

Citotoksičnost citrinina, sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina za ljudske stanice pluća

Šagud, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:562947>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ines Šagud

**Citotoksičnost citrinina, sterigmatocistina i 5-
metoksistergigmatocistina za ljudske stanice pluća**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

Svima, koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada, veliko hvala.

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu, trudu i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na ukazanom povjerenju.

Hvala mojoj obitelji na podršci pruženoj ne samo tijekom studiranja nego kroz cijeli život.

Hvala svim kolegama i kolegicama na neprocjenjivim uspomnama koji su studiranje učinili posebnim iskustvom. Uvijek ću vam biti zahvalna što ste bili uz mene u lakšim i težim studentskim danima. Hvala Franu koji je vjerovao u mene čak i kad ja nisam.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CITRININ	1
1.1.1. Kemijska svojstva citrinina	2
1.1.2. Mehanizam toksičnosti citrinina	3
1.1.3. Izloženost ljudi citrininu.....	4
1.2. STERIGMATOCISTIN	5
1.2.1. Kemijska svojstva sterigmatocistina	6
1.2.2. Mehanizam toksičnosti sterigmatocistina	6
1.2.3. Izloženost ljudi sterigmatocistinu.....	7
1.3. 5-METOKSISTERIGMATOCISTIN	9
1.3.1. Mehanizam toksičnosti 5-metoksisterigmatocistina	10
1.3.2. Izloženost ljudi 5-metoksisterigmatocistinu.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. STANIČNE KULTURE	13
3.2. TRETIRANJE STANICA MIKOTOKSINIMA.....	13
3.3. MTT TEST	14
3.4. OBRADA PODATAKA	14
3.4.1. Statistička obrada podataka	15
3.4.2. Indeks kombinacije i analiza izoblograma	15

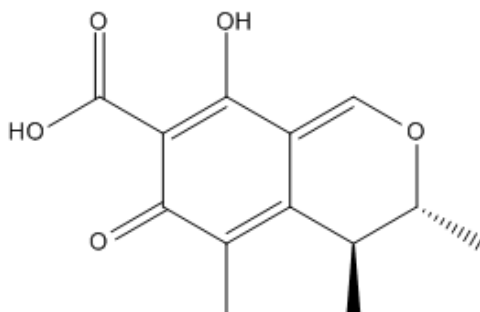
4. REZULTATI	17
4.1. CITOTOKSIČNOST POJEDINAČNIH MIKOTOKSINA ZA A549 STANICE	17
4.2. CITOTOKSIČNOST KOMBINACIJE CTN I STC ZA A549 STANICE.....	19
4.3. CITOTOKSIČNOST KOMBINACIJE CTN i 5-MET-STC ZA A549 STANICE	22
4.4. INTERAKCIJE KOMBINACIJA MIKOTOKSINA.....	24
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. LITERATURA	31
8. SAŽETAK/SUMMARY	39
8.1. SAŽETAK.....	39
8.2. SUMMARY	40
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni niske molekulske mase koji zbog svojih toksikoloških karakteristika mogu predstavljati rizik za zdravlje ljudi i životinja. Do razvoja mikotoksikoze najčešće dolazi ingestijom hrane kontaminirane mikotoksinima, što je ujedno i najznačajniji put izloženosti. Drugi putovi izloženosti su respiratorni, dermalni i parenteralni (Bennett i Klich, 2003; Peraica i Domijan, 2006).

1.1. CITRININ

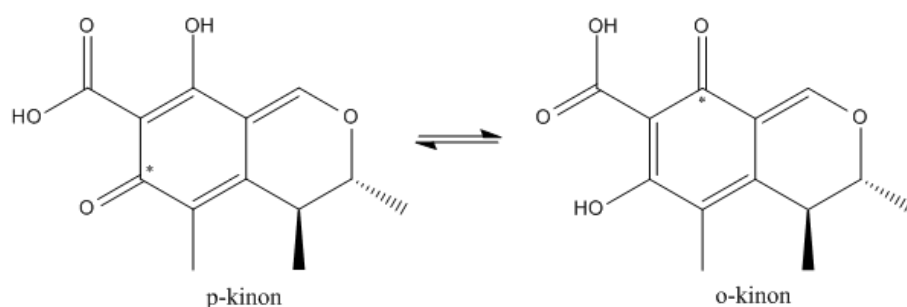
Citrinin (CTN)(Slika 1.) je mikotoksin kojeg proizvode plijesni vrste *Aspergillus*, *Penicillium* i *Monascuse*. Najčešće su kontaminirane žitarice, ali i ostali proizvodi biljnog podrijetla, poput voća, povrća, voćnih sokova, začina, te pokvareni mliječni proizvodi (EFSA, 2012). Vrste *Penicillium* i *Aspergillus* mogu proizvoditi okratoksin A (OTA) i aflatoksin zbog čega se mogu naći zajedno s CTN u žitaricama, posebice u riži. Uzročnik truljenja jabuka, *Penicillium expansum*, proizvođač je patulina (PAT), ali i CTN (Ciegler i sur., 1977) što je razlog pronalaska te kombinacije mikotoksina u sokovima i džemovima od jabuke. U Kini se fermentacijski produkti nekoliko vrsta roda *Monascuse* stoljećima koriste kao bojila za hranu i za konzerviranje mesa te je u gotovo svakom takvom proizvodu pronađen CTN u mjerljivim koncentracijama (EFSA, 2012). Na području Europe rod *Monascuse* se najviše povezuje s crvenom rižom koja se koristi kao alternativna terapija hiperlipidemije. Crvena riža je fermentacijski produkt bijele riže (*Oryza sativa*, L.) dobiven pomoću vrsta iz roda *Monascuse* koji mogu sintetizirati CTN ukoliko se fermentacija ne odvija u kontroliranim uvjetima (Đurović i Šegvić Klarić, 2015).



Slika 1. Kemijska struktura CTN.

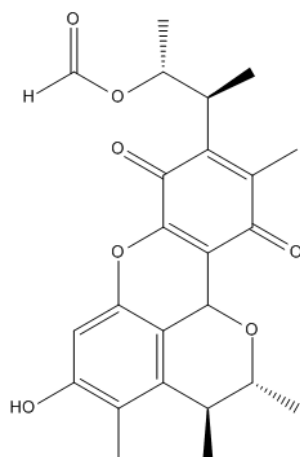
1.1.1. Kemijska svojstva citrinina

CTN je poliketidni mikotoksin molekularne mase 250,25 g/mol, a prema IUPAC-u njegovo ime glasi: (3R,4S)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,trimetil-6-okso-3H-2-benzopirran-7-karboksilna kiselina. Slabo je topljiv u vodi, ali je dobro topljiv u vodenim otopinama natrijeva hidroksida, natrijeva karbonata ili natrijeva acetata, u metanolu, acetonitrilu, etanolu i većini drugih polarnih organskih otapala (Xu i sur., 2006). CTN zbog svoje konjugirane, planarne strukture može fluorescirati, a najveću fluorescenciju pokazuje neionizirani oblik CTN pri pH 2,5 (Franco i sur., 1996). Kristalizira u žute nepravilne kristale u kojima se dva tautomerna oblika, p-kinon i o-kinon, nalaze u dinamičkoj ravnoteži (Slika 2.) (Poupko i sur., 1997).



Slika 2. Strukturni izomeri CTN.

Raspadanje strukture u suhim uvjetima počinje na temperaturi tališta (175°C) dok se u vlažnim uvjetima raspada na temperaturama iznad 100°C (Xu i sur., 2006). Zagrijavanjem CTN 30 minuta na 100°C uz prisutnost vode, nastaje raspadni produkt citrinin H1 (Slika 3.) koji pokazuje veću citotoksičnost od samog CTN (Trivedi i sur., 1993).



Slika 3. Kemijska struktura citrinina H1.

1.1.2. Mehanizam toksičnosti citrinina

CTN je nefrotoksičan mikotoksin, a prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC)(1986) uvršten je u 3. skupinu karcinogenih spojeva zbog nedovoljno dokaza o karcinogenom učinku na ljude. *In vitro* studijama dokazano je više mehanizma toksičnosti i uzroka oštećenja stanica.

Inhibicija sinteze DNA i RNA (pretežno rRNA) dokazana je u stanicama sisavaca (Wasternack i Weisser, 1992), uključujući i stanice bubrega (Yoneyama i Sharma, 1987), ali nema dokaza o indukciji oksidativnog oštećenja DNA niti povećanja razina mRNA humane 8-hidroksigvanin DNA glikozilaze 1 (hOGG₁) nakon izlaganja staničnih kultura CTN (Liu i sur., 2003). Ista studija je dokazala povećanu ekspresiju proteina toplinskog šoka HSP70 nakon inkubacije HEK293 stanica s CTN, a u kvascima se povećala ekspresija gena koji odgovaraju na oksidativni stres (Iwahashi i sur., 2007) što ide u prilog tome da je oksidativni stres jedan od mehanizama toksičnosti. U jetrenim stanicama štakora CTN inhibira GSSG-reduktazu i transhidrogenazu te povećava nastanak reaktivnih kisikovih spojeva stimuliranjem proizvodnje superoksidnih aniona u respiratornom lancu (Ribeiro i sur., 1997). Na povećan oksidativni stres upućuje i pad razine antioksidansa glutationa nakon tretiranja alveolarnih epitelnih stanica sa subtoksičnim dozama CTN što može doprinjeti upali kod udisanja kontaminiranog zraka (Johannessen i sur., 2007).

Sposobnost CTN da mijenja funkcionalnost mitohondrija ispitana je na stanicama proksimalnog tubula štakora. CTN je uzrokovao poremećaj u staničnom disanju i posljedično smanjio koncentraciju staničnog ATP-a. Vijabilnost stanica padala je u ovisnosti o koncentraciji i vremenu, a lipidna peroksidacija praćena je apoptozom (Aleo i sur., 1991). Inhibicijom influksa i povećanjem efluksa kalcijevih iona smanjila se njegova koncentracija u matriksu mitohondrija, dok se u citosolu povećala. Dodatkom Ca²⁺-kelatora značajno se smanjila apoptoza inducirana CTN čime je dokazana važna uloga poremećaja homeostaze kalcija u toksičnosti CTN (Chagas i sur., 1995; Šegvić Klarić i sur., 2012).

Dokazano je da CTN smanjuje vijabilnost stanica blastocita miša (Chan i Shiao, 2007), a u embrijskim matičnim stanicama (ESC-B5) inaktivira HSP90 multišaperonski kompleks uzrokujući raspadanje Ras i Raf-1 i daljnu inhibiciju anti-apoptotskog procesa (Chan, 2007). Dodatni mehanizam indukcije apoptoze uočen je na humanim promijelocitičnim stanicama gdje je CTN stimulirao otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citoplazmu i aktivaciju

kaspaza-3, -6, -7 i -9, a prisutnost antioksidansa nije dovela do smanjenja citotoksičnosti (Yu i sur., 2006).

1.1.3. Izloženost ljudi citrininu

Sredinom prošlog stoljeća otkrivena je antibakterijska aktivnost CTN (Raistrick i Smith, 1941), no ubrzo je otkrivena i njegova toksičnosti za sisavce zbog čega CTN kao antibiotik nikad nije zaživio. Iako je njegova toksičnost poznata već desetljećima, proveden je mali broj istraživanja te i dalje nije moguće direktno donijeti procjenu izloženosti i unosa CTN u organizam (EFSA, 2012).

Najznačajniji način unosa je ingestija kontaminirane hrane od čega su najčešće žitarice (kukuruz, pšenica, raž, zob i riža) i hrana s prerađenim žitaricama o kojima je provedeno i najviše istraživanja. Kako su žitarice baza svakodnevne prehrane, u Hrvatskoj je provedeno istraživanje o prisutnosti CTN u pšenici i kukuruzu na području 4 županije. Od 55 analiziranih uzoraka, 35 je prikupljeno u 3 županije u kojima su zabilježeni slučajevi Balkanske endemske nefropatije, a 20 u županiji koja je služila kao kontrolna grupa. Ni u jednom uzorku iz kontrolne grupe nije detektiran CTN dok je 65,7% ostalih uzoraka bilo pozitivno uz najveću izmjerenu koncentraciju od 103 µg/kg. Autori su naglasili potrebu za analizom većeg broja uzoraka kako bi se stekla realnija predodžba unosa CTN i procjenio rizik za zdravlje ljude (Čulig i sur., 2017). Uz CTN, česta je istovremena prisutnost OTA koji također djeluje nefrotoksično. U Bugarskoj su 2 od 3 CTN-pozitivna uzorka žitarica (n=37) bila pozitivna na OTA, a uzorak s najvećom koncentracijom citrinina (420 µg/kg) i okratoksina A (39 µg/kg) bio je namjenjen za ljudsku upotrebu (Vrabcheva i sur., 2000). Ista kombinacija pronađena je u 18% uzorka žitarica za doručak (n=45) s koncentracijama CTN većih od OTA. 31 uzorak bio je kontaminiran OTA, a 20% njih sadržavao je koncentracije OTA iznad limita EU koji je 3 µg/kg (Molinié i sur., 2005).

Od voća su najviše ispitivane jabuke u kojima CTN dolazi u kombinaciji s PAT. U Hrvatskoj je ispitano 100 trulih jabuka od kojih je 19% bilo pozitivno na CTN u koncentracijama 50 – 240 µg/kg (Pepeljnjak i sur., 2002). Iste godine je Portugalu ispitana 351 jabuka s različitim veličinama smeđih trulih mrlja od kojih je 68,6% bilo kontaminirano s PAT. U 19,6% uzorka nađeni su CTN i PAT, a u 3,9% samo CTN. Izmjerene koncentracije CTN iznosile su od 320 do 920 µg/kg (Martins i sur., 2002).

CTN je pronađen u sokovima od voća i povrća, crnim maslinama, plijesnivim sirevima te ljekovitom bilju, a jedna studija je dokazala prisutnost CTN u mesu i jajima životinja koje su bile hranjene s kontaminiranom stočnom hranom (Abdelhamid i Dorra, 1990). Markov i sur. (2013) su s domaćih suhomesnatih proizvoda najčešće izolirali plijesni vrste *Penicillium* uz prisutnost CTN u 4,44% uzoraka.

Preparati s crvenom rižom na hrvatskom tržištu ispitani su u tri studije. Jedna nije utvrdila prisutnost CTN u ispitivanim kapsulama dok je u dvije studije CTN dokazan u ukupno 3/13 uzoraka u dopuštenim koncentracijama do 2 mg/kg (Mornar i sur., 2012; Mornar i sur., 2013; Nigović i sur., 2013).

Ukupnoj izloženosti mikotoksinu može pridonijeti inhalacija i transdermalni prijenos pogotovo ako se radi o zatvorenim prostorima s visokim postotkom vlage. Ispitivana je unutrašnjost zgrada s problemima s vlagom na 17 mikotoksina. CTN je nađen u 3 od 79 uzorka u koncentracijama od 20 do 35000 ng/g uz prisutnost ostalih mikotoksina (Tuomi i sur., 2000), ali zbog malo podataka još nije jasno kakvu opasnosti za zdravlje predstavlja takav način izloženosti.

1.2. STERIGMATOCISTIN

Sterigmatocistin (STC) je mikotoksin kojeg proizvodi više od 50 vrsta plijesni, a najčešće se radi o vrstama roda *Aspergillus* (EFSA, 2013). Supstrati kontaminirani vrstama *A. flavus* i *A. parasiticus* sadrže niže koncentracije STC jer se većina biotransformira u O-metilsterigmatocistin koji je direktan prekursor aflatoksina B1 i G1. Vrste *A. nidulans* i *A. versicolor* nemaju tu mogućnost što dovodi do viših koncentracija STC u produktima kontaminiranim tim plijensima (EFSA, 2013).

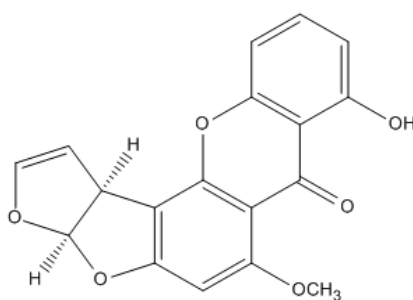
STC kontaminira žitarice i hranu s prerađenim žitaricama, ali se može pronaći i u zelenim zrnima kave, začinima, pivu i površini sira na kojoj se razvila plijesan tijekom neodgovarajućih uvjeta skladištenja. Vrsta *A. versicolor* često raste na tvrdim sirevima onečišćenim tijekom proizvodnje ili zrenja zbog čega je posebno kontaminiran površinski sloj. Količina STC naglo pada s porastom dubine uzorkovanja, a tek su male količine pronađene u jestivim dijelovima sira. STC je pokazao stabilnost na temperaturama od -18 do +16°C tijekom 3 mjeseca (van Egmond i sur., 1982).

Procesiranje hrane može do jedne mjere smanjiti koncentraciju STC ovisno o vrsti hrane i uvjetima procesiranja (EFSA, 2013).

1.2.1. Kemijska svojstva sterigmatocistina

STC je poliketidni mikotoksin, molarne mase 324,28 g/mol, a prema IUPAC-u glasi: ((3aR,12cS)-3a,12c-dihidro-8-hidroksi-6-metoksi-7H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-c]ksanten-7-on.

Strukturno je sličan aflatoksinu s kojim dijeli i biosintetski put. Kristalizira u obliku blijedo žutih igličastih kristala, a točka taljenja iznosi 245-246°C. Karakterizira ga i slaba fluorescencija (Versilovskis i De Saeger, 2010). Brzo se otapa u kloroformu u kojem je stabilan i nakon 30 dana na temperaturi od 4°C (Septien i sur., 1993). Slabo je topljiv u fosfatnom puferu pri različitim vrijednostima pH, makar je veću topljivost pokazao u kiselom pH, pogotovo pri pH 4,5 (Septien i sur., 1994).



Slika 4. Kemijska struktura STC.

1.2.2. Mehanizam toksičnosti sterigmatocistina

Prema IARC klasifikaciji, STC je uvršten u grupu 2B, odnosno smatra se potencijalnim karcinogenom za ljude. Na mjestu subkutane injekcije STC štakori su razvili sarkome dok je primjenom na kožu došlo do razvoja tumora kože i jetre. Nakon oralne administracije, miševi su razvili tumore pluća, a štakori tumore jetre (IARC, 1976).

Genotoksičnost STC povezana je s mogućnošću stvaranja DNA adukta koji povećavaju vjerojatnost nastanka ireverzibilne mutacije ukoliko ne dođe do njihova popravka (EFSA, 2013). Reaktivni egzo-epoksid nastaje metabolizmom STC različitim citokrom P450 enzimima u jetri i plućima. Perfuzijom jetra štakora STC otkriveno je o dozi ovisno vezanje STC na DNA (Essigmann i sur., 1979; Essigmann i sur., 1980) što je potvrđeno intraperitonealnom administracijom toksina 344 muškim Fischerovim štakorima. STC-DNA adukti nađeni su i do 105 dana nakon administracije kod štakora koji su primili najveće koncentracije STC (9 mg/kg tjelesne mase). Također je primijećeno da gubitak adukata iz DNA jetre prati trifazični profil: brzi gubitak u prvih 24 sata kojeg prati sporiji pad tijekom 1.

do 14. dana i na kraju ekstremno spori pad 14-105 dana nakon tretmana (Reddy i sur., 1985). Epoksidi AFB1 i STC tvore DNA adukte sličnog mutagenog potencijala s time da je STC pokazao četiri puta niži potencijal tvorbe takvih adukata od AFB1 (Raney i sur., 1992).

STC u kulturama stanica sisavca uzrokuje promjene u jezgri, potpuno blokira mitozu i inhibira ugradnju timidina u DNA i uridina u RNA (Engelbrecht i Altenkirk, 1972). Inhibitorni učinak na RNA sintezu potvrđen je *in vivo* u Wistar štakorima (n=21) kojima je intraperitonealno injektirano 50 mg STC/kg tjelesne mase što je dovelo do inhibicije ugradnje orotske kiseline u jetrenoj RNA (Nel i Pretorius, 1970).

Indukcija staničnog stresa ispitivana je na muškim Wistar albino štakorima (n=6) tako da su 30 dana hranjeni krmivom kontaminiranim s vrstom *A. versicolor*. Maksimalna podnošljiva doza STC bila je 0,2 mg/kg tjelesne mase zbog 50% smrtnosti kod grupa štakora hranjenih višim koncentracijama. U jetrenim mikrosomima značajno se povećala količina citokroma P450, citokroma b5 i njihovih reduktaza i proizvodnja ROS-a. Smanjila se količina glutaciona, askorbinske kiseline i alfa-tokoferola. Također se smanjila aktivnost katalaze dok se aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze povećala. Povećano stvaranje slobodnih radikala potrošilo je antioksidanse što je dovelo do povećane lipidne peroksidacije i posljedično oštećenja stanica (Sivakumar i sur., 2001). Na istom animalnom modelu ispitan je utjecaj kratkotrajne izloženosti STC te je dokazano da subletalne doze umjereno induciraju oksidativno oštećenje stanica. Štakorima je oralno administrirana po jedna doza STC različite koncentracije (10, 20 i 40 mg/kg tjelesne mase). U bubrezima se značajno povećala koncentracija malondialdehida (MDA) i SOD dok se u jetri značajno smanjila aktivnost glutation peroksidaze kod viših doza STC. U plazmi je primijećena povećana aktivnost katalaze pri najnižoj koncentraciji STC te o dozi ovisno povećanje MDA. Oksidativna oštećenja DNA pridonose značajnim DNA oštećenjima uzrokovanim STC s time da su bubrezi pokazali veću podložnost oksidativnom stresu od jetre (Rašić i sur., 2020).

Mnoge *in vitro* studije provedene su s visokim koncentracijama STC čime potencijalne opasnosti unosa niskih doza STC ostaju nedovoljno istražene.

1.2.3. Izloženost ljudi sterigmatocistinu

Kao i kod CTN, najviše studija provedeno je na žitaricama. Prve studije su ispitivale prisutnost STC tankoslojnom kromatografijom (TLC) te je većina uzoraka bila negativna, međutim treba uzeti u obzir da su LOD i LOQ metode bili visoki ($\geq 15 \mu\text{g/kg}$) ili nisu

zabilježeni (EFSA, 2013). Razvojem analitičkih tehnika poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), STC je pronađen u 17% neodgovarajuće skladištenih žitarica (pšenica, ječam i zob) (Scudamore i Hetmanski, 1995). Ni u jednom uzorku žitarica (n=122) i hrani s kukuruzom (n=128), skupljenih iz različitih prodajnih mjesta u Ujedinjenom Kraljevstvu nije pronađen toksin (MAFF, 1998). Korištenjem LC-MS/MS postignute su još niže LOD i LOQ metode čime je dokazana prisutnost STC u žitaricama (26%) i različitim vrstama kruha (17%) u rasponu koncentracija od 0,7 do 83 µg/kg. 4/5 kontaminiranih kruhova sadržavalo je cjelozrnate žitarice stoga su one mogući izvor STC (Versilovskis i sur., 2008; Versilovskis i Mikelsone, 2008).

U nedavnoj studiji u Europi ispitivana je prisutnost STC u žitaricama te je riža identificirana kao produkt s najvišom učestalosti kontaminacije (Mol i sur., 2015). Upravo zato je u Italiji provedeno istraživanje na neobrađenoj i procesiranoj riži. Svi uzorci neobrađene i smeđe riže bili su pozitivni na STC, kao i 90,9% uzoraka blanširane riže, dok je kontaminacija u bijeloj riži bila značajno manja zbog čega je ispitan utjecaj guljenja i poliranja na koncentraciju STC. Nakon guljenja, sadržaj STC u smeđoj riži smanjio se na 21,2–30,8%, a nakon poliranja do bijele riže na 2,2–8,3% početne koncentracije (Bertuzzi i sur., 2017).

Sirevi su proizvodi podložni rastu plijesni, a kako je *A. versicolor* njihov čest kontaminant, istraživana je pojavnost STC u sirevima. U dvije starije studije STC je detektiran u površinskom sloju ukupno 2,3% uzorka (Lafont i sur., 1979; Bartos i Matyas, 1982). Kasnija studija dokazala je prisutnost STC u 4/8 sireva proizvedenih u Latviji i 2/13 proizvedenih u Belgiji s koncentracijama između LOD metode (0,03 µg/kg) i 1,23 µg/kg (Versilovskis i sur., 2009).

Ispitivanja o prisutnosti STC u hrani koja ne sadrži žitarice su rijetka, ali se ponekad detektira u zelenim zrnima kave, začinima, orašastim plodovima i pivu (EFSA, 2013).

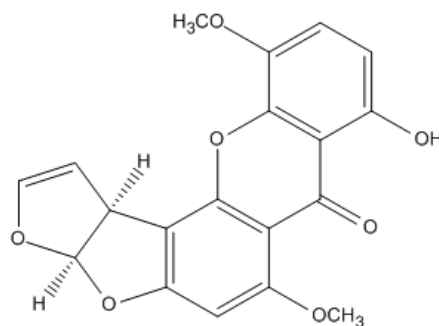
Procesiranje hrane može dovesti do smanjenja koncentracije STC, ali do koje mjere ovisi o tipu hrane i uvjetima procesiranja. Primjerice, pečenje kruha s pšenicom kontaminiranom STC na 200-220°C nije dovelo do statistički značajnog smanjenja njegove koncentracije dok je prženje zrna kave na 200°C 15 minuta smanjilo početnu koncentraciju za 70% (Bokhari i Aly, 2009; Versilovskis i Bartkevics, 2012).

Izloženosti STC može pridonijeti i inhalacija u zatvorenim prostorima. Istraživanja su ciljano provedena u zgradama s vidljivim rastom plijesni i/ili sa znakovima vlage i oštećenjima od

vode. U već navedenoj studiji sa zgradama s problemima s vlagom u Finskoj, STC je dokazan u 24% uzoraka u koncentraciji do 31 000 ng/g (Tuomi i sur., 2000). U građevinskom materijalu iz zgrada s oštećenjima od vode, STC je 3. najčešći prisutan mikotoksin (Bloom i sur., 2009). Prisutnost STC zabilježena je u prašini iz vlažnih i/ili plijesnivih tepiha, slegnutoj prašini iz poplavljenih kuća i prašini iz ventilacije (EFSA, 2013).

1.3. 5-METOKSISTERIGMATOCISTIN

5-metoksisterigmatocistin (5-MET-STC)(Slika 5.) izolirali su Holker i Kagal 1968. iz mutiranog soja *A. versicolor* proizvedenog iradijacijom spora divljeg soja. Proizvode ga vrste roda *Aspergillus* koje su i proizvođači STC kao što su *Aspergillus versicolor* i *Emericella nidulans* (Cabaret i sur., 2014). Kristalizira u obliku blijedo žutih igličastih kristala (Cai i sur., 2011) kao i STC od kojeg se razlikuje samo u metoksi skupini na poziciji 11.



Slika 5. Kemijska struktura 5-MET-STC.

Aspergili iz sekcije *Versicolores* mogu rasti na slabo hranjivim podlogama te su STC i 5-MET-STC pronađeni u svih 5 izolata navedene vrste čije su spore umjetno inokulirane na borovo drvo, tapete, gipsane ploče i ivericu (Nielsen i sur., 1998).

30-minutnom inkubacijom 5-MET-STC s humanim rekombinantnim CYP1A1 uz NADPH metabolizirano je 80% 5-MET-STC te su pronađena tri metabolita: M1 (hidroksinor-metoksisterigmatocistin), M2 (nor-MSter) i M3 (dihidroksi-MSter). Inkubacijom s humanim CYP1A2 metabolizirano je 20% 5-MET-STC uz nastanak metabolita M4 (monohidroksi-MSter). 5-MET-STC povisio je razinu CYP1A1 mRNA, a dugoročne posljedice ostaju nepoznate (Cabaret i sur., 2014).

Indirektan znak formacije reaktivnog metabolita STC je detekcija GSH metabolita u prisutnosti citosolnog GSH i GST što nije dokazano za 5-MET-STC i implicira odsustvo reaktivnog epoksidnog intermedijera (Cabaret i sur., 2010; Cabaret i sur., 2014).

Antitumorski potencijal 5-MET-STC povezan je s netaknutnim bisfuranovim prstenastim sistemom i dvostrukoj vezi u terminalnom furanskom prstenu. U nekim slučajevima antitumorska aktivnost je očuvana i nakon uvođenja substituenta u ksantonskom dijelu molekule (Essery i sur., 1976).

1.3.1. Mehanizam toksičnosti 5-metoksisterigmatocistina

Genotoksičnost STC, 5-MET-STC, VER A, 6-DEOKSI-VER A i VER B određena je mjerenjem oštećenja DNA na humanim stanicama adenokarcinoma pluća (A549). Svi testirani mikotoksini su pokazali statistički značajno povećanje stupnja oštećenja DNA u odnosu na kontrolu. Na istim stanicama je dokazana njihova citotoksičnost pri čemu je koncentracija koja smanjuje vijabilnost 50% stanica (IC_{50}) za 5-MET-STC iznosila 181 μM što je ujedno bila i najveća koncentracija od svih ispitanih mikotoksina i ukazala na manji toksični potencijal 5-MET-STC (Jakšić i sur., 2012).

Genotoksičan učinak STC i 5-MET-STC na pluća ispitan je na mužjakima štakora soja Wistar u koncentracijama koje se mogu prirodno pronaći u prašini vlažnih zatvorenih prostora. 24 sata nakon jednokratne intratrahealne instilacije štakora, mikotoksini, pojedinačno i u kombinaciji, značajno su povećali razinu jednolančanih lomova DNA. 5-MET-STC primijenjen u 10 puta većoj koncentraciji od STC izazvao je dvolančane lomove DNA značajnog intenziteta. Kombinacija mikotoksina izazvala je jednolančane i dvolančane lomove DNA manjeg intenziteta nego pojedinačni mikotoksini što upućuje na moguće antagonističko djelovanje (Ćurtović, 2019).

1.3.2. Izloženost ljudi 5-metoksisterigmatocistinu

O izloženosti ljudi ovom mikotoksinu ima vrlo malo dostupnih podataka. Među mikotoksinima detektiranim u plijesnima koje kontaminiraju zatvorene prostore zabilježena je prisutnost STC i njegovog derivata 5-MET-STC (Gravesen i sur., 1999).

Ispitivane su sezonske varijacije koncentracije aerogenih aspergila i sposobnost proizvodnje mikotoksina izoliranih sojeva iz kuća obnavljanih nakon poplava i kuća u kontrolnom selu. Sakupljeni uzorci plijesni u zraku i prašini analizirani su na mikotoksine aspergila. U prašini su, bez obzira na mjesto uzorkovanja, STC i 5-MET-STC bili dominantni metaboliti te je 5-

MET-STC bio podjednako zastupljen (50%) na obje lokacije, dok je STC detektiran u 70% uzoraka iz poplavljenih kuća, a u kontrolnim 50% (Šegvić Klarić i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nakon poplave koja je 2014. godine zadesila Gunju, u obnovljenim kućama utvrđena je kolonizacija zidova plijesnima što može predstavljati rizik za zdravlje zbog alergijskog potencijala aerogenih čestica plijesni kao i zbog mogućeg unosa mikotoksina inhalacijom. Mikološka analiza uzoraka plijesni iz zraka i prašine u obnovljenim kućama Gunje i Gornjem Stupniku (kontrolno selo) pokazala je dominaciju vrsta iz roda *Penicillium* te vrsta iz roda *Aspergillus* koje pripadaju sekciji *Versicolores*. Mikološka slika zraka i prašine odgovarala je nalazu mikotoksina u prašini (LC/MS) pri čemu su dominirali metaboliti *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta. Među mikotoksinima u prašini, STC i 5-MET-STC bili su dominantni metaboliti kako u kućama iz Gunje tako i u kontrolnom selu. STC je u detektiran u 70% uzoraka prašine u Gunji i 50% uzoraka prašine u Gornjem Stupniku dok je 5-MET-STC bio podjednako zastupljen (50%) na obje lokacije. Maksimalne koncentracije ovih toksina su bile 1,3 do 8 puta veće u Gunji negoli u Gornjem Stupniku (maksimum STC 0,59 µg/g, 5-MET-STC, 7,70 µg/g) (Šegvić Klarić i sur., 2018). Među sekundarnim metabolitima *Penicillium* vrstama u jednom uzorku prašine (Gunja) dokazan je CTN u koncentraciji 0,33 µg/g (neobjavljeni podaci). O pojavnosti CTN u prašini vlažnih prostora, odnosno inhalacijskom unosu CTN te njegovom toksičnom djelovanju na stanice u dišnom sustavu gotovo da nema podataka. S obzirom na do sada poznati toksični potencijal STC, 5-MET-STC i CTN postavljena je hipoteza da će STC, 5-MET-STC i CTN imati toksične učinke u plućnim stanicama te su postavljeni sljedeći ciljevi:

- odrediti IC_{50} pojedinačnih mikotoksina CTN, STC i 5-MET-STC u ljudskim stanicama adenokarcinoma pluća A549,
- istražiti prirodu interakcija binarnih kombinacija navedenih mikotoksina primjenom matematičkog modela za analizu indeksa kombinacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE KULTURE

Uzgoj i tretiranje stanica provodilo se unutar uređaja s laminarnim strujanjem zraka (engl. *Laminar flow hood*) sa sterilnom aparaturom na stanicama ljudskog adenokarcinoma pluća A549 (ATCC- American Type Culture Collection, Sjedinjene Američke Države).

Stanice su uzgojene u plastičnoj boci (75 cm^2 flask, Thermo Scientific™ Nunc™ Cell Culture Treated EasYFlasks™) za adhezivni uzgoj staničnih linija u RPMI mediju (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund Germany) uz dodatak 2 mM glutamina i toplinski inaktiviranog fetalnog telećeg seruma masenog udjela 10% (Sigma). U medij su dodani antibiotici penicilin ($c = 100\text{ IU/ml}$) i streptomycin ($\gamma = 100\text{ }\mu\text{g/ml}$) (Gibco, Invitrogen, Paisley) kako bi se spriječila bakterijska kontaminacija. Stanice su uzgajane u inkubatoru u uvjetima konstantne temperature ($+37^\circ\text{C}$), relativne vlažnosti (95%) i udjela ugljikovog dioksida (5%).

Kod presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS, $\text{pH}=7,4$) nakon čega se tretiraju otopinom tripsin-EDTA (0,25%) koja omogućava odvajanje stanice od podloge. Resuspendiranje stanica provodi se u svježem mediju nakon čega se tretiraju mikotoksinima.

3.2. TRETIRANJE STANICA MIKOTOKSINIMA

Stanice se resuspendiraju u RPMI mediju te se ukupni broj stanica po 1 mL suspenzije određuje pomoću hemocitometra. Stanična suspenzija se razrjeđuje s RPMI medijem do koncentracije 10^5 stanica/mL. U 96 jažica mikrotitarske pločice (Thermo Scientific Nunc 96-well plate) aplicira se po 100 μL stanične suspenzije, jedna jažica ostaje prazna kako bi kasnije poslužila kao slijepa proba u kojoj se nalazi samo RPMI medij i MTT reagens.

Stanice se inkubiraju 24 sata nakon čega se tretiraju mikotoksinima. Početna otopina CTN (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) koncentracije 0,01 mol/L dobivena je otapanjem CTN u 100% DMSO otapalu te su iz nje priređene razrijeđene otopine koncentracija u rasponu od 0,1 do 250 μM . Na isti način su priređene otopine STC i 5-MET-STC, ali u rasponu koncentracija od 0,1 do 150 μM . Uz otopine mikotoksina priređene su i kontrole DMSO otapala u različitim koncentracijama. Za CTN primijenjene su 4

koncentracije kontrole: K1 (0,02%); K2 (0,2%); K3 (0,5%) i K4 (0,83%), a za STC i 5-MET-STC primijenjeno je 5 koncentracija: K1 (0,02%); K2 (0,067%); K3 (0,2%); K4 (0,67%) i K5 (1%). Svaka otopina toksina iste koncentracije i otopina kontrole primijenjena je u 6-7 replikata. Nakon tretiranja mikotoksinima uslijedila je inkubacija od 24 sata.

Iz rezultata prvog dijela istraživanja izračunat je IC_{50} pojedinačnih mikotoksina. U drugom dijelu pokusa CTN i STC zajedno su aplicirani u jažice u omjeru njihovih IC_{50} : 1:1, 1:2 i 2:1 u koncentraciji od 1 μ M do 0,0001 μ M serijalnim deseterostrukim razrjeđivanjem u staničnom mediju. Kod omjera 1:1 primijenjene su i dodatne koncentracije od 3 μ M i serijalna deseterostruka razrjeđenja do koncentracije 0,0003 μ M. U istim omjerima IC_{50} i razrjeđenjima aplicirani su CTN i 5-MET-STC. Svaka otopina istog omjera mikotoksina i koncentracije primijenjena je u 6 replikata. Nakon tretiranja stanica kombinacijom mikotoksina uslijedila je inkubacija od 24 h.

3.3. MTT TEST

MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se procjenjuje metabolička aktivnost stanica te je korištena za ispitavanje citotoksičnog učinka pojedinačnih mikotoksina i njihovih kombinacija. Reagens se razrjeđuje staničnim medijem bez seruma kako bi njegova koncentracija bila 0,5 mg/ml te dodaje u jažice kojima je prethodno odsisan medij. Stanice se inkubiraju 3,5 sata. Vijabilne stanice reduciraju MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromid) žute boje u ljubičasto obojen formazan. Nastali formazan se akumulira kao netopljivi talog unutar stanica stoga se, prije mjerenja apsorbancije, otapa dodavanjem 150 μ L DMSO u svaku jažicu.

Koncentracija formazana proporcionalna je jačini apsorbancije na 540 nm koja se mjeri na spektrofotometru za mikrotitarske pločice s 96 jažica (PerkinElmer VictorX3). Što je veća $A(540)$, veća je koncentracija formazana, a time i broj vijabilnih stanica.

3.4. OBRADA PODATAKA

Za obradu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel, Microsoft Office 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD). Jedna jažica na svakoj mikrotitarskoj pločici korištena je kao slijepa proba te je sadržavala samo RPMI medij i MTT reagens. Srednja vrijednost apsorbancija dvije slijepa probe oduzeta je od svake $A(540)$ tretiranih i kontrolnih stanica

kako bi se zanemario udio apsorbanije RPMI medija i MTT reagensa. Rezultati vijabilnosti stanica izražavaju se u odnosu na kontrolu prema formuli:

vijabilnost stanica (%) = A (tretirane stanice) / A (kontrolne stanice) x 100%.

3.4.1. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je R (R Core Team, 2018) i paketi potrebni za modeliranje krivulja koncentracija-učinak (drc) i vizualizaciju (ggplot2) (Ritz i sur., 2015; Wickham, 2016). Rezultati dobiveni izračunom vijabilnosti stanica izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Citotoksične koncentracije CTN, STC, 5-MET-STC i njihovih kombinacija dobivene su interpolacijom na temelju nelinearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka te su izražene kao $\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$.

3.4.2. Indeks kombinacije i analiza izoblograma

Loeweov zakon aditivnosti omogućuje korištenje indeksa kombinacije za opisivanje prirode kombinacije mikotoksina:

$$\text{CI} = D_1/D_{E1} + D_2/D_{E2},$$

gdje su D_1 i D_2 doze mikotoksina M_1 i M_2 primijenjene u kombinaciji, D_{E1} i D_{E2} doze mikotoksina M_1 i M_2 primijenjenih pojedinačno, a CI indeks kombinacije. $\text{CI} < 1$ upućuje na sinergizam, $\text{CI} = 1$ na aditivnost, a $\text{CI} > 1$ na antagonizam.

Analiza izoblograma je grafički prikaz indeksa kombinacije za isti učinak različitih omjera dva mikotoksina gdje x i y-os predstavljaju dozu ili koncentraciju mikotoksina 1 odnosno mikotoksina 2. Izobola povezuje točke na x i y-osi koje predstavljaju doze potrebne za postizanje određenog učinka za pojedinačni mikotoksin. Ucertavanje točaka čije koordinate predstavljaju doze u kombinaciji koje postižu određeni učinak daje ideju o prirodi učinka kombinacije mikotoksina. Sve točke ispod izobole upućuju na sinergiju, one iznad na antagonizam dok točke na samoj izoboli na moguć aditivni učinak. Loeweov model je proširen korekcijom za neparalelne krivulje doza-učinak:

$$\text{CI} = (D_1/D_{E1})^{m_1/m_2} + D_2/D_{E2},$$

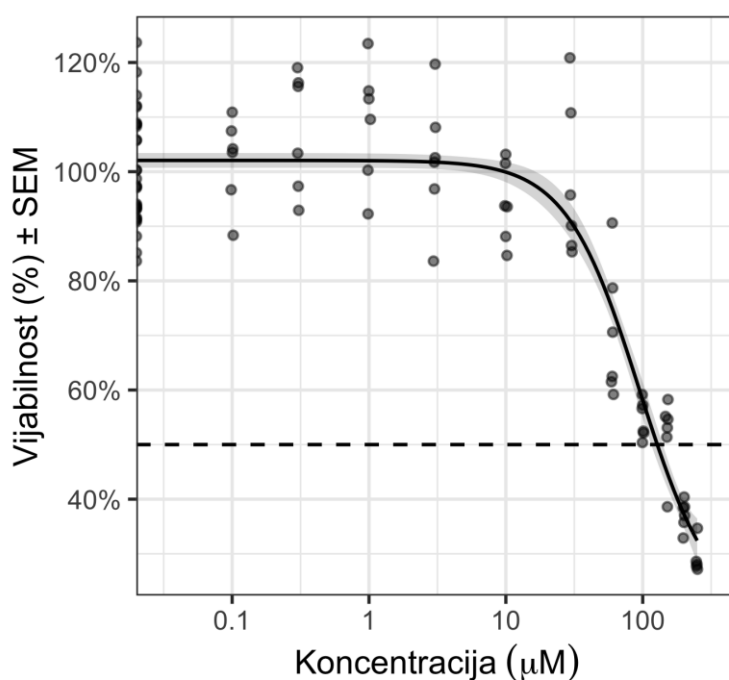
Gdje su m_1 i m_2 krivulje doza-učinak za mikotoksin 1 i 2, uz $m_1 < m_2$ (Anastasiadi i sur., 2018; Kifer i sur., 2020). Intervali pouzdanosti za indeks kombinacije određeni su primjenom

Monte Carlo simulacija (Kifer i sur., 2020; <https://www.sciencedirect.com/topics/computer-science/monte-carlo-simulation>).

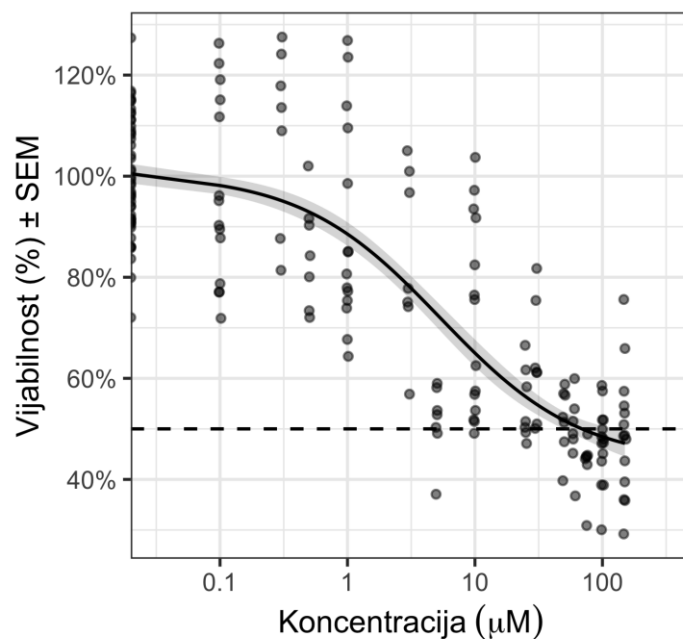
4. REZULTATI

4.1. CITOTOKSIČNOST POJEDINAČNIH MIKOTOKSINA ZA A549 STANICE

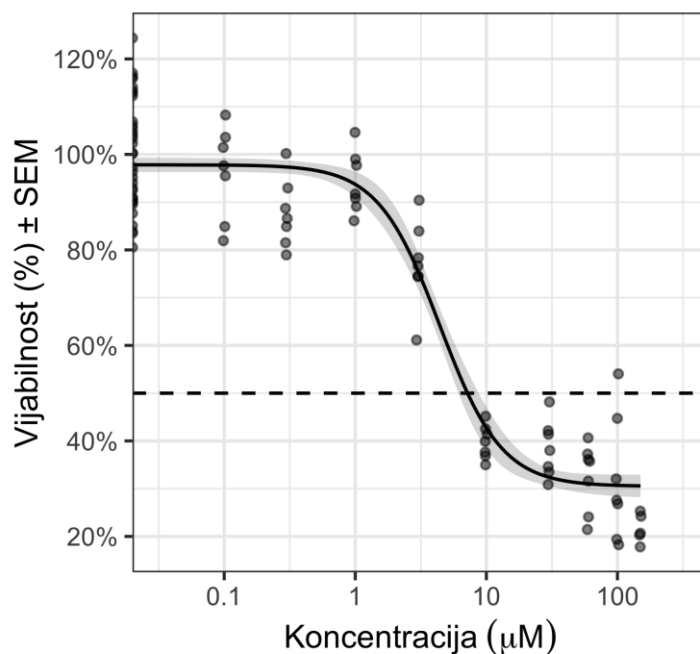
Utjecaj pojedinačnih mikotoksina (CTN, STC i 5-MET-STC) primijenjenih u različitim koncentracijama na vijabilnost stanica linija A549 prikazan je grafički, krivuljom nelinearne regresije s koncentracijama mikotoksina prikazanih na logaritamskoj skali (Slika 6., Slika 7., Slika 8.).



Slika 6. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji CTN pomoću krivulje nelinearne regresije. Graf prikazuje raspršenost vrijednosti stanične vijabilnosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine nakon 24-satne izloženosti različitim koncentracijama CTN.



Slika 7. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji STC pomoću krivulje nelinearne regresije. Graf prikazuje raspršenost vrijednosti stanične vijabilnosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine nakon 24-satne izloženosti različitim koncentracijama STC.



Slika 8. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji 5-MET-STC-a pomoću krivulje nelinearne regresije. Graf prikazuje raspršenost vrijednosti stanične

vijabilnosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine nakon 24-satne izloženosti različitim koncentracijama 5-MET-STC.

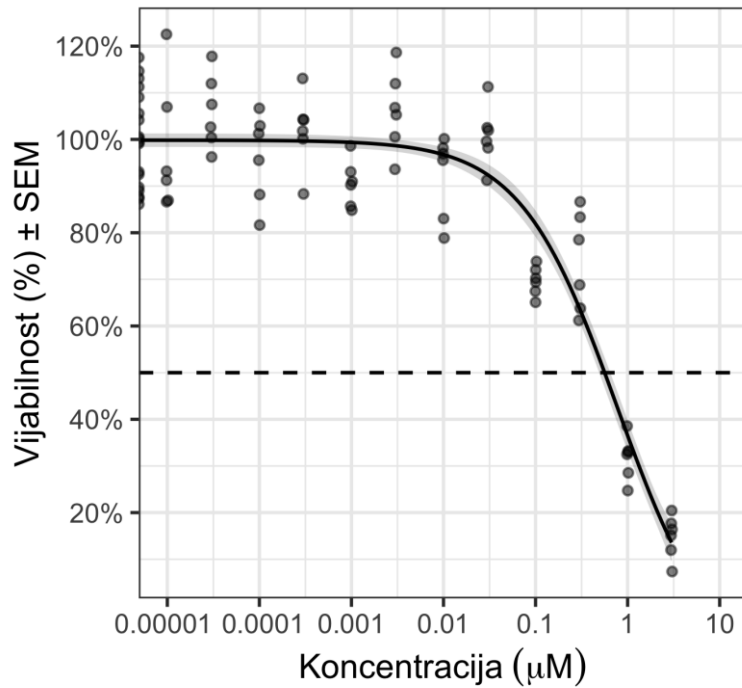
Koncentracije mikotoksina koje smanjuju vijabilnosti stanica linije A549 za 50% dobivene su iz krivulja nelinearne regresije te su prikazane u tablici (Tablica 1.). Dobiveni podaci upućuju na otprilike 8-18 puta veću citotoksičnost 5-MET-STC-a na ovu staničnu liniju nego STC i CTN.

Tablica 1. Vrijednosti IC_{50} (μM) \pm SEM za CTN, STC i 5-MET-STC dobivene iz krivulja nelinearne regresije.

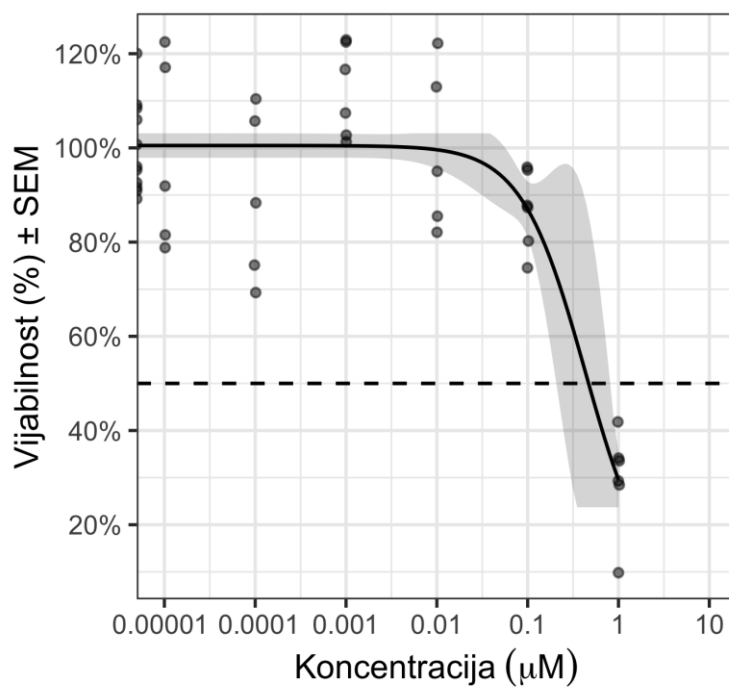
Mikotoksin	IC_{50} (μM) \pm SEM
CTN	127,7 \pm 1,5
STC	60,6 \pm 1,8
5-MET-STC	7,2 \pm 1,2

4.2. CITOTOKSIČNOST KOMBINACIJE CTN I STC ZA A549 STANICE

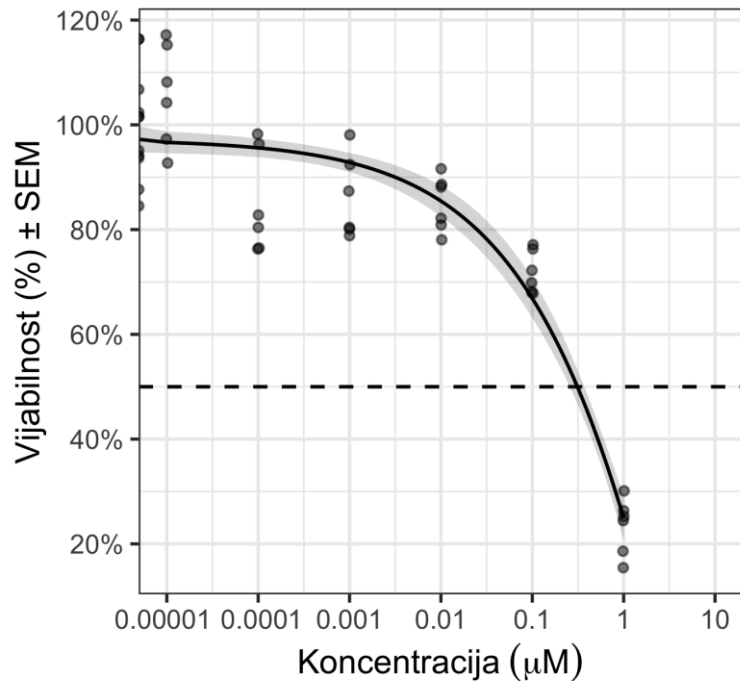
Citotoksičnost binarnih kombinacija na A549 stanice određena je MTT testom nakon 24-satne izloženosti stanica mikotoksinima. Učinak kombinacije CTN i STC na vijabilnost stanica u omjeru pojedinačnih IC_{50} 1:1, 1:2 i 2:1 i njihovim razrjeđenjima prikazan je grafički (Slika 9., Slika 10., Slika 11.).



Slika 9. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji kombinacije CTN+STC priređene u omjeru 1:1 pojedinačnih IC_{50} pomoću krivulje nelinearne regresije.



Slika 10. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji kombinacije CTN+STC priređene u omjeru 1:2 pojedinačnih IC_{50} pomoću krivulje nelinearne regresije.



Slika 11. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji kombinacije CTN+STC priređene u omjeru 2:1 pojedinačnih IC_{50} pomoću krivulje nelinearne regresije.

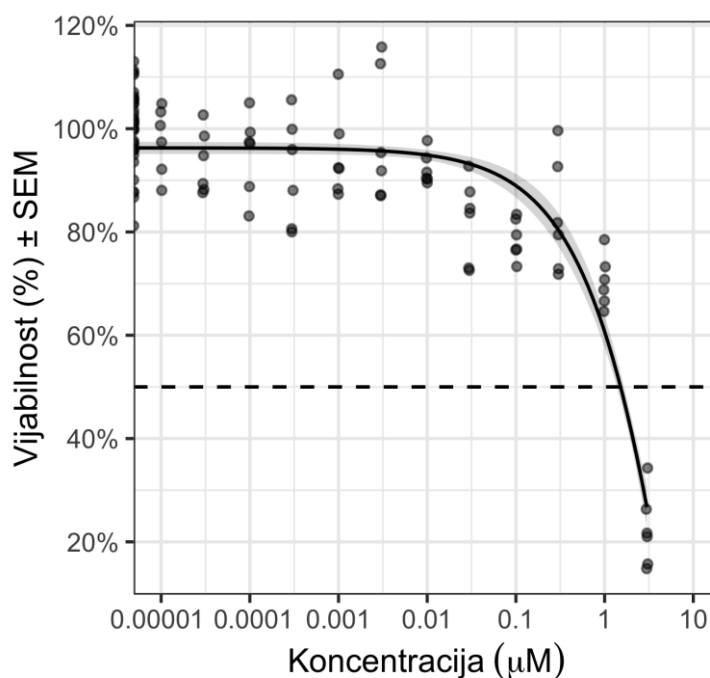
Iz krivulja nelinearne regresije dobivene su koncentracije kombinacije CTN+STC u različitim omjerima potrebnih za smanjenje vijabilnosti stanica za 50% što je prikazano u tablici (Tablica 2). Značajno niže vrijednosti IC_{50} kombinacije u usporedbi s pojedinačnim mikotoksinima pokazuju veći toksični potencijal kombinacije na A549 stanice.

Tablica 2. Inhibitorne koncentracije za 50% A549 stanica nakon 24-satne izloženosti binarnoj kombinaciji CTN+STC primijenjene u različitim omjerima pojedinačnih IC_{50} .

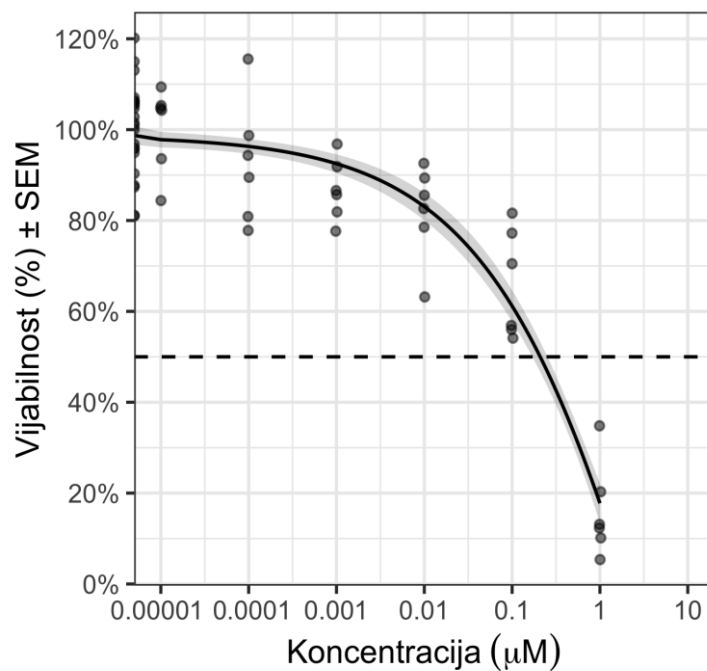
Omjer IC_{50} pojedinačnih mikotoksina	IC_{50} (μM) \pm SEM
CTN:STC=1:1	0,5 \pm 1,6
CTN:STC=1:2	0,4 \pm 58,8
CTN:STC=2:1	0,3 \pm 9,6

4.3. CITOTOKSIČNOST KOMBINACIJE CTN i 5-MET-STC ZA A549 STANICE

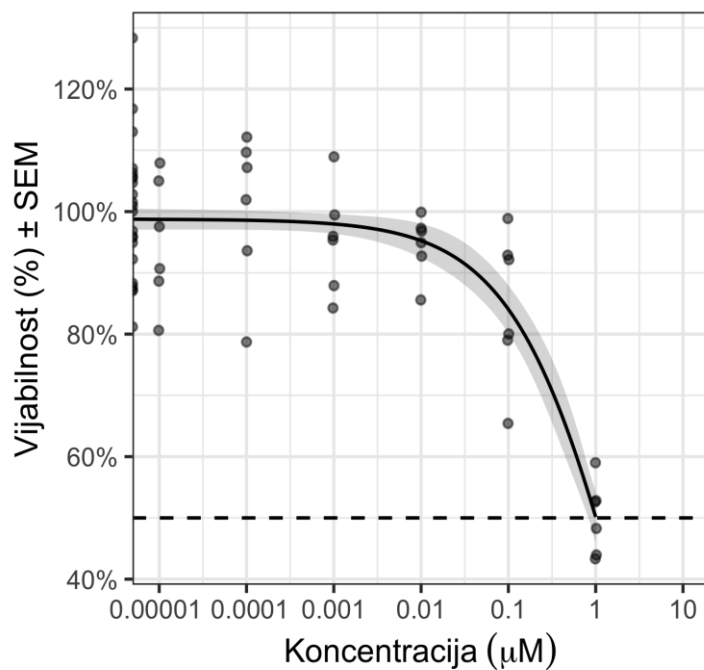
Citotoksičnost binarnih kombinacija na A549 stanice određena je MTT testom nakon 24-satne izloženosti stanica mikotoksinima. Učinak kombinacije CTN i 5-MET-STC na vijabilnost stanica u omjeru pojedinačnih IC₅₀ 1:1, 1:2 i 2:1 i njihovim razrjeđenjima prikazan je grafički (Slika 12., Slika 13., Slika 14.).



Slika 12. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji kombinacije CTN+5-MET-STC priređene u omjeru 1:1 pojedinačnih IC₅₀ pomoću krivulje nelinearne regresije.



Slika 13. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji kombinacije CTN+5-MET-STC priređene u omjeru 1:2 pojedinačnih IC_{50} pomoću krivulje nelinearne regresije.



Slika 14. Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji kombinacije CTN+5-MET-STC priređene u omjeru 2:1 pojedinačnih IC_{50} pomoću krivulje nelinearne regresije.

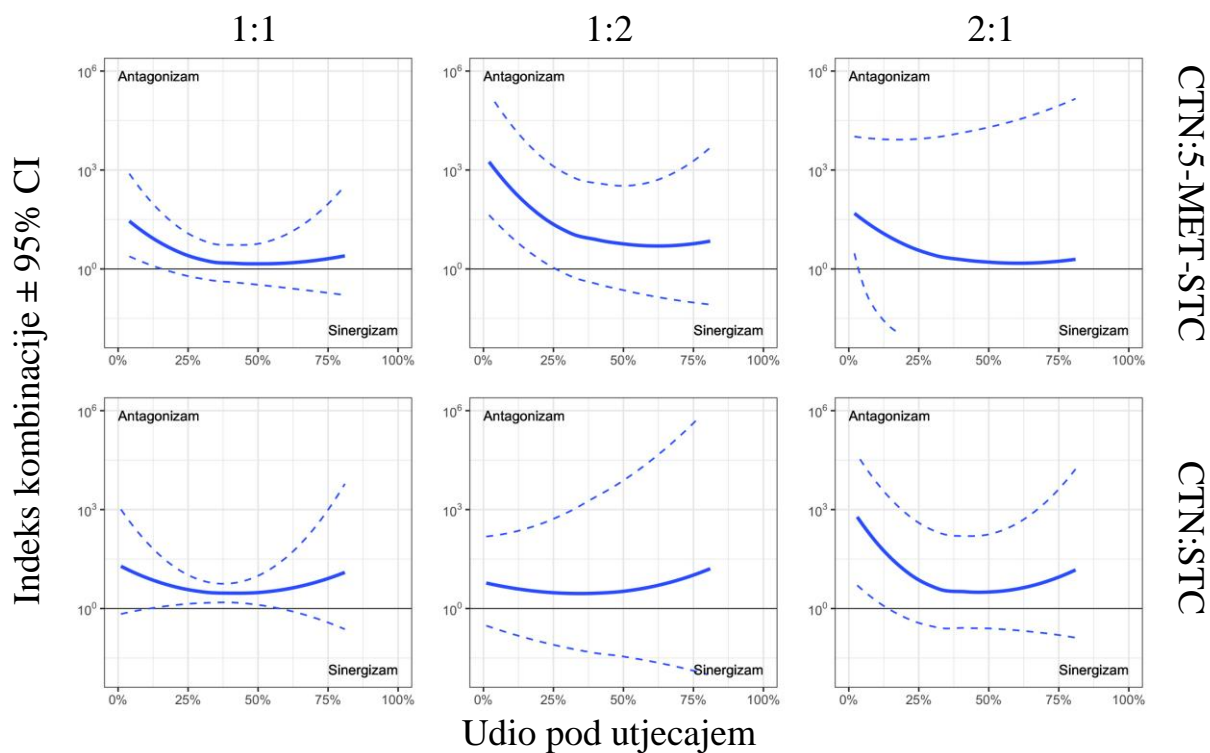
Iz krivulja nelinearne regresije dobivene su koncentracije kombinacije CTN+5-MET-STC u različitim omjerima potrebnih za smanjenje vijabilnosti stanica za 50% što je prikazano u tablici (Tablica 3). U usporedbi s IC₅₀ pojedinačnih mikotoksina, CTN+5-MET-STC pokazao je značajniji citotoksični potencijal. Najveća toksičnost ispitivanih kombinacija toksina zabilježena je za CTN+5-MET-STC u omjeru 1:2.

Tablica 3. Inhibitorne koncentracije za 50% A549 stanica nakon 24-satne izloženosti binarnoj kombinaciji CTN+5-MET-STC primijenjene u različitim omjerima pojedinačnih IC₅₀.

Omjer IC ₅₀ pojedinačnih mikotoksina	IC ₅₀ (μM) ± SEM
CTN:5-MET-STC=1:1	1,5 ± 2,1
CTN:5-MET-STC=1:2	0,2 ± 6,8
CTN:5-MET-STC=2:1	1,0 ± 111,1

4.4. INTERAKCIJE KOMBINACIJA MIKOTOKSINA

Interakcije kombinacija CTN+STC i CTN+5-MET-STC u omjerima 1:1, 1:2 i 2:1 na stanice linije A549 opisan je pomoću indeksa kombinacije i analize izobolograma (Slika 15.).



Slika 15. Prikaz dobivenih indeksa kombinacija uz 95%-tni interval pouzdanosti u ovisnosti o inhibitornim koncentracijama primijenjenih kombinacija mikotoksina.

Većina rezultata pokazuje aditivni učinak uz iznimku CTN+5-MET-STC i CTN+STC omjera 2:1 koji pokazuju antagonistički učinak na području do koncentracije IC₂₀ zahvaćenih stanica te CTN+STC omjera 1:1 u području koncentracija koje odgovaraju IC₂₅-IC₅₀.

5. RASPRAVA

Potencijalni učinak inhaliranih mikotoksina ispitivan je na stanicama plućnih fibroblasta mužjaka kineskog hrčka linije V79. Nakon 48-satne izloženosti mikotoksinima proveden je test unosa neutralno-crvene boje (NRU test) kako bi se ispitala vijabilnost stanica. Citotoksičnost je određena za 14 mikotoksina, uključujući i CTN čiji je IC_{50} iznosio $53 \pm 10 \mu M$ (Behm i sur., 2012). Slično provedena studija ispitivala je vijabilnost 24 i 48 sati nakon tretmana s CTN. IC_{50} iznosila je $70 \mu M$ nakon 24 sata, a $62 \mu M$ nakon 48 sati (Föllmann i sur., 2014). IC_{50} CTN u obje studije znatno je niža od dobivenih u ovom eksperimentu i upućuje na veću citotoksičnost CTN za V79 stanice. Na razliku u rezultatima utjecale su različite stanične linije, različite metode određivanja vijabilnosti te vrijeme izloženosti stanica CTN zbog čega se rezultati ne mogu direktno uspoređivati.

Istraživanje distribucije i raznolikosti vrsta *Aspergillus* sekcije *Versicolores* koje proizvode STC u zraku zatvorenih prostora uključivala je ispitivanje citotoksičnog potencijala izolata plijesni (Jakšić Despot i sur., 2016). Vijabilnosti A549 stanica ispitana je 24 sata nakon tretmana standardnom otopinom STC ili ekstraktom plijesni MTT testom. STC i većina ekstrakta pokazali su citotoksičnost za stanice uz raspon IC_{50} $2,7 - 7,2 \mu M$. Za STC IC_{50} iznosio je $4,2 \pm 0,5 \mu M$ što je otprilike 14 puta niža koncentracija od dobivene u ovom istraživanju, no nije jasno što je doprinijelo tako velikoj razlici među rezultatima.

Nakon što je utvrđeno da radnici nepušači koji se bave kompostiranjem, prilikom dugotrajne izloženosti visokim količinama spora plijesni, značajno gube funkciju pluća te imaju povećan rizik od razvoja kroničnog bronhitisa, Bünge i sur. proveli su studiju citotoksičnosti ekstrakata plijesni i mikotoksina. Ispitali su citotoksičnost ekstrakta plijesni prikupljenih sa kompostiranih biljaka i usporedili sa standardnim otopinama mikotoksina. Istraživanje se provelo na 4 stanične linije za koje se zna ili pretpostavlja da su mete toksičnih učinka mikotoksina. Vijabilnost stanica određena je NRU testom (engl. Neutral red uptake) 24 sata nakon tretmana, dok je ovdje korišten MTT test što može utjecati na razlike u rezultatima. IC_{50} STC za stanice A549 iznosila je $3,7 \mu M$ dok je za stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma linije HepG2 iznosila 80 puta više što je ukazalo na specifičnu osjetljivost A549 stanica na ovaj toksin. Svi ekstrakti plijesni uzrokovali su citotoksičnost na staničnim linijama čime je potvrđena hipoteza da mikotoksini mogu biti uzrok plućnih bolesti kod dugotrajne inhalacije prašine organskog podrijetla (Bünge i sur., 2004).

U studiji ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti 5-MET-STC i verzikolorina A i B na staničnoj liniji A549, stanice su bile izložene izolatima mikotoksina nakon čega je vijabilnost određena MTT testom. IC_{50} za izolirani 5-MET-STC iznosila je $181,0 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (Jakšić i sur., 2012). Primjenom standardizirane otopine 5-MET-STC u ovom eksperimentu dokazan je puno viši toksični potencijal nego što se prvotno mislilo.

Tri nova derivata STC, te otprije poznat 5-MET-STC, izolirani su iz plijesni *Aspergillus versicolor* pronađene u dubokom moru. Uz određivanje strukture novoizoliranih spojeva, ispitana je i njihova citotoksičnost za A549 stanice i stanice leukemijske linije HL-60. MTT testom određena je vijabilnosti HL-60 stanica 72 sata nakon tretmana izoliranim spojevima, a iz krivulje doza-činak izračunata je IC_{50} 5-MET-STC od $5,32 \mu\text{M}$. Iako je vrijednost IC_{50} bliska dobivenoj u ovom eksperimentu, korištenje različitih staničnih linija onemogućuje direktno uspoređivanje podataka. Također, vrijeme tretmana stanica je bilo 3 puta dulje nego u istraživanju, što doprinosi smanjenju vrijednosti IC_{50} . Za razliku od HL-60 stanica, A549 stanice bile su izložene derivatima STC 24 sata, kao i u ovom istraživanju, no umjesto MTT korišten je SRB test što je dovelo do razlike u rezultatima. IC_{50} izračunata je iz krivulje doza-činak i iznosila je $3,86 \mu\text{M}$ što potvrđuje visok toksični potencijal 5-MET-STC na A549 stanice. Od ispitivanih derivata jedino je 5-MET-STC pokazao citotoksičnost u obje stanične linije (Cai i sur., 2011).

Na stanicama ljudskog hepatocelularnog karcinoma Hep3B ispitivana je citotoksičnost i genotoksičnost 3 mikotoksina: CTN, OTA i STC, pojedinačno i u kombinaciji (Anninou i sur., 2014). Vijabilnost stanica određena je MTT testom 24 i 48 sati nakon tretmana mikotoksinima. Vrijednosti $IC_{50} \pm SD$ 24 sata nakon tretmana za CTN, OTA i STC iznosile su redom: $124 \pm 4,4$, $104 \pm 3,1$, $58 \pm 3,1 \mu\text{M}$, dok su vrijednosti nakon 48-satne izloženosti bile još i manje. Iako su vrijednosti IC_{50} CTN i STC iz studije vrlo slične dobivenim u ovom istraživanju, ispitivanja su se provodila na različitim staničnim linijama. Za opisivanje interakcija kombinacije mikotoksina na vijabilnost stanica korištena je aritmetička definicija aditivnosti u kojoj se uspoređuje izračunat i dobiven učinak kombinacije mikotoksina. Aditivnost znači da nema razlike između očekivanih i dobivenih vrijednosti, sinergizam da su dobivene vrijednosti značajno iznad očekivanih dok antagonizam predstavlja suprotni slučaj. Usprkos tome što je takav pristup u većini slučajeva netočan zbog toga što krivulja doza-činak nije linearna, i dalje se često primjenjuje za opisivanje interakcija mikotoksina (Kifer i sur., 2020). Interakcije kombinacije toksina kod citotoksičnih učinaka opisane su indeksom

kombinacije (CI). Kombinacije mikotoksina uglavnom su pokazale aditivni ili antagonistički citotoksični i genotoksični učinak na Hep3B stanice.

Na stanicama jajnika kineskog hrčka linije CHO-K1 ispitivana je citotoksičnost beauvericina (BEA), PAT i STC, pojedinačno i u kombinaciji. CHO-K1 stanice bile su izložene 24, 48 i 72 sata binarnim kombinacijama STC+PAT i STC+BEA u omjeru 5:1 i njihovim razrjeđenjima, a citotoksičnost je ispitana MTT testom. Za opisivanje interakcija kombinacija mikotoksina korišten CI-izobologram prema Chou-Talalay metodi. Nakon 24 sata IC_{50} za kombinaciju STC+PAT iznosila je $3,96 \pm 3,05 \mu\text{M}$ te je u usporedbi s IC_{50} samog STC, koja je iznosila $25,0 \pm 3,7 \mu\text{M}$, pokazala veću citotoksičnost. Navedena kombinacija pokazala je sinergizam pri niskim koncentracijama, praćena s aditivnim učincima pri višim što se može objasniti oksidativnim stresom kao mehanizmom njihove toksičnosti. Nakon 24 sata IC_{50} za STC+BEA iznosila je $2,25 \pm 2,39 \mu\text{M}$ te je u usporedbi sa samim STC također pokazana veća citotoksičnost. Kod 24-satne izloženosti stanica, STC+BEA pokazale su sinergistično djelovanje pri niskim koncentracijama i aditivno djelovanje pri višim koje se promijenilo u antagonističko prilikom dulje izloženosti (Zouaoui i sur., 2016).

Citotoksični učinak OTA i CTN ispitan je pojedinačno i u kombinaciji na ljudskim hepatokarcinogenim stanicama HepG2 nakon 24-satne inkubacije te je vijabilnost izmjerena MTT testom. OTA i CTN smanjivali su vijabilnost stanica ovisno o dozi te je IC_{50} za OTA iznosila $210 \mu\text{M}$, dok se CTN pokazao toksičnijim s IC_{50} $155 \mu\text{M}$. Kombinacije su priređene s 10-50% dobivenih IC_{50} za pojedinačne toksine. Za opisivanje interakcija korištena je aritmetička definicija aditivnosti. Primjena 20% pojedinačnih IC_{50} OTA+CTN (OTA $42 \mu\text{M}$ + CTN $31 \mu\text{M}$) izazvala je učinke slične onima pri IC_{50} pojedinačnih toksina. Zaključeno je da istodobna izloženost stanica OTA i CTN dovodi do povećane citotoksičnosti u odnosu na pojedinačne toksine te da testirane doze mikotoksina djeluju sinergistički u induciranju citotoksičnosti za HepG2 stanice (Gayathri i sur., 2015). Citotoksičnost iste kombinacije ispitana je na V79 stanicama. NRU test vijabilnosti primijenjen je 48 sati nakon izloženosti toksinima. Izabrane su koncentracije u rasponu od onih koje nisu pokazale citotoksičnost do onih koje su pokazale jaku citotoksičnost za stanice. Za OTA korištene su koncentracije u rasponu $3\text{-}20 \mu\text{M}$, a za CTN $1\text{-}100 \mu\text{M}$. Očekivana vrijednost vijabilnosti uspoređena je s dobivenim rezultatima te nije bilo značajne razlike što je dovelo do zaključka da OTA+CTN u visokim koncentracijama djeluju aditivno (Föllmann i sur., 2014). Različita kombinacija mikotoksina i primijenjenih koncentracija na različite stanične linije u odnosu na ovo

istraživanje ne daju mogućnost direktne usporedbe rezultata međutim kombinacije CTN+STC i CTN+5-MET-STC su pokazale značajniju toksičnost za A549 stanice, nego CTN+OTA za HepG2 i V79 stanice.

U dostupnoj literaturi nije pronađena nijedna studija citotoksičnosti kombinacije mikotoksina koja uključuje 5-MET-STC, iako je ovdje pokazao značajnu toksičnost za A549 stanice, pogotovo u kombinaciji s CTN što ukazuje na potencijalni rizik za zdravlje izloženih osoba.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih MTT testom citotoksičnosti na stanicama ljudskog adenokarcinoma pluća A549 tretiranih CTN, STC, 5-MET-STC, pojedinačno i u binarnim kombinacijama, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- koncentracija CTN koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 % iznosila je $IC_{50} = 127,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$,
- koncentracija STC koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 % iznosila je $IC_{50} = 60,6 \pm 1,8 \mu\text{M}$,
- koncentracija 5-MET-STC koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 % iznosila je $IC_{50} = 7,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$,
- koncentracije CTN+STC u omjerima 1:1, 1:2, 2:1 koje su smanjile vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 % iznosile su redom: $0,5 \pm 1,6 \mu\text{M}$, $0,4 \pm 58,8 \mu\text{M}$, $0,3 \pm 9,6 \mu\text{M}$,
- koncentracije CTN+5-MET-STC u omjerima 1:1, 1:2, 2:1 koje su smanjile vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 % iznosile su redom: $1,5 \pm 2,1 \mu\text{M}$, $0,2 \pm 6,8 \mu\text{M}$, $1,0 \pm 111,1 \mu\text{M}$,
- primijenjene binarne kombinacije mikotoksina pokazuju aditivnost uz iznimku CTN+5-MET-STC i CTN+STC omjera 2:1 koji pokazuju antagonistički učinak pri niskim koncentracijama i CTN+STC omjera 1:1 u području IC_{25} - IC_{50} .

7. LITERATURA

Abdelhamid AM, Dorra TM. Study on effects of feeding hens on separate mycotoxins (aflatoxins, patulin, or citrinin)-contaminated diets on the egg quality and tissue constituents. *Arch Tierernah*, 1990, 40, 305-316.

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, 455-463.

Anastasiadi M, Polizzi K, Lambert RJW. An improved model for the analysis of combined antimicrobials: a replacement for the Chou–Talalay combination index method. *J Appl Microbiol*, 2018, 124, 97–107.

Anninou N, Chatzaki E, Papachristou F, Pitiakoudis M, Simopoulos C. Mycotoxins' activity at toxic and sub-toxic concentrations: differential cytotoxic and genotoxic effects of single and combined administration of sterigmatocystin, ochratoxin A and citrinin on the hepatocellular cancer cell line Hep3B. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11, 1855-1872.

Bartos J, Matyas Z. Study of cheeses for the presence of sterigmatocystin. *Vet Med (Praha)*, 1982, 27, 747-752.

Behm C, Föllmann W, Degen GH. Cytotoxic potency of mycotoxins in cultures of V79 lung fibroblast cells. *J Toxicol Environ Heal Part A*, 2012, 75, 1226–1231.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497–516.

Bertuzzi T, Romani M, Rastelli S, Mulazzi A, Pietri A. Sterigmatocystin occurrence in paddy and processed rice produced in Italy in the years 2014-2015 and distribution in milled rice fractions. *Toxins*, 2017, 9, 86.

Bloom E, Nyman E, Must A, Pehrson C, Larsson L. Molds and mycotoxins in indoor environments--a survey in water-damaged buildings. *J Occup Environ Hyg*, 2009, 6, 671-678.

Bokhari F, Aly M. Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Advances in Biological Res*, 2009, 3, 71-78.

Bünger J, Westphal G, Mönnich A, Hinnendahl B, Hallier E, Müller M. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, 2004, 202, 199–211.

- Cabaret O, Puel O, Botterel F, Delaforge M, Bretagne S. Metabolic detoxification pathways for 5-methoxy-sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Xenobiotica*, 2014, 44, 1-9.
- Cabaret O, Puel O, Botterel F, Pean M, Khoufache K, Costa JM, Delaforge M, Bretagne S. Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23, 1673–1681.
- Cai S, Zhu T, Du L, Zhao B, Li D, Gu Q. Sterigmatocystins from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *J Antibiot*, 2011, 64, 193–196.
- Chagas GM, Klüppel ML, Campello AP, Buchi DF, de Oliveira MB. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. *Cell Struct Funct*, 1994, 19, 103-108.
- Chagas GM, Olivera MA, Campello AP, Klüppel ML. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca²⁺ transport. *Cell Biochem Funct*, 1995, 13, 53–59.
- Chan WH, Shiao NH. Effect of citrinin on mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Toxicol*, 2007, 24, 120-125.
- 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.
- Ciegler A, Vesonder RF, Jackson LK. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33, 1004-1006.
- Čulig B, Bevardi M, Bošnjir J, Serdar S, Lasić D, Racz A, Galić A, Kuharić Ž. Presence of citrinin in grains and its possible health effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017, 14, 22-30.
- Ćurtović I. Genotoksično djelovanje sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina u plućima štakora soja Wistar. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
- Despot DJ, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Klarić MŠ. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296–304.
- Đurović I, Šegvić Klarić M. Citrinin u dodacima prehrani na bazi crvene riže – potencijalni rizik za zdravlje ljudi. *Farm Glas*, 2015, 71, 701-709.

Engelbrecht JC, Altenkirk B. Comparison of some biological effects of sterigmatocystin and aflatoxin analogues on primary cell cultures. *J Natl Cancer Inst*, 1972, 48, 1647-1655.

Essery JM, O'Herron FA, McGregor DN, Bradner WT. Preparation and antitumor activities of some derivatives of 5-methoxysterigmatocystin. *J Med Chem*, 1976, 19, 1339-42.

Essigmann JM, Barker LJ, Fowler KW, Francisco MA, Reinhold VN, Wogan GN. Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci of the USA*, 1979, 76, 179-183.

Essigmann JM, Donahue PR, Story DL, Wogan GN, Brunengraber H. Use of the isolated perfused rat liver to study carcinogen-DNA adduct formation from aflatoxin B1 and sterigmatocystin. *Cancer Res*, 1980, 40, 4085-4091.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J*, 2012, 10, 2605.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J*, 2013, 11.

Föllmann W, Behm C, Degen GH. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A *in vitro*. *Arch Toxicol*, 2014, 88, 1097–1107.

Franco CM, Fente CA, Vazquez B, Cepeda A, Lallaoui L, Prognon P, Mahuzier G. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography--fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *J Chromatogr A*, 1996, 723, 69-75.

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

Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect*, 1999, 107, 505–508.

Holker JSE, Kagal SA. 5-methoxysterigmatocystin, a metabolite from a mutant strain of *Aspergillus versicolor*. *Chem Commun*, 1968, 1574.

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Citrinin. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. *IARC Press*, 1986, 40, 66-77.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances. *IARC Press*, 1976, 10, 245.

Iwahashi H, Kitagawa E, Suzuki Y, Ueda Y, Ishizawa YH, Nobumasa H, Kuboki Y, Hosoda H, Iwahashi Y. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. *BMC Genomics*, 2007, 8, 95.

Jakšić D, Puel O, Canlet C, Kopjar N, Kosalec I, Klarić MS. Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5- methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Arch Toxicol*, 2012, 86, 1583–1591.

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, 103-112.

Kifer D, Jakšić D, Šegvić Klarić M. Assessing the effect of mycotoxin combinations: Which mathematical model is (the most) appropriate? *Toxins*, 2020, 12, 153.

Klarić MŠ, Jakšić D, Kocsubé S, Kifer D, Sulyok M, Jelić D, Šarkanj B. Post-flood indoor occurrence of toxigenic *Aspergilli* from the *Versicolores* clade: is it dangerous? *Revista Română de Medicină de Laborator*, 2018, 26, 12.

Lafont P, Siriwardana MG, Lafont J. Contamination of cheeses by mycotoxins. *Médecine et Nutrition*, 1979, 15, 257-262.

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

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK). Survey of sterigmatocystin in cheese, cereals and maize-based retail products. *Food Surveillance Information Sheet no. 162*, 1998.

- Markov K, Pleadin J, Bevardi M, Vahčić N, Sokolić-Mihalak D, Frece J. Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 2013, 34, 312–317.
- Martins ML, Gimeno A, Martins HM, Bernardo F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit and Contam*, 2002, 19, 568-574.
- Mol, HG, Mac Donald S, Anagnostopoulos C, Spanjer M, Pietri A. Survey on sterigmatocystin in food. *EFSA Supporting Publ*, 2015, 12.
- Molinié A, Faucet V, Castegnaro P, Pfohl-Leskowicz A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B-1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem*, 2005, 92, 391-400.
- Monte Carlo Simulation, 2020., <https://www.sciencedirect.com/topics/computer-science/monte-carlo-simulation>, pristupljeno 05.06.2020.
- Mornar A, Nigović B, Sertić M. Identifikacija monakolina i citrinina u crvenoj fermentiranoj riži primjenom LC/MS/MS tehnike. *Farm Glas*, 2012, 68, 243–253.
- Mornar A, Sertić M, Nigović B. Development of a rapid LC/DAD/FLD/MSn method for the simultaneous determination of monacolins and citrinin in red fermented rice products. *J Agric Food Chem*, 2013, 61, 1072–1080.
- Nel W, Pretorius HE. Effect of sterigmatocystin on rat liver nuclear RNA. *Biochem Pharmacol*, 1970, 19, 957-959.
- Nielsen KF, Thrane U, Larsen TO, Nielsen PA, Gravesen S. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *Int Biodeterior Biodegradation*, 1998, 42, 9-16.
- Nigović B, Sertić M, Mornar A. Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem*, 2013, 138, 531–538.
- Pepeljnjak S, Šegvić M, Ozegovic L. Citrininotoxicity of *Penicillium* spp. isolated from decaying apples. *Braz J Microbiol*, 2002, 33, 134-137.
- Peraica M, Domijan AM. Mikotoksini i zdravlje ljudi. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 2006, 2(7).

Poupko R, Luz Z and Destro R. Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions. *J Phys Chem A*, 1997, 101, 5097-5102.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, 2018, <https://www.R-project.org/>.

Raistrick H, Smith G. Anti-bacterial substances from moulds. Part I. Citrinin, a metabolic product of *Penicillium citrinum* Thom. *Chemistry and Industry*, 1941, 60, 828-830.

Raney KD, Shimada T, Kim DH, Groopman JD, Harris TM, Guengerich FP. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: Significance of aflatoxin Q1 as a detoxication product of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol*, 1992, 5, 202-210.

Rašić D, Jakšić D, Hulina Tomašković A, Kifer D, Kopjar N, Rumora L, Želježić D, Peraica M, Šegvić Klarić M. Sterigmatocystin moderately induces oxidative stress in male Wistar rats after short-term oral treatment. *Mycotoxin Res*, 2020, 36, 181-191.

Reddy MV, Irvin TR, Randerath K. Formation and persistence of sterigmatocystin DNA adducts in rat-liver determined via P-32-postlabeling analysis. *Mutat Res*, 1985, 152, 85-96.

Ribeiro SM, Chagas GM, Campello AP, Kluppel ML. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem Funct*, 1997, 15, 203-209.

Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 2015, 10.

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

Septien I, Blanco JL, Suarez G, Cutuli MT. Solubility and stability of sterigmatocystin in aqueous solutions. *Mycotoxin Res*, 1994, 10, 15-20.

Septien I, Cutuli MT, Garcia ME, Suarez G, Blanco JL. Solubility and stability of sterigmatocystin in different organic solvents. *Toxicon*, 1993, 31, 1337-1340.

Sivakumar V, Thanislass J, Niranjali S, Devaraj H. Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. *Hum Exp Toxicol*, 2001, 20, 398-403.

Šegvić Klarić M, Želježić D, Rumora L, Peraica M, Pepeljnjak S, Domijan AM. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells

induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. *Arch Toxicol*, 2012, 86, 97-107.

Trivedi AB, Hirota M, Doi E and Kitabatake N. Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1993, 18, 2167-2171.

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

van Egmond H, Paulsch W, Northolt M. Distribution and stability of sterigmatocystin in hard cheese. Proceedings of the 4th Meeting on Mycotoxins in Animal Disease, Weybridge, 1982, 87-89.

Versilovskis A, Bartkevics V, Mikelsons V. Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chem*, 2008, 109, 243-248.

Versilovskis A, Bartkevics V. Stability of sterigmatocystin during the bread making process and its occurrence in bread from the Latvian market. *Mycotoxin Res*, 2012, 28, 123-129,

Versilovskis A, De Saeger S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136-147.

Versilovskis A, Mikelsons V. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. Proceedings of the 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology, Jelgava, 2008, 156-160.

Versilovskis A, Van Peteghem C, De Saeger S. Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A*, 2009, 26, 127-133.

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

Wasternack C, Weisser J. Inhibition of RNA- and DNA-synthesis by citrinin and its effects on DNA precursor-metabolism in V79-E cells. *Comp Biochem Physiol B*, 1992, 101, 225-230.

Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

Xu BJ, Jia XQ, Gu LJ and Sung CK, 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17, 271-285.

Yoneyama M, Sharma RP. Biochemical alterations induced by citrinin in cultured kidney epithelial cell systems. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1987, 16, 765-770.

Yu FY, Liao YC, Chang CH, Liu BH. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol Lett*, 2006, 161, 143-151.

Zouaoui N, Mallebrera B, Berrada H, Abid-Essefi S, Bacha H, Ruiz MJ. Cytotoxic effects induced by patulin, sterigmatocystin and beauvericin on CHO-K1 cells. *Food Chem Toxicol*, 2016, 89, 92-103.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji predstavljaju rizik za zdravlje ljudi i životinja uzrokujući mikotoksikoze. Iako se mikotoksini češće povezuju s kontaminiranom hranom ne smije se zanemariti izloženost preko respiratornog sustava. Kronična izloženost može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema, uključujući rak i imunodeficijencije.

Citrinin (CTN) se najčešće pronalazi na žitaricama na kojima je provedeno i najviše istraživanja. Poznat je po kontaminaciji pripravaka crvene riže koja služi kao alternativna terapija hiperlipidemije. Spada u nefrotoksične mikotoksine i 3. skupinu kancerogenih spojeva prema IARC (International Agency for Research on Cancer) klasifikaciji. Sterigmatocistin (STC) je klasificiran kao karcinogen 2B skupine (IARC), a kao sekundarni metabolit *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Versicolores* nalazi se u prašini vlažnih zatvorenih prostora gdje je detektiran zajedno sa svojim derivatom, 5-metoksisterigmatocistinom (5-MET-STC). Sva tri mikotoksina detektirana su u prašini poplavljenih kuća u Gunji. Cilj ovog rada bio je odrediti citotoksične koncentracije CTN, STC, 5-MET-STC te njihovih kombinacija na ljudske stanice adenokarcinoma pluća A549. Za određivanje vijabilnosti stanica 24 sata nakon izloženosti mikotoksinima korišten je MTT test.

Koncentracije CTN, STC i 5-MET-STC koje su smanjile vijabilnost A549 stanica za 50 % iznosile se redom: $127,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$, $60,6 \pm 1,8 \mu\text{M}$, $7,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$. 5-MET-STC pokazao se najtoksičnijim mikotoksinom od ispitivanih.

Kombinacije mikotoksina priređene su u omjerima 1:1, 1:2 i 2:1 pojedinačnih IC_{50} . IC_{50} CTN+STC iznosile su $0,3 - 0,5 \mu\text{M}$, a za CTN+5-MET-STC $0,2 - 1,5 \mu\text{M}$. Kombinacije mikotoksina pokazale su veću citotoksičnost od pojedinačnih.

Citotoksične interacije binarnih kombinacija mikotoksina opisane su CI-izobologramom s korekcijom za neparalelne krivulje doza-učinak. Binarne kombinacije pokazale su većinom aditivan učinak. Iznimku su predstavljali CTN+5-MET-STC i CTN+STC omjera 2:1 pri niskim koncentracijama i CTN+STC omjera 1:1 u području IC_{25} - IC_{50} koji su pokazali antagonistički učinak.

8.2. SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds that represent a health risk for people and animals because they cause mycotoxicosis. Although they are often connected to the contaminated food, exposure through respiratory system should not be dismissed. Chronic exposure can lead to serious health risks, including cancer and immunodeficiency.

Citrinin (CTN) is often found on grains on which most of the research is done. It is known for its contamination of red rice which is used as alternative therapy for hyperlipidemia. It is a nephrotoxic mycotoxin and classified as group 3 carcinogen according to IARC classification (International Agency for Research on Cancer classification). Sterigmatocystin (STC) is classified as group 2B carcinogen (IARC) and as the secondary metabolite of *Aspergillus* species from *Versicolores* section it has been detected in the dust of damp indoor spaces with its derivate, 5-methoxysterigmatocystin (5-MET-STC). All three mycotoxins were detected in the dust of flooded houses in Gunja. The aim of this study was to determine cytotoxic concentrations of CTN, STC, 5-MET-STC and its combinations in human adenocarcinoma cells A549. The MTT assay was performed to measure the viability of cells after 24 h treatment.

Concentrations of CTN, STC and 5-MET-STC that lowered the viability of treated A549 cells to 50% were: $127.7 \pm 1.5 \mu\text{M}$, $60.6 \pm 1.8 \mu\text{M}$, $7.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$, respectively. 5-MET-STC turned out to be more toxic than other mycotoxins.

Mycotoxin combinations were prepared in 1:1, 1:2 and 2:1 of IC_{50} concentration ratios. IC_{50} of CTN+STC ranged from 0.3 to 0.5 μM and for CTN+5-MET-STC from 0,2 to 1.5 μM . Combinations of mycotoxins showed more cytotoxicity than single mycotoxins.

Cytotoxic interactions of binary combinations were described by applying CI-isobologram with correction for unparallelled dose-response curves. Binary combinations showed mostly additive effect. The exceptions were CTN+5-MET-STC and 2:1 CTN+STC in low affected areas and 1:1 CTN+STC between IC_{25} - IC_{50} which showed antagonistic effect.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

CITOTOKSIČNOST CITRININA, STERIGMATOCISTINA I 5-METOKSISTERIGMATOCISTINA ZA LJUDSKE STANICE PLUĆA

Ines Šagud

SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji predstavljaju rizik za zdravlje ljudi i životinja uzrokujući mikotoksikoze. Iako se mikotoksini češće povezuju s kontaminiranom hranom ne smije se zanemariti izloženost preko respiratornog sustava. Kronična izloženost može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema, uključujući rak i imunodeficijencije. Citrinin (CTN) se najčešće pronalazi na žitaricama na kojima je provedeno i najviše istraživanja. Poznat je po kontaminaciji pripravaka crvene riže koja služi kao alternativna terapija hiperlipidemije. Spada u nefrotoksične mikotoksine i 3. skupinu kancerogenih spojeva prema IARC (International Agency for Research on Cancer) klasifikaciji. Sterigmatocistin (STC) je klasificiran kao karcinogen 2B skupine (IARC), a kao sekundarni metabolit *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Versicolores* nalazi se u prašini vlažnih zatvorenih prostora gdje je detektiran zajedno sa svojim derivatom, 5-metoksisterigmatocistinom (5-MET-STC). Sva tri mikotoksina detektirana u prašini poplavljenih kuća u Gunji. Cilj ovog rada bio je odrediti citotoksične koncentracije CTN, STC, 5-MET-STC te njihovih kombinacija na ljudske stanice adenokarcinoma pluća A549. Za određivanje vijabilnosti stanica 24 sata nakon izloženosti mikotoksинима korišten je MTT test. Koncentracije CTN, STC i 5-MET-STC koje su smanjile vijabilnost A549 stanica za 50 % iznosile se redom: $127,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$, $60,6 \pm 1,8 \mu\text{M}$, $7,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$. 5-MET-STC pokazao se najtoksičnijim mikotoksinom od ispitivanih. Kombinacije mikotoksina priređene su u omjerima 1:1, 1:2 i 2:1 pojedinačnih IC_{50} . IC_{50} CTN+STC iznosile su $0,3 - 0,5 \mu\text{M}$, a za CTN+5-MET-STC $0,2 - 1,5 \mu\text{M}$. Kombinacije mikotoksina pokazale su veću citotoksičnost od pojedinačnih. Citotoksične interakcije binarnih kombinacija mikotoksina opisane su CI-izobologramom s korekcijom za neparalelne krivulje doza-činak. Binarne kombinacije pokazale su većinom aditivan učinak. Iznimku su predstavljali CTN+5-MET-STC i CTN+STC omjera 2:1 pri niskim koncentracijama i CTN+STC omjera 1:1 u području IC_{25} - IC_{50} koji su pokazali antagonistički učinak.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 15 grafičkih prikaza, 3 tablice i 84 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: mikotoksini, citrinin, sterigmatocistin, 5-metoksisterigmatocistin, stanice pluća, citotoksičnost

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Daniela Jakšić, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CYTOTOXICITY OF CITRININ, STERIGMATOCYSTIN AND 5-METHOXYSTERIGMATOCYSTIN TO HUMAN LUNG CELLS

Ines Šagud

SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds that represent a health risk for people and animals because they cause mycotoxicosis. Although they are often connected to the contaminated food, exposure through respiratory system should not be dismissed. Chronic exposure can lead to serious health risks, including cancer and immunodeficiency. Citrinin (CTN) is often found on grains on which most of the research is done. It is known for its contamination of red rice which is used as alternative therapy for hyperlipidemia. It is a nephrotoxic mycotoxin and classified as group 3 carcinogen according to IARC classification (International Agency for Research on Cancer classification). Sterigmatocystin (STC) is classified as group 2B carcinogen (IARC) and as the secondary metabolite of *Aspergillus* species from *Versicolores* section it has been detected in the dust of damp indoor spaces with its derivate, 5-methoxysterigmatocystin (5-MET-STC). All three mycotoxins were detected in dust of flooded houses in Gunja. The aim of this study was to determine cytotoxic concentrations of CTN, STC, 5-MET-STC and its combinations in human adenocarcinoma cells A549. The MTT assay was performed to measure the viability of cells after 24 h treatment. Concentrations of CTN, STC and 5-MET-STC that lowered the viability of treated A549 cells to 50% were: $127.7 \pm 1.5 \mu\text{M}$, $60.6 \pm 1.8 \mu\text{M}$, $7.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$, respectively. 5-MET-STC turned out to be more toxic than other mycotoxins. Mycotoxin combinations were prepared in 1:1, 1:2 and 2:1 of IC_{50} concentration ratios. IC_{50} of CTN+STC ranged from 0.3 to 0.5 μM and for CTN+5-MET-STC from 0.2 to 1.5 μM . Combinations of mycotoxins showed more cytotoxicity than single mycotoxins. Cytotoxic interactions of binary combinations were described by applying CI-isobologram with correction for unparallelled dose-response curves. Binary combinations showed mostly additive effect. The exceptions were CTN+5-MET-STC and 2:1 CTN+STC in low affected areas and 1:1 CTN+STC between IC_{25} - IC_{50} which showed antagonistic effect.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 15 figures, 3 tables and 84 references. Original is in Croatian language.

Keywords: mycotoxins, citrinin, sterigmatocystin, 5-methoxysterigmatocystin, lung cells, cytotoxicity

Mentor: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, Ph.D. Postdoctoral research and teaching associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.