Mehanizam djelovanja fumonizina B1, bovericina i okratoksina A u bubrežnim stanicama

Šegvić Klarić, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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:163:505416

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Šegvić Klarić

MEHANIZAM DJELOVANJA FUMONIZINA B_1, BOVERICINA I OKRATOKSINA A U BUBREŽNIM STANICAMA

DOKTORSKI RAD

ZAGREB, 2005

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju i Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, a u okviru projekta MZOŠ RH br. 0006641 pod vodstvom prof. dr. sc. Stjepana Pepeljnjaka.
Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva

KAZALO

1. UVOD **5**

1.1. FUMONIZINI **7**
1.1.2. MEHANIZAM DJELOVANJA FUMONIZINA 8
1.1.3. TOKSIČNI UČINCI FUMONIZINA *IN VITRO* 9
1.1.4. TOKSIČNI UČINCI FUMONIZINA *IN VIVO* 11
1.1.4.1. HEPATOTOKSIČNOST, NEFROTOKSIČNOST I KARCINOGENOST 11
1.1.4.2. NEUROTOKSIČNOST 13
1.1.4.3. PLUĆNI EDEM (PPE) 14
1.1.4.4. IMUNOTOKSIČNOST 14
1.1.4.5. KARCINOM JEDNJAKA I JETRE U LJUDI 15
1.1.5. UČESTALOST FUMONIZINA U HRANI 16
1.2. BOVERICIN **18**
1.2.1. BIOLOŠKI UČINCI I TOKSIČNO DJELOVANJE BOVERICINA 19
1.2.2. UČESTALOST BOVERICINA U HRANI 22
1.3. OKRATOKSIN A **24**
1.3.1. METABOLIZAM I MEHANIZAM DJELOVANJA OKRATOKSINA A 25
1.3.2. TOKSIČNI UČINCI OKRATOKSINA A *IN VITRO* 27
1.3.3. TOKSIČNI UČINCI OKRATOKSINA A *IN VIVO* 29
1.3.3.1. NEFROTOKSIČNOST I HEPATOTOKSIČNOST 29
1.3.3.2. NEUROTOKSIČNOST I IMUNOTOKSIČNOST 30
1.3.3.3. TERATOGENOST, GENOTOKSIČNOST I KARCINOGENOST 31
1.3.4. IZLOŽENOST LJUDI OKRATOKSINU A 32
1.3.5. UČESTALOST OKRATOKSINA A U HRANI 34
1.4. OŠTEĆENJA STANICE I STANIČNA SMRT **37**
1.4.1. OKSIDACIJSKI STRES 37
1.4.2. NEKROZA 38
1.4.3. APOPTOZA 38
1.5. ANTIOKSIDANSI U STANICI **42**
1.5.1. GLUTATION 43

2. OBRAZLOŽENJE TEME **45**

3. MATERIJAL I METODE **46**

3.1. KULTURA STANICA **46**
3.2. MIKOTOKSINI **46**
3.3. BOJENJE ŽIVIH I MRTVIH STANICA POMOĆU TRIPAN PLAVILA (TEST VIJABILNOSTI) **47**
3.4. ODREĐIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI LAKTAT DEHIDROGENAZE (LDH) **47**
3.5. ODREĐIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI GLUTAMAT DEHIDROGENAZE (GLDH) **48**
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LIPIDNIH PEROKSIDA S TIOBARBITURATNOM KISELINOM **49**
3.6.1. ODREĐIVANJE PROTEINA 50
3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUTATIONA (GSH) **50**

3.8. HEMALAUN-EOZIN BOJENJE STANIČNIH KULTURA 52
3.9. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 53
3.10 TEST GENOTOKSIČNOSTI – TVORBA MIKRONUKLEUSA, NUKLEARNIH PUPOVA I NUKLEOPLAZMATSKIH MOSTOVA 54
3.11. STATISTIČKA OBRADA 57

4. REZULTATI 58

4.1. PREŽIVLJAVANJE STANICA 58
4.2. OŠTEĆENJE STANIČNE I MITOHONDRIJSKE MEMBRANE 62
4.3. LIPIDNA PEROKSIDACIJA I RAZINA STANIČNOG GLUTATIONA 69
4.4. INDEKS APOPTOZE I AKTIVACIJA KASPAZE-3 76
4.5. GENOTOKSIČNI UČINCI 82

5. RASPRAVA 89

6. ZAKLJUČCI 99

7. LITERATURA 101

8. SAŽETAK 118

9. SUMMARY 120

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 122
BASIC DOCUMENTATION CARD 123
ŽIVOTOPIS 124

1. UVOD

Fumonizini, sekundarni toksični metaboliti *Fusarium* vrsta, najučestaliji su kontaminanti kukuruza i njegovih prerađevina. Među njima, fumonizin B_1 (FB_1) je dominantni produkt biosinteze koji izaziva čitav niz patoloških poremećaja u različitih vrsta životinja uključujući leukoenecfalomalaciju konja, mula i magaradi (ELEM) (Wilson i sur., 1991), plućni edem u svinja (PPE) (Harrison i sur., 1990), hepatotoksikozu, nefrotoksičnost i imunosupresiju (Gelderblom i sur., 1991; Norred i sur., 1996; Bucci i sur., 1998; Chatterjee i sur., 1995) te su dokazani njegovi karcinogeni, genotoksični, citotoksični i apoptotički učinci *in vivo* i *in vitro* (Gelderblom i sur., 2001a; Rumora i sur, 2002; Dombrink-Kurtzman i sur., 1994). Osim toga fumonizini se dovode u vezu s razvojem karcinoma jednjaka i jetre u ljudi s nekih područja u južnoj Africi i Kini gdje su u kukuruzu korištenom za prehranu ljudi dokazane visoke koncentracije ovih mikotoksina (Marasas i sur., 1988; Yoshizawa i sur., 1994; Ueno i sur., 1997).

Osim fumonizina, veliki broj *Fusarium* vrsta tvori i bovericin (BEA) čije su biološke osobine povezane s njegovom mogućnošću tvorbe kompleksa s dvovalentnim (Ca^{2+}) i alkalnim kationima (Na^+ i K^+), pri čemu se katalizira translokacija tj. povećava propusnost membrane za ove ione u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Benz i sur., 1978; Ojcius i sur., 1991). Osim insekticidnog i antibiotičkog djelovanja, otkriveno je citotoksično i apoptotičko djelovanje BEA na mišje i ljudske stanične linije (Gupta i sur., 1991; Ojcius i sur., 1991). Također je utvrđena njegova sposobnost inhibicije kolesterol-aciltransferaze (ACAT) u jetri miševa pri čemu se pokazao kao jedan od najjačih specifičnih inhibitora ACAT mikrobnog podrijetla (Tomoda i sur., 1992).

Okratoksin A (OTA) je mikotoksin kojeg tvore *Aspergillus* i *Penicillium* vrste koje su česti kontaminanti uskladištenih poljoprivrednih, suhomesnatih proizvoda i krmiva (Benford i sur., 2001). Ovaj mikotoksin u eksperimentalnih životinja uzrokuje nefrotoksikozu hepatotoksikozu, imunosupresiju, neurotoksičnost, poremećaje koagulacije krvi (Krogh, 1980; Albassam i sur., 1987; Thuvander, 1996), genotoksičnost, teratogenost i karcinogenost (Pfohl-Leszkowicz i sur., 1998; Benford i sur, 2001). Ciljni organ djelovanja OTA je bubreg pri čemu je nefrotoksično djelovanje primarno usmjereno prema stanicama proksimalnih i distalnih tubula (Krogh, 1980). U ljudi se izloženost OTA dovodi u vezu s razvojem EN i povećanom učestalošću tumora urinarnog sustava (IARC, 1993; Castegnaro i sur., 1990, Vukelić i sur., 1992).

U proteklih 30 godina na području endemske nefropatije (EN) OTA je dokazan u 8-65% uzoraka žitarica, kukuruza i suhomesnatih proizvoda uglavnom uzetih iz individualnih

domaćinstava (Pepeljnjak i Šegvić, 2004). Osim u hrani, OTA je dokazan u krvi ljudi s područja EN (0,2-4,5%), u koncentracijama od 2-50 ng/mL (Radić i sur., 1997). Peraica i sur (1999, 2001) ispitivali su prisutnost OTA u krvi opće populacije u kontinentalnoj (Osijek, Varaždin, Zagreb) i priobalnoj (Rijeka i Split) Hrvatskoj. Srednje koncentracije OTA u krvi iznosile su od 0,18 ng/mL u Rijeci, do 0,68 ng/mL u Osijeku te je procijenjen dnevni unos OTA od 0,4 ng/kg tj. t., što je znatno niže od dopuštenog dnevnog unosa koji propisuje WHO (16 ng/kg tj.t.). Međutim, zdrava populacija u Hrvatskoj je izložena niskim ali sezonski i regionalno varijabilnim koncentracijama OTA, na što utječu i prehrambene navike stanovništva pojedinih regija. Osim toga, u EN i ne-EN područjima Hrvatske, u velikom broju uzoraka su dokazani FB_1+FB_2 (95% 12-11661 ng/g) pri čemu je utvrđena i ko-kontaminacija s okratoksinom A (21% 0,26-614 ng/g) i bovericinom (6,2% 13-1864 ng/g), a 2% uzoraka sadržavalo je sva tri mikotoksina (Jurjević i sur., 1999, 2002).

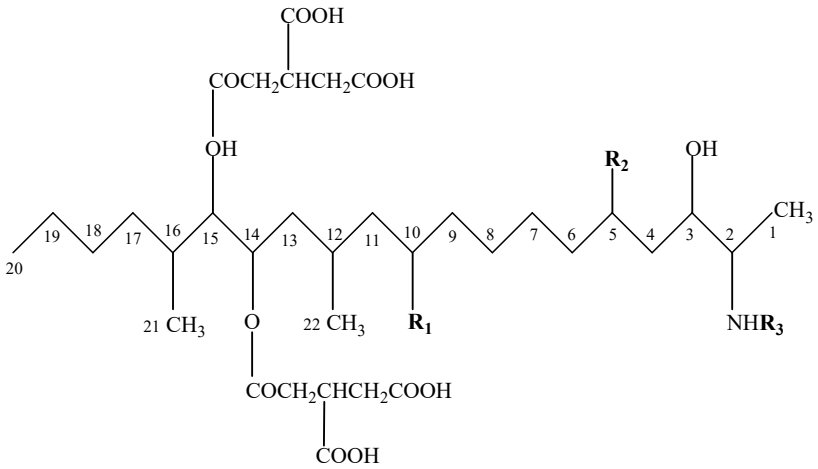
Istodobno pojavljivanje više različitih mikotoksina u hrani može predstavljati povećani mikotoksikološki rizik po zdravlje ljudi i životinja zbog njihovog mogućeg sinergističkog djelovanja. Stoga je cilj ovog rada na staničnoj razini utvrditi biokemijski mehanizam toksičnog djelovanja FB_1, BEA i OTA u niskim koncentracijama, morfološke promjene na stanicama kao i mutagene učinke, aplikacijom pojedinačnih toksina i u kombinaciji, u različitim koncentracijama i vremenu izloženosti.

1.1. FUMONIZINI

Fumonizini su prvi put izolirani iz kulture *Fusarium moniliforme* MRC 826 (Gelderblom i sur., 1988), sinonim *F. verticillioides* (Seifert i sur., 2003). Nakon otkrića fumonizina tvorba ovih mikotoksina dokazana je u većeg broja fuzarija iz sekcije Liseola uključujući *F. proliferatum, F. subglutinans, F. nygamai* (Thiel i sur., 1991; Nelson, 1992; Norred, 1993; Bullerman i Tsai, 1994; Meireles i sur., 1994), *F. anthophilum, F. dlamini* i *F. napiforme* (Nelson i sur., 1992). Osim kod pripadnika ove sekcije, tvorba fumonizina utvrđena je i kod *F. oxysporum* (Abbas i sur., 1995), *F. polyphialidicum* (Abbas i Ocamb, 1995) te *F. konzum* (Leslie i sur., 2004).

Po kemijskoj strukturi (*Slika I*) fumonizini su diesteri propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline i 2-acetilamino ili 2-amino 12, 16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroksikozana (Mr=721) (Bezuidenhout i sur., 1988). Opisano je nekoliko fumonizinskih stereoizomera; fumonizin B_1 (FB_1) ima 3 hidroksidne skupine na C-3, C-5, C-10; fumonizin B_2 (FB_2) i fumonizin B_3 (FB_3) su izomeri s hidroksidnim skupinama na C-3 i C-5 odnosno C-3 i C-10; fumonizin B_4 (FB_4) ima samo jednu hidroksidnu skupinu na C-3; fumonizin A_1 (FA_1) i fumonizin A_2 (FA_2) su N-acetil derivati FB_1 i FB_2; fumonizin C_1 (FC_1) se od FB_1 razlikuje nedostatkom metilne skupine na C-1, koja je karakteristika svih ostalih fumonizina (Bezuidenhout i sur., 1988; Cawood i sur., 1991; Plattner i sur., 1992); fumonizini P_1-P_3 sadrže hidroksipiridin na C-2 umjesto amina (Musser i sur., 1996); izo-FB_1 se od FB_1 razlikuje u položaju supstituirane hidroksidne skupine koja je kod izo-FB_1 smještena na C-4 (Mackenzie et al. 1998).

	R_1	R_2	R3
FA_1	OH	OH	CH_2CO
FA_2	H	OH	CH_2CO
FB_1	OH	OH	H
FB_2	H	OH	H
FB_3	OH	H	H
FB_4	H	H	H
FC_1	OH	OH	H



Slika I Kemijska struktura fumonizina

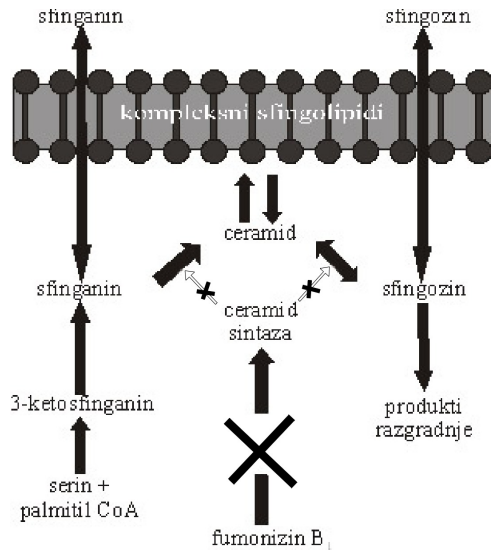
Među stereizomerima, FB_1 se javlja kao dominantni molekulski produkt biosinteze *F. moniliforme*; FB_2 i FB_3 pokazuju istu aktivnost u biološkom sustavu kao i FB_1 ali se rjeđe

pojavljuju , za razliku od FA_1 i FA_2, koji su znatno manje toksični i biološki aktivni stereoizomeri (Gelderblom i sur., 1992).

1.1.2. MEHANIZAM DJELOVANJA FUMONIZINA

Osnovni mehanizam djelovanja fumonizina u eukariotskim stanicama je inhibicija ključnih enzima koji sudjeluju u metabolizmu sfingolipida. Zbog sličnosti polihidratne alkoholne polovice FB_1 prema sfingozinu, FB_1 interferira sa sfingolipidnom biosintezom i/ili razgradnjom sfingolipida.

Specifično mjesto djelovanja FB_1 je enzim ceramid sintaza (sfinganin i sfingozin-N-aciltransferaza). Slično FB_1 ponašaju se i *Alternaria* toksini (AAL toksini) koji također zbog sličnosti sfingozinu inhibiraju ceramid sintazu (*Slika II*) (Powell i Plattner 1995). Poremećaj metabolizma sfingolipida izazvan djelovanjem fumonizina utječe na niz procesa u stanici. Akumulacija sfingoidnih baza uzrokuje inhibiciju rasta stanice, inhibiciju protein kinaze C, aktivaciju fosfolipaze D, aktivaciju i/ili inhibiciju enzima koji sudjeluju u metabolizmu lipida i inhibiciju Na^+/K^+ ATPaze.



Slika II Mehanizam djelovanja fumonizina

Svi ovi procesi povećavaju karcinogeni rizik zbog gubitka kontrole nad apoptozom i lipidnim medijatorima koji kontroliraju proliferaciju stanica (Merrill i sur., 1996; Riley i sur., 1996; Lee i sur., 1998). Inhibicija ceramid sintaze *in vivo* rezultira akumulacijom slobodnog sfinganina u jetri, plućima i bubrezima. Akumulirane sfingoidne baze zadržavaju se u tkivima, posebice bubrezima znatno duže od FB_1, odnosno eliminacija slobodnog sfinganina je brža u jetri nego u bubrezima (Shepard i Snijman 1999; Enongene i sur., 2000).

Sfinganin kao hidrofobna molekula prolazi kroz staničnu membranu te se njegova koncentracija u krvi i urinu povećava (Hannun i sur., 1991; Riley i sur., 1996). Stoga je najosjetljiviji pokazatelj utjecaja fuminizina u *in vivo* uvjetima, povećanje omjera sfinganina (Sa) prema sfingozinu (So), što je utvrđeno u serumu FB_1 tretiranih konja, štakora i svinja (Riley i sur., 1993).

Mehanizam djelovanja FB_1 također uključuje promjene u metabolizmu polinezasićenih masnih kiselina i fosfolipida (Gelderblom i sur., 2001a; Bolger i sur., 2001). U jetri štakora FB_1 inducira promjene u sastavu sfingolipida što pridonosi njegovom toksičnom i karcinogenom učinku. Promjene u koncentraciji specifičnih polinezasićenih masnih kiselina povezane su s poremećajem metabolizma D6 desaturaze i ciklooksigenaze. Fumonizin B_1 utječe na sastav fosfatidilkolina i etanolamina mijenjajući stupanj zasićenosti masnih kiselina mikrozomskih, mitohondrijskih, i plazmatskih membrana što vodi povećanju lipidne peroksidacije, inhibicije mitoze, hepatotoksičnosti, povećanoj ekspresiji faktora rasta hepatocita, transformaciji faktora rasta (TGF-a, TGF-b1) i proto-onkogena c-myc, poremećaju metabolizma retinoblastoma proteina, deregulaciji staničnog ciklusa zbog povećane ekspresije ciklin D1 proteina i na kraju hepatokarcinogenezi (Ramljak i sur., 2000; Gelderblom i sur., 2001a).

1.1.3. TOKSIČNI UČINCI FUMONIZINA *IN VITRO*

Citotoksičnost fumonizina FB_1 i FB_2 ispitana je na nekoliko staničnih linija sisavaca (Norred i sur., 1991; Shier i sur.,1991). Apliciranjem radioaktivno obilježenih FB_1 i FB_2, staničnoj kulturi hepatocita štakora, utvrđena je veća citotoksičnost FB_2 u odnosu na FB_1. Samo mali dio (0,01%) fumonizina ostaje u hepatocitima i ne ulazi u proces biotransformacije, što je u skladu sa rezultatima pokusa u *in vivo* uvjetima, gdje je 67% intraperitonealno aplicirane doze FB_1 bilo izlučeno putem žuči (Shepard i sur., 1994).

O inhibitornom učinku FB_1 na biosintezu sfingolipida u staničnoj kulturi hepatocita štakora, izvijestili su Wang i sur (1991), što je kasnije potvrđeno u pokusu sa epitelnim stanicama bubrega svinje LLC-PK_1, kada je smrt stanica nastupila trećeg dana pokusa, apliciranjem 70 μM FB_1 (Yoo i sur., 1992). Schroeder i sur (1994) ispitivali su učinak FB_1 na Swiss 3T3 fibroblaste. U stanicama je zabilježena akumulacija sfinganina i povećana sinteza DNA. Ovo saznanje upućuje na povezanost nagomilavanja sfinganina i indukcije DNA sinteze djelovanjem fumonizina, te susljedno k tome proliferaciju stanica, odnosno, ulogu FB_1 kao promotora tumora.

Koristeći limfocite purana i ljudske keratinocite, utvrđeno je povećanje apoptoze u FB_1 tretiranim stanicama. Studije provedene na ljudskim keratinocitima ukazale su na korelaciju akumulacije slobodnog sfinganina i apoptoze stanica uslijed djelovanja FB_1, u ovisnosti o vremenu i dozi (Dombrink-Kurtzman i sur., 1994; Dombrink-Kurtzman, 2003; Tolleson i sur., 1999). Fumonizin B_1 inducira apoptozu LLC-PK_1 stanica pri koncentraciji 50 μM. Apoptoza se očitovala deformacijom stanica, bubrenjem membrane, kondenzacijom kromatina,

stvaranjem apoptotičkih tjelešaca i fragmentacijom DNA (Kim i sur., 2001). Citotoksičan učinak FB_1 ispitan je i na staničnoj kulturi bubrega kunića (RK13). Vijabilnost RK13 stanica pokazala je osjetljivost na FB_1 ovisno o dozi i vremenu tj. stanična vijabilnost značajno je opadala pri izlaganju stanica FB_1 u koncentraciji 500 nM tijekom 24 sata te nakon tretiranja sa 100-500 nM tijekom 48 sati. Stanice su pri tom razvile morfološka obilježja koja odgovaraju apoptozi, ali DNA fragmentacija nije utvrđena. Također je zapaženo značajno povećanje aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) i glutamat dehidrogenaze (GLDH) nakon 48 sati tretiranja sa istim koncentracijama FB_1. Genotoksičnost je u istom pokusu dokazana mikronukleus testom, što je rezultiralo pojavom mikronukleus formacija u ovisnosti o vremenu i dozi FB_1 (Rumora i sur., 2002).

U staničnoj kulturi intestinalnih epitelnih stanica svinje (IPEC-1) tretiranoj s relativno visokim koncentracijama FB_1 (50-700 μM), zabilježeno je značajno otpuštanje LDH, smanjena proliferacija i opadanje transepitelnog električnog otpora stanica, što upućuje na moguće djelovanje FB_1 u probavnom sustavu ljudi i životinja koji konzumiraju hranu kontaminiranu s ovim mikotoksinom. Kod nižih koncentracija ovi poremećaji nisu uočeni (Bouhet i sur., 2004).

Fumonizin B_1 pokazao je citotoksično djelovanje na humane stanice jednjaka (SNO) u koncentraciji 34,64 μM. Citotoksičan učinak bio je jače izražen aplikacijom FB_1 i nitrozoamina, koji se smatraju čimbenicima u razvoju karcinoma jednjaka u ljudi (Myburg i sur., 2002). Citotoksičnost i apoptotički učinak FB_1, nivalenola (NIV) i deoksinivalenola (DON) ispitivani su u kulturi humanih eritroleukemija stanica K562. Pokazalo se da su NIV i DON znatno toksičniji od FB_1 te su izmjerene IC_{50} od 0,5 μM (NIV) do 70 μM (FB_1). Citotoksičnost ovih mikotoksina više se očitovala oštećenjem DNA i apoptotozom, nego oštećenjem stanične membrane i nekrozom (Minervini i sur., 2004).

Stanice mikroorganizama također su pokazale osjetljivost na toksičan učinak fumonizina; na stanicama kvasnica *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sydowiorum* i *Pichia ciferri*, zapažene su abnormalnosti u metabolizmu sfingolipida (Kaneshiro i sur., 1992; 1993; Wu i sur., 1995).

Bioluminescentni test genotoksičnosti na *Vibrio fischeri* pokazao je mutagenost FB_1, što je u kontradikciji s rezultatima dobivenim Ames-ovim testom, kada je dokazana citotoksičnost ali ne i mutagenost FB_1, usprkos mutagenom učinku ispitanih sojeva *Fusarium moniliforme* (Bjeldanes i Thomson, 1979; Gelderblom i Snyman, 1991; Sun i sur., 1993).

1.1.4. TOKSIČNI UČINCI FUMONIZINA *IN VIVO*

1.1.4.1. HEPATOTOKSIČNOST, NEFROTOKSIČNOST I KARCINOGENOST

Hepatotoksični i hepatokarcinogeni učinci fumonizina najviše su izučavani u štakora. Mehanizam hepatotoksičnog i karcinogenog djelovanja fumonizina uključuje poremećaje metabolizma sfingolipida, fosfolipida i masnih kiselina, proliferaciju stanica, oksidacijski stres, lipidnu peroksidaciju te oksidativna oštećenja DNA (Bolger i sur., 2001). Hepatokarcinogeneza je proučavana u mužjaka štakora soja Fischer, koji su u hrani primali FB_1 tijekom 21 dan. Utvrđena akumulacija ciklin D1 proteina povezana je s aktivacijom protein kinaze B (Akt) i inhibicijom glikogen sintaza kinaze 3b (GSK-3b), što je uzrokovalo povećanje ciklin ovisne kinaze 4 (Cdk 4) te rezultiralo hiperfosforilacijom retinoblastoma proteina u hepatocitima (Ramljak i sur., 2000). Howard i sur (2001) proveli su dvogodišnju studiju FB_1 inducirane karcinogeneze u štakora i miševa. Mužjaci (n=48) i ženke (n=48) štakora soja F344 i miševa soja B6C3F1 primali su FB_1 (96% čistoće) u različitim koncentracijama. U 9/48 jedinki mužjaka štakora soja F344uočeni su adenomi i karcinomi pri koncentraciji FB_1=50 mg/kg te u 15/48 jedinki pri koncentraciji FB_1=150 mg/kg. Hepatocelularni karcinomi i adenomi su zabilježeni i kod 5/47, 3/48, 1/48, 19/47 i 39/45 jedinki ženki miševa koje su primale 0, 5, 15, 50 i 80 mg/kg FB_1. U mužjaka miševa soja B6C3F1 nije bilo karcinogenog učinka FB_1 čak niti pri 150 mg/kg FB_1. Osim hepatotoksičnog i hepatokarcinogenog učinka FB_1 uočena je apoptoza, povećana proliferacija stanica i hiperplazija bubrežnog tubularnog epitela. Ranije toksikološke studije na štakorima i miševima dokazale su da su jetra i bubreg ciljni organi djelovanja FB_1. Također su se miševi soja B6C3F1 pokazali otporniji od štakora soja F344 prema djelovanju FB_1. U mužjaka miševa uočena je hepatotoksičnost pri koncentraciji od 81 mg/kg FB_1, dok koncentracija od 27 mg/kg nije imala nikakvog toksičnog učinka na mužjake i ženke miševa. Suprotno k tome, u mužjaka i ženki štakora zapažena je nefrotoksičnost pri koncentraciji od 9 mg/kg FB_1, dok hepatotoksičnost nije uočena niti pri koncentracijama od 27 i 81 mg/kg FB_1, što ukazuje na činjenicu da FB_1 inducira nefrotoksičnost u štakora pri koncentracijama koje ne izazivaju toksične učinke u jetri (Voss i sur., 1995). U dvogodišnjoj studiji (Gelderblom i sur., 2001a), štakori su u hrani primali 1, 10 i 25 mg FB_1/kg hrane pri čemu je uočena nekroza, odnosno apoptoza pojedinih stanica, proliferacija epitela žučnog kanala, rani znakovi fibroze te hiperplazija žučnog kanala. Adenofibroza je zabilježena samo u jednom slučaju pri najvećoj koncentraciji FB_1. Veće patološke promjene utvrđene su u bubrezima životinja koje su primale 10 i 25 mg/kg FB_1, uključujući nekrozu, apoptozu, kalcifikaciju i degenerativne promjene u proksimalnim tubulima. Hepatotoksični i nefrotoksični učinci FB_1 zabilježeni su u

pokusu sa kunićima (Gumprecht i sur., 1995). Životinje su tretirane intravenozno s 0,15-1 mg/kg FB_1 4-5 puta dnevno. Nakon višestrukog doziranja životinje su postale letargične i anoreksične, izlučivanje urina je bilo smanjeno, a biokemijski parametri ukazivali su na oštećenja jetre i bubrega. Na bubrezima je zapažena uznapredovala nekroza epitela proksimalnih tubula, medule i korteksa, dok je na jetri uočena nekroza pojedinih stanica. Omjer Sa/So bio je povećan u jetri, bubrezima, mišićima, serumu i urinu. Na miševima soja B6C3F1 ispitivani su toksični učinci FB_1, FB_2, FB_3, FP_1, hidroliziranog FB_1, N-(acetil) FB_1 i N-(karboksimetil) FB_1, apliciranih u koncentracijama 0, 14, 70 i 140 μM/kg hrane tijekom 28 dana (Howard i sur., 2001). Koncentracije žučnih kiselina, kolesterola i alkalne fosfataze bile su povećane u serumu miševa hranjenih sa 70 i 140 μM/kg FB_1. Povećana apoptoza hepatocita, hipertrofija, hiperplazija Kuppffer-ovih stanica i povećani omjer Sa/So u jetri, utvrđeni su miševa koji su primali spomenute koncentracije FB_1, što ukazuje na činjenicu da je jetra ciljni organ djelovanja FB_1 u miševa. Mužjaci štakora soja F344 hranjeni su s FB_1 tijekom 25 tjedana te su idućih 25 tjedana primali hranu koja nije sadržavala toksin (Lemmer i sur., 2004). Nakon završetka pokusa u životinja je, kao i u ranijim pokusima, zapažena proliferacija stanica, adenomi i kolangiofibroza. Ovakve lezije na jetri javljaju se u ljudi s kroničnim toksičnim hepatitisom i fibrozom, odnosno cirozom jetre.

Osim u glodavaca, hepatotoksični i nefrotoksični učinci FB_1 utvrđeni su u riba (šaran), peradi, konja, svinja i primata. U šarana je pri 0,5 i 5 mg FB_1/kg tj.t. zabilježen gubitak tjelesne težine, povećanje koncentracije ukupnog bilirubina i kreatinina te povećanje aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) što ukazuje na hepatotoksično i nefrotoksično djelovanje FB_1 (Pepeljnjak i sur., 2002). Povećanje koncentracije ukupnih proteina i AST u serumu te nekroza jetre i bubrega utvrđeni su u pilića koji su u hrani primali 200 mg/kg FB_1. Pri tom je utvrđen sinergizam FB_1 i moniliformina koji se očitovao lezijama na srčanom mišiću i bubrezima (Ledoux i sur., 2003). Slične promjene zabilježene su u pataka koje su tijekom 12 dana primale 5, 15 i 45 mg/kg FB_1 p.o. U plazmi je detektirano povećanje koncentracije ukupnih proteina, kolesterola, ALT, LDH, gama glutamiltransferaza (GGT), povećanje omjera Sa/So i hiperplazija jetre (Bailly i sur., 2001; Tran i sur., 2003). U konja oboljelih od leukoencefalomalacije, histopatološke promjene zapažene su i na jetri uključujući promjenu boje u žuto smeđu, nekrozu i fibrozu centrilobularnog dijela (Ross i sur., 1993). Bubrežne patološke promjene očitovale su se kao hidropična degeneracija, nefroza, nefropatija i nekroza stanica (Kellerman i sur., 1990). U pokusu sa svinjama koje su primale niže koncentracije fumonizina, utvrđena je subakutna hepatotoksikoza (nodularna hiperplazija) (Colvin i sur., 1993; Haschek i sur., 1992). Motelin i sur (1994) su dokazali da koncentracije manje od 12 mg/kg FB_1 ne uzrokuju histopatološke promjene na jetri. U

kratkoročnom pokusu svinje su u hrani primale FB_1 (10, 20 i 40 mg/kg) tijekom 4 tjedna te je zabilježeno značajno povećanje aktivnosti AST i omjera Sa/So u serumu (Zomborszky i sur., 2000). Peroralnom aplikacijom FB_1 (7,5-7,6 mg/kg tj.t. svinja) tijekom 5-10 dana utvrđeno je povećanje aktivnosti AST i akumulacija toksina u bubrezima (81,6-4762,4 ng/g), jetri (73,6-709,6 ng/g), plućima (6,4-1144,8 ng/g), slezeni (28-7975,2 ng/kg) i gušterači (24-464 ng/kg) (Melinda i sur., 2004). Slični rezultati su dobiveni aplikacijom FB_1 (100 mg/svinja/dan) tijekom 5-11 dana pri čemu su najveće koncentracije FB_1 izmjerene su u bubrezima (833 μg/kg), a zatim u jetri (231 μg/kg) i plućima (170 μg/kg) (Meyer i sur., 2003). Kratkoročnim (51 dan, 1 mg/kg tj.t.) i dugoročnim pokusima (13,5 godina, 0,11-0,18 mg/kg tj.t) na vervet majmunima utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti enzima (AST, GGT, LDH) i omjera Sa/So bez značajnih oštećenja jetre i bubrega (Van der Westhuizen i sur., 2001; Gelderblom i sur., 2001b).

1.1.4.2. NEUROTOKSIČNOST

U konja i drugih kopitara neurotoksično se djelovanje FB_1 očituje kao leukoencefalomalacija (ELEM). Bolest je najviše zastupljena u umjerenom pojasu (npr. SAD) i ima sezonska obilježja; javlja se od kasne jeseni do ranog proljeća, vjerojatno zbog optimalnih uvjeta za rast plijesni i biosintezu mikotoksina. Prirodno kontaminirani kukuruz s FB_1 (10 mg/kg) može izazvati ELEM, a koncentracije ispod 6 mg/kg je ne uzrokuju. Bolest se razvija u razdoblju od nekoliko tjedana tijekom kojih konji postaju letargični, dezorjentirani i odbijaju hranu. Daljnji tijek bolesti očituje se ataksijom, naglašenim znojenjem, a završava uginućem životinje. Smrt može nastupiti za manje od 7 sati, ili za nekoliko godina od pojave kliničkih simptoma. Histopatologija ELEM očituje se promjenama na mozgu uključujući edem, koji nastaje nakupljanjem tekućine ispod moždane ovojnice, te likvefakciju regija u cerebralnoj hemisferi. Ove promjene uzrokuju ispočetka mikroskopske lezije koje postupno zahvaćaju čitav režanj (Uhlinger, 1997). Visoka doza FB_1 uzrokuje smrtonosnu hepatotoksikozu s laganim oštećenjima mozga, dok je kod manjih doza više oštećen mozak, a manje jetra. Smith i sur (2002) dokazali su da koncentracije 0,01-0,2 mg/kg FB_1 i.v. tijekom 28 dana, smanjuju kardiovaskularnu funkciju u konja što može dovesti do razvoja leukoencefalomalacije. Intravenoznom aplikacijom čistog FB_1 u koncentracijama 0,05-0,2 mg/kg tijekom 28 dana dolazi do neuroloških abnormalnosti i promjena cerebrospinalne tekućine, dok koncentracija 0,01mg/kg ne izaziva patološke promjene na mozgu (Foreman i sur., 2004).

Neurotoksični učinci FB_1 zabilježeni su i u štakora nakon p.o. doziranja 6,2 mg FB_1 /kg tj.t. dnevno, što se očitovalo kao disfunkcija perifernog živčanog sustava (redukcija brzine provođenja impulsa i refleksa) (Banczerowski-Pelyhe i sur., 2002).

1.1.4.3. PLUĆNI EDEM (PPE)

PPE sindrom zabilježen je u svinja 1989-1990 u SAD na farmama gdje su životinje hranjene pljesnivim kukuruzom iz kojeg je dominantno izolirana *F. moniliforme* (=*verticillioides*). Koncentracije FB_1 u hrani iznosile su 1-330 mg/kg. Čisti FB_1 (11,3 mg/kg), odnosno 330 mg/kg u hrani, izaziva PPE, a životinje su uginule petog dana pokusa. Osim na plućima, zapažene su i promjene na jetri, gušterači, srcu, bubrezima i jednjaku (Haschek i sur., 1992; Colvin i sur., 1993; Motelin i sur.,1994). U prasadi hranjenoj s 10-40 mg FB_1/kg hrane tijekom 4 tjedna utvrđen je plućni edem u drugom i četvrtom tjednu pokusa uz ranije opisane promjene na jetri i bubrezima (Zomborszky i sur., 2000). Tijekom 8-tjednog hranjenja prasadi s FB_1 (1,5 i 10 mg/kg) zapažene su patološke promjene na plućima u sve tri pokusne skupine što ukazuje na rizik izloženosti manjim koncentracijama FB_1 kroz dulji period (Zomborszky-Kovacs i sur., 2002). U svinja hranjenih s kulturom *F. verticillioides* (20 mg FB_1/kg tj.t.) zapažen je negativni ionotropni i kronotropni učinak, inhibicija protoka kalcija kroz L-kanale i smanjena mehanička funkcija lijevog ventrikula što je navelo na zaključak da PPE sindrom nastaje kao posljedica srčane disfunkcije (Constable i sur., 2000). Upitno je dali se ovakav toksični učinak može pripisati samo FB_1, obzirom da bovericin, kojeg također tvori *F. verticillioides*, pokazuje negativno ionotropno i kronotropno djelovanje *in vivo* i *in vitro*.

1.1.4.4. IMUNOTOKSIČNOST

Chatterjee i sur. (1995) proučavali su učinak FB_1 na peritonealne makrofage pilića pri čemu je zabilježeno propadanje nukleusa ovisno o dozi (6-18 μg/mL) (120). Ovi rezultati ukazali su na smanjenje imuniteta kod pilića koji su bili izloženi djelovanju FB_1, što je u skladu s rezultatima dobivenim pri hranjenju pilića s ekstraktima iz tri soja *F. moniliforme* (=*verticillioides*), koji su također pokazali imunosupresivni učinak, a koji se očituje kao smanjena aglutinacija crvenih krvnih stanica ovce (Marjanović i sur., 1995; Bondy i Pestka, 2000). Osim kod peradi, imunosupresivno djelovanje FB_1 uočeno je i kod drugih vrsta uključujući ribe, glodavce i svinje. U ranije opisanom pokusu na šaranima koji su hranjeni s FB_1 (0,5-5 mg/kg) uočena je povećana učestalost sekundarne bakterijske infekcije (*Aeromonas salmonicida* subsp. *nova*), što se očitovalo pojavom kožnih lezija (Pepeljnjak i sur., 2002). Povećana infiltracija limfocita u tankom crijevu, povećanje interleukina-4 i smanjenje interleukina-10 te smanjenje oslobađanja vodikovog peroksida u peritonealnim makrofagima, zapaženo je u pokusu sa štakorima koji su hranjeni s 100 mg FB_1/kg hrane tijekom 12 tjedana (Theumer i sur., 2002). Slični rezultati dobiveni su aplikacijom FB_1 (100 mg/kg) i aflatoksina B_1 (40 μg/kg) (Themur i sur., 2003). U svinja je zabilježena povećana kolonizacija intestinalnog sustava s ekstraintestinalnom patogenom *E. coli* pri doziranju 0,5

mg FB_1/kg tj. t. (Oswald i sur., 2003). Ovi rezultati pokazuju da ingestija FB_1 može biti predispozicijski čimbenik razvoja infektivnih bolesti.

1.1.4.5. KARCINOM JEDNJAKA I JETRE U LJUDI

Područje Transkeje (Južna Afrika) obuhvaća nekoliko provincija u kojima prosječna godišnja incidencija karcinoma jednjaka u ljudi iznosi 50-200 slučajeva na 100000 stanovnika (Van Rensburg, 1985). Vrlo visoka učestalost karcinoma jednjaka javlja se i u Linxianu (Kina) (108 slučajeva/100 000 stanovnika), sjeveroistočnom Iranu (Manzadaran) (206-265/100000) i Charlestonu (SAD) (170/100000) (Bolger i sur., 2001). U tim predjelima su zabilježene veće koncentracije FB_1 u kukuruzu (0,17-155 mg/kg) (Rheeder i sur., 1992; Chu i Li, 1994; Yosizawa i sur., 1994). Karcinom jednjaka dovodi se u vezu s nekoliko čimbenika; nedostatak elemenata u tragovima i vitamina, način prehrane, nitrozoamini, konzumacija alkohola i pušenje. U južnoj Africi i Kini utvrđene su epidemiološke korelacije između karcinoma jednjaka i pojave *F. moniliforme* (=*verticillioides*), odnosno FB_1 na kukuruzu i kukuruznim proizvodima (10,2-140 mg/kg) (Marasas i sur., 1988). Kukuruz se u ovim područjima uzgaja tradicionalno i skladišti u polju, gdje je utvrđeno vidljivo mikološko zagađenje. U Transkeji se jako pljesnivi kukuruz koristi za proizvodnju domaćeg piva specifičnog okusa kojeg daju plijesni. Haimen, Fusui, Qudong i Penlai su neke od kineskih pokrajina u kojim je utvrđena visoka stopa primarnog karcinoma jetre (PKJ). Kao etiološki čimbenici PKJ inkriminirani su virus hepatitisa B, teški metali, herbicdi, alkohol, voda za piće te aflatoksini. Osim aflatoksina, fumonizini su od ranije poznati kao promotori hepatokarcinogeneze te su često i u visokim koncentracijama izolirani iz uzoraka kukuruza na ovim područjima. Tijekom 1993. godine u pokrajini Haimen mikotoksikološkim analizama utvrđen je FB_1 u 92 % uzoraka u koncentracijama 0,16-25,97 mg/kg, dok je na području Penlai u 15 % uzoraka nađena niža koncentracija FB_1 (0,10 mg/kg). Ispitivanja su ponovljena tijekom 1995. godine pri čemu je nanovo utvrđena značajno veća koncentracija FB_1 u uzorcima kukuruza iz Haimen pokrajine. S druge strane, utvrđene koncentracije aflatoksina nisu pokazale značajnu razliku u ove dvije regije. Osim aflatoksina i fumonizina, u uzorcima kukuruza su nađeni i trihoteceni koji također mogu biti promotori tumora u hepatokarcinogenezi iniciranoj aflatoksinom B_1. Epidemiološke studije PKJ ukazuju na veću učestalost ove bolesti u Haimen regiji u odnosu na Penlai. Također je stopa smrtnosti PKJ u Haimen regiji (52-62/100000) četiri puta veća. (Ueno i sur., 1997). U regiji visoke incidencije hepatocelularnog karcinoma (Guanxi, Kina) zabilježeno je istodobno pojavljivanje AFB_1 i FB_{1-3} pri čemu je procijenjen dnevni unos od 184,1 mg/kg (AFB_1), što ukazuje na mogućnost da bi ovako visoke koncentracije aflatoksina zajedno sa fumonizinima mogle potaknuti razvoj karcinoma u ljudi (Li i sur., 2001). S druge

strane, analizom Sa/So omjera u serumu ljudi iz pokrajine Linxian (visoka stopa karcinoma jednjaka) nije utvrđena korelacija između razine biomarkera izloženosti FB_1 i učestalosti pojave karcinoma (Abnet i sur., 2001).

Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (IARC) klasificira FB_1 kao 2B karcinogen (ima dovoljno dokaza o karcinogenom učinku na pokusnim životinjama, ali nema odgovarajućih podataka za ljude) (IARC, 2002).

1.1.5. UČESTALOST FUMONIZINA U HRANI

Svjetska zdravstvena organizacija-WHO (Bolger i sur., 2001) je izdala detaljni prikaz istraživanja FB_1- kontaminacije kukuruza u različitim zemljama svijeta što uključuje i nalaze ovog mikotoksina na području Hrvatske (Jurjević i sur., 1999). Osim toga, u Hrvatskoj je *F. verticillioides* dominirala nad ostalim fuzarijama u kukuruzu prezimjelom u polju (32%) i uskladištenom u domaćinstvima (17%) te je dokazana sposobnost tvorbe FB_1 u 100% izoliranih sojeva u širokom rasponu koncentracija (181-1320 mg/L) (Šegvić i Pepeljnjak, 2003). U *Tablici I* su prikazani rezultati nekih istraživanja distribucije FB_1 i njegovih koncentracija u kukuruzu iz različitih zemalja (Bolger i sur., 2001).

Obzirom na učestalost i izmjerene koncentracije FB_1 u kukuruzu te prehrambene navike stanovništva, u nekim zemljama je procijenjen dnevni unos ovog mikotoksina; Argentina 0,2 μg/kg tj.t. (Solovey i sur., 1999); Kanada 0,017-0,089 μg/kg tj.t. (Kupier-Goodman i sur., 1996); Nizozemska 0,06-3,7 μg/kg tj.t. (de Nijs i sur., 1998); Švicarska i UK 0,03 μg/kg tj.t. (Zoller i sur., 1994; Gregory, 1990); SAD 0,08 μg/kg tj.t. (Humphreys i sur., 2000); Transkeja (južna Afrika) 1,2-355 μg/kg tj.t. (Marasas, 1997). Kratkoročne i dugoročne toksikološke studije provedene na glodavcima pokazuju da su bubrezi najosjetljiviji na djelovanje FB_1 te je utvrđen je NOEL (no observable effect level) nefrotoksičnog djelovanja FB_1 (0,2 mg/kg tj.t.dnevno). Na temelju NOEL-a procijenjen je maksimalni dozvoljeni dnevni unos (TDI) $FB_{1\text{-}3}$ od 2 μg/kg tj.t (Bolger i sur., 2001).

Tablica I Raširenost fumonizina B_1 u sirovom i prerađenom kukuruzu

	ZEMLJA	RAZDOBLJE	N uzoraka/N (FB +)/ KUKURUZ	$\bar{x}$ / Max (mg/kg) FB_1
Sjeverna, srednja i Južna Amerika	Kanada	1993	98/10/domaći	0.069 / 1,8
		1996-97	21/21/prerađeni	0,19 / 0,85
	SAD	1996	93/93/domaći	0,13 / 3,3
		1997	602/324/prerađeni	0,13 / 1,08
	Argentina	2000	56/46/domaći	0,545 / 4,98
		1999	11/11/brašno	0,188 / 0,54
	Brazil	1995-96	150/148/domaći	1,14 / 22,6
		1999	11/2/slatki konzervirani	0,01 / 0,08
			9/9/brašno	2,29 / 4,93
	Meksiko	-	7/7/tortilje	0.6 / 1.07
Europa	Hrvatska	1996	105/102/domaći	0,627 / 11,66 FB_{1-2}
		1997	104/97/domaći	0,125 / 2,524 FB_{1-2}
		2002	49 FB_1/49/domaći	0,46/1,38 FB_1*
			3 FB_2/49	1,1/3,08 FB_2*
	Češka	1995	35/30/kruh	0,27 / 1,81 FB_{1-3}
	Mađarska	1994	23/7/domaći	0,463 / 5,1
			23/17/pljesnivi domaći	4,62 / 52,4
	Njemačka	-	6/6/brašno	0,092 / 0,202
	Italija	1994	22/20/pljesnivi domaći	67,0 / 300,0
			20/20/palenta	1,38 / 3,76
	Nizozemska	1994-96	62/61/uvezeni	0,62 / 3,35
	Španjolska	1994-96	55/48/domaći	4,2 / 19,2
	Švedska	1996	42/19/uvezeni	0,045 / 0,39
	UK	1998-99	139/134/uvezeni	0,795 / 3,4
		1994-95	20/16/palenta	0.53 / 2.12
Afrika, Azija i Australija	Južna Afrika	1994-95	143/bijeli domaći	0,637 / 12,96
			148/žuti domaći	0,664 / 5,06
			36/prerađeni	0,378 / 1,40
	Kenija	1996	197/93/domaći	0,316 / 12,0
	Kina	1996	177/94/domaći	8,88 / 78,37
			14/prerađeni	1,064 / 8,80
	Linxian	1995	164/106/domaći	0,70 / 16,0 FB_{1-3}
	Haimen	1993	40/37/domaći	4,73 / 25,97
	Penlai	1993	40/16/domaći	0,26 / 3,19
	Iran			
	Mazandaran	1998	11/11/domaći	2,27 / 3,98
	Isfahan		8/8/domaći	0,169 / 0,59
	Australija	1995	70/67/domaći	6,7 / 40,6 FB_{1-3}

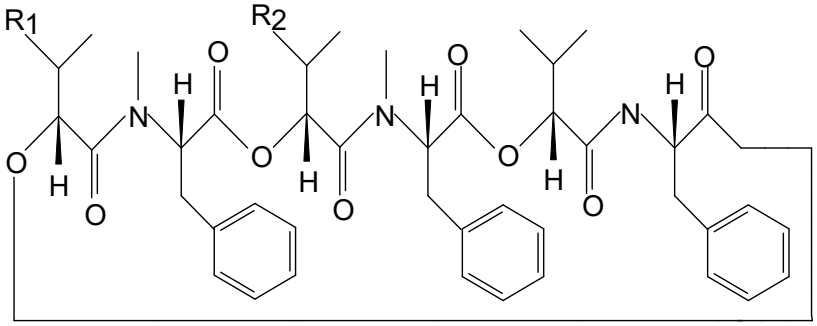
* Domijan i sur., 2005a

1.2. BOVERICIN

Bovericin (BEA) je mikotoksin prvi put izoliran iz kulture entomopatogene vrste *Beauveria bassiana*, kao supstancija s antibiotičkim djelovanjem koja se pokazala toksičnom za ličinke račića (*Artemia salina*) i ličinke komaraca (Hamill i sur., 1969; Grove i Pople,1980). Tvorba BEA utvrđena u još tri entomopatogene vrste gljivica; *Paecilomyces fumosoroseus* (Bernardini i sur., 1975), *Paecilomyces tenuipes* (Nilanonta i sur., 2000) i *Polyporus sulphureus* (bazidiomiceta) (Doel i sur., 1978). Tijekom zadnjeg desetljeća sposobnost tvorbe BEA dokazana je u brojnih vrsta fuzarija: *Fusarium semitectum*, *F. subglutinans* (Gupta i sur., 1991); *F. proliferatum* (C i E) (Plattner i Nelson, 1994); *F. verticillioides* (=*moniliforme*) (Bottalico i sur., 1995); *F. antophilum*, *F. beomiforme, F. dlamini*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. longipes*, *F. sambucinum*, *F. poae*, *F. avenaceum* (Logrieco i sur., 1998); *F. globosum* (Shepard i sur., 1999); *F. konzum* (Leslie i sur., 2004).

Po kemijskoj strukturi BEA je cikloheksadepsipeptid tj. ciklički ester trimer amida N-metil-L-fenilalanina i D-α-hidroksiizovalerijanske kiseline, molekulske mase 783 Da (*Slika III*). Stabilna je okrugla molekula lipofilnog karaktera i dominantna bioaktivna komponenta u vrste *Beauveria bassiana* (Gupta i sur., 1991).

Gupta i sur (1995) opisali su 2 kemijska analoga BEA; BEA (A) i BEA (B). Bovericin A je također cikodepsipeptid, molekulske težine 797 Da, koji je prisutan u manjoj količini kao produkt biosinteze *B. bassiana*. Veći lipofilni karakter BEA (A) potječe od dodatne metilne skupine u R_1. Bovericin (B) je viši kemijski analog BEA (A), molekulske mase 811 Da, koji sadrži dodatne metilne skupine u R_1 i R_2, i više je lipofilan. Ovaj se analog sintetizira u vrlo malim količinama.



BEA

$R_1=R_2=CH_3$

BEA(A)
$R_1=CH_2CH_3$
$R_2=CH_3$

BEA (B)
$R_1=R_2=CH_2CH_3$

Slika III *Kemijska struktura bovericina*

Smatra se da u biosintezi BEA sudjeluje multienzimski kompleks bovericin sintaza, nespecifične prirode, što može rezultirati tvorbom sekundarnih metabolita analognih struktura. Potvrđeno je H-NMR-om da tijekom biosinteze dolazi do supstitucije jedinica α-hidroksiizovalerijanske kiseline (Hiv), koju nalazimo u BEA, sa 2-hidroksi-3-metilpentanonskom kiselinom (Hmp), koju sadrže BEA (A) i BEA (B). Hmp ostaci potječu od izoleucin biosintetičkog intermedijera α-keto-β-metilvalerijanske kiseline.

Nilanonta i sur (2002) su koristeći soj *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614, dodavanjem prekursora biosinteze BEA (L-izoleucin i D-aloizoleucin), povećali proizvodnju BEA (A) i BEA (B) te sintezu BEA (C). Primjenom prekursora D-izoleucina i L-aloizoleucina sintetizirani su diastereoizomeri BEA (A, B i C) koji su nazvani alobovericini A, B i C.

Nedavno su iz kulture *Beauveria* sp. FKI-1366 izolirana tri nova stereoizomera bovericina: BEA (D, E i F) (Fukuda i sur., 2004).

1.2.1. BIOLOŠKI UČINCI I TOKSIČNO DJELOVANJE BOVERICINA

Biološke osobine BEA kao i osobine eniacina povezane su s njihovom mogućnošću stvaranja kompleksa s dvovalentnim (Ca^{2+}) i alkalnim kationima (Na^{+} i K^{+}), pri čemu se katalizira translokacija tj. povećava propusnost membrane za ove ione u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Benz, 1978; Ojcius i sur., 1991).

Bovericin pokazuje antimikrobno, insekticidno, citotoksično i apoptotičko djelovanje te ima negativan ionotropni i kronotropni učinak na srčani mišić i glatke mišiće sisavaca. Antimikrobno djelovanje BEA dokazano je na više različitih vrsta mikroorganizima. Nakon otkrića BEA dokazano je njegovo antibiotičko djelovanje na nekoliko vrsta gram-pozitivnih i negativnih bakterija uključujući, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* i *Escherichia coli* (Ovchinnikov i sur., 1971). Koristeći metodu difuzije Castelbury i sur (1999) dokazali su da BEA u količini 0,1 μg inhibira rast *Bacillus pumilus*; 1 μg inhibira rast *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. sphaericus* i *Paenibacillus alvei* i *Paenibacillus sp.*; 25 μg inhibira *P. validus*. Također je dokazano inhibitorno djelovanje BEA na anaerobne vrste *Eubacterium biforme*, *Pepetostreptococcus anaerobius*, *P. productus*, *Bifidobacterium adolescentis* i *Clostridium perfringens*. Bovericin i BEA (A) izolirani iz *Paecilomyces tenuipes* pokazali su baktericidno djelovanje na *Mycobacterium tuberculosis* u koncentraciji 12,5 μg/mL, odnosno 25 μg/mL, a dokazan je i inhibitorni učinak na *Plasmodium falciparum* (K1, multi-drug resistant strain) s EC_{50}=1,6 μg/mL, odnosno EC_{50}=12 μg/mL (Nilanonta i sur., 2000). Ovi nalazi govore u prilog djelovanja BEA kao antibiotika i antiparazitika što ga svrstava u potencijalne tuberkulostatike i antimalarike. Nilanonta i sur (2000) su također

dokazali da BEA i BEA A djeluju kao citostatici na humani epidermalni karcinom (KB) u koncentraciji IC_{50}=4,9 μg/mL, odnosno IC_{50}=2,5 μg/mL, te na humani karcinom dojke (BC-1), u koncentraciji IC_{50}=3,8 μg/mL, odnosno IC_{50}=2,9 μg/mL, u odnosu na standard supstanciju elipticin (0,46 μg/mL za KB, 0,60 μg/mL za BC-1). Novootkriveni stereoizomeri BEA (D) i (E) znatno smanjuju IC_{50} mikonazola koji se koristi za suzbijanje flukonazol-rezistentne *Candida albicans* i to sa 1,3 μM na 0,25 μM, odnosno 0,31 μM (Fukuda i sur., 2004).

Umjereno insekticidno djelovanje BEA dokazano je za ličinke komaraca (LC_{50}=26 mg/kg BEA, LC_{50}=31 mg/kg BEA A), muhe (*Musca vomitoria*) i krumpirovu zlaticu (Grove i Pople, 1980; Gupta i sur., 1991; 1995). Toksično djelovanje BEA utvrđeno je na nekim vrstama morskih račića (Crustacea); *Artemia salina* LD_{50}=2,8 μg/mL (Moretti i sur., 1995) i *Mysidopsis bahia* LD_{50}=0,56 mg/mL (Genthner i sur., 1994). Na staničnoj kulturi *Spodoptera frugiperda* SF-9 (Lepidoptera) dokazano je inhibitorno (IC_{50}=2,5 μM) i citotoksično (CC_{50}=3 μM) djelovanje BEA, pri čemu se BEA pokazao toksičnijim od gliotoksina (CC_{50}= 4 μM), eniacina (CC_{50}=6,7 μM), nivalenola (CC_{50}=9,5 μM), zearalenona (CC_{50}=18,3 μM) i deoksinivalenola (CC_{50}=45 μM) (Fornelli i sur., 2004). Osim toga, citotoksično djelovanje BEA utvrđeno je *in vitro* u kulturi humanih B-limfocita (Di Paola i sur., 1994) te u kulturi stanica limfoma U-937 (CC_{50}=30 μM) i stanicama promielocitne leukemije HL-60 (CC_{50}=15 μM) (Calo i sur., 2004).

Bovericin uzrokuje apoptozu preko Ca^{2+}-aktivirajućih endonukleaza što dovodi do citolize popraćene DNA fragmentacijom (Ojcius i sur., 1991) te stvara adukte s oligonukleotidima u vrlo maloj koncentraciji od 25 pmol/mL (Pocsfalvi i sur., 1997). Harnois i sur. (1997) proučavali su indukciju apoptoze u ne-malignih i malignih humanih kolangiocita. Bovericin je uzrokovao značajnu apoptozu (29%) u ne-malignih kolangiocita u koncentraciji od 25 μM nakon 6 sati, pri čemu je uočena kondenzacija kromatina i fragmentacija DNA tj. promjene karakteristične za apoptozu. S druge strane, apliciranjem iste koncentracije BEA zabilježena je znatno manja apoptoza u malignih kolangiocita (12%). Pri tom su maligne stanice pokazale 15 puta veću ekspresiju Bcl-2 proteina, što ukazuje na ulogu ovih proteina u rezistenciji malignih stanica na apoptozu. Que i sur. (1997) su dokazali da BEA inducira apoptozu preko Ca^{2+} ovisne CPP-32 proteaze, usprkos ekspresiji Bcl-2 proteina u kolangiocitima štakora. Bovericin uzrokuje apoptozu limfocita periferne krvi purana u koncentracijama 8 μM i 50 μM, što se očituje DNA fragmentacijom, kondenzacijom kromatina u perifernim dijelovima stanice te vakuolizacijom citoplazme. Aplikacijom BEA i FB_1 u istim koncentracijama (8 μM) zapažen je aditivan učinak koji se, osim indukcije apoptoze, očitovao i u smanjenju broja

makrofaga. Ovi rezultati upućuju na moguće sinergističko imunosupresivno djelovanje BEA i FB_1 smanjenjem proliferacije i induciranjem apoptoze (Dombrink-Kurtzman, 2003). Bovericin je vrlo jaki specifični inhibitor kolesterol-aciltransferaze (ACAT) (Tomoda i sur.,1992), enzima koji sudjeluje u esterifikaciji kolesterola s masnim kiselinama, pri čemu nastaje acil-kolesterol-ester. Izmjerena je vrlo niska koncentracija BEA (3 μM) koja je za 50% inhibirala aktivnost ACAT u mikrosomima jetre štakora, u odnosu na IC_{50} eniacina (22-110 μM). Kod ciroze jetre i toksičnog hepatitisa smanjena je sintetska i esterifikacijska funkcija jetre te se mogu naći izrazito niske koncentracije kolesterola, osobito esterificiranog kolesterola.

Ranije fiziološko-kemijske studije su pokazale da BEA ima selektivno ionoforno djelovanje prema esencijalnim kationima $K^+ > Na^+ > Ca^{2+}$, odnosno $Ca^{2+} > K^+ > Na^+$ (Prince i sur., 1974; Roeske i sur., 1974). Obzirom na kationoforne osobine BEA, proučavani su njegovi elektromehanički i fiziološki učinci u glatkim mišićima ileuma i srčanom mišiću u guinea-pig (Lemmens-Gruber i sur., 2000). Utvrđen je negativni ionotropni učinak BEA (redukcija jačine kontrakcije) u ileumu u koncentracijama 1, 3, 10 i 30 μM (IC_{50}=0,86 μM), te u papilarnim mišićima u koncentraciji 3, 10 i 30 μM (IC_{50}=18 μM), dok je u koncentraciji 100 μM kontrakcija papilarnih mišića sasvim izostala. Negativni ionotropni učinak BEA u koncentraciji 3, 10 i 30 μM antagoniziran je dodatkom $CaCl_2$ 3.5, 4.2 i 4.9 mM ekstracelularno, dok koncentracija od 100 μM BEA nije mogla biti neutralizirana dodatkom $CaCl_2$ u višim koncentracijama. Negativni kronotropni učinak (smanjenje vodljivosti) na aktivnost desnog atrija zapažen je kod 30 μM BEA pri čemu je broj otkucaja/min bio značajno smanjen (143 ± 2 otkucaj/min) u odnosu na kontrolu (189 ± 2). Time je dokazano da je negativni ionotropni učinak BEA više izražen od negativnog kronotropnog učinka. U svinja hranjenih sa smjesom koja je sadržavala kulturu fuzarije-producenta FB_1 (20 mg/kg t.t.dnevno) utvrđen je negativni ionotropni i kronotropni učinak te smanjen rad desnog ventrikula (Constable i sur., 2000), koji su najvjerojatnije bili posljedica djelovanja BEA s obzirom da je *Fusarium verticillioides* vjerojatno u biosintezi stvorila oba toksina. Mogući mehanizam redukcije kontrakcije u ileumu je inhibicija utoka Ca^{2+} kroz L-tip kalcijevih kanala, što znači da BEA ima Ca-antagonistički učinak. Drugi mogući mehanizam redukcije kontrakcije u ileumu je aktivacija kalijevih kanala čime se povećava propusnost membrane za kalij. U papilarnim mišićima smanjenje jačine kontrakcije može biti posljedica redukcije slobodnog intracelularnog kalcija koja je rezultat inhibicije protoka kalcija kroz L-kanale. Kod nižih koncentracija BEA, negativni kronotropni učinak se može antagonizirati povećanjem izvanstanične koncentracije kalcija. Međutim molni omjer BEA i $CaCl_2$ nije

konstantan što upućuje na nekompetitivnu inhibiciju protoka kalcija, što znači da je mehanizam djelovanja BEA na protok kalcija različit od djelovanja Ca-antagonista (npr. diltiazem-blokator Ca-kanala). U staničnoj kulturi neurona NG 108-15 (hibridna linija neuroblastoma miša i glioma štakora) BEA uzrokuje reverzibilnu inhibiciju L-tipa kalcijevih kanala u rasponu koncentracija od 0,3 do 100 μM (IC_{50} = 4 μM), a u koncentraciji od 30 μM povećava negativnost membranskog potencijala za približno –15 mV te smanjuje trajanje akcijskog potencijala. Potpuna inhibicija protoka kalcija zapažena je pri 10 μM nakon 2 min. Aplikacijom istih koncentracija BEA nije zapaženo značajno djelovanje na protok kalija, što znači da je BEA relativno specifični inhibitor L-tipa kalcijevih kanala u NG108-15 stanicama (Wu i sur., 2002).

Ionoforno djelovanje BEA moglo bi se objasniti na dva načina: djelovanjem BEA kao nosača i/ili mehanizmom stvaranja kanala u biološkim membranama. Kouri i sur (2003) dokazali su da BEA stvara kation-selektivne kanale u ventrikularnim miocitima i liposomima te povećava propusnost membrane za monovalentne katione što dovodi do kolapsa kationskog gradijenta. Narušavanje homeostaze monovalentnih i divalentnih kationa može djelomično objasniti nespecifično toksično djelovanje BEA na stanice sisavaca, kukaca i mikroorganizama. Također, ovakva aktivnost BEA može povećati toksičnost drugih fuzariotoksina, primjerice fumonizina, koji se istodobno pojavljuju u hrani. Sama uloga BEA u razvoju mikotoksikoza u ljudi i životinja još je uvijek nepoznata.

1.2.2. UČESTALOST BOVERICINA U HRANI

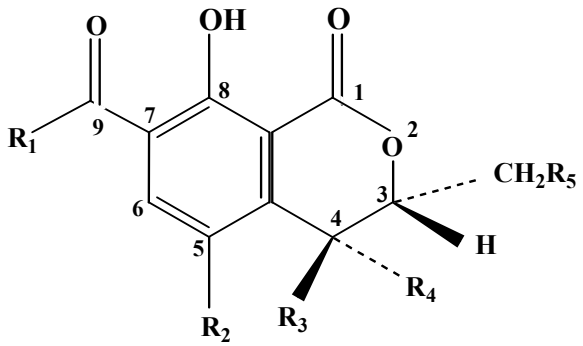
Bovericin je bioaktivni ciklodepsipeptid kojeg osim *Beauveria basiana, Paecilomyces fumosoroseus, Paecilomyces tenuipes* i *Polyporus sulphureus* tvori i veći broj *Fusarium* vrsta. Ovaj mikotoksin je prvi puta utvrđen kao prirodni kontaminant kukuruza u Poljskoj (Logrieco i sur., 1993), nakon čega je detektiran u uzorcima kukuruza iz Italije (Ritieni i sur., 1997), SAD (Munkvold i sur., 1998) i Afrike (Shepard i sur., 1999) te Hrvatske (Jurjević i sur., 2002). Sadržaj BEA u kukuruzu najčešće je bio u korelaciji s kontaminacijom kukuruza *Fusarium* vrstama. Tako je 52% uzorka iz Poljske i Italije sadržavalo BEA u koncentracijama od 5 do 520 mg/kg te je zabilježena dominacija *F. subglutinans* (Poljska), odnosno *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Italija). Botalico i sur (1995) također su utvrdili kontaminaciju kukuruza s *F. verticillioides* i *F. proliferatum* pri čemu je BEA dokazan u 100% uzoraka u koncentracijama od 5-10 mg/kg. Niže koncentracije BEA (0,1-3 mg/kg) nađene su u kukuruzu iz SAD-a (Iowa) koji je bio kontaminiran s navedene tri vrste fuzarija. U Transkeji (Afrika) BEA je dokazan u 100% uzoraka kukuruza, koji je bio inficiran s *F.*

proliferatum, *F. subglutinans* i *F. globosum*, u koncentracijama od 0,008 do 1,7 mg/kg. *Fusarium avenaceum* je dominantno izolirana (91%) iz pšenice u Finskoj, a BEA je detektiran u 100% uzoraka u koncentracijama od 0,64 do 3,5 mg/kg (Logrieco i sur., 2002). Kako su *F. proliferatum*, *F. subglutinans* i *F. verticilliodes*, kao najčešći kontaminanti kukuruza posebice u području mediteranske klime, značajni producenti drugih mikotoksina (fumonizini, moniliformin, fusaproliferin), za očekivati je njihovo istodobno pojavljivanje u takovoj hrani. O tome svjedoče nedavna istraživanja provedena u Italiji i Hrvatskoj. U neobranom kukuruzu sa Sardinije i drugih lokaliteta u Italiji dokazano je istodobno pojavljivanje BEA, FB_1 i/ili moniliformina u koncentraciji do 520 mg/kg (Logrieco i sur., 2003). Posebice su zanimljivi rezultati dobiveni pretraživanjem ukupno 209 uzoraka kukuruza sakupljenih na 14 lokaliteta u Hrvatskoj, uključujući i područje endemske nefropatije. U 9% uzoraka kukuruza BEA je dokazan u rasponu koncentracija 0,013 do 1,9 mg/kg ($\bar{x}$ =0.393 mg/kg). Od toga je 53% na BEA pozitivnih uzoraka sakupljeno u nefropatičkom području ($\bar{x}$ =0,09 mg/kg). Šest posto od ukupnog broja uzoraka sadržavalo je BEA i FB_1+FB_2, dok je 2% uzoraka sadržavalo BEA, FB_1+FB_2 i okratoksin A, što je ujedno i prvo izvješće o istodobnom pojavljivanju ova tri mikotoksina u kukuruzu (Jurjević i sur., 1999; 2002). Ko-kontaminacija ovim mikotoksinima i njihov mogući sinergizam svakako upućuju na povećani mikotoksikološki rizik po zdravlje ljudi i životinja.

1.3. OKRATOKSIN A

Okratoksin A (OTA) je prvi puta izoliran 1965. godine kao stabilan sekundarni metabolit *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe i sur., 1965), koji je pokazao antibiotičko djelovanje. Do sada je tvorba OTA dokazana u većeg broja *A. ochraceus* srodnih aspergila uključujući *A. mauricatus*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum* i *A. sulphureus* (Frisvad i Samson, 2000), zatim u *A. carbonarius* (Teren i sur., 1996) i *A. niger* (Abarca i sur., 1994) te *Penicillium verrucosum* (=*viridicatum*) (Pitt, 1987). Ove su vrste česti kontaminanti uskladištenih žitarica, kukuruza, voća, kave, mahunarki, suhomesnatih proizvoda i krmiva gdje ovisno o mikroklimatskim uvjetima mogu tvoriti OTA i druge toksične sekundarne metabolite.

Okratoksin A je po kemijskoj strukturi 7-karboksi-5-klor 3,4-dihidro-3R-metil izokumarin, amidno vezan s L-fenilalaninom preko karboksilne skupine na položaju 7 kumarinske jezgre (*Slika IV*). Bezbojna je kristalična tvar (Mr= 403,82) koja pod UV svijetlom (366 nm) fluorescira plavo.



R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	METABOLITI
Fenilalanin	Cl	H	H	H	Okratoksin A
Fenilalanin	H	H	H	H	Okratoksin B
Fenilalanin-etil-ester	Cl	H	H	H	Okratoksin C
Fenilalanin-metil-ester	Cl	H	H	H	Okratoksin A metil ester
Fenilalanin-metil-ester	H	H	H	H	Okratoksin B metil ester
Fenilalanin-etil-ester	H	H	H	H	Okratoksin B etil ester
OH	Cl	H	H	H	Okratoksin α
OH	H	H	H	H	Okratoksin β
Fenilalanin	Cl	H	OH	H	4R- Hidroksiokratoksin A
Fenilalanin	Cl	OH	H	H	4S- Hidroksiokratoksin A
Fenilalanin	Cl	H	H	OH	10- Hidroksiokratoksin A

Slika IV Kemijska struktura okratoksina A i njegovih derivata

Zbog karboksilne skupine fenilalanina i fenolne skupine na dihidroizokumarinskom prstenu OTA ima slabo kiseli karakter te je u neutralnom mediju djelomično disociran (pK=7,1). Kao natrijeva sol otapa se u vodi, a kao kiselina umjereno je topljiv u polarnim organskim

otapalima i u vodenoj otopini natrij-bikarbonata. U metanolu i kloridnoj kiselini nastaje metil ester. Može se čuvati u etanolu godinu dana. Opisano je 11 derivata izokumarina koji se razlikuju prema radikalima na kumarinskoj jezgri i karbonilnoj skupini fenilalanina (Kuiper-Goodman i Scott, 1989). S obzirom na raširenost i biološku aktivnost, OTA je najznačajniji predstavnik izokumarinskih derivata. Okratoksin C pokazuje sličnu biološku aktivnost kao i OTA, ali je znatno manje rasprostranjen u prirodi, dok je OTB najmanje toksičan. Ostali srodni metaboliti OTA su detektirani u kulturama plijesni ili su produkti biotransformacije OTA.

1.3.1. METABOLIZAM I MEHANIZAM DJELOVANJA OKRATOKSINA A

U većine eksperimentalnih životinja OTA se najbolje apsorbira u proksimalnom dijelu jejunuma (Kumagai i sur., 1988). U svinja se iz gastrointestinalnog sustava apsorbira 66%, u štakora i kunića 56% te u peradi 40% OTA (Suzuki i sur., 1977; Galtier i sur., 1981). Intratrahealnom aplikacijom 50 ng OTA/g tj. t. u Wistar štakora utvrđena je dobra apsorpcija iz pluća pri čemu je bioraspoloživost OTA iznosila 98%, a vrijeme poluživota 127 h (Breitholtz-Emanuelsson i sur., 1995).

U krvi se OTA vezuje za proteine plazme i druge makromolekule (Galtier i sur., 1980; Fuchs i Hult, 1986). Pokazuje visoki afinitet prema plazmatskim proteinima relativne molekulske mase 20 000 čija je konstanta disocijacije $2{,}3 \times 10^{10}$/mol (u ljudi), odnosno $0{,}59 \times 10^{10}$/mol (u svinja). Zasićenost vezivnih mjesta nastaje pri koncentraciji 10-20 ng OTA/mL seruma. Slobodna frakcija OTA u ljudi i štakora je 0,02% i 0,1% svinja (Benford i sur., 2001). Nakon oralne aplikacije, maksimalna koncentracija OTA u plazmi postiže se za 10-48 h u svinja i štakora (Galtier i sur., 1979, 1981), a vrijeme poluživota je 72-120 h (svinje), odnosno 55-120 h (štakor). Općenito, raspodjela OTA u tkivima svinja, štakora, peradi i ovaca odvija se sljedećim redom: bubrezi > jetra > mišići > masno tkivo, odnosno bubrezi > mišići > jetra > masno tkivo (Benford i sur., 2001).

Ženke Sprague-Dawley štakora oralno su primale 50 μg OTA/kg tj. t., 5 puta tjedno tijekom 2 tjedna prije parenja, tijekom parenja i zatim 7 dana tijekom laktacije. Pri tom su koncentracije OTA u krvi i bubrezima mladunčadi bile tri do četiri puta veće nego u majki, a nakon osmog tjedna 60% od ukupne koncentracije OTA u plazmi detektirano je u mlijeku. Najveće koncentracije OTA u plazmi i bubrezima utvrđene su u mladunčadi koja je bila izložena OTA *in utero* i putem mlijeka (Hallen i sur., 1998).

U probavnom sustavu OTA se uz pomoć crijevne mikroflore, odnosno enzima karboksipeptidaze A i kimotripsina hidrolizira u netoksični OTα (Galtier, 1978; Pitout, 1969).

Oko 25 do 27% OTA, apliciranog intraperitonealno ili oralno u štakora, izlučuje se urinom kao OTα. Drugi manje zastupljeni metaboliti su 4-OH-OTA (4R i 4S) epimeri koji nastaju u bubregu djelovanjem citokroma P450. Epimer 4R-OH-OTA je manje toksičan od OTA, a nastaje u jetrenim mikrosomima čovjeka i štakora, dok je 4S-OH-OTA više zastupljen u jetrenim mikrosomima svinje (Stormer, 1981).

Nakon oralne aplikacije u štakora, OTA se uglavnom izlučuje urinom i fecesom kao OTα (25-27% i 9%), OTA (6% i 12 %) te kao 4R-OH-OTA (1-1,5%) (Storen i sur., 1982).

Okratoksin A inhibira biosintezu makromolekula (proteini, RNA, DNA) i ATP-a, povećava lipidnu peroksidaciju te negativno utječe na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija u biološkom sustavu (Braunberg i sur., 1992; Rahimtula i sur., 1988; Meisner i Meisner, 1981; Rahimtula i Chong 1991).

U prokariota, eukariota, sisavaca i većine eksperimentalnih životinja primarni mehanizam djelovanja OTA je inhibicija sinteze proteina zbog kompeticije s fenilalaninom u reakciji aminoacilacije fenilalanin-tRNAPhe (Creppyi sur., 1984). Iako je afinitet vezivanja fenilalanin-tRNAPhe sintetaze za OTA manji u odnosu na fenilalanin (K_m=0,28 mmol/L za OTA; K_m=6 μmol/L za fenilalanin), inhibicija ovog enzima je jače izražena zbog povećanog koncentriranja OTA u stanici (Roschenthaler i sur., 1984). U hepatocitima štakora izloženih djelovanju OTA (0,12-1,4 mmol/L) zabilježena je inhibicija hidroksilacije fenilalanina u tirozin kao i inhibicija metabolizma tirozina (Creppy i sur., 1990). Osim toga, u bubregu štakora koji su u hrani primali 2 mg OTA/kg tj.t., aktivnost fosfoenolpiruvat karboksikinaze bila je smanjena za 50% pri čemu slične promjene nisu utvrđene u jetri (Meisner i Krogh, 1986). Obzirom da se OTA na neki način ponaša kao analog fenilalanina, kompetitivna inhibicija može se suzbiti povećanjem koncentracije ovog enzima. U miševa kojima je OTA apliciran intraperitonealno (0,8 mg), toksičnost i smrtnost ove doze je potpuno prevenirana istovremenom aplikacijom 1 mg fenilalanina (Creppy i sur., 1980).

Okratoksin A povećava NADPH i/ili askorbat ovisnu lipidnu peroksidaciju u jeternim mikrosomima štakora te NADPH ovisnu lipidnu peroksidaciju bubrežnih mikrosoma. Smatra se da OTA stimulira lipidnu peroksidaciju vezivanjem Fe^{3+} pri čemu se olakšava redukcija željeza. Naime, nastali kompleks OTA-Fe^{3+} reagira s kisikom te nastaju reaktivni radikali koji najčešće reagiraju s nezasićenim masnim kiselinama (Rahimtula i sur., 1988; Omar i sur., 1990). Nefrotoksični učinci OTA tj. povećana lipidna peroksidacija može se znatno umanjiti tretiranjem sa superoksid dizmutazom i katalazom. U štakora tretiranih s 20 mg ovih enzima/kg tj.t. i 290 μg OTA/kg tj. t. zabilježeno je smanjenje enzimurije, proteinurije i kreatinemije te povećanje urinarnog izlučivanja OTA (Baudrimont i sur., 1994).

1.3.2. TOKSIČNI UČINCI OKRATOKSINA A *IN VITRO*

Nefrotoksično, neurotoksično, imunotoksično, citotoksično i genotoksično djelovanje OTA izučavano je u nekoliko adekvatnih staničnih kultura.

U primarnoj kulturi proksimalnih tubula Wistar štakora tretiranih s OTA (0,1-10 μM) tijekom 24-72 sata, zabilježen je ubrzani rast stanica te smanjena sinteza DNA uslijed velike gustoće stanica. Poremećaj transepitelnog transporta elektrolita bio je uzrokovan maksimalnom koncentracijom OTA (10 μM). Toksični učinci OTA bili su umanjeni dodatkom albumina ili acidifikacijom medija. Nanomolarne koncentracije OTA stimuliraju proliferaciju stanica bez vidljivog toksičnog učinka što je vjerojatno povezano s promjenama staničnog pH (Gekle i sur., 1995). Transportni sustavi organskih aniona utječu na prijenos i akumulaciju OTA, odnosno na njegovo nefrotoksično djelovanje. Nefrotoksičnost i akumulacija OTA (1-70 nM) izučavana je u primarnoj kulturi proksimalnih tubula kunića. Akumulacija OTA bila je potpuno inhibirana aplikacijom 2 mM probenecida (inhibitor transportnog sustava organskih aniona), dok je *para*-aminohipurat inhibirao akumulaciju OTA za 40-50% pri koncentraciji 2,5 mM, što znači da na akumulaciju OTA u stanici utječu i neki drugi mehanizmi. Utvrđeno je da transporter masnih kiselina može pridonijeti akumulaciji OTA u stanici, poglavito u peritubularnoj membrani (Groves i sur., 1998). Okratoksin A inhibira sintezu proteina i uzrokuje nekrozu bubrežnih Vero-stanica (epitelne stanice bubrega zelenog majmuna). Nefrotoksično djelovanje OTA može se umanjiti dodatkom aspartama. Naime, aplikacijom 250 μM asparatma došlo je do povećanja IC_{50} sinteze proteina sa 14 μM na 22 μM. Inkubacijom stanica sa aspartamom 24 sata prije tretiranja s OTA, IC_{50} se povećala na 34 μM. Visoke koncentracije aspartama mogu umanjiti nefrotoksično djelovanje OTA sprječavajući inhibiciju sinteze proteina (Baudrimont i sur., 1997). Okratoksin A uzrokuje apoptozu humanih stanica proksimalnih tubula bubrega (IHKE) ovisno o vremenu izloženosti i koncentraciji. Značajno povećanje aktivnosti kaspaze-3 uočeno je pri koncentraciji od 5 nM nakon 7 dana te pri 10 nM tijekom 24-72 sata izloženosti. Fragmentacija DNA i kondenzacija kromatina uočena je pri 30-100 nM. Mehanizam apoptoze nije uključivao stvaranje slobodnih radikala i poremećaj homeostaze kalcija. Međutim, nanomolarne koncentracije OTA narušavaju homeostazu kalcija dovodeći do hiperpolarizacije mitohondrijske membrane, povećanja razine staničnog ATP-a i snižavanja staničnog pH (Eder i sur., 2000). Ove stanice su se pokazale osjetljivije na niske koncentracije OTA u odnosu na epitelne stanice bubrega psa MDCK-C11 (umetnute stanice distalnih tubula i sabirnih kanalića) i MDCK-C7 (glavne stanice distalnih tubula i sabirnih kanalića) (Schwerdt i sur., 1999). U spomenutim staničnim linijama MDCK utvrđeno je da C-Jun N-terminal kinaze igraju ulogu u apoptozi i

teratogenezi izazvanoj djelovanjem OTA. Koncentracije od 10 nM, 100 nM i 1 μM stimuliraju C-Jun N-terminal kinazu 1 u MDCK-C7. Povećana aktivnost kaspaze-3 i DNA fragmentacija je zabilježena pri 100 nM, ali nekroza tj. otpuštanje LDH iz citosola nije uslijedilo. Stanice MDCK-C11 su se pokazale otpornije na apoptotičko djelovanje OTA, odnosno povećana aktivnost kaspaze-3 zabilježena je pri koncentraciji od 300 nM. Međutim, otpuštanje LDH je bilo proporcionalno DNA fragmentaciji što upućuje na zaključak da OTA primarno uzrokuje nekrozu MDCK-C11 stanica. Osim toga, OTA (0,1-0,5 μM) potencira proapoptotičko djelovanje TNFα ovisno o koncentraciji što je također više izraženo u MDCK-C7 (Gekle i sur., 2000). Inhibicija mitohondrija tj. respiratornog lanca i ATP-sintaze te snižavanje izvan staničnog i unutar staničnog pH potencira apoptotičko djelovanje nanomolarnih koncentracija OTA što se očituje povećanom aktivnošću kaspaze-3 u MDCK-C7 stanicama. Ova saznanja upućuju na zaključak da mijenjanje fiziološkog pH u stanicama sabirnih kanalića može potencirati toksično djelovanje OTA (Schwerdt i sur., 2004).

Neurotoksično djelovanje OTA dokazano je u primarnoj kulturi neurona i astrocita štakora pri čemu je utvrđena inhibicija sinteze proteina i DNA (IC_{50}=14-69 μM), povećano otpuštanje LDH i lipidna peroksidacija (Bruinink i sur., 1998). U staničnoj kulturi humanih limfocita OTA (6,4-12 μM) inhibira sintezu DNA i proteina u kasnoj fazi aktivacije limfocita (Stromer i Lea, 1995). Imunosupresivni učinak OTA zabilježen je i u kulturi monocita periferne goveđe krvi (ID_{50}=0.1-4 μg/mL). Koncentracije od 3 do 4 μg/mL OTA induciraju apoptozu i citotoksičnost u humanih leukemija stanica (HL-60) (Ueno i sur., 1995).

Ispitivanjem genotoksičnosti OTA *in vitro* različitim metodama dobiveni su oprečni rezultati što vjerojatno ovisi o tipu stanične kulture, osjetljivosti metode i primijenjenim koncentracijama OTA. Ames-ovim testom na standardnim sojevima *Salmonella typhimurium* OTA (1-600 μg/ploča) nije pokazao mutageni učinak (NTP, 1989, Zepnik i sur., 2001). Međutim, aplikacijom medija u kojem su hepatociti štakora bili izloženi OTA, došlo je do aktivacije mutacija u *S. typhimurium* TA 1535, 1538 i 100 (Henning i sur., 1991). Genotoksični učinci OTA dokazani su u kulturi humanih urotelijalnih stanica u koncentraciji 0,005-0,05 μM i 10-2000 nM testom neplanirane DNA-sinteze, dok u primarnim hepatocitima štakora nije dokazan mutageni učinak OTA u koncentraciji do 500 μg/mL (Bendele i sur., 1985a). Indukcija izmjene sestrinskih kromatida i kromosomskih aberacija zabilježena je u kulturi humanih limfocita pri 4,5 μg/mL nakon 48 sati inkubacije (Manolova i sur., 1990; Henning i sur., 1991).

1.3.3. TOKSIČNI UČINCI OKRATOKSINA A *IN VIVO*

Okratoksin A je nefrotoksičan za sve ispitane monogastrične sisavce (Kuiper-Goodman i Scott, 1989). Testovima akutne toksičnosti određene su vrijednosti LD_{50} za OTA koji je primjenjen oralno, intraperitonealno ili intravenski u nekih životinjskih vrsta (*Tablica II*) (Benford i sur., 2001).

Tablica II *Vrijednosti LD_{50} za OTA u različitih životinjskih vrsta*

vrsta	LD_{50} (mg/kg tj.t.)		
	oralno	intraperitonealno	intravenski
miš	46-58	22-40	26-34
štakor	20-30	13	13
štakor (neonatalno)	3,9		
pas	0.2		
svinja	1		
pilići	3,3		

1.3.3.1. NEFROTOKSIČNOST I HEPATOTOKSIČNOST

Specifičan nefrotoksični učinak OTA je poremećaj u sustavu transporta organskih aniona, lokaliziranom u četkastoj i bazolateralnoj membrani zavijenih proksimalnih tubula (Friis i sur., 1988). Srednji (S2) i terminalni (S3) segment proksimalnih tubula su najosjetljivija mjesta toksičnog djelovanja OTA (0,05 μM), gdje je utvrđeno značajno smanjenje razine staničnog ATP-a ovisno o dozi apliciranog toksina (Jung i Endou, 1989). U štakora je subkutanom (10 mg OTA/kg tj.t. tijekom 5 dana) i oralnom aplikacijom (0,14 mg OTA/kg tj.t. svakih 48 sati tijekom 8-12 tjedana) utvrđeno značajno smanjenje aktivnosti enzima LDH, alkalne fosfataze (ALP), GGT i leucin aminopeptidaze u bubregu te istovremeno povećanje aktivnosti ovih enzima u urinu, što upućuje na oštećenje zavijenih proksimalnih tubula (Ngaha, 1985; Kane i sur., 1986). Okratoksin A narušava pH homeostazu u mužjaka Wistar štakora (1,2 μmol OTA/kg tj.t. dnevno i.v.) dovodeći do promjene acido-bazne ravnoteže (Kuramochi i sur., 1997). Osim toga OTA (0,8 mg/kg tj.t. svakih 72 sata tijekom 30 dana) dovodi do degeneracije intersticijskih stanica, kariomegalije i apoptoze stanica tubularnog epitela (Maaroufi i sur., 1999). Apoptotički procesi, oštećenja stanica proksimalnih i distalnih tubula bubrega uslijed oksidacijskog stresa izazvanog djelovanjem OTA, zabilježeni su u Wistar štakora. Životinje su tijekom 10, 30 i 60 dana tretirane s OTA u koncentraciji 120 μg/kg tj.t. Broj stanica u apoptozi je porastao za 5, 6,4 i 12,7 puta u životinja koje su primale OTA tijekom 10, 30 i 60 dana u odnosu na kontrolnu skupinu. Istovremeno, DNA-elektroforezom nije utvrđena DNA fragmentacija. Koncentracije lipidnih peroksida su

značajno porasle u bubrežnom tkivu (36%), dok je katalitička aktivnost superoksid dizmutaze bila smanjena (26%) u skupini tretiranoj 60 dana. Ovi rezultati ukazuju na povećanje prooksidacijskih nasuprot antioksidacijskim događajima u stanici pri čemu nije zabilježena promjena ukupnog antioksidativnog statusa u bubregu tretiranih skupina (Petrik i sur., 2003). Okratoksin A (289 μg/kg) inducira značajne histopatološke promjene u jetri (degeneracija i nekroza hepatocita, proliferacija stanica žućovoda, inflamatorna infiltracija) i bubrezima (tubulrna nekroza i kariomegalija, infiltracija limfocita u tubulima i glomerulu). Tretiranje s melatoninom (10 μg/kg) značajno smanjuje toksične učinke OTA u jetri i bubrezima (Aydin i sur., 2003). U ženki SPFWag štakora starosti 12 tjedana i 27-30 mjeseci, tretiranih s OTA (0,07, 0,34 i 1,68 mg/kg tj.t. tijekom 4 tjedna), zabilježeni su nefrotoksični učinci ovisno o starosti životinja. Starije štakorice su razvile tubularnu kariomegaliju i nekrozu, dok je kod mladih ženki zapaženo zadebljanje bazalne membrane i redukcija T-limfocita (Dortant i sur., 2001). U svinja koje su u hrani primale 0,2-1 mg OTA/kg hrane zabilježeno je smanjenje aktivnosti fosfoenolpiruvat karboksikinaze i GGT, smanjeno izlučivanje PAH/klirens inulina i povećanje izlučivanja glukoze što ukazuje na redukciju funkcije bubrega (Meisner i Krogh, 1986; Krogh i sur., 1988). Okratoskin A je dokazan u 100% uzoraka seruma svinja (od 48,34 ± 6,7 do 84,2 ± 41,17 ng/mL), koje su pokazivale simptome nefropatije uključujući disfunkciju proksimalnih tubula (povećane koncentracije glukoze i proteina u urinu, povećane koncentracije ureje i kreatinina te smanjene koncentracije glukoze i proteina u krvi). Također je zabilježeno povećanje koncentracije kalija, natrija, aspartat aminotransferaze (ASAT), GLDH, GGT i leucin aminopeptidaze. Histološkom pretragom epitelnih stanica proksimalnih tubula utvrđena su oštećenja stanične i mitohondrijske membrane, smanjenje broja mitohondrija, kondenzacija kromatina i gubitak integriteta jezgrine ovojnice (Stoev, 1997; Stoev i sur., 1998).

1.3.3.2. NEUROTOKSIČNOST I IMUNOTOKSIČNOST

Prva izvješća o neurotoksičnom učinku OTA (0,5-5 mg/kg hrane) opisuju piknozu ganglijskih stanica u pilića pri čemu i zabilježen patuljasti rast, hepatotoksikoza te povećanje obujma bubrega (Pepeljnjak i sur., 1982). U Fischer štakora OTA (120 μg/kg tj.t. dnevno tijekom 10, 20 i 35 dana) uzrokuje značajno povećanje GGT u tri regije mozga, pri čemu se aktivnost enzima vratila na normalne vrijednosti nakon tridesetpetog dana pokusa (Žanić-Grubišić i sur., 1996). S druge strane, OTA (290 μg/kg tj.t. dnevno tijekom 1-6 tjedana) je pokazao citotoksično djelovanje na nekoliko regija mozga (ventralni mezencefalon, hipokampus i cerebelum) Wistar štakora, pri čemu je zabilježena akumulacija OTA u mozgu (oko 100 ng/g mozga nakon 6 tjedana) (Belmadani i sur., 1998).

U BALB/c miševa OTA (1-400 μg/kg tj.t. dnevno 28-90 dana) djeluje imunotoksično što se manifestra redukcijom broja stanica slezene (oko 20%) i negativno utječe na kasnu fazu diferencijacije T-stanica (Thuvander i sur., 1995). Redukcija broja limfocita nije zabilježena. S druge strane, utvrđeno je da OTA (3-6 mg/kg t.t. dnevno) uzrokuje limfopeniju, neutrofiliju, eozinofiliju i smanjuje titar IgM u Han-NMRI miševa (Müller i sur., 1995), dok u pilića (0,5-2 mg OTA/kg hrane/21 dan) smanjuje broj limfocita, težinu timusa, Fabricijeve burze i slezene (Singh i sur., 1990). Redukcija broj T-limfocita i smanjenja fagocitna aktivnost makrofaga zabilježeni su u Wistar štakora tretiranih s OTA u koncentraciji od 50 i 450 μg/kg tj.t. (Alvarez i sur., 2004). Okratoksin A (5-50 μg/kg tj.t. dnevno tijekom 28-34 dana) smanjuje indeks fagocitoze i značajno potencira eksperimentalno izazvanu pneumoniju u svinja (Müller i sur., 1999a). Koncentracija od 2,5 mg OTA/kg hrane reducira fagocitnu aktivnsot makrofaga i tvorbu interleukina 2 (IL-2) (Harvey i sur., 1992). U svinja hranjenih krmivom (kontaminirano s *A. ochraceus*), koje je sadržavalo 1-3 mg OTA/kg zabilježena je povećana učestalost *Salmonella choleraesuis* infekcija pri čemu su bakterije dokazane u jetri i stolici životinja. Istovremeno, davanjem OTA u hrani (1 mg/kg) i imunizacijom na *S. choleraesuis* u životinja je uočena hemoragična dijareja što ukazuje na imunosupresiju i odgađanje imunizacije uslijed djelovanja OTA (Stoev i sur., 2000).

1.3.3.3. TERATOGENOST, GENOTOKSIČNOST I KARCINOGENOST

Okratoksin A uzrokuje malformacije kostura, pluća i bubrega (20-40% fetusa) aplikacijom 1 mg/kg tj.t. dnevno štakoricama od šestog do petnaestog dana gestacijskog perioda. Tretiranjem s 43 mg metionina/kg tj.t. značajno se umanjuje teratogeni učinak OTA (Abdel-Wahhab i sur., 1999).

Kromosomske aberacije zabilježene su u miševa tretiranih s 1 μg OTA/kg tj.t. dnevno tijekom 45 dana. U BALB/c miševa tretiranih s 2500 μg OTA/kg tj.t. zapažena su oštećenja DNA u stanicama slezene, bubrega i jetre nakon 24, 48 ili 72 sata izloženosti toksinu (Creppy i sur., 1985). Oštećenja DNA su također zabilježena u Wistar štakora koji su intubacijom primili niže koncentracije OTA (290 μg/kg tj.t. svakih 48 sati), kroz dulje vrijeme (6-12 tjedana) (Kane i sur., 1986). Nakon 8-satnog tretiranja s OTA, u bubregu, jetri i slezeni miševa je zabilježeno stvaranje DNA adukata koji su se zadržali više od 16 dana u bubregu, a 5 dana u jetri i slezeni, nakon čega je uslijedio mehanizam popravka. Slični poremećaji su zapaženi u tumorskim stanicama bubrega i mjehura ljudi (Pfohl-Leszkowicz i sur., 1991, 2002).

Karcinogeni učinak OTA dokazan je u mužjaka B6C3F1 miševa. Pedeset mužjaka i ženki su tijekom dvije godine u hrani primali OTA (1-40 μg/kg). U mužjaka je razvijen bubrežni karcinom (14/49 jedinki) i adenom (26/49), a nefropatija je zabilježena kod svih tretiranih

jedinki. Suprotno k tome, kod malog broja ženki je utvrđena nefropatija, dok karcinom i adenom nije zabilježen. Uz to su kod oba spola zabilježene neoplazmatske hepatocelularne promjene (Bendele i sur., 1985b). Slični rezultati su dobiveni u 2-godišnjoj studiji karcinogeneze na F344N štakorima koji su tretirani s 210, 70 i 21 mg OTA/kg tj. t. Koncentracije od 210 i 70 mg/kg tj.t. prouzročile su tubularni adenom i karcinom u 72% i 39% mužjaka te 16% i 4% ženki. U svih životinja zapažena je hiperplazija, proliferacija i kariomegalija. Tretiranjem ženki miševa s OTA od devetog dana gestacijskog perioda dokazno je stvaranje DNA adukata u fetusa i mladunčadi. Neke od životinja su dvije godine kasnije razvile bubrežni karcinom (Pfohl-Leszkowicz i sur., 2002). Ovim dugoročnim studijama dokazan je karcinogeni učinak OTA u štakora i miševa pri čemu su se mužjaci obje vrste pokazali osjetljivijima. Indukcija tumora bubrega u štakora korelira s brojem stvorenih DNA adukata tretiranjem životinja s nižim koncentracijama OTA (0,4 mg/kg tj.t.). Ove promjene dovode se u vezu s oksidacijskim stresom koji uzrokuje OTA jer primjena antioksidansa sprječava nastajanje oštećenja DNA u miševa tretiranih toksinom (Castegnaro i sur., 1998; Grosse i sur., 1997). Gautier i sur. (2001) su izvjestili da OTA (1 mg/kg) smanjuje koncentraciju α-tokoferola u plazmi štakora, a 5 puta povećava ekspresiju hem oksigenaze 1 proteina (marker oksidacijskog stresa) u bubregu. Ova istraživanja pokazuju da OTA inducira oksidacijski stres što može pridonijeti nefrotoksičnom i karcinogenom djelovanju u eksperimentalnih životinja. Mehanizam nefrotoksičnog i karcinogenog djelovanja OTA najvjerojatnije uključuje stvaranje slobodnih radikala, na što ukazuje o činjenica da se stvaranje DNA adukata u bubregu miša može inhibirati davanjem superoksid dizmutaze i katalze prije same aplikacije OTA (Pfohl-Leszkowicz i sur., 1993).
Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (IARC) klasificira OTA kao 2B karcinogen (IARC, 1993).

1.3.4. IZLOŽENOST LJUDI OKRATOKSINU A

Pedesetih godina 20 st. zamijećena je pojava bolesti poznate pod nazivom Balkanska endemska nefropatija (BEN) tj. endemska nefropatija (EN), a ista je zabilježena u nekoliko regija uz velike rijeke na području Hrvatske (Slavonski Brod i okolica), Bosne i Hercegovine, Srbije i Crne Gore, Rumunjske i Bugarske. Endemska nefropatija je kronična tubulointersticijska nefropatija s visokim stupnjem smrtnosti, koja se javlja među seoskim stanovništvom (učestalije u žena) navedenih područja. Jamačno je da ova bolest predstavlja zdravstveni i socijalno-ekonomski problem. Osim toga, u endemičnom području zabilježena je veća učestalost tumora bubrežne nakapnice i mokraćovoda (UTT). Do danas je iznesen

veliki broj pretpostavki o etiologiji bolesti među kojima važno mjesto zauzima okratoksin A (Čeović i sur., 1992; Ožegović i Pepeljnjak, 1995). Naime, na temelju sličnosti nefropatoloških promjena u ljudi koji boluju od EN i svinja tretiranih s OTA, pretpostavlja se da OTA zasigurno igra važnu ulogu u etiologiji EN. Zapažene patološke promjene uključuju smanjenje funkcije glomerula i proksimalnih tubula, hijalinizaciju glomerula, atrofiju tubula te zadebljanje bazalne membrane. Hult i sur (1982) su izvijestili da 7% uzoraka krvi ljudi s područja EN sadrži OTA, s najvećom koncentracijom od 40 ng/mL. U razdoblju od 1981-1989 godine OTA je dokazan u 1,4% uzoraka krvi (od ukupno 1379) ljudi iz endemičnog područja, u rasponu koncentracija 5-50 ng/mL tijekom svih godina ispitivanja. U ljudi iz ne-EN područja OTA je detektiran u 2,5% uzoraka (od ukupno 1824), u istom rasponu koncentracija ali samo u razdoblju od 1981. do 1985., dok tijekom preostalih godina istraživanja (ukupno 1554 uzoraka) OTA nije pronađen (Fuchs i sur., 1991). Tijekom 10-godišnje studije (1985-1994) koja je provedena u EN-selima u srednjoj Posavini i ne-EN područjima Hrvatske, dobiveni su slični rezultati (Radić i sur., 1997). Učestalost OTA u serumu ljudi s EN-područja bila je 0,2-4,5% (od 4343 uzoraka), u koncentracijama 2-50 ng/mL te 0,4-2,4% (od 2566 uzoraka), u serumu stanovnika ne-EN područja (2-10 ng/mL). Istovremeno je u Bugarskoj (1983-1990) OTA dokazan u krvi ljudi oboljelih od EN ili UTT (166 uzorka) i to u 23,3-26,3% (> 1 ng/mL), 13,3-16,7% (1-2 ng/mL) te 10-12,5% (> 2 ng/mL). U zdravih osoba s područja EN i iz ne-EN OTA je dokazan u istom rasponu koncentracija ali s nižom učestalošću (3-11% i 1,5-7,7%) (Castegnaro i sur., 1991; Petkova-Boharova i sur., 1991). Zadnjih godina ispitivana je učestalost OTA u krvi opće populacije u 5 najvećih Hrvatskih gradova (Rijeka, Split, Osijek, Varaždin i Zagreb). Srednje koncentracije OTA u krvi iznosile su: 0,18 ng/mL (Rijeka), 0,25 ng/mL (Split), 0,26 ng/mL (Zagreb), 0,59 ng/mL (Varaždin) i 0,68 ng/mL (Osijek). Najveća učestalost OTA kao i maksimalne koncentracije (> 1 ng/mL) utvrđene su u krvi ljudi iz Osijeka. Ove su razlike vjerojatno povezane s različitim prehrambenim navikama ljudi koji žive u mediteranskom i kontinentalnom području Hrvatske. Na temelju ovih rezultata procijenjen je dnevni unos OTA od 0,4 ng/kg tj. t., što je znatno niže od podnošljivog dnevnog unosa koji propisuje WHO (16 ng/kg tj.t.) (Peraica i sur., 1999, 2001). Nedavnim istraživanjima u Tunisu dobiveni su slični rezultati. U serumu anefropatičnih osoba OTA je utvrđen s učestalošću 74,2%, 22,6% i 3,2%, u koncentracijama 0,1-0,5 ng/mL, 0,51-1 ng/mL i > 1 ng/mL. S druge strane, u nefropatičnih bolesnika OTA je dokazan u jednakim rasponima koncentracija, ali je učestalost najvećih koncentracija bila veća (14,9%), a učestalost najnižih koncentracija manja (59,5%) (Grosso i sur., 2003). Ovi podaci nisu u skladu s ranijim istraživanjima Maaroufi-a i sur (1995) kada su u 42% uzoraka seruma ljudi s područja EN dokazane izrazito visoke koncentracije OTA (1-

1136 ng/mL). Osim toga, nedavno su u Tunisu objavljena 3 slučaja kariomegalične nefropatije gdje je OTA dokazan u visokim koncentracijama u krvi (102,63 –1023 ng/mL) i urinu bolesnika (10,18-94,40 ng/mL). Smatra se da u ovim slučajevima veliku ulogu igra i genetička predispozicija jer je u bolesnika dokazan isti haplotip B27/35 (Hassen i sur., 2004).
Razlike u nalazima OTA u krvi populacije s EN i ne-EN područja povezane su prehrambenim navikama i varijabilnosti nalaza OTA u hrani (Peraica i sur., 2001), što varira od godine do godine, a ovisi o makro- i mikroklimatskim uvjetima koji mogu pogodovati rastu plijesni i tvorbi ovog mikotoksina.

1.3.5. UČESTALOST OKRATOKSINA A U HRANI

Pregled 30-godišnjih istraživanja raširenosti OTA u hrani na području ne-EN i EN u Hrvatskoj prikazan je u *Tablici III*. U ovom razdoblju najveća učestalost utvrđena je za OTA (16,5%) u rasponu koncentracija 0,01-68,9 mg/kg. Tijekom 1974-1981, što uključuje i izrazito vlažnu 1978/79 godinu (vlažnost zrna 45%), uzorci su u 80 % slučajeva bili kontaminirani plijesnima. Tada je OTA utvrđen u 32 % uzoraka s najvećom koncentracijom od 68,9 mg/kg koja je zabilježena 1978/79. U istom su razdoblju (1974-1981) na sadržaj OTA analizirani organi svinja s nefropatičnog i anefropatičnog područja. U životinja iz nefropatičnog područja OTA je utvrđen u 15,7% uzoraka krvi u koncentracijama 36-77 μg/L, u 10,4% uzoraka jetre (do 21,0 μg/kg), te u 10,4% uzoraka bubrega s rasponom koncentracija 16-77,0 μg/kg. U uzorcima organa svinja uzetih u anefropatičnim područjima, OTA nije utvrđen (Pepeljnjak i Cvetnić, 1985).
Izuzimajući «vlažnu» 1978/79 godinu, prosječne koncentracije OTA u razdoblju 1974-1992 iznosile su 0,77 mg/kg. U vrijeme Domovinskog rata, te tijekom poratnih godina do 1998, prosječne koncentracije OTA iznosile su 3,6 mg/kg što je u korelaciji s povećanom kontaminacijom kukuruza i žitarica plijesnima u tom razdoblju (Pepeljnjak i sur., 1999).

Tablica III Raširenost okratoksina A u hrani na području EN i non-EN u Hrvatskoj

RAZDOBLJE	PODRUČJE	UZORCI (N uzoraka)	%/min-max OTA (mg/kg)	LITERATURA
1975	ne-EN, EN	kukuruz (157+15)	25% 0,01-5,1 mg/kg 13% 0,650 mg/kg	Pepeljnjak i Šegvić (2004)
1975-76	ne-EN, EN	kukuruz (191)	26% 0,045-5,21 mg/kg	
1976-77	ne-EN, EN	žitarice (111)	16,1% 0,04-2,1 mg/kg	
1978-79	EN	žitarice (116)	56% 0,01-68,9 mg/kg	
1978-80	EN	suhomesnati pr. (206)	12-29% 0,01-0,92 mg/kg	
1980-81	EN	žitarice (126)	82% 0,01-4,7 mg/kg	
1980-83	EN	grah (1300)	8% 0,017-0,053 mg/kg	
1984-85	ne-EN	žitarice (46)	23,9 % 0,02-0,32	
1992-95	ne-EN	žitarice (234)	10 % 0,001-3,2 mg/kg	
1998-01	ne-EN	kukuruz (105)	8,5 % 0,01-1,4	
1998-01	EN	kukuruz (31)	16,1% 0,03-1,2	
1996/97	ne-EN	kukuruz (119)	16,8 % 0,00026-0,2236	Jurjević i sur., (1999)
1996/97	EN	kukuruz (82)	29 % 0,00029-0,6137	
2001-03	različita područja u RH	grah (45) kukuruz (49) bijelo vino (7) crno vino (7)	38% 0,25-0,92 μg/kg 39% 0,9-2,54 μg/kg 57% 15-22 ng/L 100% 12-47 ng/L	Domijan i sur., 2005a, 2005b, Domijan i Peraica, 2005

U Bugarskoj su u razdoblju od 1984. do 1991. analizirani uzorci graha i kukuruza, sakupljeni u EN i ne-EN područjima. Uzorci graha iz EN regije sadržavali su OTA u koncentracijama 61-260 μg/kg pri čemu je 37-53% uzoraka sadržavalo > 10 μg/kg. U kukuruzu iz ovih područja dokazane su znatno veće koncentracije (22-1200 μg/kg), a 47-70% uzoraka sadržavalo je > 25 μg/kg OTA. Uzorci sakupljeni u ne-EN regiji sadržavali su OTA u koncentracijama 5-285 μg/kg (grah) i 0-1400 μg/kg (kukuruz) ali je učestalost OTA-pozitivnih uzoraka s >10 μg/kg, odnosno >25 μg/kg bila znatno manja (8,2-28,6% i 3,1-20%) (Pfohl-Leskowicz i sur., 2002).

Prema rezultatima ispitivanja posljednjih nekoliko godina u Hrvatskoj se uočava tendencija smanjenja kontaminacije kukuruza ovim mikotoksinom vjerojatno zbog izrazito sušnih razdoblja. Tako su u grahu, kukuruzu i vinima iz različitih područja Hrvatske (*Tablica III*). dokazane znatno niže koncentracije od maksimalnih dozvoljenih koncentracija u sirovim žitricama (5 μg/kg) koje propisuje EU. Međutim, zbog dugog vremena poluživota OTA u ljudi (35 dana), unos niskih koncentracija OTA pridonosi duljem vremenu izloženosti, a time i mogućem toksičnom djelovanju ovog mikotoksina.

Svjetska zdravstvena organizacija (Benford i sur., 2001) je izdala detaljni prikaz istraživanja raširenosti OTA u hrani (pšenica, ječam, kukuruz, meso i mesne prerađevine, kava, sušeno voće, voćni sokovi, piva i vina) iz različitih zemalja svijeta (*Tablica IV*).

Tablica IV Raširenost okratoksina A u hrani

ZEMLJA	RAZDOBLJE	N uzoraka/N (OTA+)/SUPSTRAT	$\bar{x}$ / Max (μg/kg) OTA
Danska	1986-92	402/119/pšenica	0,7 / 51
		61/17/ječam	0,9 / 14
	1993-94	11/11/pržena kava	0,51 / 3,2
		76/64/svinjetina	0,11 / 1,3
		21/21/pivo	0,049 / 0,16
Italija	1992-99	186/162/crno vino	0,54 / 15,61
	1997-99	30/16/bijelo vino	0,16 / 8,86
	1999	61/30/uvezeno pivo	0,017 / 0,135
Njemačka	1995-98	35/14/pšenica	0,11 / 0,65
		22/19/ječam	0,07 / 0,49
		31/19/kukuruz	0,17 / 3,35
		240/105/pržena kava	0,45 / 6,32
		117/112/sušeno voće	0,9 / 7,74
		264/22/mlijeko i mliječni proiz.	0,01 / 0,86
		96/42/kobasice	0,02 / 0,27
		61/27/svinjski bubreg	0,43 / 9,33
		135/34/pivo	0,026 / 0,137
	1997-99	30/7 crno vino	0,022 / 0,23
		44/12/bijelo vino	0,012 / 1,36
SAD	1995-99	180/6/sirova kava	0,353 / 19,2
	1998-99	133/90/sušeno voće	1,27 / 29
Japan	1996	10/9/kava	0,028 / 0,133
Švedska	1996-98	132/55/pšenica	0,24 / 5,2
	1999	88/36/kava	0,4 / 12,1
Španjolska	1997	38/38/pržena kava	1,01 / 5,64
		40/39/pivo	0,024 / 0,075
Velika Britanija	1997-98	148/22/pšenica	0,3 / 9,2
		131/35/ječam	0,7 / 17,8
	1998	100/92/sušeno voće	3,42 / 25,1
		20/19/voćni sok	0,48 / 2,05
Francuska	1997-99	108/29/crno vino	0,061/0,78
Norveška	1998	35/5/pšenica	0,7 / 20
Nizozemska	1999	22/9/pržena kava	0,45 / 4,5
Brazil	2000	34/23/pržena kava	0,93 / 6,5

1.4. OŠTEĆENJA STANICE I STANIČNA SMRT

1.4.1. OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres nastaje kao posljedica poremećene ravnoteže između reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i antioksidanasa u stanici pri čemu ROS-ovi uzrokuju oštećenja staničnih makromolekula (proteina, DNA, lipida, ugljikohidrata), što dovodi do gubitka fluidnosti staničnih membrana, inaktivacije membranskih enzima, ubrzane proteolize, starenja, poremećaja prijenosa signala u stanici, malignih procesa i smrti stanice (Čepelak i Dodig, 2003). Reaktivne kisikove spojeve čine ne-radikali (vodikov peroksid; H_2O_2, hipokloritna kiselina; HOCl, molekularni kisik; O_2, hidroksil anion; HO^-) i radikali (hidroksil radikal; $HO^\bullet$, superoksid radikal; O_2^-, dušik oksid radikal: $NO^\bullet$) (Al-Omar i sur., 2004). Ovi spojevi nastaju enzimatskim rekacijama (NADPH-oksidaza, ksantin-oksidaza, citokrom P450, lipooksigenaza, ciklooksigenaza) i ne-enzimatski (redoks reakcije na membrani mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i jezgre, oksidacijom ksenobiotika, spontanom oksidacijom biološki aktivnih molekula) (Chiou i Tzeng, 2000; Rumora i sur., 2003).

Jednovalentnom redukcijom molekularnog kisika nastaje superoksid radikal, dok dvovalentnom redukcijom nastaje peroksid ion (O_2^{2-}), koji se u biološkom sustavu protonira u vodikov peroksid. Nastali vodikov peroksid može reagirati sa superoksid radikalom i ionima željeza/bakra (Haber-Weiss reakcija) pri čemu se stvara hidroksil radikal (Al-Omar i sur., 2004):

$$Fe(III)/Cu(II) + O_2^{2-} \longrightarrow Fe(II)/Cu(I) + O_2$$

$$Fe(II)/Cu(I) + H_2O_2 \longrightarrow HO^\bullet + HO^- + Fe(III)/Cu(II)$$

Vodikov peroksid može lako prijeći staničnu membranu u izvanstanični prostor gdje se u prisutnosti niskih koncentracija metalnih iona stvara hidroksil radikal Fenton-ovom reakcijom:

$$FE(II)/Cu(I) + H_2O_2 \longrightarrow HO^\bullet + HO^- + Fe(III)/Cu(II)$$

Hidroksil radikal je izrazito rektivan i smatra se odgovornim za oksidacijska oštećenja u stanici. Djeluje kao oksidans i reducens uzrokujući lipidnu peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina oduzimanjem vodika, odnosno reagira s purinskim bazama (gvanin) adicijom vodika. Specifičnom enzimatskom oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina nastaju prostaglandini i leukotrieni, dok nespecifična oksidacija vodi lipidnoj peroksidaciji (Kanner i

sur., 1987; Mello-Filho i Meneghini, 1984). Osim toga, kolesterol se oksidira za vrijeme lipidne peroksidacije te nastaje epoksid koji ima mutageno djelovanje (Date i sur., 2002). ROS-ovi su također odgovorni za peroksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) koji se akumuliraju u makrofagima što pokreće nekrozu ili apoptozu. Pri tom se iz makrofaga oslobađaju proteolitički enzimi i metalni ioni koji uzrokuju povećani oksidacijski stres okolnih stanica (Mandavilli i sur., 2000). Ne-kovalentne veze koje održavaju trodimenzionalnu strukturu proteina su slabe i podložne djelovanju ROS-ova pri čemu može doći do promjena u njihovoj strukturi i funkcionalnosti. Oksidirani proteini lako podliježu proteolizi (Sontakke i Tare, 2002). Dušične baze timin i gvanin su više podložni peroksidaciji za razliku od adenina i citozina. ROS-ovi mogu izazvati poremećaj u mehanizmu popravka DNA ekscizijom u kojem sudjeluju nukleaze. Osim toga, oštećenja DNA izazvana ROS-ovima uzrokuju kromosomske abnormalnosti (Al-Omar i sur., 2004). Ova oštećenja biomolekula uzrokuju poremećaj homeostaze što dovodi do nekroze stanice ili potiče apoptotičke procese.

1.4.2. NEKROZA

Nekroza je neplanirana stanična smrt izazvana ireverzibilnim oštećenjem stanice uslijed djelovanja različitih fizikalno-kemijskih agensa. Osnovna obilježja nekroze su: integritet stanične membrane nije sačuvan, bubrenje i liza stanice, bubrenje i oštećenje staničnih organela, smrt cijele skupine stanica, oslobođeni stanični sadržaj fagocitiraju makrofagi, nema potrošnje staničnog ATP-a i razvoj upalnog procesa (Petrik i sur., 2003). Procesi koji dominiraju tijekom nekroze su liza stanice i denaturacija proteina. Ukoliko je liza stanice izazvana enzimima koji potječu od mrtvih stanica riječ je o autolizi, a ako enzimi potječu od lizozima, leukocita ili bakterija riječ je o heterolizi.

1.4.3. APOPTOZA

Apoptoza je programirani oblik smrti stanice u kojem sudjeluje sama stanica provođenjem genetski programiranog slijeda biokemijskih i morfoloških promjena koje vode samouništenju. To je osnovni mehanizam kontrole broja stanica kojim se uspostavlja dinamička ravnoteža između njihove proliferacije i diferencijacije odnosno odumiranja. Ovaj visokooraginizarini i energetski zavisan proces kaskadnih reakcija zahvaća pojedinačne stanice ili manje skupine stanica pojedinog tkiva. Do apoptoze dolazi u fiziološkim uvjetima tijekom razvoja organizma te zbog patoloških procesa koje uzrokuju različiti fizikalno-

kemijski agenski uključujući i neke mikotoksine. U ranoj fazi apoptoze smanjuje se volumen stanice zbog gubitka iona kalija i klora te povećanja unutarstaničnog kalcija. Integritet stanične membrane je sačuvan iako može doći do odvajanja stanične membrane od citoskeleta. Elektronskim mikroskopom uočena je kondenzacija mitohondrija, dilatacija endoplazmatskog retikuluma, vakuolizacija citoplazme te marginalno nakupljanje kromatina. U kasnoj fazi apoptoze dolazi do fragmentacije stanice u apoptotička tjelešca koja sadrže kondenzirani kromatin i citoplazmatske organele. Obližnji makrofagi fagocitiraju apoptotička tjelešca te ne dolazi do upalnog odgovora zbog istjecanja sadržaja citosola u izvanstanični prostor, što je slučaj kod nekroze (Rumora i sur., 2003; Barišić i sur., 2003). Ponekad isti uzrok u nekom tkivu može dovesti do apoptoze i nekroze što ovisi o jačini i dugotrajnosti negativnog djelovanja (Žlender, 2003).

Čimbenici koji sudjeluju u programiranoj staničnoj smrti su članovi obitelji kaspaza, pro-apoptotički i anti-apoptotički članovi Bcl-2 obitelji proteina, Apaf-1 protein i proteinski inhibitori kaspaza (IAP).

Ključni enzimi apoptotičkog procesa koji djeluju kao inicijatori i izvršitelji apoptoze su kaspaze-unutarstanične cisteinske proteaze (cysteine-dependent aspartate-specific proteases). U sisavaca je opisano 14 članova porodice kaspaza (Denault i Salvesen, 2002). Kaspaze su u stanici prisutne kao neaktivni proenzimi (prokaspaze) koji se aktiviraju proteolitičkim kidanjem pri čemu redosljed njihove aktivacije ovisi o načinu pokretanja apoptoze (Petrik i sur., 2003). Prokaspaze-2, -8, -9 i -10 pripadaju inicijatorskim, a prokaspaze-3, -6, i -7 efektorskim kaspazama (Köhler i sur., 2002).

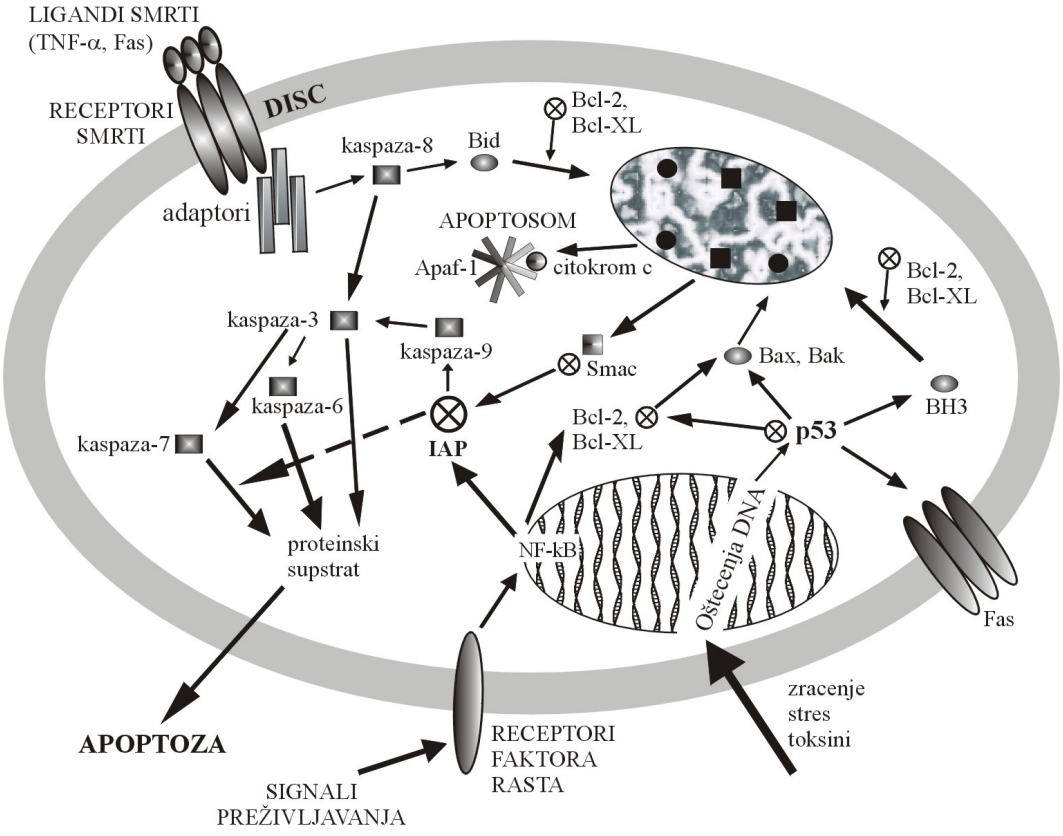
Obitelj Bcl-2 proteina čine pro-apoptotički i antiapoptotički članovi. U sisvaca je opisano 30-tak ovih proteina (Borner, 2003). U skupinu Bcl-2 anti-apoptotičkih proteina spadaju Bcl-XL, Bcl-w, A1 i Mcl-1. Pro-apoptotičku skupinu Bcl-2 članova čine Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 i Spike (Cory i Adams, 2002; Mund i sur., 2003). Prilikom otkazivanja supresorske aktivnosti anti-apoptotičkih članova može doći do pokretanja apoptoze. Proteini Bcl-2 imaju značajnu ulogu u regulaciji propusnosti za ione i citokrom c koji sudjeluju u aktivaciji apoptosoma.

Apaf-1 protein (apoptotic protease activating factor 1) čini jezgru kaspaza-aktivirajućeg kompleksa tj. apoptosoma. Djelovanjem citokroma c i dATP-a, Apaf-1 protein adaptira konformaciju u heptamer (oblik kotača)-apoptosom. Prokaspaza-9 vezuje se za unutrašnji dio «kotača» apoptosoma te se aktivira stvaranjem dimera koji aktivira efektorske kaspaze (Acehan i sur., 2002).

Inhibitore apoptoze čini porodica IAP proteina (inhibitors of apoptosis proteins). Članovi ove porodice mogu izravno inhibirati kaspaze-3, 7 i 9, što je od velike važnosti u regulaciji

procesa apoptoze s obzirom da je jednom pokrenuta kaskada kaspaza ireverzibilan proces (Salvesen i Duckett, 2002).

Opisana su tri mehanizma koji dovode do programirane stanične smrti; vezivanjem liganda smrti na površinske receptore stanice, unutrašnjim signalnim putevima u stanici i pokretanjem procesa pomoću reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Barišić i sur., 2003). Vezivanjem liganda smrti (TNF-α, Fas ligand) na receptore smrti aktivira se DISC (death inducing signaling complex), koji prosljeđuje signal vezivanjem za prokaspazu-8 (*Slika V*). Aktivirana kaspaza-8 pokreće kaskadu efektorskih kaspaza-3, 6 i 7 koje razgrađuju proteinski supstrat u stanici, što dovodi do morfoloških i biokemijskih promjena karakterističnih za apoptozu (Scaffidi i sur., 1998). Signal koji prosljeđuje DISC može se pojačati proteolitičkom aktivacijom pro-apoptotičkog proteina Bid koji pokreće apoptotički slijed u mitohondrijima. Pri tom se iz mitohondrija u citosol otpušta citokrom c koji sudjeluje u oblikovanju apoptosoma pomoću Apaf-1 i dATP-a (Acehan i sur., 2002). Stvoreni apoptosom aktivira inicjatorsku kaspazu-9 koja pokreće kaspazu-3. Mitohondrijski pro-apoptotički čimbenik Smac inhibira IAP što omogućava aktivaciju efektorskih kaspaza.



Slika V Apoptotički signalni putevi u stanici

Ekspresija IAP može biti potaknuta signalima preživljavanja preko receptora čimbenika rasta, odnosno aktivacijom transkripcije NF-kB čimbenika (Heckman i sur., 2002). Apoptotički proces može biti aktiviran signalima u stanici zbog oštećenja DNA izazvanog zračenjem,

lijekovima ili toksinima i stresom. U tom slučaju dolazi do aktivacije proteina p53 koji potiče ekspresiju pro-apoptotičkih Bcl-2 proteina, a potiskuje ekspresiju anti-apoptotičkih Bcl-2 i Bcl-XL. Protein p53 ima važnu ulogu u zaustavljanju rasta tumorskih stanica (Chene, 2003).

U većini slučajeva se apoptotički procesi u stanici pokreću zbog poremećaja unutrašnjeg membranskog potencijala ($\Delta\varphi$) i povećanja propusnosti mitohondrijske membrane što je često uzrokovano ROS-ovima. Pri tom dolazi do otpuštanja proteina npr. citokroma c, AIF (apotosis-inducing factor) i endonukleaze G. (Susin i sur., 1999; Li i sur., 2001). Osim otpuštanja ovih mitohondrijskih proteina koji sudjeluju u apoptozi, poremećaj membranskog potencijala i povećanje propusnosti mitohondrijske membrane dovodi do narušavanja homeostaze u stanici uključujući inhibiciju sinteze ATP-a, oksidaciju NADH, NADPH i glutationa te gomilanje ROS-va. Povećana razina ROS-ova uzrokuje oksidaciju lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Kroemer i Reed, 2000).

1.5. ANTIOKSIDANSI U STANICI

Kako bi se zaštitile od oksidacijskih oštećenja, stanice su razvile enzimatske i ne-enzimatske antioksidacijske mehanizme (*Tablica V*).

Tablica V *Enzimatski i ne-enzimatski antioksidacijski mehanizmi u stanici* (Halliwell i Gutteridge, 1999)

Antioksidansi	**Mehanizam djelovanja**
	Enzimatski
superoksid-dismutaza	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
glutation-peroksidaza	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$
katalaza	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
glutation-reduktaza	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
glutation-S-transferaza	metabolizam endogenog supstrata
	Ne-enzimatski
α-tokoferol (vitamin E)	inhibicija lipidne peroksidacije
askorbinska kiselina (vitamin C)	reducira ROS-ove, regeneracija vitamina E
reducirani glutation (GSH)	supstrat za glutation-peroksidazu; reducira ROS-ove
melatonin	reagira s H_2O_2 stvarajući manje reaktivne spojeve, stimulira enzimatske antioksidanse
kelatori metalnih iona (željezo/bakar)	inhibicija stvaranja hidroksil radikala

Superoksid-dismutaza (SOD) katalizira pretvorbu superoksid radikala u vodikov peroksid i molekularni kisik. Stvoreni vodikov peroksid se pretvara u vodu i kisik djelovanjem katalaze ili u vodu djelovanjem glutation-peroksidaze. Vitamini C i E i GSH uklanjaju ROS-ove reakcijama redukcije, a kelatori metalnih iona inhibiraju Haber-Weiss-ovu reakciju.

S obzirom na kratko vrijeme poluživota (nekoliko mikrosekundi) i visoku reaktivnost hidroksil radikala, ni jedan enzimatski sustav ne koristi ovaj oksidans kao supstrat (Rossi, 1986). Stoga su antioksidacijski mehanizmi u stanici usmjereni na inhibiciju stvaranja hidroksil radikala.

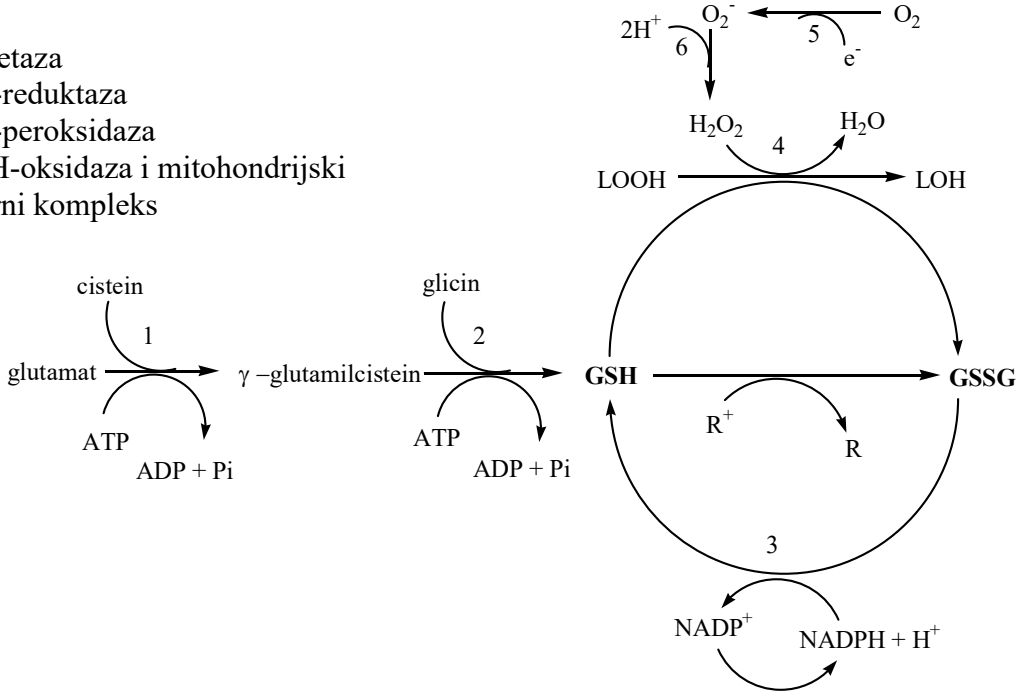
Sve skupine antioksidacijskih molekula su na specifičan način povezane s glutationom koji je količinski najzastupljeniji u stanici (Čepelak i Dodig, 2003).

1.5.1. GLUTATION

Glutation (γ-glutamilcisteinglicin; GSH) je dominantni niskomolekularni tiol (0,5-10 mmol/L) u životinjskim stanicama. Veći dio staničnog glutationa (85-90%) prisutan je u citosolu, dok se ostatak nalazi u mitohondrijima, jezgrinom matriksu i peroksizomima. Izvanstanične koncentracije GSH su relativno niske (2-20 μmol/L u plazmi). Zbog cisteinskih ostataka GSH se pomoću elektrofilnih supstancija (ROS) oksidira u glutation-disulfid (GSSG). Reducirani GSH i oksidirani GSSG čine ukupni stanični glutation čiji je omjer kod normalnih fizioloških stanja > 10, što ujedno određuje antioksidativni kapacitet stanice (Jones, 2002; Lu 2000; Griffith, 1999).

U stanicama se glutation sintetizira iz glutamata, cisteina i glicina djelovanjem citosolnih enzima γ-glutamilcistein-sintetaze (GCS) i GSH-sintetaze uz utrošak ATP-a:

1- GCS
2- GSH sintetaza
3- glutation-reduktaza
4- glutation-peroksidaza
5- NAD(P)H-oksidaza i mitohondrijski respiratorni kompleks
6- SOD



Glutation reducira stvorene perokside koji nastaju za vrijeme transporta kisika pri čemu se oksidira u GSSG. Glutation-reduktaza katalizira prevođenje GSSG u GSH uz NADPH kao izvor elektrona. Na ovaj način GSH se stvara u svim stanicama pri čemu je jetra glavni proizvođač i isporučitelj GSH (Griffith, 1999; Wu i sur., 2004).

Sinteza GSH primarno je regulirana GCS, raspoloživosti cisteina i GSH povratnom spregom (Wu i sur., 2004). Cistein nastaje iz esencijalne aminokiseline metionina razgradnjom proteina iz hrane ili pregradnjom endogenih proteina (Čepelak i Dodig, 2003). Cistein i glutamat dijele isti transporter. Kada je izvanstanična koncentracija glutamata visoka (karcinom, HIV-infekcija, medij staničnih kultura), raspoloživost cisteina je kompetitivno

inhibirana glutamatom što rezultira smanjenom GSH sintezom (Tapiero i sur., 2002). GSH je ne-alosterni inhibitor GCS pri čemu se GSH natječe s glutamatom za vezivno mjesto na enzimu. Kada je koncentracija glutamata u stanici visoka pojačava se sinteza GSH (Griffith, 1999).

Glutation igra značajnu ulogu u metabolizmu i regulaciji staničnih procesa te je najznačajniji antioksidans u stanici (*Tablica VI*).

Tablica VI *Uloga glutationa u staničnim procesima* (Wu i sur., 2004)

Antioksidativno djelovanje	**Metabolizam**	**Regulacija**
- «hvatač» slobodnih radikala i drugih ROS-ova - redukcija lipidnih peroksida - prevencija oksidacije biomolekula	- sinteza leukotriena i prostaglandina - pretvorba formaldehida u S-formil-glutation - tvorba D-laktata iz metilglioksala - tvorba merkapturata iz elektrofila (glutation-S-transferaza) - konjugiranje s NO u S-nitrozo-glutation -pohranjivanje i transport cisteina	- stanični redoks status - ekspresija gena - sinteza DNA, proteina i proteoliza - stanična proliferacija i apoptoza - tvorba citokina i imunološki odgovor - glutationilacija proteina (stabilizacija) - funkcija i integritet mitohondrija

Koncentracija glutationa se smanjuje djelovanjem različitih egzogenih «stresora» uključujući slobodne radikale u dimu cigarete, neke farmaceutske proizvode i halogenirane ugljikovodike Osim toga, manjak metionina, ionizirajuće zračenje, ishemija i reperfuzija, operacijski zahvati, septički šok, trauma, višak željeza u organizmu, alkohol, bakterijske i virusne infekcije te snažan fizički napor također pridonose smanjenju koncentracije staničnog glutationa (Čepelak i Dodig, 2003). Poremećaj omjera GSH/GSSG aktivira signalne molekule uključujući protein-kinazu B, protein-fosfatazu 1 i 2A, kalcineurin, NF-κB i C-Jun N-terminal kinazu što smanjuje proliferaciju i povećava apoptozu stanica (Sen, 2000).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kako su dosadašnja istraživanja bila uglavnom fokusirana na mehanizme djelovanja pojedinačnih mikotoksina, izučavanje interakcija FB_1 i OTA na staničnoj razini u procesima lipidne peroksidacije, smanjenja antioksidacijskog kapaciteta stanice te povećanja indeksa apoptoze, svakako bi moglo doprinijeti u razjašnjavanju uloge ovih mikotoksina u razvoju kroničnih bolesti uključujući i EN. Osim toga, toksični učinci BEA *in vitro* i *in vivo* su nedovoljno istraženi te nije poznat njegov genotoksični potencijal, ciljni organ djelovanja kao ni moguća uloga u razvoju kroničnih mikotoksikoza. Stoga bi izučavanje mehanizama djelovanja BEA bilo značajan doprinos poznavanju toksičnog i mutagenog potencijala ovog mikotoksina. Narušavanje homeostaze monovalentnih i divalentnih kationa u stanici, kao mehanizam nespecifičnog djelovanja BEA, moglo bi povećati toksičnost FB_1 i OTA.

Cilj istraživanja je na staničnoj razini utvrditi moguće interakcije niskih koncentracija FB_1, BEA i OTA s obzirom na istodobno pojavljivanje ovih mikotoksina u hrani kao i njihovu moguću ulogu u razvoju endemske nefropatije.

Biokemijski mehanizmi toksičnog djelovanja FB_1, BEA i OTA, morfološke promjene na stanicama kao i mutageni učinci, aplikacijom pojedinačnih toksina i u kombinaciji, ovisno o koncentraciji i vremenu, pratit će se *in vitro* na PK 15 stanicama (epitelne stanice bubrega svinje). Učinci toksina procijenit će se na temelju rezultata dobivenih:

1. praćenjem preživljavanja stanica te ispitivanjem integriteta stanične i mitohondrijske membrane,
2. određivanjem razine lipidne peroksidacije kao jednog od procesa koji mogu dovesti do oštećenja stanične i mitohondrijske membrane, slabljenja funkcije staničnih organela, odnosno ireverzibilnih oštećenja stanice,
3. praćenjem koncentracije staničnog glutationa čime će se odrediti antioksidacijski kapacitet stanice,
4. određivanjem stupanja apoptoze, odnosno djelovanje FB_1, BEA i OTA na aktivaciju kaspaze-3,
5. ispitivanjem genotoksičnog djelovanja navedenih mikotoksina pojedinačno i skupno na PK 15 staničnoj kulturi.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. KULTURA STANICA

Epitelne stanice bubrega svinje PK 15 (porcine kidney) (American Type Culture Collection, Rockville, Md USA) kultivirane su u hranjivom mediju DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) s dodatkom toplinski inaktiviranog fetalnog telećeg seruma (10%), 100 IU/mL penicilina, 100 μg/mL sterptomicina i 2,5 μg/mL amfotericina B, na 37°C u atmosferi CO_2 (5%). Za potrebe pokusa kultura stanica dobivena je sa Zavoda za mikrobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ljubaznošću prof. dr. sc. Josipa Madića.

Stanice su uzgajane u navedenom mediju u plastičnim TC (tissue culture) bocama (25 ili 75 cm^2), odnosno mikrotitar pločama do približno 80% konfluentnosti nakon čega su presađene, odnosno tretirane s mikotoksinima. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i megnezijevih iona (PBS, pH 7,4) i tretiraju s tripsinom (EDTA) te se resuspendiraju u novom mediju. Medij za kultiviranje stanica (DMEM) i tripsin (EDTA) pripravljani su u Imunološkom zavodu d.d. Zagreb.

3.2. MIKOTOKSINI

Fumonizin B_1 (FB_1), (Mr=721,83), čistoće 98%, iz *Fusarium moniliforme* (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim), otopljen je u sterilnoj destiliranoj vodi (matična otopina koncentracije 1 mg/mL).

Bovericin (BEA), (Mr=783,95), čistoće 99% (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim), otopljen je u apsolutnom etanolu (Kemika, Zagreb) (matična otopina koncentracije 1 mg/mL).

Okratoksin A (OTA), (Mr=403,81) iz *Aspergillus ochraceus* (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim), također je otopljen u apsolutnom etanolu (matična otopina koncentracije 1 mg/mL).

Iz matičnih otopina pripravljena su razrjeđenja te su stanice tretirane s navedenim mikotoksinima u koncentracijama 0,05 μg/mL, 0,5 μg/mL i 5 μg/mL tijekom 24 i 48 sati. Koncentracije izražene u μmol/L iznose: za FB_1 0,069, 0,69 i 6,9 μmol/L; za BEA 0,064, 0,64 i 6,4 μmol/L; za OTA 0,124, 1,24 i 12,4 μmol/L.

Mikotoksini su na staničnu kulturu aplicirani pojedinačno i u kombinaciji: FB_1, BEA, OTA, FB_1+BEA, FB_1+OTA, BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA.

Tijekom izvođenja pokusa, kontrolne stanice (K) su rasle u mediju s 0,3% etanola.

3.3. BOJENJE ŽIVIH I MRTVIH STANICA POMOĆU TRIPAN PLAVILA (TEST VIJABILNOSTI)

Tripan plavilo (Chemapol, Prag) se pripravlja miješanjem 0,4 g u 100 mL 0,81% otopine natrij-klorida i 0,06% otopine kalij-fosfata dibazičnog. Filtrira se kroz membranski filter u sterilnu bocu. Ova boja posjeduje veći afinitet za mrtve (obojene plavo) nego za žive (neobojene) stanice (Reynolds i Morton, 1998).

Postupak

1. Stanice su nasađene na mikrotitar ploče sa 12 polja (1 mL suspenzije stanica u mediju). Nakon 24 sata stanicama su aplicirani mikotoksini u određenim koncentracijama te su stanice inkubirane 24, odnosno 48 sati
2. Stanični medij se odvaja u kivete za centrifugiranje, a stanice se ispiru s PBS-om i tripsiniziraju te se zajedno sa prethodno odvojenim medijem centrifugiraju na 1500 rpm 2 min
3. Supernatant se odbaci a talogu stanica se doda 160 µl PBS-a i 40 µl tripan-plavila
4. Na hemocitometar se nanese 20 µl suspenzije stanica i prekrije pokrovnim stakalcem pri čemu se komorice napune pomoću kapilarnih sila
5. Prebroje se žive (neobojene) i mrtve (obojene plavo) stanice u svakom kvadratu hemocitometra te se vijabilnost (%) izračuna iz odnosa broja živih i ukupnih stanica

3.4. ODREĐIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI LAKTAT DEHIDROGENAZE (LDH)

Katalitička aktivnost LDH (E.C.1.1.1.27) određena je u mediju iznad stanica nakon 24 i 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu, metodom kontinuiranog mjerenja. LDH katalizira u prisutnosti $NADH_2$ redukciju piruvata u laktat pri čemu nastaje laktat i NAD. Smanjenje apsorbancije odgovara prijelazu reduciranog u oksidirani oblik koenzima:

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + \text{NAD}^+$$

Katalitička aktivnost LDH je određena pomoću komercijalnog test paketa (Herbos Dijagnostika d.o.o., Sisak, Hrvatska).

Uzeto je 80 μL uzorka i 1 mL reagensa te je nakon 60 sekundi izmjerena A_1 i nakon daljnjih 60 sekundi A_2, na valnoj duljini 365 nm pri 37^0C. Mjerenje je vršeno na spektrofotometru Cecil 9000 (Cecil Instruments Limited, Cambridge, UK).

Katalitička koncentracija LDH je izračunata prema formuli:

LDH (U/L) = ΔA/min x 8095

3.5. ODREĐIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI GLUTAMAT DEHIDROGENAZE (GLDH)

Katalitička aktivnost GLDH (E.C. 1.4.1.3) određena je u mediju iznad stanica nakon 24 i 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu, metodom kontinuiranog mjerenja.

Enzim katalizira reakciju prijenosa vodika u kojoj je ravnoteža pomaknuta u smjeru nastanka glutaminske kiseline i prijelaza $NADH_2$ u NAD. Smanjenje apsorbancije zbog prijelaza $NADH_2$ u NAD je mjera aktivnosti GLDH:

$$\text{2-oksoglutarna kiselina} + NADH + H^+ + NH_4^+ \xrightarrow[\text{GLDH}]{} \text{glutaminska kiselina} + NAD^+ + H_2O$$

Tijekom izvođenja pokusa korištene su slijedeće kemikalije:

Radni reagens: trietanolamin-pufer, pH 8,0 (50 mmol/L), EDTA (2,5 mmol/L), amonijev acetat (10 mmol/L), ADP (1 mmol/L), $NADH_2$ (0,2 mmol/L), LDH (2,0 U/L)

Supstrat: 2-oksoglutarat (7 mmol/L)

Postupak

1. Pomješa se 2 mL radnog reagensa, 0,8 mL uzorka i 0,1 mL supstrata
2. Reakcijska smjesa se ostavi 3 min na 30^0C te se izmjeri apsorbancija (A_1)
3. Nakon 5 min očita se A_2

Katalitička koncentracija GLDH se izračuna prema formuli:

GLDH (U/L) = (A_1-A_2) x 575,36

3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LIPIDNIH PEROKSIDA S TIOBARBITURATNOM KISELINOM

Zagrijavanjem uzorka, u kojem su prisutni produkti oksidacije lipida, s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) stvara se ružičasti kromogen s maksimumom absorbancije na 532 nm. Određivanje koncentracije lipidnih peroksida provedeno je modificiranom metodom prema Abel i Gelderblom (1998).

Tijekom izvođenja pokusa korištene su slijedeće kemikalije:
- tiobarbituratna kiselina (TBA) (Kemika, Zagreb)
- trikloroctena kiselina (TCA) (Kemika, Zagreb)
- 1,1,3,3-tetrametoksi-propan (TMP) (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim)
- butilirani hidroksitoluen (BHT) otopljen u acetonitrilu (0,5 mol/L) (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim)

Postupak

1. Stanice su nasađene na mikrotitar ploče sa 6 polja (2 mL suspenzije stanica u mediju ~ $5x10^7$ stanica/mL). Nakon 24 sata stanicama su aplicirani mikotoksini u određenim koncentracijama te su stanice inkubirane 24, odnosno 48 sati
2. Uklanjanje medija i ispiranje s PBS-om
3. Pomoću gumene strugalice napravi se suspenzija stanica u hladnom PBS-u (2 mL) uz dodatak BHT (10 μL/mL suspenzije stanica)
4. Homogenizacija na 1500 okretaja/min
5. U 0,5 mL suspenzije stanica doda se 0,5 mL reagensa koji se sastoji od TBA (0.67%) i TCA (20%) otopljenih u destiliranoj vodi
6. Miješanje uzoraka na miješalici Vibromix 114 (Tehtnica, Slovenija)
7. Reakcijska smjesa se inkubira na 90^0C tijekom 20 min

Nakon hlađenja reakcijske smjese izmjerena je apsorbancija kod 532 nm.
Rezultati se očitavaju iz baždarnog dijagrama. Za izradu baždarnog dijagrama korišten je TMP otopljen u apsolutnom etanolu, a razrjeđenja su pripremljena u destiliranoj vodi: 1,01, 1,21, 1,52, 3,03, 6,0, 15,17 i 30,35 μmol/L.
Apsolutna koncentracija TMP odgovara apsolutnoj koncentraciji tiobarbituratnih adukata (TBARS) koji odražavaju koncentraciju lipidnih peroksida u uzorku.
Koncentracija stvorenih TBARS izražena je u nmol/mg proteina.

3.6.1. ODREĐIVANJE PROTEINA

Proteini su određeni metodom po Bradford-u (1976). Metoda se temelji na pomicanju apsorpcijskog maksimuma Coomassie Brilliant Blue G-250 nakon njegovog vezanja na proteine (465-595 nm). Reakcija je vrlo brza (2 min), a obojeni kompleks ostaje dulje od jednog sata stabilan.

Za određivanje proteina u uzorku korištene su slijedeće kemikalije:
- Goveđi serum albumin (BSA) 98-99% čistoće, otopljen u destiliranoj vodi (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim): matična otopina koncentracije 20 mg/mL (radna otopina 1mg/mL)
- Coomassie Brilliant Blue G-250

Postupak

1. U 50 μL uzorka doda se 2,5 mL Coomassie Brilliant Blue
2. Miješanje uzoraka na miješalici
3. Stajanje 5 min na sobnoj temperaturi

Mjerenje apsorbancije vršeno ja na valnoj duljini 595 nm. Rezultati se očitaju iz baždarnog dijagrama. Za izradu baždarnog dijagrama korištene su slijedeće koncentracije BSA: 0,1, 0,25, 0,50, 0,75 i 1,00 mg/mL.

3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUTATIONA (GSH)

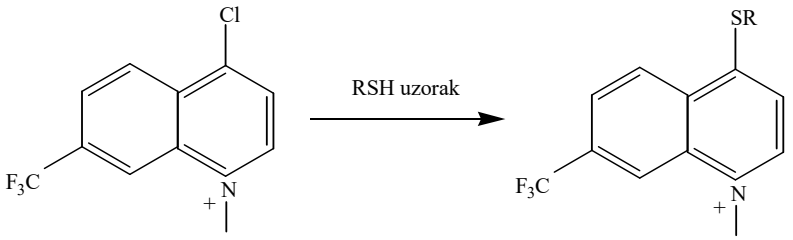
Glutation (γ-glutamilcisteinilglicin ili GSH) je tripeptid nukleofilnog i reducirajućeg potencijala koji sudjeluje u metabolizmu stanica aerobnih organizama. GSH je koenzim glutation peroksidaze, glutation S-transferaze i tiol transferaze. Sudjeluje u važnim reakcijama u stanici uključujući detoksifikaciju ksenobiotika, održavanje razine –SH proteina, izmjenu tiol-disulfida, uklanjanje hidroperoksida i slobodnih radikala te transport aminokiselina kroz staničnu membranu.

Za određivanje koncentracije staničnog glutationa korištene su slijedeće kemikalije:
- test paket Bioxytech® GSH-400 (OXISResearch, Portland, SAD) koji sadrži
  R1 (4-kloro-1-metil-7-triflurometil-qinolin metasulfat)
  R2 (30% NaOH)
  Pufer S3 (kalijev fosfat i dietilentriamin pentaoctena kiselina)

- reducirani glutation (GSH) čistoće >98% (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim)
- metafosforna kiselina (MPA) čistoće 33-37% Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim), 5% otopina u destiliranoj vodi

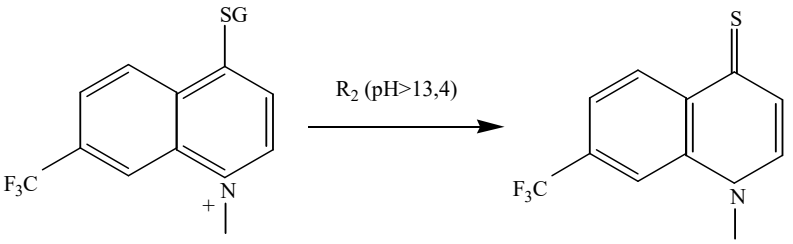
Reakcija se odvija u dva koraka:

1. Stvaranje tioetera



R_1 Tioeter

2. Reakcija β-eliminacije u alkalnoj sredini



GSH-tioeter Kromogeni tion (400 nm)

<u>Postupak:</u>

1. Stanice su nasađene na mikrotitar ploče sa 12 polja (1 mL suspenzije stanica u mediju). Nakon 24 sata stanicama su aplicirani mikotoksini u određenim koncentracijama te su stanice inkubirane 24, odnosno 48 sati
2. Uklanjanje medija i ispiranje s PBS-om (pH 7.4)
3. Dodati 100 µl otopine tripsin EDTA (2,5 g/L tripsina, 10 mmol/L EDTA)
4. Kad se stanice odlijepe dodati 500 µL PBS-a
5. Centrifugiranje na 800 g 5 min (4^0C)
6. Odliti supernatant
7. Preostalim stanicama dodati 500 µL 5% MPA (uzorci su stabilni 1 sat)
8. Homogenizacija sonikacijom 20 sek
9. Centrifugiranje na 3000 g 10 min (4^0C)
10. Uzeti 300 µL supernatanta (homogenat stanica koristi se za određivanje proteina)
11. Nadopuniti do 900 µL s S3

12. Dodati 50 µL R1
13. Miješanje na električnoj miješalici
14. Dodati 50 µL R2
15. Miješanje na električnoj miješalici
16. Inkubacija na 25±3^{0}C 10 min u mraku
17. Mjerenje apsorbancije na 400 nm

Koncentracija GSH (µmol/L) se izračuna pomoću molarnog ekstincijskog koeficijenta kod 400 nm prema formuli:

$$[GSH] = \{(A-A_0)/(\varepsilon \times I)\} \times D$$

$(A-A_0)$ - od izmjerene apsorbancije uzorka oduzima se apsorbancija slijepe probe
ε - molarni ekstincijski koeficijent (17400 $M^{-1}cm^{-1}$) kod 400 nm
I - optički put (1 cm)
D – faktor razrjeđenja uzorka

Koncentracija GSH izražava se u nmol/mg proteina.

3.8. HEMALAUN-EOZIN BOJENJE STANIČNIH KULTURA

Bojenje stanica hemalaun-eozinom, metodom po Kiernan-u (1990), omogućava razlikovanje apoptotičnih od ostalih stanica. Priređeni preparati očitavaju se svjetlosnim mikroskopom.

Postupak

1. Stanice su nasađene na mikrotitatr ploče sa 6 polja (1 mL suspenzije stanica u mediju), u koja su umetnuta sterilna pokrovna stakalca. Nakon 24 sata stanicama su aplicirani mikotoksini te su stanice inkubirane 24, odnosno 48 sati
2. Stanice se fiksiraju na pokrovnici pomoću otopine metanol/aceton (1:1) (Kemika, Zagreb) i ostave stajati najmanje 1 min
3. Ispiranje 70% etanolom (Kemika, Zagreb).
4. Bojenje hematoksilinom (Kemika, Zagreb), 1-2 min
5. Boja se izlije i stanice se preliju vodovodnom vodom, 2-3 min
6. Bojenje eozinom (Kemika, Zagreb), 1 min

7. Ispiranje destiliranom vodom, 96% etanolom, 100% etanolom i na kraju ksilolom (Kemika, Zagreb)
8. Osušene pokrovnice se zalijepe na predmetnice Kanada balzamom (Kemika, Zagreb)
9. Rezultat se izražava kao broj stanica u apoptozi na deset vidnih polja, kod povećanja 400 x.

3.9. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3

Kaspaza-3 je unutarstanična cisteinska proteaza, enzim koji igra glavnu ulogu u apoptotičkom procesu u stanici uključujući kondenzaciju kromatina, fragmentaciju DNA i bubrenje stanice. Određivanje aktivnosti enzima provedeno je kolorimetrijski na osnovu hidrolize supstrata acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida pri čemu se oslobađa žuti kromogen p-nitroanilin (pNA) čiji je maksimum apsorbancije na 405 nm (ε^{mM}=10,5).

Za određivanje aktivnosti kaspaze-3 korištene su slijedeće kemikalije:
- test paket CASP-3-C (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim) koji sadrži:
  Lizirajući pufer (HEPES 250 mM, CHAPS 25 mM, DTT 25 mM, pH 7,4),
  Test pufer (HEPES 200 mM, CHAPS 1%, DTT 50 mM. EDTA 20 mM, pH 7,4),
  Kaspaza-3 (pozitivna kontrola) otopljena u ultra-čistoj vodi (100 μg/mL) i razrjeđena test puferom koji sadrži BSA (1 mg/mL) do koncentracije 5 μg/mL,
  Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid - supstrat za kaspazu-3
  Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al – inhibitor kaspaze-3

Postupak

1. Stanice su su nasađene na mikrotitatr ploče sa 6 polja (1 mL suspenzije stanica u mediju). Nakon 24 sata stanicama su aplicirani mikotoksini te su stanice inkubirane 24, odnosno 48 sati
2. Stanični medij se odvoji i centrifugira (800 g, 4^0C, 7 min)
3. Stanice se tripsiniziraju i spoje sa stanicama koje su bile u mediju
4. Centrifugirati (800 g, 4^0C, 7 min) i odbaciti supernatant
5. Dodati PBS pH 7.4 (1 mL)
6. Centrifugirati (800 g, 4^0C, 7 min) i odbaciti supernatant
7. Homogenatu satnica dodati 100 μL lizirajućeg pufera
8. Inkubacija na ledu 15-20 min
9. Centrifugirati (18000 g, 4^0C, 15 min)

10. Odvojiti supernatant
11. Uzeti 25 μL lizata stanica + 965 μL test pufera + 10 μL supstrata za kaspazu-3
12. Uzeti 25 μL lizata stanica + 955 μL test pufera + 10 μL inhibitora kaspaze-3 + 10 μL supstrata za kaspazu-3
13. Na isti način prirediti i pozitivnu kontrolu
14. Inkubacija 18 h na 37^0C
15. Mjerenje apsorbancije na 405 nm
16. U preostalom lizatu stanica odrediti koncentraciju proteina

Aktivnost kaspaze-3 se izračuna prema formuli:

$$\mu\text{mol pNA/min/mL} = \frac{A \times d}{\varepsilon^{mM} \times t \times V}$$

ε^{mM}=10,5
d – faktor razrjeđenja
V – volumen uzorka
t – vrijeme reakcije u minutama

Aktivnost kaspaze-3 se izražava u μmol pNA/min/mL/mg proteina.

3.10 TEST GENOTOKSIČNOSTI – TVORBA MIKRONUKLEUSA, NUKLEARNIH PUPOVA I NUKLEOPLAZMATSKIH MOSTOVA

Mikronukleus test je jedan od standardnih testova genotoksičnosti. Pri izvođenju testa koristi se citohalazin B koji blokira citokinezu tj. jezgre se u potpunosti podjele, a citoplazma ostaje nepodijeljena (binuklearne stanice). U interfazi staničnog ciklusa mikronukleus izgleda poput dodatne stanične jezgre (jezgrice) koja je znatno manja od pravih jezgara u binuklearnoj stanici. Mikronukleus može nastati zbog gubitka acentričnih fragmenata kromosoma, gubitka cijelog kromosoma zbog oštećenja diobenog vretena ili gubitka funkcionalnosti diobenog vretena. Pri izvođenju testa kao pozitivna kontrola koristi se mitomicin C koji djeluje kao klastogeni agens. Mikronukleusi s većom površinom najčešće nastaju uslijed djelovanja aneugena te zadrže cijele kromosome, dok mikronukleusi nastali djelovanjem klastogena imaju manju površinu. Nuklearno pupanje je specifičan mehanizam stvaranja MN u binuklearnim stanicama. Tijekom procesa pupanja amplificirana DNA smještena je na

periferiji jezgre. Nukleoplazmatski mostovi se mogu vidjeti u binuklearnim stanicama nakon izlaganja klastogenima, a potječu od dicentričnog kromosoma. Rezultati testa prikazuju se kao broj jednog ili više mikronukleusa, nuklearnih pupova i nukleoplazmatskih mostova na 1000 binuklearnih stanica kojim je plazmatska membrana neoštećena i jezgre jasno odijeljene (Fenech i sur., 2002; 2003).



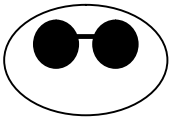
BROJANJE MIKRONUKLEUSA (MN)

1. MN su morfološki identični jezgri (nukleusu) ali su znatno manji
2. Promjer MN može varirati od 1/16 do 1/3 promjera jezgre
3. Okruglog su ili ovalnog oblika
4. Ne lome svjetlost te se jasno razlikuju od artefakata prisutnih u binuklearnoj stanici (npr. ostaci boje)
5. Nisu povezani s jezgrom
6. Najčešće je intenzitet boje MN jednak jezgrinom, a ponekad mogu biti i intenzivnije obojeni



BROJANJE NUKLEARNIH PUPOVA (NP)

1. Nuklearno pupanje javlja se u S fazi staničnog ciklusa
2. NP imaju istu morfologiju i intenzitet boje kao jezgra i MN
3. Vezani su za jezgru kraćom ili dužom "peteljkom" nukleoplazmatskog materijala što ovisi o stadiju procesa pupanja
4. Trajanje procesa pupanja do konačnog odvajanja MN je nepoznato



BROJANJE NUKLEOPLAZMATSKIH MOSTOVA (NPM)

1. NPM predstavlja kontinuiranu vezu između dvaju jezgara u binukleranoj stanici
2. Širina NPM može varirati ali obično ne prelazi 1/4 promjera jezgre
3. NPM ima jednaki intenzitet boje kao i jezgra
4. Ponekad se može vidjeti dvostruki NPM u jednoj binuklearnoj stanici
5. Binuklearna stanica koja sadrži NPM može istovremeno imati jedan ili više MN

Tijekom izvođenja testa korištene su slijedeće kemikalije:

Citohalazin B, čistoće 98% iz *Helminthosporium dematoideum* (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim), otopljen u dimetilsulfoksidu (DMSO). Citohalazin B je apliciran na stanice u koncentraciji 3 μg/mL.

Mitomicin C, iz *Streptomyces caespitosus* (Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim), razrijeđen u DMEM-u te apliciran na stanice u koncentraciji 0,03 μmol/L.

Ispitivanje genotoksičnog učinka apliciranih mikotoksina provedeno je modificiranom metodom po Varga i sur (2004).

Postupak

1. Nasaditi stanice na sterilne pokrovnice u mikrotitar pločama sa 6 mjesta - do eksponecijalnog rasta (24 sata inkubacije)
2. Promjena medija
3. Dodati test supstanciju i citohalazin B (3 μg/mL)
4. Inkubirati 24 sata
5. Odliti medij i isprati s PBS pH 7.4
6. Dodati fiziološku otopinu (37^0C)
7. Inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi i odliti
8. Dodati fikasativ ledena octena kiselina : metanol (1:5) razrjeđen s fiziološkom otopinom (1:1)
9. Inkubirati 15 min na sobnoj temperaturi i odliti
10. Isprati s fiksativom ledena octena kiselina : metanol (1:5)
11. Pokrovnice sušiti na zraku 1 sat
12. Bojenje s 7% Giemsa otopinom u PBS pH 6.8, 10 min
13. Isprati s destiliranom vodom
14. Nakon sušenja na zraku pokrovnice se mogu fiksirati s Kanada balzamom

3.11. STATISTIČKA OBRADA

Rezultati dobiveni mjerenjem vijabilnosti (n=4), katalitičke aktivnosti LDH i GLDH (n=3), koncentracije TBARS i GSH (n=4), indeksa apoptoze i aktivnosti kaspaze-3 (n=3) izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim pogreškama aritmetičke sredine. Testiranje značajnosti promjena u pokusnim skupinama u odnosu na kontrolu te promjena izazvanih djelovanjem pojedinačnih toksina u odnosu na njihove kombinacije, provedeno je jednosmjernom analizom varijance (One way-ANOVA) i Tukey post testom multiple komparacije na razini značajnosti $P<0,05$. Rezultati testa genotoksičnosti obrađeni su Hi-kvadrat testom na razini značajnosti $P<0,05$.

Odnos očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti i njihovih standardnih pogrešaka za kombinacije mikotoksina testiran je t-testom za nezavisne uzorke kako bi se utvrdilo djeluju li kombinacije mikotoksina aditivno, sinergistički ili antagonistički u pojedinom ispitivanom mehanizmu. Izračunavanje očekivanih srednjih vrijednosti za kombinacije mikotoksina prikazano je na primjeru kombinacije BEA i OTA.

$$\overline{X}_{\text{(očekivana. za BEA+OTA)}} = \overline{X}_{\text{(izmjerena za BEA)}} + \overline{X}_{\text{(izmjerena za OTA)}} - \overline{X}_{\text{(kontrola)}}$$

$$SE_{\text{(očekivana za BEA+OTA)}} = \left[(SE_{\text{(BEA)}})^2 + (SE_{\text{(OTA)}})^2 \right]^{1/2}$$

Rezultati su interpertirani na slijedeći način:

$\overline{X}_{\text{(izmjerena)}} \geq$ ili $\leq \overline{X}_{\text{(očekivana)}}$ $P>0,05$; ADITIVAN UČINAK

$\overline{X}_{\text{(izmjerena)}} > \overline{X}_{\text{(očekivana)}}$ $P<0,05$; SINERGIZAM

$\overline{X}_{\text{(izmjerena)}} < \overline{X}_{\text{(očekivana)}}$ $P<0,05$; ANTAGONIZAM

Testiranje značajnosti rezultata interakcija mikotoksina u pokusu genotoksičnosti provedeno je Hi-kvadrat testom.

4. REZULTATI

Mehanizam djelovanja mikotoksina u *in vitro* uvjetima ovisi o apliciranoj koncentraciji i vremenu izlaganja. Fumonizin B_1 (FB_1), bovericin (BEA) i okratoksin A (OTA) aplicirani su pojedinačno i u kombinacijama, u relativno niskim koncentracijama (0,05, 0,5 i 5 μg/mL), tijekom 24 i 48 sati, kako bi se mogle pratiti biokemijske i morfološke promjene epitelnih stanica bubrega svinje (PK 15).

4.1. PREŽIVLJAVANJE STANICA

U *Tablici VII* i *VIII* prikazana je vijabilnosti (%) PK 15 stanica nakon 24- i 48-satnog izlaganja FB_1, BEA i OTA (pojedinačno i u kombinacijama) u koncentracijama 0,05, 0,5 i 5 μg/mL. *Grafovima I* i *II* prikazano je preživljavanje stanica u odnosu na kontrolu (0,3% etanol).

Nakon 24-satnog izlaganja svih pokusnih skupina mikotoksinima u koncentraciji 0,05 μg/mL vijabilnost stanica se bitno ne razlikuje od kontrole i međusobno. Također, apliciranjem pojedinačnih mikotoksina te kombinacija FB_1+BEA i FB_1+OTA, u koncentraciji 0,5 μg/mL, vijabilnost stanica se značajno ne smanjuje u odnosu na kontrolu. U skupinama tretiranim s BEA+OTA i sva tri mikotoksina vijabilnost se smanjuje za 10% u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 5 μg/mL vijabilnost se smanjuje za 25% u skupini tretiranoj s FB_1, za 30 do 40% u skupinama tretiranim s BEA, OTA i kombinacijama od po dva mikotoksina te za 47 % u skupini FB_1+BEA+OTA, u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Također je preživljavanje stanica znatno manje u skupini FB_1+BEA+OTA u odnosu na pojedinačno aplicirane mikotoksine u istoj koncentraciji ($P<0,05$).

Nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima vijabilnost stanica se smanjuje u svim skupinama u odnosu na 24-satno tretiranje. U koncentraciji 0,05 μg/mL vijabilnost stanica se za oko 12% smanjuje u skupinama BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u odnosu na kontrolu ($P<0,05$), dok se u ostalim pokusnim skupinama vijabilnost bitno ne razlikuje od kontrolnih stanica. Tretiranjem stanica s mikotoksinima u 10 puta većoj koncentraciji preživljavanje stanica se znatno smanjuje u svim pokusnim skupinama u odnosu na kontrolu ($P<0,05$) i to za 20 do 25% u skupinama tretiranim s FB_1, BEA i OTA, za 45 do 50% u skupinama tretiranim s dva mikotoksina te za 53% u skupini FB_1+BEA+OTA. Preživljavanje stanica se znatno smanjuje

u skupinama tretiranim s dva i tri mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane toksine ($P<0,05$) te u skupini FB_1+BEA+OTA u odnosu na FB_1+BEA i FB_1+OTA ($P<0,05$).

Tretiranjem stanica s mikotoksinima u koncentraciji 5 μg/mL tijekom 48 sati, vijabilnost se smanjuje za 50 do 60% u skupinama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima, za 60 do 64% u skupinama tretiranim s dva mikotoksina te za 70% u skupini tretiranoj sa sva tri mikotoksina, u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Također je preživljavanje stanica znatno manje u skupinama tretiranim s dva i tri mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane toksine ($P<0,05$) te u skupini FB_1+BEA+OTA u odnosu na stanice tretirane s kombinacijom od po dva mikotoksina apliciranih u istoj koncentraciji ($P<0,05$).

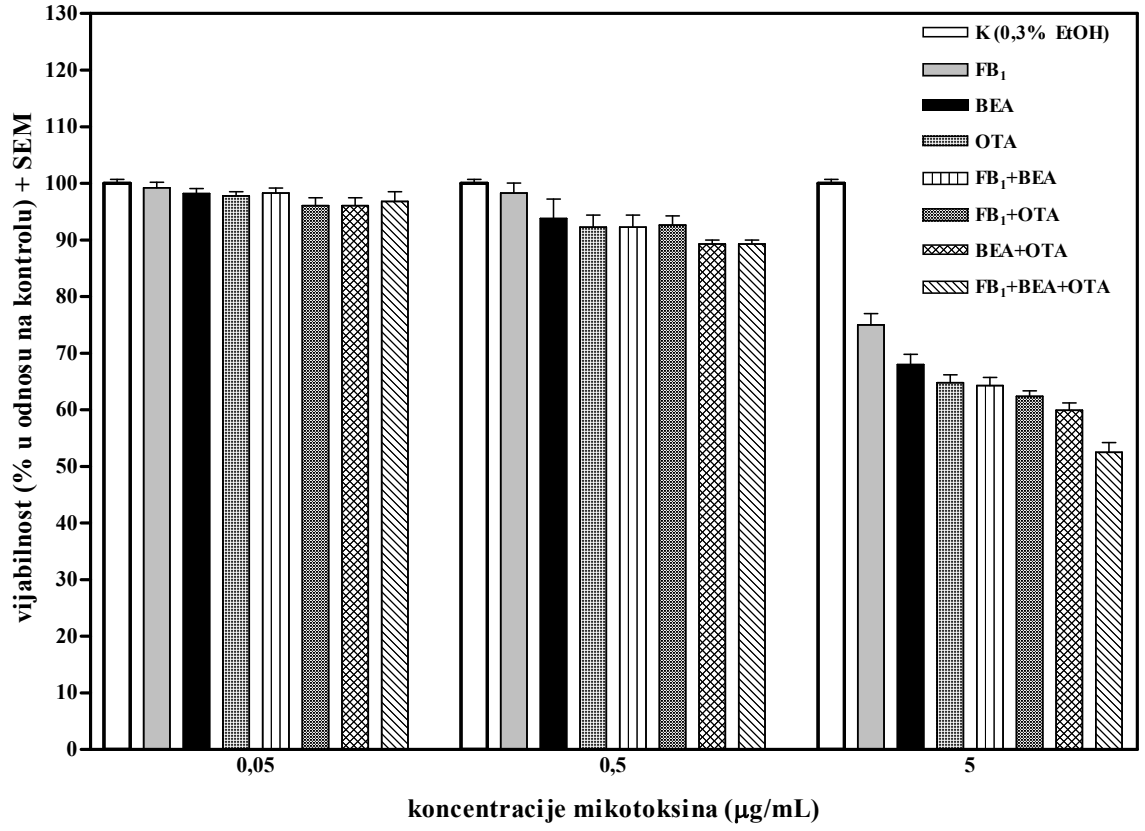
Rezultati testa vijabilnosti pokazuju da su FB_1, BEA i OTA podjednako toksični za PK 15 stanice te da njihovo djelovanje ovisi o dozi pojedinog mikotoksina i vremenu izlaganja. Kombiniranim apliciranjem mikotoksina u koncentracijama 0,05 μg/mL i 0,5 μg/mL izraženi su aditivni učinici dok je u tretmanu s najvećom koncentracijom zapažen antagonizam.

Tablica VII *Numeričke vrijednosti vijabilnosti PK 15 stanica nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	vijabilnost stanica (%) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		82,6 ± 0,7	81,8 ± 1,3	62,5 ± 1,8* [a]
BEA		81,8 ± 0,6	78,1 ± 2,5	56,6 ± 1,6* [b]
OTA		81,4 ± 0,5	76,8 ± 1,5	53,9 ± 1,1* [c]
FB_1+BEA		81,8 ± 0,6	76,8 ± 1,1	53,5 ± 1,3*
FB_1+OTA		80,0 ± 2,0	77,1 ± 1,1	51,9 ± 0,9*
BEA+OTA		80,0 ± 1,0	74,3 ± 0,5*	49,9 ± 1,1*
FB_1+BEA+OTA		80,6 ± 0,2	74,3 ± 0,5*	43,7 ± 1,5* [a b c]
Kontrola (0,3% EtOH)		**83,2 ± 0,5**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam**



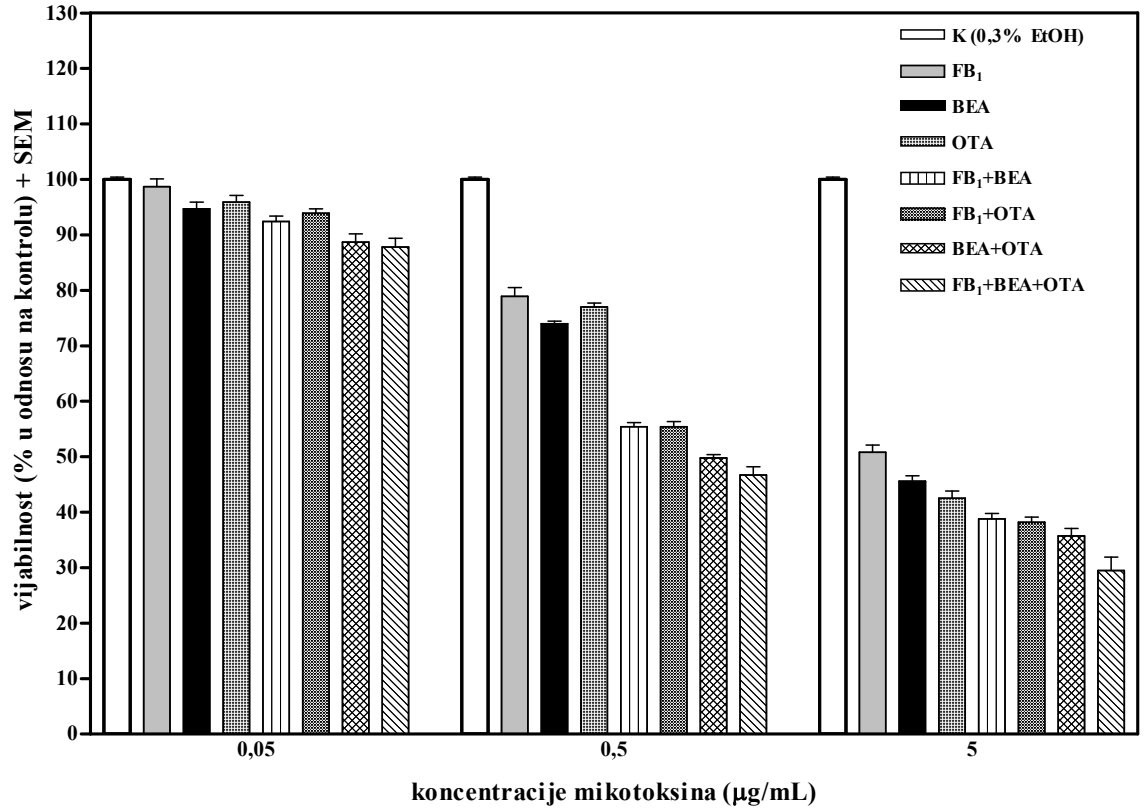
Graf I *Preživljavanje PK 15 stanica nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica VIII *Numeričke vrijednosti vijabilnosti PK 15 stanica nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	vijabilnost stanica (%) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		75,3 ± 0,9	60,2 ± 1,1* [a]	38,8 ± 0,8* [a]
BEA		72,3 ± 0,8	56,5 ± 0,3 * [b]	34,8 ± 0,6* [b]
OTA		73,3 ± 0,8	59,1 ± 0,4 * [c]	32,5 ± 0,8* [c]
FB_1+BEA		70,5 ± 0,6	42,3 ± 0,5 * [a d]	29,6 ± 0,6* [a d]
FB_1+OTA		71,7 ± 0,5	42,3 ± 0,6 * [a c e]	29,2 ± 0,6* [a e]
BEA+OTA		67,9 ± 0,9*	38,0 ± 0,4 * [b c]	27,3 ± 0,9* [b c f]
FB_1+BEA+OTA		67,0 ± 1,1*	35,7 ± 1,0 * [a b c d e]	22,5 ± 1,6* [a b c d e f]
Kontrola (0,3% EtOH)		**76,3 ± 0,3**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e, f] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam**



Graf II *Preživljavanje PK 15 stanica nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

4.2. OŠTEĆENJE STANIČNE I MITOHONDRIJSKE MEMBRANE

Stupanj oštećenja stanične membrane određen je praćenjem katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju iznad PK 15 stanica nakon 24- i 48-satnog izlaganja FB_1, BEA i OTA (pojedinačno i u kombinacijama) u koncentracijama 0,05, 0,5 i 5 μg/mL (*Tablica IX* i *X*). *Grafovima III* i *IV* rezultati su prikazani u postotcima u odnosu na kontrolu (0,3% etanol).

Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima (pojedinačno i u kombinaciji) u koncentracijama od 0,05 i 0,5 μg/mL, katalitička aktivnost LDH u staničnom mediju kreće se od 52,9 ± 4,1 do 58,6 ± 4,2 U/L) što se značajno ne razlikuje od vrijednosti izmjerenih u kontrolnoj skupini (52,9 ± 4,1 U/L). Tretiranjem stanica s mikotoksinima (5 μg/mL) u kombinacijama FB_1+BEA i FB_1+OTA katalitička koncentracija LDH se povećava za 33 i 48% u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). U skupinama BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA katalitička koncentracija se povećava za 57 i 65% u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Također je katalitička aktivnost LDH u staničnom mediju za oko 40% veća u skupini tretiranoj s tri mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane toksine ($P<0,05$).

Izlaganjem stanica mikotoksinima (pojedinačno i u kombinacijama) u koncentraciji 0,05 μg/mL tijekom 48 sati, katalitička aktivnost LDH se bitno ne mijenja u odnosu na 24-satno tretiranje istim koncentracijama. Nešto veće koncentracije LDH (od 58,4 ± 5,7 do 68,5 ±6,4 U/L) zabilježene su u skupinama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijama s dva toksina, u deset puta većoj koncentraciji, ali bez značajne razlike u odnosu na kontrolu (53,9 ± 4,6). Jedino je u skupini tretiranoj sa sva tri mikotoksina utvrđeno značajno povećanje katalitičke aktivnosti LDH (za 38%) u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Izlaganjem stanica mikotoksinima u koncentraciji 5 μg/mL katalitička koncentracija LDH se povećava u odnosu na 24 satno tretiranje. Pri tom je aktivnost LDH za 45% veća u skupini tretiranoj s FB_1, za 77 do 84% u skupinama BEA, OTA, FB_1+BEA i FB_1+OTA te za 90% u skupinama BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA, u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je koncentracija LDH u staničnom mediju skupine FB_1+BEA+OTA za 45% veća od vrijednosti izmjerenih u skupini koja je bila tretirana s 5 μg/mL FB_1 tijekom 48 sati.

Katalitička aktivnost LDH u staničnom mediju pokazuje da citotoksično djelovanje pojedinačnih mikotoksina više ovisi o dozi, dok je ovisnost o vremenu izlaganja zapažena tretiranjem s najvećom koncentracijom. Nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama mikotoksina izražen je aditivan učinak u svim apliciranim koncentracijama. Tretiranjem

stanica kombinacijama mikotoksina tijekom 48 sati, aditivan učinak je izražen pri nižim koncentracijama (0,05 i 0,5 μg/mL) dok je kod 5 μg/mL zapažen antagonizam.

Stupanj oštećenja mitohondrijske membrane određen je praćenjem katalitičke aktivnosti glutamat dehidrogenaze (GLDH) u mediju iznad PK 15 stanica nakon 24- i 48-satnog izlaganja mikotoksinima u navedenim koncentracijama (*Tablica XI* i *XII*). *Grafovima V* i *VI* rezultati su prikazani u postotcima u odnosu na kontrolne stanice.

Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji 0,05 μg/mL katalitička aktivnost GLDH kreće se od 29,7 ± 0,9 do 31,4 ± 0,9 U/L u skupinama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijom FB_1 i BEA, što se značajno ne razlikuje od kontrole (28 ± 0,7 U/L). U skupinama tretiranim s FB_1+OTA, BEA+OTA i sva tri mikotoksina, katalitička koncentracija GLDH se povećava za 20 do 29% u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Tretiranjem stanica s mikotoksinima (pojedinačno i u kombinaciji) u koncentraciji 0,5 μg/mL, koncentracija GLDH u staničnom mediju se povećava za 24 do 38% u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Također je katalitička aktivnost GLDH za 15% veća u skupini tretiranoj s tri mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane toksine i kombinaciju FB_1 i BEA ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksina u deset puta većoj koncentraciji, aktivnost GLDH se za 40 do 45% povećava u skupinama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima, za 47 do 55% u skupinama tretiranim s dva mikotoksina te za 70% u skupini tretiranoj sa tri mikotoksina, u donosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je koncentracija GLDH u staničnom mediju za oko 30% i 20% manja u skupinama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima, odnosno kombinacijama FB_1+BEA i FB_1+OTA, u odnosu na stanice tretirane s tri mikotoksina u istoj koncentraciji ($P<0,05$).

Nakon 48-satnog izlaganja stanica mikotoksinima u istim koncentracijama, katalitička aktivnost GLDH u staničnom mediju bitno se ne razlikuje od vrijednosti izmjerenih nakon 24-satnog izlaganja. Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,05 μg/mL znatno veća aktivnost GLDH izmjerena je u skupini tretiranoj s tri mikotoksina (16%) u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Izlaganjem stanica deset puta većoj koncentraciji mikotoksina, GLDH se neznatno povećava u skupinama tretiranim s FB_1 i BEA. Znatno povećanje aktivnosti GLDH utvrđeno je u skupinama tretiranim s OTA (21%) te kombinacijama dva i tri mikotoksina (35-45%), u donosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je katalitička aktivnost GLDH za 24, 20 i 34% veća u skupinama FB_1+BEA, FB_1+OTA i FB_1+BEA+OTA u odnosu na pojedinačno aplicirane FB_1 i BEA ($P<0,05$). Koncentracija GLDH je 20 i 25% manja u skupini tretiranoj s OTA u odnosu na stanice tretirane s kombinacijama BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA ($P<0,05$). Izlaganjem stanica mikotoksinima u najvećoj koncentraciji, katalitička aktivnost GLDH se povećava za

37 do 40% u skupinama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima te za 49 do 70% u skupinama tretiranim kombinacijama mikotokisna, u donosu na kontrolu ($P<0,05$). Koncentracija GLDH u staničnom mediju skupina FB_1, BEA i OTA je za oko 30% manja u donosu na stanice tretirane sa sva tri mikotoksina ($P<0,05$).

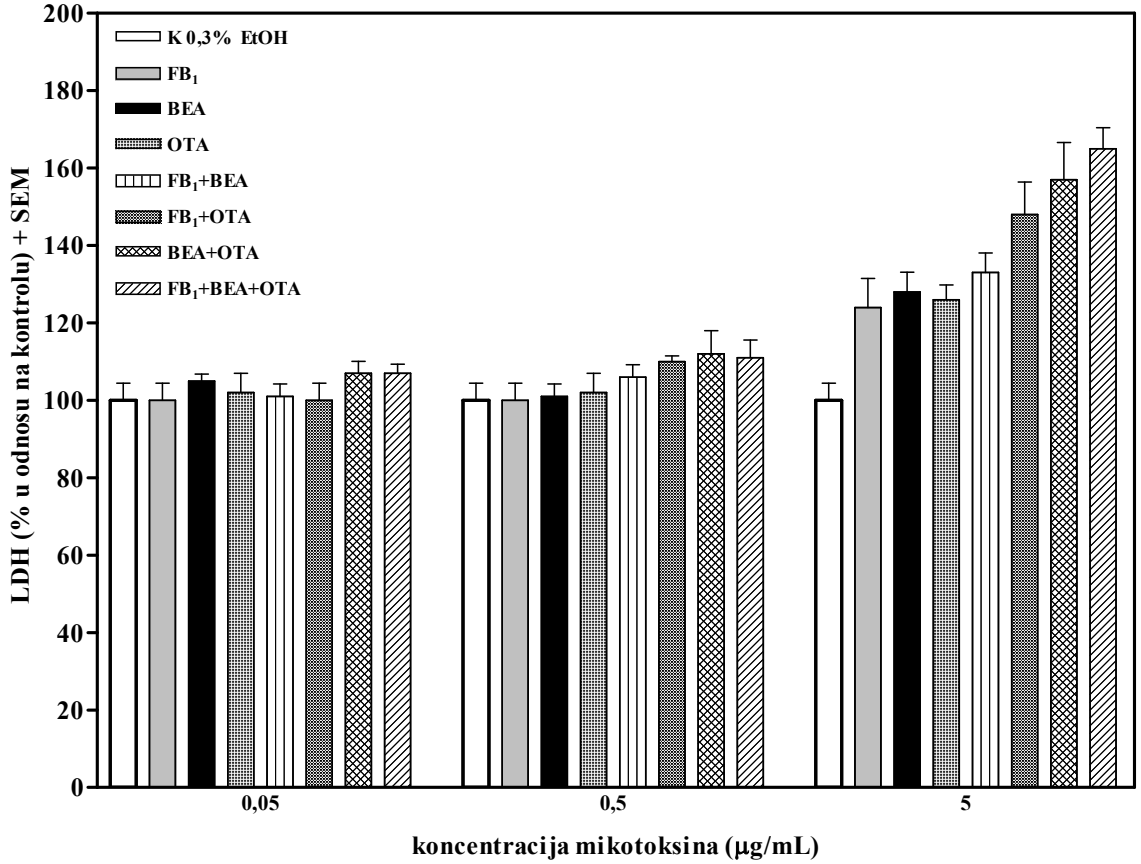
Katalitička aktivnost GLDH u staničnom mediju pokazuje da stupanj oštećenja membrane mitohondrija ovisi o dozi pojedinačnih toksina. Tretiranjem stanica kombinacijama mikotoksina u koncentraciji 0,05 μg/mL tijekom 24 sata zapažen je aditivan učinak, dok se nakon aplikacije većih koncentracija ispoljava antagonizam. Nakon 48-satnog izlaganja kombinacijama mikotoksina apliciranih u koncentracijama 0,05 i 0,5 zabilježen je aditivan učinak, dok kombinirani tretman u najvećoj koncentraciji ima antagonistički učinak na aktivnost GLDH.

Tablica IX *Katalitička koncentracija laktat dehidrogenaze (LDH) u staničnom mediju nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE		KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1	LDH (U/L) ± SEM	52,9 ± 2,3	52,9 ± 2,3	65,6 ± 4,0 [a]
BEA		55,6 ± 1,0	53,6 ± 1,7	67,5 ± 2,7 [b]
OTA		53,9 ± 2,7	53,9 ± 2,7	66,5 ± 2,0 [c]
FB_1+BEA		53,6 ± 1,7	56,3 ± 1,7	70,2 ± 2,7*
FB_1+OTA		52,9 ± 2,3	58,3 ± 0,8	78,5 ± 4,4*
BEA+OTA		56,4 ± 1,7	59,2 ± 3,2	83,1 ± 5,1*
FB_1+BEA+OTA		56,8 ± 1,3	58,6 ± 2,4	87,3 ± 2,8* [a b c]
Kontrola (0,3% EtOH)		**52,9 ± 2,3**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije sa tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci



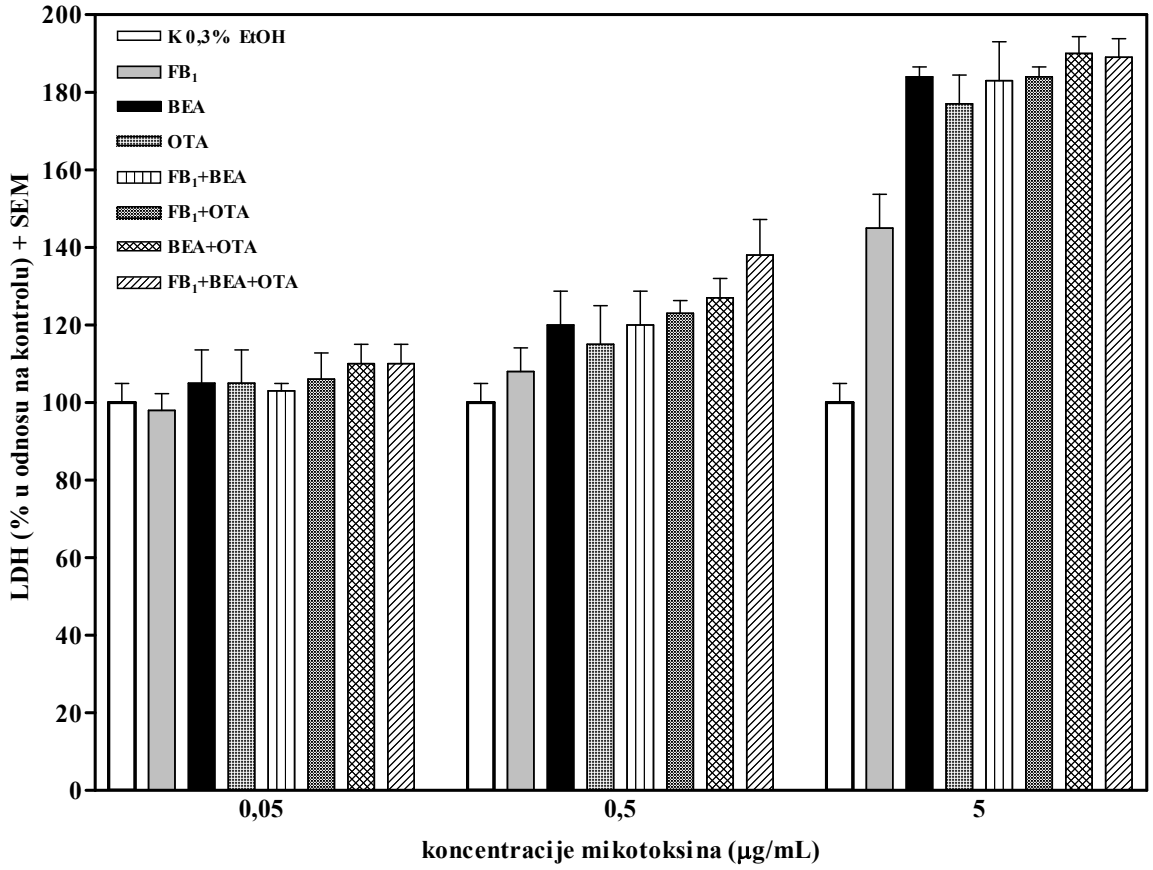
Graf III *Otpuštanje LDH u stanični medij nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica X *Katalitička koncentracija laktat dehidrogenaze (LDH) u staničnom mediju nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE		KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1	LDH (U/L) ± SEM	52,9 ± 2,3	58,4 ± 3,3	78,5 ± 4,7* [a]
BEA		56,6 ± 4,6	64,8 ± 4,6	99,2 ± 1,4*
OTA		56,6 ± 4,6	62,0 ± 5,3	95,4 ± 3,9*
FB_1+BEA		55,7 ± 1,0	64,8 ± 4,6	98,9 ± 4,7* [a]
FB_1+OTA		57,3 ± 3,7	66,5 ± 1,8	99,2 ± 1,4* [a]
BEA+OTA		59,4 ± 2,7	68,5 ± 3,8	102,4 ± 1,3*
FB_1+BEA+OTA		59,4 ± 2,7	74,3 ± 5,1*	101,6 ± 2,6* [a]
Kontrola (0,3% EtOH)		**53,9 ± 2,7**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a] pojedinačni toksin u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam**



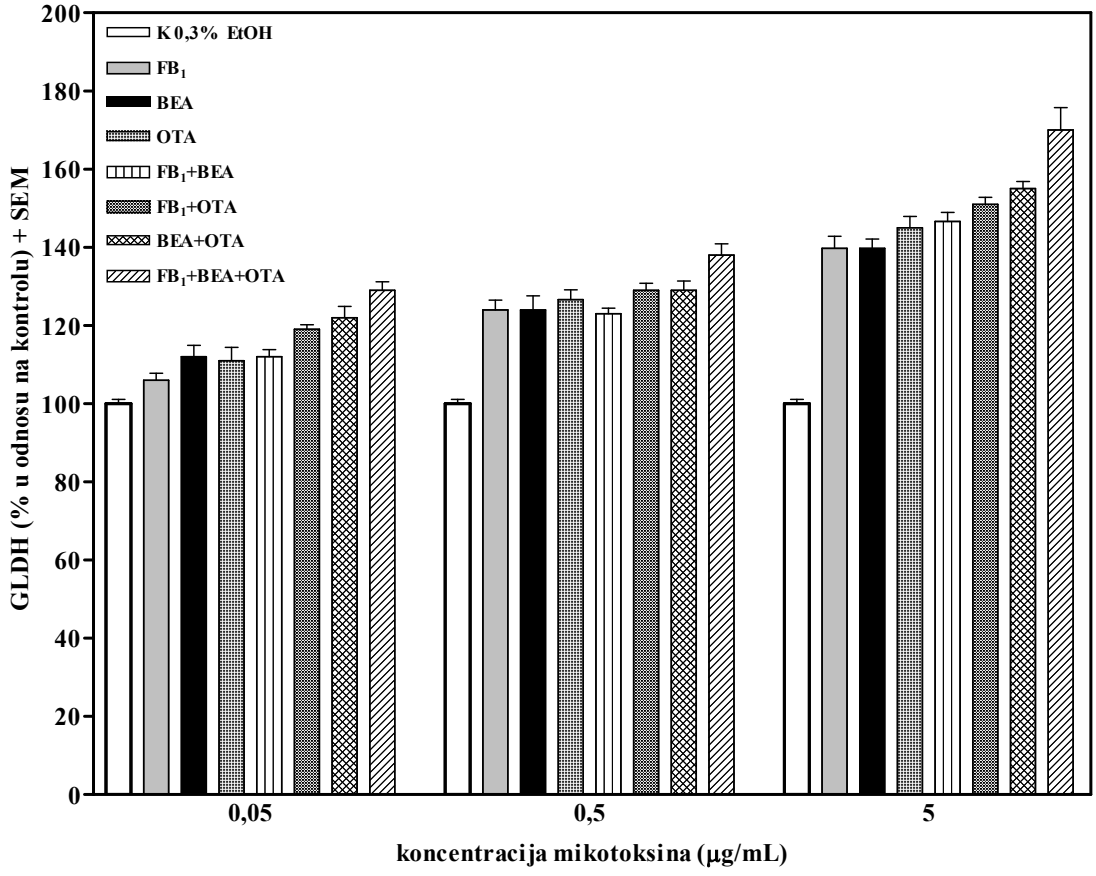
Graf IV *Otpuštanje LDH u stanični medij nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica XI *Katalitička koncentracija glutamat dehidrogenaze (GLDH) u staničnom mediju nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	GLDH (U/L) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		29,7 ± 0,5	34,7 ± 0,7* [a]	39,1 ± 0,9* [a]
BEA		31,4 ± 0,8	34,7 ± 1,0* [b]	39,1 ± 0,7* [b]
OTA		31,1 ± 0,9	34,9 ± 0,7* [c]	40,7 ± 0,8* [c]
FB_1+BEA		31,4 ± 0,5	34,1 ± 0,4* [d]	41,0 ± 0,7* [d]
FB_1+OTA		33,4 ± 0,3*	36,1 ± 0,5*	42,4 ± 0,5* [e]
BEA+OTA		34,1 ± 0,8*	36,1 ± 0,7*	43,5 ± 0,5*
FB_1+BEA+OTA		36,2 ± 0,6*	38,7 ± 0,8* [a b c d]	47,8 ± 1,7* [a b c d e]
Kontrola (0,3% EtOH)		**28,0 ± 0,4**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam**

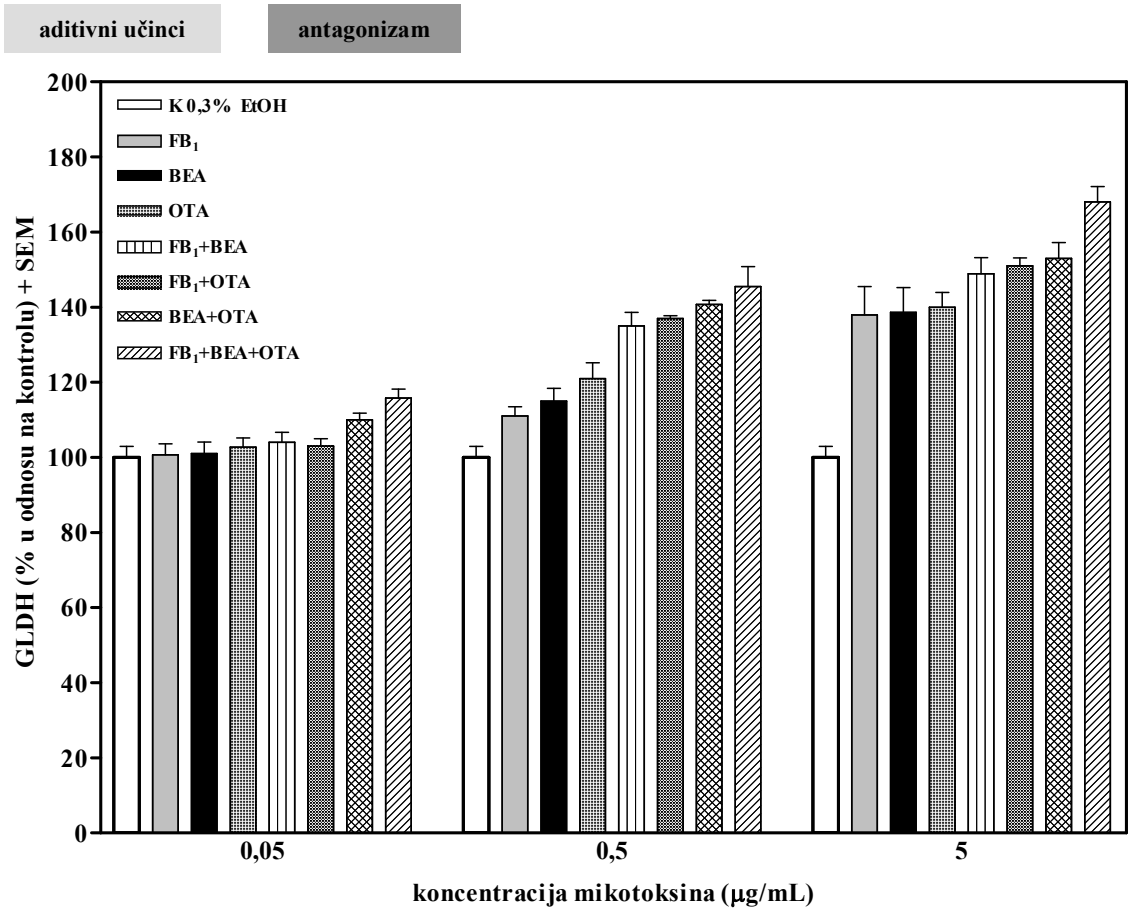


Graf V *Otpuštanje GLDH u stanični medij nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica XII *Katalitička koncentracija glutamat dehidrogenaze (GLDH) u staničnom mediju nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	GLDH (U/L) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		28,0 ± 0,8	30,9 ± 0,7 [a]	38,4 ± 2,1* [a]
BEA		28,2 ± 0,9	32,0 ± 0,9 [b]	38,6 ± 1,8* [b]
OTA		28,6 ± 0,7	33,7 ± 1,1* [c]	38,9 ± 1,0 * [c]
FB_1+BEA		28,9 ± 0,8	37,6 ± 1,0* [a b]	41,4 ± 1,1 *
FB_1+OTA		28,7 ± 0,5	38,1 ± 0,2* [a]	42,0 ± 0,5 *
BEA+OTA		30,7 ± 0,5	39,1 ± 0,3* [b c]	42,6 ± 1,1 *
FB_1+BEA+OTA		32,2 ± 0,6*	40,5 ± 1,5* [a b c]	46,8 ± 1,1 * [a b c]
Kontrola (0,3% EtOH)		**27,8 ± 0,7**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)



Graf VI *Otpuštanje GLDH u stanični medij nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

4.3. LIPIDNA PEROKSIDACIJA I RAZINA STANIČNOG GLUTATIONA

U *Tablicama XIII* i *XIV* prikazana je koncentracija tiobarbituratnih adukata (TBARS u nmol/mg proteina) što odražava koncentraciju lipidnih peroksida u PK 15 stanicama nakon 24- i 48-satnog izlaganja mikotoksinima FB_1, BEA i OTA (pojedinačno i u kombinacijama), u koncentraciji od 0,05, 0,5 i 5 μg/mL. *Grafovima VII* i *VIII* rezultati su izraženi u postotcima u odnosu na kontrolu (0,3% etanol).

Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji 0,05 μg/mL (pojedinačno i u kombinaciji), koncentracija TBARS kreće se od 7,1 ± 0,8 do 9,8 ± 2,7 nmol/mg proteina što se značajno ne razlikuje od koncentracije lipidnih peroksida u kontrolnim stanicama (7,1 ± 0,9 nmol/mg proteina). Apliciranjem deset puta veće koncentracije mikotoksina koncentracija TBARS se neznatno povećala u odnosu na kontrolu u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijama FB_1+BEA i FB_1+OTA (8,8 ± 1,6–9,8 ± 2,0 nmol/mg proteina). Statistički značajno veća koncentracija TBARS u odnosu na kontrolu utvrđena je u skupini BEA+OTA (za 58%) i FB_1+BEA+OTA (za 80%) ($P<0,05$). Također je koncentracija lipidnih peroksida za 60% veća u skupini tretiranoj s tri mikotoksina u odnosu na stanice tretirane s BEA ($P<0,05$). Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji 5 μg/mL koncentracija TBARS se povećala za 56% u stanicama tretiranim s OTA te za 94 do 100% u stanicama tretiranim kombinacijama mikotoksina u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je koncentracija lipidnih peroksida za 50 do 60% veća u skupinama tretiranim kombinacijama mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane FB_1 i OTA ($P<0,05$).

Nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji 0,05 i 0,5 μg/mL koncentracija TBARS u stanicama se bitno ne mijenja u odnosu na 24-satno tretiranje. Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,05 μg/mL znatno veća koncentracija TBARS zabilježena u skupini tretiranoj s tri mikotoksina (11,7 ± 1,0 nmol/mg proteina) u odnosu na kontrolu (7,3 ± 1,0 nmol/mg proteina) i ostale pokusne skupine ($P<0,05$), izuzev BEA+OTA. Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,5 μg/mL koncentracija lipidnih peroksida se za 53 do 79% povećava u stanicama tretiranim s kombinacijama mikotoksina u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). U skupinma tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima koncentracija TBARS je za 30 do 50% niža u odnosu na stanice tretirane s kombinacijama mikotoksina ($P<0,05$). Nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji od 5 μg/ml koncentracija TBARS se povećava u odnosu na 24-satno tretiranje. Pri tom je koncentracija TBARS veća za 57 do 85% u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima te za 110 do 140% u stanicama tretiranim s kombinacijama mikotoksina u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je

koncentracija TBARS znatno manja u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima u odnosu na skupinu tretiranu s tri mikotoksina ($P<0,05$).

Fumonizin B_1, BEA i OTA izazivaju lipidnu peroksidaciju u PK 15 stanicama ovisno o dozi. Ovisnost o vremenu izlaganja zapažena je tretiranjem s najvećom koncentracijom mikotoksina. Nakon 24 i 48-satnog izlaganja kombinacijama mikotoksina zapažen je aditivan učinak na stimulaciju lipidne peroksidacije u PK 15 stanicama.

U *Tablicama XV* i *XVI* prikazane su apsolutne vrijednosti koncentracija staničnog glutationa (GSH u nmol/mg proteina) u PK 15 stanicama nakon 24- i 48-satnog izlaganja mikotoksinima FB_1, BEA i OTA pojedinačno i u kombinacijama u koncentraciji od 0,05, 0,5 i 5 μg/mL. *Grafovima IX* i *X* rezultati su prikazani u postotcima u odnosu na kontrolu (0,3% etanol).

Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji od 0,05 μg/mL, koncentracija GSH smanjuje se za 18% u skupini tretiranoj s OTA, te 18-25% u skupinama tretiranim sa dva i tri mikotoksina u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također se razine GSH značajno smanjuju (za 18-27%) u stanicama koje su tretirane s kombinacijama mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane FB_1 i BEA ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,5 μg/mL, koncentracija GSH se smanjuje za 15 do 23% u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijama FB_1+BEA i FB_1+OTA te za 40-45% u stanicama tretiranim s BEA+OTA i FB_1+OTA+BEA ($P<0,05$). Koncentracija GSH smanjuje se za 10-35% u skupinama tretiranim s FB_1+OTA i FB_1+BEA+OTA u odnosu na pojedinačno aplicirani FB_1 ($P<0,05$). U stanicama tretiranim s BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA, koncentracija GSH se također značajno smanjuje (30%) u odnosu na pojedinačno aplicirani BEA i OTA ($P<0,05$). Koncentracija GSH u stanicama tretiranim sa tri mikotoksina smanjena je za 25% u odnosu na kombinacije FB_1+BEA i FB_1+OTA ($P<0,05$). U stanicama koje su tretirane mikotoksinima u koncentraciji 5 μg/mL, koncentracija GSH je također značajno smanjena u pokusnim skupinama (20-45%) u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Isto tako je razina GSH za 20 do 40% manja u stanicama tretiranim kombinacijama mikotoksina u odnosu na pojedinačno aplicirane FB_1, BEA i OTA ($P<0,05$).

Nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima koncentracija GSH neznatno se smanjuje u odnosu na 24-satno tretiranje. Tretiranjem stanica mikotoksinima u koncentraciji od 0,05 μg/mL, koncentracija staničnog GSH smanjuje se za 10 do 20 % u svim pokusnim skupinama u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je razina GSH za 10 do 17% veća u stanicama tretiranim s FB_1 u odnosu na skupine tretirane s kombinacijama mikotoksina ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksinima u koncentraciji od 0,5 μg/mL, koncentracija GSH znatnije opada (za 16-39%) u svim pokusnim skupinama, u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Koncentracija GSH u stanicama tretiranim sa tri mikotoksina smanjuje se za 17 do 26% u odnosu na skupine

tretirane s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijama ($P<0,05$). Jedino je apliciranjem kombinacije FB_1+OTA uočeno povećanje koncentracije GSH u odnosu na tretiranje stanica sa samim OTA. Tretiranjem stanica s mikotoksinima u koncentraciji 5 μg/mL, razina GSH se smanjuje za 28 do 40% u skupinama izloženim djelovanju pojedinačnih mikotoksina, za 46 do 49% u stanicama tretiranim s dva mikotoksina te za 56% u stanicama tretiranim s tri mikotoksina u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Kombinacije s dva i tri mikotoksina smanjuju koncentraciju GSH u stanicama za 6 do 28% u odnosu pojedinačno aplicirane mikotoksine ($P<0,05$). Također je koncentracija GSH u stanicama tretiranim s FB_1+BEA znatno veća od vrijednosti izmjerenih u stanicama koje su bile izložene djelovanju sva tri mikotoksina u istoj koncentraciji.

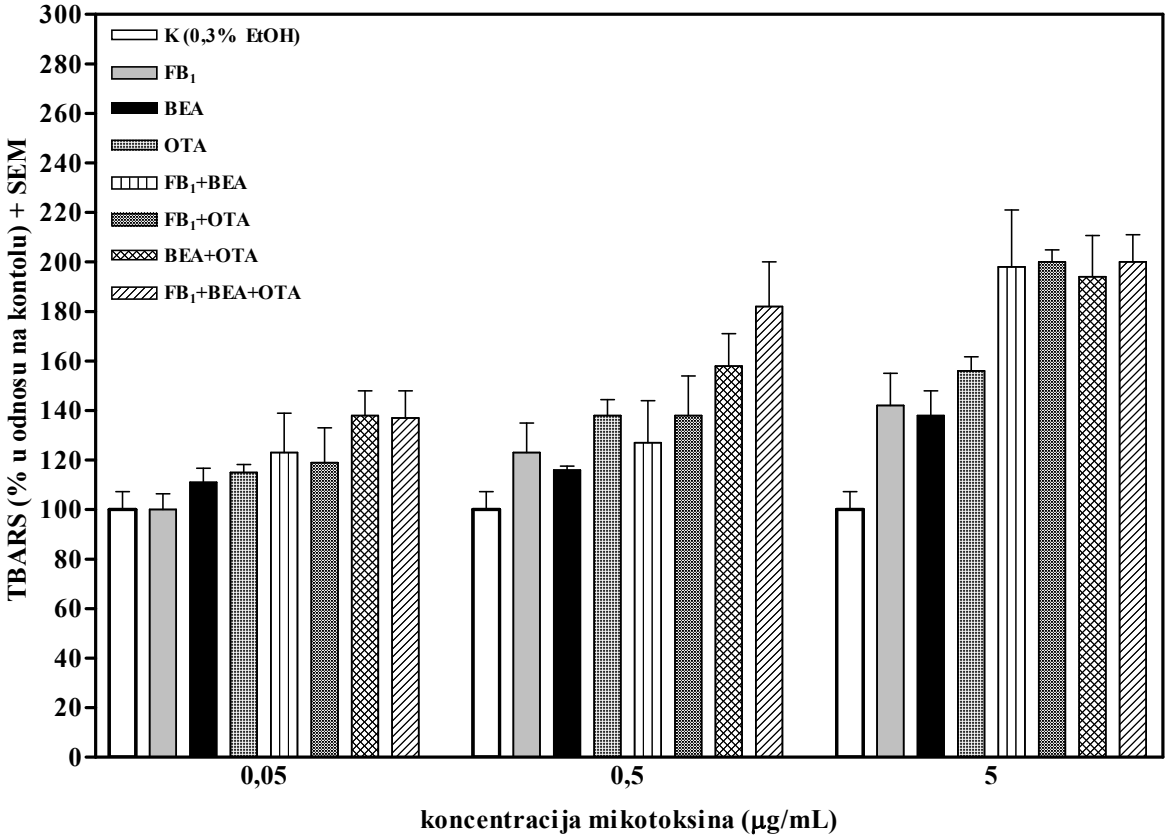
Djelovanje pojedinačnih mikotoksina na razinu GSH u PK 15 stanicama ovisi o apliciranoj dozi. Nakon 24-satnog tretiranja kombinacijama mikotoksina najviše je izražen aditivan učinak i to za sve kombinacije aplicirane u koncentraciji 0,05 μg/mL, FB_1+BEA, FB_1+OTA i FB_1+BEA+OTA u koncentraciji 0,5 μg/mL te kombinacije s dva mikotoksina u najvećoj koncentraciji. Sinergizam je zabilježen samo u slučaju BEA+OTA pri koncentraciji 0,5 μg/mL, a antagonizam nakon aplikacije tri toksina u najvećoj koncentraciji. Nakon 48-satnog tretiranja s kombinacijama mikotoksina zapažen je aditivan i antagonistički učinak. Kombinacije FB_1+BEA i FB_1+OTA (0,05 μg/mL) te BEA+OTA (0,5 μg/mL) djeluju aditivno, dok sve ostale kombinacije mikotoksina imaju antagonistički učinak na smanjenje koncentracije GSH u PK15 stanicama.

Tablica XIII *Koncentracija lipidnih peroksida u PK 15 stanicama nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	TBARS (nmol/mg proteina) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		7,1 ± 0,4	8,8 ± 0,8	10,1 ± 0,8 [a]
BEA		7,9 ± 0,3	8,3 ± 0,1 [b]	9,8 ± 0,7 [b]
OTA		8,2 ± 0,2	9,8 ± 0,4	11,1 ± 0,4*
FB_1+BEA		8,8 ± 1,6	9,0 ± 1,0	14,1 ± 1,4* [b]
FB_1+OTA		8,5 ± 0,9	9,8 ± 1,0	14,2 ± 0,3* [a]
BEA+OTA		9,8 ± 0,7	11,2 ± 0,8*	13,8 ± 1,0* [b]
FB_1+BEA+OTA		9,7 ± 1,3	12,9 ± 1,2* [b]	14,6 ± 0,7* [a b]
Kontrola (0,3% EtOH)		**7,1 ± 0,5**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci

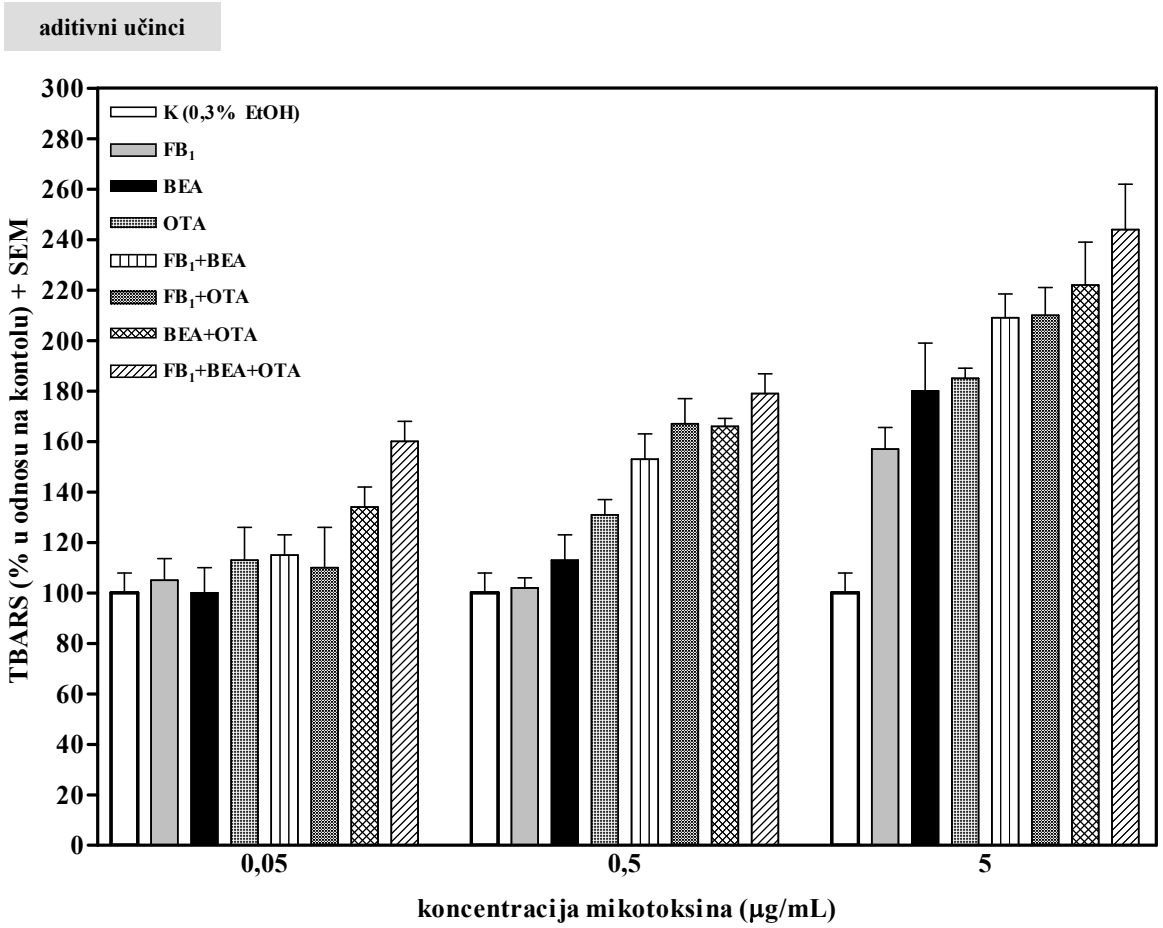


Graf VII *Povećanje koncentracije lipidnih peroksida u PK 15 satnicama nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica XIV *Koncentracija lipidnih peroksida u PK 15 stanicama nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	TBARS (nmol/mg proteina) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		7,7 ± 0,6 [a]	7,5 ± 0,3 [a]	11,5 ± 0,5* [a]
BEA		7,3 ± 0,7 [b]	8,3 ± 0,7 [b]	13,2 ± 1,2* [b]
OTA		8,3 ± 0,8 [c]	9,6 ± 0,4 [c]	13,5 ± 0,3* [c]
FB_1+BEA		8,4 ± 0,5 [d]	11,2 ± 0,7* [a b]	15,3 ± 0,6*
FB_1+OTA		8,1 ± 1,0 [e]	12,2 ± 0,7* [a c]	15,7 ± 0,7*
BEA+OTA		9,8 ± 0,5 [b]	12,1 ± 0,2* [b c]	16,2 ± 1,1*
FB_1+BEA+OTA		11,7 ± 0,5* [a b c d e]	13,1 ± 0,5* [a b c]	17,8 ± 2,3* [a b c]
Kontrola (0,3% EtOH)		**7,3 ± 0,5**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)



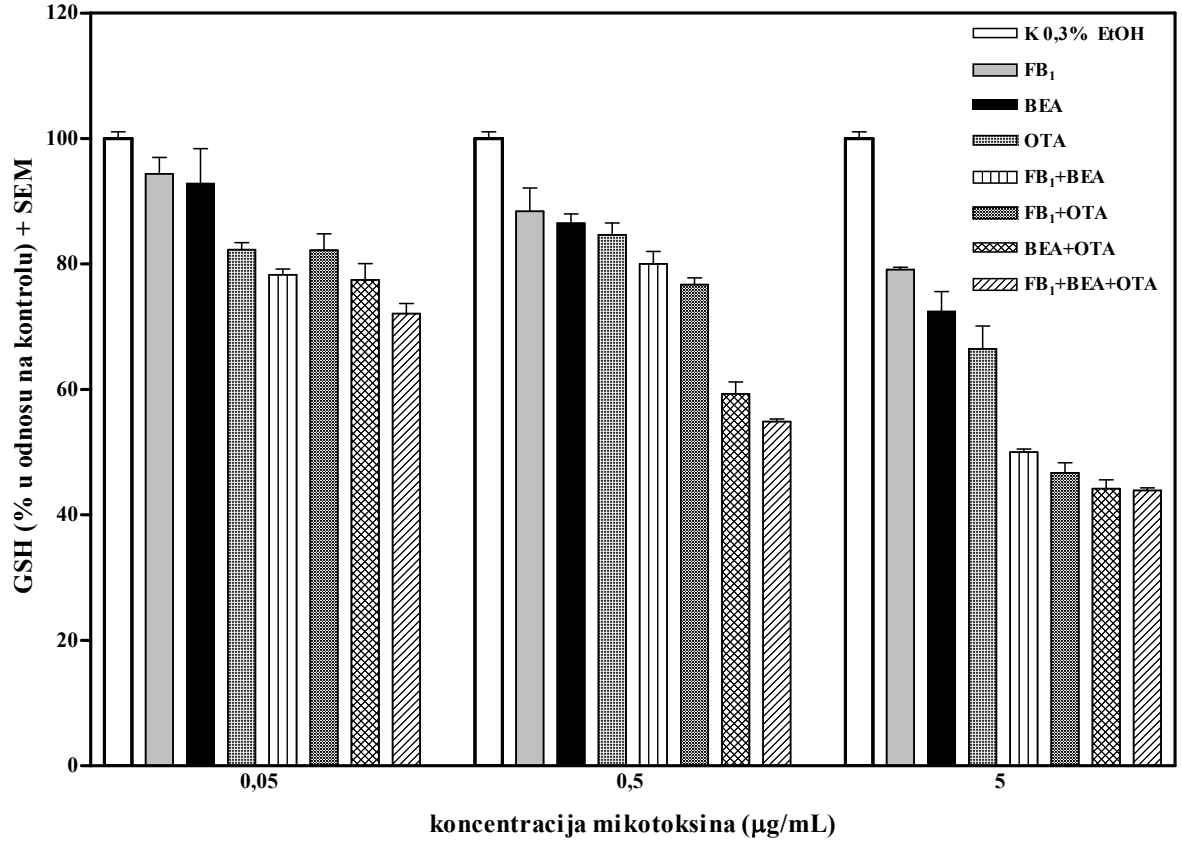
Graf VIII *Povećanje koncentracije lipidnih peroksida u PK 15 satnicama nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica XV *Koncentracija staničnog glutationa (GSH) u PK 15 stanicama nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	GSH (nmol/mg proteina) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		52,3 ± 1,4 [a]	49,0 ± 2,6* [a]	43,8 ± 0,3* [a]
BEA		51,5 ± 3,1 [b]	47,9 ± 0,9* [b]	40,1 ± 1,8* [b]
OTA		45,6 ± 0,7*	46,9 ± 1,0* [c]	36,9 ± 2,1* [c]
FB_1+BEA		43,4 ± 0,6* [a b]	44,4 ± 1,1* [d]	27,2 ± 0,2* [a b]
FB_1+OTA		45,1 ± 1,4* [a]	42,5 ± 0,6* [a e]	25,9 ± 0,8* [a c]
BEA+OTA		42,9 ± 1,6* [b]	32,9 ± 1,1* [b c]	24,5 ± 0,8* [b c]
FB_1+BEA+OTA		39,9 ± 0,8* [a b]	30,5 ± 0,3* [a b c d e]	24,3 ± 0,2* [a b c]
Kontrola (0,3% EtOH)		**55,4 ± 0,6**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam** **sinergizam**



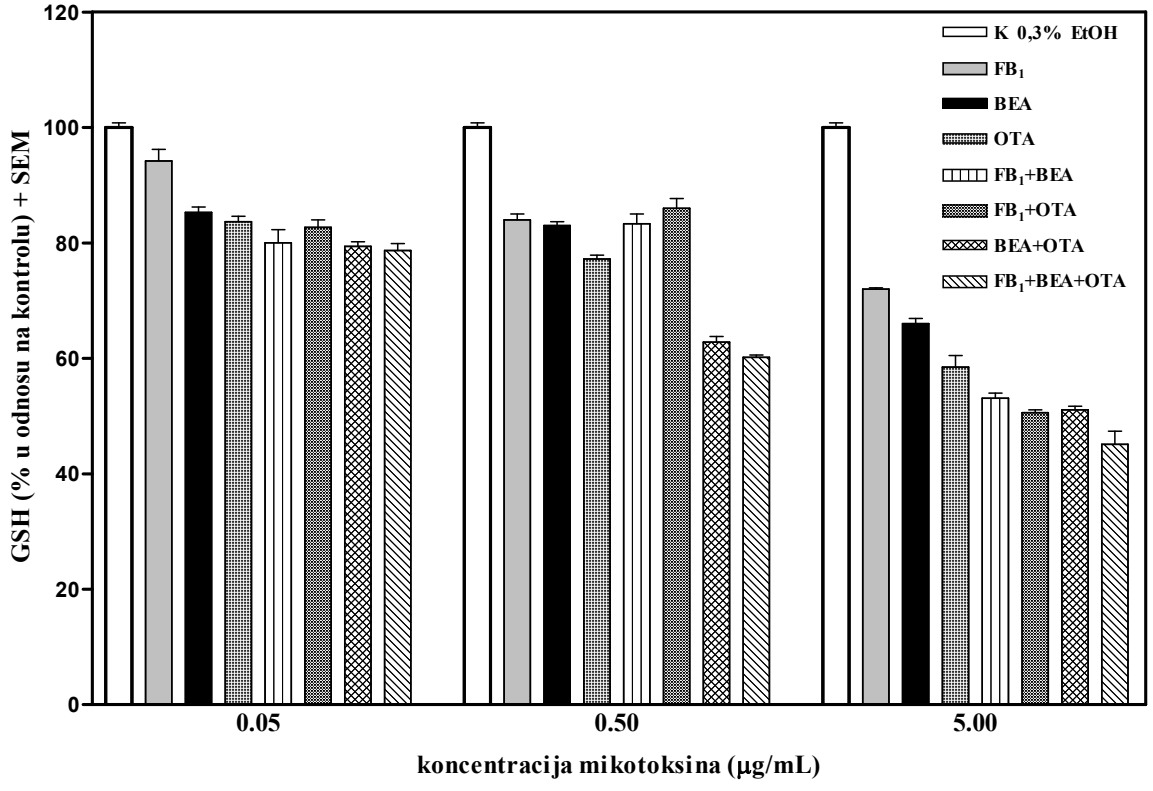
Graf IX *Smanjenje koncentracije GSH nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica XVI *Koncentracija staničnog glutationa (GSH) u PK 15 stanicama nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	GSH (nmol/mg proteina) ± SEM	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1		49,9 ± 1,1* [a]	44,5 ± 0,6* [a]	38,1 ± 0,2* [a]
BEA		45,2 ± 0,5*	44,0 ± 0,4* [b]	34,0 ± 0,4* [b]
OTA		44,3 ± 0,5*	40,9 ± 0,6* [c]	31,0 ± 1,1* [c]
FB_1+BEA		42,3 ± 1,2* [a]	44,1 ± 0,8* [d]	28,1 ± 0,5* [a b d]
FB_1+OTA		43,8 ± 0,7* [a]	45,5 ± 0,06* [c e]	26,8 ± 0,2* [a c]
BEA+OTA		42,0 ± 0,5*	33,2 ± 0,5* [b c]	27,1 ± 0,3* [b c]
FB_1+BEA+OTA		41,7 ± 0,6* [a]	31,9 ± 0,3* [a b c d e]	23,9 ± 1,3* [a b c d]
Kontrola (0,3% EtOH)		**52,9 ± 1,7**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam**



Graf X *Smanjenje koncentracije GSH nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

4.4. INDEKS APOPTOZE I AKTIVACIJA KASPAZE-3

Indeks apoptoze u PK 15 stanicama promatran je na deset vidnih polja srednjeg povećanja, nakon 24-i 48 satnog izlaganja FB_1, BEA i OTA, pojedinačno i u kombinaciji, u koncentracijama 0,05, 0,5 i 5 μg/mL (*Tablica XVII* i *XVIII*).

Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentracijama od 0,05 i 0,5 μg/mL, broj apoptotičkih stanica se statistički značajno ne razlikuje od kontrole. Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji od 5 μg/mL, tri do devet puta veći indeks apoptoze zapažen je u skupinama koje su tretirane s kombinacijama dva i tri mikotoksina u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Pri tom je najveći broj apoptoza zabilježen u skupini BEA+OTA (*Slika VI*). Također je indeks apoptoze dva do četiri puta manji u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijom FB_1+BEA u odnosu na ostale kombinacije mikotoksina ($P<0,05$).

Nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentracijiama od 0,05 i 0,5 μg/mL, indeks apoptoze se bitno ne razlikuje od rezultata 24-satnog tretiranja, izuzev u skupini FB_1+BEA+OTA, gdje je broj apoptoza znatno veći u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je indeks apoptoze znatno manji u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i FB_1+BEA u koncentraciji 0,5 μg/mL, u odnosu na stanice tretirane sa sva tri mikotoksina ($P<0,05$). Izlaganjem stanica mikotoksinima u najvećoj koncentraciji, znatno veći broj apoptoza (2,5 do 3,5 puta) u odnosu na kontrolu zapažen je u stanicama tretiranim s FB_1, FB_1+OTA te BEA+OTA ($P<0,05$). Tretiranjem stanica kombinacijama mikotoksina tijekom 24 i 48 sati izražen je uglavnom aditivan učinak. Sinergističko djelovanje dolazi do izražaja nakon 24-satnog izlaganja stanica kombinaciji BEA+OTA (5 μg/mL), a antagonizam nakon 48 sati tretiranja sa sva tri mikotoksina. Indeks apoptoze u stanicama tretiranim kombinacijama FB_1+OTA, BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA je znatno manji u odnosu na 24-satno izlaganje, vjerojatno zbog nekroze većeg broja stanica.

U *Tablicama XIX* i *XX* prikazana je aktivnost kaspaze-3 u PK 15 stanicama nakon 24- i 48-satnog izlaganja FB_1, BEA i OTA, pojedinačno i u kombinacijama, u koncentracijama 0,05, 0,5 i 5 μg/mL. Aktivnost ovog enzima izrežena je u μmol p–nitroanilina (pNA) koji nastaje hidrolizom supstrata (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid) pomoću kaspaze-3. *Grafovima XI* i *XII* rezultati su prikazani u postotcima u odnosu na kontrolu (0,3% etanol).

Nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u koncentraciji 0,05 μg/mL, aktivnost kaspaze-3 značajno raste u skupinama FB_1+OTA (za 140%), BEA+OTA (za 168%) i FB_1+BEA+OTA (za 228%) u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). U stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima i kombinacijom FB_1+BEA, aktivnost kaspaze-3 se statistički značajno ne

razlikuje od kontrole. Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,5 μg/mL, aktivnost kaspaze-3 se uglavnom neznatno povećava u svim skupinama, izuzev u stanicama tretiranim s BEA+OTA gdje je aktivnost enzima za 110% veća u odnosu na rezultate dobivene nakon tretmana sa deset puta manjom koncentracijom mikotoksina. Aktivnost kaspaze-3 znatno je veća u stanicama tretiranim s OTA (za 84%), FB_1+OTA (za 144%), BEA+OTA (za 296%) i FB_1+BEA+OTA (za 288%) u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Također je aktivnost enzima znatno veća u stanicama tretiranim spomenutim kombinacijama mikotoksina u donosu na pojedinačno aplicirane toksine i FB_1+BEA, čije se vrijednosti statistički ne razlikuju od kontrolnih. Izlaganjem stanica mikotoksinima u koncentraciji 5 μg/mL aktivnost kaspaze-3 se znatno povećava u stanicama tretiranim s FB_1+BEA i to za 220% u odnosu na kontrolu ($P<0,05$) te za 180% u odnosu na rezultate dobivene nakon tretmana s manjim koncentracijama. U ostalim pokusnim skupinama aktivnost kaspaze-3 se uglavnom neznatno povećava u odnosu na vrijednosti dobivene apliciranjem manjih koncentracija mikotoksina pri čemu i statistički odnosi među skupinama ostaju nepromjenjeni.

Nakon 48 stanog izlaganja mikotoksinima, aktivnost kaspaze-3 je tri do šest puta veća u stanicama tretiranim s FB_1 i BEA te kombinacijom FB_1+BEA u odnosu na 24-satno izlaganje. Povećanje aktivnosti enzima nakon 48-satnog tretmana s OTA je manje izraženo. Mjerenjem aktivnosti kaspaze-3 zapaženi su aditivni i sinergistički učinci. Sinergističko djelovanje izraženo je nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA, u koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL te FB_1+BEA i BEA+OTA, u najvećoj apliciranoj koncentraciji. Nakon 48-satnog izlaganja kombinacijama FB_1+OTA, BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u svim navedenim koncentracijama te FB_1+BEA u najvećoj koncentraciji, nije dobiven pozitivan signal što ukazuje na dominaciju nekroze stanica. Kombinacija FB_1+BEA u manjim koncentracijama djeluje aditivno na aktivaciju kaspaze3.

Tablica XVII Indeks apoptoze u PK 15 stanicama nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima

POKUSNE SKUPINE		KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1	**indeks apoptoze ± SEM**	9,5 ± 0,7	9,0 ± 3,5	10,5 ± 3,9 [a]
BEA		10,0 ± 4,2	10,0 ± 4,6	11,7 ± 4,1 [b]
OTA		9,5 ± 2,1	11,0 ± 4,9	9,0 ± 1,4 [c]
FB_1+BEA		13,3 ± 0,3	13,3 ± 3,3	16,0 ± 3,6 * [d]
FB_1+OTA		11,0 ± 2,3	11,7 ± 1,7	32,3 ± 11,5 * [a c]
BEA+OTA		9,7 ± 3,2	14,0 ± 2,6	47,6 ± 4,8 * [b c]
FB_1+BEA+OTA		12,3 ± 8,8	14,7 ± 1,6	31,0 ± 0,0 * [a b c d]
Kontrola (0,3% EtOH)		**5,3 ± 1,8**		

Tablica XVIII Indeks apoptoze u PK 15 stanicama nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima

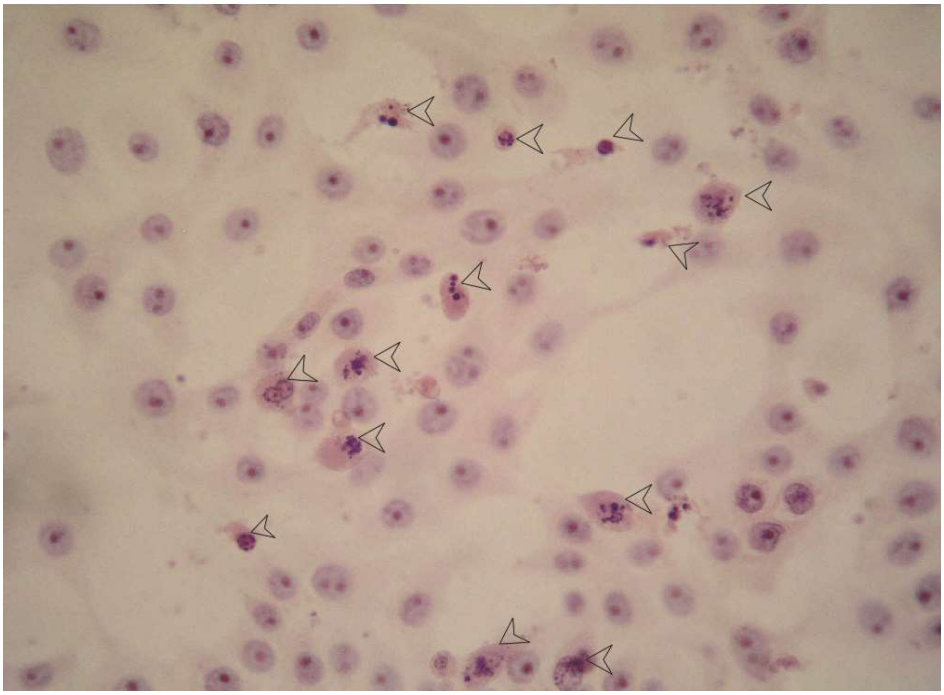
POKUSNE SKUPINE		KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (μg/mL)	0,5 (μg/mL)	5 (μg/mL)
FB_1	**indeks apoptoze ± SEM**	6,7 ± 2,4	11,7 ± 8,1 [a]	17,0 ± 5,7 *
BEA		9,3 ± 0,7	8,7 ± 4,6 [b]	14,7 ± 1,7
OTA		10,0 ± 4,0	10,0 ± 3,0 [c]	16,3 ± 1,2
FB_1+BEA		15,7 ± 6,3	9,0 ± 5,7 [d]	16,7 ± 2,8
FB_1+OTA		13,0 ± 4,0	15,0 ± 7,0	25,0 ± 2,6 *
BEA+OTA		16,6 ± 9,1	13,0 ± 6,1	21,6 ± 10,0 *
FB_1+BEA+OTA		17,3 ± 2,7 *	27,0 ± 7,5 * [a b c d]	11,5 ± 0,5
Kontrola (0,3% EtOH)		**7,0 ± 3,5**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine
* (P<0,05) u odnosu na kontrolu
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05)
[d] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam** **sinergizam**



a



b

Slika VI *Apoptotičke promjene u PK15 stanicama*

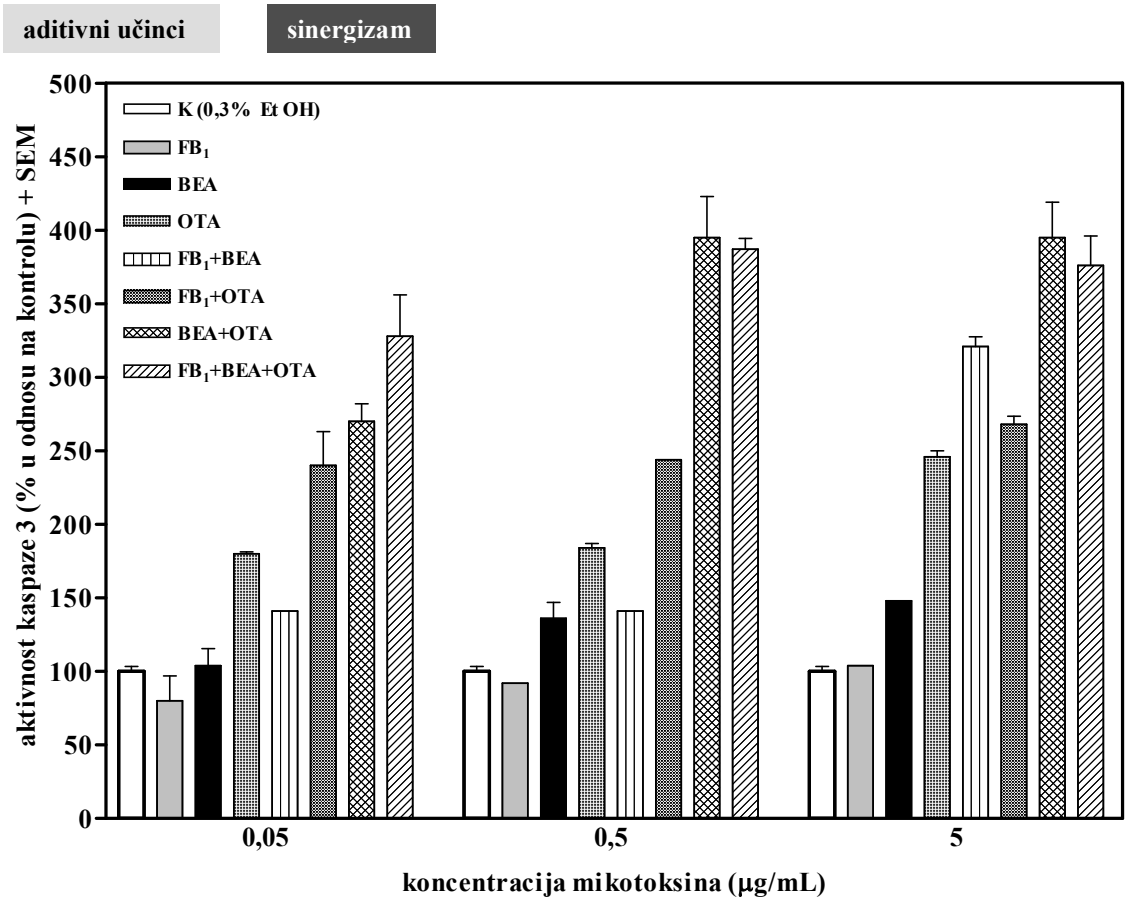
a) Kontrola (0,3% EtOH): morfološki uredne PK15 stanice, bez znakova apoptoze (hemalaun-eozin, 400x)

b) BEA+OTA 24h 5 µg/mL: strelice pokazuju brojne apoptotičke stanice sa fragmentiranim jezgrama (hemalaun-eozin, 400x)

Tablica XIX *Aktivnost kaspaze-3 u PK 15 stanicama nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	µol pNA/min/ml/mg proteina x 10^{-3} ± SEM x 10^{-3}	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (µg/mL)	0,5 (µg/mL)	5 (µg/mL)
FB_1		2,0 ± 0,4 [a]	2,3 ± 0,0 [a]	2,6 ± 0,0 [a]
BEA		2,6 ± 0,3 [b]	3,4 ± 0,3 [b]	3,7 ± 0,0 [b]
OTA		4,5 ± 0,03 [c]	4,6 ± 0,08 * [c]	6,1 ± 0,1 * [c]
FB_1+BEA		3,5 ± 0,0 [d]	3,5 ± 0,0 [d]	8,0 ± 0,1 * [a b]
FB_1+OTA		6,0 ± 0,6 * [a]	6,1 ± 0,0 * [a]	6,7 ± 0,1 * [a]
BEA+OTA		6,7 ± 0,3 * [b c]	9,9 ± 0,7 * [b c]	10,8 ± 0,6 * [b c]
FB_1+BEA+OTA		8,2 ± 0,7 * [a b c d]	9,7 ± 0,2 * [a b c d]	9,4 ± 0,5 * [a b]
Kontrola (0,3% EtOH)		**2,5 ± 0,08**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu;
[a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)



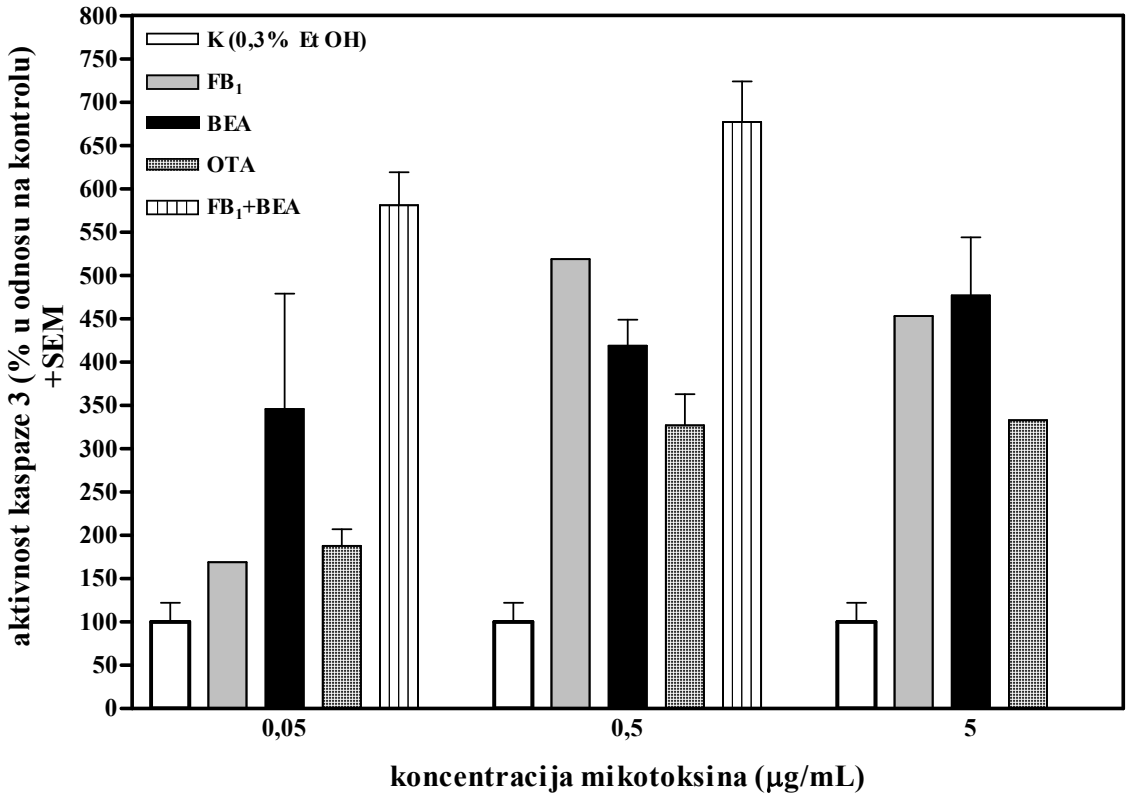
Graf XI *Povećanje aktivnosti kaspaze-3 nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

Tablica XX *Aktivnost kaspaze-3 u PK 15 stanicama nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima*

POKUSNE SKUPINE	µol pNA/min/ml/mg proteina x 10^{-3} ± SEM x 10^{-3}	KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA		
		0,05 (µg/mL)	0,5 (µg/mL)	5 (µg/mL)
FB_1		4,4 ± 0,0 [a]	13,5 ± 0,0 [* a]	11,8 ± 0,0 *
BEA		9,0 ± 3,5	10,9 ± 0,7 [* b]	12,4 ± 1,7 *
OTA		4,9 ± 0,4	8,6 ± 0,9 *	8,7 ± 0,0 *
FB_1+BEA		15,1 ± 1,0 [* a]	17,6 ± 1,4 [* a b]	-
FB_1+OTA		-	-	-
BEA+OTA		-	-	-
FB_1+BEA+OTA		-	-	-
Kontrola (0,3% EtOH)		**2,6 ± 0,6**		

SEM, standardna pogreška aritmetičke sredine; * (P<0,05) u odnosu na kontrolu; [a, b] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); - nema signala

aditivni učinci



Graf XII *Povećanje aktivnosti kaspaze-3 nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima u odnosu na kontrolu*

4.5. GENOTOKSIČNI UČINCI

Genotoksični učinci FB_1, BEA i OTA određeni su brojem stvorenih mikronukleusa (MN), nuklearnih pupova (NP) i nukleoplazmatskih mostova (NPM) na tisuću binuklearnih stanica nakon 24- i 48-satnog izlaganja mikotoksinima, pojedinačno i u kombinaciji (*Tablica XXI* i *XXII*), u koncentracijama od 0,05, 0,5 i 5 μg/mL. S obzirom na veličinu mikronukleus formacija te stvorene nukleoplazmatske mostove FB_1, BEA i OTA imaju klastogeni i aneugeni učinak.

Nakon 24-satnog izlaganja PK 15 stanica navedenim mikotoksinima u koncentraciji 0,05 μg/mL, broj MN se značajno povećava u skupini tretiranoj s OTA (13 MN) te kombinacijama dva i tri mikotoksina (12 do 15 MN), u odnosu na kontrolu (4 MN) ($P<0,05$). Značajno povećanje broja MN zabilježeno je u svim skupinama tretiranim s mikotoksinima u koncentraciji 0,5 μg/mL (15 do 22 MN) i 5 μg/mL (19 do 41 MN) u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). Izlaganjem stanica najvećoj koncentraciji mikotoksina broj MN je znatno veći u skupinama BEA+OTA (36 MN) i FB_1+BEA+OTA (41 MN) u odnosu na pojedinačno aplicirane toksine (18 i 19 MN) ($P<0,05$). Stanice izložene djelovanju sva tri mikotoksina imale su veći broj MN od onih tretiranih s kombinacijama FB_1+BEA (20 MN) i FB_1+OTA (22 MN) ($P<0,05$).

Broj stvorenih NP nije se statistički značajno razlikovao od kontrole (64 NP) nakon 24-satnog izlaganja stanica mikotoksinima u koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL, osim u skupini BEA+OTA (97 NP) tretiranoj s 0,5 μg/mL ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksina u najvećoj koncentraciji broj NP se značajno povećava u stanicama tretiranim s FB_1 (95 NP) FB_1+OTA (99 NP) i FB_1+BEA (104 NP), u odnosu na kontrolne stanice ($P<0,05$). U skupinama FB_1+BEA+OTA (55 NP) i BEA+OTA (50 NP), tretiranim s najvećom koncentracijom, broj NP je znatno manji ($P<0,05$) u odnosu na stanice izložene pojedinačnim mikotoksinima, odnosno kombinacijama FB_1+BEA (104 NP) i FB_1+OTA (99 NP).

Tvorba NPM nije zapažena u kontroli i stanicama tretiranim s FB_1 (0,05 μg/mL). Apliciranjem mikotoksina u najmanjoj koncentraciji broj NPM se kreće od 1 (OTA) do 5 (sva tri mikotoksina). Kod deset puta veće koncentracije mikotoksina broj NPM raste u svim skupinama. Pri tom je broj NPM znatno veći u stanicama tretiranim s FB_1+OTA (8 NPM) te sva tri mikotoksina (9 NPM) u odnosu na pojedinačno aplicirani FB_1 (1 NPM) ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 5 μg/mL broj NPM kreće se od 5 do 12 pri čemu nema statistički značajne razlike među skupinama.

Nakon 48-satnog izlaganja broj MN se značajno ne povećava u stanicama tretiranim s pojedinačnim mikotoksinima (8 do 12 MN) u odnosu na kontrolu (6 MN). U ostalim je slučajevima broj MN znatno veći nego u kontrolnim stanicama ($P<0,05$). Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,05 μg/mL znatno veći broj MN zabilježen je u stanicama tretiranim s FB_1+OTA (19 MN) i FB_1+BEA+OTA (22 MN), u odnosu na pojedinačno aplicirani FB_1 (8 MN), odnosno BEA (10 MN) ($P<0,05$). Nakon 48-satnog izlaganja porast broja MN najviše dolazi do izražaja u stanicama tretiranim s kombinacijama mikotoksina u koncentraciji 0,5 μg/mL, u odnosu na 24-satni tretman. Pri tom je broj MN znatno veći u stanicama izloženim BEA+OTA (34 MN) i FB_1+BEA+OTA (35 MN), u odnosu na pojedinačno aplicirane BEA (18 MN) i FB_1(17 MN) ($P<0,05$). Izlaganjem stanica najvećoj koncentraciji mikotoksina znatno manji broj MN zabilježen je u skupinama tretiranim s pojedinačnim toksinima (20 MN), u odnosu na kombinaciju BEA+OTA (38 MN) ($P<0,05$). U stanicama tretiranim sa tri mikotoksina broj MN je nešto manji u odnosu na 24-satno izlaganje.

Općenito se broj NP smanjuje u svim skupinama ovisno o koncentraciji u usporedbi s rezultatima 24-satnog izlaganja mikotoksinima. Pri tom je broj NP nešto veći u stanicama tretiranim s mikotoksinima u koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL (65 do 85 NP), ali bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (64 NP). Znatno manji broj NP zabilježen je jedino u stanicama tretiranim s kombinacijama dva i tri mikotoksina (42 i 40 NP), u usporedbi s kontrolom ($P<0,05$).

Nakon 48-satnog tretiranja broj NPM se u svim skupinama značajnije ne razlikuje u odnosu na rezultate 24-satnog izlaganja mikotoksinima u istim koncentracijama. U kontrolnim i stanicama tretiranim s FB_1 (0,05 μg/mL) nije zabilježena tvorba NPM. U ostalim skupinama broj NPM kreće se od 3 (BEA) do 9 (FB_1+BEA+OTA). Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji 0,5 μg/mL broj NPM raste u svim skupinama pri čemu je učestalost ove pojave znatno veća u stanicama tretiranim s BEA+OTA (12 NPM) i FB_1+BEA+OTA (13 NPM), u odnosu na pojedinačno aplicirane FB_1 (2 NPM) i BEA (4 NPM) ($P<0,05$). Izlaganjem stanica deset puta većoj koncentraciji mikotoksina broj NPM se značajnije ne povećava u odnosu na rezultate tretiranja koncentracijom 0,5 μg/mL (4-13 NPM). Jedino je učestalost NPM znatno manja u skupini tretiranoj s FB_1 (4 NPM) u odnosu na kombinacije ovog mikotoksina s BEA (13 NPM) i OTA (14 NPM) ($P<0,05$).

Tretiranjem stanica kombinacijama mikotoksina tjekom 24 i 48 sati dominiraju aditivni učinci i to u slučaju tvorbe mikronukleusa i nukleoplazmatskih mostova, dok je u slučaju tvorbe

nuklearnih pupova izraženiji antagonizam. Također se opaža da povećanjem koncentracije mikotoksina raste broj mikronukleusa, a broj nuklearnih pupova se smanjuje, što je izraženije nakon 48-satnog tretmana.

Tablica XXI *Broj mikronukleusa (MN), nuklearnih pupova (NP) i nukleoplazmatskih mostova (NPM) na 1000 binuklearnih (BN) PK15 stanica nakon 24-satnog izlaganja mikotoksinima*

Tretman	Broj BN sa MN			**Ukupno**	Broj BN sa NP			**Ukupno**	**Ukupno**
	1 MN	2 MN	3 MN	**MN**	1 NP	2 NP	3 NP	**NP**	**NPM**
Koncentracija mikotoksina 0,05 μg/mL									
Kontrola (0,3% EtOH)	4	-	-	**4**	52	6	-	**64**	**-**
FB_1	7	1	-	**9**	52	4	-	**60**	**-**
BEA	10	-	-	**10**	47	5	1	**60**	**2**
OTA	11	1	-	**13***	45	9	-	**63**	**1**
FB_1+BEA	10	2	-	**14***	51	16	-	**83**	**4**
FB_1+OTA	10	1	-	**12***	49	20	-	**89**	**3**
BEA+OTA	11	1	-	**13***	47	19	3	**94**	**5**
FB_1+BEA+OTA	11	2	-	**15***	54	16	2	**92**	**5**
Koncentracija mikotoksina 0,5 μg/mL									
FB_1	13	1	-	**15***	48	18	-	**84**	**1** [a]
BEA	13	1	-	**15***	49	16	1	**84**	**4**
OTA	15	1	-	**17***	53	19	-	**91**	**8***
FB_1+BEA	14	2	-	**18***	52	10	3	**81**	**5**
FB_1+OTA	15	2	-	**19***	54	12	3	**87**	**8*** [a]
BEA+OTA	15	2	-	**19***	68	10	3	**97***	**9***
FB_1+BEA+OTA	16	3	-	**22***	67	9	2	**94**	**9*** [a]
Koncentracija mikotoksina 5 μg/mL									
FB_1	15	2	-	**19*** [a]	63	13	2	**95*** [a]	**5**
BEA	18	-	-	**18*** [b]	68	10	-	**88** [b]	**8***
OTA	17	1	-	**19*** [c]	58	11	4	**92** [c]	**10***
FB_1+BEA	18	1	-	**20*** [d]	70	11	3	**104*** [d]	**8***
FB_1+OTA	20	1	-	**22*** [e]	67	16	-	**99*** [e]	**12***
BEA+OTA	32	2	-	**36*** [a b c]	40	5	-	**50** [b c]	**8***
FB_1+BEA+OTA	35	3	-	**41*** [a b c d e]	43	6	-	**55** [a b c d e]	**8***

***** ($P<0,05$) u odnosu na kontrolu; [a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji ($P<0,05$); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji ($P<0,05$)

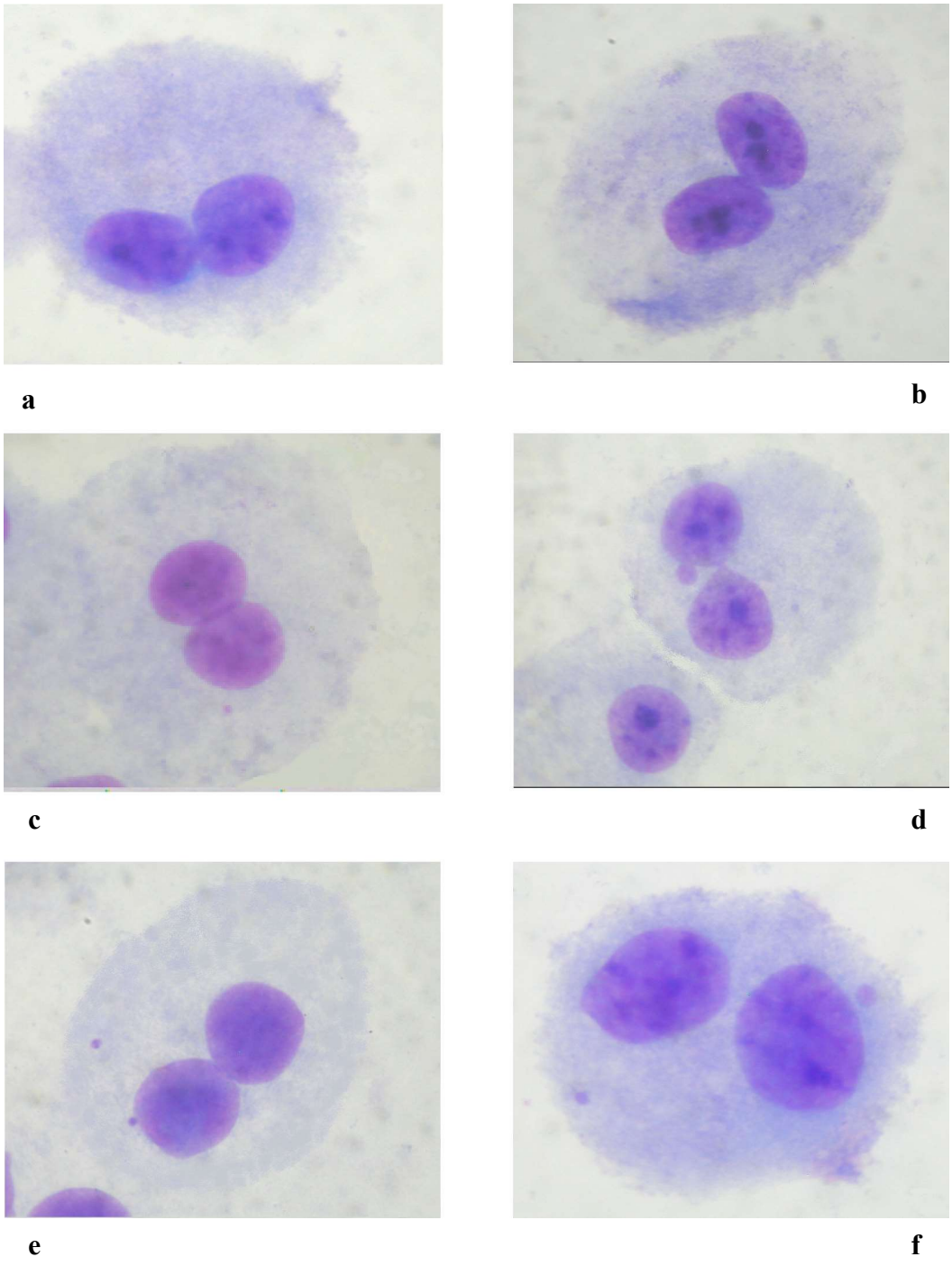
aditivni učinci **antagonizam**

Tablica XXII Broj mikronukleusa (MN), nuklearnih pupova (NP) i nukleoplazmatskih mostova (NPM) na 1000 binuklearnih (BN) PK15 stanica nakon 48-satnog izlaganja mikotoksinima

Tretman	Broj BN sa MN			**Ukupno**	Broj BN sa NP			**Ukupno**	**Ukupno**
	1 MN	2 MN	3 MN	**MN**	1 NP	2 NP	3 NP	**NP**	**NPM**
Koncentracija mikotoksina 0,05 μg/mL									
Kontrola (0,3% EtOH)	4	1	-	**6**	52	6	-	**64**	**-**
FB_1	8	-	-	**8** [a]	42	10	1	**65**	**-**
BEA	10	-	-	**10** [b]	54	8	-	**70**	**3**
OTA	12	-	-	**12**	44	14	3	**67**	**4**
FB_1+BEA	12	2	-	**16***	44	16	-	**72**	**4**
FB_1+OTA	13	3	-	**19*** [a]	46	14	-	**74**	**6***
BEA+OTA	13	3	-	**19***	44	16	-	**72**	**9***
FB_1+BEA+OTA	18	2	-	**22*** [a b]	49	10	-	**69**	**9***
Koncentracija mikotoksina 0,5 μg/mL									
FB_1	13	2	-	**17*** [a]	47	20	-	**87**	**2** [a]
BEA	14	2	-	**18*** [b]	40	22	-	**84**	**4** [b]
OTA	18	2	-	**22***	62	12	-	**86**	**7***
FB_1+BEA	24	-	-	**24***	48	20	-	**88**	**8***
FB_1+OTA	22	2	-	**26***	40	14	-	**68**	**8***
BEA+OTA	22	6	-	**34*** [b]	50	8	-	**66**	**12*** [b]
FB_1+BEA+OTA	27	4	-	**35*** [a b]	52	8	-	**68**	**13*** [a b]
Koncentracija mikotoksina 5 μg/mL									
FB_1	18	2	-	**20*** [a]	45	6	-	**57**	**4** [a]
BEA	17	2	-	**20*** [b]	44	4	-	**52**	**8***
OTA	17	2	-	**20*** [c]	34	8	-	**50**	**8***
FB_1+BEA	28	2	-	**32***	38	4	-	**46**	**13*** [a]
FB_1+OTA	30	-	1	**33***	34	4	-	**42***	**14*** [a]
BEA+OTA	31	2	1	**38*** [b c]	34	4	-	**42***	**13***
FB_1+BEA+OTA	29	1	-	**32***	32	4	-	**40***	**10***

***** (P<0,05) u odnosu na kontrolu; [a, b, c] pojedinačni toksini u odnosu na kombinacije s dva i tri toksina aplicirani u istoj koncentraciji (P<0,05); [d, e] kombinacija s dva mikotoksina u odnosu na kombinaciju s tri mikotoksina u istoj koncentraciji (P<0,05)

aditivni učinci **antagonizam**



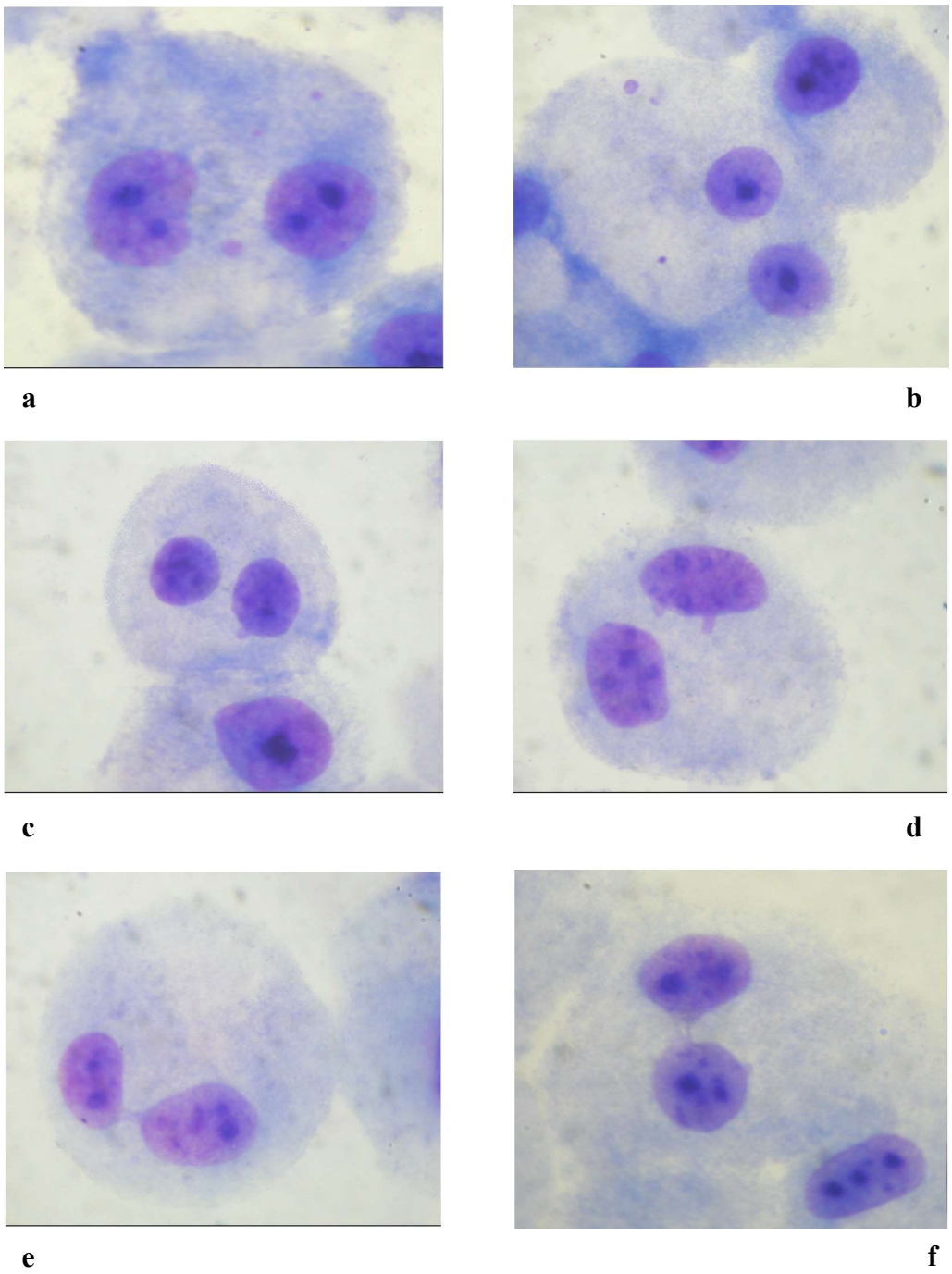
a **b**

c **d**

e **f**

Slika VII *Mikronukleus formacije u PK 15 stanicama (2000x)*

a i b) Izgled normalne binuklearne stanice (kontrola 0,3% EtOH)
c) Binuklearna stanica s jednim mikronukleusom-klastogeni učinak (FB_1, 0,05 μg/mL, 24 h)
d) Binuklearna stanica s jednim mikronukleusom-aneugeni učinak (FB_1, 5 μg/mL, 24 h)
e i f) Binuklearna stanica sa dva mikronukleusa (FB_1+BEA, 0,5 μg/mL, 24 h i FB_1+BEA+OTA, 5 μg/mL, 24 h)



Slika VIII *Mikronukleus formacije, nuklearni pupovi i nukleoplazmatski mostovi u PK 15 stanicama (2000x)*

a i b) Binuklearna stanica s tri mikronukleusa (BEA+OTA i FB_1+OTA, 5 μg/mL, 48 h)
c) Binuklearna stanica s jednim nuklearnim pupom (FB_1, 0,05 μg/mL, 24 h)
d) Binuklearna stanica s dva nuklearna pupa (BEA, 0,05 μg/mL, 24 h)
e) Binuklearna stanica s jednim nukleoplazmatskim mostom (OTA, 0,5 μg/mL, 24 h)
f) Binuklearna stanica s dvostrukim nukleoplazmatskim mostom i jednim nuklearnim pupom (BEA+OTA, 0,5 μg/mL, 24 h)

5. RASPRAVA

Dugogodišnja istraživanja u svijetu i u nas pokazuju da su fumonizin B_1 (FB_1) i okratoksin A (OTA) te njihovi producenti česti kontaminanti kukuruza i drugih žitarica. Fumonizin B_1 izaziva čitav niz patoloških promjena u različitih životinjskih vrsta uključujući leukoencefalomalaciju kopitara, plućni edem u svinja, hepatotoksikozu, nefrotoksičnost, imunotoksičnost u većine ispitanih životinja (Bogler i sur., 2001; Pepeljnjak i sur., 2002), te karcinogenezu u glodavaca (Gelderbloom i sur., 2001). Osim toga, FB_1 se dovodi u vezu s razvojem karcinoma jednjaka i jetre u ljudi iz nekih područja u južnoj Africi i Aziji (Bogler i sur., 2001; Ueno i sur., 1997). Okratoksin A u eksperimentalnih životinja uzrokuje nefrotoksikozu hepatotoksikozu, imunosupresiju, neurotoksičnost, poremećaje koagulacije krvi (Benford i sur., 2001; Krogh, 1980; Thuvander i sur., 1996), teratogenost, mutagenost i karcinogenost (Pfohl-Leskowicz i sur., 1998). U ljudi se izloženost OTA dovodi u vezu s razvojem endemske nefropatije (EN), bolesti bubrega koja se pojavljuje među seoskim stanovništvom zapadne Brodske Posavine. Mogućoj ulozi OTA u razvoju ove bolesti doprinose nalazi povećanih koncentracija OTA u hrani (žitarice, kukuruz, grah, suhomesnati proizvodi) u regiji EN. Na našim područjima, posebice u regiji EN, OTA je dokazan u 8-65% uzoraka žitarica, kukuruza i suhomesnatih proizvoda uglavnom uzetih iz individualnih domaćinstava (Pepeljnjak i Šegvić, 2004). Osim u hrani, OTA je dokazan u krvi ljudi s područja EN (0,2-4,5%) u koncentracijama od 2-50 ng/mL (Radić i sur., 1997). Međutim, OTA je dokazan i u hrani i krvi stanovništva iz neendemskih područja (0,18-0,68 ng/mL) (Peraica i sur., 2001), što dovodi u sumnju mikotoksikološku hipotezu o EN. Nameće se potreba razjašnjavanja moguće uloge OTA, ali i njegove interakcije s drugim nefrotoksinima plijesni kao što je FB_1. Osim FB_1 i OTA, kao svjetski rašireni kontaminant kukuruza pojavljuje se i mikotoksin bovericin (BEA). Njega, kao i FB_1, tvori plijesan vrste *Fusarium verticillioides* (sinonim *F. moniliforame*). Bovericin je poznat po mikrobicidnom djelovanju (Castelbury i sur., 1999). Osim toga, on je specifični inhibitor kolesterol-aciltransferaze u jetri miševa (Tomoda i sur., 1992), djeluje negativno ionotropno i kronotropno na glatke mišiće sisavaca (Lemmens-Gruber i sur., 2000) te citotoksično i apoptotički u staničnim kulturama (Dombrink-Kurtzman i sur., 2003). Zbog visoke učestalosti *F. verticillioides* (10-60%) u kukuruzu na području Hrvatske (Šegvić i Pepeljnjak, 2003), može se očekivati i istodobno pojavljivanje FB_1 i BEA u hrani. Tako su u EN i ne-EN područjima Hrvatske, u velikom broju uzoraka dokazani FB_1+FB_2 (95% 12-11661 ng/g) pri čemu je utvrđena i ko-kontaminacija s okratoksinom A (21% 0,26-614 ng/g) i bovericinom (6,2% 13-1864 ng/g), a

2% uzoraka sadržavalo je sva tri mikotoksina. (Jurjević i sur., 1999, 2002). Istraživanja novijeg datuma također govore u prilog ko-kontaminacije kukuruza s FB_1, FB_2, OTA te zearalenonom (ZEA), pri čemu je 55% uzoraka sadržavalo po tri mikotoksina (Domijan i sur., 2005a).

Istodobno pojavljivanje različitih mikotoksina u hrani svakako nameće potrebu istraživanja njihovih mogućih interakcija. Stoga je u ovom radu ispitivan mehanizam djelovanja FB_1, BEA i OTA i njihove interakcije na staničnoj razini (PK 15-kultura stanica epitela bubrega svinje), praćenjem preživljavanja stanica, integriteta plazmatske i mitohondrijske membrane, razine lipidne peroksidacije i antioksidacijskog kapaciteta stanice te stupnja apoptoze i genotoksičnog učinka niskih koncentracija mikotoksina (0,05 μg/mL, 0,5 μg/mL i 5 μg/mL), tijekom 24 i 48 sati. Kako se stanična linija PK 15 pokazala adekvatnom u ispitivanju citotoksičnosti kombinacija *Fusarium* toksina i ekstrakata plijesni *Fusarium* vrsta (Morrison i sur., 2002; Gulteb i sur., 2002), odabrana je kao model za ispitivanje mehanizama toksičnog djelovanja ovih mikotoksina i njihovih interakcija.

Praćenjem preživljavanja stanica, katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) i glutamat dehidrogenaze (GLDH) utvrđeno je da su FB_1, BEA i OTA toksični za PK 15 stanice. Pri tom vijabilnost stanica i stupanj oštećenja plazmatske membrane (aktivnost LDH) ovise o dozi i vremenu izlaganja dok stupanj oštećenja mitohondrijske membrane (aktivnost GLDH) ovisi samo o dozi mikotoksina. Do značajnog smanjenja vijabilnosti stanica dolazi nakon 24-satnog izlaganja FB_1 (25%), BEA (30%) i OTA (40%) u koncentraciji 5 μg/mL, u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Pri tom nije zabilježeno značajnije otpuštanje LDH. Nakon 48-satnog izlaganja FB_1 u koncentraciji 5 μg/mL vijabilnost stanica se smanjuje za 50%, dok BEA i OTA u istoj koncentraciji smanjuju preživljavanje za 55 i 57% u odnosu na kontrolu. Kod iste koncentracije katalitička aktivnost LDH u staničnom mediju se povećava za 45% (FB_1) i 80% (BEA i OTA) u odnosu na kontrolu ($P<0,05$), dok je aktivnost GLDH za 40% veća od kontrolne vrijednosti ($P<0,05$), nakon 24 i 48-satnog tretiranja s pojedinačnim toksinima, što ukazuje na nekrozu stanica. Tretiranjem PK 15 stanica kombinacijama mikotoksina u nižim koncentracijama (0,05 i 0,5 μg/mL) najviše je izražen aditivan učinak kako na vijabilnost stanica tako i na narušavanje integriteta plazmatske i mitohondrijske membrane. Kod najveće koncentracije toksina zapaža se antagonizam posebice nakon 48-satnog tretmana. Citotoksičnost FB_1 dokazana je na većem broju staničnih linija u širokom rasponu koncentracija pri čemu su se primarne stanice jetre štakora pokazale najosjetljivije (IC_{50}=0,07 μg/mL), a primarni hondrociti i splenociti pilića najotporniji (IC_{50}>144 μg/mL)

(Norred i sur., 1992, Wu i sur., 1995). RK 13 stanice (epitelne stanice bubrega kunića) su osjetljivije na djelovanje FB_1 od PK 15 stanica jer se nakon 48-satnog izlaganja nižim koncentracijama (od 0,07 do 0,36 μg/mL) smanjuje vijabilnost (55-75%) te povećava aktivnost LDH i GLDH u odnosu kontrolu (Rumora i sur., 2002). S druge strane, epitelne stanice bubrega psa (MDCK) i svinje (LLC-PK1) su otpornije na djelovanje FB_1 pri čemu IC_{50} iznose 8,66 μg/mL, odnosno 25 μg/mL (Abbas i sur., 1993; Norred i sur., 1992). Okratoksin A je toksičniji od FB_1 za LLC-PK1 stanice (IC_{50}=20 μg/mL) (Schaaf i sur., 2002). Međutim, u LLC-PK1 i MDCK stanicama tretiranim znatno manjim koncentracijama OTA (2,5 i 1,5 μg/mL) tijekom 12 sati, nakon čega je usljedilo razdoblje oporavka (6-36 sati), dolazi do značajnog smanjenja vijabilnosti i povećanja aktivnosti LDH (20-200%) u odnosu na kontrolu, što ukazuje na ireverzibilno oštećenje membrane iako je toksin uklonjen iz medija (Barišić i sur., 2002). V 79 (plućni fibroblasti kineskog hrčka) i CV-1 stanice (bubrežne stanice afričkog zelenog majmuna) su mnogo osjetljivije na OTA ($IC_{50}\approx$ 1μg/mL) (Kamp i sur., 2005), u usporedbi s LLC-PK1 i PK 15 stanicma. Fumonizin B_1 je relativno slabo toksičan za C6 glioma-stanice mozga štakora (IC_{50}= 32 μg/mL), Caco-2-stanice humanog probavnog sustava (IC_{50}= 22,5 μg/mL) i Vero-stanice epitela bubrega zelenog majmuna (IC_{50}= 46 μg/mL), u usporedbi s OTA koji se pokazao umjereno toksičnim za iste stanične linije (IC_{50}=0,12, 2,9 i 3,7 μg/mL). Pri tom su dokazane sinergističke interakcije kombinacijom umjerene i niske inhibitorne koncentracije toksina (4 μg OTA/mL i 7,2-36 μg FB_1/mL) (Creppy i sur., 2004). Citotoksično djelovanje BEA u relativno niskim koncentracijama dokazano je u stanicama humanog epidermalnog karcinoma (IC_{50}=4,9 μg/mL), humanog karcinoma dojke (IC_{50}=3,8 μg/mL), humanog karcinoma pluća (IC_{50}=3,5 μg/mL) te stanicama leukemije (IC_{50}=1,9 μg/mL) (Nilanonta i sur., 2000; Jow i sur., 2004; Lin i sur., 2005). Bovericin također značajno smanjuje vijabilnost makrofaga periferne krvi purana u koncentraciji od 6,2 μg/mL, a u kombinaciji s FB_1 (5,7 μg/mL) ima aditivan učinak (Dombrink-Kurtzman, 2003). Može se pretpostaviti da će interakcije kombinacija mikotoksina ovisiti o mehanizmu citotoksičnog djelovanja, dozama mikotoksina te osjetljivosti stanične linije. Pri tom je izglednije da će se aditivni, odnosno sinergistički učinci izraziti kombinacijom nižih inhibitornih koncentracija.

Fumonizin B_1, BEA i OTA izazivaju lipidnu peroksidaciju i smanjenje koncentracije glutationa (GSH) u PK15 stanicama ovisno o dozi. Pri tom OTA za 56% povećava koncentraciju TBARS, što je izraženije kod najveće aplicirane koncentracije nakon 24 sata, u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Nakon 48-satnog izlaganja istoj koncentraciji tokisna

koncentracija TBARS je za 57% veća u stanicama tretiranim s FB_1 te za 80% u stanicama tretiranim s BEA ili OTA, u odnosu na kontrolne vrijednosti ($P<0,05$). To znači da nakon duljeg izlaganja, BEA i OTA imaju jači učinak na lipidnu peroksidaciju od FB_1. Povećanje katalitičke aktivnosti LDH u staničnom mediju korelira s povećanjem koncentracija TBARS u PK 15 stanicama. Okratoksin A značajno smanjuje koncentraciju GSH već kod 0,05 μg/mL (za 18%), a FB_1 i BEA kod 0,5 μg/mL (za 15%), što znači da je GSH osjetljivi pokazatelj prooksidacijskog djelovanja ovih mikotoksina. U literaturi još uvijek nema podataka o interakcijama ovih mikotoksina u procesu lipidne peroksidacije i utjecaju na antioksidacijski sustav stanice. Isto tako, nije poznata uloga BEA u ovim događajima u stanicama životinjskog ili humanog podrjetla. Za sada postoji samo jedno izvješće o smanjenju razine reduciranog i povećanju oksidiranog glutationa te smanjenju aktivnosti askorbat peroksidaze (uklanja vodikov peroksid) u rajčici (*Licopersicon esculentum* L.) (Paciolla i sur., 2004), što ukazuje na moguće prooksidacijsko djelovanje BEA. Nakon 24 i 48-satnog tretiranja stanica kombinacijama mikotoksina u svim apliciranim koncentracijama izražen je aditivan učinak u procesu lipidne peroksidacije. Sve kombinacije mikotoksina u koncentraciji od 0,05 μg/mL, kombinacije FB_1+BEA, FB_1+OTA i FB_1+BEA+OTA u koncentraciji 0,5 μg/mL te kombinacije s dva mikotoksina u najvećoj koncentraciji, nakon 24-satnog tretmana, aditivno djeluju na smanjenje razine GSH u stanicama. Sinergizam je zabilježen samo u slučaju BEA+OTA, apliciranih u koncentraciji 0,5 μg/mL, a antagonizam nakon tretiranja stanica s tri toksina u najvećoj koncentraciji. Nakon 48-satnog tretiranja s kombinacijama mikotoksina zapažen je aditivan i antagonistički učinak. Kombinacije FB_1+BEA i FB_1+OTA (0,05 μg/mL) te BEA+OTA (0,5 μg/mL) djeluju aditivno, dok sve ostale kombinacije mikotoksina imaju antagonistički učinak na smanjenje koncentracije GSH u PK15 stanicama. Lipidna peroksidacija narušava integritet membranskih lipida i negativno utječe na fluidnost membrane dovodeći do gubitka funkcije i oštećenja membranski vezanih enzima i receptora (Winrow i sur., 1993). Osim toga, dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih intermedijera kao što su α,β-nezasićeni aldehidi koji se kovalentno vežu za GSH (Glaab i sur., 2001). U LLC-PK1 stanicama tretiranim sa 36 μg FB_1 /mL nakon 24 sata dolazi do značajnog smanjenja razine GSH i povećanja aktivnosti glutation reduktaze (30%), dok se aktivnost glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dizmutaze značajno ne mijenja (Kang i Aleksander, 1996), što znači da su promjene GSH-redoks statusa izrazito osjetljivi pokazatelj prooksidacijskog djelovanja FB_1 kako je utvrđeno i u PK 15 stanicama. Fumonizin B_1 uzrokuje oksidacijski stres u staničnoj kulturi humanih (SH-SY5Y), štakorskih (C6-glioma) i mišjih (GT1-7)

neurona, u širokom rasponu koncentracija (0,07-72 μg/mL), pri čemu se značajno smanjuje razina GSH, a povećava koncentracija lipidnih peroksida bez osobitog učinka na vijabilnost stanica. Kod većih koncentracija je učinak oksidacijskog stresa u korelaciji s povećanjem katalitičke aktivnosti LDH tj. nekrozom stanica (Stockmann-Juvala i sur., 2004). U Vero stanicama, kao i u PK 15 stanicama, FB_1 potiče lipidnu peroksidaciju u vrlo niskim koncentracijama (0,1 do 10 μg/mL) (Abado-Becognee i sur., 1998), u odnosu na ranije spomenutu inhibitornu koncentraciju od 46 μg/mL (Creppy i sur., 2004). Ovi rezultati kao i rezultati dobiveni na PK 15 stanicama upućuju na zaključak da lipidna peroksidacija, odnosno smanjenje antioksidacijskog kapaciteta stanica, što može biti posljedica oksidacijskog stresa, prethode i pridonose citotoksičnom učinku FB_1. Slično je dokazano i u slučaju OTA. Naime, u LLC-PK1 stanicama niska koncentracija OTA (5 μg/mL), nakon 24 sata smanjuje vijabilnost stanica za 40%, dok ista koncentracija znatno povećava tvorbu reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) već nakon 4 sata. Pri tom se značajno smanjenje razine GSH zapaža kod niže koncentracije OTA (2,5 μg/mL) (Schaaf i sur., 2002). U V 79 i CV-1 stanicama veća koncentracija OTA (40 μg/mL) uzrokuje značajno smanjenje GSH već nakon 1 sat vjerojatno zbog povećane lipidne peroksidacije, odnosno stvaranja rekativnih intermedijera koji se vezuju za glutation. S druge strane, OTA u istim staničnim linijama uzrokuje oksidacijska oštećenja DNA u vrlo niskim koncentracijama (≈ 0,4 μg/mL) nakon 24 sata inkubacije, što upućuje na zaključak da oksidacijski stres izazvan ovim mikotoksinom može pokrenuti karcinogene promjene u stanicama, odnosno proliferativni odgovor popraćen citotoksičnim učincima (Kamp i sur., 2005). U usporedbi s do sada spomenutim staničnim linijama, humani gingivalni fibroblasti (HF1) su veoma otporni na citotoksično djelovanje OTA. Naime, veće koncentracije OTA (10 i 20 μg/mL) ne utječu značajnije na vijabilnost stanica i otpuštanje LDH tijekom 48 i 72 sata. Zapravo je znatno veća aktivnost LDH zapažena tek nakon 72-satnog tretiranja s 20 μg OTA /mL. Međutim, znatno veća tvorba ROS-ova, u odnosu na kontrolu, zabilježena je nakon 48-satnog izlaganja manjoj i većoj koncentraciji OTA. Povećanje razine ROS-ova nakon 72-satnog izlaganja korelira s oksidacijskim oštećenjima DNA što upućuje na povezanost oksidacijskog stresa s genotoksičnim učinkom OTA (Russo i sur., 2005). Oksidacijski stres izazvan djelovanjem FB_1 i OTA dokazan je i kod eksperimentalnih životinja. Tretiranjem štakora s većim (250 i 500 mg/kg) i manjim koncentracijama FB_1 (10, 50 i 100 mg/kg) dokazano je povećanje razine TBARS u homogenatu jetre što je također dokazano i u primarnim hepatocitima štakora (54 μg/mL). Pri tom je, kao i kod PK 15 stanica, zapaženo da otpuštanje LDH korelira s povećanjem

koncentracije TBARS (Abel i Gelderblom, 1998). U Wistar štakora, OTA u koncentraciji 120 μg/kg tj.t. (60 dana) uzrokuje povećanu tvorbu lipidnih peroksida u bubrežnom tkivu (36%) i smanjenje katalitičke aktivnosti superoksid dizmutaze (26%), što ukazuju na povećanje prooksidacijskih nasuprot antioksidacijskim događajima u stanici pri čemu nije zabilježena promjena ukupnog antioksidacijskog statusa u bubregu tretiranih skupina (Petrik i sur., 2003). Gautier i sur (2001) izvijestili su da niska koncentracija OTA (1 mg/kg) smanjuje koncentraciju α-tokoferola u plazmi (22%) i uzrokuje pet puta veću ekspresiju proteina toplinskog šoka u bubregu štakora, što ukazuje na oksidacijski stres koji može pridonijeti nefrotoksičnosti i karcinogenezi tijekom duljeg izlaganja niskim koncentracijama. S obzirom na aditivne, odnosno sinergističke interakcije kombinacija niskih koncentracija FB_1, BEA i OTA u povećanoj lipidnoj peroksidaciji, odnosno smanjenju razine glutationa u PK 15 stanicama, također se može pretpostaviti da bi niske koncentracije kombinacija ovih toksina tijekom duljeg izlaganja *in vivo* mogle potaknuti karcinogenezu.

Fumonizin B_1, BEA i OTA uzrokuju aktivaciju kaspaze-3 i apoptozu u PK 15 stanicama što se očituje kondenzacijom kromatina i tvorbom apoptotičkih tjelešaca. Nakon 24-satnog izlaganja indeks apoptoze raste ovisno o koncentraciji pojedinačnih toksina ali bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Apliciranjem mikotoksina u koncentraciji od 5 μg/mL, tri do devet puta veći indeks apoptoze zapažen je u skupinama koje su tretirane s kombinacijama dva i tri mikotoksina u odnosu na kontrolu ($P<0,05$), pri čemu je najveći broj apoptoza zabilježen u skupini BEA+OTA. Tretiranjem stanica tijekom 48 sati u koncentracijama od 0,05 i 0,5 μg/mL, indeks apoptoze se bitno ne razlikuje od rezultata 24-satnog tretiranja, dok se apliciranjem najveće koncentracije značajnije povećava samo u stanicama tretiranim s FB_1. Apliciranjem sva tri toksina u nižim koncentracijama zapaža se povećanje broja apoptotičkih stanica u odnosu na 24-satno izlaganje. Tretiranjem stanica kombinacijama mikotoksina tijekom 24 i 48 sati izražen je uglavnom aditivan učinak. Sinergističko djelovanje dolazi do izražaja nakon 24-satnog izlaganja stanica kombinaciji BEA+OTA (5 μg/mL). Indeks apoptoze u stanicama tretiranim kombinacijama FB_1+OTA, BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u najvećoj koncentraciji znatno je manji u odnosu na 24-satno izlaganje, vjerojatno zbog nekroze većeg broja stanica. Djelovanje pojedinačnih toksina na aktivaciju kaspaze-3 ovisi o dozi. Pri tom jedino OTA nakon 24-satnog izlaganja (0,5 i 5 μg/mL) uzrokuje značajnije povećanje aktivnosti kaspaze-3 u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Ovisnost o duljini izlaganja više je izražena u tretmanu stanica s FB_1 i BEA jer je aktivnost enzima tri do četiri puta veća u odnosu na 24-satno izlaganje. Kombinacije mikotoksina već

kod niskih koncentracija uzrokuju značajno povećanje aktivnosti kaspaze-3 u odnosu na kontrolne vrijednosti pri čemu se očituju aditivne i sinergističke interakcije. Sinergističko djelovanje izraženo je nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL te FB_1+BEA i BEA+OTA u najvećoj apliciranoj koncentraciji. Nakon 48-satnog izlaganja kombinacijama FB_1+OTA, BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u svim navedenim koncentracijama te FB_1+BEA u najvećoj koncentraciji, nije dobiven pozitivan signal što ukazuje na dominaciju nekroze stanica. Tretiranjem humanih stanica proksimalnih tubula bubrega (IHKE) s FB_1 u koncentraciji 7,2 μg/mL utvrđena je inhibicija ceramid sintaze, značajno povećanje koncentracije sfinganina i aktivnosti kaspaze-3, kondenzacija kromatina i fragmentacija DNA. (Seefelder i sur, 2003). Fumonizin B_1 inducira apoptozu LLC-PK_1 stanica u koncentraciji 36 μg/mL što se očitovalo deformacijom stanica, bubrenjem membrane, kondenzacijom kromatina, stvaranjem apoptotičkih tjelešaca i fragmentacijom DNA (Kim i sur., 2001). Pri tom je, osim akumulacije sfinganina, uočena povećana ekspresija kalmodulin mRNA i povećanje koncentracije proteina kalmodulina što je vjerojatno povezano s mehanizmom apoptoze. Naime, apliciranjem FB_1 i β-fluoroalanina spriječena je akumulacija sfingoidnih baza te je fragmentacija DNA sasvim izostala. Isto tako aplikacijom FB_1 i W7 koji je antagonist kalmodulina nije došlo do DNA fragmentacije. U nižim koncentracijama FB_1 (7,2 μg/mL) smanjuje aktivnost protein kinaze C, inhibira traslokaciju nuklearnog faktora kappa B (NF-κB) iz citosola u jezgru te vezivanje NF-κB za DNA u LLC-PK_1 stanicama (Gopee i sur, 2003). Također je zabilježena inhibicija tumor nekrotizirajućeg faktora α (TNFα) i povećana aktivnost kaspaze-3 pri koncentracijama od 0,72 do 7,2 μg/mL tijekom 24 i 48 h. U RK 13 stanicama je utvrđeno da niske koncentracije FB_1 potiču apoptotičke promjene koje vode sekundarnoj nekrozi s obzirom na narušeni integritet stanične i mitohondrijske membrane (Rumora i sur., 2002), što je utvrđeno i u PK 15 stanicama. Izloženost IHKE stanica vrlo niskoj koncentraciji OTA (od 0,004 do 0,4 μg/mL) dovodi do značajnog povećanja aktivnosti kaspaze-3 u odnosu na kontrolu što je dokazano i u PK 15 stanicama. U usporedbi s IHKE stanicama, MDCK-C7 stanice su nešto otpornije na apoptotičko djelovanje OTA s obzirom da se značajno povećanje aktivnosti kaspaze-3 očitava u koncentracijama većim od 0,12 μg/mL (Weber i sur., 2005). Slične promjene u spomenutim staničnim linijama ranije su opisali Schwerdt i sur (1999). Osim toga, OTA (0,04-0,2 μg/mL) potencira proapoptotičko djelovanje TNFα tako što pojačava njegov učinak na aktivaciju c-jun amino-terminal kinaze (JNK), što je više izraženo u MDCK-C7 nego u MDCK-C11 stanicama (Gekle i sur., 2000). Kaspaza-3 može biti aktivirana barem na

dva načina; putem receptora na plazmatskoj membrani ili promjenama u mitohondrijima (Scaffidi i sur., 1998; Acehan i sur., 2002). Inhibicija respiratornog lanca u mitohondrijima i ATP-sintaze, snižavanje izvanstaničnog i unutarstaničnog pH te narušavanje homeostaze kalcija može potencirati apoptotičko djelovanje vrlo niskih koncentracija OTA što se očituje povećanom aktivnošću kaspaze-3 (Schwerdt i sur., 2004; Eder i sur., 2000). Interakcije kombinacija OTA s drugim nefrotoksinima (primjerice cisplatin, kadmij i vodikov-peroksid) ukazuju na aditivno i/ili sinergističko djelovanje niskih koncentracija nefrotoksina (Weber i sur., 2005). Apoptotičko djelovanje BEA (2,3 μg/mL) također uključuje aktivaciju kaspaze-3 nakon 24-satnog tretmana što je dokazano u humanim limfoblastičnim leukemija stanicima te humanim stanicama karcinoma pluća (Jow i sur., 2004; Lin i sur., 2005). Kombiniranim tretiranjem makrofaga periferne krvi purana u koncentraciji od 6,2 μg BEA/mL i 5,7 μg FB_1/ mL dokazan je aditivan učinak na povećanje broja apoptoza (Dombrink-Kurtzman, 2003), što je utvrđeno i mjerenjem indeksa apoptoze u PK 15 stanicama. S obzirom da BEA smanjuje membranski potencijal mitohondrija, dolazi do značajnog otpuštanja citokroma c u citosol što pokreće kaskadu kaspaza i aktivaciju kaspaze-3 te smrt stanice. Osim toga, niska koncentracija BEA uzrokuje značajno povećanje intracelularnog kalcija što potiče apoptozu stanica. U navedenim stanicama, kao i u PK 15 je zabilježeno značajnije otpuštanje LDH pri koncentracijama koje su veće od onih koje potiču apoptotičke procese i značajnije smanjuju vijabilnost stanica, što znači da je pri niskim koncentracijama BEA smrt apoptozom više izražena od nekroze. Isto je zabilježeno u slučaju tretiranja stanica s OTA i FB_1. Kako tretiranjem PK 15 stanica kombinacijama toksina tijekom 48-sati nije bilo moguće dobiti pozitivan signal kaspaze-3 vjerojatno je došlo do nekroze većeg broja stanica, na što ukazuje i značajnije povećanje aktivnosti LDH i GLDH.

Fumonizin B_1, BEA i OTA djeluju genotoksično u PK 15 stanicama, a s obzirom na veličinu mikronukleus formacija i tvorbu nukleoplazmatskih mostova, pokazuju više klastogeni, a manje aneugeni učinak. U koncentraciji od 0,05 μg/mL samo OTA značajno povećava broj mikronukleusa u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Apliciranjem većih koncentracija, sva tri mikotoksina djeluju podjednako genotoksično pri čemu se zapaža ovisnost o dozi ali ne i o duljini izlaganja. S obzirom na tvorbu nukleoplazmatskih mostova, OTA i BEA imaju izraženiji klastogeni učinak od FB_1. Broj nuklearnih pupova se značajnije povećava u odnosu na kontrolu tek nakon tretmana s pojedinačnim toksinima u koncentraciji od 5 μg/mL ($P<0,05$). Međutim, kako kombiniranim apliciranjem mikotoksina (5 μg/mL) raste broj mikronukleusa, broj nuklearnih pupova se smanjuje, što je izraženije nakon 48-satnog

tretmana. Tretiranjem stanica kombinacijama mikotoksina tijekom 24 i 48 sati dominiraju aditivni učinci i to u slučaju tvorbe mikronukleusa i nukleoplazmatskih mostova, dok je u slučaju tvorbe nuklearnih pupova izraženiji antagonizam. Također je utvrđeno da kombinacija BEA i OTA ima više izraženo genotoksično djelovanje od ostalih kombinacija mikotoksina.

Ispitivanjem genotoksičnosti FB_1 i OTA *in vitro* različitim metodama dobiveni su oprečni rezultati što vjerojatno ovisi o tipu stanične kulture, osjetljivosti metode i primijenjenim koncentracijama. Bioluminescentnim testom genotoksičnosti na *Vibrio fischeri* dokazano je mutageno djelovanje FB_1, što je u kontradikciji s rezultatima dobivenim Ames-ovim testom, kada je dokazana citotoksičnost ali ne i mutagenost FB_1 (Bjeldanes i Thomson, 1979; Gelderblom i Snyman, 1991; Sun i sur., 1993). S druge strane, u RK 13 stanicama kao i u PK 15 stanicama, niske koncentracije FB_1 djeluju genotoksično, što se očitivalo povećanjem broja mikronukleusa ovisno o dozi (Rumora i sur., 2002). Također je genotoksično djelovanje FB_1 dokazano u humanim hepatoma stanicama (HepG2), u koncentraciji 25 μg/mL pri čemu je zapaženo značajno povećanje broja mikronukleusa (Ehrlich i sur., 2002a). Kao i u slučaju FB_1, OTA nije dao pozitivne rezultate Ames-ovim testom na *S. typhimurium* TA 1535, 1538 i 98. Odnosno, mutageno djelovanje OTA bilo je utvrđeno tek nakon metaboličke aktivacije s mikrosomalnom frakcijom bubrega miša (Obrecht-Pfulmio i sur., 1999). Tvorba mikronukleusa, odnosno izraženiji klastogeni učinak OTA, dokazan je u kulturi ovčjih sjemenih vrećica (OSV) nakon tretiranja s 5-12 μg/mL OTA te u humanim HepG2 stanicama pri koncentraciji OTA od 5-25 μg/mL (Degan i sur., 1997; Echrlich i sur., 2002b). Ova saznanja uključujući i rezultate dobivene na PK 15 stanicama, govore u prilog mutagenom učinku FB_1 i OTA te njihovom mogućem karcinogenom djelovanju u ljudi. Bovericin se pokazao umjereno toksičnim u testu bakterijske bioluminescencije *Vibrio fischeri* (EC_{50} 94 ± 9 μg/mL). Međutim, Ames-ovim testom na 5 standardnih sojeva *Salmonella typhimurium* BEA nije pokazao mutageni učinak u koncentraciji 2 μg/ploča (spot test) te u rasponu koncentracija od 0,2 do 500 μg/ploča (ugradnja u ploču) (Fotso i Smith, 2003). S obzirom na genotoksično djelovanje BEA u PK 15 stanicama, mogući mutageni učinak *in vitro* i *in vivo* se ne može zanemariti. Kako kombinacije FB_1 s OTA ili BEA pokazuju aditivne genotoksične učinake u niskim koncentracijam, može se pretpostaviti da bi ovi mikotoksini tijekom dulje izloženosti mogli potaknuti karcinogene promjene *in vivo*.

Fumonizin B_1, bovericin i okratoksin A djeluju citotoksično i genotoksično na PK 15 stanice, izazivajući lipidnu peroksidaciju, smanjujući razinu glutationa te izazivajući apoptozu i nekrozu ovisno o dozi. Pri tom su kod kombinacija ovih mikotoksina, u koncentracijama od

0,05 i 0,5 μg/mL, najviše izražene aditivne interakcije, dok najveća koncentracija uglavnom pokazuje antagonistički učinak, posebice nakon 48-satnog tretmana. Sinergističke interakcije ovih mikotoksina odražavaju se na aktivnost kaspaze-3. *In vivo* istraživanja su pokazala da unos mikotoksina u koncentracijama koje ne izazivaju kliničku sliku mikotoksikoza, uzrokuje imunosupresiju (Corrier, 1999). Pri tom oksidacijski stres uzrokovan mikotoksinima može dovesti do narušavanja komunikacije među stanicama imunološkog sustava. Tome pridonose saznanja o aditivnom učinku niskih koncentracija nivalenola (0,1 μM) i T-2 toksina (0,001 μM), odnosno DAS (0,0025 μM) i DON (0,25 μM) na inhibiciju proliferacije humanih limfocita (Thuvander i sur., 1999). U svinja je dokazano da kombinirano tretiranje s niskim koncentracijama OTA (7 μg/kg tj. t.) i FB_1/FB_2 (15 μg/kg tj. t) tijekom 36 dana ima aditivan učinak na smanjenje fagocitne sposobnosti makrofaga (Müller i sur., 1999). S druge strane, izrazito visoke koncentracije FB_1 i OTA *in vivo* izazivaju uginuće životinja (Diaz i sur., 2001). Naime, nakon hranjenja praščića s prirodno kontaminiranom hranom koja je sadržavala FB_1 (10-40 mg/kg) i OTA (20-39 mg/kg), došlo je do uginuća životinja pri čemu su utvrđene patološke promjene karakteristične za oba mikotoksina (plućni edem, oštećenja jetre i bubrega) što upućuje na sinergizam ovih mikotoksina. Na temelju rezultata dobivenih na PK 15 stanicama može se pretpostaviti da će niske koncentracije FB_1, BEA i OTA imati aditivno i/ili sinergističko djelovanje *in vivo* što se negativno odražava na antioksidacijski sustav u stanicama dovodeći do oštećenje staničnih makromolekula (lipida, proteina i DNA), što može izazvati prvo imunosupresiju, a zatim nakon dulje izloženosti nefrotoksikozu i karcinogenezu.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ispitivanja morfoloških i biokemijskih promjena u PK 15 stanicama nakon 24 i 48-satnog tretiranja s fumonizinom B_1 (FB_1), bovericinom (BEA) i okratoksinom A (OTA), pojedinačno i u kombinacijama, u koncentracijama od 0,05, 0,5 i 5 μg/mL, može se zaključiti sljedeće:

FB_1, BEA i OTA su citotoksični za PK 15 stanice što se očituje značajnim smanjenjm vijabilnosti nakon 24-satnog izlaganja u koncentraciji od 5 μg/mL i povećanjem katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze nakon 48-satnog izlaganja istoj koncentraciji. Do oštećenja mitohondrijske membrane dolazi nakon 24-satnog izlaganja pojedinačnim mikotoksinima u koncentracijama od 0,5 i 5 μg/mL, što se očituje značajno povećanom aktivnošću glutamat dehidrogenaze.

Sva tri mikotoksina pojedinačnim apliciranjem u koncentraciji od 5 μg/mL značajno stimuliraju lipidnu peroksidaciju ovisno o vremenu izloženosti. Pri tom OTA nakon 24-satnog izlaganja povećava razinu lipidnih preoksida za 56%, a FB_1 i BEA za 57%, odnosno 80% nakon 48-satnog tretmana stanica.

Okratoksin A u koncentraciji od 0,05 μg/mL, nakon 24-satnog izlaganja, značajno smanjuje koncentraciju glutationa u PK 15 stanicama (za 18%), dok FB_1 i BEA aplicirani u deset puta većoj koncentraciji, smanjuju razinu glutationa za 15% što ukazuje na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta stanice.

Fumonizin B_1, BEA i OTA uzrokuju apoptozu PK 15 stanica pri čemu se značajnije morfološke promjene koje odgovaraju apoptozi zamjećuju nakon 48-satnog izlaganja pojedinačnim toksinima.

Okratoksin A povećava aktivnost kaspaze-3 za 84% već nakon 24-stanog tretiranja u koncentraciji od 0,5 μg/mL, dok FB_1 i BEA za 419%, odnosno 319% povećavaju aktivnosti ovog enzima nakon 48-satnog izlaganja istoj koncentraciji.

Pri koncentracijama od 0,05 i 0,5 μg/mL FB_1, BEA i OTA više je izraženo ugibanje stanica apoptozom, a pri koncentraciji od 5 μg/mL nekrozom.

FB_1 i BEA su genotoksični za PK 15 stanice u koncentracijama od 0,5 i 5 μg/mL, dok OTA značajno povećava broj mikronukleusa već u koncentraciji od 0,05 μg/mL. Sva tri mikotoksina imaju klastogeni i aneugeni učinak pri čemu je klastogeno djelovanje OTA i BEA više izraženo. Kombinacije mikotoksina tijekom 24 i 48 sati uglavnom djeluju aditivno genotoksično što se odražava na tvorbu mikronukleusa i nukleoplazmatskih mostova, dok je u slučaju tvorbe nuklearnih pupova izraženiji antagonizam.

U koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL nakon 24-i 48-satnog izlaganja, kombinacije FB_1+BEA, FB_1+OTA, BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA pokazuju uglavnom aditivane interakcije koje se odražavaju na smanjenje vijabilnosti, narušavanje integriteta stanične i mitohondrijske membrane, stimulaciju lipidne peroksidacije i smanjenje antioksidacijskog kapaciteta stanice. Također, kombinirano tretiranje stanica mikotoksina, u koncentraciji od 5 μg/mL, aditivno djeluju na stimulaciju lipidne peroksidacije.

Bovericin i OTA (0,5 μg/mL) sinergistički djeluju na smanjenje razine glutationa, a u koncentraciji od 5 μg/mL sinergistički povećavaju indeks apoptoze u PK 15 stanicama, nakon 24-satnog tretiranja. Kombinacije BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u koncentracijama od 0,05 i 0,5 μg/mL te FB_1+BEA i BEA+OTA u koncentraciji od 5 μg/mL, djeluju sinergistički na povećanje aktivnosti kaspaze-3 nakon 24-satnog tretmana.

Kombinacije toksina u najvećoj koncentraciji uglavnom djeluju antagonistički na smanjenje vijabilnosti, povećanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze i glutamat dehidrogenaze te smanjenje koncentracije glutationa u PK 15 stanicama, posebice nakon 48-satnog tretiranja.

Dobiveni rezultati upućuju na to da se istodobni unos niskih koncentracija ispitivanih mikotoksina putem hrane negativno odražava na antioksidacijski sustav te može pridonjeti imunosupresiji, nefrotoksičnosti i karcinogenezi u životinja i ljudi tijekom dulje izloženosti.

7. LITERATURA

Abado-Becognee K, Mobio TA, Ennamany R, Fleurat-Lessard F, Shier WT, Badria F, Creppy EE (1998) Cytotoxicity of fumonisin B_1: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein DNA syntheses. Arch Toxicol 72: 233-236.

Abbas HK, Gelderblom WCA, Cawood ME, Shier WT (1993) Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme* in jimsonweed (*Datura stramonium* L.) and mammalian cell cultures. Toxicon 31: 345-353.

Abbas HK, Ocamb CM (1995) First report of production of fumonisin B_1 by *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. Plant Dis 79: 642.

Abbas HK, Ocamb CM, Xie WP, Mirocha CJ, Shier WT (1995) First report of fumonisin B_1, B_2 and B_3 produced by *Fusarium oxysporum* var. *redolens*. Plant Dis 79: 968.

Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS (1999) Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. J Appl Toxicol 19: 7-12.

Abel S, Gelderblom WCA (1998) Oxidative damage and fumonisin B_1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver *in vivo*. Toxicology 131: 121-131.

Abnet CC, Borkowf, CB, Qiao YL, Albert PS, Wang E, Merrill AH, Mark SD, Dong ZW, Taylor PR, Dawsey SM (2001) Sphingolipids as biomarkers of fumonisin exposure and risk of esophageal squamous cell carcinoma in China. Cancer Causes Control 12. 821-828.

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. Mol Cell 9: 423-432.

Albassam MA, Yong SI, Bhatnagar R, Sharma AK, Prior MG (1987) Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. Vet Pathol 424: 427-435.

Al-Omar MA, Beedham C, Alsarra IA (2004) Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. Saudi Pharm J 12:1-18.

Alvarez L, Gil AG, Ezpeleta O, Garcia-Jalon JA, de cerain AL (2004) Immunotoxic effects of ochratoxin A in Wistar rats after oral administration. Food Chem Toxicol 42: 825-834.

Aydin G, Ozcelik N, Cicek E, Soyoz M (2003) Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by ochratoxin A and melatonin in rats. Hum Exp Toxicol 22: 383-391.

Bailly JD, Benard G, Jouglar JY, Durand S, Guerre P (2001) Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B_1 in ducks. Toxicology 163: 11-22.

Banczerowski-Pelyhe L, Detari L, Vilagi I, Kukorelli T (2002) Nerve conduction velocity and spinal reflex may change in rats after fumonisin B_1 exposure. Acta Biol Hun 53: 413-422.

Barišić K, Petrik J, Rumora L (2003) Biochemistry of apoptotic cell death. Acta Pharm 53: 151-164.

Barišić K, Petrik J, Rumora L, Čepelak I; Žanić-Grubišić T (2002) Expression of Hsp70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. Arch Toxicol 76: 218-226.

Baudrimont I, Betbeder A, Creppy EE (1997) Reduction of the ochratoxin A-induced cytotoxicity in Vero cells by aspartame. Arch Toxicol 71: 290-298.

Baudrimont I, Betbeder A, Gharbi AM, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G, Creppy EE (1994) Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. Toxicology 89: 101-111.

Belmadani A, Tramu G, betbeder AM, Steyn PS, Creppy EE (1998) Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and citotoxicity in rat brain. Arch Toxicol 72: 656-562.

Bendele AM, Carlton WW, Krogh P, Lillehoj EB (1985b) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6JxC3H)F1 mouse. J Natl Cancer Inst 75: 733-742.

Bendele AM, Neal SB, Oberly TJ, Thompson CZ, Bewsey BJ, Hill LE, Rexroat Ma, Carlton WW, Probst GS (1985a) Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. Food Chem Toxicol 23: 911-918.

Benford D, Boyle C, Dekant W, Fuchs R, Gaylor DW, Hard G, McGregor DB; Pitt JI, Pleština R, Shepard G, Solfrizzo M, Verger PJP, Walker R (2001) Ochratoxin A. U: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva, WHO Food Additives series 47, 281-415.

Benz R (1978) Alkali ion transport through lipid bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. J Membr Biol 43: 367-394.

Bernardini M, Carilli A, Pacioni G, Santurbano B (1975) Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. Phytochemistry 14: 1865.

Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorstallman RMM, Marasas WFO, Spiteller G, Vleggaar R (1988) Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J Chem Soc Chem Commun 11: 743-745.

Bjeldanes LF, Thomson SV (1979) Mutagenic activity of *Fusarium moniliforme* isolates in *Salmonella typhimurium* assay. Appl Environ Microbiol 37: 1118-1121.

Bolger M, Coker RD, DiNovi M, Gaylor D, Gelderblom WCA, Olsen M, Paster N, Riley RT, Shepard G, Speijers GJA (2001) Fumonisins U: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva, WHO Food Additives series 47, 103-279.

Bondy G, Pestka JJ (2000) Immunomodulation by fungal toxins. J Toxicol Environ Health 3: 109-143.

Borner C (2003) Bcl-2protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol 39: 615-647.

Bottalico A, Logrieco A, Ritieni A, Moretti A, Randazzo G, Corda P (1995) Beauvericin and fumonisin B_1 in prehravest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. Food Addit Contam 12: 599-607.

Bouhet S, hourcade E, Loiseau N, Fikry A, Martinez S, Roselli M, Galtier P, Mengheri E, Oswald IP (2004) The mycotoxin fumonisin B_1 alters the proliferation and the barier function of porcine intestinal epithelial cells. Toxicol Sci 77: 165-171.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Braunberg RC, Gantt O, Barton C, Friedman L (1992) *In vitro* effects of the nephrotoxin ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. Arch Environ Contam Toxicol 22: 464-470.

Breitholtz-Emanuelsson A, Fuchs R, Hult K (1995) Toxicokinetics of ochratoxin A in rat following intratracheal administration. Nat Toxins 3: 101-103.

Bruinink A, Rasonyi T, Sidler C (1998) Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha *in vitro*. Nat Toxins 6: 173-177.

Bucci TJ, Howard PC, Tolleson WH, Laborde JB, Hansen DK (1998) Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals. Toxic Pathol 26: 160-164.

Bullerman LB, Tsai WYJ (1994) Incidence and level of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn. J Food Prot 57: 541-546.

Calo L, Fornelli F, Ramires R, Nenna S, Tursi A, Caiaffa MF, Macchia L (2004) Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. Pharmacol Res 49: 73-77.

Castegnaro M, Maru V, Petkova-Bocharova T, Nikolov I, Bartsch H (1991) Concentrations of ochratoxin A in the urine of endemic nephropathy patients and controls in Bulgaria: lack of detection of 4-hydroxyochratoxin A. U: Castegnaro M, Pleština R, Driheimer

G, Chernozemsky IN, Bartsch H (ur.) Mycotoxiny, endemic nephropathy and urinary tract tumours (IARC Scientific Publications No. 115) Lyon, IARCPress, 165-169.
Castegnaro M, Mohr U, Pfohl-Leskowicz A, Esteve J, Steinmann J (1998) Seks- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. Int J Cancer 77: 70-75.
Castelbury LA, Sutherland JB, Tanner LA, henderson AL, Cerniglia CE (1999) Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. World J Microbiol Biotechnol 15: 119-121.
Cawood ME, Gelderblom WCA, Vleggaar R, Behrend Y, Thiel PG, Marasas WFO (1991) Isolation of the fumonisin mycotoxins; a quantitative approach. J Agric Food Chem 39: 1958-1962.
Chatterjee D, Mukherjee SK, Dey A (1995) Nuclear disintegration in chicken peritoneal macrophages exposed to fumonisin B_1 from Indian maize. Lett Appl Microbiol 20: 184-185.
Chene P (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 3: 102-109.
Chiou TJ, Tzeng WF (2000) The roles od glutathion and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. Toxicology 145: 75-84.
Chu FS, Li GY (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B_1 and other mycotoxins in moldy corn from Peoples Republic of China in regions with high incidence of oesophageal cancer. Appl Environ Microbiol 60: 847-852.
Colvin BM, Cooley AJ, Beaver RW (1993) Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathologic findings J Vet Diagn Invest 5: 232-241.
Constable PD, Smith GW, Rottinghaus GE, Haschek WM (2000) Ingestion of fumonisin B_1-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. Toxicol Appl Pharmacol 162: 151-160.
Corrier DE (1991) Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. Vet Immunol Immunopathol 30: 73-87.
Cory S, Adams JM (2002) The Bcl-2 family: regulators of the cellular life or death switch. Nat Rev Cancer 2: 647-656.
Creppy EE, Chakor K, Fisher MJ, Dirheimer G (1990) The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxilase in isolated rat hepatocytes *in vivo*. Arch Toxicol 64: 279-284.
Creppy EE, Chirappa P, Baudrimont I, Borracci P, Moukha S, Carratu MR (2004) Synergistic effects of fumonisn B_1 and ochratoxin A: are *in vitro* cytotoxicity data predictive of *in vivo* acute toxicity?. Toxicology 201: 115-123.
Creppy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet 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.
Creppy EE, Roschenthaler R, Dirheimer G (1984) Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. Food Chem Toxicol 22: 883-886.
Creppy EE, Schlegal M, Roschenthaler R, Dirheimer G (1980) Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. Toxicol Lett 6: 77-80.
Čeović S, Hrabar A, Šarić M (1992) Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. Food Chem Toxicol 30: 183-188.
Čepelak I, Dodig S (2003) Glutation i oksidacijski stres. Biochem Med 13: 93-100.
Date T, Belanger AJ, Mochizuki S, Sullivan JA, Liu LX, Scaria A, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C (2002) Adenovirus mediated expression of p53 prevents hypoxia/reoxygenation injury by reducing reactive oxygen species and caspase activity. Cardiovasc Res 55: 309-319.

De Nijs M, van Egmond HP, Nauta M, Rombouts FM, Notermans SHW (1998) Assesment of human exposure to fumonisin B_1. J Food Prot 61: 879-884.
Degan GH, Greber MM, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G (1997) Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. Arch Toxicol 71: 365-371.
Denault JB, Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of the cell death. Chem Rev 102: 4489-4500.
Di Paola R, Nenna S, Fomelli F, Moretti A, Logrieco A, Caiaffa MF, Botallico A, Tursi A, Macchia L (1994) Cytotoxicity of beauvericin on human B-lymphocyte cell lines. Allergy Clinic Immun 2: 256.
Diaz CT, Sogbe E, Ascanio E, Hernandez M (2001) Ochratoxin A and fumonisin B_1 natural interaction in pigs. Cinical and pathological studies. Rev Cient Fac Cien V: 314-321.
Doel BS, Ridley DD, Singh P (1978) Isolation of cyclodepsipeptides from plant pathogenic fungi. Australian J Chem 31: 1397-1399.
Dombrink-Kurtzman MA (2003) Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes. Mycopathologia 156: 357-364.
Dombrink-Kurtzman MA, Bennett GA, Richard JL (1994) An optimised MTT bioassay for determination of cytotoxicity of fumonisins in turkey lymphocytes. J Assoc Off Anal Chem 77: 512-516.
Domijan AM, Peraica M (2005) Ochratoxin A in wine. Arh Hig Rada Toksikol 56: 17-20.
Domijan AM, Peraica M, Jurjević Ž, Ivić D, Cvjetković B (2005a) Fumonisin B_1, fumonisin B_2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. Food Add Contam 22: 677-680.
Domijan AM, Peraica M, Žlender V, Cvjetković B, Jurjević Ž, Topolovec-Pintarić S, Ivić D (2005b) Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. Food Chem Toxicol 43: 427-432.
Dortant PM, Peters-Volleberg GWM, Van Loveren H, Marquardt RR, Speijers GJA (2001) Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. Food Chem Toxicol 39: 55-65.
Eder S, Benesic A, Freudinger R, Engert J, Schwerdt G, Drumm K, Gekle M (2000) Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. Pflugers Arch 440: 521-529.
Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Zsivkovits M, Knasmueller S (2002a) Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. Mutagenesis 17: 257-260.
Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Gann M, Majer BJ, Eisenbauer M, Knasmueller S (2002b) Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. Food Chem Toxicol 40: 1085-1090.
Enongene EN, Sharma RP, Voss KA, Riley RT (2000) Subcutaneous fumonisin administration disrupts sphingolipid metabolism in mouse digestive epithelia, liver, and kidney. Food Chem Toxicol 38: 793-799.
Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) HUMN project: detailes desription of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocite cultures. Mutation Research 534: 65-75.
Fenech M, Crott JW (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in cytoxinesis-block micronucleus assay. Mutation Research 504: 131-136.

Foreman JH, Constable PD, Waggoner AL, Levy M, Eppley RM, mith GW, Tumbleson ME, Haschek WM (2004) Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horeses administered fumonisin B_1 intravenously. J Vet Intern Med 18: 223-230.

Fornelli F, Minervini F, Logrieco A (2004) Cytotoxicity of fungal metaboliet to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). J Invertebr Pathol 85: 74-79.

Fotso J, Smith JS (2003) Evaluation of beauvericin toxicity with the bacterial bioluminescence assay and the Ames mutagenicity bioassay. J Food Chem 68: 1938-1941.

Friis C, Brinn R, Hald B (1988) Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. Toxicology 52: 209-217.

Frisvad JC, Samson RA (2000) Neopetromyces gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus Circumdati. Stud Mycol (Baarn) 45: 201-207.

Fuchs R, Hult K (1986) Analysis and dynamics of ochratoxin A in biological systems. U: Steyn PS, Vleggaar R (ur.) Mycotoxins and phycotoxins. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 365-376.

Fuchs, R., Radić, B., Čeović, S., Šoštarić, B., & Hult, K. (1991). Human exposure to ochratoxin A. U: Castegnaro M, Pleština R, Driheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (ur.) Mycotoxiny, endemic nephropathy and urinary tract tumours (IARC Scientific Publications No. 115) Lyon, IARCPress, 131-135.

Fukuda T, Arai M, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Omura S (2004) New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366. Taxonomy, fermentation isolation and biological properties. J Antibiot 57: 110-116.

Galtier P (1978) Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology – Ochratoxin A. Vet Sci Commun 1: 349-358.

Galtier P, Alvinerie M, Charpenteau JL (1981) The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. Food Cosmet Toxicol 19: 735-738.

Galtier P, Camguilhem R, Bodin G (1980) Evidence for *in vitro* and *in vivo* interaction between ochratoxin A and three acidic drugs. Food Cosmet Toxicol 18: 493-496.

Galtier P, Charpenteau JL, Alvinerie M, Labouche C (1979) The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. Drug Metabol Disposition 7: 429-434.

Gautier J Holzhaeuser D, Marković J, Gremaud E, Schilter B, Turesky RJ (2001) Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. Free Rad Biol 30: 1089-1098.

Gekle M, Pollock CA, Silbernagl S (1995) Time- and concentration dependent biphasic effect of ochratoxin A on growth of proximal tubular cells in primary culture. J Pharmacol Exp Ther 275: 397-404.

Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenberger, Wilflingseder D, Pollack V, Dander M, Schramek H (2000) Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. J Pharmacol Exp Ther 293: 837-844.

Gelderblom WCA, Abel S, Smuts CM, Marnewick J, Marasas WFO, Lemmer ER, Ramljak D (2001a) Fumonisin–induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion. Environ Health Perspect 109: 291-300.

Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NPJ (1988) Fumonisins-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol 54: 1806-1811.

Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG (1991): Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B_1 in rats. Carcinogenesis 12: 1247-1251.

Gelderblom WCA, Marasas WFO, Vleggaar R, Thiel PG, Cawood ME (1992) Fumonisins-isolation, chemical characterisation and biological effects. Mycopathologia. 117: 11-16.

Gelderblom WCA, Seier JV, Snijman PW, Van Schalkwyk DJ, Shepard GS, Marasas WFO (2001b) Toxicity of culture material *Fusarium verticillioides* strain MRC 826 to nonhuman primates. Environ Health Perspect 109: 267-276.

Gelderblom WCA, Snyman SD (1991) Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. Mycol Res 7: 46-50.

Genthner FJ, Cripe GM, Crosby DJ (1994) Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). Arch Environ Contam Toxicol 26: 90-94.

Glaab V, Collins AR, Eisenbrand G, Janzowski C (2001) DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, comaperd to food relevant 2-alkenals. Mutat Res 497: 185-197.

Gopee NV, He Q, Sharma RP (2003) Fumonisin B_1-induced apoptosis is associated with delayed inhibition of protein kinase C, nuclear factor κB and tumor necrosis factor α in LLC-PK_1 cells. Chem Biol Inter 146: 131-145.

Gregory JR, Foster K, Tyler H, Wiseman M (1990) Dietary and nutritional survey of British adults: further analyisis. London, Her Majestys Stationery Office.

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

Grosse Y, Chekir-Ghedira L, Huc A, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G, Bacha H, Pfohl-Leskowicz A (1997) Retinol, ascorbic acid and alpha tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. Cancer Lett 114: 225-229.

Grosso F, Said S, Mabrouk I, Fremy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S (2003) New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. Food Chem Toxicol 41:1133-1140.

Grove JF, Pople M (1980) The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. Mycopathologia 70: 103-105.

Groves CE, Morales M, Wrught SH (1998) Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules. J Pharmacol Exp Ther 284: 943-948.

Gumprecht LA, Marcucci M, Weigel RM, Vesonder RF, Riley RT, Showker JL, Beasley VR, Haschek WM (1995) Effect of intravenous fumonisin B_1 in rabbits: nephrotoxicity and sphingolipide alterations. NatToxins 3: 395-403.

Gupta S, Krasnoff SB, Underwood NL, Renwick JAA, Roberts DW (1991) Isolation of beauvericin as an insect toxin from Fusarium semitectum and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Mycopathologia 115: 185-189.

Gupta S, Montllor C, Hwang YS (1995) Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. J Nat Prod 58: 733-738.

Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. Environ Toxicol Pharmacol 11: 309-320.

Hallen IP, Breitholtz-Emanuelsson A, Hult K, Olsen M, Oskarsson A (1998) Placental and lactational transfer of ochratoxin A in rats. Nat Toxins 6: 43-49.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Clarendon press, 1999: 22.

Hamill RK, Higgens CE, Boaz HE, Gorman M (1969) The structure of beauvericin: a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Lett 49: 4255-4258.

Hannun YA, Merrill AHjr, Bell RM (1991) Use of sphingosine as an inhibitor of protein kinase C. Methods Enzymol 201: 316-328.

Harnois DM, Que FG, celli A, Larusso NF, Gores GJ (1997) Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line. Hepatology 26: 884-890.

Harrison LR, Colvin BM, Green JT, Newman LE, Cole JR (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B_1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J Vet Diagn Invest 2: 217-221.

Harvey BB, Elissalde MH, Kubena LF, Weaver EA, Corrier de Clerment BA (1992) Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. Am J Vet Res 53: 1966-1970.

Haschek WM, Motelin G, Ness DK, Harlin KS, Hall WF, Vesonder R, Peterson R, Beasley VR (1992) Caracterisation of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. Mycopathologia 117: 83-96.

Hassen W, Abid-Essafi S, Achour A, Guezzah N, Zakhama A, Ellouz F, Creppy EE, Bacha H (2004) Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of ochratoxin A and possible genetic predisposition. Hum Exp Toxicol 23: 339-346.

Heckman CA, Mehew JW Boxer LM (2002) NF-kappaB activates Bcl-2 expression in T-lymphoma cells. Oncogene 21: 3898-3908.

Henning A, Fink-Gremmels J, Leistner L (1991) Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid excange after metabolic activation. U: Castegnaro M, Pleština R, Driheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (ur.) Mycotoxiny, endemic nephropathy and urinary tract tumours (IARC Scientific Publications No. 115) Lyon, IARCPress, 255-260.

Howard PC, Eppley RM,. Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovach RM, Bucci TJ (2001) Fumonisin B_1 carcinogenicity in two-year feeding study using F344 Rats and B6C3F_1 mice. Environ Health Perspect 109: 277-282.

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.

Humphreys SH, Carrington C, Bolger PM (2000) A quantitative risk assessment for fumonisin B_1 and B_2 in US corn. Food Addit Contam 18: 211-220.

IARC (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 56, Lyon: IARC.

IARC (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphtalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 82, Lyon: IARC.

Jones DP (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Methods Enzymol 348:93-112.

Jow G-M, Chou C-J, Chen B-F, Tsai J-H (2004) Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. Cancer Lett 216: 165-173.

Jung KY, Endou H (1989) Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 100: 383-390.

Jurjević Ž, Solfrizzo M, Cvjetković B, Avantaggiato G, Visconti A (1999) Ochratoxin A and fumonisins (B1 and B2) in maize from Balkan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia. Mycot Res 15: 67-80.

Jurjević Ž, Solfrizzo M, Cvjetković B, De Girolamo A, Visconti A (2002) Occurrence of beauvericin in corn from Croatia. Food Technol Biotechnol 40: 91-94.

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

Kane A, Creppy EE, Roth A, Roschenthaler R, Dirheimer G (1986) Distribution of the (H3)-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. Arch Toxicol 58: 219-224.

Kaneshiro T, Vesonder RF, Peterson RE (1992) Fumonisin stimulated N-acetyldihydrosphingosine, N-acetylphytosphingosine and phytosphingosine production by *Pichia ciferri*. Curr Microbiol 24: 319-324.

Kaneshiro T, Vesonder RF, Peterson RE, Bagby MO (1993) 2-Hydroxyhexadecanoic and 8,9,13-trihydroxydocosanoic acid accumulated by yeasts treated with fumonisin B_1. Lipids 28: 397-401.

Kang YJ, Alexander JM (1996) Alterations of the glutathione redox cycle status in fumonisin B_1-treated pig kidney cells. J. Biochem Toxicol 11: 121-126.

Kanner J, German JB, Kinsella JE (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. Crit Rev Food Sci Nut 25: 317-364.

Kellerman TS, Marasas WFO, Thiel PG, Gelderblom WCA, Cawood M, Coetzer JAW (1990) Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B_1. Onderstepoort J Vet Res 57: 269-275.

Kiernan JA (1990) Histological and histochemical methods. 2nd ed. Pergamon, London.

Kim MS, Lee DY, Wang T, Schroeder JJ (2001) Fumonisin B_1 induces apoptosis in LLC-PK_1 renal epithelial cells via sphinganine and calmodulin dependent pathway. Toxicol Appl Pharmacol 176: 118-126.

Köhler C, Sten O, Boris Z (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J Immunol Methods 265: 97-111.

Kouri K, Lemmens M, Lemmens-Gruber R (2003) Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. Biochim Biophys Acta Biomembr 1609: 203-210.

Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. Nat Med 6: 513-519.

Krogh P (1980) Causal association of mycotoxic nephropathy. Medical Mycol Zbl Bakt Suppl 8: 291-299.

Krogh P, Gyrd-Hansen N, Hald B, Larsen S, Neilson JP, Smith M, Ivanoff C, Meisner H (1988) Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: Diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. J Toxicol Environ Health 23: 1-14.

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

Kumagai S (1988) Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochatoxin A in rats . Food Chem Toxicol 26: 753-758.

Kupier-Goodman T, Scott PM, McEwen NP, Lombaert GA, Ng W (1996) Approaches to risk assesment of fumonisins in corn-based foods in Canada. Adv Exp Med Biol 392: 369-393.

Kuramochi G, Gekle M, Silbernagl S (1997) Derangement of pH homeostasis in the renal papilla: Ochratoxin A incerases pH in vasa recta blood. Nephron 76: 472-476.

Ledoux DR, Broomhead JN, Bermudez AJ, Rottingaus GE (2003) Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B_1 and moniliformin in broiler chicks. Avian Dis 47: 1368-1375.

Lee JY, Leonhardt LG, Obeid LM (1998) Cell-cycle-dependent changes in ceramide levels preceding retinoblastoma protein dephosphorylatin in G2/M. Biochem J 344: 457-461.

Lemmens-Gruber R, Rachoy B, Steininger E, Kouri K, Saleh P, Krska R, Josephs R, Lemmens M (2000) The effect of the *Fusarium* metabolite beauvericin on electromechanical and physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. Mycopathologia 149: 5-12.

Lemmer ER, Vessey CJ, Gelderblom WCA, Shepard EG, Van Schalkwyk DJ, Van Wijk RA, Marasass WFO, Kirsch RE, Hall PD (2004) Fumonisn B_1-induced hepatocellular tumors in male Fischer 344 rats: potentiating effects of 2 acetylaminofluorene on oval cell proliferation and neoplastic development in a discontinued feeding study. Carcinogenesis 25: 1257-1264.

Leslie JF, Zeller KA, Logrieco A, Mule G, Moretti A, Ritieni A (2004) Species diversity and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from Prairie Grasses in Kansas. Appl Environ Microbiol 70: 2254-2262.

Li FQ, Yoshizawa T, Kawamura O, luo XY, Li YW (2001) Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. J Agric Food Chem 49: 4122-4126.

Li Ly, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNAse when released from mitochondria. Nature 412: 95-99.

Lin H-I, Lee Y-J, Chen B-F, Tsai M-C, Lu J-L, Chou C-J, Jow G-M (2005) Involvement of Bcl-2 family, cytochrom c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. Cancer Lett XX (u tisku): 1-12.

Logrieco A, Bottalico A, Mule G, Moretti A, Perrone G (2003) Epidemiology of toxigenic fungi associated mycotoxins from some Mediterranean crops. Eur J Plant Pathol 109: 645-667.

Logrieco A, Moretti A, Castella G, Kostecki M, Golinski P, Ritieni A, Chelkowski J (1998) Beauvericin production by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol 64: 3084-3088.

Logrieco A, Moretti A, Ritieni A, Chelkowski J, Altomare C, Bottalico A, Randazzo G (1993) Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland. J Agric Food Chem 41: 2149-2152.

Logrieco A, Rizzo A, Ferracane R, Ritieni A (2002) Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. Appl Environ Microbiol 68: 82-85.

Lu SC (2000) Regulation of glutathione synthesis. Curr Top Cell Regul 36:95-116.

Maaroufi K, Achour A, Hammami M, el May M, Betbeder AM, Ellouz F, Creppy EE, Bacha H (1995) Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. Hum Exp Toxicol 14:609-614,

Maaroufi K, Zakhama A, Baudrimont I, Achour A, Abid S, Ellouz F, Dhouib S, Creppy RR, Bacha H (1999) Karyomegaly of tubular cells as an early stage marker of nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. Hum Exp Toxicol 18: 410-415.

Mackenzie SE, Savard ME, Blackwell BA, Miller JD, Apsimon JW (1998) Isolation of a new fumonisin from *Fusarium moniliforme* grown in a liquid culture. J Nat Prod 61: 367-369.

Mandavilli BS, Ali SF, Houten BV (2000) DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment. Brain Res 885: 45-52.

Manolova Y, Manolov G, Parvanova L, Petkova-Bocharova T, Castegnaro M, Chernozemsky IN (1990) Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. Mutat Res 231:143-149.

Marasas WFO (1997) Risk assessment of fumonisins produced by *Fusarium moniliforme* in corn. Cereal Res Commun 25: 399-406.

Marasas WFO, Jaskiewicz K, Venter FS, Van Schalkwyk DJ (1988) *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. S Afr Med J 74: 110-114.

Marjanović DR, Holt P, Norred WP, Bacon CW, Voss KA, Stancel PC, Ragland WL (1991) Imunosupressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. Poultr Sci 70: 1895-1901.

Meireles MCA, Correa B, Fischman O, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Pozzi CR (1994) Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. Mycopathology 127: 183-188.

Meisner H, Krogh P (1986) Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin A induced nephropathy. Dev Toxicol Environ Sci 14: 199-206.

Meisner H, Meisner P (1981) Ochratoxin A, an inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxylase. Arch Biochem Biophys 208:146-151.

Melinda K, Judit F, Meyer K, Mohr K, Bauer J, Imre R, ferenc V, Peter H, Ferenc K (2004) Residues formation of fumonisin B_1 in porcine tissues after feeding diet of high toxin concentration. Magy Allatorv Lapja 126: 146-154.

Mello-Filho AC, Meneghini R (1984) *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by Haber-Weiss reaction. Biochim Biophys Acta 781: 56-63.

Merrill AHjr, Wang E, Vales TR, Smith ER, Schroeder JJ, Menaldino DS, Alexander C, Crane CM, Xia J, Liotta DC, Meredith FI, Riley RT (1996) Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. Adv Exp Med Biol 392: 297-306.

Meyer K, Mohr K, Bauer J, Horn P, Kovacs M (2003) Residue formation of fumonisin B_1 in porcine tissues. Food Aditiv Contam 20: 639-647.

Minervini F, Fornelli F, Flynn KM (2004) Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B_1 in a human erythroleukemia cell line. Toxicol *in vitro* 18: 21-28.

Moretti A, Logrieco A, Bottalico A, Ritieni A, Randazzo, Corda P (1995) Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. Mycol Res 99: 282-286.

Morrison E, Rundberget T, Kosiak B, Aastveit AH, bernhoft A (2002) Cytotoxicity of trichotecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. Mycopathologia 153: 49-56.

Motelin GK, Haschek WM, Ness DK, hall WF, Harlin KS, Schaeffer DJ, Beasly VR (1994) Temporal and dose response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. Mycopathologia 126: 27-40.

Müller G, Kielstein P, Kohler H, Berndt A, Rosner H (1995) Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in the mouse model. Mycoses 38: 85-91.

Müller G, Kielstein P, Rosner H, Berndt A, Heller M, Kohler H (1999a) Studies of the influence of ochratoxin A on immune defence reactions in weaners. Mycoses 42: 495-505.

Müller G, Kielstein P, Rosner H, Berndt A, Heller M, Köhler H (1999b) Studies on the influence of combined administration of ochratoxin A, fumonisin B_1, deoxynivalenol and T-2 toksin on immune and defence reactions in weaner pigs. Mycoses 42: 485-493.

Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S (2003) Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmatic reticulum. Faseb J 17: 696-698.

Munkvold G, Stahr HM, Logrieco A, Moretti A, Ritieni A (1998) Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in *Fusarium*-contaminated livestock feed in Iowa. Appl Environ Microbiol 64: 3923-3926.

Musser SM, Gay ML, Mazzola EP, Plattner RD (1996) Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine. J Nat Prod 59: 970-972.

Myburg RB, Dutton MF, Chuturgoon AA (2002) Cytotoxicity of fumonisin B_1, diethylnitrosoamine and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. Environ Health Perspect 110: 813-815.

National Toxicology Program (1989) Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344 Rats (gavage studies) (NIH publication No. 89-2813), Reserach Triangle Park, NC: US Department of Helath and Human Servicies, National Institute of Helath.

Nelson PE (1992) Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 117: 29-36.

Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE (1992) Fumonisin B_1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species. Appl Environ Microbiol 58: 984-989.

Ngaha EO (1985) Biochemical changes in rat urine during experimentally induced acute ochratoxicosis. Enzyme 33: 1-8.

Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Palittapongarnpim P, Kamchonwongpaisan S, Pittayakhajonwut D, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2000) Antimicrobial and antiplasmoidal cyclodepsipeptides from insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. Planta Med 66: 756-758.

Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Trakulnaleamsai S, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2002) Precursor-directed biosynthesis of beauvericin analogs by the insect pathogenic fungus Paecilomyces tenuipes BCC 1614. Tetrahedron 58: 3355-3360.

Norred WP (1993) Fumonisins-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. J Toxicol Environ Health 38: 309-328.

Norred WP, Bacon CW, Plattner RD, Vesonder RF (1991) Differential cytotoxicity and mycotoxin content among isolates of *Fusarium moniliforme*. Mycopathology 115: 37-43.

Norred WP, Voss KA, Riley RT, Plattner RD (1996) Fumonisin toxicity and metabolism studies at the USDA. U: Jackson L, Devries J, Bullerman L (Eds.) Fumonisins in Food. Plenum Press, New York, 225-236.

Norred WP, Wang E, Yoo H, riley RT, Merrill AH (1992) In vitro toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. Mycopathologia 117: 73-78.

Obrecht-Pflumio S, Chassat T, Dircheimer G, Marzin D (1999) Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. Mutat Res 446: 95-102.

Ojcius DM, Zychlinsky A, Zheng LM, Young JD (1991) Ionophore-induced apoptosis: a role of DNA fragmentation and calcium fluxes. Exp Cell Res 197: 43-49.

Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD (1990) Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. Biochem Pharmacol 40: 1183-1191.

Oswald IP; Desautels C, Laffitte J, Fournout S, Peres SY, Odin M, Le Bars P, Le Bars J, Fairbrother JM (2003) Mycotoxin fumonisin B_1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. Appl Environ Microbiol 69: 5870-5874.

Ovchinnikov YA, Ivanov VT, Mikhaleva II (1971) The synthesis and some properties of beauvericin. Tetrahedron Lett 2: 159-162.

Ožegović L, Pepeljnjak S (1995) Mikotoksikoze. Školska Knjiga, Zagreb

Paciolla C, Dipierro N, Mule G, Logrieco A, Dipiero S (2004) The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts. Phyisiol Molecul Plant Pathol 65: 49-56.

Pepeljnjak S, Cvetnić Z (1985) The mycotoxicological chain and contamination of food by ochratoxin A in Yugoslavia. Mycopathologia 90: 147-153.

Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Brlek V (1999) Skladišne gljivice i mikotoksini u našim skladištima. U: Korunić Z (ur.) Zaštita uskladištenih poljoprivrednih proizvoda. Korunić Press, Zagreb, 51-64.

Pepeljnjak S, Mužic S, Herceg M (1982) Pathogenic influence of ochratoxin A and B on chicken growth. Vet Arh 52: 235-240.

Pepeljnjak S, Petrinec Z, Kovačić S, Šegvić M (2002) Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio* L.) on feed amanded with fumonisin B_1. Maycopathologia 156: 139-145.

Pepeljnjak S, Šegvić M (2004) An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. U: Logrieco A, Visconti A (ur.) An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrechr, 33-50.

Peraica M, Domijan A-M, Fuchs R, Lucić A, Radić B (1999) The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. Toxicol Lett 110: 105-112.

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

Petkova-Bocharova T, Castegnaro M (1991) Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. U: Castegnaro M, Pleština R, Driheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (ur.) Mycotoxiny, endemic nephropathy and urinary tract tumours (IARC Scientific Publications No. 115) Lyon, IARCPress, 135-137.

Petrik J, Rumora L, Juretić D, Čepelak I (2003) Apoptoza-detekcija i kvantifikacija. Biochemia Medica 13: 109-117.

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.

Pfohl-Leskowicz A, Chakor K, Creppy EE, Dirheimer G (1991) DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. U: Castegnaro M, Pleština R, Driheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (ur.) Mycotoxiny, endemic nephropathy and urinary tract tumours (IARC Scientific Publications No. 115) Lyon, IARCPress, 245-253.

Pfohl-Leskowicz A, Grosse Y, Kane A, Gharbi A, Baudrimont I, Obrecht S, Creppy EE, Dirheimer G (1993) Is the oxidative pathway impicated in genotoxicity of ochratoxin A? U: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (ur.) Human ochratoxicosis and its pathologies (Montrouge: John Libbey Eurotext, vol. 231), 129-140.

Pfohl-Leskowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M (2002) Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. Food Adit Contam 19: 282-302.

Pfohl-Leszkowicz A, Pinelli E, Bartsch H, Mohr U, Castegnaro M (1998) Seks- and strain-specific experssion of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. Mol Carcinog 23: 76-85.

Pitout MJ (1969) The hydrolisis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. Biochem Pharmacol 18: 485-491.

Pitt JI (1987) *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. Appl Environ Microbiol 53: 266-269.

Platner RD, Nelson PE (1994) Production of beauvericin by a strain of *Fusarium proliferatum* isolated from corn fodder for swine. Appl Environ Microbiol 60: 3894-3896.

Plattner RD, Weisleder D, Shackelford DD, Peterson R, Powell RG (1992) A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 117: 23-28.

Pocsfalvi G, Dilanda G, Ferranti P, Ritieni A, Randazzo G, Malorni A (1997) Observation of non-covalent interactions between beauvericin and oligonucleotides using electrospray ionization mass spectometry. Rapid Comm Mass Spectr 11: 265-272.

Powell RG, Plattner RD (1995) Fumonisins. U: Alkaloids: Chemical and biological perspectives. Pelletier SW (ur.) Elsevier Science Ltd, Oxford UK, 247-278.

Prince RC, Crofts AR, Steinrauf LK (1974) A comparision of beauvericin, enniatin and valinomycin as calcium transporting agents in liposomes and chromatophores. Biochem Biophys Res Comm 59: 697-703.

Que FG, Gores GJ, Larusso NF (1997) Development and initial application of an *in vitro* model of apoptosis in rodent cholangiocytes. American J Physiol 35: G106-G115.

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

Rahimtula AD, Bereziat JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H (1988) Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. Biochem Pharmacol 37: 4469-4477.

Rahimtula AD, Chong X (1991) Alterations in calcium homeostasis as a possible cause of ochratoxin A nephrotoxicity. U: Castegnaro M, Pleština R, Driheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (ed.) Mycotoxiny, endemic nephropathy and urinary tract tumours (IARC Scientific Publications No. 115) Lyon, IARCPress, 207-214.

Ramljak D, Calvert RJ, Wiesenfeld PW, Diwan BA, Catipovic B, Marasas WFO, Victor TC, Anderson LM, Gelderblom WCA (2000) A potential mechanism for fumonisin B_1-mediated hepatocarcinogenesis: cyclin D1 stabilization associated with activation of Akt and inhibition of GSK-3β activity. Carcinogenesis 21: 1537-1546.

Reynolds DS, Morton AJ (1998) Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat barin can be visualised with trypan blue. J Neurosci Methods 79: 115-121.

Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Shepard EW, Van Schalkwyk DJ (1992) *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology 82: 353-357.

Riley R.T, An NH, Showker JL, Yoo HS, Norred WP, Chamberlain WP, Wang E, Merrill AHjr, Motelin G, Beasley VR, Haschek WM (1993) Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin contaning feeds in pigs. Toxicol Appl Pharmacol 118: 105-112.

Riley RT, Wang E, Schroeder JJ, Smith ER, Plattner RD, Abbas H, Yoo HS, Merrill AHjr. (1996) Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. Nat Tox 4: 3-15.

Ritieni A, Moretti A, Logrieco A, Bottalico A, Randazzo G, Monti SM, Ferracane R, Fogliano V (1997) Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B1 and beauvericin in maize from Italy. J Agric Food Chem 45: 4011-4016.

Roeske RW, Isaac S, King TE, Steinrauf LK (1974) The binding of barium and calcium ions by the antibiotic beauvericin. Biochem Biophys Res Comm 57: 554-561.

Roschenthaler R, Creppy EE, Dirheimer G (1984) Ochratoxin A: On the mode of action of a ubiqutous mycotoxin. J Toxicol 3: 53-86.

Ross PF, Ledet AE, Owens DL, Rice LG, Nelson HA, Osweiler GD, Wilson TM (1993) Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatosis and encelophaty caused by corn naturally contaminated with fumonisins. J Vet Diagn Invest 5: 69-74.

Rossi F (1986) The O_2^- forming NADPH oksidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. Biochim Biophysic Acta 853: 65-89.

Rumora L, Kovačić S, Rozgaj R, Čepelak I, Pepeljnjak S, Žanić-Grubišić T (2002) Cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B_1 in rabbit kidney RK13 cell line. Arch Toxicol 76: 55-61.

Rumora L, Petrik J, Žanić-Grubišić T (2003) Oksidacijski stres i stanična smrt. Biochem Med 13: 75-82.

Russo A, Fauci LL, Acquaviva R, Campisi A, Raciti G, Scifo C, renis M, Galvano G, Vanella A, Galvano F (2005) Ochratoxin A-induced damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-o-β-D-glucoside. J Nutr Biochem 16: 31-37.

Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to deaths door. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 401-410.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. Embo J 17: 1675-1687.

Schaaf GJ, Nijmeijer SM, Maas RFM, Roestenberg P, Groene de 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.

Schroeder JJ, Crane HM, Xia J, Liotta DC, Merrill AH (1994) Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B_1. J Biol Chem 269: 3475-3481.

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

Schwerdt G, Freudinger R, Schuster C, Silbernagl S, Gekle M (2004) Inhibition of mitochondria and extracellular acidification enhance ochratoxin A-induced apoptosis in renal collecting duct-derived MDCK-C7 cells. Cell Physiol Biochem 14: 47-56.

Seefelder W, Humpf HU, Schwerdt G, freudinger R, Gekle M (2003) Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. Toxicol Appl Pharmacol 192: 146-153.

Seifert KA, Aoki T, Baayen RP, Brayford D, Burgess LW, Chulze S, Gams W, Geiser D, de Gruyter J, Leslie JF, Logrieco A, Marasas WFO, Nirenberg HI, O'Donnell K, Rheeder J, Samuels GJ, Summerell BA, Thrane U, Waalwijk C (2003) The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. Mycol Res 107: 643-644.

Sen CK (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. Curr Top Cell Regul 36:1-30.

Shepard GS, Sewram V, Nieuwoudt TW, Marasas WFO, Ritieni A (1999) Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* section Liseola. J Agr Food Chem 47: 5111-5115.

Shepard GS, Snijman PW (1999) Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B_2 in a non-human primate. Food Chem Toxicol 37: 111-116.

Shepard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Alberts JF (1994): Biliary excretion of the mycotoxin fumonisin B_1 in rats. Food Chem Toxicol 32: 489-491.

Shier WT, Abbas HK, Mirocha CJ (1991) Toxicity of mycotoxins fumonisins B_1 and B_2 and *Alternaria alternata* toxin (AAL) in cultured mamalian cells. Mycopathologia. 116: 97-104.

Singh GS, Chaunhan HV, Jha GJ, Singh KK (1990) Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. J Comp Pathol 103: 399-410.

Smith GW, Constable PD, Foreman JH, Epply RM, Waggoner AL, Tumbleson ME, Haschek WM (2002) Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B_1 in horses. Am J Vet Res 63: 538-545.

Solovey MMS, Somoza C, Cano G, Pacin A, Resnik S (1999) A survey of fumonisins, deoxinivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. Food Addit Contam 16: 325-329.

Sontakke AN, Tare RS (2002) A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. Clin Chim Acta 318: 145-148.

Stockmann-Juvala H, Mikkola J, Naarala J, Loikkanen J, Elovaara E, Savolainen K (2004) Oxidative stress induced by fumonisin B_1 in continuous human and rodent neural cell cultures. Free Rad Res 38: 933-942.

Stoev SD (1997) Experimental mycotoxic nephropathy in pigs. Pathomorphological studies. Vet Med 1-2: 102-107.

Stoev SD, Goundasheva D, Mirtcheva T, Mantle P (2000) Susceptibility to bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. Exp Toxicol Pathol 52: 287-296.

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

Storen O, Holm H, Stormer FC (1982) Metabolism of ochratoxin A by rats. Appl Environ Microbiol 44: 785-789.

Stormer FC, Hansen CE, Pedersen JI, Hvistendhal G, Aasen AJ (1981) Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxochartoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. Appl Environ Microbiol 42: 1051-1056.

Stromer FC, Lea T (1995) Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. Toxicology 95: 45-50.

Sun TS, Stahr HM (1993) Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test. J Assoc Off Anal Chem Int 76: 893-898.

Susin Sa, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397: 441-446.

Suzuki S, Satoh T, Yamazaki M (1977) The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. Jpn J Pharmacol 27: 735-744.

Šegvić M, Pepeljnjak S (2003) Distribution and fumonisin B_1 production capacity of *Fusarium moniliforme* isolated from corn in Croatia. Period Biol 105: 275-279.

Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD (2002) Glutamine and glutamate. Biomed Pharmacother 56:446-457.

Teren J, Varga J, Hamari Z, Rinyu E, Kevei F (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. Mycopathologia 134: 171-176.

Themur MG, Lopez AG, Masih DT, Chulze SN, Rubinstein HR (2002) Immunobiological effects of fumonisin B_1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. Clin Diagn Lab Immunol 9: 149-155.

Themur MG, Lopez AG, Masih DT, Chulze SN, Rubinstein HR (2003) Immunobiological effects of AFB_1 and AFB_1-FB_1mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. Toxicology 186: 159-170.

Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shepard GS, Gelderblom WCA, Nieuwenhuis JJ (1991) Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol 57: 1089-1093.

Thuvander A, Breitholtz-Emanuelsson A, Olsen M (1995) Effects of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure. Food Chem Toxicol 33: 1005-1011.

Thuvander A, Funseth E, Breitholtz-Emanuelsson A, Hallen IP, Oskarsson A (1996) Effects of ochratoxin A on the rat immune system after perinatal exposure. Nat Toxins 4: 141-147.

Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I (1999) In vitro exposure of human lymphocites to trichotecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. Food Chem Toxicol 37: 639-648.

Tolleson WH, Couch LH, Melchior WBjr, Jenkins GR, Musheliskhvili M, Musheliskhvili L, McGarrity LJ, Domon OE, Morris SM, Howard PC (1999) Fumonisin B_1 induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. Int J Oncol 14: 833-843.

Tomoda H, Huang XH, Cao J, Nishida H, Nagao R, Okuda S, Tanaka H, Omura S, Arai H, Inoue K (1992) Inhibition of acyl CoA: cholesterol acyl transferaze activity by ciclodepsipeptide antibiotics. J Antibiot 45:1626-1632.

Tran ST, Bailly JD, Tardieu D, Durand S, Benard G, Guerre P (2003) Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B_1 exposure in ducks. Chem Biol Ineract 146: 61-72.

Ueno Y, Iijima K, Wang S-D, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, Chen C, Yu S-Z (1997) Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of cor harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. Food Chem Toxicol 35: 1143-1150.

Ueno Y, Umemori K, Niime E, Tanuma S, Nagata S, Sugamata M, Ihara T, Sekifima M, Kawai K, Ueno I, Tashiro F (1995) Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. Nat Toxins 3: 129-137.

Uhlinger C (1997) Leukoencephalomalacia. Vet Clin North Am 13: 13-20.

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

Van der Westhuizen L, Shepard GS, Van Schalkwyk DJ (2001) The effect of a single gavage dose of fumonisin B-2 on the sphinganine and sphingosine concentrations in vervet monkeys. Food Chem Toxicol 39: 455-459.

Van Rensburg SJ (1985) Recent studies on the etiology of oesophageal cancer. S Afr Cancer Bull 29: 22-31.

Varga D, Johannes T, Jainta S, Schuster S, Schwarz-Boeger U, Kiechle M, Patino Garcia B, Vogel W (2004) An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis**.** Mutagenesis 19: 391-397.

Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Herbert RA, Walters DB, Norred NP (1995): Subcronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B_1 in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats. Fund Appl Toxicol 24: 102-110.

Vukelić M, Šoštarić B, Belicza M (1992) Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. Food Chem Toxicol 30: 193-200.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AHjr (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J Biol Chem 266: 14486-14490.

Weber F, Freudinger R, Schwerdt G, Gekle M (2005) A rapid screening method to test apoptotic synergisms of ochratoxin A with other nephrotoxic substances. Toxicol *in vitro* 19: 135-143.

Wilson TM, Ross PF, Nelson PE (1991) Fumonisin mycotoxins and equine leukoencephalomalacia. J Am Vet Med Assoc 198: 1104-1105.

Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR (1993) Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. Br Med Bull 49: 506-522.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr 134: 489-492.

Wu SN, Chen H, Liu YC, Chiang HT (2002) Block of L-type Ca^{2+} current by beauvericin, a toxic cyclopeptide, in the NG 108-15 neuronal cell line. Chem Res Toxicol 15: 854-860.

Wu W, Liu T, Vesonder RF (1995) Comparative cytotoxicity of fumonisin B_1 and moniliformin in chicken primary cell cultures. Mycopathologia 132: 111-116.

Yoo HS, Norred WP, Wang E, Merrill AH, Riley RT (1992) Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosinthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. Toxicol Appl Pharmacol 144: 9-15.

Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y (1994) Fumonisin occurence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. Appl Environ Microbiol 60: 1626-1629.

Zepnik H, Pahler A, Schauer U, Dekant W (2001) Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? Toxicol Sci 59: 59-67.

Zoller O, Sager F, Zimmerli B (1994) Occurrence of fumonisins in foods. Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg 85: 81-99.

Zomborszky MK, Vetesi F, Repa I, Kovacs F, Bata A, Horn P, Toth A, Romvari R (2000) Experiment to determine limits of tolerance for fumonisin B_1 in weaned piglets J Vet Med 47: 277-286.

Zomborszky-Kovacs M, Vetesi F, Horn P, Repa I, Kovacs F (2002) Effect of prolonged exposure to low-dose fumonisin B_1 in pigs. J Vet Med 49: 197-201.

Žanić-Grubišić T, Santini A, Čepelak I, Barišić K, Juretić D, Pepeljnjak S (1996) Influence of ochratoxin A tretment on the activity of membrane bound enzymes in rat brain regions. Biol chem Hoppe Seyler 377: 121-127.

Žlender V (2003) Apoptoza-programirana smrt stanice. Arh Hig Rada Toksikol 54: 267-274.

8. SAŽETAK

Fumonizin B_1 (FB_1) i okratoksin A (OTA) te njihovi producenti česti su kontaminanti kukuruza i njegovih prerađevina. Fumonizin B_1 izaziva čitav niz patoloških promjena u različitih životinjskih vrsta uključujući leukoencefalomalaciju kopitara, plućni edem u svinja, hepatotoksikozu, nefrotoksičnost, imunotoksičnost u većine ispitanih životinja, karcinogenezu u glodavaca te se dovodi u vezu s razvojem karcinoma jednjaka i jetre u ljudi iz nekih područja u južnoj Africi i Aziji. Okratoksin A u eksperimentalnih životinja uzrokuje nefrotoksikozu hepatotoksikozu, imunosupresiju, neurotoksičnost, poremećaje koagulacije krvi, teratogenost i karcinogenost. Osim toga, u ljudi se izloženost OTA dovodi u vezu s razvojem endemske nefropatije (EN). Uz FB_1 i OTA, kao svjetski raširen kontaminant kukuruza pojavljuje se i mikotoksin bovericin (BEA) kojeg, kao i FB_1, tvori plijesan vrste *Fusarium verticillioides*. Bovericin ima antimikrobno djelovanje, specifični je inhibitor kolesterol-aciltransferaze u jetri miševa, djeluje negativno ionotropno i kronotropno na glatke mišiće sisavaca te citotoksično i apoptotički *in vitro*. U kukuruzu iz endemskih i ne-endemskih područja Hrvatske dokazano je istodobno pojavljivanje FB_1, OTA i BEA.

Stoga je u ovom radu ispitan mehanizam djelovanja FB_1, BEA i OTA i njihove interakcije na staničnoj razini (PK 15-kultura stanica epitela bubrega svinje), praćenjem preživljavanja stanica, integriteta plazmatske i mitohondrijske membrane, razine lipidne peroksidacije i antioksidacijskog kapaciteta stanice te stupnja apoptoze i genotoksičnog učinka niskih koncentracija mikotoksina (0,05 μg/mL, 0,5 μg/mL i 5 μg/mL), tijekom 24 i 48 sati.

Fumonizin B_1, BEA i OTA su citotoksični za PK 15 stanice što se očituje smanjenjem vijabilnosti i povećanjem katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze i glutamat dehidrogenaze ovisno o dozi mikotoksina. Do značajnog smanjenja vijabilnosti stanica dolazi nakon 24-satnog izlaganja FB_1 (25%), BEA (30%) i OTA (40%) u koncentraciji 5 μg/mL, u odnosu na kontrolu ($P<0,05$). Kod iste koncentracije nakon 48-satnog izlaganja katalitička aktivnost LDH u staničnom mediju se povećava za 45% (FB_1) i 80% (BEA i OTA) u odnosu na kontrolu ($P<0,05$), dok je aktivnost GLDH za 40% veća od kontrolne vrijednosti ($P<0,05$) nakon 24 i 48-satnog tretiranja s pojedinačnim toksinima, što ukazuje na nekrotičke promjene u stanicama. Sva tri mikotoksina u najvećoj koncentraciji značajno stimuliraju lipidnu peroksidaciju, a već pri nižim koncentracijama smanjuju koncentraciju glutationa u PK 15 stanicama, što ukazuje na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta stanica. Fumonizin B_1, BEA i OTA uzrokuju apoptozu PK 15 stanica pri čemu se značajnije morfološke promjene koje

odgovaraju apoptozi zamjećuju nakon 48-satnog izlaganja. Okratoksin A ima jače djelovanje na aktivnost kaspaze-3 već nakon 24-satnog tretiranja u koncentracijama od 0,5 i 5 μg/mL, dok BEA i OTA uzrokuju značajnije povećanje aktivnosti ovog enzima nakon duljeg izlaganja ($P<0,05$). FB_1 i BEA su genotoksični za PK 15 stanice u koncentracijama od 0,5 i 5 μg/mL, dok OTA značajno povećava broj mikronukleusa već kod najmanje koncentracije ($P<0,05$). Sva tri mikotoksina imaju klastogeni i aneugeni učinak pri čemu je klastogeno djelovanje OTA i BEA više izraženo. Kombinacije mikotoksina tijekom 24 i 48 sati uglavnom djeluju aditivno genotoksično što se odražava na tvorbu mikronukleusa i nukleoplazmatskih mostova, dok je u slučaju tvorbe nuklearnih pupova izraženiji antagonizam. U koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL nakon 24-i 48-satnog izlaganja, kombinacije dva i sva tri mikotoksina pokazuju uglavnom aditivane interakcije koje se odražavaju na smanjenje vijabilnosti, narušavanje integriteta stanične i mitohondrijske membrane, stimulaciju lipidne peroksidacije, smanjenje antioksidacijskog kapaciteta stanica i povećanja indeksa apoptoze. Također, kombinirano tretiranje stanica mikotoksina, u koncentraciji od 5 μg/mL, aditivno djeluje na stimulaciju lipidne peroksidacije. Bovericin i OTA (0,5 μg/mL) sinergistički djeluju na smanjenje razine glutationa, a u koncentraciji 5 μg/mL sinergistički povećavaju indeks apoptoze u PK 15 stanicama, nakon 24-satnog tretiranja. Kombinacije BEA+OTA i FB_1+BEA+OTA u koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL te FB_1+BEA i BEA+OTA u najvećoj apliciranoj koncentraciji, djeluju sinergistički na povećanje aktivnosti kaspaze-3 nakon 24-satnog tretmana. Kombinacije toksina u najvećoj koncentraciji uglavnom djeluju antagonistički na smanjenje vijabilnosti, povećanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze i glutamat dehidrogenaze te smanjenje koncentracije glutationa u PK 15 stanicama, posebice nakon 48-satnog tretiranja. Istovremeni unos niskih koncentracija ovih mikotoksina putem hrane negativno se odražava na antioksidacijski sustav što može pridonijeti imunosupresiji, nefrotoksičnosti i karcinogenezi u i životinja i ljudi tijekom dulje izloženosti.

9. SUMMARY

Fumonisin B_1, ochratoxin A and their producers are frequent contaminants of maize and maize-based products. Fumonisin B_1 is associated with various animal toxicoses including leukoenecephalomalacia of equidae, porcine pulmonary oedema (PPE), hepatotoxicosis, hepatocarcinomas, nephrotoxicosis and immunosuppressive effects. Also, FB_1 may be a contributing factor in the development of esophageal and liver cancer in people of South Africa and China. Ochratoxin A is nephrotoxic, hepatotoxic, immunosuppressive, neurotoxic, teratogenic and carcinogenic agent in animals and it affects normal blood coagulation. It has been implicated in the development of Endemic nephropathy (EN) in humans. Beauvericin (BEA) is also widespread contaminant of maize that is produced by *Fusarium verticillioides* – the principal producer of FB_1. This mycotoxin shows antimicrobial, cytotoxic and apoptotic activity. It is the most potent specific inhibitor of cholesterol acyltransferase and possesses ionophoric properties. Co-occurrence of FB_1, BEA and OTA was reported in maize from endemic and non-endemic areas in Croatia.

Therefore, we studied the mechanism of action of FB_1, BEA and OTA, as well as their interactions on the cell level (PK 15-porcine kidney epithelial cells). We examined the effects of low concentrations (0.05, 0.5 and 5 μg/mL) of individual and combined mycotoxins on cell viability, mitochondrial (GLDH) and plasma (LDH) membrane integrity, lipid peroxidation, antioxidative cell capacity, apoptotic and genotoxic events in PK 15 cells.

Decrease of cell viability and increase of catalytic activity of LDH and GLDH show that FB_1, BEA and OTA are cytotoxic to PK 15 cell in dose dependent manner. Cell viability significantly decreased after 24 hours of exposure to 5 μg/mL of FB_1 (25%), BEA (30%) and OTA (40%), compared to control ($P<0,05$). After 48 hours of exposure to the same concentration level, activity of LDH was increased for 45% (FB_1) and 80% (BEA and OTA), while activity of GLDH increased for 40% already after 24 hours, remaining increased in the same level after 48 hours ($P<0,05$). These data indicated necrotic events in the cells. Individual treatment of cells with 5 μg/mL of FB_1, BEA and OTA significantly stimulated lipid peroxidation, while lower concentrations significantly reduced levels of glutathione, indicating decrease of antioxidative cell capacity. Significant morphological apoptotic changes were observed after 48 hours of exposure to individual mycotoxins. Ochratoxin A activated caspase-3 already after 24 hours of treatment with 0.5 and 5 μg/mL, while BEA and OTA significantly affected this enzyme after prolonged exposure. Fumonisn B_1 and BEA are

genotoxic to PK 15 cells in concentrations of 0.5 and 5 μg/mL, while OTA significantly increased the number of micronuclei already after treatment with lowest concentrations. All of three mycotoxins mainly act as clastogens. Combinations of mycotoxins during 24 and 48 hours showed additive genotoxic effect on formation of micronuclei and nucleoplasmatic bridges while antagonistic effect was observed in formation of nuclear buds. Combined treatment (24 and 48 hours) with two or all of three mycotoxins in concentrations of 0.05 and 0.5 μg/mL showed additive interactions on cell viability, mitochondrial and plasma membrane integrity, stimulation of lipid peroxidation and decrease of antioxidative capacity in PK 15 cells. Also, combined treatment with highest concentration during 24 and 48 hours, showed additive interactions in lipid peroxidation. Beauvericin and OTA (0,5 μg/mL) synergistically decreased glutathione level, while in highest concentration synergistically increased apoptotic index. Synergistic effects on caspase-3 activities were observed after 24 hours of exposure to BEA+OTA and FB_1+BEA+OTA (0,05 and 0,5 μg/mL), and FB_1+BEA and BEA+OTA (5 μg/mL). Antagonistic effects on cell viability, mitochondrial and plasma membrane integrity and glutathione level in the cells were observed after treatment with highest concentration, especially after 48 hours. Simultaneous prolonged exposure to mycotoxins in low dietary concentrations can negatively affect antioxidant status contributing the immunosuppression, nephrotoxicity and carcinogenicity in animals and humans.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorska disertacija

MEHANIZAM DJELOVANJA FUMONIZINA B_1, BOVERICINA I OKRATOKSINA A U BUBREŽNIM STANICAMA

Maja Šegvić Klarić

Zavod za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Fumonizin B_1 (FB_1), bovericin (BEA) i okratoksin A (OTA) su svjetski rašireni mikotoksini koji izazivaju čitav niz patoloških promjena *in vivo* i *in vitro*, a čije je istodobno pojavljivanje u kukuruzu dokazano na području Hrvatske. Stoga je u ovom radu ispitan mehanizam djelovanja FB_1, BEA i OTA i njihove interakcije u PK 15 stanicama (epitel bubrega svinje), praćenjem preživljavanja stanica, integriteta plazmatske i mitohondrijske membrane, razine lipidne peroksidacije i antioksidacijskog kapaciteta stanice te stupnja apoptoze i genotoksičnog učinka niskih koncentracija mikotoksina (0,05 μg/mL, 0,5 μg/mL i 5 μg/mL), tijekom 24 i 48 sati. Fumonizin B_1, BEA i OTA su citotoksični za PK 15 stanice što se očituje smanjenjem vijabilnosti i povećanjem katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze i glutamat dehidrogenaze ovisno o dozi mikotoksina. Sva tri mikotoksina u najvećoj koncentraciji značajno stimuliraju lipidnu peroksidaciju, a već pri nižim koncentracijama smanjuju koncentraciju glutationa u PK 15 stanicama. Fumonizin B_1, BEA i OTA uzrokuju apoptozu PK 15 stanica pri čemu se značajnije morfološke apoptotičke promjene zamjećuju nakon 48-satnog izlaganja. Okratoksin A ima jače djelovanje na aktivnost kaspaze-3 već nakon 24-satnog tretiranja u koncentracijama od 0,5 i 5 μg/mL, dok BEA i OTA uzrokuju značajnije povećanje aktivnosti ovog enzima nakon duljeg izlaganja. FB_1 i BEA su genotoksični za PK 15 stanice u koncentracijama od 0,5 i 5 μg/mL, dok OTA značajno povećava broj mikronukleusa već kod najmanje koncentracije. Sva tri mikotoksina imaju klastogeni i aneugeni učinak pri čemu je klastogeno djelovanje OTA i BEA više izraženo. U koncentracijama 0,05 i 0,5 μg/mL nakon 24- i 48-satnog izlaganja, kombinacije dva i sva tri mikotoksina mikotoksina pokazuju uglavnom aditivane a manje sinergističke interakcije što se odražava na smanjenje vijabilnosti, narušavanje integriteta stanične i mitohondrijske membrane, stimulaciju lipidne peroksidacije i smanjnje antioksidacijskog kapaciteta te apoptozu i mutagenezu. Nakon 24-satnog izlaganja navedenim kombinacijama u koncentraciji 5 μg/mL zapažen je aditivan, sinergistički i antagonistički učinak, a nakon 48-satnog tretmana u istoj koncentraciji više je izražen antagonizam. Istodobni unos niskih koncentracija ovih mikotoksina putem hrane negativno se odražava na antioksidacijski sustav te može pridonijeti imunosupresiji, nefrotoksičnosti i karcinogenezi u ljudi i životinja tijekom dulje izloženosti.

(123 stranice, 8 slika, 12 grafičkih prikaza, 22 tablice, 306 literaturnih podataka, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: fumonizin B_1, bovericin, okratoksin A, bubrežne stanice, citotoksičnost, antioksidacijski kapacitet, apoptoza, genotoksičnost

Mentor: Dr. sc. Stjepan Pepeljnjak, redoviti profesor FBF-a

Ocjenjivači: Dr. sc. Jozsef Petrik, docent FBF-a
Dr. sc. Stjepan Pepeljnjak, redoviti profesor FBF-a
Dr. sc. Maja Peraica, viši znanstveni suradnik

Rad prihvaćen dne: 7. prosinca 2005.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry Disertation

MECHANISAM OF ACTION OF FUMONISNIN B_1, BEAUVERICIN AND OCHRATOXIN A IN KIDNEY CELLS

Maja Šegvić Klarić

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Fumonisin B_1 (FB_1), beauvericin (BEA) and ochratoxin A are widespread mycotoxins, which cause a great number of pathological changes *in vivo* and *in vitro*. Their co-occurrence was established in maize in Croatia. The mechanism of action of FB_1, BEA and OTA, as well as their interactions, were studied in the PK 15 cells (porcine kidney epithelial cells). We examined the effects of low concentrations (0.05, 0.5 and 5 μg/mL) of individual and combined mycotoxins on cell viability, mitochondrial and plasma membrane integrity, lipid peroxidation, antioxidative status, and apoptotic and genotoxic events in PK 15 cells. Decrease of cell viability and increase of catalytic activity of LDH and GLDH show that FB_1, BEA and OTA are cytotoxic to PK 15 cell in dose dependent manner. Individual treatment of cells with 5 μg/mL of FB_1, BEA and OTA significantly stimulated lipid peroxidation, while lower concentrations significantly reduced levels of glutathione. Significant morphological apoptotic changes were observed after 48 hours of exposure to individual mycotoxins. Ochratoxin A activated caspase-3 already after 24 hours of treatment with 0.5 and 5 μg/mL, while BEA and OTA significantly affected this enzyme after prolonged exposure. Fumonisn B_1 and BEA are genotoxic to PK 15 cells in concentrations of 0.5 and 5 μg/mL, while OTA significantly increased the number of micronuclei already after treatment with lowest concentrations. All of three mycotoxins mainly act as clastogens. Combined treatment with two or all of three mycotoxins in concentrations of 0.05 and 0.5 μg/mL during 24 and 48 hours, showed mainly additive and less synergistic interactions on cell viability, mitochondrial and plasma membrane integrity, stimulation of lipid peroxidation and decrease of antioxidative capacity, apoptotic and genotoxic events in PK 15 cells. After 24 hours of exposure to combined mycotoxins in concentration of 5 μg/mL, additive, synergistic and antagonistic effects were observed, while after 48 hours of exposure to same concentration we observed antagonism. Simultaneous prolonged exposure to mycotoxins in low dietary concentrations can negatively affect antioxidant status contributing the immunosuppression, nephrotoxicity and carcinogenicity in animals and humans.

(123 pages, 20 figures, 22 tables, 306 references, original in Croatian)

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

Key words: fumonisin B_1, beauvericin, ochratoxin A, kidney cells, citotoxicity, antioxidative status, apoptosis, genotoxicity

Supervizor: Prof. Stjepan Pepeljnjak, PhD, VD

Reviewers: Assistant Prof. Jozsef Petrik, PhD
Prof. Stjepan Pepeljnjak, PhD, VD
Maja Peraica, PhD, MD

Thesis accepted: December 7, 2005

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 01. svibnja 1971. u Splitu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer biologija-kemija, upisala sam 1990. u Splitu a diplomirala 1995. te stekla zvanje profesora biologije i kemije. Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, polje biologija, smjer toksikologija, upisala sam 1997. Od 1997 god. zaposlena sam kao znanstveni novak na Zavodu za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam uključena u rad na projektu pod nazivom "Mikromicete, toksini, utjecaj na zdravlje i prevencija". U sklopu ovog projekta sam izradila magistarski rad pod naslovom «Raširenost i fumonizinotoksinogenost gljivice *Fusarium moniliforme* u Hrvatskoj», kojeg sam obranila 2001. Sudjelovala sam u organizaciji dvaju hrvatskih znanstvenih skupova s međunarodnim sudjelovanjem. Član sam Hrvatskog toksikološkog društva i pridruženi član Hrvatskog društva za zdravstvenu ekologiju hrvatskog liječničkog zbora. Hrvatsko društvo za zdravstvenu ekologiju hrvatskog liječničkog zbora dodjelio mi je Zahvalnicu u znak priznanja za zasluge u radu Društva i promicanje zdravstvene ekologije. Ko-autor sam na nekoliko znanstvenih i stručnih radova.

Popis radova

Poglavlje u knjizi

Pepeljnjak S, Šegvić M (2004) An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. U: Logrieco A, Visconti A (ur.) An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 33-50.

Radovi citirani u CC-u

Pepeljnjak S, Petrinec Z, Kovačić S, Šegvić M (2002) Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio* L.) on feed amanded with fumonisin B_1. Mycopathologia 156: 139-145.

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

Pepeljnjak S, Slobodnjak Z, Šegvić M, Peraica M, Pavlović M (2004) The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. Hum Exp Toxicol 23: 15-19.

Znanstveni radovi u ostalim časopisima

Šegvić M, Pepeljnjak S (2001) Fumonisins and their effects on animal health- a brief rewiev. Vet Arh 71: 299-323.

Pepeljnjak S, Šegvić M (2003) Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croatia. Aerobiologia 19: 11-19.

Šegvić M, Pepeljnjak S (2003) Distribution and fumonisin B_1 production capacity of *Fusarium moniliforme* isolated from corn in Croatia. Period Biol 105: 275-279.

Šegvić M, Pepeljnjak S (2004) Aerogena učestalost spora plijesni na području grada Zagreba. Arh Hig Rada Toksikol 55: 159-165.

Kovačić S, Petrinec Z, Pepeljnjak S, Šegvić Klarić M (2004) Toksični učinci fumonizina B_1 u šarana (*Cyprinus carpio* L.). Praxis Veterinaria 52: 183-192.

Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Šegvić M (2005) Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. Arh Hig Rada Toksikol 56: 275-280.

Pepeljnjak S, Šegvić Klarić M (2005) Seasonal variations of airborne fungi in Continental and Mediterranean parts of Croatia. Period Biol 107: 351-355.

Kosalec I, Pepeljnjak S, Šegvić Klarić M (2005) Verruculogen production in airborne and clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* Fres. Acta Pharm 55: 357-348.

Pepeljnjak S, Petrik J, Šegvić Klarić M (2005) Toxic effects of *Ustilago maydis* and fumonizina B_1 in Fischer rats. Acta Pharm 55: 339-348.

Ostali radovi

Pepeljnjak S, Šegvić M (2000) Fumonizini kao rizični čimbenici zdravlja u ljudi. Medix 33: 65-69.

Pepeljnjak S, Šegvić M (2002) Plijesni kao aeroalregeni. Medix 40: 125-133.