

Ispitivanje interakcija mikotoksina sterigmatocistina ciklodekstrinima i humanim serumskim albuminom spektrofotometrijskim metodama

Šćur, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:302430>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-09-30**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Šćur

**Ispitivanje interakcija mikotoksina
sterigmatocistina sa ciklodekstrinima i humanim
serumskim albuminom spektrofotometrijskim
metodama**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021. godina.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Daniele Jakšić i prof. dr. sc. Ive Piantanide.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 2. Obrazloženje teme..... | 4 |
| 3. Materijali i metode | 5 |
| 3.1. Kemikalije | 5 |
| 3.2. Instrumenti..... | 5 |
| 3.3. Priprema reagensa..... | 5 |
| 3.4. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima i HSA metodom UV/Vis spektroskopije..... | 6 |
| 3.5. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima i HSA metodom spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD)..... | 6 |
| 3.6. Ispitivanje interakcije STC sa HSA, CXD- γ , CXD-Br i CXD- β metodom fluorimetrije..... | 7 |
| 3.6.1. Ispitivanje interakcije pretpostavljenog kompleksa STC-HSA dodatkom CXD- γ , CXD-Br i CXD- β metodom fluorimetrije..... | 7 |
| 3.7. Obrada podataka..... | 7 |
| 4. Rezultati | 8 |
| 4.1. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima i HSA metodom UV/Vis spektroskopije..... | 8 |
| 4.2. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima i HSA metodom spektroskopije cirkularnog dikroizma | 11 |
| 4.3. Ispitivanje interakcije STC sa HSA, CXD- γ , CXD-Br i CXD- β metodom fluorimetrije..... | 14 |
| 4.3.1. Ispitivanje interakcije pretpostavljenog kompleksa STC-HSA dodatkom CXD- γ , CXD-Br i CXD- β metodom fluorimetrije..... | 15 |
| 5. Rasprava..... | 17 |
| 6. Zaključci..... | 19 |
| 7. Literatura | 20 |
| 8. Sažetak | 23 |
| 9. Summary | 24 |
| 10. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card | 25 |

1. Uvod

Humani serumski albumin (HSA) spada u najzastupljenije proteine cirkulacije. Ima brojne fiziološke funkcije uključujući regulaciju koloidno osmotskog tlaka i transport masnih kiselina, hormona, žučnih soli, aminokiselina, metala i toksičnih metabolita. Sudjeluje i u transportu lijekova i ksenobiotika do ciljnog organa ili tkiva (Yang i sur., 2014). Praćenje interakcija lijekova sa HSA važno je zbog uloge u raspodjeli istih u organizmu, njihovoj eliminaciji, a posebno za procjenu njihovih željenih i neželjenih učinaka (Fanali i sur., 2012). Osim lijekova u interakcije sa HSA stupaju i drugi ksenobiotici među koje spadaju i različiti toksini. Vežanje toksina poput arazina, metil parationa i arsena za HSA dovodi do konformacijskih promjena proteina HSA što posljedično utječe na fiziološke funkcije proteina te pridonosi drugim potencijalno negativnim biološkim učincima (Gao i sur., 2008).

U središtu pozornosti ovoga diplomskog rada su mikotoksini, toksični produkti sekundarnog metabolizma plijesni. Mikotoksine nalazimo u različitim supstratima okolišu kao što je voda, tlo, prašina, žitarice, voće, povrće te hrana životinjskog porijekla. Stoga ljudi i životinje mogu biti izloženi mikotoksinima ingestijom kontaminirane hrane, inhalacijom ili putem kože i sluznica (Marin i sur., 2013). Najistraživaniji i najpoznatiji među mikotoksinima svakako je aflatoxin B₁ (AFB₁) kojega je Svjetska agencija za istraživanje raka (IARC, engl. International Agency for Resaerch on Cancer) zbog dokazane uzročno-posljedične veze sa hepatocelularnim tumorom svrstala u grupu 1 kancerogena (IARC, 2012). Upravo istraživanje albuminskih adukata AFB₁ u plazmi predstavlja početak procjene izloženosti kemikalijama iz hrane na temelju biomarkera (Gan i sur., 1988). Zbog svoje zastupljenosti u hrani i okolišu te kancerogenih učinaka dokazanih na životinjskim modelima (IARC 2B) kontroliraju se i istražuju i drugi mikotoksini poput okratoksina A (OTA), citrinina (CTN), zearalenona (ZEA) deoksinivanelola (DON) te fumonizini, osobito fumonizin B₁ (FB₁) (Marin i sur., 2013). Mikotoksini CTN, OTA, ZEA i AFB₁ stupaju u interakcije s HSA (Bagheri i Fatemi, 2018; Poór i sur., 2017, 2015; Perry i sur., 2003), pri čemu OTA i AFB₁ tvore stabilnije komplekse sa HSA u odnosu na mikotoksine ZEA ili CTN (tablica 1).

Tablica 1. Afinitet vežanja nekih mikotoksina i HSA

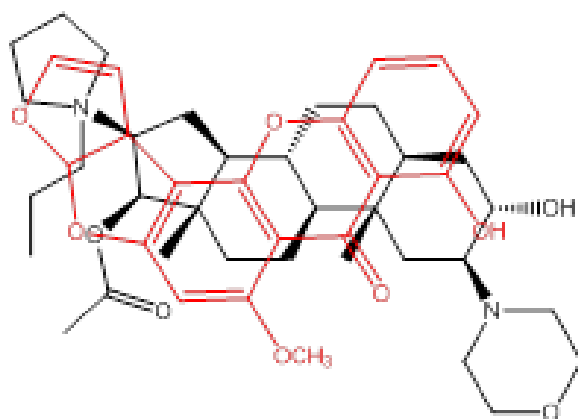
| Mikotoksin | logK |
|------------------|------|
| CTN | 5,30 |
| OTA | 6,71 |
| ZEA | 5,10 |
| AFB ₁ | 6,90 |

Mikotoksin sterigmatocistin (STC) furofuranski je prekursor u biosintezi AFB₁ koji ovisno o staničnom ili životinjskom modelu pokazuje različite toksične učinke u odnosu na AFB₁ (EFSA, 2013), a spada u potencijalne kancerogene za ljude (IARC 2B). Za razliku od AFB₁ koji je uglavnom zastupljen u žitaricama i orašastim plodovima (JECFA, 2008), STC je mnogo više zastupljen u prašini različitih zatvorenih prostora uključujući skladišta hrane, ali i prostore u kojima ljudi borave i rade (Jakšić i sur., 2020; Jakšić Despot i sur., 2016; Veršilovskis i de Saeger, 2010; Tangni i Pussemier, 2007; Engelhart i sur., 2002). Jedan od mehanizama kojim STC ispoljava toksične učinke podrazumijeva nastajanje reaktivne epoksi skupine koja se kovalentno veže na DNA molekulu stvarajući STC-N₇-gvanin adukt (Essigmann i sur., 1979). Međutim, nedavna istraživanja upućuju na moguću ulogu nekovalentnih interakcija STC sa DNA i polinukleotidima u toksičnosti STC (Jakšić i sur., 2019).

Ciklodekstrini (CXD) su ciklički oligosaharidi građeni od šest do osam glukopiranoznih jedinica. Lako su topivi u vodi zahvaljujući brojnim hidroksi skupinama s vanjske strane, dok hidrofobna unutrašnjost predstavlja temelj inkluzijskih kompleksa s malim organskim molekulama (Topuz i Uyar, 2019). CXD imaju primjenu i kao aktivni farmaceutski sastojci koji se koriste u terapiji infekcija, kardiovaskularne disfunkcije, metaboličkih bolesti, kao i u biomedicinskoj tehnologiji (Davis i Brewster, 2004). Odobreni CXD za terapijske svrhe su hidroksipropil-beta-ciklodekstrin (HPβCD) i Sugamadeks (Braga, 2019). Sugamadeks je anionski γ-CXD derivat dizajniran da uzrokuje reverziju muskularne blokade uzrokovanu rokuronijevim bromidom. Sugamadeks veže rokuronij specifično i s vrlo visokim afinitetom u molarnom omjeru 1:1 uz konstantu asocijacije $1,03 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Yang i Keam, 2009). U Hrvatskoj je Sugamadeks registriran kao lijek Bridion (Registar lijekova u Hrvatskoj, 2020). Prema dostupnoj literaturi CXD su prepoznati u detekciji mikotoksina te se primjenjuju u separacijskoj kromatografiji, ali i kao dodatak hranjivom mediju za kvalitativnu i kvantitativnu procijenu prisutnosti toksina (Galaverna i sur., 2008). Prijašnja istraživanja ističu da neki CXD, osobito β-CXD mogu formirati komplekse s nekim mikotoksinima, uključujući AFB₁ i druge aflatoksine, CTN, OTA i ZEA (Appell i Maragos, 2009). Najviše je dostupnih podataka za AFB₁ koji tvori komplekse sa CXD u omjeru 1:1, uz slabi afinitet vezanja $3,09 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ za CXD-β (Dall' Asta i sur., 2003). Nekoliko studija pokazalo je da CXD mogu biti korisni u ekstrakciji mikotoksina iz vodenih otopina kao i pića poput piva, vina, sokova (Mohos i sur. 2021; Faisal i sur. 2020; Faisal i sur. 2019; Appell i sur. 2019; Poór i sur. 2018; Appell i Jackson 2010).

Interakcije STC i CXD slabo su istražene. Fluorescentna proba tipa MIP@ β -CXD/CNNS¹ modificirana je sa β -CXD u svrhu optimizacije metode za dokazivanje STC u žitaricama (Shi i sur., 2019). Nedavno objavljeno istraživanje pokazuje da β -CXD polimer² veže do 80% STC (2 μ M) otopljenog u puferiranim vodenim otopinama pH vrijednosti od 3-7 (Mohos i sur., 2021).

Obzirom na spomenuti visoki afinitet vezanja rokuronija za Sugamadeks te strukturnu sličnost STC i rokuronija (slika 1) korisno je ispitati prirodu interakcije STC i Sugamadeksa te poredbeno sa nativnim CXD- γ i CXD- β . Usporedbom sa interakcijama STC i HSA procijeniti će se uloga različitih CXD kod trovanja sa STC.



Slika 1. Preklopanjem struktura rokuronija (crno) i sterigmatocistina (crveno) može se uočiti konformacijska podudarnost ovih spojeva

¹ CNNS- nanočestice ugljikovog nitrida

² β -ciklodekstrin-epiklorohidrin unakrsno polimerizirane perlice

2. Obrazloženje teme

STC je toksični, mutageni i genotoksični mikotoksin dokazanoga kancerogenoga učinka u životinjama (IARC 2B), a prekursor je i u biosintezi AFB₁ koji se povezuje sa hepatocelularnim karcinomom kod ljudi (grupa IARC 1). Budući da je STC jedan od najzastupljenijih mikotoksina u zatvorenim unutarnjim prostorima, osobito u prašini, STC predstavlja opasnost za zdravlje ljudi u stambenim i radnim sredinama ukoliko dođe do inhalacije kontaminirane prašine.

CXD ciklički su oligosaharidi koji u vodenim otopinama stvaraju inkluzijske komplekse s malim organskim spojevima. Sugamadeks je modificirani oblik CXD- γ , a koristi se kao lijek Bridion kod reverzije intramuskularne blok anestezije.

Poznato je da CXD, osobito CXD- β , stupaju u značajne interakcije sa AFB₁ pri čemu dolazi do pojačavanja intenziteta fluorescencije AFB₁ pa se stoga CXD primjenjuju u kromatografskim metodama dokazivanja ovoga mikotoksina. Obzirom na konformacijsku podudarnost kemijskih struktura STC i anestetika rokuronija, kao i na sličnost u kemijskim strukturama STC i AFB₁, može se pretpostaviti interakcija STC sa CXD o čemu su podaci u literaturi limitirani.

Cilj ovoga rada je spektroskopskim metodama (UV/Vis i CD) ispitati interakcija STC sa CXD- β , CXD- γ - te sa lijekom Bridion. Nadalje, metodom fluorimetrije u kompetitivnom eksperimentu ispitati će se istiskivanje STC iz kompleksa sa HSA nakon dodataka pojedinih CXD.

Stoga je specifični cilj ovoga rada na temelju izračunatih konstanti vezanja STC i HSA, odnosno različitih CXD, ispitati mogućnost korištenja CXD kao antidota kod intoksikacije sa STC.

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

- STC (Sigma Aldrich, Darmstad, Njemačka)
- Bridion (Merck Sharp & Dohme Limited, Hertfordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo, donirano ljubaznošću tvrtke Medika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Beta ciklodekstrin hidrat (Alfa Aesar, Hengelo, Nizozemska)
- Gama ciklodekstrin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Humani serumski albumin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Kakodilatni pufer ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$) priređuje se miješanjem 0,2 M otopine natrijevog kakodilata sa 0,2 M otopinom kloridne kiseline. Otopina odgovarajuće ionske jakosti i pH dopuni se destiliranom vodom do potrebnog volumena. U svim ispitivanjima korišten je pufer ionske jakosti $I = 50$ mmol i pH vrijednosti $7,0 \pm 0,02$.

3.2. Instrumenti

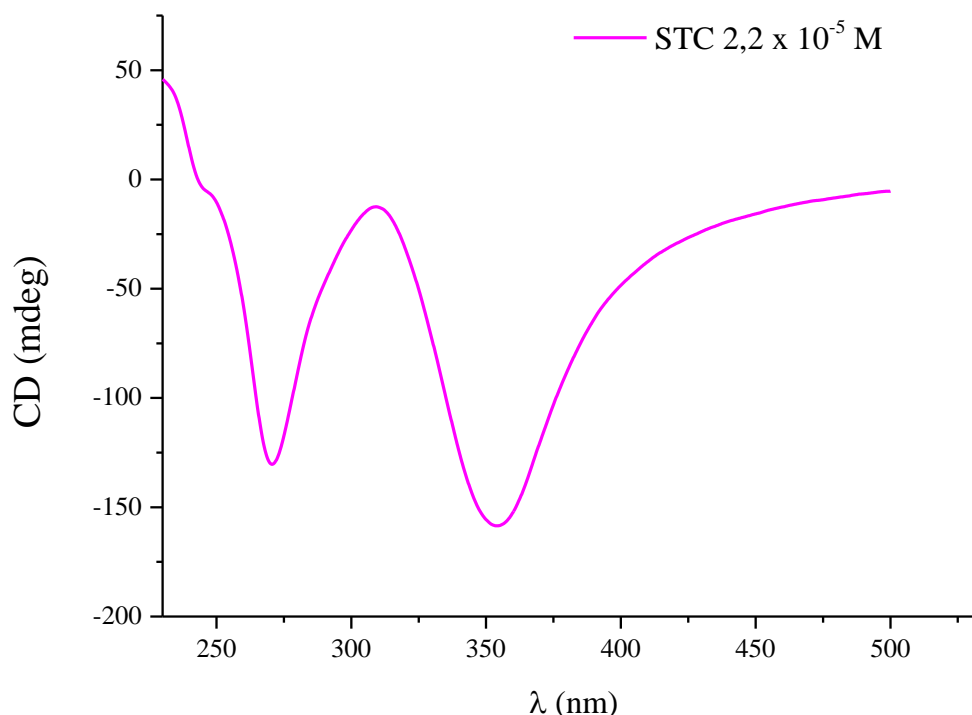
- Ultrazvučna vodena kupelj (Bandelin, tip: RK-100, Njemačka)
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Gießen, Njemačka)
- UV/Vis spektrofotometar Varian Cary 100Bio (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- Spektrometar cirkularnog dikroizma JASCO J-815 spectropolarimeter (Jasco Inc., Tokyo, Japan)
- Fluorimetar Varian Cary Eclipse fluorimeter (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)

3.3. Priprema reagensa

Matične otopine CXD- β (0,005 M), CXD- γ (0,01 M) te HSA ($1,73 \times 10^{-4}$ M), pripravljeni su otapanjem u kakodilatnom puferu dok je korištena originalna otopina Bridiona[®] (CXD-Br; 0,077 M). Daljnja razrjeđenja za provođenje titracije priređivana su u kakodilatnom puferu.

U titracijama je korištene ili matična otopina STC u acetonitrilu ($8,9 \times 10^{-3}$ M) ili otopina priređenog STC agregata u kakodilatnom puferu ($2,2 \times 10^{-5}$ M). Pri tome je agregat STC priređen razrjeđivanjem matične otopine STC u acetonitrilu ($8,9 \times 10^{-3}$ M) sa kakodilatnim puferom do koncentracije STC u puferu $2,2 \times 10^{-5}$ M. Nakon inkubacije 30 minuta na sobnoj temperaturi,

tvorba agregata dokazana je na temelju karakterističnog CD signala (slika 2). U pokusima je isključen utjecaj acetonitrila na mjerenje.



Slika 2. CD spektar STC agregata ($2,2 \times 10^{-5}$ M, kakodilatni pufer pH 7,0, $l=50$ mmol)

3.4. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima CXD- γ , CXD-Br i CXD- β i HSA metodom UV/Vis spektroskopije

Titracije otopine STC (2×10^{-5} M) u kakodilatnom puferu provedene su sa CXD- γ (0,001 M), CXD-Br ($4,6 \times 10^{-4}$ M), CXD- β (0,005 M) i HSA ($1,74 \times 10^{-4}$ M). UV/Vis spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina od 220-550 nm na Varian Cary 100 Bio spektrometru (Varian Inc, Palo Alto, CA, SAD) na sobnoj temperaturi koristeći kvarne kivete (1 cm). Svi spektri korigirani su za baznu liniju tj. spektar pufera te obzirom na povećanje volumena u kivetu.

3.5. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima CXD- γ , CXD-Br i CXD- β i HSA metodom spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD)

Titracije agregata STC (2×10^{-6} M) u kakodilatnom puferu provedene su sa matičnim otopinama CXD- γ (0,001 M), CXD-Br ($4,6 \times 10^{-4}$ M)³, CXD- β (0,005 M) i HSA ($1,74 \times 10^{-4}$ M) u

³ Originalna otopina iz ampule (0,077 M) razrijeđena je kakodilatnim puferom

kakodilatnom puferu. CD spektri snimljeni su na JASCO J-815 spektropolarimetru (Jasco Inc., Tokyo, Japan) na sobnoj temperaturi koristeći kvarcne kivete (1 cm) i brzinu skeniranja 200 nm/min (prosjeak od 3 akumulacije) u rasponu valnih duljina od 220-550 nm. Svi spektri korigirani su za baznu liniju tj. spektar pufera te obzirom na povećanje volumena u kivetima.

3.6. Ispitivanje interakcije STC sa HSA metodom fluorimetrije

Titracija otopine HSA u kakodilatnom puferu (2×10^{-6} M) provedena je dodacima STC iz matične otopine u acetonitrilu ($8,9 \times 10^{-3}$ M). Fluorescentni spektri su mjereni na Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru (Agilent Technologies), s kvarcnim kivetama (1 cm). Korištena valna duljina pobude bila je 280 nm, a emisijski spektar sniman je u rasponu 300-500 nm. Slitovi na instrumenti podešeni su na vrijednost 10/10.

3.6.1. Ispitivanje interakcije pretpostavljenog kompleksa STC+HSA dodatkom ciklodekstrina CXD- γ , CXD-Br i CXD- β metodom fluorimetrije

U fluorimetrijskom kompetitivnom eksperimentu provodila se titracija pretpostavljenog HSA+STC kompleksa u kakodilatnom puferu dodacima matičnih otopina CXD- γ (0,01 M) i CXD- β (0,005 M) u kakodilatnom puferu te originalne otopine CXD-Br (0,077 M). Korištena valna duljina ekscitacije bila je 280 nm ili 295 nm, a emisijski spektri snimani su u rasponu 300-500 nm. Slitovi na instrumenti podešeni su na vrijednost 10/10.

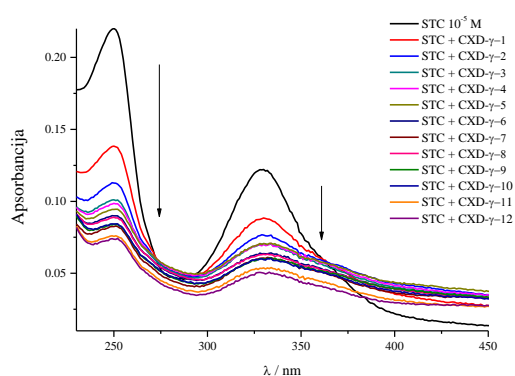
3.7. Obrada podataka

Svi podaci su obrađeni u programskim paketima Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD) i Origin Lab 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, SAD).

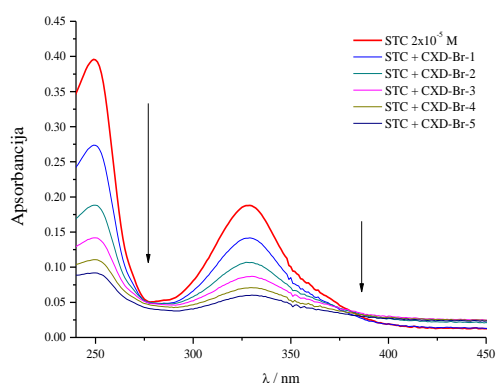
4. Rezultati

4.1. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima CXD- γ , CXD-Br i CXD- β i HSA metodom UV/Vis spektroskopije

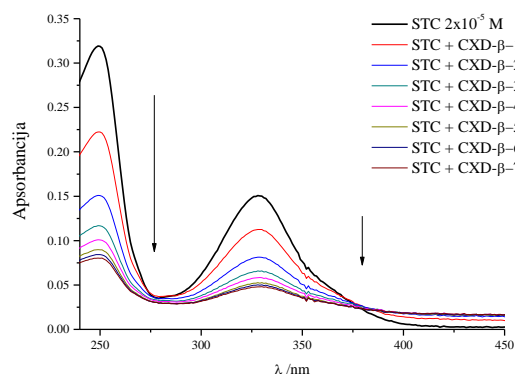
UV/Vis spektar STC karakteriziraju dva apsorpcijska maksimuma na 262 nm i 330 nm. Dodavanjem CXD- γ , CXD- β i CXD- γ -Br primjećuje se snižavanje apsorpcije na oba apsorpcijska maksimuma (slika 3). Nadalje, primjećuje se i blagi pomak ulijevo za 3 nm. Podizanja bazne linije upućuje na agregiranje STC u vodenoj sredini (slika 3).

a

| Br dodatka | c (CXD- γ), M | c (STC), M |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $4,99 \times 10^{-7}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 2 | $9,97 \times 10^{-7}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 3 | $1,49 \times 10^{-6}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 4 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 5 | $2,49 \times 10^{-6}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 6 | $2,99 \times 10^{-6}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 7 | $3,48 \times 10^{-6}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 8 | $3,98 \times 10^{-6}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 9 | $4,47 \times 10^{-6}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 10 | $4,97 \times 10^{-6}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 11 | $1,09 \times 10^{-5}$ | $1,98 \times 10^{-5}$ |
| 12 | $1,67 \times 10^{-5}$ | $1,97 \times 10^{-5}$ |

b

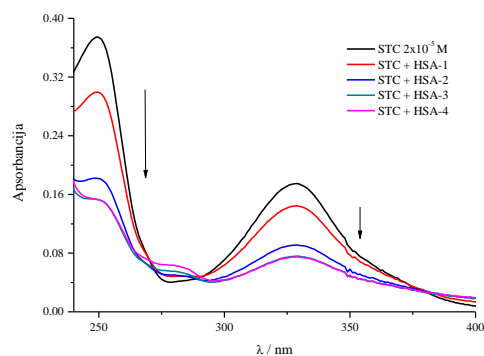
| Br dodatka | c (CXD-Br), M | c (STC), M |
|------------|------------------------|-----------------------|
| 1 | $9,68 \times 10^{-10}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 2 | $4,82 \times 10^{-9}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 3 | $9,59 \times 10^{-9}$ | $1,98 \times 10^{-5}$ |
| 4 | $4,58 \times 10^{-6}$ | $1,89 \times 10^{-5}$ |
| 5 | $1,10 \times 10^{-5}$ | $1,76 \times 10^{-5}$ |

c

| Br dodatka | c (CXD- β), M | c (STC), M |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $5,00 \times 10^{-6}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 2 | $9,98 \times 10^{-6}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 3 | $1,50 \times 10^{-5}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 4 | $1,99 \times 10^{-5}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 5 | $2,49 \times 10^{-5}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 6 | $2,98 \times 10^{-5}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |
| 7 | $3,48 \times 10^{-5}$ | $1,99 \times 10^{-5}$ |

Slika 3. Prikaz promjene UV spektra STC nakon titracije sa CXD- γ (a), CXD-Br (b) i CXD- β (c); smjer strelice na grafu upućuje na smanjenje apsorpcijskih maksimuma STC na 262 nm i 330 nm. Koncentracije CXD- γ , CXD-Br i CXD- β te promjena koncentracije STC zbog promjene volumena u kiveti tokom titracije prikazane su tablično uz pojedini graf.

Ispitivanje interakcija STC sa HSA provodilo se titracijom STC agregata (2×10^{-5} M) sa rastućim koncentracijama HSA (slika 4). Hipokromni pomak apsorpcijskog maksimuma na 330 nm izraženiji je u odnosu na titraciju sa različitim CXD. Daljnjim dodacima dolazi do rasta apsorbanije HSA te interferencije sa apsorbanijom STC (nije prikazano).



| Br dodatka | c (HSA), M | c (STC), M |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 1.69×10^{-7} | 1.78×10^{-5} |
| 2 | 3.39×10^{-7} | 1.78×10^{-5} |
| 3 | 5.07×10^{-7} | 1.78×10^{-5} |
| 4 | 6.76×10^{-7} | 1.78×10^{-5} |

Slika 4. Prikaz UV spektra titracije STC (2×10^{-5} M) s HSA (a); strelice na grafu upućuju na smanjenje oba apsorpcijska maksimuma (250 i 330 nm).

Iz nelinearne ovisnosti intenziteta apsorbanije na 330 nm naspram koncentracije CXD odnosno HSA izračunat je afinitet vezanja STC za CXD- γ , CXD-Br, CXD- β i HSA (tablica 2). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da STC ima 10–15 veći afinitet vezanja za HSA u odnosu na CXD. Što se tiče ciklodekstrina, STC pokazuje najveći afinitet za CXD-Br (tablica 2).

Tablica 2. Afiniteti vezanja ($\log K$) STC sa CXD- γ , CXD-Br, CXD- β i HSA izračunati iz naznačenih jednadžbe krivulje ovisnosti apsorbanije o koncentraciji liganda CXD- γ , CXD-Br, CXD- β i HSA na valnoj duljini maksimuma apsorbanije STC (330 nm)

| Kompleks | $\log K$ | Funkcija | R^2 |
|-------------------|----------|--|-------|
| STC+CXD- γ | 5,36 | $y = 0,06 + 0,06e^{-x/9,45 \cdot 10^{-7}}$ | 0,94 |
| STC+CXD-Br | 5,69 | $y = 0,06 + 0,10e^{-x/2,04 \cdot 10^{-6}}$ | 0,77 |
| STC+CXD- β | 5,01 | $y = 0,04 + 0,11e^{-x/9,78 \cdot 10^{-6}}$ | 0,99 |
| STC+HSA | 6,62 | $y = 0,07 + 0,11e^{-x/2,40 \cdot 10^{-7}}$ | 0,95 |

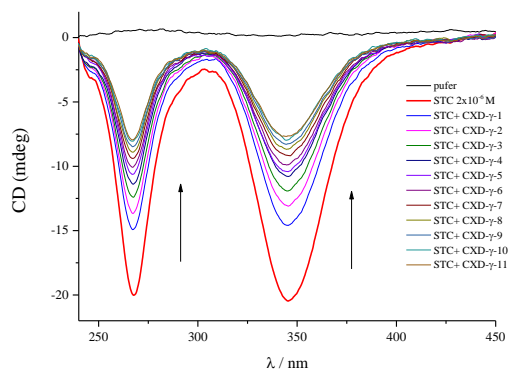
Međutim, treba uzeti u obzir interferenciju agregiranja STC sa smanjenjem apsorpcijskih maksimuma koji su posljedica interakcije STC sa različitim CXD odnosno HSA. Stoga možemo zaključiti da UV/Vis spektrofotometrijska metoda nije prikladna metoda ispitivanja interakcija STC sa HSA odnosno CXD.

4.2. Ispitivanje interakcija STC agregata sa ciklodekstrinima CXD- γ , CXD-Br i CXD- β i HSA metodom spektroskopije cirkularnog dikroizma

CD predstavlja metodu izbora za praćenje reakcija STC i raznih ciklodekstrina, odnosno HSA obzirom da STC agregat daje izuzetno snažan i stabilan CD signal u vodenoj otopini te se jasno mogu pratiti promjene CD spektra tokom titracije. Pri tome se CD signal izmjeren dodatkom čistih CXD odnosno HSA u kiveti ne razlikuje značajno od bazne linije (nije prikazano).

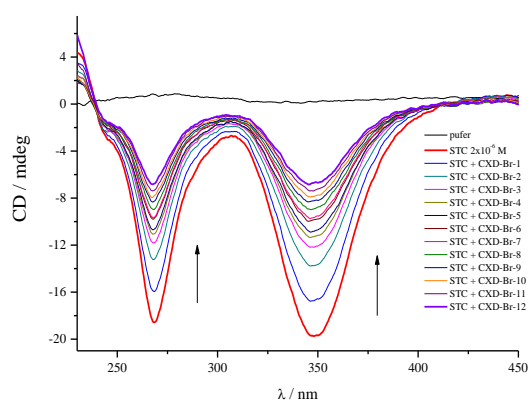
Titracijom otopine STC agregata (2×10^{-6} M) sa rastućim koncentracijama CXD- γ , CXD- β i CXD-Br uočava se smanjenje oba karakteristična maksimuma STC na 268 i 342 nm (slika 5). Uočene promjene upućuju na istiskivanje pojedinih molekula STC iz agregata što se može objasniti interakcijama pojedinih molekula STC sa CXD. Iz omjera koncentracija različitih CXD i STC mogu se izračunati molarni omjeri koji iznose 5:1 za interakciju CXD- γ i STC, 21:1 za CXD-Br i STC te 116:1 za CXD- β i STC.

a



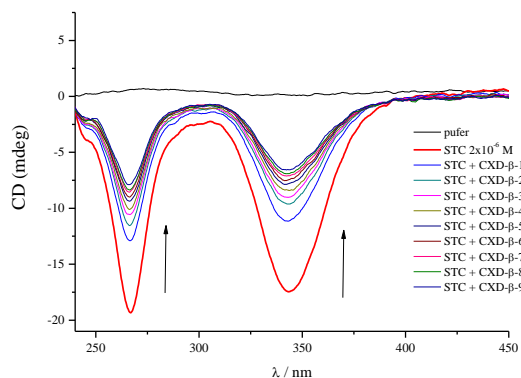
| Br dodatka | c (STC), M | c (CXD- γ), M |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $4,54 \times 10^{-7}$ |
| 2 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $9,08 \times 10^{-7}$ |
| 3 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $1,36 \times 10^{-6}$ |
| 4 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $1,81 \times 10^{-6}$ |
| 5 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $2,27 \times 10^{-6}$ |
| 6 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $2,72 \times 10^{-6}$ |
| 7 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $3,17 \times 10^{-6}$ |
| 8 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $3,62 \times 10^{-6}$ |
| 9 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $4,07 \times 10^{-6}$ |
| 10 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $4,52 \times 10^{-6}$ |
| 11 | $1,98 \times 10^{-6}$ | $9,90 \times 10^{-6}$ |

b



| Br dodatka | c (STC), M | c (CXD-Br), M |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $2,09 \times 10^{-7}$ |
| 2 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $4,18 \times 10^{-7}$ |
| 3 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $6,26 \times 10^{-7}$ |
| 4 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $8,35 \times 10^{-7}$ |
| 5 | $2,00 \times 10^{-6}$ | $1,04 \times 10^{-6}$ |
| 6 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $1,46 \times 10^{-6}$ |
| 7 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $2,29 \times 10^{-6}$ |
| 8 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $3,12 \times 10^{-6}$ |
| 9 | $1,98 \times 10^{-6}$ | $5,17 \times 10^{-6}$ |
| 10 | $1,97 \times 10^{-6}$ | $7,20 \times 10^{-6}$ |
| 11 | $1,91 \times 10^{-6}$ | $2,00 \times 10^{-5}$ |
| 12 | $1,83 \times 10^{-6}$ | $3,83 \times 10^{-5}$ |

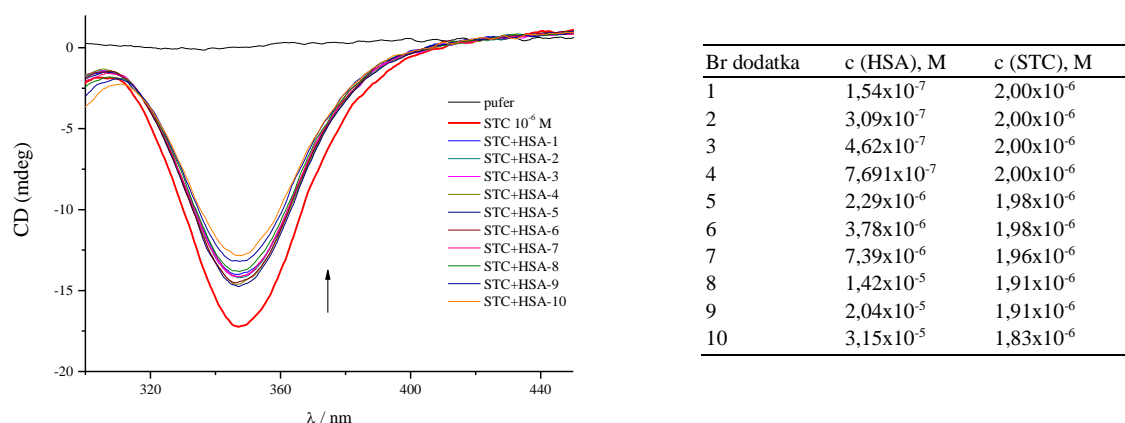
c



| Br dodatka | c (STC), M | c (CXD- β), M |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $2, \times 10^{-6}$ | $4,54 \times 10^{-6}$ |
| 2 | $2, \times 10^{-6}$ | $9,7 \times 10^{-6}$ |
| 3 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $1,36 \times 10^{-5}$ |
| 4 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $1,81 \times 10^{-5}$ |
| 5 | $1,99 \times 10^{-6}$ | $2,71 \times 10^{-5}$ |
| 6 | $1,98 \times 10^{-6}$ | $4,6 \times 10^{-5}$ |
| 7 | $1,98 \times 10^{-6}$ | $4,95 \times 10^{-5}$ |
| 8 | $1,97 \times 10^{-6}$ | $7,17 \times 10^{-5}$ |
| 9 | $1,91 \times 10^{-6}$ | $2,22 \times 10^{-4}$ |

Slika 5. Grafički prikaz CD titracije STC agregata u kakodilatnom puferu (2×10^{-6} M) sa CXD- γ (a), CXD-Br (b) i CXD- β (c); smjer strelice na grafu prati smanjenje intenziteta CD signala; koncentracije CXD- γ , CXD-Br i CXD- β prikazane su u tablicama uz pojedini graf.

Interakcija STC sa HSA ispitana je titracijom otopine STC u kakodilatnom puferu (2×10^{-6} M) rastućim dodacima otopine HSA u istom puferu (slika 6). Iako do izraženijeg smanjenja karakterističnog CD signala na 342 nm dolazi tek kada su koncentracije HSA veće od 10^{-5} M, na završetku titracije CD signal i dalje odgovara agregatu STC (slika 6). Titraciju koncentracijama iznad $2,5 \times 10^{-5}$ M nije bilo moguće provesti zbog ograničenja volumenom kivete te uvjeta agregiranja samog STC. Stoga je u ovome mjerenju prepostavljeni molarni omjer vezanja HSA i STC 17:1.



Slika 6. Grafički prikaz CD titracije STC agregata u kakodilatnom puferu (2×10^{-6} M) sa HSA. Strelica na grafu prati smjer smanjenja intenziteta CD signala agregata STC na 342 nm. Koncentracije HSA u kivetu tokom titracije kao i smanjene koncentracije STC zbog povećanja volumena prikazane su u tablici pored grafa.

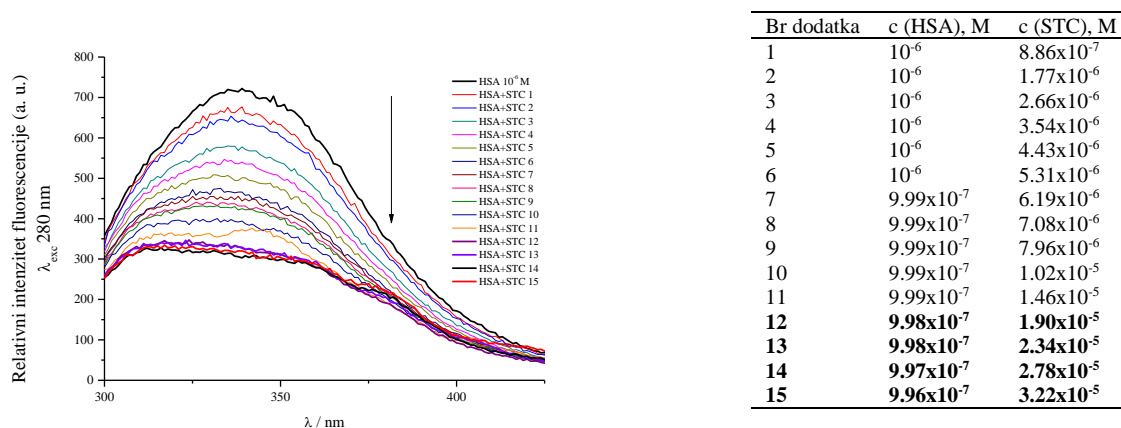
Iz nelinearne promjene CD signala na 342 nm i rastućih koncentracija CXD odnosno HSA izračunat je afinitet vezanja STC ($\log K$) za CXD- γ , CXD-Br i CXD- β odnosno za HSA te se može zaključiti da u najjaču interakciju STC stupa sa CXD-Br (tablica 3).

Tablica 3. Afinitet vezanja (logK) pretpostavljenih kompleksa STC sa CXD- γ , CXD-Br, CXD- β izračunate iz naznačenih jednadžbe krivulja ovisnosti intenziteta CD signala o koncentraciji liganda CXD- γ , CXD-Br i CXD- β na valnoj duljini maksimuma CD signala STC agregata (342 nm)

| Kompleks | logK | Funkcija | R ² |
|-------------------|------|--|----------------|
| STC+CXD- γ | 5,94 | $y = -8,16 - 11,51e^{-x/1,15*10^{-6}}$ | 0,97 |
| STC+CXD-Br | 6,15 | $y = -8,04 - 11,23e^{-x/6,98*10^{-7}}$ | 0,96 |
| STC+CXD- β | 5,22 | $y = -7,21 - 9,87e^{-x/6,05*10^{-6}}$ | 0,96 |
| STC+HSA | 4,99 | $y = -17,40 - 2,58e^{-x/5,11*10^{-5}}$ | 0,99 |

4.3. Ispitivanje interakcije STC sa HSA metodom fluorimetrije

Na početku svakog mjerenja u kiveti je izmjeren emisijski spektar HSA uz naznačenu valnu duljinu pobude. Nakon dodataka STC iz matične otopine u acetonitrilu dolazi do smanjenja intenziteta emisijskog spektra HSA u kakodilatnom puferu razmjerno povećanju koncentracije STC u kiveti (slika 7). Pri tome dolazi do zasićenja kada je koncentracija STC u kiveti $2,8 \times 10^{-5}$ M, uz afinitet vezanja STC+HSA izračunat kao $\log K = 5,24$. Pretpostavljeni molarni omjer interakcije HSA i STC koji proizlazi iz ovoga mjerenja je 19:1.



Slika 7. Titracija HSA u kakodilatnom puferu rastućim dodacima STC; strelica označava smanjenje intenziteta fluorescencije na 337 nm; koncentracije STC u kiveti koje odgovaraju dodacima STC (1-15) uz korigirane koncentracije HSA u kiveti prikazane su u tablici uz graf. Podebljane vrijednosti odgovaraju zasićenju.

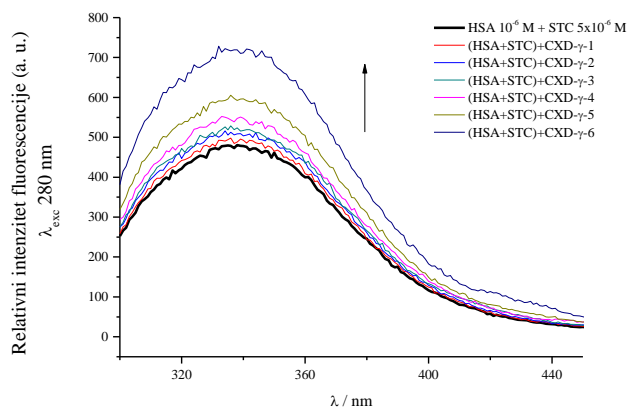
Uspoređujući metodu fluorimetrije s ostalim spektrofotometrijskim metodama može se zaključiti da je ova metoda izbora pri praćenju interakcija proteina HSA i STC. Naime, pri

valnoj duljini ekscitacije od 280 nm ne dolazi do emisije koja bi se mogla pripisati STC-u u području valnih duljina iznad 300 nm. Stoga uočene promjene emisijskog spektra 300-500 nm opažene u titraciji proizlaze iz interakcije HSA i STC odnosno asocijacije u kompleks HSA+STC.

4.3.1. Ispitivanje interakcije pretpostavljenog kompleksa STC+HSA dodatkom ciklodekstrina CXD- γ , CXD-Br i CXD- β metodom fluorimetrije

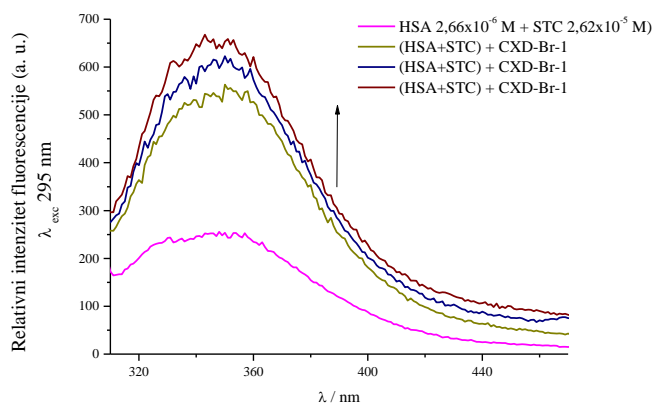
Prije dodataka različitih CXD u kiveti je prvotno formiran kompleks HSA i STC koji je titriran rastućim koncentracijama CXD (slika 8). Nakon dodataka CXD- γ , CXD-Br odnosno CXD- β dolazi do porasta intenziteta fluorescencije na 337 nm što upućuje na istiskivanje HSA iz kompleksa sa STC (slika 8). Do potpunog istiskivanja HSA iz kompleksa sa STC dolazi kada je koncentracija CXD- γ $2,97 \times 10^{-3}$ M, dok je koncentracija CXD-Br koja potpuno istisne STC iz kompleksa HSA+STC $1,09 \times 10^{-2}$ M. Uzimajući u obzir da je pri tome koncentracija STC u kiveti $3,52 \times 10^{-6}$ odnosno $1,51 \times 10^{-5}$ možemo zaključiti da CXD- γ i STC reagiraju u molarnom omjeru približno 844:1, a CXD-Br i STC približno 720:1. Pri koncentracija CXD- β $1,54 \times 10^{-3}$ M dolazi do potpunog istiskivanja STC iz kompleksa HSA+STC. Obzirom da je pri tome koncentracija STC u kompleksu $5,05 \times 10^{-6}$ možemo zaključiti da CXD- β i STC reagiraju u molarnom omjeru od približno 305:1.

a



Br. dodatka c (CXD- γ), M c (HSA), M c (STC), M

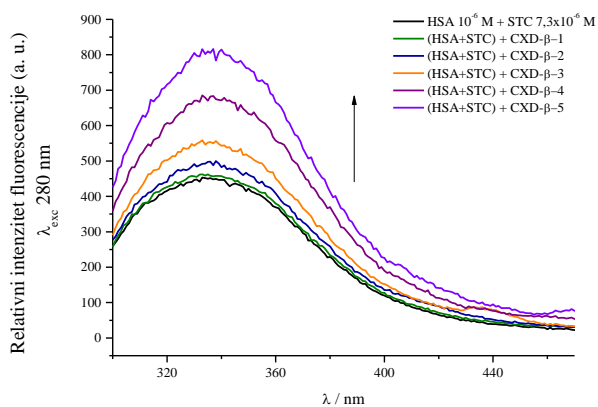
| Br. dodatka | c (CXD- γ), M | c (HSA), M | c (STC), M |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $3,69 \times 10^{-4}$ | $9,63 \times 10^{-7}$ | $4,82 \times 10^{-6}$ |
| 2 | $7,12 \times 10^{-4}$ | $9,29 \times 10^{-7}$ | $4,64 \times 10^{-6}$ |
| 3 | $1,03 \times 10^{-3}$ | $8,97 \times 10^{-7}$ | $4,48 \times 10^{-6}$ |
| 4 | $1,33 \times 10^{-3}$ | $8,67 \times 10^{-7}$ | $4,34 \times 10^{-6}$ |
| 5 | $1,87 \times 10^{-3}$ | $8,13 \times 10^{-7}$ | $4,07 \times 10^{-6}$ |
| 6 | $2,97 \times 10^{-3}$ | $7,03 \times 10^{-7}$ | $3,52 \times 10^{-6}$ |



Br. dodatka c (CXD-Br), M c (HSA), M c (STC), M

| Br. dodatka | c (CXD-Br), M | c (HSA), M | c (STC), M |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $1,52 \times 10^{-2}$ | $2,13 \times 10^{-6}$ | $2,10 \times 10^{-5}$ |
| 2 | $1,27 \times 10^{-2}$ | $1,78 \times 10^{-6}$ | $1,76 \times 10^{-5}$ |
| 3 | $1,09 \times 10^{-2}$ | $1,53 \times 10^{-6}$ | $1,51 \times 10^{-5}$ |

b



Br. dodatka c (CXD- β), M c (HSA), M c (STC), M

| Br. dodatka | c (CXD- β), M | c (HSA), M | c (STC), M |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $6,98 \times 10^{-5}$ | $6,58 \times 10^{-7}$ | $7,20 \times 10^{-6}$ |
| 2 | $2,26 \times 10^{-4}$ | $6,37 \times 10^{-7}$ | $6,97 \times 10^{-6}$ |
| 3 | $5,11 \times 10^{-4}$ | $5,99 \times 10^{-7}$ | $6,55 \times 10^{-6}$ |
| 4 | $1,09 \times 10^{-3}$ | $5,21 \times 10^{-7}$ | $5,70 \times 10^{-6}$ |
| 5 | $1,54 \times 10^{-3}$ | $4,61 \times 10^{-7}$ | $5,05 \times 10^{-6}$ |

c

Slika 8. Titracija pretpostavljenog kompleksa HSA+STC (10^{-6} M + $7,3 \times 10^{-6}$ M) sa CXD- γ (**a**), CXD-Br (**b**) i CXD- β (**c**); smjer strelice na grafu prati povećanje emisije na 337 nm. U tablicama uz grafove naznačene su koncentracije koje odgovaraju pojedinim dodacima u kiveti te korigirane koncentracije HSA i STC obzirom na promjenu volumena u kiveti.

5. Rasprava

U dostupnoj literaturi do sada nije karakterizirana priroda interakcija STC i CXD, dok o interakcijama mikotoksina sa CXD Sugamadeks nema nikakvih podataka. Međutim, obzirom na konformacijsku podudarnost lijeka rokuronija sa STC možemo pretpostaviti slični način uklapanja STC u hidrofobnu unutrašnjost CXD-Br pri čemu je afinitet STC za ovaj ciklodekstrin usporediv sa onim za rokuronij za koji konstanta asocijacije iznosi $1,79 \times 10^{-7}$ M (Zweirs i sur., 2012).

O mehanizmu interakcije STC sa ciklodekstrinima možemo zaključiti i na temelju podataka dostupnih za AFB₁ koji je kao i STC furofuranska molekula, ali nešto manje hidrofobne površine u odnosu na STC. Rezultati dostupnih istraživanja ukazuju da pored inkluzijskog kompleksa 1:1 dolazi i do interakcija furanskog dijela molekule sa hidrofilnim omotačem ciklodekstrina (Dall' Asta i sur., 2003). Međutim, bez obzira na stehiometriju kompleksa 1:1, 2:1 ili 1:2 potreba za velikim udjelom ciklodekstrina (1000:1–10⁵:1) upućuje na izrazitu kompleksnost interakcije aflatoksina i ciklodekstrina koje uključuju i vanjsku površinu ciklodekstrina (Vazquez i sur., 1991). Rezultati dobiveni molekulskim modeliranjem interakcije upućuju na umetanje dihidrofurana AFB₁ u CXD-β uz stvaranje vodikove veze između karbonila AFB₁ i sekundarnih hidroksilnih skupina ciklodekstrina (Amadasi i sur., 2007). Ipak, treba uzeti u obzir da je afinitet STC za ciklodekstrine, osobito one gama tipa, više od 20000 puta veći u odnosu na onaj opažen za različite aflatoksine pa možemo pretpostaviti značajne razlike u mehanizmu interakcije STC i CXD u odnosu na AFB₁. Na temelju dobivenih izračunatih afiniteta vezanja STC i CXD (logK) koji su iznosili 5,22 za STC+CXD-β, 5,94 za STC+CXD-γ i 6,15 za STC+CXD-Br možemo pretpostaviti da STC tvori inkluzijske komplekse sa CDX tipa γ sličnim mehanizmom kao anestetik rokuronij, tj. da dolazi do enkapsulacije (Bom i sur., 2007).

Istraživanje mehanizma interakcije STC sa ciklodekstrinima dodatno je komplicirano njegovim svojstvom agregiranja u vodenoj sredini koje se opaža metodom CD spektroskopije (Jakšić i sur., 2019). Naime, moguće je da postoji razlika u interakciji monomera STC i interakcije agregata STC. To je donekle vidljivo u razlici omjera STC i CXD u pokusima metodom CD spektroskopije u odnosu na UV/Vis. Metoda fluorimetrije nedvosmisleno prati interakciju HSA i monomernog oblika STC uz afinitet vezanja $\log K = 5,24$. Međutim, metodom UV/Vis i CD spektroskopije utvrđeni su drugačiji afiniteti, i to $\log K = 6,62$ metodom UV/Vis i $\log K = 4,99$ metodom CD spektroskopije. Obzirom da fluorimetrijska metoda nedvosmisleno prati isključivo monomerni oblik STC možemo potvrditi da monomerni STC ima veći afinitet za

ciklodekstrine tipa γ (CXD- γ i CXD-Br) u odnosu na HSA. Navedeno opažanje je potvrđeno kompetitivnim fluorimetrijskim eksperimentom istiskivanja STC iz kompleksa sa STC dodatkom pojedinih ciklodekstrina.

6. Zaključci

- Cirkularni dikroizam predstavlja dobar sustav za praćenje reakcija kompleksacije između STC i ciklodekstrina dok je interakciju proteina HSA i STC bolje pratiti fluorimetrijskom metodom
- Na temelju izračunatih logK vrijednosti zaključujemo da STC ima veći afinitet za ciklodekstrine CXD- γ (log K 6,15) i CXD-Br (logK 6,46) nego za CXD- β (logK 5,62) te mogućnost istiskivanja STC iz pretpostavljenog kompleksa sa HSA (logK 4,99).
- Afinitet STC za CXD-Br usporediv je s onim kojega registrirani lijek rokuronij ima za Bridion te se može pretpostaviti sličan mehanizam stvaranja inkluzijskog kompleksa
- Usporedbom sa literaturnim podacima utvrđeno je da je afinitet STC za CXD za 20000 puta veći u odnosu na afinitet najslabijeg mikotoksina AFB₁ što govori u prilog drugačijem mehanizmu interakcije ovih mikotoksina sa biomakromolekulama
- Dobiveni rezultati govore u prilog potencijalne primjene gama tipa ciklodekstrina kod intoksikacije sterigmatocistinom.

7. Literatura

- Amadasi, A., Dallasta C., Ingletto G. Explaining cyclodextrin–mycotoxin interactions using a “natural” force field. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 4585–4594.
- Appell, M., Evans K.O., Compton D.L. Determination of ochratoxin A in grape juice and wine using nanosponge solid phase extraction clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *Liq Chro Tech*, 2019, 41, 949–954.
- Appell, M., Jackson, M. A. Synthesis and evaluation of cyclodextrin-based polymers for patulin extraction from aqueous solutions. *Molecules*, 2010, 68, 117–122.
- Appell, M., Maragos, C. M. A closer look at cyclodextrins in mycotoxin analysis. *ACS S S*, 2009, 1031, 293–305.
- Bagheri, M., Fatemi, M. H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. *J Lum*, 2018, 202, 345–353.
- Bom, A., Epemolu O., Thomson K. Selective relaxant binding agents for reversal of neuromuscular blockade, *Current opinion in pharmacology*. 2007, 298–302.
- Braga, S. Cyclodextrins: Emerging Medicines of the New Millennium. *Biomolecules*. 2019, 9, 801.
- Dall’asta, C., Ingletto G. Fluorescence Enhancement of Aflatoxins Using Native and Substituted Cyclodextrins, *Molecules*. 2003, 45, 257–263.
- Davis, M., Brewster, M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3, 1023–1035.
- 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, 3254.
- Engelhart, S., Looek A., Exner M. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Envir Microbiol*, 2002, 68, 3886–90.
- Essigmann, J. M., Barker L., Wogan G.N. Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. *Proc Natl Acad USA*, 1979, 76, 179–83.
- Faisal, Z., Poor M. Cyclodextrins Can Entrap Zearalenone-14-Glucoside: Interaction of the Masked Mycotoxin with Cyclodextrins and Cyclodextrin Bead Polymer. *Biomolecules*, 2019, 9, 354.

- Faisal, Z., Poor M. Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *J Molec Liq*, 2020, 310, 113236.
- Fanali, G., Di Masi A. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Aspec Med*, 2012, 33, 209–290.
- Galaverna, G. Marchelli R. Cyclodextrins as selectors for mycotoxin recognition. *W M J*, 2008, 1(4), str. 397–406.
- Gan, L., Skipper P.L. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1. *Carcinogenesis*, 1998, 9, 1323–1325.
- Gao, H. W., Xu Q., Yuan Y. Potential protein toxicity of synthetic pigments: Binding of poncean S to human serum albumin. *Biophysical J*, 2008, 94, 546.
- IARC IARC monographs. A review of human cancerogens: Aflatoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 2012, 225–248.
- Jakšić Despot D., Kocsube S., Bencsik O., Varga J., Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296-304.
- Jakšić, D., Klarić Šegvić M., Crnolatac I., Smrečki V., Gorecki M., Piantanida I. Unique Aggregation of Sterigmatocystin in Water Yields Strong and Specific Circular Dichroism Response Allowing Highly Sensitive and Selective Monitoring of Bio-Relevant Interactions. *Mar Drugs*, 2019, 17, 11.
- Jakšić, D., Sertić M., Kifer D, Mornar Turk A., Nigović B., Šegvić Klarić M. Fungi and their secondary metabolites in water-damaged indoors after a major flood event in eastern Croatia. *Indoor Air*, 2020, 277.
- JECFA Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Aflatoxins, in Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (ed.) Compendium of food additive specifications. World Health Organ Tech Rep Ser 2008, str 305–356.
- Marin, S. Ramos A. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60, 218–237.
- Medicinska naklada. REGISTAR LIJEKOVA U HRVATSKOJ 2020. <https://www.medicinskanaklada.hr/registar-lijekova-u-hrvatskoj-2020> , pristupljeno 25.8.2021.
- Mohos, V., Faisal Z., Poor M. Testing the extraction of 12 mycotoxins from aqueous solutions by insoluble beta-cyclodextrin bead polymer. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 1–12.

- Perry, J. L. Binding of Ochratoxin A Derivatives to Human Serum Albumin. *J Med Chem*, 2003, 107, 6644–6647.
- Poór, M., Lemli B. Interaction of Citrinin with Human Serum Albumin. *Toxins*, 2015, 7, 5155.
- Poór, M., Lemli B. Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 170, 16–24.
- Poór, M., Lemli B. Removal of Zearalenone and Zearalenols from Aqueous Solutions Using Insoluble Beta-Cyclodextrin Bead Polymer. *Toxins* 2018, 10, 216.
- Shi, J., Li G., He H. Surface-imprinted β -cyclodextrin-functionalized carbon nitride nanosheets for fluorometric determination of sterigmatomycin. *Mikrochim. Acta*, 2019, 186, 1–9.
- Tangni, E. K., Pussemier, L. Ergosterol and mycotoxins in grain dusts from fourteen Belgian cereal storages: A preliminary screening survey. *Food Sci Nutr*, 2007, 87, 1263–1270.
- Topuz, F., Uyar, T. Electrospinning of Cyclodextrin Functional Nanofibers for Drug Delivery Applications. *Pharmaceutics*, 2019, 2018, 11, 6.
- Vazquez, M. L., Cepeda A., Blais J. Cyclodextrins as modifiers of the luminescence characteristics of aflatoxins. *Analy Chim Acta*, 1991, 252, 343–350.
- Veršilovskis, A., de Saeger, S. Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136–147.
- Yang, F., Zhang, Y., Liang, H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci*, 2014, 15, 3580–3595.
- Yang, L. P. H., Keam, S. J. Sugammadex: A review of its use in anaesthetic practice. *Drugs*, 2009, 69, 919–942.
- Zwiers, A., Rutherford S. Assessment of the Potential for Displacement Interactions with Sugammadex. *Clin Drug Investig*, 2012, 31, 101–111.

8. Sažetak

Ciklodekstrini (CXD) ciklički su oligosaharidi koji u vodenim otopinama stvaraju inkluzijske komplekse s malim organskim spojevima. Sugamadeks je modificirani oblik CXD gama (CXD- γ), a u Hrvatskoj je registriran kao lijek Bridion (CXD-Br) koji se koristi kod reverzije intramuskularne blok anestezije. Sterigmatocistin (STC) jedan je od najčešćih mikotoksina u zatvorenim prostorima u kojima ljudi borave i rade. Ovaj toksični, mutageni i genotoksični mikotoksin dokazanoga kancerogenoga učinka u životinjama (grupa IARC 2B), prekursor je i u biosintezi AFB₁ koji se povezuje sa hepatocelularnim karcinomom kod ljudi (grupa IARC 1). Poznato je da CXD, stupaju u značajne interakcije sa AFB₁ te su CXD te su našli primjenu u kromatografskim metodama dokazivanja ovoga mikotoksina. Obzirom na konformacijsku podudarnost kemijskih struktura STC i anestetika rokuronija, kao i na sličnost u kemijskim strukturama STC i AFB₁, može se pretpostaviti interakcija STC sa CXD o čemu su podaci u literaturi limitirani. U ovome radu ispitane su nekovalentne interakcije STC sa CXD beta (CXD- β), CXD- γ i CXD-Br. Kako bi se procijenio afinitet vezanja STC i CXD na temelju spektrofotometrijskih mjerenja (UV/Vis, cirkularni dikroizam- CD i fluorimetrija) izračunate su logK. Kako bi se procijenila mogućnost primjene CXD kao antidota izračunat je i afinitet vezanja za humani serumski albumin (HSA) istim metodama te je proveden kompetitivni fluorimetrijski eksperiment istiskivanja STC vezanog za HSA.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da CXD- β , CXD- γ i CXD-Br stupaju u snažne nekovalentne interakcije sa STC. Pri tome je najveći afinitet vezanja (logK) izračunat za CXD-Br (6,46) i CXD- γ (6,15), a nešto niži za CXD- β (5,62). Ispitivanjem je također pokazano da se STC veže i za protein HSA no nižim afinitetom u odnosu na CXD uz logK od 4,99 (CD spektroskopija) do 5,24 (fluorimetrija). U kompetitivnom fluorimetrijskom eksperimentu dokazali smo da svi ispitani CXD istiskuju STC iz kompleksa sa HSA. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost primjene CXD kao antidota kod trovanja mikotoksinom STC.

9. Summary

Cyclodextrins (CXD) are cyclic oligosaccharides that create inclusion complexes with small organic compounds in aqueous solutions. Sugammadex is a modified form of CXD gamma (CXD- γ), and in Croatia it is registered as a drug Bridion (CXD-Br) used in intramuscular block anesthesia reversion. Sterigmatocystin (STC) is one of the most common mycotoxins in indoor living and working environments. This toxic, mutagenic, and genotoxic mycotoxin with a demonstrated carcinogenic effect in animals (group IARC 2B), is also a precursor in the biosynthesis of AFB1, which is associated with hepatocellular carcinoma in humans (group IARC 1). It is known that CXD, engage in significant interactions with AFB1 and thus they have found application in chromatographic-based analysis of this mycotoxin. Given the structural resemblance of STC and the anesthetic rocuronium and AFB1, the interaction of STC with CXD can be anticipated and worth investigating since the data in the literature is limited. In this diploma thesis the non-valent interactions of STC with CXD beta (CXD- β), CXD- γ and CXD-Br were explored. To assess the possibility of using CXD as an antidote for STC poisoning, the binding affinity for human serum albumin (HSA) was assessed by the same methods. In addition, a competitive fluorimetry experiment was conducted to demonstrate displacement of STC from HSA-STC complex by CXDs.

According to the results obtained, it can be concluded that CXD- β , CXD- γ and CXD-Br engage in strong non-covalent interactions with STC. The highest binding affinity ($\log K$) was calculated for CXD-Br (6.46) and CXD- γ (6.15), and slightly lower for CXD- β (5.62). The study also showed that STC binds to the HSA protein but with a lower affinity compared to CXD with a corresponding $\log K$ of 4.99 (CD spectroscopy) to 5.24 (fluorimetry). Competitive fluorimetry experiments demonstrated that all CXDs are capable of STC displacing from the complex with HSA. The obtained results support the application of CXDs as antidote treatment in poisoning caused by mycotoxin STC.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Ispitivanje interakcija mikotoksina sterigmatocistina sa ciklodekstrinima i humanim serumskim albuminom spektrofotometrijskim metodama

Lucija Šćur

SAŽETAK

Ciklodekstrini (CXD) ciklički su oligosaharidi koji u vodenim otopinama stvaraju inkluzijske komplekse s malim organskim spojevima. Sugamadeks je modificirani oblik CXD gama (CXD- γ), a u Hrvatskoj je registriran kao lijek Bridion (CXD-Br) koji se koristi kod reverzije intramuskularne blok anestezije. Sterigmatocistin (STC) jedan je od najčešćih mikotoksina u zatvorenim prostorima u kojima ljudi borave i rade. Ovaj toksični, mutageni i genotoksični mikotoksin dokazanoga kancerogenoga učinka u životinjama (grupa IARC 2B), prekursor je i u biosintezi AFB₁ koji se povezuje sa hepatocelularnim karcinomom kod ljudi (grupa IARC 1). Poznato je da CXD, stupaju u značajne interakcije sa AFB₁ te su CXD te su našli primjenu u kromatografskim metodama dokazivanja ovoga mikotoksina. Obzirom na konformacijsku podudarnost kemijskih struktura STC i anestetika rokuronija, kao i na sličnost u kemijskim strukturama STC i AFB₁, može se pretpostaviti interakcija STC sa CXD o čemu su podaci u literaturi limitirani. U ovome radu ispitane su nekovalentne interakcije STC sa CXD beta (CXD- β), CXD- γ i CXD-Br. Kako bi se procijenio afinitet vezanja STC i CXD na temelju spektrofotometrijskih mjerenja (UV/Vis, cirkularni dikroizam- CD i fluorimetrija) izračunate su logK. Kako bi se procijenila mogućnost primjene CXD kao antidota izračunat je i afinitet vezanja za humani serumski albumin (HSA) istim metodama te je proveden kompetitivni fluorimetrijski eksperiment istiskivanja STC vezanog za HSA. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da CXD- β , CXD- γ i CXD-Br stupaju u snažne nekovalentne interakcije sa STC. Pri tome je najveći afinitet vezanja (logK) izračunat za CXD-Br (6,46) i CXD- γ (6,15), a nešto niži za CXD- β (5,62). Ispitivanjem je također pokazano da se STC veže i za protein HSA no nižim afinitetom u odnosu na CXD uz logK od 4,99 (CD spektroskopija) do 5,24 (fluorimetrija). U kompetitivnom fluorimetrijskom eksperimentu dokazali smo da svi ispitani CXD istiskuju STC iz kompleksa sa HSA. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost primjene CXD kao antidota kod trovanja mikotoksinom STC.

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

Rad sadrži: 27 stranica, 8 grafičkih prikaza, 3 tablice i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sterigmatocistin, ciklodekstrini, humani serumski albumin, cirkularni dikroizam, UV/Vis, fluorimetrija, antidot

Mentor: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivo Piantanida, *znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković*

Dr. sc. Hrvoje Rimac *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Rujan 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Study of noncovalent interactions of sterigmatocystin, cyclodextrins and human serum albumin by spectrophotometric methods

Lucija Šćur

SUMMARY

Cyclodextrins (CXD) are cyclic oligosaccharides that create inclusion complexes with small organic compounds in aqueous solutions. Sugammadex is a modified form of CXD gamma (CXD- γ), and in Croatia it is registered as a drug Bridion (CXD-Br) used in intramuscular block anesthesia reversion. Sterigmatocystin (STC) is one of the most common mycotoxins in indoor living and working environments. This toxic, mutagenic, and genotoxic mycotoxin with a demonstrated carcinogenic effect in animals (group IARC 2B), is also a precursor in the biosynthesis of AFB₁, which is associated with hepatocellular carcinoma in humans (group IARC 1). It is known that CXD, engage in significant interactions with AFB₁ and thus they have found application in chromatographic-based analysis of this mycotoxin. Given the structural resemblance of STC and the anesthetic rocuronium and AFB₁, the interaction of STC with CXD can be anticipated and worth investigating since the data in the literature is limited.

In this diploma thesis the non-valent interactions of STC with CXD beta (CXD- β), CXD- γ and CXD-Br were explored. To assess the possibility of using CXD as an antidote for STC poisoning, the binding affinity for human serum albumin (HSA) was assessed by the same methods. In addition, a competitive fluorimetry experiment was conducted to demonstrate displacement of STC from HSA-STC complex by CXDs.

According to the results obtained, it can be concluded that CXD- β , CXD- γ and CXD-Br engage in strong non-covalent interactions with STC. The highest binding affinity (logK) was calculated for CXD-Br (6.46) and CXD- γ (6.15), and slightly lower for CXD- β (5.62). The study also showed that STC binds to the HSA protein but with a lower affinity compared to CXD with a corresponding logK of 4.99 (CD spectroscopy) to 5.24 (fluorimetry). Competitive fluorimetry experiments demonstrated that all CXDs are capable of STC displacing from the complex with HSA. The obtained results support the application of CXDs as antidote treatment in poisoning caused by mycotoxin STC.

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

Thesis includes: 27 pages, 8 figures, 3 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Sterigmatocystin, cyclodextrines, human serum albumin, circular dichroism, UV/Vis, fluorimetry, antidote

Mentor: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivo Piantanida, Ph.D. Science Associate, Science Institute Ruđer Bošković

Hrvoje Rimac, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.