

Citotoksičnost 5-metoksisterigmatocistina za ljudske stanice pluća i jetre

Palija, Dunja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:212326>

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](#)



Dunja Palija

**Citotoksičnost 5-metoksisterigmatocistina za
ljudske stanice pluća i jetre**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić. Rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta (MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

Zahvaljujem se svojoj mentorici. Prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima koji su me pratili i podržavali kroz sve godine moga obrazovanja.

SADRŽAJ

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 1.1 | MIKOTOKSINI..... | 1 |
| 1.1.1 | Izloženost ljudi mikotoksinima..... | 3 |
| 1.1.2 | Metode analize..... | 3 |
| 1.2 | STERIGMATOCISTIN I 5-METOKSISTERIGMATOCISTIN..... | 4 |
| 1.2.1 | Kemijska struktura..... | 5 |
| 1.2.2 | Toksični učinci..... | 6 |
| 1.2.2.1 | Mehanizam toksičnosti..... | 7 |
| 1.2.2.2 | Ispitivanja toksičnosti..... | 8 |
| 2. | OBRAZLOŽENJE TEME..... | 10 |
| 3. | MATERIJALI I METODE..... | 11 |
| 3.1 | STANIČNE KULTURE..... | 11 |
| 3.2 | TRETIRANJE STANICA 5-MET-STC..... | 11 |
| 3.3 | MTS TEST..... | 12 |
| 3.4 | OBRADA PODATAKA..... | 13 |
| 3.4.1 | Statistička obrada podataka..... | 13 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA..... | 14 |
| 4.1 | STANIČNA LINIJA A549..... | 14 |
| 4.2 | STANIČNA LINIJA HepG2..... | 17 |
| 4.3 | RASPRAVA..... | 20 |
| 5. | ZAKLJUČCI..... | 22 |
| 6. | LITERATURA..... | 23 |
| 7. | SAŽETAK / SUMMARY..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 7.1 SAŽETAK..... | 27 |
| 7.2 SUMMARY..... | 28 |
| 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini predstavljaju sekundarne metabolite gljivica. S obzirom na svoje kemijske i toksikološke karakteristike predstavljaju jednu vrlo heterogenu skupinu metabolita koja može predstavljati rizik po zdravlje ljudi i životinja (Bennett i Klich, 2003).

Mikotoksine prvenstveno proizvode plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Claviceps* koje pripadaju skupini askomiceta. Askomicete su bogata skupina veoma rasprostranjenih gljiva karakterizirane končastim tj. micelijskim vegetativnim tijelom. Mogu nastanjivati mrtvi organski supstrat ili živi organizam (Tang i sur., 2006).

Kada govorimo o mikotoksinima bitno je naglasiti da su oni svi gljivičnog porijekla, ali da nisu sve toksične tvari koje gljivice proizvode mikotoksini. Pri takvom definiranju bitna je doza i meta djelovanja. Mikotoksini su metaboliti toksični u niskim koncentracijama dok se drugi metaboliti poput etanola koji su toksični u visokim koncentracijama ne smatraju mikotoksinima. Osim toga plijesni proizvode metabolite koji su toksični za bakterije, ali ne i za čovjeka, primjerice antibiotik penicilin (Bennett, 1987). Zbog različitih kemijskih karakteristika, puta biosinteze i konačnog biološkog učinka njihova klasifikacija je dosta izazovna. Klinički se svrstavaju prema organu na kojega djeluju, primjerice na neurotoksine, nefrotoksine, hepatotoksine, imunotoksine. Biolozi ih dijele na mutagene, karcinogene, teratogene i alergene toksine, kemičari prema molekularnoj strukturi, a biokemičari prema načinu biosinteze (Bennett i Klich, 2003).

Povijesno gledajući mikotoksini počinju imati svoj utjecaj na čovječanstvo od kada je čovjek prestao biti isključivo lovacem i započeo sa uzgojem i pohranom hrane. Glavni izvor mikotoksina kod ljudi su žitarice i proizvodi na bazi žitarica te proizvodi životinjskog porijekla. Ergotizam uzrokovan trovanjem ergot alkaloidima koje proizvodi *Claviceps Purpurea* konzumiranjem raži poznat je već više od 2,000 godina i uzrokovao je smrt više desetaka tisuća ljudi u Europi u proteklom tisućljeću. U Japanu se od 17. stoljeća trovanja konzumacijom riže povezuju s toksinom citroviridinom kojeg proizvodi *Penicillium citreonigrum*. Za neke *Penicillium* toksine poput okratoksina A smatralo se da su bili uzročnici Balkanske endemske nefropatije. U Rusiji 1940-ih godina pojava toksične alimentarne aleukije povezivala se sa mikotoksinima roda *Fusarium* posebice T-2 toksinom (Peraica i sur., 1999). Unatoč povijesnom utjecaju na ljudsko zdravlje značajnije istraživanje mikotoksina započinje 1960-ih

godina velikim pomorom purica na životinjskom farmama u Engleskoj koje se povezivalo sa alfatoksinom koje proizvodi vrsta plijesni *Aspergillus flavus* (Maggon i sur., 1977).

Kada govorimo o utjecaju gljivica na ljudsko zdravlje treba razlikovati dva pojma: mikoze i mikotoksikoze. Mikoze predstavljaju bolesti uzrokovane samim rastom gljivica na površini ljudskog ili životinjskog domaćina. Bolesti uzrokovane mikotoksinima putem respiratorne, dermalne ili ingestijske izloženosti se nazivaju mikotoksikozama. Mikoze mogu uzrokovati primarni patogeni poput vrste *Histoplasma capsulatum* ili oportunistički patogeni poput vrsta *Aspergillus fumigatus* i *Candida albicans*. U ljudi su mikoze većinom uzrokovane oportunističkim patogenima. Infekcije koje uzrokuju mogu ostati lokalizirane ili postati sistemske te je najčešći put infekcije preko respiratornog trakta, ali i dermalnim putem (van Burik i Magee, 2001). Mikotoksikoze predstavljaju trovanje toksičnim metabolitima. Simptomi koji će se razviti ovise o različitim čimbenicima poput tipa mikotoksina, količini i trajanju izloženosti, ali i o samome pojedincu i njegovom zdravstvenom stanju (Fink-Grermels, 1999). Najčešći put izloženosti je konzumacija kontaminirane hrane. Do danas nema mnogo načina za liječenje mikotoksikoza i većinom se liječenje svodi na suportivnu terapiju u vidu prehrane i hidracije. Postoje određene indikacije da neki sojevi *Lactobacillus* mogu učinkovito vezati prehrambene mikotoksine i na taj način pomoći u terapiji (el-Nezami i sur., 1998).

Mikotoksikoze pripadaju skupini toksikoloških sindroma i kao takve se mogu podijeliti na akutne i kronične. Akutne mikotoksikoze predstavljaju brzi odgovor organizma na visoke doze mikotoksina dok kronične podrazumijeva dugotrajnu izloženost niskim dozama mikotoksina. Veći globalni zdravstveni problem predstavlja dugotrajna izloženost koja može rezultirati imunosupresijom i pojavom karcinoma (Placinta i sur., 1999). Da bi se mikotoksikoza utvrdila potrebno je pronaći doza-učinak vezu između mikotoksina i bolesti. Izloženost mikotoksinima se potom utvrđuje okolišnim i biološkim praćenjima.

1.1.2 Izloženost ljudi mikotoksinima

U ljudski organizam mikotoksini najčešće dospijevaju ingestijom kontaminirane hrane. Glavni izvor mikotoksina su žitarice i proizvodi na bazi žitarica. FAO navodi da je 25% svjetske proizvodnje žitarica kontaminirano mikotoksinima koji mogu ozbiljno utjecati na ljudsko zdravlje (Peraica i Domijan, 2001). Kontaminacija usjeva može se dogoditi u bilo kojem proizvodnom koraku, a ovisi o prirodnim uvjetima i to sadržaju vlage, relativnoj vlažnosti zraka, temperaturi, pH vrijednosti i hranjivom supstratu, koji mogu pogodovati rastu plijesni i produkciji mikotoksina (Jay, 1992). Drugi način intoksikacije je putem inhalacije gljivičnih spora. Najugroženija skupina su radnici u poljoprivredi, silosima za preradu žitarica te radnici drvne industrije. Respiratorni put intoksikacije manje je obrađivan u studijama od prethodnog, ali danas mu se pridaje sve veći značaj. Provode se istraživanja koja ukazuju na zdravstvene rizike inhalacijske izloženosti mikotoksinima u zatvorenim prostorima zahvaćenim plijesni poput domova ili škola (Kelman i sur., 2004).

Na globalnoj razini 30-100% uzoraka hrane je kontaminirano mikotoksinima, to uključuje nemodificirane i modificirane mikotoksine koji mogu nastati u bio kojem segmentu proizvodnog procesa (Marin i sur., 2013). Stabilni su pri gotovo svim procesima prerade hrane što uvelike otežava njihovu eliminaciju iz kontaminiranog materijala. Zbog toga se sve više ulaže u prevenciju kontaminacije hrane mikotoksinima. Prevencija uključuje dobru proizvođačku praksu, dovoljno sušenje usjeva nakon berbe pa sve do stvaranja rezistentnih biljkama na plijesni pomoću genetičkog inženjerstva (Rajasekaran i sur., 2006).

1.1.3 Metode analize

Brojne analize koje su provedene kroz zadnjih par desetljeća pokazuju prevalenciju mikotoksina u brojnim uzorcima stočne hrane i hrane na bazi žitarica. Globalni pregled zastupljenosti mikotoksina iz 2013. godine pokazuje rezultate da 81% od 3 000 uzoraka žitarica i stočne hrane sadržava barem 1 mikotoksin (Murugesan i sur., 2015). Veliko povećanje u broju pozitivnih uzoraka uvelike je povezano s boljim i osjetljivijim metodama detekcije. Prvotno se u analizi mikotoksina koristila imunoenzimska metoda (ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay) kao jednostavna i brza metoda, ali glavna mana je nedovoljna specifičnost. Bitan napredak je učinjen korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) koja je omogućila istovremenu analizu više različitih mikotoksina (Schuhmacher i sur., 1997). Danas se kao glavna metoda analize koristi tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrofotometijom (LC-MS/MS). Ova metoda

omogućuje istovremenu analizu većeg broja analita te zbog svoje selektivnosti, osjetljivosti i točnosti prednjači pred ostalim analitičkim metodama (Malachová i sur., 2014).

Metode detoksifikacije mikotoksina su različite. Najkorištenija uključuje adsorbense koji na svoju površinu adsorbiraju mikotoksin i na taj način ga imobiliziraju. Metoda je učinkovita za određene mikotoksine poput aflatoksina, ali s obzirom na njihovu raznolikost u kemijskoj strukturi ne može se samostalno koristiti za deaktivaciju velikog broja mikotoksina. Različite metode i strategije se moraju kombinirati da se dobiju zadovoljavajući rezultati. Enzimska i mikrobiološka detoksifikacija koje se još nazivaju biotransformacijom i biodetoksifikacijom koriste mikroorganizme i pročišćene enzime kako bi mikotoksin preveli u manje toksičan ili ne-toksičan produkt (Grenier i sur., 2013).

1.2. STERIGMATOCISTIN I 5-METOKSISTERIGMATOCISTIN

5-metoksisterigmatocistin (5-MET-STC) je metoksi derivat sterigmatocistina (STC). Sterigmatocistin je karcinogeni i hepatotoksični mikotoksin, a ujedno i prekursor u biosintezi aflatoksina kojeg proizvode plijesni *Aspergillus* spp. poput *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Versicolores* i *Aspergillus nidulans* (Balogh i sur., 2019).

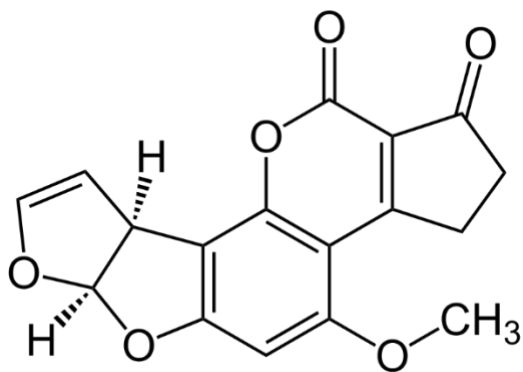
Sterigmatocistin je prvi puta izoliran iz micelija *A. versicolor* 1954. godine. Danas je poznato da je *Aspergillus* sekcija *Versicolores* je najveći proizvođač STC-a iako ne proizvodi aflatoksine čije je on prekursor (Blackburn, 2006). Vrste *Aspergillus* sekcije *Versicolores* primarno kolonizira vlažne prostore i druga je najizoliranija vrsta plijesni iz opustošenih stambenih prostora. Njezin značaj je u tome što može opstati na slabo hranjivim podlogama te raste u uvjetima niskog aktiviteta vode (a_w). Rast plijesni u stambenim prostorima uvijek se javlja zbog pojačanog aktiviteta vode. Najniža procijenjena vrijednost aktiviteta vode koja podržava rast plijesni je 0,67-0,75. Većina mikotoksičnih plijesni zahtjeva za svoj rast vrijednosti $a_w > 0,9$ dok *Aspergillus* pripada primarnim kolonizatorima i može opstati u uvjetima manje vlažnosti u odnosu na ostale plijesni. Može rasti pri vrijednostima $a_w < 0,8$ te u istim uvjetima proizvodi STC i 5-MET-STC (Nielsen i sur., 1999). *Aspergillus* sekcija *Versicolores* je značajan kontaminant hrane, široko je rasprostranjen i može ga se naći u uzorcima različite vrste hrane poput pšenice, kukuruza, orašastim plodovima, zrnima kave pa sve do sušenoga mesa i tvrdih sireva (Pitt i Hocking, 1997). Sterigmatocistin pokazuje akutnu nefrotoksičnost i hepatotoksičnost te je karcinogen 2B skupine prema IARC-u. Mnoge zemlje nemaju regulaciju

za razine ovog mikotoksina u hrani. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) predložila je limit kvantitativno utvrđenih vrijednosti $<1.5 \mu\text{g/kg}$ (EFSA, 2013).

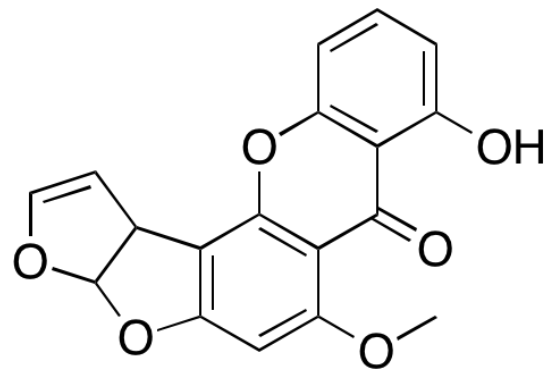
1.2.1 Kemijska struktura

Sterigmatocistin je prekursor u biosintezi aflatoksina B₁ kod *A. parasiticus* i *A. flavus*, a konačni produkt biosinteze kod aspergila sekcije *Versicolores* koja u istim uvjetima stvara i 5-MET-STC.

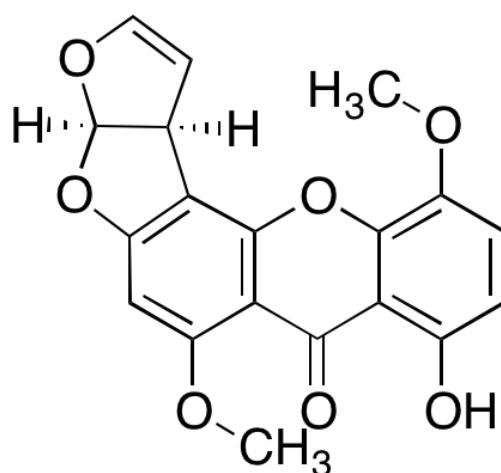
Kemijske strukture sterigmatocistina, aflatoksina B₁ pa time i 5-MET-STC su vrlo slične (Slika 1). Toksikologija aflatoksina, posebice najtoksičnijeg karcinogena AFB₁ gotovo je u potpunosti istražena, puno manje se zna o metaboličkoj aktivaciji i deaktivaciji STC-a i njegovih derivata. Aflatoxin B₁ je jako hepatotoksičan i nefrotoksičan te je najpotentniji prirodni hepatokarcinogen. Smatra se da karcinogeni učinak AFB₁ proizlazi iz stvaranja izrazito reaktivnog epoksida na furofuranskom prstenu posredstvom citokroma P450 i daljnjim stvaranjem DNA adukata (Bedard i Massey, 2006).



a) aflatoxin B₁



b) sterigmatocistin



c) 5-metoksisterigmatocistin

Slika 1. Kemijska struktura a) AFB1 b) STC-a c) 5-MET-STC

Sterigmatocistin (C₁₈H₁₂O₆) građen je ksantinske jezgre povezane sa bifuranskom strukturom te sadržava hidroksilnu i metoksi skupinu. Molekulska masa iznosi 324,29 g/mol, talište mu je na 246°C i kristalizira u obliku svijetložutih iglica. Pokazuje dobru topljivost u metanolu, etanolu, acetonitrilu, benzenu i kloroformu. Ima maksimum apsorpcije ultraljubičaste (UV) svjetlosti na 245 i 325 nm (Rodricks, 1969). 5-metoksisterigmatocistin (C₁₉H₁₄O₇) strukturno vrlo blizak i predstavlja derivat sterigmatocistina s jednom dodatnom metoksi skupinom. Proizvode ga one *Aspergillus* spp. kojima je STC konačni produkt poput *Aspergillus* sekcije *Versicolores*. (Cabaret i sur., 2014). Oba spoja imaju lijevu rotaciju što ukazuje na to da imaju istu apsolutnu konfiguraciju s (1'R, 2'S) (Cai i sur., 2011).

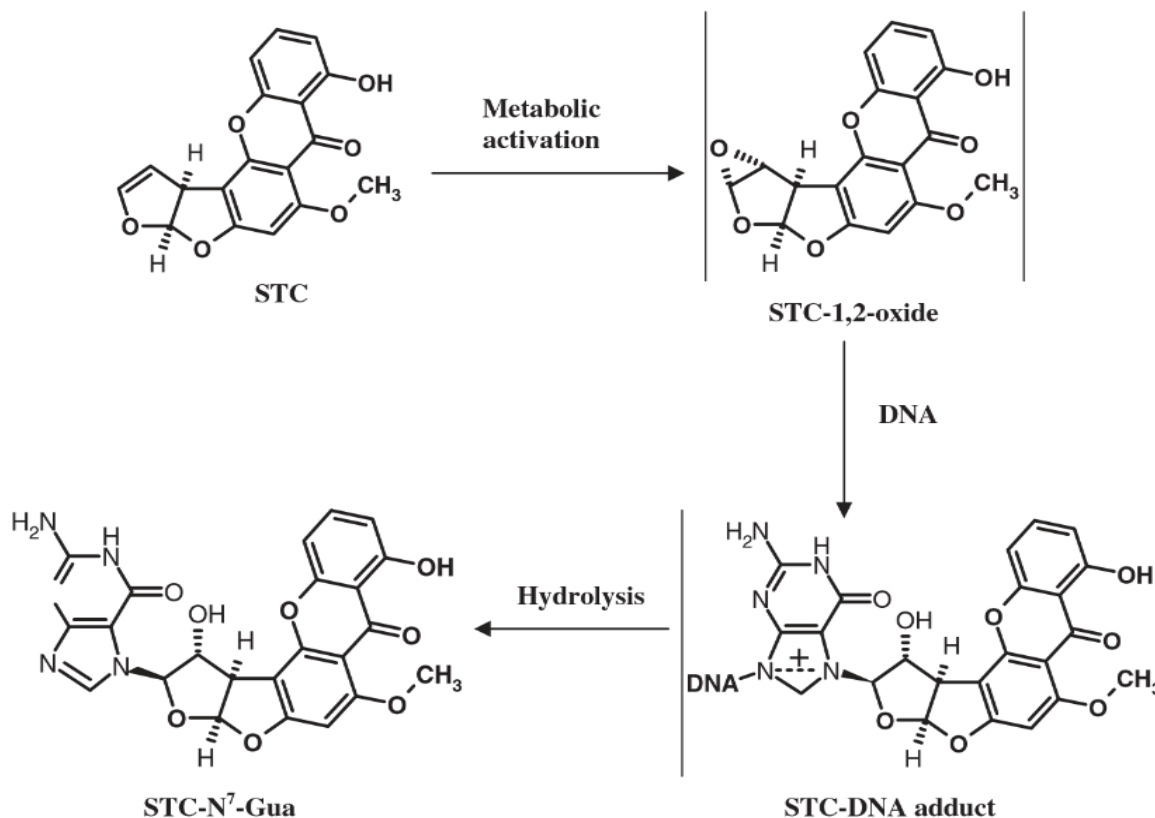
1.2.2 Toksični učinci

Sterigmatocistin je dokazani karcinogen na životinjskim modelima, a klasificiran kao potencijalni karcinogen kod ljudi (2B) (IARC, 1976). Na njemu su provedena brojna istraživanja vezana uz akutnu toksičnost, citotoksičnost, mutagenost i karcinogenost. Pokazuje akutnu hepatotoksičnost na većini testiranih životinja dok karcinogenost ovisi o životinjskoj vrsti te načinu i frekvenciji apliciranja toksina. Unatoč tome što pokazuje potentan toksični i karcinogeni učinak značaj njegova učinka na ljudsko zdravlje nije u potpunosti otkriven. (Veršilovskis i De Saeger, 2010).

U zadnjih nekoliko desetljeća provedene su brojne studije vezane za toksičnost STC-a dok njegov derivat 5-MET-STC i dalje ostaje podosta neistražen. Sterigmatocistin je povezan s akutnim kliničkim simptomima, krvavom dijarejom i konačnom smrću stoke koja je konzumirala hranu kontaminiranu s *A. versicolor* (Vesonder i Horn, 1985). Kulture stanica izložene djelovanju STC-a pokazivale su izmijenjene procese u jezgri poput inhibicije mitoze, inhibicije unosa timidina i uridina te stimulirane sinteze popravka DNA. Istraživanja su uglavnom provedena na manjim sisavcima poput štakora, miševa pa čak i majmuna. STC uzrokuje i inhibiciju RNA sinteze u jetri štakora (Nel i Pretorius, 1970). Pokazalo se da u štakora uzrokuje hepatocelularni karcinom nakon oralne primjene ili intraperitonealne aplikacije (Dickens i sur., 1966), a karcinom skvamoznih stanica aplikacijom kroz kožu (Purchase i Van der Watt, 1973). Određivana je doza STC-a (mg/kg tjelesne mase) koja je bila smrtonosna za 50% testiranih životinja (LD50). Sagledavao se 10-to dnevni učinak te je LD50 za miševu iznosio 800 mg/kg, 166 mg/kg za mužjake odnosno 120 mg/kg za ženke Wistar štakora te 32 mg/kg za Vervet majmuna. Kronični simptomi su uključivali indukciju hepatoma u štakora, respiratornih tumora u miševa te nastanak promjena i lezija u bubregu i jetri majmuna (Veršilovskis i De Saeger, 2010).

1.2.2.1 Mehanizam toksičnosti

Metabolizam i bioaktivacija STC-a, a time i 5-MET-STC-a je blizak onome AFB₁ zbog strukturnih sličnosti. Dimenzije i apsolutna konfiguracija furofuranskog dijela molekule je vrlo slična kod sva tri toksina. To ukazuje da će se metabolička aktivacija odvijati na istome mjestu, u području C2-C3 dvostruke veze (Kiessl, 1986). Pokazalo se da je upravo metabolička aktivacija, stvaranje epoksida djelovanjem citokroma P450 potrebna za ispoljavanje toksičnog i mutagenog učinka STC-a kod bakterija, životinja i nekih kultiviranih stanica (Tang i Friedman, 1977) (Kuczuk i sur., 1978). Mutageni učinak STC-a je povezan s njegovim kovalentnim vezanjem za molekulu DNA nakon metaboličke aktivacije i konverzije u STC-N7-gvaninski adukt nakon hidrolize (Slika 2) (Essigmann i sur., 1979). Drugi mogući mehanizam mutagenog učinka predložen je 2014. godine preko hidroksilacije aromatskog prstena i nastanka katehola koji potom može reagirati s molekulom DNA (Pfeiffer i sur., 2014).



Slika 2. Metabolička aktivacija STC-a i nastanak DNA adukta prema Essigmannu.

1.2.2.2 Ispitivanja toksičnosti

S obzirom na to da se toksičnost STC-a bazira na mutagenom i genotoksičnom učinku, provedene su studije na linijama stanica. Korištene linije stanica u studijama su prvenstveno stanice hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 koje su funkcionalno najbližnje stanicama jetre i idealne su za ispitivanje hepatotoksičnosti i genotoksičnosti. Sterigmatocistin pokazuje genotoksični učinak na HepG2 preko oksidativnog stresa i pucanja lizosoma. Nakon 24-satne izloženosti stanica STC-u IC₅₀ je iznosila 3 μM (Gao i sur., 2015). Osim na HepG2 staničnoj liniji ispitivanja su provedena i na stanicama adenokarcinomatозnog tkiva pluća A549. U ispitivanju su korištene obje linije stanica i dobivene IC₅₀ vrijednosti od 7,3 μM za HepG2 i 3,7 μM za A549 (Liu i sur., 2014). STC može inducirati adenokarcinom pluća miša *in vivo* i DNA oštećenje i zaustavljanje staničnog ciklusa A549 stanica *in vitro* (Cui i sur., 2017).

Derivat STC-a, 5-MET-STC, nije do sada toliko ispitivan. Nekoliko ispitivanja je provedeno i to uglavnom na varijacijama plućnih stanica. Vlažni i nedovoljno provjetravani

stambeni prostori idealni su za rast *A. versicolor* koji u tim uvjetima proizvodi STC te 5-MET-STC, ponekad i u većim količinama od STC-a (Nielsen i sur., 1999). Udisanjem zraka u takvim prostorima može doći do inkontaminacije 5-MET-STC-om te su upravo zato ispitivanja na plućnim stanicama od interesa. U Hrvatskoj je 2016. godine provedeno istraživanje gdje je u uzorku zraka iz stambenih i podrumskih prostora identificirano 7 vrsta aspergila sekcije *Versicolores*. Najdominantnije vrste u uzorku su bile *A. jensenii* i *A. creber* praćene s *A. protuberus*, *A. venenatus*, *A. tennesseensis*, *A. amoenus* i *A. griseoaurantiacus*. Za sve vrste je utvrđeno da proizvode STC među kojima najveći potencijal ima *A. jensenii*. *A. jensenii* najzastupljenija je vrsta u zraku stambenih prostora, više od *A. versicolor* te je utvrđeno da proizvodi i 5-MET-STC. Ispitivanje citotoksičnosti STC-a provedeno je na A549 stanicama te su dobivene vrijednosti $IC_{50} > 3,2 \mu\text{g/mL}$ za *A. jensenii* (Jakšić Despot i sur., 2016). 2011. godine provedeno je ispitivanje citotoksične aktivnosti pojedinih derivata sterigmatocistina među kojima i 5-MET-STC-a na A549 staničnoj liniji. On je jedini od ispitanih derivata pokazao umjerenu citotoksičnost s IC_{50} vrijednosti $3,86 \mu\text{M}$ (Cai i sur., 2011). U jednom ispitivanju 5-Met-STC pokazao je citotoksični i genotoksični učinak na A549 stanicama, IC_{50} vrijednost $181 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (Jakšić i sur., 2012). Provedena je i studija o potencijalnoj metaboličkoj deaktivaciji 5-MET-STC-a na primarnim trahealnim epitelnim stanicama (PTEC). Poznato je da se STC može metabolizirati pomoću CYP enzima, UDP-glukuronozil-transferaze te sulfotransferaza u epitelnim stanicama dišnog sustava. Studija je koristila humani rekombinantni CYP i PTEC staničnu liniju za ispitivanje metabolizma 5-MET-STC-a. Dobiveni rezultati ukazivali su na to da s 5-MET-STC uglavnom detoksificira putem konjugacije kao i STC. Utvrđeno je i da djelovanjem CYP-a nastaje reaktivni metabolit STC-a, ali ne i 5-MET-STC-a, međutim 5-MET-STC povećava CYP1A1 mRNA vrijednosti. Zaključak je da bilo kakve dugoročne posljedice i dalje ostaju nepoznate (Cabaret i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj provedenoga istraživanja i ovog rada jest utvrđivanje citotoksičnog učinka mikotoksina 5-MET-STC-a i određivanje inhibitorne koncentracije za 50% stanica (IC50). Određivanje navedenih parametara provodilo se na dvije stanične linije, na stanicama adenokarcinomatозnog tkiva pluća soja A549 i stanicama hepatocelularnog tkiva jetre HepG2. Određivanje IC50 omogućit će odabir subcitotoksičnih koncentracija 5-MET-STC-a koje će se moći dalje koristiti u ispitivanju citotoksičnosti 5-MET-STC-a u kombinaciji i s drugim mikotoksinima koji mogu biti prisutni u prašini vlažnih prostora i hrani.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 STANIČNE KULTURE

U ispitivanju su korištene dvije linije stanica, obje uzete iz Američke zbirke staničnih kultura (ATCC-American Type Culture Collection). Prva linija stanica su stanice adenokarcinoma tkiva pluća soja A549, a druga linija ispitivanih stanica su stanice hepatocelularnog karcinoma soja HepG2. Stanične kulture su uzgajane i tretirane u sterilnim uvjetima. Pri tome se koristila potpuno sterilna aparatura, a cjelokupni postupak se izvodio unutar uređaja s laminarnim strujanjem zraka(*eng. Laminar flow hood*).

Stanice A549 i HepG2 su uzgajane u RPMI mediju (Capricorn Scientific GmbH Ebsdorfergrund Germany) uz dodatak toplinski inaktiviranog fetalnog telećeg seruma masenog udjela 10% (Sigma) i 2 mM glutamina. Stanice su uzgojene u plastičnoj boci (75 cm² flask, Thermo Scientific™ Nunc™ Cell Culture Treated EasYFlasks™) za adhezivni uzgoj u navedenom mediju u inkubatoru pod uvjetima konstantne temperature (+37°C), relativne vlažnosti (95%) i udjela ugljikovog dioksida (5%). Kako bi se spriječila bakterijska kontaminacija dodani su antibiotici penicilin (c =100 IU/ml) i streptomycin (γ =100 μg/ml) (Gibco, Invitrogen, Paisley).

Prilikom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS, pH=7,4) i tretiraju otopinom tripsin-EDTA (0,25%) jer tripsin omogućava odljepljivanje stanica od podloge. Potom se stanice resuspendiraju u svježem mediju. U daljnjem postupku dolazi do tretiranja stanica mikotoksinom 5-MET-STC-om.

3.2 TRETIRANJE STANICA 5-MET-STC-om

Prije samog tretiranja stanica toksinom brojali smo ih na hemocitometru i pri tome utvrdili da njihova koncentracija iznosi 10⁶ stanica po 1 ml suspenzije. Potom se po 1 mL suspenzije stanica obje stanične linije resuspendirao s 9 mL medija RPMI. Slijedilo je nasadivanje stanica pri čemu se po 100 μL svake od dviju razrijeđenih suspenzija stanica nasadilo u jažice. Korištene su dvije odvojene mikrotitarske pločice s po 96 jažica (Thermo Scientific Nunc 96-well plate). Time smo dobili da je koncentracija stanica sojeva A549 i HepG2 bila 10⁴ po jažici. U dvije jažice svake mikrotitarske pločice stanice nisu nasadene jer

su te jažice predstavljale slijepu probu kojoj je dodan samo RPMI medij te u kasnijem postupku i MTS reagens.

Usljedio je inkubiranje stanica kroz period od 24 sata te nakon toga tretiranje mikotoksinom 5-MET-STC-om. Početna otopina 5-MET-STC-a (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) koncentracije 0,01 mol/L dobivena je otapanjem toksina u 100% DMSO otapalu. Od takve početne otopine pripravljene su razrijeđene ispitivane otopine u 10 različitih koncentracija koje su redom iznosile: 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M. Kod mikrotitarske pločice sa stanicama linije A549 za tretiranje stanica primjenjivanje su ispitivane otopine toksina iste koncentracije u 7 replikata, a kod mikrotitarske pločice sa stanicama linije HepG2 u 6 replikata. Kontrole DMSO primjenjene su u dvije koncentracije kao K1 (0,67% DMSO) i K2 (0,3% DMSO) na obje mikrotitarske pločice u 7 replikata. Kontrolni tretmani nisu utjecali na vijabilnost stanica.

Nakon tretiranja stanica toksinom, uslijedila je ponovna inkubacija toksinom od 24 sata.

3.3 MTS TEST

Za ispitivanje citotoksičnog učinka toksina 5-MET-STC-a na stanične linije A549 i HepG2 proveden je MTS proliferacijski test (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). Ova kolorimetrijska metoda koristi reagens (The CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent) s tetrazolinskom komponentom (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolin) i s komponentom koja služi kao hvatač elektrona (fenazin etosulfat).

U prethodnom koraku smo tretirali stanice sojeva A549 i HepG2 toksinom 5-met-STC-om te ih stavili na inkubiranje od 24 sata. Po završenom inkubiranju u svaku jažicu na dvije mikrotitarske pločice dodano je 100 μ L MTS reagensa razrijeđenog u staničnom mediju te j uslijedila ponovna inkubacija od 1-2 sata. Vijabilne stanice su metabolički aktivne, stoga su njihove NAD(P)H ovisne dehidrogenaze metabolizirale žuto obojeni MTS reagens u ljubičasto obojeni formazan. Nastali spoj topljiv je u staničnom mediju što omogućava da mu bez dodatnih postupaka mjerimo apsorbanciju na 490 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice s 96 jažica (PerkinElmer VictorX3). Izmjerena apsorbancija fromazana proporcionalna je nastaloj količini fromazana u jažici, a time i koncentraciji živih stanica u pojedinoj jažici. Dolazimo do

toga da što je veća izmjerena apsorbancija na 490 nm veća je i količina nastalog fromazana, a time i veća koncentracija živih stanica u jažici.

3.4 OBRADA PODATAKA

Za obradu dobivenih podataka prvotno je korišten je računalni program Microsoft Excel, Microsoft Office 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD). U ispitivanju smo koristili dvije slijepe probe koje su sadržavale samo medij RPMI i MTS reagens.). Kako bi se zanemario udio apsorbancije medija RPMI i reagensa MTS, od svake izmjerene A(490) tretiranih stanica i kontrolnih stanica oduzeta je srednja vrijednost apsorbancije dvije slijepe probe.

Rezultati vijabilnosti stanica izražavaju se u odnosu na kontrolu prema formuli:

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

Za izračun postotka vijabilnosti stanica tretiranih ispitivanim otopinama toksina koncentracija u rasponu 0,1-100 μM korištena je srednja vrijednost apsorbancije kontrolnih stanica tretiranih kontrolnom otopinom K1. Srednja vrijednost apsorbancije kontrolnih stanica tretiranih kontrolnom otopinom K2 koristila se u izračunu postotka vijabilnosti stanica tretiranih ispitivanim otopinama toksina koncentracija 150 μM i 200 μM . Kontrolne stanice nisu tretirane toksinom i zbog toga predstavljaju 100% preživjelih stanica.

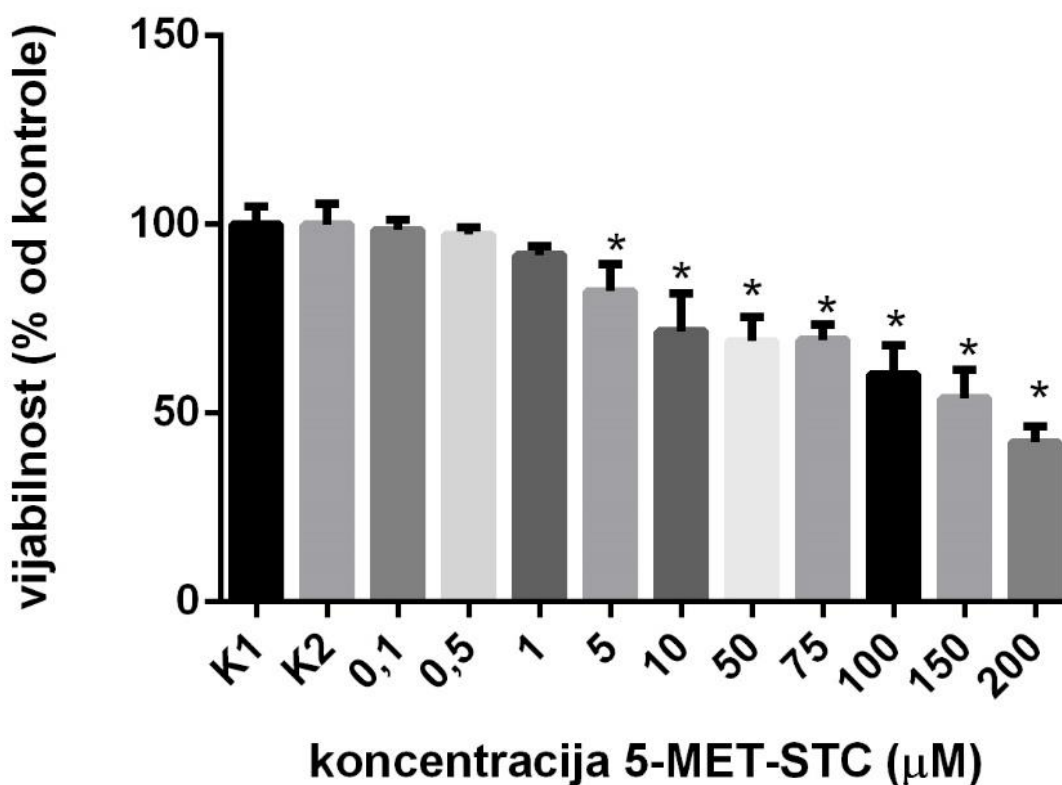
3.4.1 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je software *Prism 6* (GraphPad Software, Inc., San Diego). Rezultati dobiveni izračunom vijabilnosti stanica izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim pogreškama aritmetičke sredine ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Testiranje značajnosti razlika između pokusnih skupina u odnosu na kontrolu provedeno je jednosmjernom analizom varijance (One-Way ANOVA) i višestrukim usporednim testom (engl. *Dunnnett's multiple comparisons test*). Vrijednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Citotoksične koncentracije 5-met-STC-a (IC_{50}) dobivene su interpolacijom na temelju nelinearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka i izražene su kao $\text{IC}_{50} \pm$ standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM).

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 CITOTOKSIČNI UČINAK 5-MET-STC-a na A549 STANICE

Utjecaj 5-MET-STC-a na vijabilnost tretiranih stanica linije A549 primijenjenog u različitim koncentracijama prikazan je grafički (Slika 3). Koncentracije 5-MET-STC-a u odnosu na kontrole prikazane su grafički uz naznačeni statistički značaj.



Slika 3. Grafički prikaz postotka vijabilnosti tretiranih stanica A549 za različite koncentracije 5-MET-STC-a u odnosu na kontrolu. Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji 5-MET-STC, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji 5-MET-STC. * $p < 0,05$.

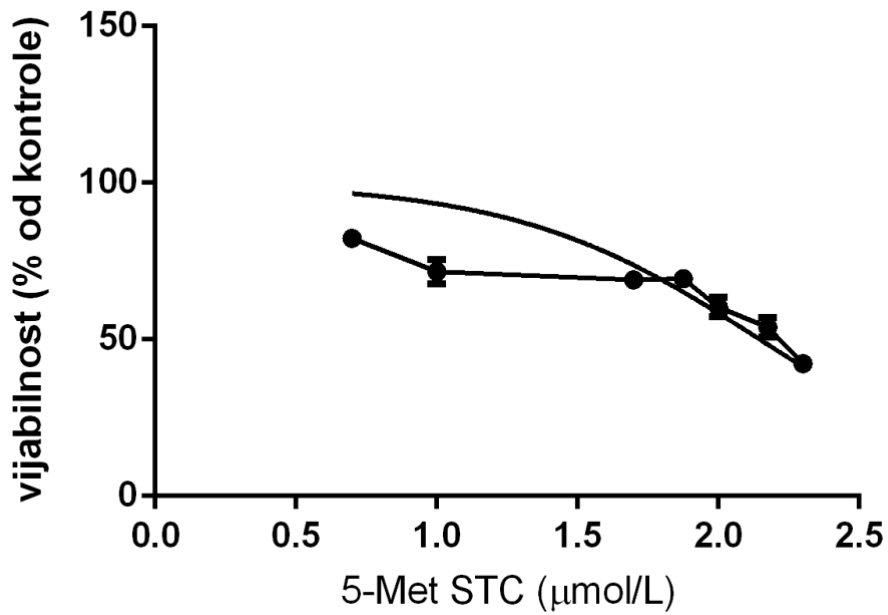
Vrijednosti parametara dobivenih statističkom obradom replikata rezultata vijabilnosti stanica A549 za pojedinu koncentraciju 5-MET-STC-a priložene su u tablici (Tablica 1).

Tablica 1. Statistički parametri vijabilnosti stanica A549 za određenu koncentraciju 5-MET-STC-a.

| Konc.5-MET-STC (μM) | K1 | K2 | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 | 10 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 |
|---|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Srednja vrijednost | 100,0 | 100,0 | 98,58 | 97,30 | 91,95 | 82,36 | 71,64 | 69,09 | 69,48 | 60,37 | 53,90 | 42,25 |
| Standardna devijacija | 4,700 | 5,516 | 2,667 | 1,937 | 2,304 | 7,055 | 10,21 | 6,443 | 3,932 | 7,698 | 7,568 | 4,195 |
| Standardna pogreška aritmetičke sredine | 1,776 | 2,085 | 1,008 | 0,7322 | 0,8708 | 2,667 | 3,858 | 2,631 | 1,605 | 3,143 | 3,089 | 1,713 |

5-metoksisterigmatocistin je u vremenu od 24h pokazao toksični učinak na stanice A549 u primijenjenim koncentracijama od 5 μM do 200 μM . Pri tim koncentracijama 5-MET-STC-a izračunate su srednje vrijednosti vijabilnosti stanica. One redom iznose: 82,36% za koncentraciju 5-MET-STC od 5 μM , 71,64% za konc. od 10 μM , 69,09% za konc. 50 μM , 69,48% za konc. 75 μM , 60,37% za konc. 100 μM , 53,90% za konc 150 μM i 42,25% za konc. 200 μM .

Krivulja nelinearne regresije dobivena je transformiranjem vrijednosti koncentracija 5-MET-STC-a u logaritamski oblik. Njome je grafički iskazan pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije toksina 5-MET-STC-a (Slika 4).

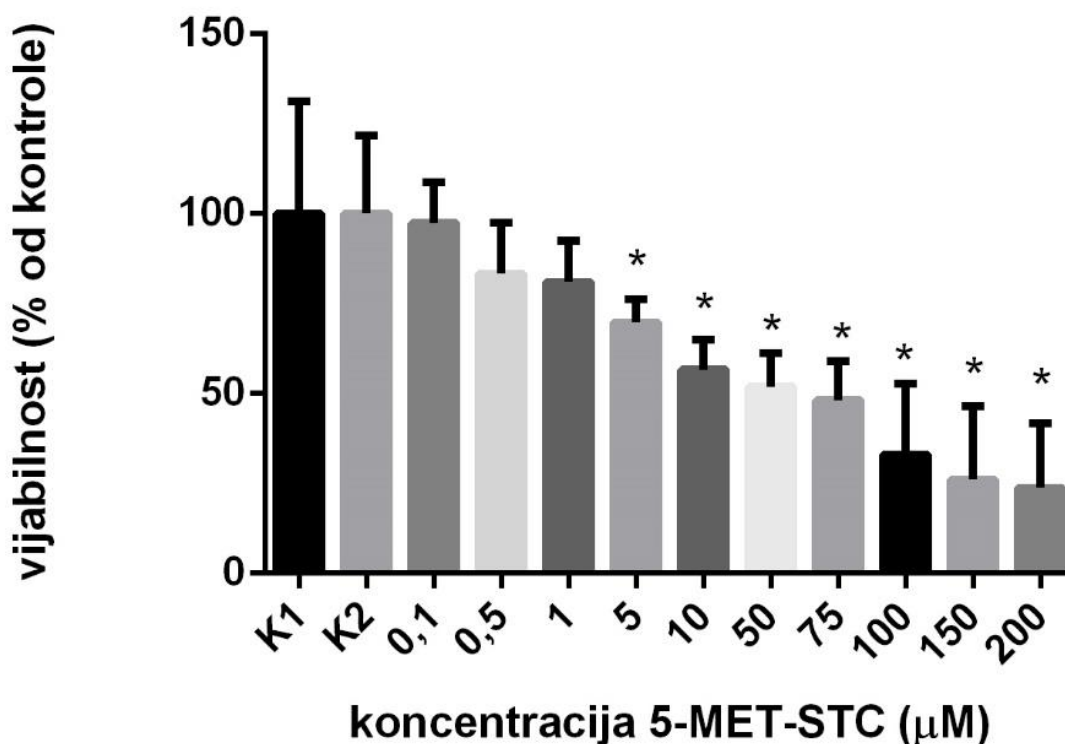


Slika 4. Krivulja nelinearne regresije za određivanje IC_{50} 5-MET-STC na A549 stanicama. Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost \pm SEM stanične vijabilnosti za koncentracije u rasponu do 0,1 do 200 μ M.

Iz krivulje nelinearne regresije dobivena je koncentracija 5-MET-STC-a koja smanjuje vijabilnost stanica linije A549 za 50%, $IC_{50} = 140 \mu\text{M} \pm 1$

4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK 5-MET-STC-a NA HepG2 STANICE

Utjecaj različitih koncentracija toksina 5-MET-STC-a na vijabilnost stanica linije HepG2 prikazan je grafički (Slika 5). Koncentracije 5-MET-STC-a u odnosu na kontrolu prikazan su na grafu uz naznačenu statističku značajnost.



Slika 5. Grafički prikaz postotka vijabilnosti tretiranih stanica linije HepG2 za različite koncentracije 5-MET-STC-a u odnosu na kontrole. Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji 5-MET-STC-a, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj konc 5-MET-STC-a. * $p < 0,05$

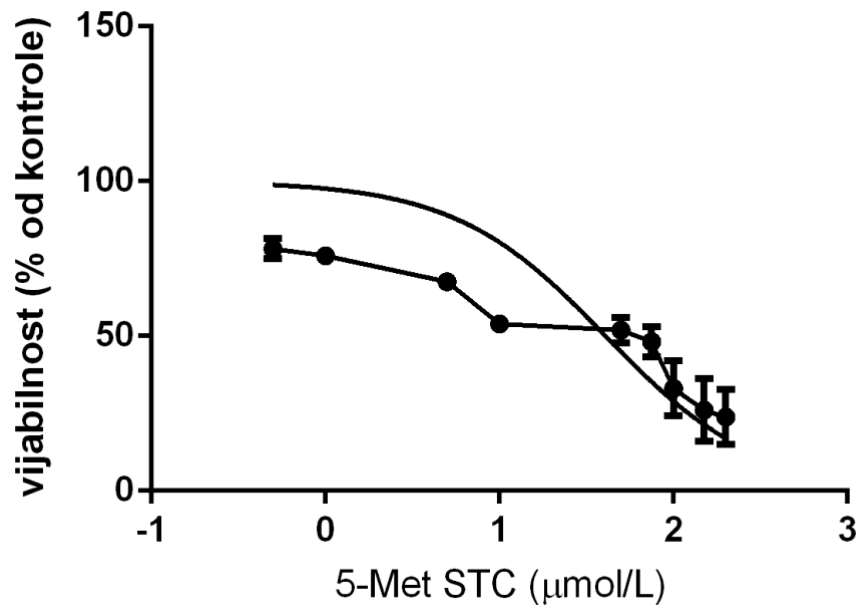
Vrijednosti parametara dobivenih statističkom obradom replikata rezultata vijabilnosti stanica HepG2 za pojedinu koncentraciju 5-MET-STC-a priložene su u tablici (Tablica 2).

Tablica 2. Statistički parametri vijabilnosti stanica HepG2 za određenu koncentraciju 5-MET-STC-a.

| Konc.5-MET-STC (μM) | K1 | K2 | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 | 10 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Srednja vrijednost | 100,0 | 100,0 | 97,41 | 83,36 | 81,01 | 69,86 | 56,67 | 51,90 | 48,15 | 33,08 | 26,12 | 23,83 |
| Standardna devijacija | 31,27 | 21,79 | 11,45 | 14,21 | 11,54 | 6,323 | 8,280 | 9,245 | 10,88 | 19,76 | 20,47 | 17,88 |
| Standardna pogreška aritmetičke sredine | 11,82 | 8,235 | 4,673 | 5,800 | 5,159 | 2,581 | 3,380 | 4,134 | 4,865 | 8,837 | 10,24 | 8,939 |

5-metoksisterigmatocistin u vremenu od 24 h pokazao toksični učinak na stanice HepG2 u primijenjenim koncentracijama od 5 μM do 200 μM . Pri tim koncentracijama 5-MET-STC-a izračunate su srednje vrijednosti vijabilnosti stanica. One redom iznose: 69,86% za koncentraciju 5-MET-STC od 5 μM , 56,67% za konc. od 10 μM , 51,90% za konc. 50 μM , 48,15% za konc. 75 μM , 33,08% za konc. 100 μM , 26,12% za konc 150 μM i 23,83% za konc. 200 μM .

Krivulja nelinearne regresije dobivena je transformiranjem vrijednosti koncentracija 5-MET-STC-a u logaritamski oblik. Njome je grafički iskazan pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije toksina 5-MET-STC-a (Slika 6).



Slika 6. Krivulja nelinearne regresije za određivanje IC_{50} 5-MET-STC na HepG2 stanicama . Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost \pm SEM stanične vijabilnosti za koncentracije u rasponu do 0,1 do 200 μ M.

Iz krivulje nelinearne regresije dobivena je koncentracija 5-MET-STC-a koja smanjuje vijabilnost stanica linije HepG2 za 50%, $IC_{50} = 40,83 \mu\text{M} \pm 1,2$.

4.3. RASPRAVA

Dosadašnja ispitivanja uglavnom su kao predmet interesa imala STC, a o njegovom derivatu 5-MET-STC-u ne zna se mnogo. S obzirom na veliku sličnost u strukturi i poznati mutageni i genotoksični učinak STC, malobrojna ispitivanja na 5-MET-STC uglavnom se baziraju na utvrđivanju njegova potencijalnog citotoksičnog i genotoksičnog učinka.

Inhalacija konidija koje sadržavaju 5-MET-STC najvjerojatniji je put moguće intoksikacije ovim toksinom. Vlažni i nedovoljno provjetravani stambeni prostori predstavljaju idealne uvjete za rast aspergila sekcije *Versicolores* koja u tim uvjetima uz STC proizvodi i 5-MET-STC (Nielsen i sur., 1999). Zbog toga su se dosadašnja ispitivanja vezna uz potencijalno citotoksičnost 5-MET-STC uglavnom provodila na varijacijama plućnih stanica. U Hrvatskoj je 2016. godine provedeno istraživanje gdje je u uzorku zraka iz stambenih i podrumskih prostora identificirano 7 vrsta aspergila sekcije *Versicolores* među kojima su najdominantnije vrste bile *A. jensenii* i *A. creber*. Za sve vrste je utvrđeno da proizvode STC pri čemu najveći potencijal pokazuje *A. jensenii* ($61,29 \pm 44,48 \mu\text{g/mL}$ STC). Ispitivanje citotoksičnosti provedeno je na A549 stanicama i dobivena IC_{50} vrijednost $>3,2 \mu\text{g/mL}$. Dodatno, ispitivanjem je utvrđeno da uz STC *A. jensenii* proizvodi i 5-MET-STC za razliku od *A. versicolor* te je puno zastupljeniji u zraku stambenih prostora (Jakšić Despot i sur., 2016). 2011. godine provedeno je ispitivanje citotoksične aktivnosti pojedinih derivata sterigmatocistina među kojima i 5-MET-STC-a na A549 staničnoj liniji. On je jedini od ispitanih derivata pokazao umjerenu citotoksičnost s IC_{50} vrijednosti $3,86 \mu\text{M}$ (Cai i sur., 2011). Našim ispitivanjem dobivena je vrijednost $\text{IC}_{50} = 140 \mu\text{M} \pm 1$ na A549 stanicama. Dobiveni rezultati pokazuju 36 puta manju toksičnost od onih u ispitivanju iz 2011. godine. Razlog tome može biti u samoj metodi provođenja ispitivanja gdje se 2011. godine koristio MTT test i gledala toksičnost nakon 72 h izloženosti, dok smo mi u ispitivanju koristili MTS test i očitavali rezultate nakon 24-satne izloženosti. Još jedna studija sagledavala je potencijalni citotoksični i genotoksični učinak 5-MET-STC na A549 stanicama (Jakšić i sur., 2012). U tom istraživanju dobivena je vrijednost $\text{IC}_{50} = 181 \mu\text{M} \pm 2,6$, što se relativno podudara s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Očitavala se toksičnost u oba istraživanja nakon 24-satne izloženosti, ali metode nisu bile u potpunosti jednake. Prvotna je koristila MTT test, a ova MTS test. Ispitivanjem toksičnosti STC-a na A549 stanicama dobivena je $\text{IC}_{50} 3,7 \mu\text{M}$ (Bunger i sur., 2004). Uspoređujući s rezultatima za STC možemo reći da je 5-MET-STC pokazao 38 puta manji toksični učinak na A549 stanicama od STC nakon 24h izloženosti.

U prikazanom istraživanju druga korištena stanična linija je HepG2. Stanice hepatocelularnog karcinoma jetre funkcionalno su najbližnje stanicama jetre i idealne za ispitivanje hepatotoksičnosti i genotoksičnosti. Mikotoksini koji u organizam dopiju ingestijom metaboliziraju se, biotransformiraju i detoksificiraju putem jetre. Do sada su sva ispitivanja potencijalne citotoksičnosti i genotoksičnosti 5-MET-STC-a provedena na varijacijama plućnih stanica te nema dostupnih literaturnih podataka za njegov učinak na HepG2 stanicama. STC pokazuje genotoksični učinak na HepG2 preko oksidativnog stresa i pucanja lizosoma. U istraživanju iz 2015. godine nakon 24-satne izloženosti stanica STC-u dobivena je vrijednost IC_{50} 3 μ M korištenjem MTT testa (Gao i sur., 2015). Liu i suradnici korištenjem SRB metode dobili su vrijednosti IC_{50} 7,3 μ M za STC na HepG2 stanicama nakon 24h izloženosti. Razlike u dobivenim rezultatima vjerojatno proizlaze iz različitih korištenih metoda za mjerenje stanične vijabilnosti. Navedeno istraživanje prikazalo je da STC uzrokuje prekid staničnog ciklusa HepG2 stanica što u konačnici vodi do apoptoze stanice (Liu i sur., 2014). Našim istraživanjem utjecaja 5-MET-STC-a na HepG2 stanice dobivena je vrijednost $IC_{50} = 40,83 \mu\text{M} \pm 1,2$. U odnosu na prethodna istraživanja provedena na STC-u, vrijednost IC_{50} za 5-MET-STC je 13 odnosno 6 puta veća. Ipak rezultate ne možemo direktno uspoređivati jer se ne radi o istome toksinu niti istoj metodi, ovdje je korišten MTS test o kojem za sada nema podataka u literaturi vezano za citotoksičnost 5-MET-STC.

S obzirom na puno niže vrijednosti IC_{50} dobivene na HepG2 stanicama, nego na A549 možemo reći da 5-MET-STC pokazuje veću toksičnost na HepG2 stanicama.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih mjerenjem vijabilnosti stanica u staničnim linijama HepG2 i A549 s MTS proliferacijskim testom pri čemu su stanice prethodno tretirane 5-MET-
STC-om u koncentracijskom nizu od 10 različitih koncentracija, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Citotoksične koncentracije 5-MET-
STC za stanice linije A549 koje su se značajno razlikovale od kontrole redom iznose: 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M i 200 μ M što je vidljivo iz vijabilnosti stanica pri tim koncentracijama
- IC₅₀, koncentracija 5-MET-
STC koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50% iznosi 140 μ M \pm 1.
- Citotoksične koncentracije 5-MET-
STC za stanice linije HepG2 koje se značajno razlikuju od kontrole također se nalaze u rasponu koncentracija od 5 μ M do 200 μ M.
- IC₅₀, koncentracija 5-MET-
STC koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije HepG2 za 50% iznosi 40,83 μ M \pm 1,2.
- Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je 5-MET-
STC 3,5 puta toksičniji za HepG2 stanice u odnosu na stanice A549, time možemo zaključiti da su jetrene stanice osjetljivije na 5-MET-
STC nego plućne stanice.

6. LITERATURA

- Balogh K, Kövesi B, Zándoki E, Kulcsár S, Ancsin Z, Erdélyi M, Dobolyi C, Bata-Vidács I, Inotai K, Szekeres A, Mézes M, Kukolya J. Effect of Sterigmatocystin or Aflatoxin Contaminated Feed on Lipid Peroxidation and Glutathione Redox System and Expression of Glutathione Redox System Regulatory Genes in Broiler Chicken. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2019, 8, 10.3390/antiox8070201
- Bedard LL, Massey TE. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett*, 2006, 241, 174–183.
- Bennett JW. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 1987, 100, 3–5.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497–516.
- Blackburn C de W. Food spoilage microorganisms. CRC Press, 2006, 451–487
- Bunger 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*, 2014a, 44, 1–9.
- Cabaret O, Puel O, Botterel F, Delaforge M, Bretagne S. Metabolic detoxification pathways for 5-methoxy-sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Xenobiotica*, 2014b, 44, 1–9.
- 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.
- Cui J, Wang J, Huang S, Jiang X, Li Y, Wu W, Zhang X. Sterigmatocystin induced apoptosis in human pulmonary cells in vitro. *Exp Toxicol Pathol*, 2017, 69, 695–699.
- 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.
- Dickens F, Jones HE, Waynforth HB. Oral, subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances: the intratracheal administration of cigarette tar

in the rat. *Br J Cancer*, 1966, 20, 134–144.

el-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J Food Prot*, 1998, 61, 466–8.

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 U S A*, 1979, 76, 179–83.

Fink-Grenmels J. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Vet Q*, 1999, 21, 115–120.

Gao W, Jiang L, Ge L, Chen M, Geng C, Yang G, Li Q, Ji F, Yan Q, Zou Y, Zhong L, Liu X. Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicol Vitro*, 2015, 29, 1–7.

Grenier B, Bracarense A-PFL, Schwartz HE, Luciola J, Cossalter A-M, Moll W-D, Schatzmayr G, Oswald IP. Biotransformation Approaches To Alleviate the Effects Induced by *Fusarium* Mycotoxins in Swine. *J Agric Food Chem*, 2013, 61, 6711–6719.

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

Jay JM. *Modern Food Microbiology*. Dordrecht, Springer Netherlands, 1992, 595–612

Kelman BJ, Robbins CA, Swenson LJ, Hardin BD. Risk from Inhaled Mycotoxins in Indoor Office and Residential Environments. *Int J Toxicol*, 2004, 23, 3–10.

Kiessl K-H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins, *Pure & App! Chem*. 1986, 327–338

Kuczuk MH, Benson PM, Heath H, Wallace Hayes A. Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*, 1978, 53, 11–20.

Liu Y, Du M, Zhang G. Proapoptotic activity of aflatoxin B 1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicol Reports*, 2014, 1, 1076–1086.

Maggon KK, Gupta SK, Venkitasubramanian TA. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol Rev*,

1977, 41, 822–55.

Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A*, 2014, 1362, 145–156.

Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60, 218–237.

Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, Berthiller F, Applegate TJ, Grenier B, Phillips TD, Schatzmayr G. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult Sci*, 2015, 94, 1298–315.

Nel W, Pretorius HE. Effect of sterigmatocystin on rat liver nuclear RNA. *Biochem Pharmacol*, 1970, 19, 957–959.

Nielsen KF, Gravesen S, Nielsen PA, Andersen B, Thrane U, Frisvad JC. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*, 1999, 145, 43–56.

Peraica M, Domijan AM. Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2001, 52, 23–35.

Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ*, 1999, 77, 754–66.

Pfeiffer E, Fleck SC, Metzler M. Catechol Formation: A Novel Pathway in the Metabolism of Sterigmatocystin and 11-Methoxysterigmatocystin. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27, 2093–2099.

Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA, Springer US, 1997, 489–507

Placinta CM, D’mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, 1999, 21-37

Purchase IFH, Van der Watt JJ. Carcinogenicity of sterigmatocystin to rat skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1973, 26, 274–281.

Rajasekaran K, Cary JW, Cleveland TE. Prevention of preharvest aflatoxin contamination through genetic engineering of crops. *Mycotoxin Res*, 2006, 22, 118–124.

Schuhmacher R, Krska R, Weingaertner J, Grasserbauer M. Interlaboratory comparison study

for the determination of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. *Fresenius J Anal Chem*, 1997, 359, 510–515.

Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J*, 2013, 11, 3254.

Tang A, Shenoy B, Hyde K. Fungal Diversity. In *Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa*, CRC Press, 2006, 227–249

Tang T, Friedman MA. Carcinogen activation by human liver enzymes in the ames mutagenicity test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*, 1977, 46, 387–394.

Van Burik J-AH, Magee PT. Aspects of Fungal Pathogenesis in Humans. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55, 743–772.

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

Vesonder RF, Horn BW. Sterigmatocystin in dairy cattle feed contaminated with *Aspergillus versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49, 234–5.

7 SAŽETAK / SUMMARY

7.1 SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni te mogu predstavljati rizik za ljudsko zdravlje. Glavni putevi dospijevanja mikotoksina u ljudski organizam su ingestija putem hrane ili inhalacija spora koje sadržavaju mikotoksin.

5-metokisterigmatocistin (5-MET-STC) je metoksi derivat dobro poznatog sterigmatocistina (STC). Među najznačajnijim proizvođačima oba toksina je plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Versicolores* koja nastanjuje vlažne stambene prostore, a uz to značajan je kontaminant hrane. Sterigmatocistin pokazuje akutnu nefrotoksičnost i hepatotoksičnost te je karcinogen 2B skupine prema IARC-u. 5-metoksisterigmatocistin nije još toliko istražen kao njegov prekursor, ali s obzirom na veliku sličnost u strukturi istražuje se njegov potencijalni citotoksični i genotoksični učinak.

Cilj ovoga rada bio je odrediti citotoksične koncentracije 5-MET-STC na ljudskim stanicama adenokarcinoma pluća A549 i stanicama hepatocelularnog karcinoma HepG2 te dobiti IC_{50} , koncentraciju 5-MET-STC koja smanjuje vijabilnost stanica pojedine linije za 50%. Navedene koncentracije određene su primjenom MTS proliferacijskog testa i mjerenjem apsorbancije uz pomoć spektrofotometra na 490 nm.

5-MET-STC je ostvario citotoksične učinke u koncentracijama od 5 μ M do 200 μ M na stanicama linije A549 te u istim koncentracijama i na stanicama linije HepG2. Dobivena je $IC_{50} = 140 \mu\text{M} \pm 1$ za A549 stanice i $IC_{50} = 40,83 \mu\text{M} \pm 1,2$ za HepG2 stanice.

Dobiveni rezultati pokazuju da 5-MET-STC ima citotoksično djelovanje i na A549 i na HepG2 stanicama pri čemu 5-MET-STC pokazuje 3,5 puta toksičniji učinak na HepG2 stanicama. Time se može zaključiti da su jetrene stanice osjetljivije na djelovanje ovog mikotoksina od plućnih stanica.

7.2 SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds and they can represent serious health risk. Humans are exposed to mycotoxins through ingestion of contaminated food or inhalation of spores containing mycotoxins.

5-methoxysterigmatocystin (5-MET-STC) is methoxy derivat of well known sterigmatocystin (STC). One of the main producers of both mycotoxins are *Aspergilli* section *Versicolores*. This mould inhabitates damp indoor spaces and can be significant food contaminant as well. Sterigmatocystin demonstrates acute nephrotoxicity and hepatotoxicity and is 2B group carcinogen by IARC classification. There are few literature data containing 5-MET-STC but due to its high structural similarity to STC cytotoxic and genotoxic potentials are explored.

The aim of this study was to determine cytotoxic concentrations of 5-MET-STC in human adenocarcinoma cells A549 and hepatocellular carcinoma cells HepG2 and IC_{50} , concentration of 5-MET-STC that is required to lower the cell viability of each cell line to 50% of maximum viability. Those concentrations were determined by using MTS proliferation assay after which the absorbance was measured using a spectrophotometer at 490 nm.

Concentrations of 5-MET-STC that resulted in cytotoxic effect in both A549 and HepG2 cell line were all from 5 μ M to 200 μ M. Measured IC_{50} for A549 cell line was 140 μ M \pm 1 and 40,83 μ M \pm 1,2 for HepG2.

Obtained results showed that 5-MET-STC demonstrates cytotoxic activity in both cell lines but it is almost 3,5 times more toxic to HepG2 cells. In conclusion, liver cells are more susceptible to toxicity of 5-MET-STC than lung cells.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

CITOTOKSIČNOST 5-METOKSISTERIGMATOCISTINA ZA LJUDSKE STANICE PLUĆA I JETRE

Dunja Palija

SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni te mogu predstavljati rizik za ljudsko zdravlje. Glavni putevi dospijevanja mikotoksina u ljudski organizam su ingestija putem hrane ili inhalacija spora koje sadržavaju mikotoksin. 5-metokisterigmatocistin (5-MET-STC) je metoksi derivat dobro poznatog sterigmatocistina (STC). Među najznačajnijim proizvođačima oba toksina je plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Versicolores* koja nastanjuje vlažne stambene prostore, a uz to značajan je kontaminant hrane. Sterigmatocistin pokazuje akutnu nefrotoksičnost i hepatotoksičnost te je karcinogen 2B skupine prema IARC-u. 5-metoksisterigmatocistin nije još toliko istražen kao njegov prekursor, ali s obzirom na veliku sličnost u strukturi istražuje se njegov potencijalni citotoksični i genotoksični učinak. Cilj ovoga rada bio je odrediti citotoksične koncentracije 5-MET-STC na ljudskim stanicama adenokarcinoma pluća A549 i stanicama hepatocelularnog karcinoma HepG2 te dobiti IC_{50} , koncentraciju 5-MET-STC koja smanjuje vijabilnost stanica pojedine linije za 50%. Navedene koncentracije određene su primjenom MTS proliferacijskog testa i mjerenjem apsorbancije uz pomoć spektrofotometra na 490 nm. 5-MET-STC je ostvario citotoksične učinke u koncentracijama od 5 μ M do 200 μ M na stanicama linije A549 te u istim koncentracijama i na stanicama linije HepG2. Dobivena je $IC_{50} = 140 \mu\text{M} \pm 1$ za A549 stanice i $IC_{50} = 40,83 \mu\text{M} \pm 1,2$ za HepG2 stanice. Dobiveni rezultati pokazuju da 5-MET-STC ima citotoksično djelovanje i na A549 i na HepG2 stanicama pri čemu 5-MET-STC pokazuje 3,5 puta toksičniji učinak na HepG2 stanicama. Time se može zaključiti da su jetrene stanice osjetljivije na djelovanje ovog mikotoksina od plućnih stanica.

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

Rad sadrži: 28 stranica, 6 grafičkih prikaza, 2 tablice i 43 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: 5-metoksisterigmatocistin, A549, HepG2, IC_{50}

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Daniela Jakšić, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

CYTOTOXIC EFFECTS OF 5-METHOXYSTERIGMATOCYSTIN A IN HUMAN LUNG AND LIVER CELLS

Dunja Palija

SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds and they can represent serious health risk. Humans are exposed to mycotoxins through ingestion of contaminated food or inhalation of spores containing mycotoxins. 5-methoxysterigmatocystin (5-MET-STC) is methoxy derivat of well known sterigmatocystin (STC). One of the main producers of both mycotoxins are Aspergilli section *Versicolores*. This mould inhabitates damp indoor spaces and can be significant food contaminant as well. Sterigmatocystin demonstrates acute nephrotoxicity and hepatotoxicity and is 2B group carcinogen by IARC classification. There are few literature data containing 5-MET-STC but due to its high structural similarity to STC cytotoxic and genotoxic potentials are explored. The aim of this study was to determine cytotoxic concentrations of 5-MET-STC in human adenocarcinoma cells A549 and hepatocellular carcinoma cells HepG2 and IC_{50} , concentration of 5-MET-STC that is required to lower the cell viability of each cell line to 50% of maximum viability. Those concentrations were determined by using MTS proliferation assay after which the absorbance was measured using a spectrophotometer at 490 nm. Concentrations of 5-MET-STC that resulted in cytotoxic effect in both A549 and HepG2 cell line were all from 5 μ M to 200 μ M. Measured IC_{50} for A549 cell line was 140 μ M \pm 1 and 40,83 μ M \pm 1,2 for HepG2.

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

Thesis includes: 28 pages, 6 figures, 2 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: 5-methoxysterigmatocystin, A549, HepG2, IC_{50}

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: September 2019.