ochratoxin A-induced apoptosis in rat kidney tissue. Arh Hig Rada Toksikol 55:243-248.

47. Domijan AM, Peraica M, Fuchs R, Lucić A, Radić B. (2004a) Effect of ochratoxin A on enzymr activity and malondialdehyde in rat urine. Period Biolog 106:373-376.

48. Domijan AM, Peraica M, Lucić Vrdoljak A, Radić B, Žlender V, Fuchs R. (2007) The involvement of oxidative stress in ochratoxin A and fumonisin B1 toxicity in rats. Mol Nutr Food Res 51:1147-1151.

49. Domijan AM, Peraica M, Žlender V, Cvjetković B, Jurjević Ž, Topolovec Puntarić S, Ivić D. (2005a) Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (Phaseolus vulgaris L.) in the Republic of Croatia. Food Chem Toxicol 43:427-432.

50. Domijan AM, Peraica M. (2005b) Ochratoxin A in wine. Arh Hig Rada Toksikol 56:17-20.

51. Domijan AM, Peraica M. (2010) Carcinogenic Mycotoxins. In: Chalene A. McWuenn, Comprehensive Toxicology, volume 14, pp. 125-137. Oxford: Academic Press.

52. Domijan AM, Želježić D, Kopjar N, Peraica M. (2006) Standard snd Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B_1-treated rats. Toxicology 222:53-59.

53. Dömnez-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.

54. Dostal A, Jakusova L, Cajdova J, Hudeckova H. (2008) Results of the first studies of occurence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. Bratisl Lek Listy 106:276-278.

55. Drury J A, Nycyk J A, Cooke R W I. (1997) Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. Clin Chim Acta 263:177-185.

56. Dunn BB, Stack ME, Park DL, Joshi A, Friedman L, King RL. (1983) Isolation and identification of dihydrocitrinone, a urinary metabolite of citrinin in rats. J Toxicol Environ Health 12:183-289.

57. Dwiwedi P, Burns RB. (1986) The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. World Poultry Sci J 42:32-47.

58. EFSA (2012) Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA Panel on Contaminants int he Food Chain (CONTAM); European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italija.

59. Ellman GL. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch Biochem Biophys 74:443-450.

60. El-Sayed AMAA. (1996) Natural occurrence of ochratoxin A and citrinin in food stuffs in Egypt. Mycotoxin Research 12:41-44.

61. Fang JG, Lu M, Chen ZH, Zhu HH, Li Y, Yang L. (2002). Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. Chemistry – A Europ J 8:4191-4198.

62. Fernandez-Mar MI, Mateos R, Garcia-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. (2012) Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. Food Chem 130:797-813.

63. Fink-Gremmels J, Dresel J, Leistner L. (1991) Use of Monascus extracts as an alternative to nitrate in meat products. Fleischwirtschapt 71:1184-1186.

64. Fink-Gremmels J, Jahm A, Blom MJ. (1995) Toxicity and metabolism of ochratoxin A. Natural Toxins 3:214-220.

65. Flajs D, Domijan AM, Ivić D, Cvjetković B, Peraica M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. Food Control 20:590-592.

66. Föllmann W, Hillebrand IE, Creppy EE, Bolt HM. (1995) Sister chromatid exchange frequency in culture isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. Arch Toxicol 69:280-286.

67. Föllmann W, Lebrun S, Kullik B, Kock M, Römer HC, Golka K. (2000) Citotoxicity of ochratoxin A and citrinin in different cell types *in vitro.* Mycotoxin Res 16:123-126.

68. Frank HK. (1992) Citrinin. Z Ernährungswiss 31:164-177.

69. Fuchs R, Appelgren LE, Hagelberg S, Hult K. (1988a) Carbon-14-ochratoxin A distribution in the japanese quail (Coturnix coturnix japonica) monitored by whole body autoradiography. Poultry Sci 67:707-714.

70. Fuchs R, Appelgren LE, Hult K. (1986) Distribution of 14C-ochratoxin A in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Acta Pharmacol Toxicol 59:220-227.

71. Fuchs R, Appelgren LE, Hult K. (1988b) Distribution of 14C-ochratoxin A in the mouse monitored by whole-body autoradiography. Pharmacol Toxicol 63:355-360.

72. Galvano F, Piva A; Ritieni A, Galvano D. (2001) Dietary strategies to counteract the effects on milk production and components. J Anim Sci 64:120-131.

73. Gareis M, Märtlbauer E, Bauer J, Gedek B. (1988) Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch. Z Lebensm Unters Forsch 186:114-117.

74. Gehm BD, McAndrews JM, Chein PY, Jameson JL. (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. Proc Nat Acad Sci 94:14138-14143.

75. Gekle M, Oberleithner H, Silbernagel S. (1993) Ochratoxin A impairs „postproximal“ nephron function *in vivo* and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-Darby caninekidney cells *in vitro*. Pflugers Arch 425:401-408.

76. Glahn RP, Wiedeman RF, Enangelisti JW. (1988) Effects of ochratoxin A alone and in combination with citrinin on kidney function of single comb white leghorn pullets. Poultry Sci 67:1034-1042.

77. Glahn RP, Wiedman RF, Evangelisti JW. (1987) Effects of ochratoxin A alone and in combination with citrinin on kifney function of single comb white leghorn pullets. Poultry Sci 67:1034-1042.

78. Grazioli B, Fumi MD, Silva A. (2006). The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: A study on naturally contaminated grapes. Internat J Food Microbiol 111:S93-S96

79. Griffith OW. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Rad Biol Med 27:922-935.

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

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

82. Hanika C, Carlton WW. (1994) Toxicology and pathology of citrinin. U: Llewellyn G. C., Dashek W. V., O'Rear C. E. (ur.) Biodeterioration research 4. Mycotoxins, wood decay, plant stress, biocorrosion and general biodeterioration. New York, Plenum Press, str. 41-63.

83. Harikumar KB, Aggarwal BB. (2008) Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. Cell Cycle 7:1020-1035.

84. Hatanaka J, Doke N, Harada T, Aikawa T and Enomoto M. (1982) Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in medaka, *Oryzias latipes*. Japan J Experimen Med 52:243-253.

85. Hesseltine CW. (1986) Global significance of mycotoxins. In: Mycotoxins and Phycotoxins. Steyn PS, Vleggar R (eds) Elsevier, Amsterdam.

86. Hetherington AC, Raistrick H. (1931) Studies on biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow coloring matter, citrinin produced from glucose by Penicilium citrininum Thom. Phil Trans Roy Soc London, Ser B 220:269-296.

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

88. Hoehler D, Marquardt RR, Frohlich A. (1996) Lipid peroxidation as one mode of action of ochratoxin A toxicity in rats and chicks. Can J Anim Sci 77:287-292.

89. Höhler D. (1998) Ochratoxin A in food and feed: occurence, legislation and mode of action. Z Ernährungswiss 37:2-12.

90. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature 425:191-196.

91. Hult K, Pleština R, Habazin Novak V, Radić B, Čeović S. (1982) Ochratoxin A in human blood and balkan endemic nephropathy. Arch Toxicol 51:313-321.

92. IARC (1983) *Approaches to Classifying Chemical Carcinogens According to Mechanism of Action* (IARC intern. tech. Rep. No. 83/001)

93. IARC (1986) Citrinin. Some naturally occuring and synthetic food components, surocoumarins and ultraviolet radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 40.67.

94. IARC (1993) Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 56. Some natirally occuring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International agency for research on cancer, Lyon. Pp. 489-521

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

96. Johannessen LN, Nilsen AM, Lovik 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.

97. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM (2002) The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. J Nutr 132:257-260.

98. Kamp HG, Eisenbrand G, Schlatter J, Würth K, Janzowski C. (2005) Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. Toxicology 206:413-425.

99. Kanisawa M. (1984) Synergistic effects of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. Toxigenic fungi – their toxins and health hazard 4:245-254.

100. Karlsson J, Emgard M, Brundin P, Burkitt MJ. (2000) Trans-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide:Electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. J Neurochem 75:141-150.

101. Kitabatake N, Trivedi AB, Doi E. (1991) Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions. J Agricult Food Chem 39:2240-2244.

102. Kitchen D, Carlton WW, Tuite J. (1977) Ochratoxin A and Citrinin induced nephrosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological Features. Vet Pathol 4:154-172.

103. Kleinman WA, Richie JP. (2000) Status of glutathione ond other thiols and disulfides in human plasma. Biochem Pharmacol 60:19-29.

104. Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW, Erlich 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. Nutrit Cancer 50:190-197.

105. Knecht A, Schwerdt G, Gekle M, Humpf HU. (2005) Combinatory effect of citrinin and ochratoxin A in immortalized human proximal tubule cells. Mycotoxin Research 21:176-181.

106. Kozakiewicz Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. Mycological paper no. 161, CAB International Mycological Institute, Kew, UK, p. 1.

107. Kpodo K, Sorensen AK, Jakobsen M. (1996) The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. Food Chem 56:147-153.

108. Krogh P, Axelsen NH, Elling F, Gyrd-Hansen N, Hald B, Hyldaard-Jensen J, Larsen AE, Madsen A, Mortensen HP, Moller T, Peterson OK, Ravnskov U, Rostgaard M, Aalund O. (1974) Experimental porcine nephopathy. Acta Pathol Microbiol Scand Supp 246:1-21.

109. Krogh P, Gyrd-Hansen N, Hald B, Larsen S, Nielsen JP, Smith M, Ivanoff C, Meisner H. (1988) Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine

nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gammaglutamyl transpeptidase activity. J Toxicol Environ Health 23:1-14.

110. Krogh P, Hald B, Gjersten P, Myken F. (1974) Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. Appl microbiol 1:31-34.

111. Krogh P. (1972) Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for balkan Endemic Nephropathy. Bulgarian cademy of Sciences. Endemic nephropathy. Proceedings oft he second International Symposium on Endemic Nephropathy, Sofia, November 9-11.

112. Krogh P. (1976) Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. Nord Veterinaermed 28:452-458.

113. Krogh P. (1987) Ochratoxin in food. Page 97 in P. Krogh, ed. Mycotoxins in food. Academic Press, Inc., London, UK.

114. Kuiper-Goodman T, Scott PM. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomed Environ Sci 2:179-248.

115. Kumari CK, Nusrath M. (1987) Natural occurrence of citrinin and ochratoxin A in coconut products. Nat Acad Sci Lett-India 10:303-305.

116. La vecchia C. Bosetti C. (2006) Diet and cancer risk in mediterranean countries: open issues. Pub Health Nutrit 9:1077-1082.

117. Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J. (2001) Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. Appl Environ Microbiol 67:3630-3635.

118. Lee CL, Chen WP, Wang JJ, Pan TM (2007) A simple and rapid approach for removing citrinin while retaining monacolin K in red mold rice. J Agricult Food Chem 55:11101-11108.

119. Li Y, Cao Z, Zhu H (2006). Up-regulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyohenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and elektrophilic stress. Pharmacological Research 53:6-15.

120. Lillehoj EB, Aalund O, Hald B. (1978) Bioproduction of ^{14}C ochratoxin A in submerged culture. Appl Eniviron Microbiol 36:720-723.

121. Liochev SI, Fridovich I. (2010) Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. Free Rad Biol Med 48:1565-1569.

122. Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. (2003) Evaluation of genotoxic risk on oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin i citrinin. Toxicol Appl Pharmacol 191:255-263.

123. Lu SC. (2012) Glutathione synthesis. Biochim Bioph Acta (article in press).

124. Marquardt RR, Frohlich AA. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. J Anim Sci 70:3968-3988.

125. Martin W, Lorkowski G, Creppy EE, Dirheimer G, Roschenthaler R. (1986) Action of citrinin on bacteria chromosomal and plasmid DNA *in vivo* and *in vitro*. Appl Environment Microbiol 52:1273-1279.

126. Martins ML, Gimeno A, Martins HM, Bernardo F. (2002) Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. Food Add Contam 19:568-574.

127. Mayura K, Parker R, Berndt WO, Phillips TD. (1984) Effect of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and citrinin in the rat. J Toxicol Environment Health 13:553-561.

128. Meister A, Anderson ME. (1984) Glutathione. Ann Rev Bichem 52:711-760.

129. Meki A, Hussein A. (2001) Melatonine reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. Toxicol Pharmacol 103:305-313.

130. Mertens-Talcott SU, Percival SS (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the industion of apoptosis and cause transient cell arrest in human leukemia cells. Cancer Lett 218:141-151.

131. Micco C, Miraglia M, Brera C, Corneli S, Ambruzzi A. (1995) Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. Food Addit Contam 12:351-354.

132. Miletić-Medved M, Domijan AM, Peraica M. (2005) Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumor in Croatia. Wien Klin Wochenschr 117:604-609.

133. Miller JD. (2001) Factors that affect the occurence of Fumonisin. Environ Health Perpect 109(Suppl 2):321-324.

134. Mladinic M, Berend S, Lucic Vrdoljak A, Kopjar N, Radic B, Zeljezic D. (2009) Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. Environ Molec Mutag 50:800-807.

135. Moss MO. (1996) Mode od formation of ochratoxin A. Food Addit Contam 13:5-9.

136. Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. (2005) Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. Food Addit Contam 22:457-462.

137. Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leszkowicz A. (2007) Occurence of aflatoksin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. Food Chem 105:42-47.

138. Nicholls P. (2012) Classical catalase: Ancient and modern. Arch Bioch Biophys 525:95-101.

139. Obrecht-Pflumio S, and Dirheimer G. (2000) *In vitro* DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. Chem-Biol Interact 127:29-44.

140. Obrecht-Pflumio S, and Dirheimer G. (2001) Horseradish peroxidase mediates DNA, and deoxyguanosine 30-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. Arch Toxicol 75:583–590.

141. Olas B, Holmsen H. (2012) Interaction of resveratrol with membrane glycerophospholipids in model system *in vitro*. Food Chem Toxicol 50:4028-4034.

142. Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. (2002) The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. Molec Pharmacol 61:294-302.

143. Otteneder H, Majerus P. (2000) occurence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. Food Addit Contam 9:793-798.

144. Pardo E, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V. (2005) Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffe beans. J Food Protect 68:133-138.

145. Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, lambert E, Tourette C, Catoire H. (2005) Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. Nature Genetics 37:349-350.

146. Pascale M, Visconti A. (2001) Ocratoxin A in wine and beer: analytical method and natural occurrence. Congress Proceedings, 11th Congress of the Mediteranean Phytopathology Union and 3rd Congress if the Sociedade Portugesa de Fitopatologia, Evora, Portugal, 17-20 September. 426-428

147. Pavlović M, Pleština R, Krogh P. (1979) Ochratoxin A contamination of foodstuffs ina n area with balkan (endemic) nephropathy. Acta Path Microbiol Scand Sect B 87:243-246.

148. Pepeljnjak S, Šegvić M, Ožegović L. (2002) Citrininotoxinogenicity of *Penicillium spp*. isolated from decaying apples. Brazilian J Microbiol 33:134-137.

149. Peraica M, Domijan AM, Jurjević Ž, Cvjetković B. (2002) Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. Arh Hig Rada Toksikol 53:229-237.

150. Peraica M, Domijan AM, Matašin M, Lucić A, Radić B, Delaš F, Horvat M, Bosanac I, Balija M, Grgičević D. (2001) Variations of ochratoksin A concentration int he blood of healthy populations in some Croatian cities. Arch Toxicol 75:410-414.

151. Peraica M, Rašić D. (2012) The impact of mycotoxicoses on human history. Arh Hig Rada Toksikol 63:513-518.

152. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim Biophys Acta 1804:246-262.

153. Petkova-Bocharova T, Castegnaro M, Michelon J and Maru V. (1991) Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Eds Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN and Bartsch H. IARC Scientific Publications, 83-87.

154. Petrik J, Žanić-Grubišić T, Barišić K, Pepeljnjak S, Radić B, Ferenčić Ž, Čepelak I. (2003) Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. Arch Toxicol 77:685-693.

155. Petzinger E, Ziegler K. (2000) Ochratoxin A from a toxicological perspective. J Vet Pharmacol Ther 23:91-98.

156. Pfeiffer E, Gross K, Metzler M. (1998) Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. Carcenogenesis 19:1313-1318.

157. Pfohl-Leszkowich A, Manderville RA. (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Mol Nutr Food Res 51:61-99.

158. Pfohl-Leszkowich A, Molinie A, Tozlovanu M, Manderville RA. (2008) Combined toxic effects of ochratoxin A and citrinin, in vivo and in vitro Experimental procedures (American Chemical Society), chapter 3:56-79.

159. Pfohl-Leszkowich A, Tozlovanu M, Manderville RA, Peraica M, Castegnaro M, Stefanovic V. (2007) New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. Molec Nutrit Food Res 51:1131-1146.

160. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Creppy E, Dirheimer G. (1993) Differential DNA adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin ochratoxin A. Mutation Res 289:265-273.

161. Pitt JI. (2000) Toxigenic fungi and mycotoxins. Food Science Australia 56:184-192.

162. Queiroz AN, Gomes BAQ, Moraes WM, Borges RS. (2009) A theoretical antioxidant phamacophore for resveratrol. Eur J Med Chem 44:1644-1649.

163. Radić B, Fuchs R, Peraica M, Lucić A. (1997) Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. Tox Lett 91:105-109.

164. Raistrick H, Smith G. (1941) Anti-bacterial substances from moulds. Chem Ind London 6:828-830

165. Reddy BN, Nusrath M, Kumari CK, Nahdi S. (1983) Mycotoxin contamination in some food commodities from tribal areas of Medak District, Andhra Pradesh. Indian Phytopathology 36:683-686.

166. Reddy RV, Mayura K, Wallace Hayes A, Berndt WO. (1982a) Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats. Toxicology 25:151-160.

167. Reddy RV, Taylor MJ, Sharma RP. (1988b) Evaluation on citrinin toxicity on the immune functions of mice. J Food Protect 51:32-36.

168. Reddy RV, Wallace Hayes A, Berndt WO. (1982) Disposition and metabolism of [^{14}C]citrinin in pregnant rats. Toxicology 25:161-174.

169. Reid LM, Zhu X, Ma BL. (2001) Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to gibberella (Fusarium graminearum) ear rot. Plant Soil 237:1-14.

170. 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.

171. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chem-Biolog Interact 159:18-46.

172. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem 66:401-436.

173. Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M. (2012) Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. Pharmacol Res 66:375-382.

174. Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Roschenthaler R, Dirheimer G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. Toxicology 48:293-308.

175. Sabater-Vilar M, Maas RFM, Fink-Gremmels J. (1999) Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutat Res 444:7-16.

176. Samson RA Houbraken JAMP, Kujipers AFA, Frank JM, Frisvard JC. (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Stud Mycol 50:45-61.

177. Santos L, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. (2009) Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. J Sci Food Agricult 89:1802-1807.

178. Saxena J, Mehrotra BS. (1989) Screening of spices commonly marketed in India for natural occurrence of mycrotoxins. J Food Composit Analysis 2:286-292.

179. Schaaf GJ, Nijmeijer SM, Maas RFM, Roestenberg P, Groene EM, Fink-Gremmels J. (2002) The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. Biochim Biophys Acta 1588:149-158.

180. Schwerdt G, Freudinger R, Mildenberger S, Silbernagel S, Gekle M. (1999) The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. Cell Biol Toxicol 15:405-415.

181. 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 Agr Food Chem 20:1103-1109.

182. 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 tumorigenesis. Gann 67:147-155.

183. Siemann EH, Creasy LL. (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. Amer J Enology Viticult 43:49-52

184. Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular fumctions. Free Rad Biol Med 27:916-921.

185. Simarro Doorten Y, Nijmeijer S, de Nijs-Tjon L, Fink-Gremmels J. (2005) Metabolism-mediated Ochratoxin A genotoxicity in the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Food Chem Toxicol 44:261-270.

186. Skaug MA, Helland I, Solvoll K, Saugstad OD. (2001) Presence of ocratoxin A in human milki n relation to dietary intake. Food Addit Contam 4:321-327.

187. Slater I, Odum J, Ashby J. (1999) Resveratrol and red wine consumption. Hum Experiment Toxicol 18:625-626.

188. Smith CA, O'Donovan MR, Martin EA. (2006) hOGG! Recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. Mutagenesis 21:185-190.

189. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? Clin Biochem 30:91-113.

190. Speijers GJA, Speijers MHM. (2004) Combined toxic effect of mycotoxins. Toxicol Lett 153:91-98.

191. Stoev SD, Anguelov G, Ivanov I, Pavlov D. (2000) Influence of ochratoxin A anda n extract of artichoke on the vaccinal immunita and health in broiler Chicks. Exp Toxicol Pathol 52:43-55.

192. Stoev SD, Daskalov H, Radic B, Domijan A, Peraica M. (2002) Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. Vet Res 33:83–94.

193. Stoev SD, Hald B, Mantle P. (1998a) Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex of uncertain (mycotoxin) etiology. Vet Rec 142:190-194.

194. Stoev SD, Stoeva J, Anguelov G, Hald B, Creppy EE, Radic B. (1998b) Haematological, bio- chemical and toxicological investigations in spontaneous cases with different frequency of porcine nephropathy in Bulgaria. J Vet Med A 45:229-236.

195. Stoev SD. (2008) Complex Etiology, Prophylaxis and Hygiene Control in Mycotoxic Nephropathies in Farm Animals and Humans. Int J Mol Sci 9:578–605.

196. 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.

197. Sun Y, Larry WO, Ying Li. (1988) Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clinical Chem 34:497-500.

198. Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34:497-500.

199. Šegvić Klarić M. (2012) Adverse effects od combined mycotoxins. Arh Hig Rada Toksikol 63:519-530.

200. Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Rozgaj R. (2008) Genotoxicity of Fumonisin B1, Beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. Croat Chem Acta 81:139-146.

201. Šegvić Klarić M, Želježić D, Rumora L, Peraica M, Pepeljnjak S, Domijan AM. (2012) A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin citrinin. Arch Toxicol 86:97-107.

202. Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen K, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes V, Alexander J, Hult K, Olsen M. (2001) Levels of ochratoxin A in blood from Norvegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. Food Chem Toxicol 39:1145-1151.

203. Ueno Y. (1998) Residue and risk of ochratoxin A ih numan plasma and beverages in Japan. Mycotoxins, No. 47:25-32.

204. Valenzano DR, terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Current Biol 16:296-300.

205. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scoot DB, Theron JJ (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature 205:1112-1113.

206. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. (2003) Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. Food Technol Biotechnol 41:29-36.

207. Vesela D, Vesely D, Jelinek R. (1983) Toxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos. Appl Environm Microbiol 45:91-93.

208. Visconti A, Pascale M, Centonze G. (1999) Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 846:89-101.

209. Vrabceva 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.

210. Wang JS, Groopman JD. (1999) DNA damage by mycotoxins. Mutat Res 424:167-181.

211. Wang Z, Zou J, Cao K, Hseih T, Huang Y, Wu JM. (2005) Dealkoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in

hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. Internat J Molec Med 16:533-540.

212. Wehner FG, Thiel PG, van Resnburg SJ, Demasius IP. (1978) Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. Mutat Res 58:193-203.

213. Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V. (2005) Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administrated to Wistar rats. Molec Nutr Food Res 49:482-494.

214. WHO/FAO (2001) Ochratoxin A in: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Vol. 47. WHO Food Addit Series, pp. 281-415.

215. WHO/IPCS (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Addit Series 47:281-416.

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

217. Xu BJ, Jia XQ, Gu LJ, Sung CK. (2006) Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxins citrinin. Food Control 17:271-285.

218. Zimmerli B, Dick R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. J Chromatogr 666:85-99.

219. Žlender V, Breljak D, Ljubojević M, Flajs D, Balen D, Brzica H, Domijan A-M, Peraica M, Fuchs R, Anzai N, Sabolić I. (2009) Low doses of ochratoxin A upregulate the protein expression of organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat5 in rat kidney cortex. Toxicol Appl Pharmacol 239:284-296.

10 SAŽETAK

Okratoksin A (OTA) i citrinin (CTN) su mikotoksini koji se često nalaze zajedno u žitaricama i oba imaju nefrotoksična svojstva u svim do sada ispitivanim vrstama osim u preživača. Sekundarni su metaboliti plijesni iz rodova *Aspergillus i Penicillium*. Mehanizam djelovanja OTA nije do kraja istražen, a mehanizam djelovanja CTN-a gotovo je u potpunosti nepoznat. Pretpostavlja se da je oksidacijski stres jedan od mehanizama djelovanja OTA i CTN-a. O zajedničkom djelovanju ova dva mikotoksina na sisavce proveden je mali broj istraživanja, a rezultati tih istraživanja nisu jednoznačni. U nekim je istraživanjima nađeno da je njihovo djelovanje sinergistično, u drugima da je aditivno, a u nekim pak da je antagonistično.

Cilj istraživanja bio je na muškim odraslim Wistar štakorima ispitati mehanizam toksičnog djelovanja OTA i CTN-a kao i zaštitni učinak poznatog antioksidansa RSV-a.

U preliminarnom su pokusu štakori tretirani s OTA (250 i 500 µg kg^{-1} tm) tijekom 10 dana te su mjerene koncentracije OTA i malondialdehida (MDA) kao parametar lipidne peroksidacije u urinu, bubregu i jetri. Koncentracija OTA bila je povećana u skladu s dozom, a najveća koncentracija izmjerena je u jetri nakon tretmana višom dozom (112,21±35,36 ng g^{-1} tkiva). Značajno povećanje MDA izmjereno je u jetri nakon tretmana višom dozom (261,23±10,30 nmol g^{-1} tkiva). Životinje su oralno gastričnom sondom tretirane s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm) i RSV-om (20 mg kg^{-1} tm) tijekom 21 dan i CTN-om (20 mg kg^{-1} tm) zadnja dva dana pokusa. Nakon završetka pokusa životinje su žrtvovane te su uzorkovani krv, bubrezi, jetra i mozak. U tim su organima izmjereni parametri oksidacijskog stresa: koncentracija MDA, glutationa (GSH) kao i katalitička aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) te koncentracija OTA i CTN-a. U stanicama bubrega i jetre hOGG1 komet testom izmjereno je oksidacijsko oštećenje DNA.

U organima životinja najviše koncentracije OTA i CTN-a izmjerene su u bubrezima, a najmanje u mozgu. Izmjerena koncentracija CTN-a bila je oko pet puta viša u organima životinja koje su uz CTN tretirane i s OTA, negoli u životinja koje su tretirane samo CTN-om. Tretman s OTA (125 i 250 µg kg^{-1}) značajno je povisio koncentraciju MDA bubregu u odnosu na kontrolu za 145% odnosno 170%. Sam CTN (20 mg kg^{-1}) nije utjecao na promjenu koncentracije MDA niti u jednom ispitivanom organu. Međutim, kada su životinje uz nižu

dozu OTA tretirane i CTN-om koncentracija MDA bila je viša u plazmi, bubregu i jetri za 128%, 194% odnosno 160% u odnosu na kontrole. Veća koncentracija MDA nađena je i u plazmi i jetri životinja tretiranih višom dozom OTA i CTN-om za 132% odnosno 170% u odnosu na kontrole. U životinja koje su osim mikotoksinima tretirane i RSV-om (20 mg kg^{-1}) nije nađena značajno veća koncentracija MDA osim u plazmi životinja koje su dobile višu dozu OTA i CTN. Koncentracija GSH bila je značajno niža u bubregu i mozgu (69%, odnosno 77%) životinja koje su tretirane s višom dozom OTA. Tretman CTN-om uzrokovao je smanjenje koncentracije GSH u plazmi (70% u odnosu na kontrole). Niža doza OTA zajedno s CTN-om uzrokovala je smanjenje koncentracije GSH u jetri od 70% u odnosu na kontrolu, a viša doza OTA zajedno s CTN-om smanjenje koncentracije GSH u bubregu i mozgu (66% odnosno 85%). Nakon tretmana RSV-om snižena koncentracija GSH nađena je samo u bubregu životinja koje su dobivale višu dozu OTA i CTN (71%). Katalitička aktivnost SOD-a bila je smanjena u plazmi životinja koje su dobile višu dozu OTA, nižu dozu OTA i CTN kao i višu dozu OTA, CTN i RSV. Tretman s obje doze OTA nije uzrokovao promjenu parametara komet testa, dok je tretman CTN-om uzrokovao povećanje intenziteta repa kometa u bubrezima tretiranih životinja (1,65±0,32%) u usporedbi s kontrolom (0,72±1,02). U životinja koje su osim s OTA tretirane CTN-om intenzitet repa kometa bio je značajno veći pri obje doze OTA u stanicama bubrega (5,33±1,55, 14,6±10,1%, $p<0,001$) nego u kontrolnih životinja (1,99±0,65, 1,90±5,80%). Isti je učinak na intenzitet repa kometa nađen i u stanicama jetre životinja tretiranih s obje doze OTA i CTN-om (4,10±0,82, 35,0±9,9% $p<0,001$) u odnosu na kontrole (1,04±0,11, 1,80±3,40%). Duljina repa kometa bila je viša u bubregu životinja tretiranih nižom dozom OTA i CTN-om kao i u jetri životinja tretiranih višom dozom OTA i CTN-om. U životinja koje su osim s OTA i CTN-om tretirane i RSV-om razlika u intenzitetu repa u bubrezima bila je i nadalje značajna pri obje doze OTA kao i u jetri pri višoj dozi OTA, dok je duljina repa bila značajno veća u bubregu i jetri samo nakon više doze OTA i CTN.

Iz rezultata ovih istraživanja vidljivo je da je koncentracija CTN-a u organima životinja koje su tretirane s oba mikotoksina višestruko veća u odnosu na koncentraciju CTN-a u organima životinja koje su tretirane samo CTN-om. Isto tako zajednički tretman životinja s oba mikotoskina povećava oksidacijski stres u životinja u odnosu kada su tretirane mikotoksinima pojedinačno. Iako je imao učinak na smanjenje MDA i povećanje GSH, tretman RSV-om nije spriječio oksidacijsko oštećenje DNA.

11 SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) and Citrinin (CTN) are mycotoxins commonly found together in grain. Both were found to have nephrotoxic properties in all species experimented upon so far except for ruminants. These secondary metabolites of mold are commonly produced by the same species (*Aspergillus* and *Penicillium*). The toxicity mechanism of OTA has not been fully explained, while the toxicity mechanism of CTN is all but unknown. It is hypothesized that oxidative stress is one of the toxicity mechanisms of OTA and CTN. There has been little research on the combined effects of both mycotoxins and the results are ambiguous at best. Some papers state that the combined effect is synergistic, others say it is additive while others still say it is antagonistic.

This thesis explores the combined effect of OTA and CTN applied to adult male Wistar rats, as well as the protective effect of the well-known antioxidant resveratrol (RSV).

In a preliminary experiment, the animals have been treated with OTA (125 and 250 µg kg^{-1} bw) for 10 days. Concentrations of OTA and malondialdehyde (MDA) as a parameter of lipide peroxidation in urine, kidney and liver tissue were measured. The OTA concentration was increased in accordance with applied dosage, with the biggest levels measured in the liver after treatment with the higher dosage (112,21±35,36 ng g^{-1} tissue). A significant increase in MDA concentration levels was measured in liver tissue after treatment with the higher dosage (261,23±10,30 nmol g^{-1} tissue). The animals have been treated via gastric probe with OTA (125 and 250 µg kg^{-1} bw) for 21 days and RSV and CTN (20 mg kg^{-1} bw) for the last two days of the experiment. After the experiment, they were sacrificed and blood, kidney, liver and brain tissue were sampled. Parameters of oxidative stress were measured in the samples taken: concentration of MDA and glutathione (GSH), catalytic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). In the kidney and liver tissue, the hOGG1 comet test was performed for oxidative DNA damage.

The highest concentration levels of OTA and CTN were measured in kidney tissue and the lowest in brain tissue. The measured levels of CTN were five times higher in animals treated with OTA also. The higher OTA dosage (250 µg kg^{-1}) significantly increased the MDA levels in kidney samples compared to the controls, by 145% and 170% respectively. CTN by itself did

not increase MDA levels in any of the sampled organs. However, when treated with the lower dosage of OTA and CTN simultaneously, the MDA levels in plasma, kidney and brain samples were 128%, 194% and 160% higher than in the controls. MDA levels were also increased in plasma and liver samples from animals treated separately with higher OTA and CTN dosages by 132% and 170%, respectively. In animals that were also treated with RSV (20 mg kg^{-1}), the MDA levels were not significantly increased, except for the plasma in animals treated with higher OTA and CTN dosages. GSH levels were significantly lower in kidney and brain tissue samples (69% and 77%) from animals treated with the higher OTA dosage. Treatment with CTN alone decreased GSH levels in plasma by 70%. The lower OTA dosage with CTN decreased GSH levels in liver tissue by 70%. The higher OTA dosage with CTN decreased GSH levels in kidney and brain tissue by 66% and 85%, respectively. After treating with RSV, decreased GSH levels were found only in kidney tissue of animals receiving the higher OTA dosage and CTN, 71% lower compared to controls. SOD catalytic activity was reduced in plasma of animals receiving the higher OTA dosage, lower OTA dosage with CTN and higher OTA dosage with CTN and RSV. Neither dosage of OTA caused a change in the comet assay parameters. Tail intensity was increased in kidney tissue from animals treated with CTN only (1.65±0.32%) compared to controls (0.72±1.02). When treated in combination with CTN, tail intensity in the kidney tissue was significantly higher with both dosages of OTA (5.33±1.55, 14.6±10.1%, $p<0.001$) compared to control values (1.99±0.65, 1.90±5.80%). The same effect was also observed in liver samples from animals receiving both dosages of OTA combined with CTN (4.10±0.82, 35.0±9.9% $p<0.001$) compared to controls (1.04±0.11, 1.80±3.40%). Comet tail length was higher in kidney tissue of animals receiving the lower OTA dosage and CTN as well as in the liver tissue of animals receiving the higher OTA dosage and CTN. In animals treated with RSV in addition to OTA and CTN, tail intensity for kidney tissue was still displaying significant change for both OTA dosages. Tail intensity for liver tissue was affected only by the higher OTA dosage. Tail length was significantly higher in both kidney and liver tissue only after applying the higher OTA dosage combined with CTN.

These results clearly show that CTN concentration levels in organs of animals treated with both mycotoxins are several times higher than in organs of animals treated only with CTN. Also, the oxidative stress is significantly higher when both mycotoxins are applied together as opposed to one by one. Although reducing MDA and increasing GSH levels, treatment with RSV did not prevent DNA oxidative damage.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorski rad

UČINAK OKSIDACIJSKOG STRESA NA MEHANIZAM DJELOVANJA OKRATOKSINA A I CITRININA

Dubravka Rašić

Jedinica za toksikologiju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Okratoksin A (OTA) i citrinin (CTN) su nefrotoksični mikotoksini koji se često zajedno nalaze u žitaricama. Mehanizam djelovanja OTA nije do kraja istražen, a CTN-a je gotovo u potpunosti nepoznat. Zbog zajedničkog pojavljivanja i pretpostavke da je u mehanizam njihove toksičnosti uključen oksidacijski stres provedena su istraživanja na muškim odraslim Wistar štakorima koji su danomice oralno tretirani s OTA (125 i 250 µg kg^{-1} tm x21), CTN-om (20 mg kg^{-1} tmx2) i resveratrolom (20 mg kg^{-1} tmx21). Ciljevi istraživanja bili su utvrditi: izaziva li tretman CTN-om oksidacijski stres, utječe li tretman s OTA i CTN-om na povećanje oksidacijskog stresa u pokusnim životinjima te može li tretman antioksidacijskim spojem resveratrolom smanjiti nastanak oksidacijskog stresa izazvanog djelovanjem OTA i CTN. CTN je uzrokovao smanjenje koncentracije glutationa (GSH) u plazmi i povećanje intenziteta repa kometa u bubregu. Nađeno je da CTN pojačava učinak OTA povećanjem koncentracije MDA u plazmi i jetri, a posebice u bubregu gdje se taj učinak smanjuje tretmanom resveratrolom. Zajedničkim tretmanom s OTA i CTN-om snižava se koncentracija GSH u jetri nakon niže koncentracije OTA, a u bubregu i mozgu nakon više. Učinak dodatnog tretmana s resveratrolom jest značajno niža koncentracija GSH nađena samo u bubregu. Budući da je snižena koncentracija GSH primijećena u bubregu i mozgu pri većoj koncentraciji OTA, učinak na sniženje koncentracije GSH može se pripisati tom mikotoksinu. Učinak tretmana s OTA i CTN-om nije bio jednoznačan na djelovanje antioksidacijskih enzima. Katalaza je bila najmanje osjetljiva na djelovanje mikotoksina, a superoksid dismutaza najosjetljivija. Oštećenje DNA mjereno kometskim testom bilo je izraženo kada su životinje tretirane s oba mikotoksina a intenzitet repa bio je osjetljiviji parametar oštećenja. Primjena resveratrola nije spriječila oksidacijsko oštećenje DNA.

(124 stranice, 32 slike, 8 tablica, 219 literaturnih podataka, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u biblioteci Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, A. Kovačića 1, Zagreb

Ključne riječi: okratoksin A, citrinin, resveratrol, pokusne životinje, malondialdehid, glutation, hOGG1, superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza

Mentor: Dr. sc. Maja Peraica, dr. med., znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, izv. prof.
Dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, red. prof
Dr. sc. Božica Radić, znanstvena savjetnica

Rad prihvaćen dana: 19. lipnja 2013.

BASIC DOCUMENTARY CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry Disertation

THE SIGNIFICANCE OF OXIDATIVE STRESS IN THE MECHANISM OF TOXICITY OF OCHRATOXIN A AND CITRININ

Dubravka Rašić

Unit of Toxicology, Institute for Medical Research and Occupational Health,Zagreb, Croatia

Ochratoxin A (OTA) and Citrinin (CTN) are nephrotoxic mycotoxins commonly found together in grain. The toxicity mechanism of OTA has not been fully explained, while the toxicity mechanism of CTN is all but unknown. Because they commonly appear together in nature and because it is hypothesized that oxidative stress is somehow included in their toxicity mechanisms, a research was performed on adult male Wistar rats which were treated daily with OTA (125 i 250 µg kg-1 bm x21), CTN (20 mg kg-1 bmx2) and resveratrol (20 mg kg-1 bmx21). The goals of the research were to establish whether CTN treatment induces oxidative stress, whether combined OTA and CTN treatment increases oxidative stress in tested animals and whether treatment with the antioxidant compound resveratrol can reduce the levels of oxidative stress induced by OTA and CTN. CTN treatment caused a reduction in glutathione (GSH) concentration levels in plasma samples and an increase of comet tail length in kidney samples. It has been established that CTN augments the effects of OTA by increasing malondialdehyde (MDA) concentration levels in plasma and liver tissue and especially in the kidneys where this effect is reduced by resveratrol treatment. GSH concentration levels are decreased in liver samples after treatment with both dosages of OTA, while kidney and brain samples display this reduction only after treatment with the higher dosage. The effect of resveratrol treatment is that a significant reduction in GSH concentration levels is found only in kidney samples. Since GSH concentration reduction was observed in all experiments with higher OTA dosages, the effect can be attributed to that mycotoxin. The effect of the combined OTA and CTN treatment on oxidative enzyme levels is ambiguous. Catalase activity was least sensitive to the effect of mycotoxins, while superoxide dismutase activity was most sensitive. DNA damage measured with the comet assay was prominent in animals treated with both mycotoxins with tail intensity being the better damage indicator. Treatment with resveratrol did not prevent DNA oxidative damage.

(124 Pages, 32 figures, 8 tables, 219 references; original in Croatian)

Thesis deposited in the library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia

Key words: ochratoxin A, citrinin, resveratrol, experimental animals, malondialdehyde, glutathione, hOGG1, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase

Supervisor: Maja Peraica, MD, PhD

Reviewers: Prof. Maja Šegvić Klarić, PhD, Assoc. Prof.
Prof. Tihana Žanić Grubišić, PhD, Full Prof.
Božica Radić, PhD, Scientific Advisor

Thesis accepted: June 19th 2013

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. studenog 1980. godine u Koprivnici. Osnovu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju završila sam u Križevcima. 1999. godine upisala sam studij biologije i kemije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje sam diplomirala 2005. godine i bila svrstana među 10% najboljih studenata ovog smjera i stekla zvanje profesora biologije i kemije. Tijekom 2005. i 2006. godine bila sam vanjski suradnik na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu na kolegijima Biologija stanica i Stanična i molekularna biologija, a tijekom 2006. i 2007. godine radila sam kao učitelj prirode, biologije i kemije u Osnovnoj školi Trnsko i Osnovnoj školi Frana Krste Frankopana u Zagrebu. Od 2007. godine zaposlena sam u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada na projektu „Utjecaj mikotoskina na ljude i životinje“ kojem je voditeljica dr. sc. Maja Peraica. Iste godine upisala sam poslijediplomski doktorski studij Medicinsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Bila sam član Organizacijskog odbora i tajnica IV. Hrvatskog toksikolškog kongresa, a tajnica sam i Hrvatskog toksikološkog društva. Članica sam i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju i Hrvatskog mikološkog društva. Sudjelovala sam na nekoliko radionica, simpozija i kongresa u Hrvatskoj i inozemstvu, a koautor sam na nekoliko znanstvenih i stručnih radova.

Popis radova

1. Znanstvene publikacije u časopisima koje citira baza Current Contents (CC)

1. Flajs D, Domijan A-M, Ivić D, Cvjetković B, Peraica M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wine collected in Croatia. Food Control 20: 590-592.

2. Žlender V, Breljak D, Ljubojević M, Flajs D, Balen D, Brzica H, Domijan A-M, Peraica M, Fuchs R, Anzai N, Sabolić I. (2009) Low doses of ochratoxin A upregulate the protein expression of organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat5 in rat kidney cortex. Toxicol Appl Pharmacol 239: 284-296.

3. Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Pažanin S, Šarolić A, Domijan A-M, Flajs D, Peraica M. (2011) Assessment of cytogenetic damage and oxidative stress in personnel occupationally exposed to the pulsed microwave radiation of marine radar equipment. Internat J Hyg Environ Health 214: 59-65.

4. Šuran J, Flajs D, Peraica M, Prevendar-Crnić A, Šperanda M, Božić F. (2013) Pharmacokinetics of an immunomodulating dose of levamisole in weaned pigs. Acta veterianaria Hungarica DOI: 10.1556/Avet.2013.020.

5. Šuran J, Prišć M, Rašić D, Srebočan E, Prevendar Crnić A. (2013) Malondialdehyde and heavy metal concentrations in tissues of wild boar (*Sus scrofa* L.) from central Croatia. J Environ Sci Health, Part B. 48:147-152.

6. Petlevski R, Flajs D, Kalođera Z, Zovko Končić M. (2013) Composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic Pelargonium radula extracts. S Af J Botany; 85: 17–22.

2. Znanstvene publikacije u časopisima koje citira baza SCI Expanded i druge znanstvene baze

1. Flajs D, Peraica M. Toxicological features of citrinin. (2009) Arh Hig Rada Toksikol 60: 457-464.

2. Peraica M, Flajs D. (2012) The impact of mycotoxicoses on human history. Arh Hig Rada Toksikol 63: 513-517.

3. Znanstvena publikacija objavljena u elektronskom časopisu s recenzijom koji se ne referira u sekundarnim i tercijarnim publikacijama

1. Peraica M, Flajs D, Domijan A-M, Ivić D, Cvjetković B. (2010) Ochratoxin A contamination of food from Croatia. Toxins 2: 2098-2105. (doi: 10.3390/toxins2082098) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals

4. Znanstvena publikacija objavljena u zborniku radova s nacionalnog znanstvenog skupa

1. Peraica M, Flajs D. Opasnosti od izloženosti mikotoksinima u dječjoj dobi. (2012) Zbornik radova Proljetnog pedijatrijskog simpozija, 4.-5. ožujka 2012., Osijek (Ereš Hrvaćanin Z, Aberle N, ur.) (u tisku)

5. Sažetak objavljen u časopisu s međunarodnom recenzijom koji se referira u CC

1. Peraica M, Marjanović A, Flajs D, Domijan A-M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V. (2008) Oxidative stress in workers occupationally exposed to microwave radiation. Abstracts of the 44th European Congress of Toxicology, Rodos, Grčka, 2008: S156. Toxicol Lett 2008; 180S:S38.
2. Flajs D, Domijan A-M, Ivić D, Cvjetković B, Peraica M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wine collected in Croatia. Abstracts of the 44th European Congress of Toxicology, Rodos, Grčka, 2008: S156. Toxicol Lett 2008; 180S:S182.
3. Peraica M, Domijan A-M, Flajs D, Pavlović M. MDA and 8-OHdG in urine of elderly persons from two regions in Croatia with different diet habits. Abstracts of the 45th European Congress of Toxicology, Dresden, Njemačka, Toxicol Lett 2009: S189:S119.
4. Flajs D, Pizent A, Domijan A-M, Peraica M. Concentration of malodnialdehyde in plasma of lead-workers. Abstracts of the 45th European Congress of Toxicology, Dresden, Njemačka, Toxicol Lett 2009: S189:S119.
5. Peraica M, Flajs D. HE time course of kidney lesions in ochratoxin a treatment. Abstracts of the 46th European Congress of Toxicology, Barcelona, Španjolska, ToxicolLett2010:S196:S239
6. Flajs D, Želježić D, Mladinić M, Peraica M. Effects of citrinin treatment on oxidative stress in rat kidney. Abstracts of the 46th European Congress of Toxicology, Barcelona, Španjolska, Toxicol Lett 2010: S196:S239
7. Peraica M, Flajs D, Mladinić M, Želježić D, Balen Eror D, Koepsell H, Sabolić I. Oxidative stress and Na^+-glucose cotransporters Sglt1 and Sglt2 in kidneys of ochratoxin A-treated rats. Abstracts of the 47th European Congress of Toxicology, Pariz, Francuska, Toxicol Lett 2011: S205:S275
8. Flajs D, Mladinić M, Želježić D, Peraica M. Citrinin potentiates ochratoxin A toxicity. Abstracts of the 47th European Congress of Toxicology, Pariz, Francuska, Toxicol Lett 2011:S205:S220-221.

6. Stručni radovi u časopisu s recenzijom koji se referira u neselektivnim sekundarnim i tercijarnim publikacijama (Index Medicus, Excerpta Medica, Chemical Abstracts i sl).

1. Peraica M, Domijan A-M, Flajs D, Ivić D, Cvjetković B. The exposure of general population in Croatia to ochratoxin A. Krmiva 2008; 50: 27-33.
2. Peraica M, Flajs D, Domijan A-M, Ivić D, Cvjetković B. Vina mogu biti kontaminirana mikotoksinima. Glasilo biljne zaštite 2010; 10: 241-245.

7. Sažetak objavljen u zborniku sažetaka sa nacionalnog znanstvenog skupa

1. Peraica M, Domijan A-M, Flajs D, Ivić D, Cvjetković B. Izloženost opće populacije u Hrvatskoj okratoksinu A. XV. međunarodno savjetovanje Krmiva 2008. Opatija 2.-5. lipnja 2008. Program i sažeci radova str. 31.
2. Flajs D, Domijan A-M, Ivić D, Cvjetković B, Peraica M. Okratoksin A u vinima u Republici Hrvatskoj. 2. hrvatski znanstveni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem Gljivice i mikotoksini – zdravstveni aspekti i prevencija. Zagreb 5. prosinca 2008. str.78.
3. Marjanović AM, Domijan A-M, Flajs D, Pavičić I. Pokazatelji oksidacijskog oštećenja makromolekula i antioksidacijske obrane u ispitanika izloženih radarskom zračenju frekvencija od 1, 5 GHz - 10, 9 GHz. Zbornik radova osmog simpozija hrvatskog društva za zaštitu od zračenja. Krajcar Bronić, I ; Kopjar, N ; Milić, M ; Branica, G (ur.). Zagreb, 2011. 513-519.
4. Flajs D, Peraica M. Oxidative of brain tissue damage in rats treated with ochratoxin A and citrinin. Programme and Abstracts „Power of Funghi and Mycotoxins in Health and Disease“, Primošten, 19.-22. listopada 2011. Antolović R, Miličević T (ur.) 2011. str. 58.
5. Novak I, Flajs D, Peraica M. Glutathione and MDA in tissues of rats treated with ochratoxin A. Programme and Abstracts „Power of Funghi and Mycotoxins in Health and Disease“, Primošten, 19.-22. listopada 2011. Antolović R, Miličević T (ur.) 2011. str. 86-86.
6. Rašić D, Peraica M. Resveratrol reduces oxidative damage in the rat liver caused by ochratoxin A and citrinin. Abstracts of the 4th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012). Arg Hig Rada Toksikol 2012:63(Suppl. 2):P27,str.41.
7. Milić M, Rašić D, Angelini S, Peraica M. Influence of hOGG1 ang XRCC1 polymorphism on MDA concentrations in occupationally exposed radiation workers after irradiation. Abstracts of the 4th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012). Arg Hig Rada Toksikol 2012:63(Suppl. 2):P52,str.54.

8. Sažetak objavljen u zborniku sažetaka sa međunarodnog znanstvenog skupa

1. Flajs D, Domijan A-M, Miletić-Medved M, Peraica M. Concentration of malondialdehyde in human urine samples from area of endemic nephropathy. Federation of European Biochemical Societies Workshop on lipids as regulators of cell function, Spetses, Grčka 16.-21. lipnja 2008. Programme and Abstracts str.
2. Flajs D, Domijan A-M, Žlender V, Sabolić I, Peraica M. The effect of treatment with ochratoxin A on oxidative stress in rat liver and kidney. Federation of European Biochemical Societies Advanced Course on Mechanisms, Consequences and Detection of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications, Kemer Antalya, Turska 15.-20. travnja 2009. Programe and Abstract Book, str. 78.
3. Peraica M, Domijan A-M, Flajs D, Pavlović M. The impact of Mediterranean diet on MDA and on 8-OhdG concentrations in urine of elderly persons: comparison in Croatian regions with different diet habits. Research symposium on clinical trials with frail elderly persons. Rim, Italija 18-19. XI. 2009.