

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

*Iva Pirin*

**Djelovanje okratoksina A i citrinina na aktivaciju MAP kinaza u  
bubrežnim stanicama**

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Šegvić Klarić i prof. dr. sc. Lade Rumora i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009/2010.

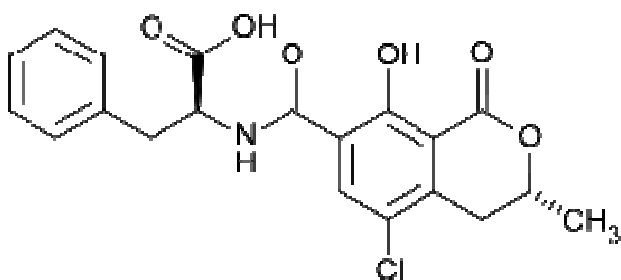
# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Okratoksin A	1
1.1.1. <i>Mehanizam djelovanja OTA</i>	1
1.1.2. <i>Toksični učinci OTA</i>	2
1.2. Citrinin	3
1.2.1. <i>Mehanizam djelovanja CTN</i>	3
1.2.2. <i>Toksični učinci CTN</i>	4
1.3. Kombinirani toksični učinci OTA i CTN	5
1.4. Proteinske kinaze aktivirane mitogenima	6
1.4.1. <i>ERK signalni put</i>	7
1.4.2. <i>JNK signalni put</i>	8
1.4.3. <i>p38 signalni put</i>	8
1.5. Dvojno-specifične MAPK fosfataze	9
<b>2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b>	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	11
3.1. Kultura stanica	11
3.2. Mikotoksini	11
3.3. MTT test	11
3.4. Pripremanje staničnog lizata	13
3.5. Određivanje koncentracije proteina	13
3.6. Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu	14
3.7. Western blot metoda	14
3.8. Statističke metode	16
<b>4. REZULTATI</b>	17
4.1. Vijabilnost PK15 stanica	17
4.2. Aktivacija MAPK	19
<b>5. RASPRAVA</b>	23
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	26
<b>7. ZAHVALE</b>	27
<b>8. LITERATURA</b>	28
<b>9. SAŽETAK</b>	35
<b>10. SUMMARY</b>	36

# 1. UVOD

## 1.1. Okratoksin A

Okratoksin A (OTA) je prvi puta izoliran 1965. godine kao stabilan sekundarni metabolit *Aspergillus ochraceus*, koji je pokazao antibiotsko djelovanje. Do sada je tvorba OTA dokazana u *A. mauricatus*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. carbonarius* i *A. niger* te *Penicillium verrucosum* (= *viridicatum*). Ove su vrste česti kontaminanti uskladištenih poljoprivrednih, suhomesnatih proizvoda i krmiva (JECFA, 2001). 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 1).



Slika 1. Kemijska struktura okratoksina A

Okratoksin A je sveprisutan mikotoksin s potencijalnim nefrotoksičnim, karcinogenim i citotoksičnim djelovanjem. Zbog svog nefrotoksičnog i karcinogenog djelovanja pretpostavlja se da bi OTA mogao biti jedan od etioloških čimbenika endemske nefropatije u ljudi koja je povezana s povećanim rizikom od tumora urinarnog trakta i drugim oblicima intersticijskog nefritisa (Pfohl-Leskowicz, 2002).

### 1.1.1. Mehanizam djelovanja OTA

Osjetljivost stanica na OTA u većini slučajeva ovisi o koncentraciji mikotoksina, vremenu izlaganja te o unutarstaničnom molekulskom i genetičkom sastavu. OTA inhibira biosintezu makromolekula (proteini, RNA, DNA) i ATP. Povećava lipidnu peroksidaciju te negativno utječe na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija u biološkom sustavu (Braunberg i sur., 1992; Rahimtula i Chong, 1991; Rahimtula i sur., 1988; Meisner i Meisner, 1981). Do inhibicije sinteze proteina dolazi zbog kompeticije s fenilalaninom u reakciji aminoacilacije fenilalanin-tRNAPhe (Creppy i sur., 1984). Specifične izoforme citokroma

P450 (CYP450 1A1, 3A4, 2D6, 2C9, 2A6 i 2E1) uzrokuju nastajanje OTA-DNA adukta i genotoksičnost OTA (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Smatra se da OTA stimulira lipidnu peroksidaciju vezanjem  $Fe^{3+}$ . Nastali kompleks OTA- $Fe^{3+}$  reagira s kisikom te nastaju reaktivni radikali koji najčešće reagiraju s nezasićenim masnim kiselinama. 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). Koncentracija tiobarbiturnih adukata (TBARS) odražava koncentraciju lipidnih peroksida. OTA (5  $\mu\text{g/ml}$ ) nakon 24-satnog izlaganja povećava stvaranje TBARS u bubrežnim PK15 stanicama svinje za 56 %, a nakon 48 sati za 85 %, u odnosu na kontrolu (Šegvić Klarić i sur., 2007b). Povećana lipidna peroksidacija može se umanjiti tretiranjem sa superoksid dismutazom i katalazom, antioksidansima u stanici (Omar i sur., 1990; Rahimtula i sur., 1988). Smatra se da je apoptozno djelovanje OTA posljedica nekoliko mehanizama uključujući poremećaj mitohondrijskog respiracijskog lanca, neravnotežu pro- i anti-apoptoznih proteina Bcl-2, aktivaciju proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK), smanjenje koncentracije unutarstaničnog ATP kao i povećanje koncentracije kalcija u stanici (Eder i sur., 2000; Schwerdt i sur., 2004; Assaf i sur., 2004; Gekle i sur., 2005).

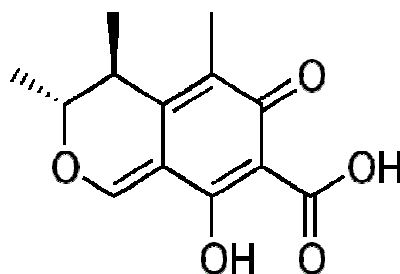
### **1.1.2. Toksični učinci okratoksina A**

Iako je bilo prikazano da su moguće mete OTA jetra, imunosni sustav i stanice mozga, bubrezi su ipak glavna meta toksičnog djelovanja OTA. Prema vrijednostima  $LD_{50}$  (doza koja uzrokuje 50 % umiranje životinja) nakon oralne primjene OTA, najosjetljiviji su psi (0,2 mg/kg tj.t.) i svinje (1 mg/kg tj.t.), dok su najotporniji štakori (20-30 mg/kg tj.t.) i miševi (46-58 mg/kg tj.t.) (Pepeljnjak i sur., 2008; JECFA, 2001). Studije provedene u Danskoj, Mađarskoj, Poljskoj i Skandinaviji pokazuju da OTA ima veliku ulogu u etiologiji svinjske nefropatije. Nefropatija je bila inducirana dozama 0,02, 0,1 i 0,4 mg/kg tj.t.. Tijekom 3 do 4 mjeseca tretiranja s dozama 0,1 i 0,4 mg došlo je do nekroze u bubrezima. Oštećenje bubrega u tretiranih životinja je karakterizirano slabljenjem funkcije proksimalnih tubula koje se očituje proteinurijom, glukozurijom, uremijom i povećanjem koncentracija kreatinina u krvi te smanjenjem koncentracija proteina i glukoze u krvi (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Imunosupresivno djelovanje OTA također je dokazano u svinja. Naime, ovaj mikotoksin u dozi 5-50  $\mu\text{g/kg}$  tj.t. dnevno tijekom 28-34 dana smanjuje indeks fagocitoze i značajno potencira eksperimentalno izazvanu pneumoniju u svinja (Müller i sur., 1999). Karcinogeno djelovanje OTA dokazano je u Fischer štakora i B6C3F1 miševa. Miševi i štakori su nakon jedne, odnosno dvije godine tretmana s OTA (40  $\mu\text{g}$  u hrani, odnosno 21, 70, 210  $\mu\text{g/kg}$  tj.t. intraperitonealno) razvili tubularne adenome i karcinome. Pri tom su se mužjaci pokazali osjetljiviji u odnosu na ženke: 72 % mužjaka štakora i 16 % ženki imalo je karcinom bubrega

dok u ženki miša nije došlo do razvoja karcinoma (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Prema IARC (International Agency for Research on Cancer) OTA je svrstan u skupinu 2B (moguće karcinogeno djelovanje za ljude) (IARC, 1986).

## 1.2. Citrinin

Citrinin (CTN) proizvodi *Penicillium citrinum*, neke druge vrste roda *Penicillium* i *Aspergillus* (Ožegović i Pepeljnjak, 1995) te *Monascus* (Xu i sur., 2006). Ovaj mikotoksin je bio otkriven 1949. godine pokazujući, kao i OTA, antibiotsko djelovanje (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). CTN je česti ko-kontaminant hrane zajedno s OTA (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Ovaj mikotoksin najčešće kontaminira žitarice, voće i kikiriki (Peraica i sur., 2008). Toksikološke studije su pokazale da je CTN nefrotoksičan za životinje, oštećujući proksimalne tubule bubrega te se, poput OTA, smatra potencijalnim uzročnikom endemske nefropatije (Xu i sur., 2006; Frank, 1992; IARC, 1986).



Slika 2. Kemijska struktura CTN

CTN je po kemijskoj strukturi 4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4-dimetil-6-okso-2-benzopiran-7-karboksilna kiselina (Slika 2). Prisutan je u obliku žućkastih kristala s maksimalnom apsorpcijom od 250 nm do 333 nm (u metanolu). Topljiv je u acetonu, kloroformu, benzenu i etanolu, a netopljiv je u vodi i n-heksanu.

### 1.2.1. Mehanizam djelovanja CTN

CTN u koncentraciji od 100 µg inhibira RNA, sintezu proteina i DNA (Ožegović i Pepeljnjak., 1995). *In vitro* studije na različitim kulturama stanica dale su kontradiktorne rezultate o uključenosti oksidacijskog stresa u toksičnom djelovanju CTN. Objavljeno je da CTN modificira antioksidacijske enzimske komplekse stanica jetre štakora tako da inhibira glutation reduktazu i transhidrogenazu (Ribeiro i sur., 1997). Nije primijećen učinak na glutation peroksidazu, katalazu, glukoza-6-fosfat dehidrogenazu, 6-fosfoglukonat dehidrogenazu i superoksid dismutazu. CTN stimulira stvaranje superoksidnog aniona u respiracijskom lancu i tako povećava tvorbu reaktivnih kisikovih spojeva. Autori su iz toga

zaključili da je oksidacijski stres važan mehanizam citotoksičnosti CTN. To je i potvrđeno istraživanjima o učinku CTN na stanice kvasca (Iwahashi i sur., 2007) i istraživanjima vijabilnosti Vero stanica izloženih CTN i antioksidansu vitaminu E (El Golli i sur., 2006). Korištena je i suspenzija proksimalnih tubula bubrega (RPT, engl. *renal proximal tubules*) te je utvrđeno da CTN povećava lipidnu peroksidaciju i da deferoksamin (koji sprječava lipidnu peroksidaciju posredovanu željezom) nije zaštitio RPT stanice od stanične smrti koju potiče CTN (Aleo i sur., 1991). Utvrđeno je da CTN uzrokuje apoptozu HL-60 stanica u ljudi i PK15 stanica bubrega svinje (Yu i sur., 2005; Šegvić Klarić i sur., 2008). Broj stanica u apoptozi povećava se značajno pri dozama većim od LC<sub>50</sub> (koncentracija koja uzrokuje 50 % umiranje stanica) (50 µg).

Elektronska mikroskopija pokazala je da CTN značajno utječe na normalne mitohondrije te stanica bubri i umire. Predloženo je da CTN smanjuje nakupljanje Ca<sup>2+</sup> iona u matriksu mitohondrija sprječavajući normalan dotok i povećavajući izlazak Ca<sup>2+</sup> iz stanica (Chagas i sur., 1995). CTN smanjuje koncentraciju glutationa ovisno o dozi i vremenu u ljudskim epitelnim stanicama alveola (A549) u netoksičnim koncentracijama (Johannessen i sur., 2007). Ovaj efekt ukazuje na prisutnost oksidacijskog stresa i može doprinjeti upali u ljudi izloženih plijesnima.

### **1.2.2. Toksični učinci CTN**

CTN slično okratoksinu A djeluje nefrotoksično, hepatotoksično i teratogeno. Citotoksičnost CTN iznimno varira ovisno o vrsti stanice na koju CTN djeluje. Oralni je LD<sub>50</sub> za štakore 50 mg/kg tj.t. (Sakai i sur., 1955), dok subkutano LD<sub>50</sub> iznosi 67 mg/kg tj.t. (Ambrose i sur., 1945). Subkutani tretman trudnih štakora s 35 mg/kg tj.t. tijekom 6, 9 i 10 dana trudnoće rezultira smrću ≥50 % ženki (Reddy i sur., 1982). Kod danskih kunića oralna LD<sub>50</sub> iznosi 134 mg/kg tj.t., dok kod novozelandskih bijelih kunića LD<sub>50</sub> iznosi 120 mg/kg tj.t.. Akutna letalna doza u kunića, zamoraca, štakora i svinja uzrokuje naticanje bubrega i akutnu tubularnu nekrozu (Friis i sur., 1969; Ambrose i sur., 1946; Krogh i sur., 1970). Subkronična oralna terapija štakora vodenom suspenzijom izoliranom iz kulture *Penicillium viridicatum* uzrokuje ozljedu bubrega induciranu CTN karakteriziranu povećanjem bubrega i raznim oštećenjima proksimalnih tubula (Friis i sur., 1969). Tjedni tretman miševa injekcijama s CTN (20 mg/kg) tijekom 6 tjedana rezultirao je značajnim oštećenjem stanica koštane srži, prekursorima crvenih i bijelih krvnih stanica, megakariocita, smanjenjem težine slezene te smanjenjem broja stanica slezene (Gupta i sur., 1983). Yu i sur. (2005) su ispitali utjecaj CTN na jezgru i DNA HL-60 stanica: neke od jezgri su se smanjile i fragmentirale, upućujući na to da izlaganje stanica CTN može dovesti do uništenja kromatina, što je glavno obilježje apoptoze. Isto tako apoptozi uzrokovanoj CTN je pridonijelo i nagomilavanje citokroma c u

citosolu otpuštenog iz mitohondrija te aktivacija kaspaza 3, 6, 7 i 9. U stanicama ljudskog bubrega (HK2; CRL-2190) utvrđeno je da CTN inducira stvaranje tri adukata pri koncentraciji 50  $\mu$ M. Prisutnost tih adukata je vremenski ograničena te se oni ne mogu detektirati nakon 72 h (Pfohl-Leszkowicz i sur., 2007). Što se tiče genotoksičnosti isti testovi daju i pozitivne i negativne rezultate iz čega se ne može izvući siguran zaključak, a isto se pokazalo i kod mutageneze.

Podaci o kancerogenosti CTN su malobrojni. CTN je embriocidan i toksičan za fetus miševa (Hood i sur., 1976). LD<sub>50</sub> CTN na kokošnjem embriju starom 4 dana je 80,5  $\mu$ g po jajetu (Ciegler i sur., 1977). Doze CTN od 50, 100 i 150  $\mu$ g po jajetu bile su teratogene u 46 %, 48 % i 73 % preživjelih kokošnjih embrija.

Prema IARC CTN je svrstan u skupinu 3 zbog nedovoljno dokaza o njegovoj karcinogenosti na eksperimentalnim životinjama i nikakvih dokaza za ljude (IARC, 1986).

### **1.3. Kombinirani toksični učinci OTA i CTN**

Istraživanja su pokazala da istovremeni unos OTA i CTN kod miševa uzrokuje citotoksični i genotoksični učinak te povećanu pojavnost bubrežnih tumora. CTN ima manji genotoksični potencijal od OTA, međutim pokazalo se da ovaj mikotoksin pojačava genotoksično djelovanje OTA tj. nastajanje OTA-DNA adukata. Primjerice, količine OTA-DNA adukta, C-C8dGMP-OTA, su povećane u prisutnosti CTN. Stoga se pretpostavlja da je interakcija ovih dvaju mikotoksina povezana s procesom prijenosa elektrona. Naime, kinonska struktura CTN može oksidirati OTA u fenokilni radikal i na taj način potaknuti stvaranje C-C8dGMP-OTA adukta. Ovaj mehanizam predstavlja ne-enzimski put bioaktivacije OTA koji bi mogao igrati glavnu ulogu u sinergističkom učinku OTA i CTN (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Tretiranjem PK15 stanica kombinacijom ova dva mikotoksina u niskim koncentracijama zapažen je aditivni genotoksični učinak te sinergistički apoptozni učinak (Šegvić Klarić i sur., 2008).

Sinergističke, aditivne ali i antagonističke interakcije OTA i CTN zapažene su u različitim eksperimentalnim modelima *in vitro* i *in vivo* (Tablica 1).

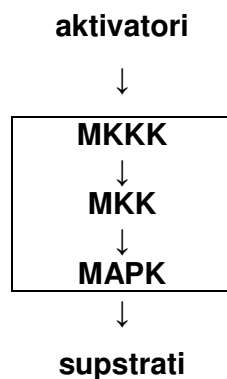


Tablica 1. Interakcije okratoksina A i citrinina (preuzeto iz Speijers i Speijers, 2004).

Uzorak / mjerenje	Učinak
Hepatociti / RNA i DNA, sinteza proteina	Sinergistički
Stanice bubrežnog korteksa / transport org.iona	Aditivni ili blago sinergistički
Bijele koke nesilice / funkcija bubrega	Antagonistički
Pilići / ultrastruktura bubrega	Aditivni
Miševi / hepato-renalna karcinogeneza	Sinergistički
Pileći embrio / morfologija	Aditivni
Broiler pilići / potiskivanje rasta, povećano zadržavanje vode	Antagonistički
Fetus štakora / malformacije	Sinergistički
Štakori / renalna Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> i Mg ATPaza	Sinergistički (samo za Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPazu)
Miš / letalnost	Sinergistički
Zamorčić / letalnost	Sinergistički (ženke), aditivno (mužjaci)
Pas / nefroza	Indikacija za sinergizam
Svinja / sinteza proteina, transport p-aminohipuratnih (PAH) iona u bubrežnom korteksu	Sinergistički (sinteza proteina), aditivni (transport PAH iona)

#### 1.4. Proteinske kinaze aktivirane mitogenima

Tijekom svog životnog ciklusa stanice se neprekidno bore s raznim stresnim poticajima. To uključuje promjene u kemijskim ili fizikalnim uvjetima (primjerice toplina, hladnoća ili pH) ili genska oštećenja. Ti potencijalno štetni poticaji stimuliraju (programiranu) smrt stanice ili aktivaciju obrambenih mehanizama stanice na koju djeluju. Neke molekule koje sudjeluju u odgovoru stanice na te poticaje mogu svojom aktivacijom regulirati oba događaja, i smrt i preživljavanje stanice. Koji će proces prevladati ovisi o vrsti poticaja koji djeluje na stanicu, njegovom intenzitetu i o tipu same stanice. Brojni izvanstanični poticaji aktiviraju članove obitelji proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*). Klasična MAPK kaskada sastoji se od tri unutarstanične proteinske kinaze u slijedu koje se međusobno aktiviraju (Slika 3).



*Slika 3.* Trokomponentni model aktivacije MAPK

Prva kinaza u slijedu je serin-treoninska kinaza ili kinaza kinaze MAPK (MKKK). Kada se ova kinaza aktivira, ona fosforilira i aktivira sljedeću kinazu u slijedu, a to je kinaza MAPK (MKK). MKK su kinaze koje prepoznaju i fosforiliraju treoninski i tirozinski ostatak unutar Thr-X-Tyr motiva aktivacijske omče MAPK (gdje "X" označava različite aminokiseline), pa stoga ove kinaze nazivamo dvojno-specifičnim kinazama. MAPK su usmjerene ka prolinu te fosforiliraju samo one supstrate koji sadrže prolinski ostatak na P-1 mjestu unutar Pro-X-Ser/Thr-Pro slijeda. MAPK mogu fosforilirati i brojne druge supstrate poput citoplazmatskih proteina, proteinskih kinaza, fosfolipaza (Widmann i sur., 1999).

#### **1.4.1. ERK signalni put**

ERK (kinaze regulirane izvanstaničnim signalima) su kinaze regulirane izvanstaničnim signalima. U ovu obitelj se ubraja sedam MAPK: ERK1-5, ERK7 i ERK8. Stanice na koje djeluju različiti čimbenici (poput izloženosti UV i IR svjetlu, vodikovom peroksidu i drugim kemikalijama koje oštećuju DNA) mogu aktivirati fosforilirajuću kaskadu kako bi se regulirala ekspresija gena i stanica pokrenula programiranu staničnu smrt (apoptozu). Različiti tipovi receptora mogu aktivirati ERK1/ERK2 put, poput receptora s tirozin-kinaznim djelovanjem, citokinskih receptora, receptora povezanih s G-proteinima i integrina.

G-protein Ras aktivira Raf-1 (MAPKKK) koji onda fosforilira i aktivira dvojno-specifične treonin-tirozinske kinaze MEK1/2 (MAPKK) te one fosforiliraju ERK1/ERK2 (MAPK). Aktivirane ERK1/ERK2 se brzo translociraju u jezgru gdje reguliraju aktivnost transkripcijskih faktora. ERK1/ERK2 se defosforilacijom različitim specifičnim fosfatazama inaktiviraju te se tada vraćaju u citoplazmu (Cuschieri i sur., 2005).

Kaskada ERK kinaza se aktivira raznim mitogenima, uključujući faktore rasta, tromboksan A2, angiotenzin II i inzulin. ERK se također aktivira kao odgovor na brojne endotoksine, oksidacijski stres te pri prijanjanju stanica prirođene imunosti (monociti i

makrofagi). Velik broj supstrata na koje može djelovati ERK1 i ERK2 ukazuje na različite odgovore stanice u kojima ona sudjeluje: proliferacija, zaustavljanje rasta i diferencijacija, stanični ciklus, migracija stanica, preživljavanje ali i smrt stanica (Widmann i sur., 1999).

### **1.4.2. JNK signalni put**

JNK (kinaze koje fosforiliraju N-kraj transkripcijskog faktora c-Jun) su MAPK koje se razlikuju od ERK po tome što se aktiviraju tretiranjem stanica citokinima i izlaganjem stanica raznim oblicima stresa te se vežu na i fosforiliraju transkripcijski faktor c-Jun na aktivacijskim mjestima na N-kraju, a ne na inhibicijskim mjestima na C-kraju koje fosforilira ERK2.

Postoji najmanje deset JNK izoformi koje su različito eksprimirane i aktivirane u stanicama. Ove izoforme su posljedica alternativnog izrezivanja i slaganja tri glavna gena (*jnk1*, *jnk2* i *jnk3*) koji kodiraju JNK proteinske kinaze. JNK1/2 su posvuda eksprimirane, dok je JNK3 eksprimirana uglavnom u mozgu, srcu i testisima. JNK se aktiviraju kao odgovor stanice na različite vrste stresa što rezultira apoptozom stanice.

Aktivatori JNK (MKK4/MKK7 – fosforiliraju treoninske i tirozinske ostatke) nalaze se i u jezgri i u citoplazmi pa JNK može fosforilirati brojne citoplazmatske proteine i proteine jezgre (Widmann i sur., 1999). Slično kao ERK, i aktivacija JNK sudjeluje u brojnim biološkim odgovorima. No, za razliku od ERK koja uglavnom potiče preživljavanje stanica, proliferaciju i diferencijaciju, JNK najčešće sudjeluje u apoptoznom procesu i potiče umiranje stanica, iako to ovisi o tipu stanica, vrsti i intenzitetu poticaja koji djeluje na stanice (Liu i sur., 2005).

### **1.4.3. p38 signalni put**

p38 se zajedno s JNK naziva stresnom kinazom jer se najčešće aktivira kao odgovor stanice na stres i kod nekih apoptoznih procesa. No i p38, kao i JNK, može sudjelovati u procesima proliferacije i diferencijacije, poticaja preživljavanja stanica i sinteze citokina (Widmann i sur., 1999).

Aktivaciju p38 mogu izazvati fiziološki i osmotski stres, endotoksini i izloženost UV zrakama, a aktiviraju ga i citokini i receptori povezani s G-proteinima. Identificirano je pet izoformi p38 MAPK koje kodiraju različiti geni: *p38 $\alpha$* , *p38 $\beta$* , *p38 $\beta$ 2*, *p38 $\gamma$*  i *p38 $\delta$* . Sve ih fosforilira i aktivira MAPK kinaza MKK 6.

Aktivacija p38 MAPK vrši se dvojnomo fosforilacijom na treoninskom i tirozinskom ostatku unutar Thr-Gly-Tyr aktivacijskog motiva, a fosforiliraju ga dvojno-specifične kinaze (MKK 3 i MKK 6) (Cuschieri i sur., 2005).

## 2.5. Dvojno-specifične MAPK fosfataze

Jedna od najvažnijih posttranslacijskih modifikacija među brojnim regulacijskim mehanizmima koji kontroliraju raznoliku aktivnost stanica je fosforilacija proteina na serinskim, treoninskim i tirozinskim ostacima. Skupinu proteinskih fosfataza sačinjavaju dvije velike obitelji: serin-treoninske fosfataze (PPaze) koje defosforiliraju fosfoserinske i fosfotreoninske ostatke i tirozinske fosfataze (PTPaze) koje defosforiliraju fosfotirozinske ostatke.

Dvojno-specifične fosfataze (DSP) tvore posebnu skupinu PTPaza. One defosforiliraju karakteristične fosfotreoninske i fosfotirozinske ostatke unutar aktivacijske omče MAPK pa se stoga nazivaju fosfatazama MAPK (Yang i sur., 2003).

Prva identificirana dvojno-specifična fosfataza koja može defosforilirati i fosfotirozinske i fosfoserinske / fosfotreoninske ostatke bila je VH1, rekombinantni protein iz virusa vakcinije. Sljedeća detektirana DSP bila je CL100, koja je otkrivena iz cDNA knjižice fibroblasta ljudske kože. CL100 cDNA kodira PTPazu koja je homologna po slijedu s VH1. Pokazalo se da su im aminokiselinski slijedovi 96,5 % identični kao rani gen kojeg induciraju faktori rasta.

Rekombinantni CL100 / 3CH134 može defosforilirati treoninske i tirozinske ostatke ERK kinaza te je time inaktivirati. Povezanost razine ekspresije 3CH134 i inaktivacije ERK u stanicama sisavaca ukazala je na specifičnost prema inaktivaciji MAPK, pa je ova fosfataza nazvana fosfataza MAP kinaza 1 (MKP-1) (Rumora, 2002).

Složenost MAPK signalnih putova i brojnih kinaza uključenih u te putove je velika. Zbog toga je logično da postoje mnoge proteinske fosfataze koje mogu djelovati na kinaze na različitim razinama i regulirati njihove aktivnosti (Yang i sur., 2003).

## 2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Kontaminiranje hrane mikotoksinima globalni je problem. Mikotoksini su sekundarni metaboliti rasta i razvoja plijesni na supstratima biljnog i životinjskog porijekla. Čovjek je najčešće izložen djelovanju mikotoksina putem hrane, ali u nekim slučajevima može doći do njihova udisanja, prolaska kroz kožu ili parenteralne izloženosti. Hrana je često kontaminirana s *Aspergillus* i *Penicillium* vrstama plijesni koje mogu tvoriti više različitih mikotoksina uključujući nefrotoksine OTA i CTN. Stoga se u hrani može istodobno očekivati više različitih mikotoksina što, između ostalih, potvrđuju i nalazi ko-kontaminacije žitarica s OTA i CTN (Pfohl-Leskowicz i Manderville, 2007). Mnogobrojnim istraživanjima potvrđena su citotoksična, mutagena i karcinogena djelovanja OTA i CTN (JECFA, 2001). Također je dokazano da ovi mikotoksini pokazuju uglavnom sinergističke toksične interakcije u različitim eksperimentalnim modelima (Speijers i Speijers, 2004).

Novija istraživanja pokazuju da mehanizam toksičnog djelovanja OTA i CTN uključuje i aktivaciju signalnih putova MAPK, koji su jedni od najbolje proučenih signalnih putova u stanicama. Aktivirane MAPK (ERK, JNK i p38) utječu na konačni odgovor stanice na različite poticaje te mogu stimulirati proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje ili smrt stanice. Sve MAPK reguliraju brojne različite stanične programe, ali u većini slučajeva ERK je povezana s preživljavanjem stanice, dok su JNK i p38 povezane s programiranom staničnom smrću (apoptozom). Proučavanje i ispitivanje ovih signalnih putova veoma je važno za razumijevanje patologije mnogih bolesti te mogućnosti utjecaja na njihov ishod. Hipoteza ovog rada jest da OTA i CTN potiču aktivaciju stresnih kinaza (JNK i p38) i potiskuju aktivaciju ERK te na taj način djeluju citotoksično na epitelne stanice bubrega svinje PK15. Stoga je opći cilj ovog rada ispitati utjecaj OTA i CTN na vijabilnost PK15 stanica i na aktivaciju MAPK. Specifični ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti  $IC_{50}$  (koncentracija koja smanjuje vijabilnost stanica za 50 %) za OTA i CTN u PK15 stanicama kako bi se izabrale sub- i supracitotoksične koncentracije koje će biti primjenjene za određivanje aktivnosti MAPK (ERK, JNK i p38).
2. Ispitati aktivnost ERK, JNK i p38 u PK15 stanicama ovisno o koncentraciji i vremenu izlaganja OTA i CTN.
3. Odrediti aktivnost ERK, JNK i p38 nakon istodobnog izlaganja PK15 stanica OTA i CTN.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Kultura stanica

Epitelne stanice bubrega svinje PK15 (engl. *porcine kidney*) (American Type Culture Collection, Rockville, Md USA) uzgajaju se u RPMI 1640 mediju (Imunološki zavod, Zagreb) bez fenolnog crvenila uz dodatak 2 mM glutamina i toplinski inaktiviranog 10 % (v/v) telećeg fetalnog seruma (Sigma) te antibiotika penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100 µg/mL) i amfotericina B (2,5 µg/mL). Inkubacija se provodi na temperaturi 37°C u atmosferi s 95 % vlažnosti i 5 % CO<sub>2</sub>. Stanice su uzgajane u navedenom mediju do približno 80 % konfluentnosti nakon čega su presađene, odnosno tretirane mikotoksinima. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS; pH 7,4) i tretiraju s tripsinom (EDTA) te se resuspendiraju u novom mediju.

### 3.2. Mikotoksini

Okratoksin A (OTA), (Mr=403,81) iz *Aspergillus ochraceus* (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) i citrinin (CTN), (Mr=250,25) iz *Penicillium citrinum* (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) otopljeni su u apsolutnom etanolu (matične otopine koncentracije 1 mg/ml). Prije tretiranja stanica iz matičnih otopina priređena su odgovarajuća razrjeđenja sa staničnim medijem. Stanice su tretirane s OTA u koncentracijama 1, 2, 6, 10, 18, 26, 34 i 46 µM za određivanje IC<sub>50</sub> te s 0,1, 0,25, 0,5, 1, 6 i 10 µM za detekciju ekspresije i aktivacije MAPK (ERK, JNK i p38). Stanice su tretirane s CTN u koncentracijama 10, 30, 50, 70, 90, 110 i 130 µM za određivanje IC<sub>50</sub> te s 10, 20, 30, 50, 70 i 100 µM za detekciju ekspresije i aktivacije MAPK (ERK, JNK i p38). Tijekom izvođenja pokusa, kontrolne stanice (K) su rasle u mediju s 1,8 % etanola.

### 3.3. MTT test

U staničnoj kulturi moguće je u uvjetima *in vitro* upotrebom MTT reagensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) ispitati citotoksične učinke vanjskih čimbenika na stanice. MTT se reducira enzimima ER-a (mikrosomalnim enzimima) koji trebaju NADH i NADPH. Sukcinat također može biti elektron-donor pri redukciji MTT mitohondrijskom sukcinat dehidrogenazom. Ovom metaboličkom redukcijom MTT (blijedo-žuti supstrat) nastaje formazan (intenzivno tamno-plavo obojeni krajnji produkt). Stanična membrana živih stanica nepropusna je za kristale formazana pa se oni nakupljaju u stanicama. Primjenom kiselog izopropanola, oslobađaju se kristali formazana i otapaju u mediju. Intenzitet boje

nastao oslobađanjem kristala formazana iz živih stanica u okolinu može se kvantitativno mjeriti pomoću čitača mikrotitarskih pločica na valnoj duljini 595 nm. Princip MTT postupka je da je broj preživjelih stanica nakon inkubacije stanične kulture s citotoksičnom tvari, a nakon bojanja MTT reagensom, proporcionalan količini nastalog formazana kojeg odredimo spektrofotometrijski. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole.

Za izvođenje MTT testa korištene su sljedeće kemikalije:

- MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Sigma) otopljen je u PBS u koncentraciji 10 mg/ml
- 0,04 M HCl u apsolutnom izopropanolu (Kemika, Zagreb)

POSTUPAK:

1. Uzgoj kulture stanica PK15 do eksponencijalne faze rasta (24-satna inkubacija pri 37°C, 95 % vlažnosti i 5 % CO<sub>2</sub>).
2. Razrjeđivanje stanica RPMI 1640 hranjivim medijem do gustoće od 90000 stanica/mL (9000 stanica / jažici)
3. Aplikacija 100 µL suspenzije stanica u određeni broj jažica mikrotitarske pločice s 96 jažica, inkubacija 36 h.
4. Promjena medija i inkubacija u mediju bez seruma 12 h.
5. Stanicama dodajemo mikotoksine i otapalo (1,8 % etanol) kao kontrolu, inkubacija 24 h.
6. Pažljivo uklonimo medij i dodamo u svaku jažicu po 100 µL MTT razrijeđenog hranjivim medijem do koncentracije 0,5 mg MTT/mL medija, inkubiramo 3,5 sata pri temperaturi 37°C, 95 % vlažnosti, 5 % CO<sub>2</sub>.
7. Pažljivo uklonimo medij odsisavanjem s vakuum sisaljkom.
8. U svaku jažicu doda se po 200 µL 0,04 M HCl u apsolutnom izopropanolu i ostavi 15 minuta na tresilici kako bi nastali formazan prešao iz stanice u medij.
9. Pomoću čitača mikrotitarske pločice (VICTOR<sup>3</sup> 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer) očitamo apsorbanciju pri 595 nm.

### 3.4. Pripremanje staničnog lizata

PK15 stanice se nasade na ploče sa 6 jažica ( $3 \times 10^5$ /mL) i inkubiraju 36 sati. Potom se medij zamijeni svježim RPMI 1640 bez telećeg fetalnog seruma te se stanice inkubiraju 12 sati. Nakon inkubacije stanice se tretiraju mikotoksinima tijekom 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 sata. Po završetku tretmana s mikotoksinima medij se ukloni, a stanice se dva puta isperu s hladnim PBS (sve je potrebno raditi držeći ploču sa stanicama na ledu). U svaku se jažicu dodaje 200  $\mu$ L hladnog pufera za liziranje stanica (50 mM Tris HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Nonident P-40, 10 % glicerol, koktel tableta inhibitora proteaza, 100 mM natrijev ortovanadat). Nakon 20 minuta inkubacije na ledu, stanice se podignu blagim struganjem silikonskim strugačem i centrifugiraju (14000 rpm, 4°C, 20 minuta). U 160  $\mu$ L nadtaloga dodaje se 40  $\mu$ L 6x pufera za nanošenje uzorka (0,375 M Tris HCl pH 6,8, 12 % SDS, 3 % glicerol, 0,2 % bromfenol plavilo, 12 %  $\beta$ -merkaptioetanol u destiliranoj vodi) i uzorci se kuhaju (97°C, 5 minuta), ohlade na ledu i pospreme na -20°C. Ovi se uzorci nanose na SDS-poliakrilamidni gel (30  $\mu$ g proteina u svaku jažicu) i služe za Western blot određivanja. Ostatak nadtaloga služi za određivanje koncentracije proteina.

### 3.5. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje proteina pomoću bicinkonične kiseline (BCA) korišten je test kit (Sigma, St. Louis, SAD) prema uputama proizvođača.

1. Oko  $5 \times 10^6$  stanica homogenizira se u 200  $\mu$ L pufera za liziranje stanica.
2. Centrifugiranje prema protokolu za MAPK i odvajanje nadtaloga.
3. 4  $\mu$ L nadtaloga se dodaje na 21  $\mu$ L destilirane vode u jažicu mikrotitarske pločice (razrjeđenje je 6,25x).
4. Doda se 100  $\mu$ L reagensa i ostavi 30 min. na 37°C te se očita apsorbancija na 562 nm. Reagens se priređuje miješanjem 50 volumena BCA i jednog volumena bakar-2-sulfata.
5. Apsorbancija se očita pomoću čitača mikrotitarskih pločica (VICTOR<sup>3</sup> 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer) na 562 nm.

Baždarni pravac je napravljen od 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 i 1 mg/ml albumina goveđeg seruma (BSA).



### 3.6. Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Gel-elektroforeza proteina provedena je u 4 % sabijajućem i 12 % razdvajajućem poliakrilamidnom gelu prema metodi po Laemmli-u (Laemmli, 1970).

- Gel za sabijanje 4 %  
mješavina akrilamida 4 % (30 % matična otopina: 29,2 g akrilamid i 0,8 g N'N'-metilen-bis-akrilamid u destiliranoj vodi; drži se na 4°C zaštićeno od svjetla)  
pufer za sabijanje 25 % (0,5 M Tris HCl pH 6,8, 10 % SDS )  
amonijev persulfat 10 %  
Temed 0,05 %  
u destiliranoj vodi
- Gel za razdvajanje 12 %  
mješavina akrilamida 12 % (30 % matična otopina: 29,2 g akrilamid i 0,8 g N'N'-metilen-bis-akrilamid u destiliranoj vodi; drži se na 4°C zaštićeno od svjetla)  
pufer za sabijanje 25 % (1,5 M Tris HCl pH 8,8, 10 % SDS)  
amonijev persulfat 10 %  
Temed 0,05 %  
u destiliranoj vodi

Uzorci koji se nanose na gel sadržavaju jednaku koncentraciju proteina (30 µg). Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu (0,25 M Tris HCl pH 8,3, 2 M glicin, 0,1 % SDS) uz napon od 100 V tijekom otprilike 90 minuta. Kao standard za određivanje približne molekulske mase proteina korištena je komercijalno nabavljena smjesa proteina za SDS-poliakrilamidnu gel elektroforezu poznate molekulske mase ("Multi Mark Multi-Colored Standard", Invitrogen).

### 3.7. Western blot metoda

Elektroforezom razdvojeni proteini nanijeti su na nitroceluloznu membranu u uređaju za elektro-prijenos proteina (BioRad PowerPac 300) pri jakosti struje od 250 mA tijekom 90 minuta. Da bismo provjerili da li su uzorci koje smo nanijeli na gel sadržavali jednaku koncentraciju proteina i postigli ujednačenost prijenosa uzoraka na membranu, gelove smo obojali otopinom za bojanje Commasie plavilom R-250 (0,1 % Commasie plavilo R-250 u smjesi 40 % metanola i 10 % octene kiseline). Višak boje smo uklonili otopinom za odbojavanje (40 % metanol i 10 % octena kiselina u destiliranoj vodi). Osim toga, da bismo provjerili ujednačenost prijenosa uzoraka na membranu kao kontrola nam je poslužila i ravnomjerna razina ekspresije MAPK.

Nespecifično vezanje proteina na slobodna vezna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje (10 % albumin iz goveđeg seruma i 10 %

albumin kokoši u puferu za ispiranje: 50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20 u destiliranoj vodi) tijekom 60 min. Membrana je zatim inkubirana tijekom 15 minuta u primarnom protutijelu (ERK, JNK, p38, ERK-P, JNK-P, p38-P) razrijeđenom puferom za blokiranje i tako pohranjena na 4°C tijekom noći.

- Za detekciju proteina ERK korištena su kuničja ERK1 (C-16) poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara aminokiselinskom slijedu 352-367 C-kraja štakorske ERK1, koja detektiraju ERK1 i ERK2 kinazu (Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:800).
- Za detekciju dvojno-fosforilirane ERK korištena su kuničja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Thr-Glu-Tyr područja unutar aktivacijske omče aktivnih oblika ERK1 i ERK2 kinaza (Promega) (razrjeđenje 1:5000).
- Za detekciju proteina JNK korištena su kuničja JNK1 (FL) poliklonska protutijela razvijena naspram potpunog aminokiselinskog slijeda (1-384) humane JNK1, koja detektiraju JNK1 i JNK2 (Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:800).
- Za detekciju dvojno-fosforilirane JNK korištena su kuničja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Thr-Pro-Tyr područja unutar aktivacijske omče aktivnih oblika JNK1 i JNK2 kinaza (Promega) (razrjeđenje 1:5000).
- Za detekciju proteina p38 korištena su kuničja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara aminokiselinskom slijedu 341-360 C-kraja mišje p38 (Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:800).
- Za detekciju dvojno-fosforilirane p38 korištena su kuničja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Thr-Pro-Tyr područja unutar aktivacijske omče aktivnog oblika humane p38 kinaze (Promega) (razrjeđenje 1:5000).

Nakon inkubacije, membrana je isprana puferom za ispiranje (4x15 minuta) te su membrane inkubirane sa sekundarnim protutijelima tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi uz neprekidno miješanje. Sekundarno protutijelo je razrijeđeno s otopinom 5 % obranog mlijeka u prahu u puferu za ispiranje.

- Za detekciju svih navedenih proteina korištena su poliklonska protutijela magarca razvijena naspram cijele molekule kuničjeg imunoglobulina G (GE Healthcare) (razrjeđenje 1:5000).

Vizualizacija proteina postiže se inkubacijom membrane s reagensom za pojačanu kemiluminescenciju (GE Healthcare) tijekom 60 sekundi u mraku. Membrane se zatim izlože filmu (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm™ ECL), a vrijeme izlaganja je oko 20 minuta.

### 3.8. Statističke metode

Rezultati dobiveni mjerenjem vijabilnosti (n=5) izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim pogreškama aritmetičke sredine (SEM). 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) te Dunnett post testom (pokusne skupine vs. kontrola) i Tukey post testom (pojedinačni toksini vs. kombinacije toksina) multiple komparacije na razini značajnosti  $P < 0,05$ . Odnos očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti i njihovih standardnih pogrešaka (SEM) 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 CTN i OTA.

$$\bar{X}_{\text{(očekivana za CTN+OTA)}} = \bar{X}_{\text{(izmjerena za CTN)}} + \bar{X}_{\text{(izmjerena za OTA)}} - \bar{X}_{\text{(kontrola)}}$$

$$SEM_{\text{(očekivana za CTN+OTA)}} = [ (SEM_{\text{(CTN)}})^2 + (SEM_{\text{(OTA)}})^2 ]^{1/2}$$

Rezultati su interpretirani na sljedeći način:

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

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

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

## 4. REZULTATI

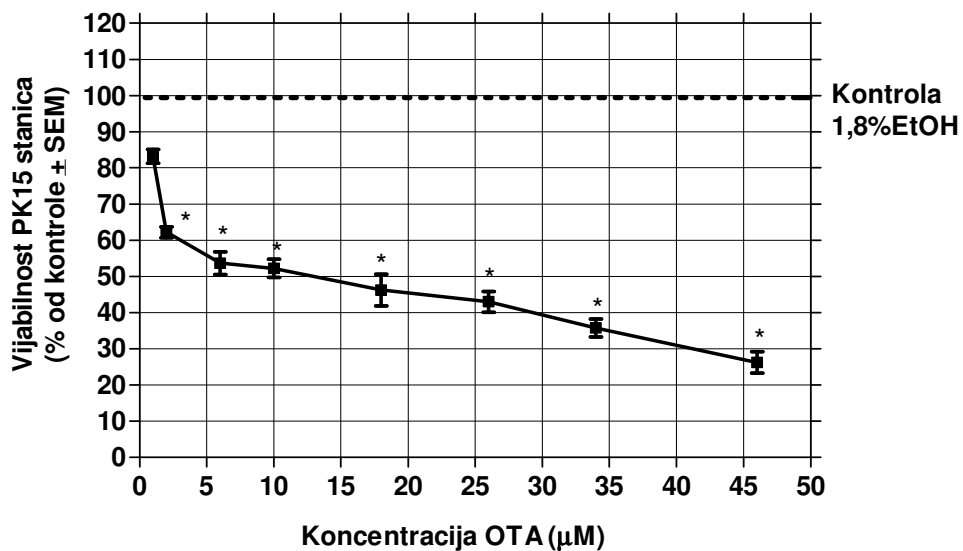
### 4.1. Vijabilnost PK15 stanica

Za određivanje vijabilnosti PK15 stanica nakon 24-satnog izlaganja različitim koncentracijama OTA (od 1 do 46  $\mu\text{M}$ ) i CTN (od 10 do 130  $\mu\text{M}$ ) primjenjen je MTT test. Na *Slikama 4 i 5* prikazana je vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu (1,8 % etanol).

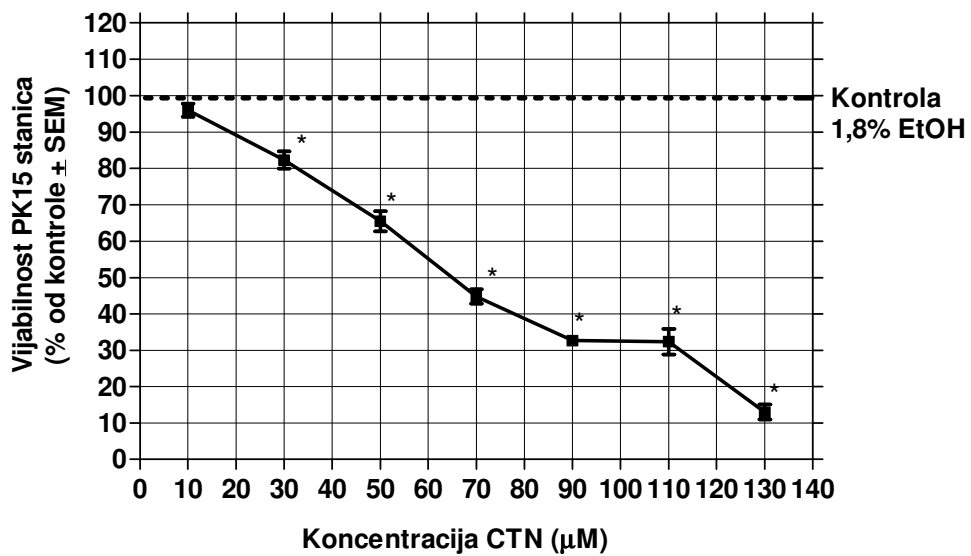
Pri tretiranju PK15 stanica koncentracijom 1  $\mu\text{M}$  OTA (*Slika 4*) ne dolazi do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu. Daljnjim povećanjem koncentracije OTA (2-46  $\mu\text{M}$ ) dolazi do statistički značajnog pada vijabilnosti u odnosu na kontrolu (od oko 38 do 75 %,  $P < 0,05$ ). Na temelju vrijednosti dobivenih nakon tretmana stanica s rastućim koncentracijama OTA izračunata je  $\text{IC}_{50}$  (koncentracija OTA koja smanjuje vijabilnost stanica za 50 %) te ona iznosi  $14,0 \pm 2,4 \mu\text{M}$ .

Iz *Slike 5* vidljivo je da se tretiranjem stanica s 10  $\mu\text{M}$  CTN stanična vijabilnost značajno ne smanjuje. Povećanjem koncentracija CTN u rasponu od 30 do 130  $\mu\text{M}$  vijabilnost stanica značajno pada u odnosu na kontrolu (od oko 20 do 90%,  $P < 0,05$ ).  $\text{IC}_{50}$  CTN iznosi  $73,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$  što je oko 5 puta veća vrijednost od  $\text{IC}_{50}$  OTA.

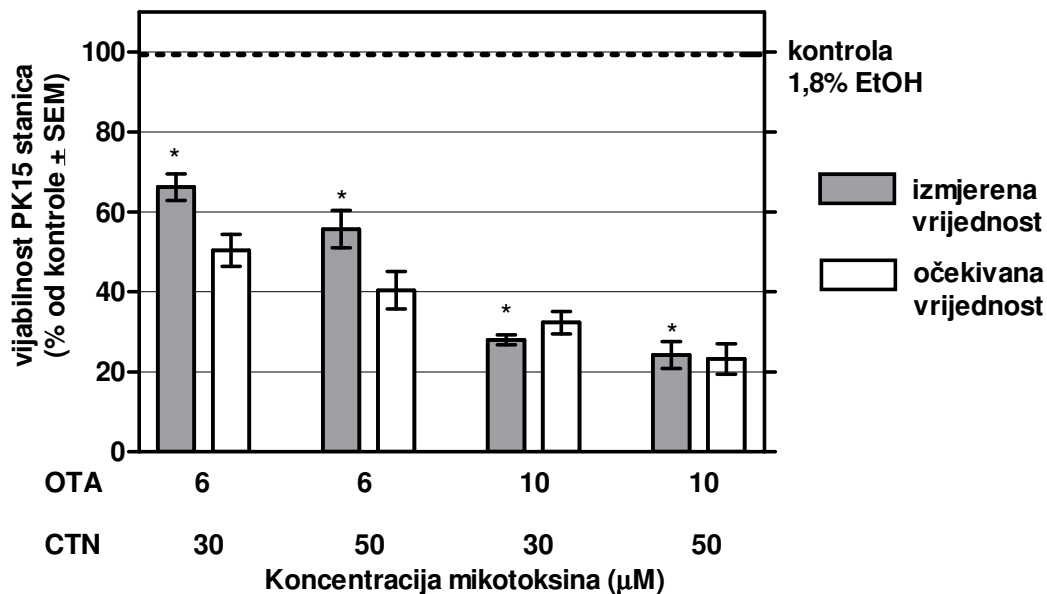
Kako bi se ispitale citotoksične interakcije (aditivne, sinergističke ili antagonističke) ovih mikotoksina izabrane su sub-citotoksične koncentracije OTA (6 i 10  $\mu\text{M}$ ) i CTN (30 i 50  $\mu\text{M}$ ). Nakon 24-satnog tretmana kombinacijama OTA i CTN (6+30  $\mu\text{M}$  i 6+50  $\mu\text{M}$ ) vijabilnost stanica pada za oko 40% u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ), a kombinacije 10  $\mu\text{M}$  OTA s 30 ili 50  $\mu\text{M}$  CTN smanjuju vijabilnost za oko 75% u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ). Ispitivane kombinacije koncentracija OTA i CTN imaju aditivan citotoksični učinak na PK15 stanice jer se izmjerene vijabilnosti statistički značajno ne razlikuju od očekivanih vrijednosti za sve ispitane kombinacije ovih mikotoksina (*Slika 6*).



Slika 4. Citotoksično djelovanje OTA na PK15 stanice nakon 24-satnog tretmana s rastućim koncentracijama OTA (od 1 do 46  $\mu\text{M}$ ). \* $P < 0,05$  statistička značajnost u odnosu na kontrolu (1,8 % EtOH).



Slika 5. Citotoksično djelovanje CTN na PK15 stanice nakon 24-satnog tretmana s rastućim koncentracijama CTN (od 10 do 130  $\mu\text{M}$ ). \* $P < 0,05$  statistička značajnost u odnosu na kontrolu (1,8 % EtOH).



Slika 6. Vijabilnost PK15 stanica nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama OTA+CTN. \*P<0,05 statistička značajnost u odnosu na kontrolu (1,8 % EtOH).

## 4.2. Aktivacija MAPK

Da bismo ispitali da li je aktivacija MAP kinaza uključena u mehanizam citotoksičnosti mikotoksina, odredili smo ekspresiju i aktivaciju ERK, JNK i p38 MAPK Western blot metodom.

Stanice smo tretirali s OTA u koncentracijama 0,1, 0,25, 0,5, 1, 6 i 10 μM te s CTN u koncentracijama 10, 20, 30, 50, 70 i 100 μM tijekom 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 sata.

OTA i CTN, neovisno o primijenjenoj koncentraciji i/ili vremenu izloženosti stanica ovim mikotoksinima nisu značajno utjecali na razinu ekspresije MAPK (*slike 7, 8, 9 i 10*). Ipak, OTA i CTN su inducirali aktivaciju, tj. fosforilaciju MAPK (ERK, JNK i p38 MAPK). Intenzitet i trajanje fosfo-MAPK signala ovisili su o koncentraciji OTA i CTN i o vremenu tretiranja ovim mikotoksinima.

Nakon 30 minuta tretiranja PK15 stanica mikotoksinima (pojedinačno ili u kombinaciji) nismo uspjeli detektirati aktivaciju MAPK.

Sve su primjenjene koncentracije OTA i CTN te OTA+CTN (6+30, 6+50, 10+30, 10+50 μM) aktivirale **ERK1/ERK2** kinaze nakon 1, 2, 4 i 6 sati, ali je intenzitet aktivacije

ovisio o koncentraciji mikotoksina i pojačavao se povećanjem koncentracije (*Slika 7*). Nakon 8, 12 i 24 sata fosfo-ERK1/ERK2 signal nismo uspjeli detektirati.

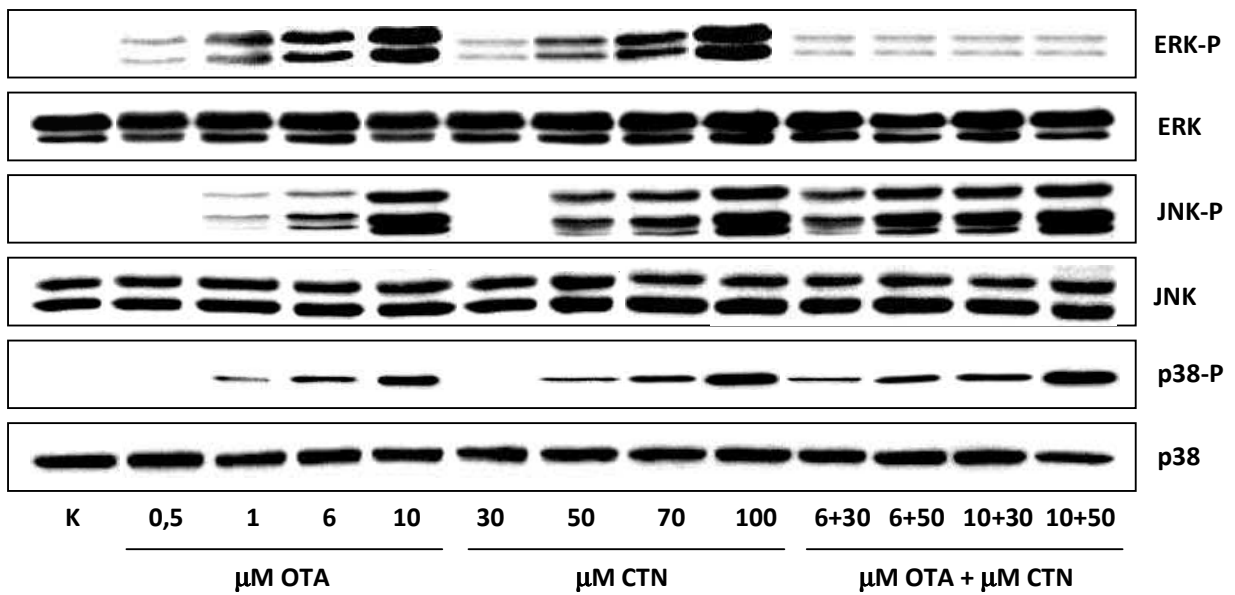
Aktivaciju **JNK1/JNK2** kinaza zabilježili smo nakon 1 i 2 sata samo kod tretiranja stanica s CTN u koncentracijama 70 i 100  $\mu\text{M}$  te kod kombinacije OTA+CTN u koncentracijama 10+30 i 10+50  $\mu\text{M}$ . Nakon 4 sata izloženosti PK15 stanica nismo uspjeli zabilježiti aktivaciju JNK1/JNK2 kinaza. No, nakon 6, 8 i 12 sati tretmana zabilježena je aktivacija JNK1/JNK2 kinaza kod svih mikotoksina i to u koncentracijama 1, 6 i 10  $\mu\text{M}$  za OTA, 50, 70 i 100  $\mu\text{M}$  za CTN te za sve koncentracije mikotoksina u kombinaciji. Aktivacija JNK1/JNK2 kinaza detektirana je i nakon 24 sata, ali samo nakon izloženosti stanica CTN (70 i 100  $\mu\text{M}$ ) te OTA+CTN (10+30 i 10+50  $\mu\text{M}$ ).

**p38** kinaza se aktivirala nakon 2 sata uz 6 i 10  $\mu\text{M}$  OTA, 50, 70 i 100  $\mu\text{M}$  CTN te uz sve primijenjene koncentracije OTA+CTN (6+30, 6+50, 10+30 i 10+50  $\mu\text{M}$ ). Iste koncentracije CTN i kombinacije mikotoksina su aktivirale p38 nakon 4 sata i nakon 6 sati (*Slika 7*). S druge strane, detektirali smo fosfo-p38 signal uz 0,25, 0,5, 1, 6 i 10  $\mu\text{M}$  OTA nakon 4 sata, uz 1, 6 i 10  $\mu\text{M}$  OTA nakon 6 sati te uz 10  $\mu\text{M}$  OTA nakon 8 sati. OTA+CTN aktivirali su p38 MAPK u koncentracijama od 6+50  $\mu\text{M}$ , 10+30  $\mu\text{M}$  te 10+50  $\mu\text{M}$ , a CTN u koncentracijama 70 i 100  $\mu\text{M}$  nakon 8 i 12 sati. Fosfo-p38 signal nismo uspjeli detektirati nakon 24 sata.

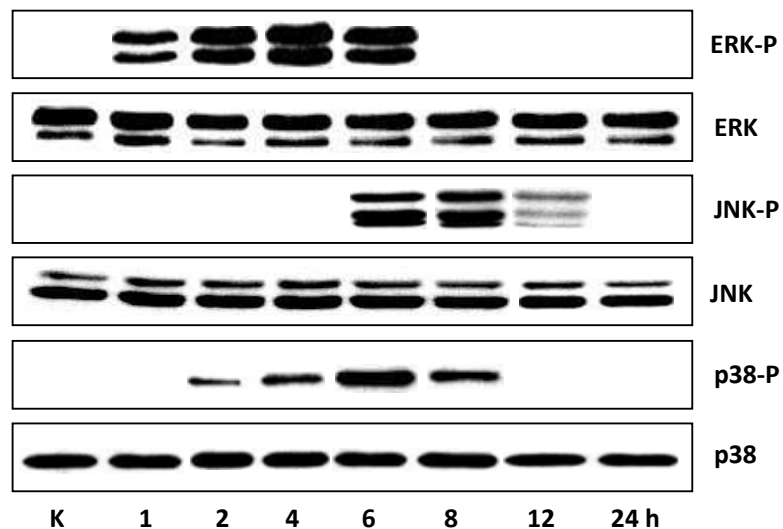
Kod koncentracije od **10  $\mu\text{M}$  OTA** neovisno o vremenu izloženosti stanica ovom mikotoksinu, razina ekspresije MAPK se nije značajno mijenjala (*Slika 8*). Kod primjene OTA u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ , ERK1/ERK2 kinaze su se aktivirale nakon 1, 2, 4 i 6 sati tretmana stanica, ali je aktivacija bila najintenzivnija nakon 4 sata izlaganja. Aktivacija JNK1/JNK2 kinaza javila se nakon 6, 8 i 12 sata tretmana s time da jačina signala slabi nakon 12 sata tretmana. p38 kinaza aktivirala se nakon 2, 4, 6 i 8 sati tretmana, a najsnažnije nakon 6 sati.

Kod koncentracije od **50  $\mu\text{M}$  CTN** neovisno o vremenu izloženosti stanica ovom mikotoksinu, razina ekspresije MAPK se nije značajno mijenjala (*Slika 9*). ERK1/ERK2 kinaze su se aktivirale nakon 1, 2, 4 i 6 sati izloženosti stanica ovom mikotoksinu, najsnažnije nakon 2 sata. Aktivacija JNK1/JNK2 kinaza javila se nakon 6, 8 i 12 sata tretmana, s najintenzivnijom fosforilacijom nakon 8 sati. p38 kinaza se aktivirala nakon 2, 4 i 6 sata izloženosti, a fosfo-p38 signal je bio najsnažniji nakon 4 sata.

Uz zajedničku primjenu **10  $\mu\text{M}$  OTA i 50  $\mu\text{M}$  CTN** neovisno o vremenu izloženosti stanica ovim mikotoksinima, razina ekspresije MAPK se nije značajno mijenjala (*Slika 10*). Aktivaciju ERK1/ERK2 kinaza detektirali smo nakon 1, 2, 4 i 6 sati izloženosti stanica, ali je intenzitet aktivacije bio jako slab. Aktivacija JNK1/JNK2 kinaze nije bila opažena samo nakon 4 sata izloženosti stanica, dok je intenzitet aktivacije bio najjači nakon 6 i 8 sati. p38 kinaza se fosforilirala nakon svih vremena izloženosti stanica (2, 4, 6, 8 i 12 sati), ali je intenzitet aktivacije bio najsnažniji nakon 6 i 8 sati.

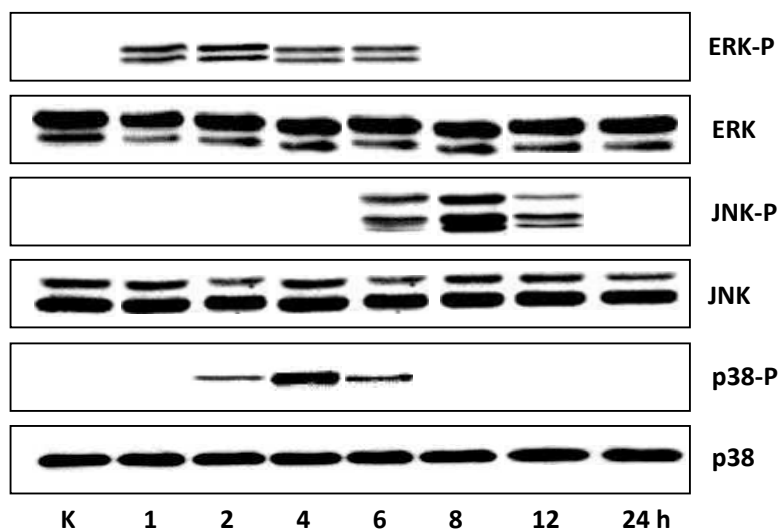


*Slika 7.* Djelovanje mikotoksina na razinu ekspresije MAPK i na aktivaciju ERK-P, JNK-P i p38-P u PK15 stanicama. Stanice su tretirane 6 sati mikotoksinima OTA (0,5, 1, 6 i 10  $\mu$ M), CTN (30, 50, 70 i 100  $\mu$ M) i kombinacijom OTA+CTN (6+30, 6+50, 10+30, 10+50  $\mu$ M).

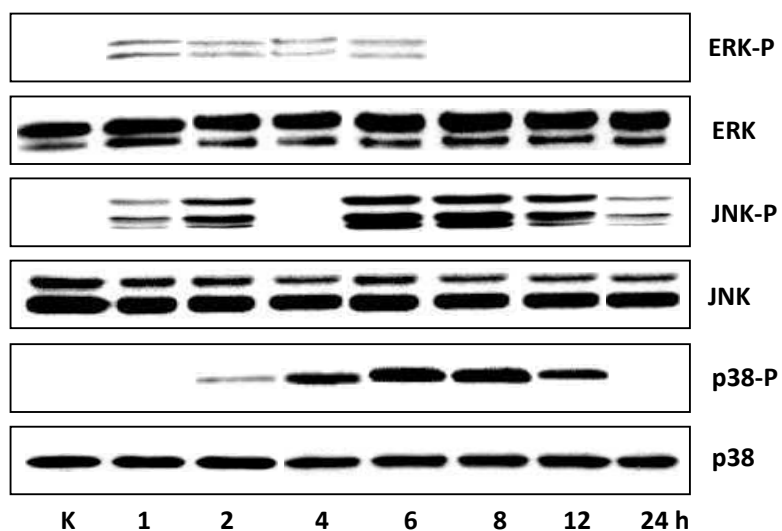


*Slika 8.* Djelovanje OTA na razinu ekspresije MAPK i na aktivaciju ERK-P, JNK-P i p38-P u PK15 stanicama. Stanice su tretirane s 10  $\mu$ M koncentracijom OTA u različitim vremenima (1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 sata).





*Slika 9.* Djelovanje CTN na razinu ekspresije MAPK i na aktivaciju ERK-P, JNK-P i p38-P u PK15 stanicama. Stanice su tretirane s 50  $\mu$ M koncentracijom CTN u različitim vremenima (1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 sata).



*Slika 10.* Djelovanje kombinacije OTA i CTN na razinu ekspresije MAPK i na aktivaciju ERK-P, JNK-P i p38-P u PK15 stanicama. Stanice su tretirane s 10  $\mu$ M koncentracijom OTA i 50  $\mu$ M koncentracijom CTN u različitim vremenima (1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 sata).

## 5. RASPRAVA

Iako je odavno poznato da su OTA i CTN nefrotoksični mikotoksini s karcinogenim potencijalom, a koji se često nalaze kao ko-kontaminanti hrane, mehanizam njihovog djelovanja još je uvijek nedovoljno istražen. Novija istraživanja pokazuju da mehanizam toksičnog djelovanja OTA i CTN uključuje aktivaciju signalnih putova proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati ekspresiju i aktivaciju MAPK (ERK, JNK i p38) u PK15 stanicama ovisno o koncentraciji i vremenu izlaganja OTA i CTN. Prije ispitivanja aktivacije MAPK ispitana je citotoksičnost OTA i CTN na PK15 stanicama te su određene  $IC_{50}$  za pojedinačne mikotoksine. Pri tom se pokazalo da je OTA ( $IC_{50}=14,0\pm 2,4 \mu\text{M}$ ) oko 5 puta toksičniji od CTN ( $IC_{50}=73,5\pm 1,0 \mu\text{M}$ ). OTA smanjuje staničnu vijabilnost u različitim staničnim kulturama. Nakon 24-satnog tretiranja V79 stanica (plućni fibroblasti kineskog hrčka) i CV-1 stanica (bubrežne stanice afričkog zelenog majmuna) s OTA vrijednost  $IC_{50}$  je bila oko  $2 \mu\text{M}$  (Kamp i sur., 2005), što znači da su ove stanične linije znatno osjetljivije na djelovanje OTA u odnosu na PK15 stanice. S druge strane, svinjske bubrežne LLC-PK1 su bile nešto otpornije na djelovanje OTA ( $IC_{50}=25 \mu\text{M}$ ) (Schaaf i sur., 2002) od PK15 stanica. Prilikom tretiranja Vero stanica (stanice bubrega zelenog majmuna) s CTN, dobivena  $IC_{50}$  iznosila je  $260 \mu\text{M}$  (Golli i sur., 2006), što znači da su PK15 stanice znatno osjetljivije od Vero stanica. S druge strane, inkubacija HL-60 stanica (stanica ljudske promijelocitne leukemije) s  $25 \mu\text{M}$  CTN nije dovela do većeg pada vijabilnosti, dok izlaganje  $50$  i  $75 \mu\text{M}$  CTN uzrokuje pad vijabilnosti na  $51$  i  $22 \%$  u odnosu na kontrolu (Yu i sur., 2006). Iz ovih istraživanja može se zaključiti da citotoksični potencijal OTA i CTN ovisi o vrsti stanične linije, pri čemu se OTA pokazao toksičniji od CTN na svim ispitivanim staničnim linijama uključujući i PK15 stanice. Kombinirani tretman PK15 stanica s OTA i CTN ima aditivno citotoksično djelovanje. Aditivno i/ili sinergističko djelovanje OTA i CTN već je ranije zabilježeno kako u staničnim kulturama tako i u pokusnih životinja (Speijers i Speijers, 2004).

Stanice su istovremeno izložene raznim izvanstaničnim i unutarstaničnim signalima pa moraju integrirati te poticaje i odabrati odgovarajući odgovor. Biološki kontekst signala veoma je bitan za određivanje konačnog učinka aktivacije MAPK. Iako ERK uglavnom regulira rast i diferencijaciju stanica, a JNK i p38 MAPK sudjeluju u odgovorima na stres i najčešće potiču smrt stanice, to ne vrijedi za sve stanične sustave. Aktivacija neke od MAPK kaskada može prouzrokovati suprotne stanične odgovore u istom tipu stanica u različitim uvjetima jer je specifičnost signala određena i drugim regulacijskim mehanizmima.

Nekoliko istraživanja *in vitro* i *in vivo* pokazalo je da OTA inducira staničnu smrt, apoptozu ili nekrozu, ovisno o koncentraciji OTA. U većini slučajeva veća koncentracija OTA uzrokuje nekrozu bubrežnih stanica što je pokazano korelacijom s aktivnošću laktat

dehidrogenaze u staničnom mediju (Sauvant i sur., 2005; Petrik i sur., 2005). Suprotno tome, niske koncentracije OTA stimuliraju apoptozu što je potvrđeno fragmentacijom i kondenzacijom kromatina, fragmentacijom DNA i/ili aktivnošću apoptoznog enzima kaspaze-3 (Sauvant i sur., 2005; Gekle i sur., 2000; Barišić i sur., 2005; Schwerdt i sur., 1999). Dokazano je da su MAPK ključne komponente staničnih putova preživljavanja/smrti. Znanstvenici su istražili učinke OTA na dva klon MDCK stanica bubrega, MDCK-C7 i MDCK-C11. Kod MDCK-C11 stanica nanomolarne koncentracije OTA uzrokovale su nekrozu, a kod MDCK-C7 apoptozu što potvrđuje različitu osjetljivost stanica na OTA. ERK1/2 i JNK1/2 su bile aktivne u MDCK-C7 stanicama, ali u MDCK-C11 stanicama nisu. Ova istraživanja su ukazala da signalni put JNK kinaze može igrati ulogu u apoptozi MDCK-C7 stanica koju inducira OTA (Gekle i sur., 2000; Schwerdt i sur., 1997). Neka druga istraživanja su također potvrdila fosforilaciju MAPK koju potiče OTA (Sauvant i sur., 2005; Marin-Kuan i sur., 2007; Horvath i sur., 2002; Barišić i sur., 2005). Predloženo je da dinamička ravnoteža između ERK signalnog puta i JNK/p38 MAPK signalnih putova utječe na konačan odgovor i sudbinu stanice nakon stimulacije nekim poticajem (Xia i sur., 1995). Sukladno rezultatima istraživanja drugih znanstvenika, naše istraživanje pokazalo je da OTA utječe na aktivaciju MAPK ovisno o koncentraciji i vremenu tretiranja. JNK1/2 nije se aktivirala do šestog sata tretmana, kada stanica aktivira sve kinaze i balansira između preživljavanja i smrti.

CTN, kao i neki drugi mikotoksini, u različitim tipovima stanica u niskim koncentracijama potiče fosforilaciju ERK1/2. Ipak, nedavna istraživanja su pokazala da izloženost serumom stimuliranih stanica embrija miša CTN tijekom 24 sata vodi ka degradaciji Ras i Raf-1 proteina, koji su aktivatori ERK kinaza, a samim time do inhibicije ERK1/2 fosforilacije (Chan i sur., 2007). U ovom smo radu detektirali aktivaciju ERK1/2 kinaza u PK15 stanicama, ovisno o koncentracijama CTN, tijekom 1, 2, 4 i 6 sati nakon čega ERK više nije bila fosforilirana. Mehanizam kako CTN aktivira MAPK je nejasan. Kada uđe u stanicu, CTN najvjerojatnije potiče stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Chan i sur., 2007; Ribeiro i sur., 1997) te je moguće da oksidacijski stres inducira aktivaciju MAPK (Kameta i sur., 2005; Wu i sur., 2006). Također, dokazano je da CTN uzrokuje ranu i dugotrajnu (kasnu) fosforilaciju JNK kinaza u osteoblastima čovjeka (Huang i sur., 2008). Ranu fazu aktivacije JNK potiče stvaranje ROS kod primjene CTN, a to je bitno za aktivaciju kaspaze-3 i -9 koje stimuliraju aktivaciju proteinske kinaze 2 koju aktivira p21 (PAK2, engl. *p21-activated protein kinase 2*) te tako utječu na kasnu aktivaciju JNK. Kasna faza aktivacije JNK vodi ka apoptozi ljudskih stanica osteoblasta. Naša istraživanja su također ukazala na ranu (1 i 2 sata) i kasnu fazu aktivacije JNK (6 do 24 sata). Pretpostavljamo da kasna faza aktivacije JNK u našem istraživanju ukazuje na apoptozu, no daljnja istraživanja su potrebna kako bismo mogli s većom sigurnošću interpretirati ove rezultate.

Pokazalo se da se povećanjem koncentracije CTN smanjuje aktivacija p38, a povećava aktivacija JNK u ESC-B5 stanicama (Chan i sur., 2007). Suprotno tome, naši su rezultati ukazali na pojačan i fosfo-JNK i fosfo-p38 signal s porastom koncentracije CTN. Stoga je moguće da aktivacija obje stresne kinaze (JNK i p38) potiče apoptozu PK15 stanica.

MAPK mogu sudjelovati u proliferaciji, diferencijaciji i apoptoznom umiranju stanica. Stoga daljnja ispitivanja treba usmjeriti ka povezivanju opažene fosforilacije ERK, JNK i p38, koju potiču OTA i CTN u PK15 bubrežnim stanicama, i biološkog odgovora ovih stanica na aktivaciju MAPK, a to će se postići upotrebom specifičnih inhibitora na svaku pojedinačnu MAPK.

## 6. ZAKLJUČAK

- OTA i CTN smanjuju vijabilnost PK15 stanica ovisno o koncentraciji. Prema vrijednostima  $IC_{50}$  OTA ( $IC_{50}=14,0\pm 2,4 \mu M$ ) je oko 5 puta toksičniji od CTN ( $IC_{50}=73,5\pm 1,0 \mu M$ ) za PK15 stanice.
- Kombinacije koncentracija OTA (6 i 10  $\mu M$ ) i CTN (30 i 50  $\mu M$ ) imaju aditivan citotoksični učinak na PK15 stanice.
- Aktivacija ERK zabilježena je nakon 1, 2, 4 i 6 sati izloženosti pojedinačnim OTA i CTN i njihovim kombinacijama pri čemu je intenzitet aktivacije ovisio o koncentraciji mikotoksina. Nakon dulje izloženosti ovim mikotoksinima aktivaciju ERK više nije bilo moguće detektirati te se može pretpostaviti da stanice idu u apoptozu.
- CTN i sve kombinacije OTA i CTN aktiviraju JNK nakon kratkotrajnog izlaganja (1 i 2 sata) te ponovno nakon duljeg izlaganja (6, 8 i 12 sati). Nakon 24 sata fosforilacija JNK javlja se samo kod stanica izloženih CTN (70 i 100  $\mu M$ ) te u kombinaciji OTA+CTN (10+30 i 10+50  $\mu M$ ). Više mikromolarne koncentracije OTA (1, 6 i 10  $\mu M$ ) aktiviraju JNK nakon 6, 8 i 12 sati.
- Fosforilacija p38 MAPK zabilježena je nakon 2, 4, 6 i 8 sati izlaganja stanica pojedinačnim mikotoksinima i njihovim kombinacijama. Nakon 12 sati aktivacija se javlja samo kod CTN (70 i 100  $\mu M$ ) i u kombinaciji OTA+CTN (6+50, 10+30 i 10+50  $\mu M$ ), a nakon 24 sata aktivnost p38 MAPK više nije bilo moguće detektirati.
- Mehanizam citotoksičnosti OTA i CTN uključuje aktivaciju MAPK (ERK, JNK i p38) pri čemu kombinacije OTA i CTN, u odnosu na pojedinačne mikotoksine, uglavnom još više pojačavaju aktivaciju stresnih kinaza JNK i p38, a potiskuju aktivaciju ERK kinaze te je stoga moguće da OTA i CTN u kombinaciji još snažnije potiču apoptozno umiranje PK15 stanica.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujem se mentoricama doc. dr. sc. Maji Šegvić Klarić i prof. dr. sc. Ladi Rumora na uloženom trudu i vremenu te nesebičnoj pomoći koju su mi pružile. Bile ste mi velika inspiracija, a stečena znanja i vještine sigurno ću dobro iskoristiti.

## 8. LITERATURA

1. Aleo MD, Wyatt RD, Schnellmann RG. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 109:455-63.
2. Ambrose AM, DeEds F. Acute and subacute toxicity of pure citrinin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1945; 59:289-91.
3. Ambrose AM, DeEds F. Some toxicological and pharmacological properties of citrinin. *J Pharmacol Exp Ther* 1946; 173:86.
4. Barišić K, Rumora L, Petrik J, Čepelak I, Žanić-Grubišić T. Ochratoxin A induces apoptosis in LLC-PK1 cells via JNK and p38 MAPK activation. *Croat Chem Acta* 2005; 78:385-92.
5. Braunberg RC, Gantt O, Barton C, Friedman L. *In vitro* effects of the nephrotoxin ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992; 22:464-70.
6. Chagas GM, Wambier Klüpper ML, Campello AP, Buchi DF, Oliveira MBM. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. *Cell Struct Funct* 1994; 19:103-8.
7. Chagas GM, Oliveira MBM, Campello AP, Klüpper MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca<sup>2+</sup> transport. *Cell Biochem Funct* 1995; 13:53-9.
8. Chan WH. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem J* 2007; 404:317-326.
9. Chang CH, Yu FY, Wang LT, Lin YS, Liu BH. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 237:281-287.

10. Ciegler A, Vesonder RF, Jackson LK. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. Appl Environ Microbiol 1977; 33:1004-6.
11. Creppy EE, Roschenthaler R, Dirheimer G. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. Food Chem Toxicol 1984; 22:883-6.
12. Cuschieri J, Maier RV. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). Crit Care Med 2005; 12:417-419.
13. El Golli E, Hassen W, Bouslimi A, Bouaziz C, Ladjimi MM, Bacha H. Induction of Hsp70 in Vero cells in response to mycotoxins. Cytoprotection by sub-lethal heat shock and by vitamin E. Toxicol Lett 2006; 166:122-30.
14. Frank HK. Citrinin. Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft. 1992; 31:164-177.
15. Friis P, Hasselager E, Krogh P. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. Acta Path Microbiol Scand 1969; 77:559-60.
16. Galtier P. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology – Ochratoxin A. Vet Sci Commun 1978; 1:349-58.
17. Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G. Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. Mol Nutr Food Res 2005; 49:118-30.
18. Gupta M, Sasmal D, Bandyopadhyay S, Bagchi G, Chatterjee T, Dey S. Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. Toxicology 1983; 26:55-62.
19. Hood RD, Hayes AW, Schammell JG. Effects of prenatal administration of citrinin and viriditoxin to mice. Food Cosmet Toxicol 1976; 14:175-8.
20. Horvath A, Upham BL, Ganey V, Trosko JE. Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. Toxicol 2002; 40:273-82.



21. Huang YT, Lai CY, Lou SL, Yeh JM, Chan WH. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. *Environ Toxicol* 2008; 24:343-356.
22. International Agency for Research of Cancer (IARC). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol.40. Lyon: IARC; 1986. p. 67-82.
23. Iwahashi H, Kitagawa E, Suzuki J, Ueda Y, Ishizawa Y, Nobumasa H, Kuboki Y, Hosoda H, Iwahashi Y. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. *BCM Genomics* 2007; 8:95.
24. JECFA (2001). Ochratoxin A. U: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (ur.), Safety evaluation of food additives and contaminants. WHO/FAO Food additives Series 47. IPCS – International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva.
25. Johannessen LN, Nilsen AM, Lovik M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. *Toxicol Lett* 2007; 168:103-12.
26. Jurjević Ž, Solfrizzo M, Cvjetković B, Avantaggiato G, Visconti A Ochratoxin A and fumonisins (B1 and B2) in maize from Balkan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia. *Mycot Res* 1999; 15:67-80.
27. Jurjević Ž, Solfrizzo M, Cvjetković B, De Girolamo A, Visconti A. Occurrence of beauvericin in corn from Croatia. *Food Technol Biotechnol* 2002; 40:91-4.
28. Kamp HG, Gerhard E, Schlatter J, Würth K, Janzowski C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology* 2005; 206:413-425.
29. Krogh P, Hasselager E, Friis P. Studies on fungal nephrotoxicity. Isolation of 2 nephrotoxic compounds from *Penicillium viridicatum* West: Citrinin and oxalic acid. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1970; B78:401-13.

30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680- 685.
31. Lalithakunjamma CR, Nair MK. Citrinin toxicity in chick embryos: Light and Electron Microscopic Studies. *Indian J. of Vet. Path.* 1991; 15:1-4.
32. Liu J., Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: A double- edged sword. *Cell* 2005; 15:36-42.
33. Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezençon C, Pigué D, Delatour T, Mantle P, Cavin C, Schilter B. MAPK-ERK activation in kidney of male rats chronically fed ochratoxin A at a dose causing a significant incidence of renal carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:174-81.
34. Meisner H, Meisner P. Ochratoxin A, an inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 1981; 208:146-51.
35. Müller G, Kielstein P, Rosner H, Berndt A, Heller M, Kohler H. Studies of the influence of ochratoxin A on immune defence reactions in weaners. *Mycoses* 1999; 42:495-505.
36. Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990; 40:1183-91.
37. Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Zagreb: Školska Knjiga 1995; str. 105-108.
38. Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić Klarić M. Ochratoxin A and zearalenone: cereals and feed contamination in Croatia (1977-2007) and influence on animal and human health. *Krmiva* 2008; 3:147-59.
39. Petrik J, Malić A, Barišić K, Rumora L, Kőszegi T, Pepeljnjak S, Žanić-Grubišić T, Čepelak I. Ochratoxin A induces apoptotic and necrotic renal cell death. *Croat Chem Acta* 2005; 78:447-53.
40. Peraica M, Domijan AM, Miletić-Medved M, Fuchs R. The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy. *Wien Klin Wochenschr* 2008; 120:13-14.

41. Peraica M, Domijan AM, Matašin M, Lucić A, Radić B, Delaš F, Horvat M, Bosanac I; Balija M, Grgičević D. Variations of ochratoxin A concentration in the blood of healthy populations in some Croatian CTNies. *Arch Toxicol* 2001; 75:410-14.
42. Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Adit Contam* 2002; 19:282-302.
43. Pfohl-Leszkowicz A, Tozlovanu M, Manderville R, Peraica M, Castegnaro M, Stefanovic V. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51:1131-1146.
44. Pitout MJ. The hydrolisis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem Pharmacol* 1969; 18:485-91.
45. Rahimtula AD, Chong X. 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, 1991; 207-14.
46. Rahimtula AD, Bereziat JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem Pharmacol* 1988; 37:4469-4477.
47. Reddy RV, Mayura K, Hayes AW, Berndt W. Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats. *Toxicology* 1982; 25:150-60.
48. Ribeiro SMR, Chagas GM, Campello AP, Klüppel LW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem Funcht* 1997; 15:203-9.
49. Rumora L. Uloga protein kinaza aktiviranih stresom u programiranoj smrti stanica. *Dizertacija, Zagreb* 2002; 9-50.

50. Sakai F. An experimental study on the toxic effect, especially on the kidney of "yellowed rice" polluted by *Penicillium citrinum* Thom, as well as of citrinin, a pigment isolated from the mould. *Folia Pharmacol Jpn* 1955; 51:431-42.
51. Sauvant C, Holzinger H, Gekle M. The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15:125-34.
52. Schaaf GJ, Nijmeijer SM, Maas RF, Roestenberg P, de Groene EM, Fink-Gremmels J. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588:149-58.
53. Schwerdt G, Wilflingseder D, Pollack V, Freudinger R, Mildenerger S, Gekle M. Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby Canine Kidney-C7 cell dedifferentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283:1460-8.
54. Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S, Gekle M. The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol Toxicol* 1999; 15:405-15.
55. Schwerdt G, Freudinger R, Schuster C, Silbernagl S, Gekle M. Inhibition of mitochondria and extracellular acidification enhance ochratoxin A-induced apoptosis in renal collecting duct-derived MDCK-C7 cells. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14:47-56.
56. Speijers GJA, Speijers MHM. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters* 153 2004; 91-98.
57. Storen O, Holm H, Stormer FC. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44:785-9.
58. Stoev, SD, Daskalov H, Radić B, Domijan AM, Peraica M. Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Vet Res* 2002; 33:83-93.

59. Stormer FC, Hansen CE, Pedersen JI, Hvistendhal G, Aasen AJ. Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxochartoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42:1051-6.
60. Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Domijan M, Petrik J. Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin FB<sub>1</sub>, beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007b; 100:157-164.
61. Šegvić Klarić M, Rumora L, Ljubanović D, Pepeljnjak S. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B<sub>1</sub>, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Arch Toxicol* 2008; 28:247-255.
62. Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Rozgaj R. Genotoxicity of fumonisin B<sub>1</sub>, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Croat Chem Acta* 2008a; 81:139-46.
63. Yang J, Yingnian Y, Duerksen- Hughes PJ. Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. *Mutat Res* 2003; 543:31-58.
64. Yu FY, Liao YC, Chang CH, Liu BH. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicology Letters* 2006; 161:143-51.
65. Widmann C, Gibson S, Matthew BJ, Johnson GL. Mitogen- activated protein kinase: conservation of a three- kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79:143-180.
66. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993; 49:506-22.
67. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270:1326-31.
68. Xu B, Jia X, Gu L, Sung C. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control* 2006; 17:271-285.

## 9. SAŽETAK

Iva Pirin

### Djelovanje okratoksina A i citrinina na aktivaciju MAP kinaza u bubrežnim stanicama

Okratoksin A (OTA) i citrinin (CTN) su nefrotoksični mikotoksini s potencijalnim karcinogenim djelovanjem koji često istovremeno kontaminiraju hranu. Mehanizam djelovanja ovih mikotoksina, kao i njihove interakcije u različitim signalnim putevima u stanici, nisu dovoljno istraženi. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti ulogu proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK) u mehanizmu toksičnog djelovanja OTA i CTN na stanicama bubrežnog epitela svinje (PK15) kao eksperimentalnom modelu. Primjenom MTT testa određene su koncentracije OTA i CTN koje za 50% smanjuju vijabilnost PK15 stanica ( $IC_{50}$ ) kako bi se izabrale sub- i supracitotoksične koncentracije koje će biti primjenjive za određivanje aktivnosti MAPK (ERK, JNK i p38). OTA i CTN smanjuju vijabilnost PK15 stanica ovisno o koncentraciji. Pri tome se pokazalo da je OTA ( $IC_{50}=14,0\pm 2,4 \mu M$ ) oko 5 puta toksičniji od CTN ( $IC_{50}=73,5\pm 1,0 \mu M$ ) za PK15 stanice. Kombinacije koncentracija OTA (6 i 10  $\mu M$ ) i CTN (30 i 50  $\mu M$ ) imaju aditivan citotoksični učinak na PK15 stanice. OTA i CTN nisu značajno utjecali na razinu ekspresije MAPK, ali su inducirali aktivaciju MAPK. Intenzitet i trajanje fosfo-MAPK signala ovisili su o koncentraciji OTA i CTN i o vremenu tretiranja ovim mikotoksinima. Aktivacija ERK zabilježena je nakon 1, 2, 4 i 6 sati izloženosti pojedinačnim OTA i CTN i njihovim kombinacijama pri čemu je intenzitet aktivacije ovisio o koncentraciji mikotoksina. Nakon dulje izloženosti ovim mikotoksinima aktivaciju ERK više nije bilo moguće detektirati te se može pretpostaviti da stanice ulaze u apoptozu. CTN i kombinacije OTA i CTN aktiviraju JNK nakon kratkotrajnog izlaganja (1 i 2 sata) te ponovno nakon duljeg izlaganja (6, 8, 12 sati). Nakon 24 sata fosforilacija JNK javlja se samo kod stanica izloženih CTN (70 i 100  $\mu M$ ) te u kombinaciji OTA+CTN (10+30 i 10+50  $\mu M$ ). OTA izaziva aktivaciju JNK samo nakon dužeg vremena izlaganja stanica ovom mikotoksinu (6, 8 i 12 sati). Fosforilacija p38 MAPK zabilježena je nakon 2, 4, 6 i 8 sati izlaganja stanica pojedinačnim mikotoksinima i njihovim kombinacijama. Nakon 12 sati aktivacija se javlja kod CTN (70 i 100  $\mu M$ ) i u kombinaciji OTA+CTN (6+50, 10+30 i 10+50  $\mu M$ ), a nakon 24 sata aktivnost p38 MAPK više nije bilo moguće detektirati. Opažena aktivacija stresnih kinaza JNK i p38 nakon dužeg vremena izlaganja pojedinačnim mikotoksinima i njihovim kombinacijama najvjerojatnije ukazuje na apoptozno umiranje stanica. Mehanizam citotoksičnosti OTA i CTN uključuje aktivaciju MAPK (ERK, JNK i p38) pri čemu kombinacije OTA i CTN imaju uglavnom jače izraženo djelovanje od pojedinačnih toksina, posebice na JNK i p38.

**Ključne riječi:** okratoksin A; citrinin; MAPK; nefrotoksičnost; apoptoza

## 10. SUMMARY

Iva Pirin

### Ochratoxin A and citrinin-mediated activation of MAP kinases in renal cells

Ochratoxin A (OTA) and citrinin (CTN) are nephrotoxic mycotoxins with potential carcinogenic action that frequently co-contaminate food. The mechanism of toxicity of this mycotoxins as well as their interplay with different signalling pathways within a cell are not fully understood. Therefore, the aim of this study was to explore the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in the mechanism of OTA and CTN toxicity on porcine kidney epithelial cells (PK15) as an experimental model. By using the MTT assay, concentrations of OTA and CTN which are decreasing viability of PK15 cells by 50 % ( $IC_{50}$ ) have been determined, in order to select both sub- and supracytotoxic concentrations for detection of expression and activation of MAPKs (ERK, JNK and p38). OTA and CTN provoked decrease of PK15 cells' viability was concentration-dependent. Our results imply that OTA ( $IC_{50}=14.0\pm 2.4 \mu\text{M}$ ) is 5 times more cytotoxic than CTN ( $IC_{50}=73.5\pm 1.0 \mu\text{M}$ ). Combined treatment with OTA (6 and 10  $\mu\text{M}$ ) and CTN (30 and 50  $\mu\text{M}$ ) causes additive cytotoxic effect on PK15 cells. OTA and CTN do not affect MAPKs' expression significantly; however, they induce activation of MAPKs. Intensity and duration of phospho-MAPKs signal depends on both concentration of OTA and CTN, and time of exposure. Activation of the ERK pathway was concentration-dependent, and was detected after 1, 2, 4 and 6 hours of treatment with OTA and CTN alone or their combinations (6+30, 6+50, 10+30, and 10+50  $\mu\text{M}$ ). After longer treatment period we could not detect ERK activation; therefore, we assume that cells are initiating their apoptotic program. After CTN and OTA+CTN treatment both early (1 and 2 hours) and late (6, 8 and 12 hours) JNK phosphorylation was detected. After 24 hours JNK activation was up-regulated only in cells treated with CTN (70 and 100  $\mu\text{M}$ ) and some OTA+CTN combinations (10+30 and 10+50  $\mu\text{M}$ ). On the other hand, OTA induces activation of JNK only after longer time of exposure (6, 8 and 12 hours). Phosphorylation of p38 MAPK was detected at 2, 4, 6 and 8 hours of treatment with individual mycotoxins and their combinations. CTN (70 and 100  $\mu\text{M}$ ) and OTA+CTN combinations (6+50, 10+30 and 10+50  $\mu\text{M}$ ) induce p38 activation after 12 hours, but we could not detect phospho-p38 signal after 24 hours. Prolonged activation of stress kinases JNK and p38 after exposure to individual mycotoxins and their combinations most likely indicate that cells are dying by apoptosis. Our investigation demonstrates that activation of MAPKs (ERK, JNK and p38) is implicated in the mechanism of OTA and CTN cytotoxicity, and that combinations of OTA and CTN have

generally stronger effect on those signalling molecules, especially on JNK and p38, than individual mycotoxins.

**Key words:** ochratoxin A; citrinin; MAPKs; nephrotoxicity; apoptosis



