

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

**Naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 immuunlokalisatsioon
kanade neerukoos normijuhtumite ja T-2-mükotoksikoosi korral**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Sofia Kõrs

Juhendajad: PhD Piret Hussar

MSc Martin Kärner

PhD Florina Popovska-Percinic

TARTU 2026

INFOLEHT

Naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 immuunlokalisatsioon kanade neerukoos normijuhtumite ja T-2-mükotoksikoosi korral

Glükoosi imendumist organismis reguleerivad naatriumi-glükoosi kaastransportijad (SGLT) ja hõlbustatud difusiooniga glükoosi transportijad (GLUT). Uuringus immuunlokaliseeriti naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 (SGLT1) tervete ja T-2-mükotoksiiniga kokkupuutunud kanade neerukoos, kasutades küüliku polüklooroonseid primaarseid antikehi SGLT1 vastu. Leiti, et SGLT1 lokaliseerus proksimaalsete vääntuubulite epiteelirakkude apikaalsetes membraanides ning SGLT1 ekspressioon oli nõrgem T-2-toksiiniga kokku puutunud kanadel, millega kaasnesid ka morfoloogilised kahjustused neerukoos. See viitab neerufunktsiooni langusele ja vähenenud glükoosi transpordivõimele mükotoksikoosi tõttu.

Märksõnad: GLUT, SGLT1, T-2-mükotoksikoos, neerud

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Sodium/glucose cotransporter-1 immunolocalization in chicken kidney tissue in norm and in T-2 mycotoxicosis

Glucose absorption in the body is regulated by sodium/glucose cotransporters (SGLT) and facilitated glucose transporters (GLUT). In this study, rabbit polyclonal primary antibodies against sodium/glucose cotransporter-1 (SGLT1) were used to immunolocalize SGLT1 in the kidney tissue of healthy chickens and those exposed to T-2 mycotoxin. The results showed that SGLT1 was primarily located in the apical membranes of proximal convoluted tubule epithelial cells, but its expression was weaker in chickens exposed to T-2 toxin. Additionally, morphological damage in kidney tissue was observed, indicating impaired kidney function and reduced glucose transport capacity due to mycotoxicosis.

Keywords: GLUT, SGLT1, T-2 mycotoxicosis, kidneys

CERCS: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Neerude ehitus	7
1.1.1. Kana neerude histoloogiline ehitus.....	10
1.2. Glükoosi transportijate üldine jaotus	11
1.2.1. Naatriumi-glükoosi kaastranportija-1 (SGLT1)	11
1.3. Glükoosi transport neerudes	13
1.4. Mükotoksiinide jaotus	15
1.4.1. T-2-mükotoksiin	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1. Töö eesmärgid	18
2.2. Materjal ja meetodika	18
2.2.1. Materjal.....	18
2.2.1.1. Eetikakomitee kinnitus	18
2.2.2. Meetodika	19
2.2.2.1. Materjali ettevalmistus värvimiseks	19
2.2.2.1.1. Fikseerimine	19
2.2.2.1.2. Materjali pesemine ja dehüdratatsioon	19
2.2.2.1.3. Sisestamine ja lõikamine mikrotoomiga.....	19
2.2.2.1.4. Koelõikude deparafineerimine	19
2.2.2.2. Värvimine	20
2.2.2.2.1. Värvimine hematoksüliin-eosiin meetodil.....	20
2.2.2.2.2. Immuunhistokeemia	20
2.2.3. Statistiline analüüs	22

2.3.	Tulemused	22
2.3.1.	Hematoksüliin-eosiin meetod	22
2.3.2.	Immuunhistokeemia	23
2.3.3.	Statistiline analüüs	26
2.4.	Arutelu	28
KOKKUVÕTE		30
Summary.....		31
KIRJANDUSE LOETELU.....		32

KASUTATUD LÜHENDID

GBM – Glomerulaarne basaalmembraan

GLUT – Glükoosi transportijad

SGLT – Naatriumist-sõltuvad glükoosi transportijad

SGLT1 (SLC5A1) – Naatriumi-glükoosi kaastransportija-1

SLC5 (Solute Carrier Family 5) – lahustite transportijate perekond-5

SGLT2 (SLC5A2) – Naatriumi-glükoosi kaastransportija-2

TCT – Trikoteetseente toksiinid

SISSEJUHATUS

Glükoos on peamine energiallikas nii rakulisel kui ka organismi tasandil. Kõik süsivesikud, lipiidid ja valgud lagundatakse lõppkokkuvõttes glükoosiks, mis toimib imetajate metabolismis esmase universaalse energiaallikana. Glükoos on vajalik rakkude normaalseks talitluseks ja veresuhkru taseme ning varuenergia säilitamiseks. Samuti on glükoos peamine lähteühend mitmete oluliste biomolekulide sünteesiks nagu glükogeen, riboos ja desoksüriboos, galaktoos, glükolipiidid, glükoproteiinid ja proteoglükaanid (Nakrani, Wineland, & Anjum, 2020).

Neerudel on keskne roll glükoosi homöostaasi säilitamises glükoneogeneesi, glükoosi filtreerimise, tagasiimendumise ja tarbimise kaudu (Mather & Pollock, 2011). Rakud omastavad ja vabastavad glükoosi spetsiifiliste transportijate kaudu nagu naatriumi-glükoosi kaastransportijad (SGLT) ja hõlbustatud difusiooniga glükoosi transportijate (GLUT) abil. SGLT glükoosi kotransporti vahendab basolateraalse naatrium-kaalium-ATPaasi aktiivne naatriumi väljapumpamine, mis võimaldab glükoosi omastamist rakusisesel kontsentratsioonigradiendi vastu (Zierler, 1999). Naatriumi-glükoosi kaastransportija-2 (SGLT2) vastutab ligikaudu 90% ulatuses filtreeritud glükoosi tagasiimendumise eest ning naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 (SGLT1) reabsorbeerib kuni 10% filtreeritud glükoosist (Mather & Pollock, 2011).

T-2-mükotoksiin on *Fusarium sporotrichioides* seente toodetud trikoteetseene toksiin, mis esineb laialdaselt saastunud põllukultuurides nagu mais, nisu ja oder. See võib sattuda inimeste toiduahelasse otseselt saastunud taimede kaudu või kaudselt saastunud sööta tarbinud loomade ja lindude kaudu (Janik, et al., 2021).

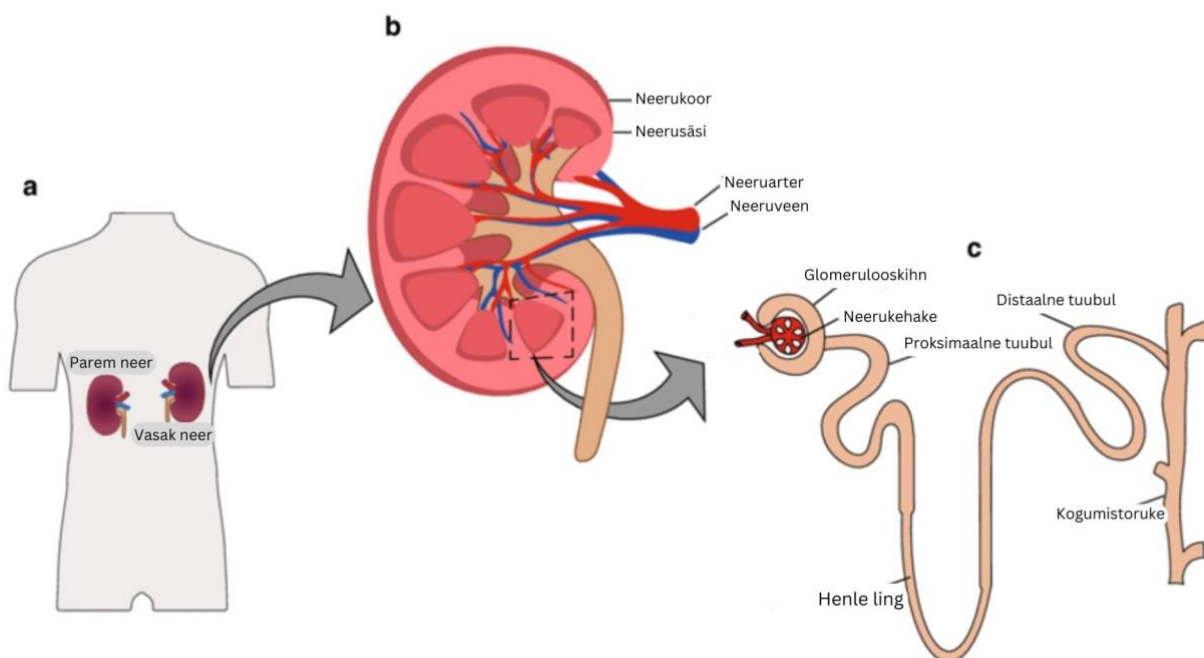
Kui naatriumi-glükoosi kaastransportijaid on imetajate neerudes üksikasjalikult kirjeldatud, on lindude neerudes SGLT-de paiknemise kohta puudulikku infot. Seda saab seletada asjaoluga, et erinevalt imetajatest on lindude neerudel mitmeid ainulaadseid morfoloogilisi ja funktsionaalseid erinevusi (Hussar et al., 2022). See teema on oluline, kuna täidab olulise lünga kanade neerude naatriumi-glükoosi kaastransportija SGLT1 paiknemise ja T-2-mükotoksiini mõju mõistmises, mis aitab paremini hinnata mükotoksiinide toksilist mõju lindude tervisele ja toetada tõhusamaid ennetusmeetmeid põllumajanduses.

Töö eesmärgiks oli naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 (SGLT1) immuunlokalisatsioon tervete ja T-2-mükotoksikoosi nakatunud kanade neerukoos, kasutades küüliku polükloonseid primaarseid antikehi SGLT1 vastu. Töö viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis ja Eesti Maaülikoolis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Neerude ehitus

Inimestel ja enamikel selgroogsetel on kaks neeru, mis asuvad retroperitoneaalselt kõhuõõne tagaseinas (Hussar et al., 2005). Inimese neerud on ubakujulised rusika suurused elundid (Joonis 1). Neer jaguneb kaheks osaks: neerukoor (*cortex*) ehk neeru välimine osa ja säsi (*medulla*) ehk sisemine osa. Neerudel on arteriaalne ja venoosne verevarustus ning mitmeid olulisi homöostaatilisi funktsioone. Nende hulka kuuluvad jääkainete eemaldamine, vedeliku ja elektrolüütide tasakaalu säilitamine, ainevahetusliku vere happe-aluse tasakaalu hoidmine ning hormoonide tootmine ja modifitseerimine, mis reguleerivad vererõhku, kaltsiumi/kaaliumi homöostaasi ja punaste vereliblede tootmist (Moinuddin & Dhanda, 2016).



Joonis 1. Inimese neeru anatoomia. Välimine vaade (a), sisemine vaade (b) ja nefron (c). Joonis on tehtud bakalaureusetöö autori poolt kasutades Canva graafilise disaini tarkvara ja põhineb Faria et al. originaaljoonisel (Faria, Ahmed, Gerritsen, Mihaila, & Masereeuw, 2019).

Neeru parenhüüm koosneb nefronitest ja kogumistorukestest. Nefron on neeru morfofunktsionaalne ühik, kus toimub vere ultrafiltratsioon (esmasuriini valmistamine neerukehakeses) ja glomeruloosvedeliku reabsorptsioon (lõpliku uriini moodustumine nefroni torukestes) (Hussar et al., 2005). Nefron koosneb glomerulooskihnust (*capsula glomeruli Bowmani*), pea- (*portio principalis*), ülejuhte- (*portio conducens*) ja kesk- ehk vaheosast (*portio intermedia s. distalis s.pars nephroni distalis*) ning nefronid arenevad välja järelneerust

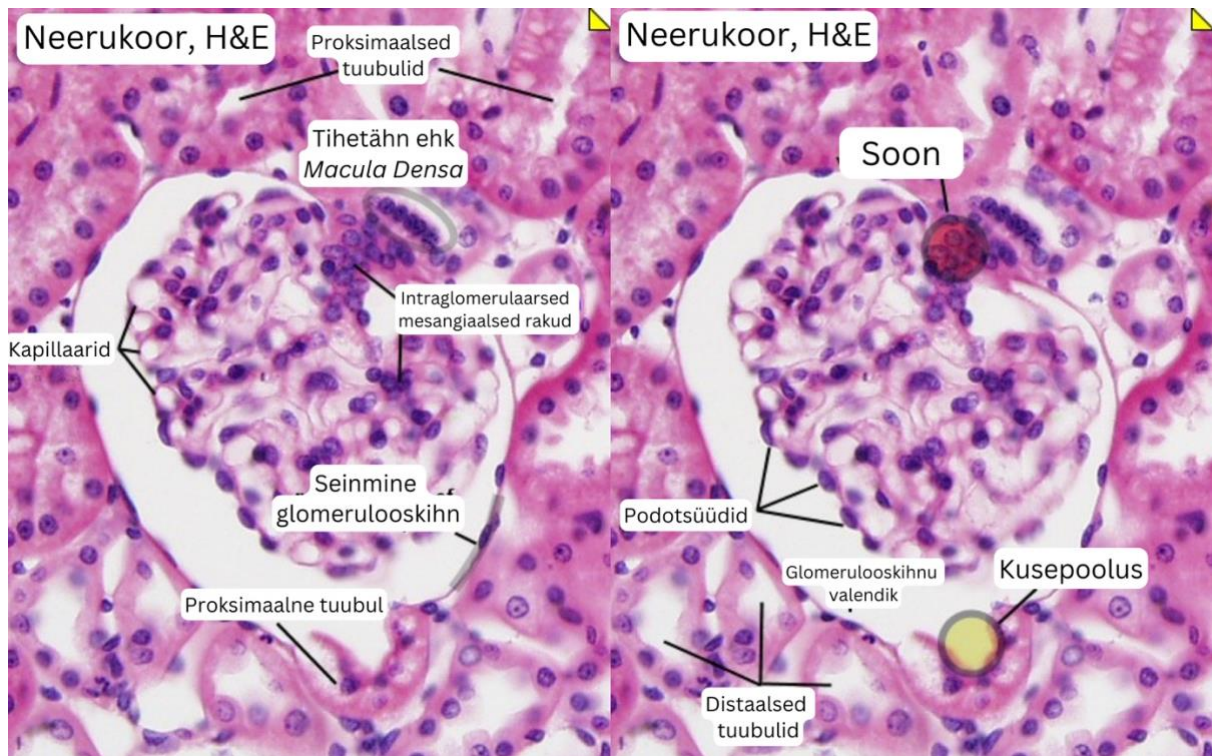
(*metanephros*). Nefroni juurde ei kuulu arenguliselt, küll aga funktsionaalset, neerukehakese päsmake ja vaheosi kogumistorukestega (*tubuli colligentes*) ühendav sideosa (*portio reuniens*). Nefronite juures kasutatakse Henle lingu (*ansa nephroni*) mõistet, mis ühendab nefroni säsis paiknevaid torukesi (Hussar et al., 2022). Henle lingul eristatakse järgmist segmentatsiooni:

1. Henle lingu alaneva sääre jäme osa on peaosa ehk proksimaalosa sirge osa (*pars recta/tubulus rectus proximalis*);
2. Henle lingu alaneva sääre peen/kitsas osa on ülejuhteosa (*portio conducens/tubulus (pars) attenuatus*);
3. Henle lingu ülenev sääre on vaheosa ehk distaalosa sirge osa (*pars recta/tubulus rectus distalis*).

Läbides Henle lingu erinevaid osi toimub uriini kontsentreerimine, happe-leelise tasakaalu säilitamine ja elektrolüütide tasakaalu reguleerimine (Soriano, Penfold, & Leslie, 2018).

Imetajatel nagu hiirtel ja inimestel on imetajatüüpi nefronid. Hiirtel moodustub enamik nefroneid pärast sündi, samas kui inimese neerudes lõpeb nefronite moodustumine (nefrogenees) umbes 36. rasedusnädalal. Hiire neerus on 12000-16000 nefronit, kuid inimestel on nefronite arv veelgi suurema varieeruvusega: uuringud näitavad, et indiviidide vahel võib nefronite arv erineda kuni kümme korda, keskmiselt umbes miljon nefronit ühe neeru kohta (McMahon, 2016).

Filtratsioon algab neeru- ehk Malphigi kehakeses, mis koosneb glomerulooskihnust ja neerukehakese päsmakesest (*glomerulus corpusculi renis*). Neerukehake (Joonis 2) on tihedalt pakitud kapillaaride võrgustik, mille seinad on läbilaskvad väikestele molekulidele nagu vesi, glükoos, soolad ja jääkained, kuid mitte suurtele molekulidele nagu vererakud ja suuremad valgud (Moinuddin & Dhanda, 2016). Veri filtreeritakse neerukehakesse, kus glomerulooskihnu välimise ja sisemise lestme vahel olevasse kapsliõõne koguneb esmane uriin, mis sisaldab vett, elektrolüüte, toit- ja jääkaineid. Seejärel liigub esmane uriin nefroni peaossa, kus toimub oluliste ainete, nagu vesi ja toitained, tagasiimendumine verre ning jääkainete ja liigse vee eritumine uriinina. Lõplik uriin kogutakse neeruvaagnasse ja suunatakse kusejuha kaudu põide (Soriano, Penfold, & Leslie, 2018).



Joonis 2. Neerukehake (*Corpusculum renalis Malpighi*) (Hill, 2025).

Neerukehakese päsmake ehk glomeerulus koosneb kapillaarlingudest. Intraglomerulaarsed mesangiaalsed rakud toetavad füüsiliselt glomeeruluse kapillaare, paiknedes basaalmembraani all olevates rakkudevahelistes ruumides (Hussar et al., 2005). Mesangiaalarakud moodustavad koos mesangiaalmaatriksiga päsmakeste vahelise mesangiumi. Mesangiaalsed rakud on suhteliselt väikesed, ebakorrapärase ja paljude tsütoplasmaatiliste jätketega. Need osalevad fagotsütoosis ja kindlustavad glomerulaarse verevoolu (Moinuddin & Dhanda, 2016).

Glomerulaarne basaalmembraan (GBM) on paks struktuur, mis koosneb rakuvälistest valkudest, sealhulgas proteoglükkaanidest, lamiinist, fibronetsiinist ja tüüp IV kollageenist. GBM on hematorenaalse filtratsioonibarjääri kolmas komponent, koos kapillaaride endoteelirakkude tsütoplasma ja podotsüütide tsütoplasmaga (Falkson & Bordonni, 2023).

Podotsüüdid ehk epitsüüdid (*epicyti*) on pikkade jätketega (tsütopoodidega) varustatud, kapillaariseinaga tihedalt liituvad erilaadsed epiteelirakud, mis moodustavad neerukehakese vistseraalse lestme (*pars interna*). Podotsüüdid hematorenaalse barjääri olulise komponendina toetavad samas ka glomerulaarseid kapillaare (Murray & Paolini, 2020).

Macula densa ehk tihetähn on distaalse vääntorukese paksenenud piirkond selle epiteelis. Seda iseloomustavad apikaalsed tuumad ja tihedalt pakitud silindrilised rakud. *Macula densa* talitleb sensorina, mis jälgib naatriumi- ja klooriioonide taset (Murray & Paolini, 2020).

Capsula glomeruli Bowmani ehk glomerulooskihnust saab alguse nefroni pea- ehk proksimaalosa (*portio proximalis s. pars nephroni proximalis*). Peaosa valendikku ümbritseb ühekihiline kuupepiteel, mis on spetsialiseerunud vee, elektrolüütide ja muude osakeste imendumisele ja transportimisele. Peaosa rakkude vabal pinnal esineb iseloomulik mikrohattudest koosnev harjasääris (*limbus striatus basalis s. striatura basalis*), mis suurendab glomerulaarse ultrafiltraadiga kokku puutuvat pinda (Falkson & Bordoni, 2023).

1.1.1. Kana neerude histoloogiline ehitus

Lindude neerud on lamedad elundid, millel on kolm osa: kraniaalne, mediaalne ja kaudaalne osa. Neerud koosnevad väiksematest sagaratest, millel igal on omakorda koor ja säsi. Lindude neerud sisaldavad kaht või kolme tüüpi nefroneid (Deepa, Sreeranjini, & Soumya, 2020).

Kanade neerud on pruunikat värvi ning kõik neerude osad on üsna suured võrreldes teiste lindudega (Dhyaa, Ali, Azhar, & Myson, 2014). Kanade neerudes nagu teistel linnuliikidel on kolme tüüpi nefroneid: suured imetajatüüpi nefronid ning väiksed roomajatüüpi nefronid säsiipiirkonnas ja keskmised imetajatüüpi nefronid säsiipiirkonna sügavamates osades. Eri tüüpi nefronite esinemine tuleneb kanade elukeskkonnast, sest on võimalus, et puudub pidev ligipääs veele, mistõttu on seda tarvis võimalikult hästi omastada (Deepa, Sreeranjini, & Soumya, 2020).

Roomajate tüüpi nefronid on võimelised postembrüonaalseks nefrogeneesiks mesonefroses, kus nad suruvad alla Six2 transkriptsioonifaktorit. Imetajatel on nefronite arv piiratud ainult embrüonaalse arenguga ning pärast sündi nefrogeneesi enam ei toimu. Imetajatel arenevad pronefros ja mesonefros mööda nefrilist juha, liikudes anterioorselt posterioorsema osa suunas. Pronefros ja mesonefros taanduvad, kusjuures mesonefroose rakud aitavad kaasa meessugunäärmete (munandite) arengule. Seetõttu on välja pakutud, et postembrüonaalne nefrogenees on omane mesonefrosole, kuid kaob amniootide metanefroosi arengus (Camarata et al., 2016).

Kana neeru sagar on kooreosas omakorda sagardunud ning koosneb sagarikest ja tsentraalsest veenist. Kanade neerukehasesed paiknevad ümber keskse veeni ning kooses esinevad ka proksimaalsed ja distaalsed vääntuubulid, Henle lingud, kogumistorukesed, kusejuha harud ja veresooned (Deepa, Sreeranjini, & Soumya, 2020). Proksimaalseid ja distaalseid väänilisi neerutorukesti vooderdab ühekihiline kuupepiteel. Neeru säsiosa koosneb Henle lingust ja kogumistorukestest, mis on kaetud ühekihilise kuupepiteeliga (Aryani et al., 2020).

1.2. Glükoosi transportijate üldine jaotus

Glükoosi transportijad (GLUT) on valgud, mida kodeerivad SLC2 geenid. Nad moodustavad suure membraanitransportijate perekonna, millest 14 on ekspresseeritud inimeses. GLUT valgud koosnevad ligi 500-st aminohappejäägist ning need jaotatakse kolme klassi (Ismail & Tanasova, 2022):

1. Klass I (GLUT1–4 ja GLUT14) – vahendavad glükoosi ja teiste heksooside, kuid mitte fruktoosi transporti;
2. Klass II (GLUT5, 7, 9 ja 11) – spetsialiseerunud fruktoosi transpordile;
3. Klass III (GLUT6, 8, 10 ja 12) – struktuurselt atüüpilised GLUT-id.

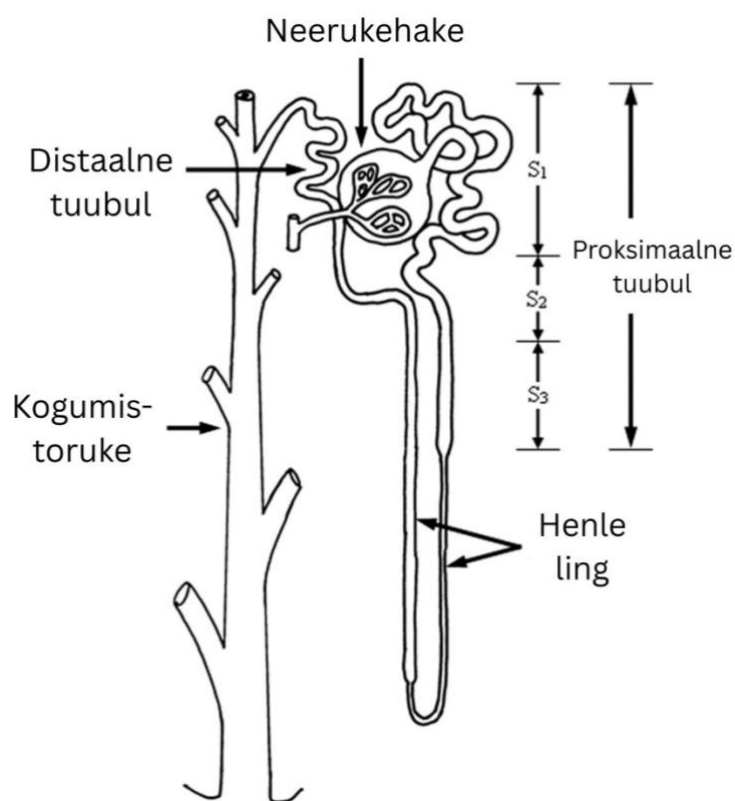
Neerudes on tuvastatud mitmeid GLUT-esindajaid, sealhulgas GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5, GLUT9 ja GLUT11, kusjuures GLUT1–5 on kõige põhjalikumalt uuritud (Wood & Trayhurn, 2003). GLUT-id on ekspresseeritud pea igas inimkeha rakutüübis, vahendades monosahhariidide, polüoolide ja teiste väikeste süsinikühendite transporti rakumembraanide kaudu, mis on oluline rakkude energia ja ainevahetuse säilitamiseks. GLUT-valkude funktsionaalne roll glükoosi ja fruktoosi transportimisel erinevates kudedes toob esile nende olulisuse ainevahetuse homöostaasi ja energia tasakaalu säilitamisel (Mueckler & Thorens, 2013).

1.2.1. Naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 (SGLT1)

Naatriumi-glükoosi kaastransportijad (SGLT) kuuluvad laiemasse lahustunud aine kandjate rühma nimega SLC5, mis hõlmab praegu kuut SGLT liiget. SGLT1 ja SGLT2 on selle rühma kõige paremini iseloomustatud kaastransportijad ja need eristuvad nende glükoosi transpordivõime, glükoosi ja naatriumi afiinsuse, suhkrute selektiivsuse ja neerusisese jaotuse põhjal (Vrhovac et al., 2015). SGLT1 on peamine soole glükoosi transportija ning seda leidub süljenäärmetes, maksas, kopsudes, skeletilihastes ning südames (Sano, Shinozaki, & Ohta, 2020). SGLT2 leidub peamiselt neerukudedes kuid ka niudesooles, ajus ja maksas (Vrhovac et al., 2015).

SGLT transpordib glükoosi ja galaktoosi erineva afiinsusega läbi sekundaarse aktiivse transportmehhanismi. Naatriumi elektrokeemilist gradienti, mida võimaldab naatrium-kaalium ATPaasi pump, kasutatakse glükoosi transportimiseks rakkudes selle kontsentratsiooni gradiendi vastu. See glükoosi transportimise vorm toimub rakkude luminaalsel membraanil, mis katab peensoole ja neerude proksimaalseid neerutorukesi (Wood & Trayhurn, 2003).

SGLT2 vastutab suurema osa glükoosi tagasiimendumise eest proksimaalsete torukeste alguse osas, samas kui SGLT1, millel on kõrgem afiinsus, kuid madalam transpordivõime, reabsorbeerib ülejäänud glükoosi proksimaalsete torukeste distaalsemas osas. Proksimaalne neerutoruke on jaotatud kolme segmenti: S1, S2 ja S3 (Joonis 3). Antikehade kasutamise ja immuunlokalisatsiooni abil on kinnitatud, et SGLT2 ja SGLT1 põhiline avaldumine esineb vastavalt proksimaalse tuubuli alguse ja lõpuosa harjapiirimembraanis nii rottide kui ka inimeste neerukoe proovides. Hiirtel oli SGLT1 valgu ekspressioon proksimaalse tuubuli S2 segmentides suurem kui S3 segmentide medullaarsetes kiirtes ja välimises võötmes. Inimese neerus leiti kõige tugevam SGLT1 ekspressioon S3 segmentis (Oe & Vallon, 2022). SGLT1 valgu ekspressioon inimestel on lokaliseeritud peensoole apikaalses harjasäärises ja proksimaalsete tuubulite distaalses osas (Sano, Shinozaki, & Ohta, 2020).



Joonis 3. Nefron (Fujiwara et al., 2009).

SGLT1 inhibeerimisel säilib SGLT1 vahendusel teatud kogus glükoosi reabsorptsioonist, ning uriiniga eritub vaid see glükoosihulk, mis ei imendu SGLT1 kaudu. SGLT1 *knockout* hiirtel ei esine märkimisväärset glükosuuriat, mis viitab sellele, et mitte-diabeetilistes tingimustes on SGLT2 üksi suuteline reabsorbeerima praktiliselt kogu filtreeritud glükoosi. Kuid kui SGLT1 *knockout* hiirtele manustati empagliflosiini, eritus praktiliselt kogu filtreeritud glükoos uriiniga. Tulemused viitavad sellele, et normaalsetel hiirtel kompenseeritakse SGLT2 inhibeerimise

käigus filtreeritud ja eritunud glükoosi vaheline kogus SGLT1 vahendusel (Barfull, Garriga, Mitjans, & Planas, 2002).

Kuna SGLT1 on olemas nii neerudes kui ka soolestikus, võib SGLT1 inhibeerimine olla seotud seedetrakti kõrvalmõjudega. Inimestel, kellel on mutatsioonid SGLT1 (SLC5A1) ja SGLT2 (SLC5A2) geenides, esinevad erinevad neeru fenotüübid. SGLT1 mutatsioonid põhjustavad soole glükoosi-galaktoosi malabsorptsiooni, SGLT1 kriitilise rolli tõttu aktiivses soole glükoosi reabsorptsioonis. Selle tagajärjel võib vastündinutel, kellel on SGLT1 mutatsioonid, galaktoosi või glükoosi toidust tingitud kokkupuude põhjustada eluohtlikku kõhulahtisust. Võrreldes sellega, pole SGLT2 mutatsiooniga inimestel esinenud muid komplikatsioone nagu neerufunktsiooni kahjustus või kuseteede infektsioonid ning nende soole glükoosi käitlemine on normaalne (Abdul-Ghani, Norton, & DeFronzo, 2015).

Farmaatsiaettevõtted on keskendunud ravimite arendamisele, mis inhibeerivad selektiivselt SGLT2, vältides liigset mõju SGLT1-le, et minimeerida seedetrakti kõrvaltoimeid. Siiski suureneb SGLT2 inhibeerimise korral neerudes SGLT1 roll glükoosi reabsorptsioonis, piirates glükoosi eritumist uriiniga ja vähendades ravi efektiivsust (Abdul-Ghani, Norton, & DeFronzo, 2015). See on taastanud huvi kombineeritud SGLT2/SGLT1 inhibiitorite vastu. Osaline SGLT1 inhibeerimine koos SGLT2 pärssimisega võimaldaks suuremat glükosuuriat ja tõhusamat veresuhkru langust, pakkudes paremat võimalust hüpoglükeemia raviks (Barfull, Garriga, Mitjans, & Planas, 2002).

1.3. Glükoosi transport neerudes

Neerud filtreerivad pidevalt suures koguses glükoosi ja täidavad olulist rolli glükoosi homöostaasis. See ei hõlma vaid glükoosi kasutamist, vaid ka glükoneogeneesi ning plasmas oleva glükoosi taseme reguleerimist, kontrollides glükoosi reabsorptsiooni neerutorukestes pärast glomerulaarfiltratsiooni. Neerukooses toimub glükoneogenees ning neerusäsis glükolüüs. Tervete inimeste neerud filtreerivad iga päev 160–180 g glükoosi, mis on umbes kolmandik päevasest energiavajadusest, mis läheks muidu uriiniga kaduma, mistõttu tervete inimeste uriin on peaaegu glükoosivaba (Mather & Pollock, 2011).

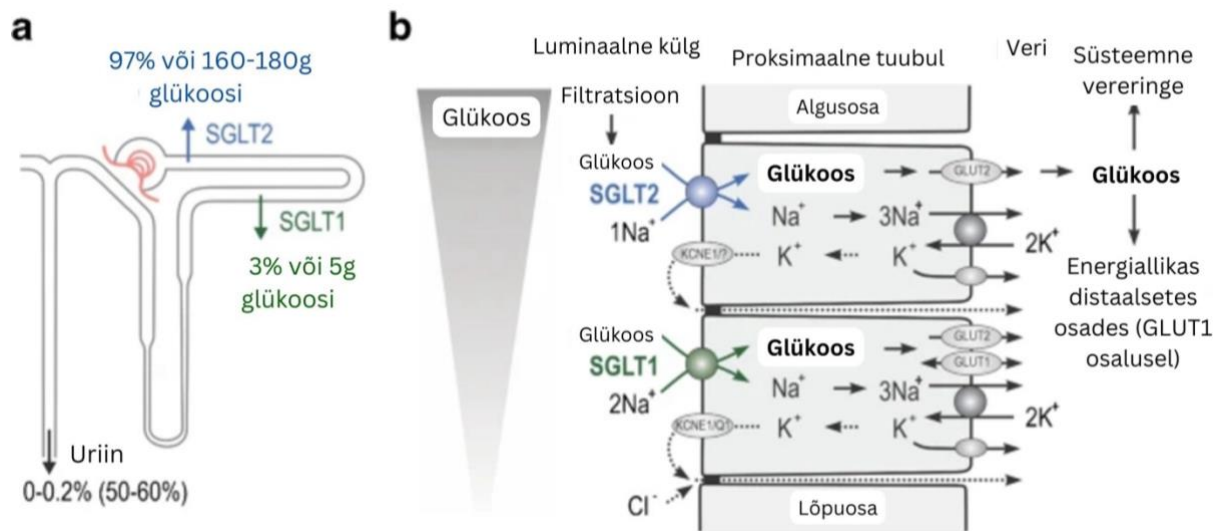
Glükoosi reabsorbeerimine ja säilitamine toimub neerude torujas süsteemis. Neerude proksimaalses torukeses on olemas vajalikud ensüümid glükoneogeneesiks: laktaat, glutamiin, glütserool jaalaniin. Lisaks on vajalikud apikaalsel membraanil asuvad naatriumi-glükoosi kaastransportijad SGLT2 ja SGLT1 ning basolateraalsel membraanil olev glükoosi transportija GLUT2 (Lizák et al., 2019). Proksimaalses tuubulis reabsorbeeritud või toodetud glükoos

imendub peamiselt peritubulaarsetes kapillaarides ja suunatakse tagasi süsteemsesse vereringesse või kasutatakse energiaallikana distaalsete tuubulite segmentides, mis võtavad glükoosi vastu basolateraalse GLUT1 kaudu. Glükoosi transporti kontrollivad mitmed hormoonid nagu insuliin ja glükagoon, mis reguleerivad raku glükoosi omastamist ning glükoosi säilitamist ja endogeenset glükoosi tootmist (Vallon, 2020).

Normoglükeemia korral reabsorbeerib SGLT2 proksimaalses tuubuli algusosas umbes 97% filtreeritud glükoosist. Ülejäänud umbes 3% glükoosist reabsorbeeritakse SGLT1 poolt proksimaalse tuubuli lõpuosas. Uriiniga väljutatakse 0-0,2% glükoosist. SGLT2 inhibeerimine vähendab glükoosi reabsorptsiooni, mille korral on SGLT1 glükoosi reabsorptsiooni võime sõltuvalt glükoosikoormusest umbes 40-50% filtreeritud glükoosist (Joonis 4) (Vallon, 2020).

Glükoosi transpordiks üle neeruepiteelirakkude apikaalse harja piiri nõuab naatriumi gradiendi olemasolu. Madala intratsellulaarse naatriumi kontsentratsiooni loob ja säilitab basolateraalselt paiknev naatrium-kaaliumi-adenosiintrifosfataasi pump, mis sunnib intratsellulaarset naatriumit rakust väljuma läbi basolateraalse membraani. Sel viisil loodud elektrokeemiline gradient annab liikumapaneva jõu naatriumi pidevaks transportimiseks rakku läbi apikaalse membraani, võimaldades glükoosi samaaegset transportimist spetsiifiliste naatriumist-sõltuvate glükoosi transportijatega, vaatamata suhteliselt madalale rakuvälisele kontsentratsioonile (Mather & Pollock, 2011).

Naatriumi-glükoosi kotransport muudab raku membraanipotentsiaali. Selle tasakaalustamiseks toimub kas klooriidioonide paratsellulaarne tagasiimendumine või kaaliumioonide liikumine läbi raku väljapoole. Kui glükoos on epiteelirakkudes kontsentreeritud tasemeni, mis ületab interstitsiaalset glükoosi taset, difundeerub see interstitsiumi läbi glükoosi transportijate, mis paiknevad basolateraalsel membraanil. Hõlbustav glükoosi transportija GLUT2 vahendab glükoosi transporti basolateraalse membraani kaudu piki selle keemilist gradienti. Basolateraalne GLUT1 võib aidata glükoosil reabsorbeerida või glükoosi peritubulaarsest ruumist võtta (Joonis 4) (Lizák et al., 2019).



Joonis 4. Glükoosi transportijad. SGLT1 reabsorptsiooni võime proksimaalse tuubuli lõpuosas (a), SGLT1 ja SGLT2 toimemehhanismid proksimaalses tuubulis (b) (Vallon, 2020).

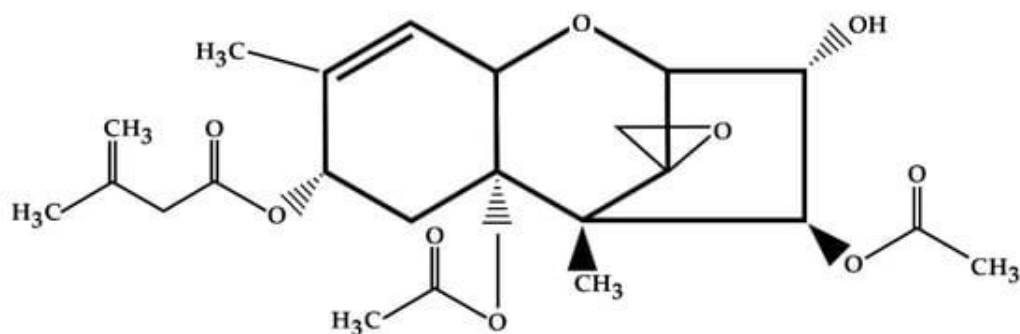
1.4. Mükotoksiinide jaotus

Mükotoksiinid on madala molekulmassiga sekundaarsed metaboliidid, mida toodavad filamentseid seened. Need metaboliidid moodustavad toksikogeenselt ja keemiliselt heterogeense koosluse, mis on rühmitatud koos vaid seetõttu, et need võivad põhjustada haigusi ja surma inimestel ja teistel selgroogsetel. Mükotoksiinide olulisuse määramine põhineb nende esinemissagedusel ja/või haiguse tõsidusel, mida nad põhjustavad. Arstid klassifitseerivad mükotoksiine sageli vastavalt millisele organile nad mõjuvad, näiteks hepatotoksiinid, nefrotoksiinid, neurotoksiinid ja immuuntoksiinid. Rakubioloogid jagavad mükotoksiine laiematesse kategooriatesse, nagu teratogeeneid, mutageeneid, kantserogeeneid ja allergeeneid (Zain, 2011).

Suur rühm mükotoksiine, millest paljud on kantserogeensed, hõlmab näiteks aflatoksiine, desoksünivalenooli, fumonisiine ja T-2-mükotoksiini. Nende mükotoksiinide põhjustatud haigused (mükotoksikoosid) on mitmekesised ja mõjutavad paljusid vastuvõtlikke loomaliike ning inimesi. Enamik neist haigustest tekib pärast mükotoksiiniga saastunud teravilja või sellistest teradest valmistatud toodete tarbimist, kuid on ka teisi kokkupuuteviise. Mükotoksikooside diagnoosimine võib olla keeruline, kuna haiguse sümptomid on sageli sarnased teiste patogeeneid põhjustatud haigusnähtudega, mistõttu sisaldab diagnostiline protsess proovide võtmist, ettevalmistamist ja analüüsi (Richard, 2007).

1.4.1. T-2-mükotoksiin

T-2-mükotoksiin kuulub trikoteet seente mükotoksiinide rühma, mis kuulub keemilisse klassi A, mis sisaldab mitte-makrotsükliilisi trikoteet seeni (Joonis 5). Peamine seen, mis vastutab T-2-toksiini tootmise eest on *Fusarium sporotrichioides*. Mõned selle seene tüved toodavad ka lähedalt seotud mükotoksiine nagu HT-2 toksiin ja diatsetoksüskirpenool. Trikoteetseente toksiine (TCT) tootvad seened esinevad kogu maailmas. Nad suudavad kasvada väga erinevates keskkonnatingimustes, sealhulgas toitainete-, temperatuuri-, niiskusesisalduse ja hapnikutaseme muutlikes kasvukeskkondades (Janik et al., 2021). T-2-toksiini sisaldavaid põllukultuurid nagu mais, nisu, oder, kaer, riis ja rukis. Looduslikult esineb T-2-toksiin Aasias, Aafrikas, Lõuna-Ameerikas, Euroopas ja Põhja-Ameerikas. Toksiini tootmine on suurim kõrge niiskustaseme puhul ja temperatuuri vahemikus 6-24 °C (Li et al., 2011). TCT-d võivad sattuda inimeste toiduahelasse hommikusöögihelveste, pagaritoodete, suupistete ja õlu kaudu. Inimeste mürgistuse peamine põhjus on TCT-ga saastunud sööta saanud kariloomade ja lindude liha, piima ja munade tarbimine (Janik et al., 2021).



Joonis 5. T-2-toksiini graafiline struktuur (Janik et al., 2021).

T-2-toksiin on kõige toksilisem kõikidest TCT-dest. Pärast T-2-mükotoksiiniga kokkupuudet või selle tarvitamist imendub see koheselt seedetrakti või hingamisteede limaskestast membraanide kaudu ning transporditakse maksa, mis on peamine organ, mis vastutab toksiini ainevahetuse eest. Sõltuvalt vanusest, doosist ja kokkupuute viisist ilmnevad mürgistusnähud nagu oksendamine, maovalu, mao nekroos ja nahaärritus. T-2-toksiini eemaldamiseks on leitud erinevaid dekontamineerimise tehnikaid, mis aitavad vähendada T-2-toksiini kontsentratsiooni põllumajandustootetes. Siiski usutakse, et selle toksiini 100% lagundamine ei pruugi olla võimalik (Janik et al., 2021).

T-2-toksiin mõjub eelkõige neerude tööle, sest see häirib metaboolseid radu ning mõjutab energiakasutust, aminohapete metabolismi, nukleotiidide sünteesi ja oksüdatiivse stressi vastuseid (Kulcsár et al., 2024). T-2-toksiin ja teiste *Fusarium* perekonna seente toksiinid

pärsivad valkude sünteesi, millele järgneb DNA ja RNA sünteesi sekundaarne häirimine. See mõjutab aktiivselt jagunevaid rakke, mis vooderdavad seedetrakti, nahka, lümfoideid ja erütroideid rakke. Selle tulemusena võib väheneda antikehade tase, immuunglobuliinide arv ja muud humoraalsed faktorid nagu tsütokiinid. Haiguse ilmingute hulka kuuluvad kaalulangus või kehva kaalutõus, verine kõhulahtisus, naha nekroos või nokapõletikud ja suu limaskestast kahjustused, verejooks ning vähenenud piima ja munade tootmine. Tüüpilised suukaused kahjustused linnuliikidel on kollased kaseossed naastud, mis esinevad noka äärel, suulae limaskestal, suu nurkades ja keelel (Li et al., 2011).

Noortel kitsedel uuriti T-2-toksiini mõju neerudele toksikopatoloogilise uuringuga. Histoloogiline analüüs näitas neerudes toimunud muutusi pärast 30-päevast T-2-toksiiniga saastunud dieeti. Tähelepanu väärtus on rakutuuma ja mitokondrite ulatuslik kahjustustumine. Kahjustatud epiteelirakkudel oli harjakeste kadu, mis tekitab tühja ruumi ning põhjustas mitokondrite pleomorfseid vorme. Neerukoe tasandil olid toimunud apoptootilised muutused proksimaalsete ja distaalsete tuubulite epiteelirakkudes. Kõik need neerukoe muutused viitavad toksiooni kahjulikule mõjule neerudes (Nayakwadi et al., 2020).

Katsete käigus on selgunud, et kanad taluvad oma toidus kuni 0,1 ppm (osakest miljoni kohta) T-2-mükotoksiini, ilma et see avaldaks olulist kahjulikku mõju nende elujõulisuse protsendile, elundite kaalule, immuunsusele ja elundite histopatoloogiale 0-6 kasvunädala jooksul (Singh, 2020).

Manafi et al. katses jagati 192 päeva vanused kanad nelja gruppi, kellest kahele manustati 0,5 ppm T-2-mükotoksiini 5 nädala jooksul sh ühele neist gruppidest manustati lisaks ka *Mycoplasma gallisepticum*'i. Iga nädala tagant võeti proovid ühelt emaselt ja ühelt isaselt linnult ning viidi läbi biokeemilised ja histoloogilised testid ning hinnati patoloogiate taset. Võrreldes kontrollgrupiga esines T-2-mükotoksiini saanud lindude hulgas märgatav kehakaalu langus ning neerudes tuubulaarse epiteeli vakuolaarne degeneratsioon koos püknootiliste tuumadega. Neerud olid kõigis ravirühmades veidi suurenenud ja ülekoormatud. T-2-toksiiniga söödud lindudel ilmnemise rabadad ja tumedat värvi neerud. Toimus lümfoideid rakkude vähenemine folliikulites, kus esinesid retikuloepiteeliaalsed rakud, ja apoptootilisi kehi esines harvemini. Lisaks selgus, et T-2-mükotoksiin on tugev immuunsupressor, sest *Mycoplasma gallisepticum*'iga nakatunud kanad olid vastuvõtlikumad toksiooni tekitatud kahjustustele (Manafi et al., 2015).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 (SGLT1) immuunlokalisatsioon kanade neerukoos normijuhtumite ja T-2-mükotoksikoosi korral.

Sellest tulenevalt on uurimistöo hüpoteesid:

1. SGLT1 kaastransportija lokaliseerub kanade neerude proksimaalsetes vääntuubulites;
2. SGLT1 ekspressioon on vähenenud T-2-mükotoksikoosi põdevate kanade neerukoos.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Materjal

Katses osales 14 seitsmepäevast Ross-tüüpi kana (*Gallus gallus domesticus*), jagatuna võrdselt tervete (kontrollrühm, n=7) ja T-2-mükotoksikoosi nakatunud kanade (n=7) rühma. Kanad pärinesid Makedoonia haudejaamast ja olid katse alguses kliiniliselt terved. Kanu hoiti soojendatud liivapõrandaga boksides. Kogu katseperioodi vältel oli lindudele vabalt kättesaadav tibusööt (Cargill, Poola) ja joogivesi *ad libitum*.

T-2-toksiini rühma kuuluvatele tibudele manustati T-2-toksiini alates neljandast elupäevast annuses 0,250 mg/tibu päevas kolme järjestikuse päeva jooksul. Lindude eutanaasia viidi läbi 24 tundi pärast viimast toksiooni annust südamesisese 0,5 ml 20% naatriumpentobarbitaali üledoosiga. Terved seitsmepäevased kanatibud eutanaseeriti samal meetodil. Seejärel eemaldati kanatibude neerudest 0,5–1,0 cm läbimõõduga koetükid, millele järgnesid kudede värvimisele eelnevad histotehnika meetodid.

2.2.1.1. Eetikakomitee kinnitus

Katsetes kasutatud preparaadid olid valmistatud (kuni deparafineerimise etapini) Makedoonias, kus Ss. Cyrili ja Methodiuse Ülikooli eetikakomisjon Skopjes kiitis heaks uuringu eksperimentaalsed protseduurid, järgides Euroopa konventsiooni soovitusi selgroogsete loomade kaitseks, keda kasutatakse eksperimentaalsetel ja muudel teaduslikel eesmärkidel (ETS nr. 123, heakskiit nr. 03-7534, 12. aprill 2013).

2.2.2. Metoodika

2.2.2.1. Materjali ettevalmistus värvimiseks

Uuringus kasutati histotehnika meetodeid (materjali fikseerimine, pesemine ja dehüdratatsioon, sisestamine ja lõikamine mikrotoomiga, deparafineerimine), millele järgnes koelõikude värvimine hematoküliini ja eosiiniga ning immunohistokeemia.

2.2.2.1.1. Fikseerimine

0,5–1,0 cm läbimõõduga neerukoe materjal fikseeriti toatemperatuuril 10% puhverdatud formaldehüüdis vähemalt 72 tundi, et tagada täielik fikseerumine.

2.2.2.1.2. Materjali pesemine ja dehüdratatsioon

Enne sisestamist loputati materjali fosfaatpuhverdatud soolalahusega (PBS) kuni fikseerimisvahend eemaldus ja dehüdreeriti järjestikustes, tõusva kontsentratsiooniga etanoolis - 50%; 70%; 80%; 95%; 100% (iga etapp kestusega 10 minutit).

Etanooli eemaldamiseks viidi koematerjal etanool-ksüleenilahustesse ja lõpuks 100% ksüleenijärgmiselt:

- Etanool-ksüleen 2:1 suhtega 10–15 minutit
- Etanool-ksüleen 1:1 suhtega 10–15 minutit
- Etanool-ksüleen 1:2 suhtega 10–15 minutit
- 100% ksüleen 10–15 minutit, kolm korda.

2.2.2.1.3. Sisestamine ja lõikamine mikrotoomiga

Kudedele tahke lõikekonsistentsi andmiseks kasutati parafiinsisestust 60°C juures järgmiselt:

- Ksüleen-parafiin 2:1 suhtega 30 minutit
- Ksüleen-parafiin 1:1 suhtega 30 minutit
- Ksüleen-parafiin 1:2 suhtega 30 minutit
- 100% parafiin 1–2 tundi
- 100% parafiin 24 tundi.

Parafiinsisestusega materjalist lõigati mikrotoomiga Microm HM360 (USA) 7 µm paksused koelõigud, mis asetati polü-L-Lüsiiniga kaetud preparaadiklaasidele (O. Kindler GmbH, Freiburg, Saksamaa) ning kuivatati 44 °C juures 12 tundi.

2.2.2.1.4. Koelõikude deparafineerimine

Koelõikude värvumise parandamiseks viidi läbi deparafineerimine: ksüleen abil eemaldati parafiin ja alkoholi abil ksüleen. See viidi läbi järgmises reas:

- Ksüleen (kolm korda) 5 min
- Absoluutne alkohol (kaks korda) 10 min
- 95% etanool (kaks korda) 10 min
- Kaks pesu destilleeritud vees, iga kord 5 minutit.

2.2.2.2. Värvimine

Koelõikude deparafineerimisele järgnesid koelõikude värvimised hematoksüliin-eosiin meetodil ja immuunhistokeemia märgistatud streptavidiin-biotiini (LSAB) meetodil. Kõiki koelõike töödeldi ühtemoodi, välja arvatud negatiivseid kontrolle, mis ei sisaldanud primaarset antikeha (küüliku anti-SGLT1).

2.2.2.2.1. Värvimine hematoksüliin-eosiin meetodil

Hematoksüliin on aluseline värvaine, mis värvib happelisi struktuure lillakassiniseks, eosiin - happeline värvaine - värvib aluselisi struktuure roosaks. Koelõikude värvimine viidi läbi rutiinhistoloogia meetodil Carsoni (1997) järgi järgmiselt:

- Hematoksüliin 5 minutit (min)
- Voolava kraanivee all 1-2 min
- Loputamine veega 1-2 min
- Hapu alkohol, nn diferentseerimislahuses (70° alkoholile on lisatud mõni tilk 0,1% soolhapet) 10 sekundit
- Loputusvesi hapu alkoholi väljapesemiseks 1-2 min
- Loputusvesi 20-30 min
- Eosiin 1-2 min
- Loputusvesi 1-2 min
- Dehüdreerimine alkoholide tõusvas kontsentratsioonis: 50°, 70°, 96° alkohol I, II, III (2 min igas), karboksülool (kuni 1 min), ksüleen I, II, III (igas 2 min)
- Koelõikudele 1–2 tilka Kanada palsamit
- Koelõikude katmine katteklaasiga.

2.2.2.2.2. Immuunhistokeemia

SGLT1 lokaliseerimise määramiseks kanade neerukoest kasutati Abcam'i (Abcam, 2020) immuunhistokeemilist (IHK) komplekti, mille juhiseid järgiti täpselt.

Mittespetsiifilise taustavärvumise vältimiseks töödeldi proove vesinikperoksiidiga, et blokeerida endogeense peroksüdaasi aktiivsus:

- 3% H₂O₂ 10 min

- Loputus puhvriga (kaks korda).

Kogu katse vältel on puhvrina kasutatud fosfaatpuhver saliini (PBS).

Mittespetsiifilise antikehade seondumise vältimiseks tuleb kasutada valgu blokaatorit (Protein Block):

- Protein Block 5 minutit toatemperatuuril
- PBS.

Immuunhistokeemiline värvimine viidi läbi kasutades küüliku polükloonseid primaarseid antikehi SGLT1 vastu (Abcam, 2020):

- SGLT1-ga (lahjendus 1:100) inkubeeriti proove 30 min temperatuuril 37 °C
- PBS (neli korda)
- Sekundaarne antikeha Goat-anti-Rabbit (lahjendus 1:100)
- PBS (neli korda).

Negatiivse kontrollina kasutati identseid koelõike, kuid ilma primaarse antikehata. Positiivse kontrollina kasutati mikrofotosid jaanalinnu tibude neerukoest, millel oli kasutatud primaarse antikehana SGLT1 (Hussar et al., 2020).

Selles uuringus kasutati tuvastamiseks IHK komplektis sisalduvat (Abcam, UK) biotinüleeritud sekundaarset antikeha Goat-anti-Rabbit ja streptavidiin peroksüdaasi ning kromogeenina DAB-i (3,3'-diaminobensidiini), mis annab positiivselt värvunud rakkudele pruuni värvuse:

- Streptavidiin peroksüdaas 10 min toatemperatuuril
- PBS (neli korda)
- 20 µl DAB kromogeeni lisati 1 ml-le DAB substraadile, ja kanti koelõikudele 10 minutiks
- PBS (neli korda).

IHK katse lõpp (püsipreparaatide tegemine):

- Destilleeritud vesi
- Tuumade kontrasteerimine Harrise hematoksüliiniga 1 min
- Koelõigud voolavas vees kuni 1 min
- PBS 1 min
- Destilleeritud vesi (kaks korda) 5 min
- Dehüdreerimine
 - 95% etanool (kaks korda) 10 s

- 100% etanool (kaks korda) 10 s
- ksüleen 10 s (kaks korda)
- Koelõikudele 1-2 tilka Kanada palsamit
- Koelõikude katmine katteklaasiga.

SGLT1 immuunlokaliseerimist hinnati visuaalselt tervetel ja T-2-mükotoksikoosi haigestunud kanadel. Katsete tulemusena töödeldud koelõikudest tehti fotod PreciPoint M8 digitaalmikroskoobiga (PreciPoint, Garching bei München, Saksamaa) 20x ja 40x suurendusega.

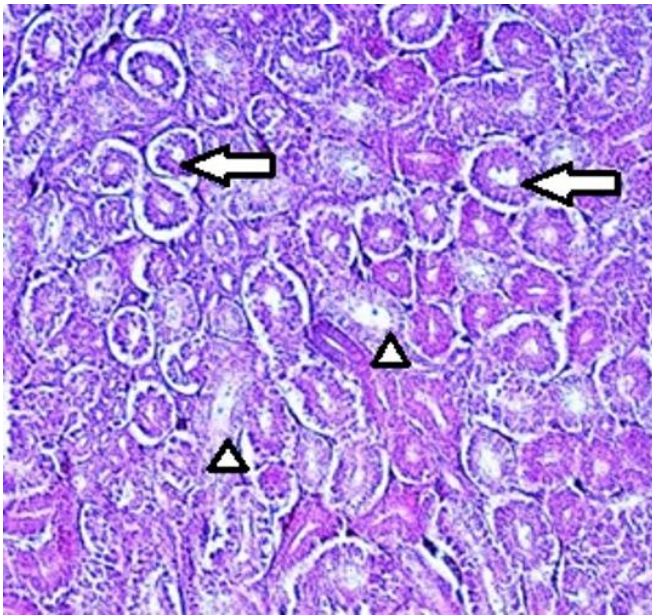
2.2.3. Statistiline analüüs

SGLT1 ekspressiooni tugevust hinnati semikvantitatiivselt visuaalse vaatluse teel, kasutades skaalat nõrk (+), mõõdukas (++) ja tugev (+++). Statistiline analüüs viidi läbi Python'i tarkvara abil (versioon 3.11, 2022). Kontroll- ja T-2-toksiini rühmade võrdlemiseks kasutati Mann-Whitney U-testi ja sõltumatute valimite t-testi (Independent samples t-test). Tulemused esitati keskmiste \pm standardhälvetena (Mean \pm SD) ning *p*-väärtused alla 0,05 loeti statistiliselt oluliseks.

2.3. Tulemused

2.3.1. Hematoksüliin-eosiin meetod

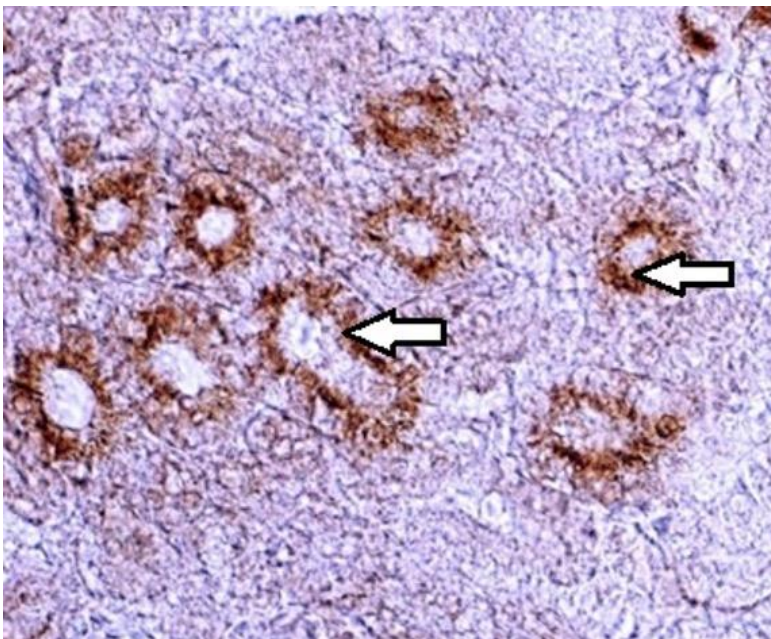
Kanade neerukoe normaalse struktuuri paremaks mõistmiseks teostati rutiinhistoloogiline värvimine hematoksüliini ja eosiiniga (Joonis 6). Joonisel on näha tuvastatud proksimaalsed ja distaalsed neerutorukesed tervetel kanadel.



Joonis 6. Tervete 7-päevaste kanade neerukude: proksimaalsed (nooled) ja distaalsed neerutorukesed (nooletsad). Hematoksüliin-eosiin. Obj. 40x (Hussar, 2024).

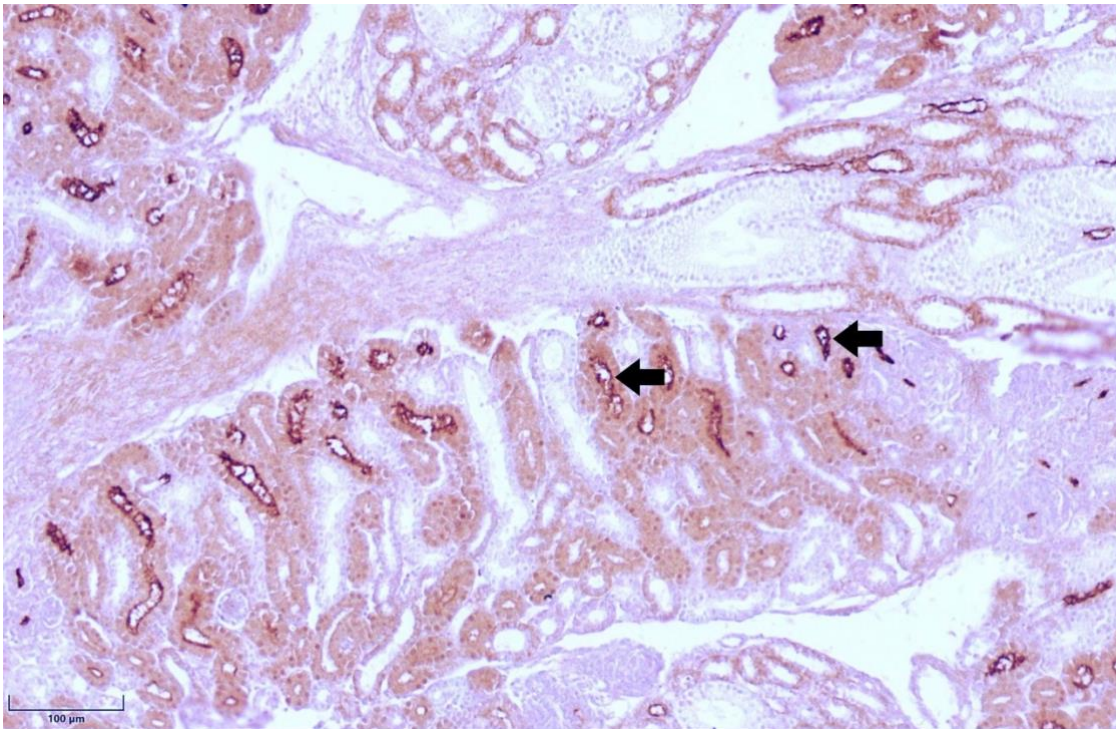
2.3.2. Immuunhistokeemia

Immuunhistokeemiliselt lokaliseeriti SGLT1 7-päevaste kanade neerukoos. Läbiviidud uuringud näitasid tugevat SGLT1 esinemist 7-päevaste tervete kanade proksimaalsete neerutorukeste apikaalsel poolel (Joonis 7). SGLT1 spetsiifilist värvumist ei täheldatud tervete lindude neerude distaalsetes torukestes, glomeerulites ega kogumistorukestes.



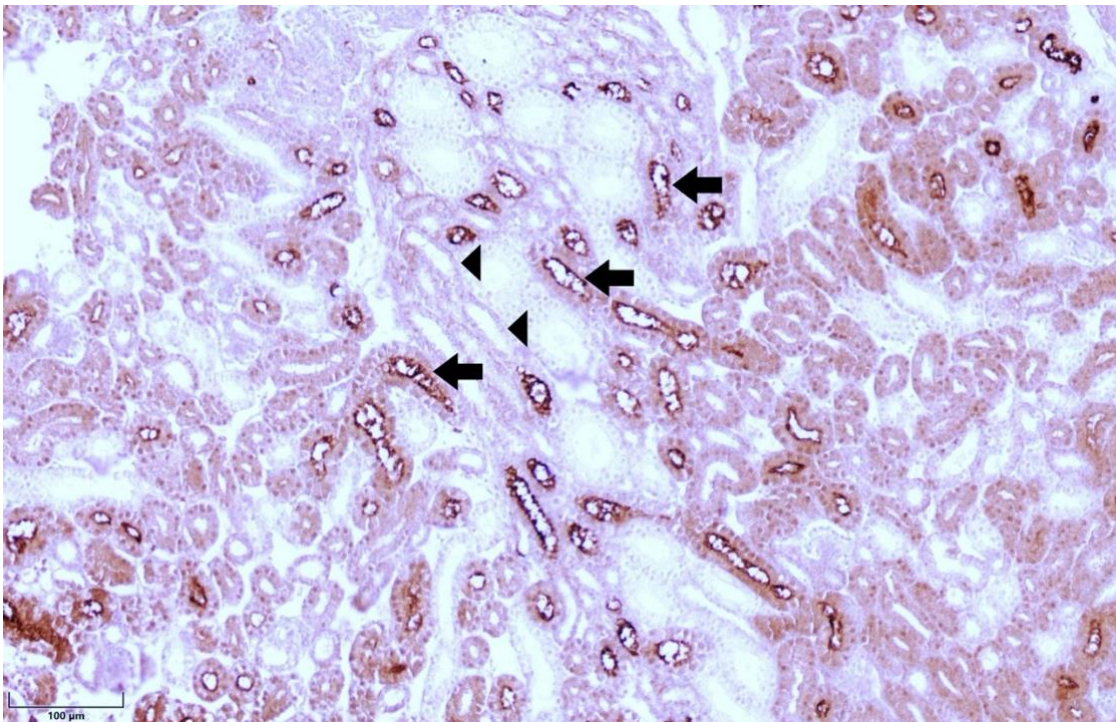
Joonis 7. Tervete 7-päevaste kanade neerukude. Tugev SGLT1 värvumine proksimaalsete neerutorukeste apikaalsel poolel (nooled). Obj. 40x (Hussar, 2024).

Võrreldes tervete kanadega, ilmnes mükotoksikoosi nakatunud kanade proksimaalsete neerutorukestes nõrgem SGLT1 ekspressioon (Joonis 8).



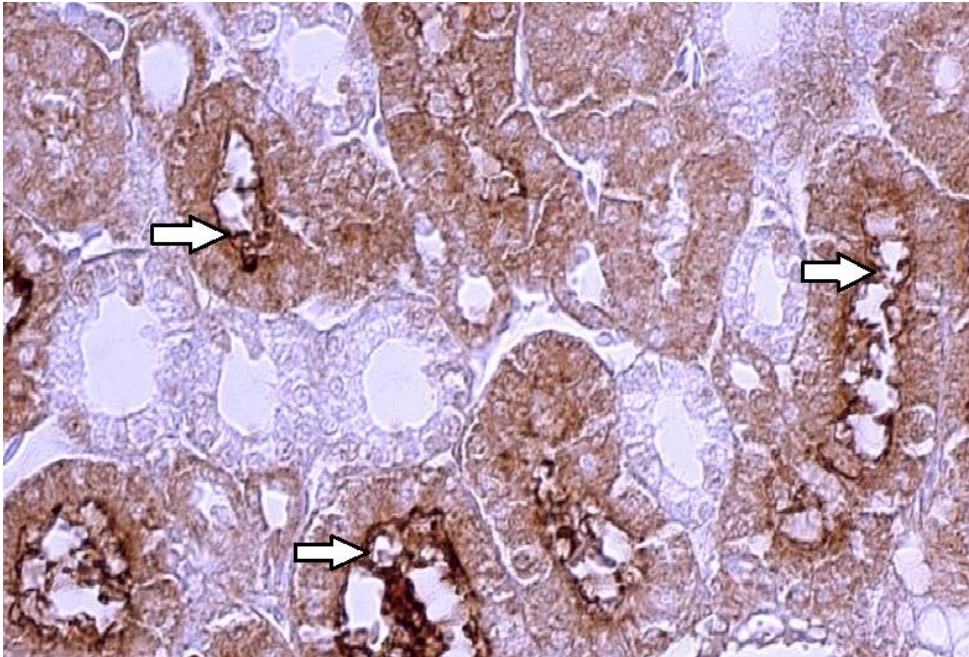
Joonis 8. T-2-mükotoksikoosi nakatunud 7-päevaste kanade neerukude: proksimaalsed neerutorukesed (nooled). Bar: 100μm.

Distaalsete neerutorukeste SGLT1 värving nõrk või puudus (Joonis 9).



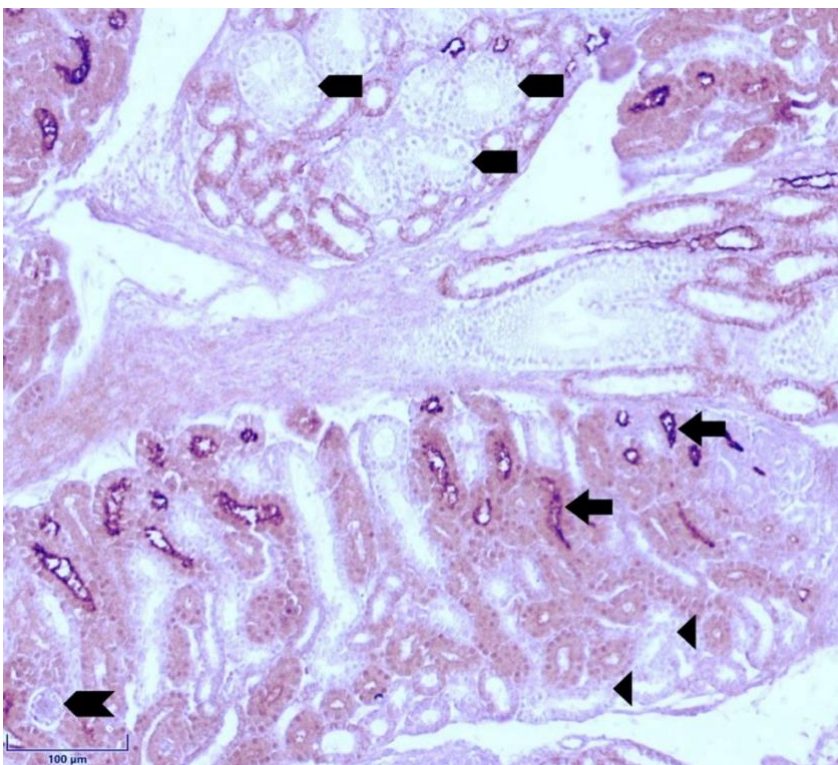
Joonis 9. T-2-mükotoksikoosi nakatunud 7-päevaste kanade neerukude: proksimaalsed (nooled) ja distaalsed neerutorukesed (nooleotsad). Bar: 100μm.

Lisaks ilmnese, et T-2-mükotoksikoosi põdevate kanade neerude proksimaalsete vääntuubulite epiteelirakkude harjasääris oli ebaregulaarne ja kahjustunud (Joonis 10).



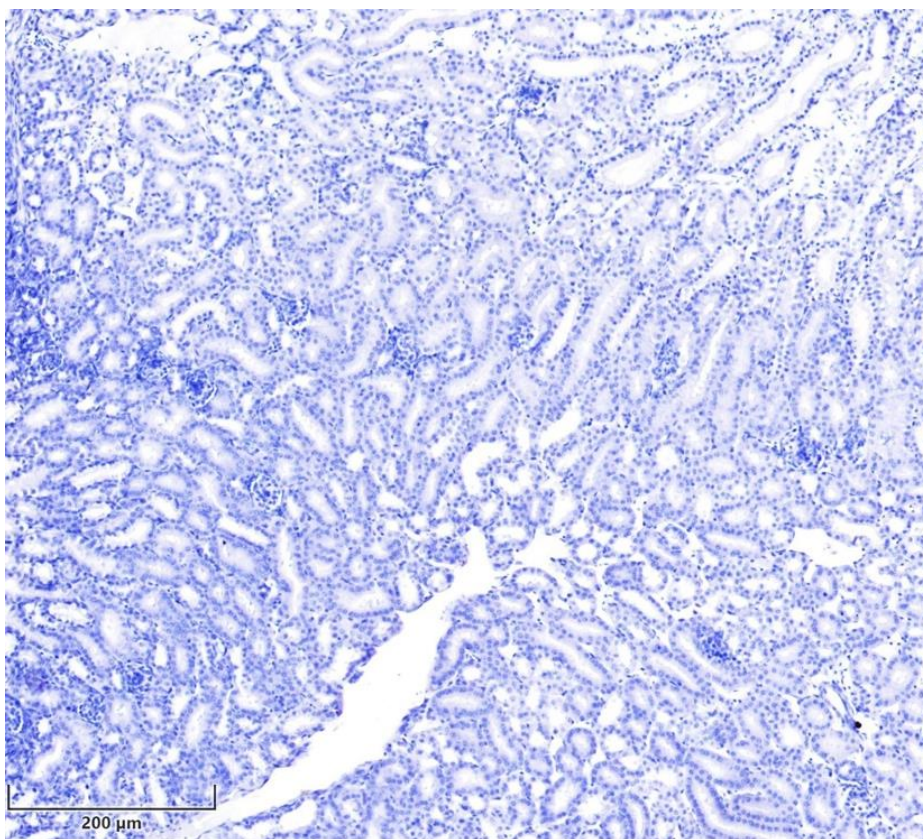
Joonis 10. T-2-mükotoksikoosi nakatunud 7-päevaste kanade neerukude: ebaregulaarne ja kahjustunud proksimaalsete vääntuubulite epiteelirakkude harjasääris (nooled). Obj. 40x (Hussar, 2024).

Kogumistorukestes ja neerukehakestes puudus SGLT1 spetsiifiline värvumine (Joonis 11).



Joonis 11. T-2-mükotoksikoosi nakatunud 7-päevaste kanade neerukude: proksimaalsed (nooled) ja distaalsed vääntuubulid (nooleotsad), kogumistorukesed (nooled pildi üleval) ja glomeerul (nool vasakul all nurgas). Bar: 100µm.

Negatiivse kontrollina kasutati T-2-mükotoksikoosi nakatunud kanade neerude preparaate ilma SGLT1 märgistamiseta (ilma primaarsete antikehadeta) (Joonis 12).



Joonis 12. Negatiivne kontroll: T-2-mükotoksikoosi nakatunud 7-päevaste kanade neerukude. Rakutumade kontrasteering HARRISE hematoksüliiniga. Bar: 200μm.

Üliõpilase poolt läbiviidud tööetapid hõlmasid preparaatide hematoksüliin-eosiin (H&E) värvimist ning immunohistokeemilise (IHC) meetodi teostamist. Mõlema meetodi puhul viis üliõpilane iseseisvalt läbi kõik etapid alates kudede deparafineerimisest kuni värvimise, preparaatide katmise ning tulemuste hindamiseni. Lisaks teostas üliõpilane iseseisvalt lõputöö koostamise, sealhulgas kirjanduse analüüsi, meetoodika kirjeldamise, arutelu ja tulemuste esitamise.

2.3.3. Statistiline analüüs

Kuna IHC meetodil töödeldud preparaatide visuaalsel vaatlusel leiti, et SGLT1 lokaliseerub spetsiifiliselt neeru proksimaalsetes torukestes, samal ajal kui teistes struktuurides (nt distaalsetes torukestes, kogumistorukestes ja glomeerulites) oli värvumine väga nõrk või puudus, viidi statistiline analüüs läbi neeru proksimaalsete torukeste SGLT1 ekspressiooni erinevuste hindamiseks tervete ja T-2-mükotoksikoosi nakatunud kanade vahel. Visuaalse hindamise põhjal oli SGLT1 värvumine kontrollrühma neerukoos märgatavalt tugevam kui T-

2-toksiinirühmas. Semikvantitatiivse (visuaalse) analüüsi tulemused proksimaalsetes torukestes on esitatud alljärgnevas tabelis 1.

Tabel 1. SGLT1 ekspressioon kana neerude proksimaalsetes tuubulites*

Antikeha	Linnu nr.	Kontrollrühm (terved kanad)	T-2-toksiini rühm
SGLT1	1	++	++
	2	+++	+
	3	++	+
	4	++	+
	5	++	++
	6	++	+
	7	++	+

* SGLT1 ekspressiooni tugevus visuaalsel hindamisel: nõrk (+), mõõdukas (++) ja tugev (+++)

SGLT1 immunohistokeemilise värvingu semikvantitatiivne hindamine näitas värvuse intensiivsuse olulist vähenemist T-2-toksiini rühmas võrreldes kontrollrühmaga (Tabel 2). Keskmine värvingu skoor oli kontrollrühmas $2,14 \pm 0,38$ ja T-2-toksiini rühmas $1,29 \pm 0,49$ ($n = 7$ lindu rühma kohta).

Rühmade vaheline erinevus oli statistiliselt oluline, mida kinnitas Mann–Whitney U-test ($U = 43, p = 0,0088$). Sõltumatute valimite t-test andis sellega kooskõlas olevad tulemused ($t = 3,67, p = 0,0035$).

Tabel 2. SGLT1 ekspressiooni keskmine intensiivsus ja statistiline olulisus tervete ja T-2-mükotoksikoosi haigestunud kanade neerude proksimaalsetes tuubulites

Antikeha	Kontrollrühm (terved kanad), keskmine \pm SD*	T-2-toksiini rühm, keskmine \pm SD*	U-testi p-väärtus**	t-testi p-väärtus**
SGLT1	$2,14 \pm 0,38$	$1,29 \pm 0,49$	0,0088	0,0035

* $n = 7$

** $p < 0,05$

2.4. Arutelu

Uuringute eesmärgiks oli immuunlokalisierida naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 tervete ja T-2-mükotoksiiniga kokkupuutunud kanade neerukoos. Katse tulemused näitasid, et SGLT1 lokaliseerub tervete kanade neerukoos proksimaalsete vääniliste tuubulite epiteelirakkude apikaalsetes membraanides, mis kattub inimeste neerukoe SGLT1 immuunlokalisatsiooniga (Sano, Shinozaki, & Ohta, 2020). Uuringud näitasid samuti, et T-2-mükotoksiiniga kokkupuutunud kanade neerudes oli SGLT1 ekspressioon visuaalselt nõrgem, millega kaasnesid ka märkimisväärsed morfoloogilised muutused nagu epiteelirakkude harjasäärise kahjustused.

Need leiud viitavad sellele, et T-2-mükotoksiin kahjustab proksimaalsete vääniliste tuubulite epiteelirakke ja võib seeläbi takistada SGLT1 normaalset funktsioneerimist. Kuna SGLT1 on võtmetähtsusega glükoosi tagasiimendumisel, võib selle nõrgenenud ekspressioon T-2-toksiiniga kokku puutunud lindude neerudes viidata häirunud glükoositranspordile. See võib omakorda mõjutada looma ainevahetust ja üldist tervislikku seisundit.

Uuringu tulemused on kooskõlas töö alguses seatud uuringu hüpoteesidega andes uutset teavet SGLT1 immuunlokalisatsioonist ning T-2-mükotoksiini mõjust kanade neerudele. Arvestades, et mükotoksiinide mõju glükoosi transportijatele on seni uuritud peamiselt imetajate mudelites, aitavad saadud tulemused täita olulist lünka lindude toksikoloogias. Lisaks võivad need leiud tõsta teadlikkust söödaga seotud mükotoksiinide ohust ja toetada tõhusamaid kontrollmeetmeid linnukasvatustes, et vältida lindude tervise ja tootlikkuse kahjustumist. Samuti võib see mudel olla kasulik ka inimeste seisukohast arvestades, et mükotoksiinide toksiline toime võib olla liigiti sarnane.

Samas tuleb arvestada, et käesolev uuring oli piiratud kvalitatiivse lähenemisega, mis ei võimaldanud hinnata SGLT1 ekspressioonitasemeid kvantitatiivselt. Proovide arv oli piiratud ning uuringus käsitleti vaid üht transportervalgu ja üht toksilist ühendit. Samuti ei uuritud, kas täheldatud muutused on pöördumatud või ajutised. Need piirangud vähendavad tulemuste üldistatavust ning suurendavad vajadust täiendavateks uuringuteks.

Edasistes uuringutes oleks soovitatav hinnata SGLT1 ekspressiooni kvantitatiivselt, kasutades näiteks RT-qPCR-i või Western blot analüüsi, et kinnitada ja täpsustada täheldatud ekspressioonimuutusi. Samuti võiks läbi viia dooside ja kokkupuute aja varieerumisega katseid, et selgitada, kas transportija ekspressioon väheneb juba madalate kontsentratsioonide juures või alles teatud toksilisuse lävel.

Lisaks morfoloogilistele ja molekulaarsetele muutustele oleks oluline hinnata ka neerude funktsionaalseid parameetreid: mõõta glükoosi kontsentratsiooni uriinis või kasutada *in vitro* süsteeme glükoositranspordi aktiivsuse hindamiseks. Need katsed võimaldaksid teha kindlaks, kas SGLT1 vähenenud ekspressioon kajastub ka glükoositranspordi languses, kinnitades seeläbi toksilise mõju funktsionaalset tähendust. Samuti saab uurida, kas SGLT1 ekspressioon taastub pärast T-2-toksiini eemaldamist. Selline lähenemine aitaks mõista, kas toksiin põhjustab pöördumatuid või ajutisi muutusi.

KOKKUVÕTE

Glükoosi imendumine on organismi toimimiseks hädavajalik protsess, mida reguleerivad kaks peamist transportijate rühma: naatriumi-glükoosi kaastransportijad (SGLT) ja glükoosi transportijad (GLUT). SGLT1 ja SGLT2 paiknevad peamiselt soolestikus ja neerudes, kus nad vastutavad aktiivse glükoosi tagasiimendumise eest primaarsest uriinist. SGLT2 vastutab suurema osa glükoosi tagasiimendumise eest proksimaalsete neerutorukeste alguse osas, samas kui SGLT1 reabsorbeerib ülejäänud glükoosi proksimaalsete torukeste distaalsemas osas. GLUT transportijad, nagu GLUT1 ja GLUT2, vahendavad glükoosi passiivset transporti rakkudesse, järgides kontsentratsioonigradiendi suunda, mis tagab glükoosi efektiivse jaotumise ja kasutamise kudedes. SGLT ja GLUT transportijate tasakaalustatud töö aitab hoida vere glükoositaset stabiilsena ning tagab organismile vajaliku energia.

Katse eesmärk oli immuunlokaliseerida SGLT1 tervete ja T-2-mükotoksiiniga kokkupuutunud kanade neerukoes. Katsetulemused näitasid, et SGLT1 lokaliseerus proksimaalsete vääntuubulite epiteelirakkude apikaalsetes membraanides ning et tranportheri ekspressioon on nõrgem T-2-toksiiniga kokku puutunud tibude neerudes. Koos morfoloogiliste muutustega, nagu ebaregulaarsed ja kahjustunud harjasäärise epiteelirakud proksimaalsetes neerutorukestes, võib SGLT1 nõrk ekspressioon T-2-toksiini grupi kanade neerukoes viidata neerukoe kahjustusele ja sellest tulenevalt vähenenud glükoosi transpordivõimele T-2-mükotoksikoosi mõjul. Selle esmase uuringu tulemused on uudsed ning annavad olulist teavet edasisteks uurimusteks.

Summary

Sodium/glucose cotransporter-1 immunolocalization in chicken kidney tissue in norm and in T-2 mycotoxicosis

Sofia Kõrs

Glucose absorption is a vital process for the functioning of the organism, regulated by two main groups of transporters: sodium-glucose cotransporters (SGLT) and glucose transporters (GLUT). SGLT1 and SGLT2 are primarily located in the intestines and kidneys, where they are responsible for the active reabsorption of glucose from primary urine. SGLT2 accounts for most of the glucose reabsorption in the early part of the proximal tubules, while SGLT1 reabsorbs the remaining glucose in the later sections of the proximal tubules. GLUT transporters, such as GLUT1 and GLUT2, mediate the passive transport of glucose into cells following the concentration gradient, ensuring the efficient distribution and utilization of glucose in tissues. The balanced function of SGLT and GLUT transporters helps maintain stable blood glucose levels and provides the necessary energy for the organism.

The aim of the study was to immunolocalize SGLT1 in the kidney tissue of healthy chickens and chickens exposed to T-2 mycotoxin. Study results showed that SGLT1 was localized in the apical membranes of epithelial cells in the proximal convoluted tubules and that the expression of the transporter was weaker in the kidneys of chicks exposed to T-2 toxin. Along with morphological changes such as irregular and damaged brush border membranes in the proximal tubules, the weak expression of SGLT1 in the kidney tissue of the T-2 toxin group may indicate kidney damage and, consequently, reduced glucose transport capacity due to T-2 mycotoxicosis. The results of this preliminary study are novel and provide important information for further research.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abcam. (2020). ab64264 - Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit.
- Abdul-Ghani, A. M., Norton, L., & DeFronzo, A. R. (2015). Renal sodium-glucose cotransporter inhibition in the management of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Physiology*.
- Antonio, M.-I., & Pradeep, V. (2024). *Histology, Nephron*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Aryani, D., Masyitha, D., Zainuddin, Akmal, M., Helmi, T. Z., Fahrimal, Y., & Herrialfian, H. (2020). Histology and Histomorphometry of Kidney on Domestic Chicken (*Gallus gallus domesticus*) During Pre and Post Hatch. *Advances in Biological Sciences Research*.
- Barfull, A., Garriga, C., Mitjans, M., & Planas, J. M. (2002). Ontogenetic expression and regulation of Na⁺-d-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken. *American Journal of Physiology*.
- Brake, J., Hamilton, P., & Kittrell, R. (2000). Effects of the Trichothecene Mycotoxin Diacetoxyscirpenol on Feed Consumption, Body Weight, and Oral Lesions of Broiler Breeders. *Poultry Science*, 856–863.
- Camarata, T., Howard, A., Elsey, R. M., Raza, S., O'Connor, A., Beatty, B., . . . Vasilyev, A. (2016). Postembryonic Nephrogenesis and Persistence of Six2-Expressing Nephron Progenitor Cells in the Reptilian Kidney. *PLOS ONE*.
- Carson, L. F. (1997). *Histotechnology*. Chicago: ASCP Press.
- Deepa, K.P., Sreeranjini, A.R. & Soumya, C.B. (2020). Comparative histological studies on the renal cortex in broiler chicken and broiler duck. *The Pharma Innovation Journal*, 129–131.
- Dhyaa, A. A., Ali, F. R., Azhar, S. K., & Myson, A. A. (2014). Comparative anatomical and histological features of the kidney in Harrier (*Circus aueruginosus*), Chicken (*Gallus domesticus*) and Mallard duck (*Anas platyrhynchos*). *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 107–113.
- Falkson, S. R., & Bordoni, B. (2023). *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Bowman Capsule*. Treasure Island: StatPearls Publishing.

- Faria, J., Ahmed, S., Gerritsen, K. G., Mihaila, S. M., & Masereeuw, R. (2019). *Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing*. https://www.researchgate.net/publication/336908347_Kidney-based_in_vitro_models_for_drug-induced_toxicity_testing
- Fujiwara, K., Shin, M., Matsunaga, H., Saita, T., & Larsson, L.-I. (2009). Light-Microscopic Immunocytochemistry for Gentamicin and Its Use for Studying Uptake of the Drug in Kidney. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Hill, M. (2025). *Renal System Histology*. Embryology: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Renal_System_Histology
- Hussar, P., Allmang, C., Popovska-Percinic, F., Järveots, T., & Dūrītis, I. (2022). Comparative Study of Sodium-Dependent Glucose Co-Transporters in Kidneys of Ostrich Chickens. *Scientific Horizons*, 30–35.
- Hussar, P., Dūrītis, I., Popovska-Percinic, F., & Järveots, T. (2020). Immunohistochemical study of sodium-dependent glucose co-transporters in ostrich kidneys. *Journal of Agricultural Science*, 147–150.
- Hussar, P., Hussar, Ü., Kärner, J., & Suuroja, T. (2005). *Histoloogia: miniloengud, praktikumid*. Halo Kirjastus.
- Ismail, A., & Tanasova, M. (2022). Importance of GLUT Transporters in Disease Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Stela, M., & Bijak, M. (2021). T-2 Toxin—The Most Toxic Trichothecene Mycotoxin: Metabolism, Toxicity, and Decontamination Strategies. *Molecules*.
- Kubena, L., Harvey, R., Huff, W., & D.E., C. (1989). Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. *Poultry Science*, 867–872.
- Kulcsár, S., Turbók, J., Kövér, G., Balogh, K., Zándoki, E., Ali, O., . . . Mézes, M. (2024). Exposure to a Combination of Fusarium Mycotoxins Leads to Lipid Peroxidation and Influences Antioxidant Defenses, Fatty Acid Composition of Phospholipids, and Renal Histology in Laying Hens. *Toxins*.
- Kövesi, B., Kulcsár, S., Ancsin, Z., Erdélyi, M., Zándoki, E., Gömbös, P., . . . Mézes, M. (2024). The effects of T-2 toxin, deoxynivalenol, and fumonisin B1 on oxidative stress-related genes in the kidneys of laying hens. *Toxins*.

- Li, Y., Wang, Z., Beier, R. C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S., & Zhang, S. (2011). T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3441–3453.
- Lizák, B., Szarka, A., Kim, Y., Choi, K.-S., Bánhegyi, G., Németh, C. E., . . . Margittai, É. (2019). Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Manafi, M., Pirany, N. N., Hedayati, M., Khalaji, S., & Yari, M. (2015). Experimental pathology of T-2 toxicosis and mycoplasma infection on performance and hepatic functions of broiler chickens. *Poultry Science*, 1483–1492.
- Mather, A., & Pollock, C. (2011). Glucose handling by the kidney. *Kidney International*, 1-6.
- McMahon, A. P. (2016). Development of the Mammalian Kidney. *Current Topics in Developmental Biology*, 31–64.
- Moinuddin, Z., & Dhanda, R. (2016). Anatomy of the kidney and urether. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 247–252.
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 121–138.
- Murray, I., & Paolini, M. (2020). *Histology, Kidney and Glomerulus*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Nakrani, M., Wineland, R., & Anjum, F. (2020). *Physiology, Glucose Metabolism*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Nayakwadi, S., Ramu, R., Sharma, A. K., Gupta, V. K., Rajukumar, K., Kumar, V., . . . Basalingappa, K. M. (2020). Toxicopathological studies on the effects of T-2 mycotoxin and their interaction in juvenile goats. *PLOS ONE*.
- Oe, Y., & Vallon, V. (2022). The Pathophysiological Basis of Diabetic Kidney Protection by Inhibition of SGLT2 and SGLT1. *Diabetic Kidney Disease*, 349–368.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 3–10.
- Sano, R., Shinozaki, Y., & Ohta, T. (2020). Sodium-glucose Co-transporters: Functional Properties and Pharmaceutical Potential. *Journal of Diabetes Investigation*.

- Singh, R. (2020). Effect of Dietary T-2 Toxin on Liveability, Organ Weights, Immunity and Histopathology of Organs in Broiler Chickens. *Veterinary Research International*, 285–290.
- Soriano, R., Penfold, D., & Leslie, S. (2018). *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Kidneys*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Vallon, V. (2020). Glucose transporters in the kidney in health and disease. *European Journal of Physiology*, 1345–1370.
- Vrhovac, I., Erer, D. B., Klessen, D., Burger, C., Breljak, D., Kraus, O., . . . Koepsell, H. (2015). Localizations of Na⁺-d-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *European Journal of Physiology*, 1881–1898.
- Wood, S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 3–9.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 129–144.
- Zierler, K. (1999). Whole body glucose metabolism. *American Journal of Physiology*, 409–426.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sofia Kõrs,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Naatriumi-glükoosi kaastransportija-1 immuunlokalisatsioon kanade neerukoos normijuhtumite ja T-2-mükotoksikoosi korral”, mille juhendajad on Piret Hussar, Martin Kärner ja Florina Popovska-Percinic, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Sofia Kõrs

14.01.2026