

# Citotoksičnost citrinina za ljudske stanice pluća i jetre

---

Mamić Subašić, Lara

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:537576>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

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



**Lara Mamić Subašić**

**Citotoksičnost citrinina za ljudske stanice pluća i  
jetre**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Maji Šegvić Klarić na vodstvu i pomoći oko izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojoj obitelji na podršci i prijateljima koji su i u lakim i u teškim studentskim danima uvijek bili uz mene.*

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	MIKOTOKSINI.....	1
1.2	CITRININ.....	2
1.2.1	Kemijska svojstva citrinina .....	3
1.2.2	Analitičke metode za dokazivanje i određivanje citrinina .....	5
1.2.3	Toksikološka svojstva citrinina .....	6
1.2.4	Izloženost ljudi .....	10
2	OBRAZLOŽENJE TEME .....	12
3	MATERIJALI I METODE .....	13
3.1	STANIČNE KULTURE .....	13
3.2	TRETIRANJE STANICA CITRININOM .....	13
3.3	MTS TEST.....	14
3.4	OBRADA PODATAKA.....	14
3.4.1	Statistička obrada podataka .....	15
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	16
4.1	CITOTOKSIČNOST CITRININA ZA A549 STANICE.....	16
4.2	CITOTOKSIČNOST CITRININA ZA HepG2 STANICE .....	19
5	ZAKLJUČCI.....	24
6	LITERATURA.....	25
7	SAŽETAK / SUMMARY .....	32
7.1	SAŽETAK .....	32
7.2	SUMMARY .....	33
8	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1 UVOD

## 1.1 MIKOTOKSINI

Mikotoksini nastaju kao produkt sekundarnog metabolizma plijesni u odgovarajućim uvjetima. Iako njihovoj proizvodnji više pogoduju vrući i vlažni uvjeti, jednako tako plijesni ih proizvode i u područjima s umjerenom klimom što kao posljedicu ima vrlo veliku raširenost mikotoksina. Mikotoksini su poznati od davnina, a sama riječ potječe od grčke riječi *mykes*, što znači gljiva ili plijesan te latinske riječi *toxicum*, što znači otrov. Bolesti koje mikotoksini uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze.

Kroz povijest su mikotoksini uzrokovali mnoga masovna trovanja, a jedno od poznatijih dogodilo je Rusiju u ranom 20. stoljeću. Velik broj ljudi tad se otrovao konzumiranjem raži zaražene ergot alkaloidima koje proizvodi plijesan *Claviceps purpurea* (Chrevatidis, 2003). Unatoč prisutnosti mikotoksina u cjelokupnoj ljudskoj povijesti, veći interes za njihovim istraživanjem pojavio se tek 1960. godine pojavom mikotoksikoze uzrokovane aflatoksinom na životinjskim farmama u Engleskoj. Otkrio se hepatokarcinogeni učinak aflatoksina za ljude i životinje što je potaknulo daljna istraživanja mikotoksina (Peraica i sur., 1999).

Mikotoksini su strukturno međusobno vrlo raznoliki. Od mikotoksina koji u strukturi imaju samo jedan heterociklički prsten koji doseže molekulsku masu do 50 Da, pa sve do mikotoksina sa 6 do 8 prstenova u strukturi s ukupnom molekulskom masom većom od 500 Da. Zbog svoje male veličine mikotoksini ne mogu potaknuti imunološki odgovor u čovjeku, stoga u ljudski organizam ulaze neprimjetno što im omogućava da se nakupljaju i izazivaju toksične učinke (Pitt i sur., 2000). Ingestijom velikih doza mikotoksini mogu uzrokovati akutna trovanja čija posljedica u najgorem slučaju može biti i smrt, a ingestijom malih doza kroz dulji vremenski period dovode do kronične toksičnosti (Chrevatidis, 2003). Ovisno o vrsti mikotoksina, oni mogu imati hepatotoksično, nefrotoksično, estrogeno, genotoksično, imunosupresivno, teratogeno i/ili karcinogeno djelovanje (Edite Bezerra da Rocha i sur., 2014).

Ljudi na različite načine mogu biti izloženi mikotoksinima. Nešto rijedi, ali svejedno značajan unos jest inhalacijom kontaminiranog zraka ili prašine te transdermalni put unosa

(Niculita-Hirzel i sur., 2016). Najčešći put unosa ipak je putem kontaminirane hrane, jer mikotoksini se često mogu pronaći i u ljudskoj i u životinjskoj hrani. Osim toga, mikotoksini se mogu formirati na poljima žitarica u svakoj fazi procesa proizvodnje, uključujući prije žetve, za vrijeme žetve te tijekom čuvanja kao posljedica neodgovarajućih uvjeta temperature i vlage (Sforza i sur., 2006). Pouzdani izračuni pokazali su da je 25% - 50% svih proizvoda proizvedenih na globalnoj razini na neki način kontaminirano mikotoksinima (Bhat i Miller, 1991; Mannon i Johnson, 1985). S obzirom da takva prisutnost mikotoksina ima velike posljedice na ekonomskoj i zdravstvenoj razini, svaka država donosi propise i smjernice za dozvoljene maksimalne koncentracije mikotoksina u hrani za ljude i životinje. Europska komisija odredila je maksimalne razine za 6 mikotoksina u hrani za životinje te za 7 mikotoksina uključujući i citrinin (CTN) u hrani za ljudsku prehranu (Smith i sur., 2016).

## 1.2 CITRININ

Otkriće mikotoksina citrinina (CTN) bilo je obećavajuće s obzirom da je prvi put izoliran 1931. godine kao sekundarni metabolit plijesni roda *Penicillium citrinum*, s pretpostavkom da ima antibiotski učinak (Hetherington i Raistrick, 1931). Nedugo nakon revolucionarnog otkrića, ustanovljen je nefrotoksičan učinak CTN i time on nikad nije korišten kao antibiotik. Osim glavnog toksičnog učinka na bubrege, otkriveni su i drugi ciljni organi na koje CTN može djelovati toksično, poput jetre i koštane srži (Gupta i sur., 1983). Osim *P. citrinum*, CTN proizvode i mnoge druge vrste iz roda *Penicillium*, poput *Penicillium expansum* i *Penicillium viridicatum*, te plijesni iz rodova *Aspergillus* (*Aspergillus niveus* i *Aspergillus terreus*) i *Monascus* (*Monascus ruber* i *Monascus purpureus*) (Bragulat i sur., 2008). Citrinin većinom kontaminira žitarice poput kukuruza, pšenice, raži, zobi i riže, nakon žetve ili tijekom njihovog skladištenja, ali može kontaminirati i druge proizvode poput graha, voća, aromatičnog bilja i začina (Scott i sur., 1972).

U prošlosti se CTN povezivao sa sindromom „žute riže“ u Japanu 1971. godine, zbog neprestane prisutnosti *P.citrinum* vrste u žutoj riži na tržištu (Saito i sur., 1971). Također, smatrao se i odgovornim za nefropatiju u svinja i ostalih životinja iako akutna toksičnost CTN varira ovisno o životinjskoj vrsti (Carlton i Tuite, 1977).

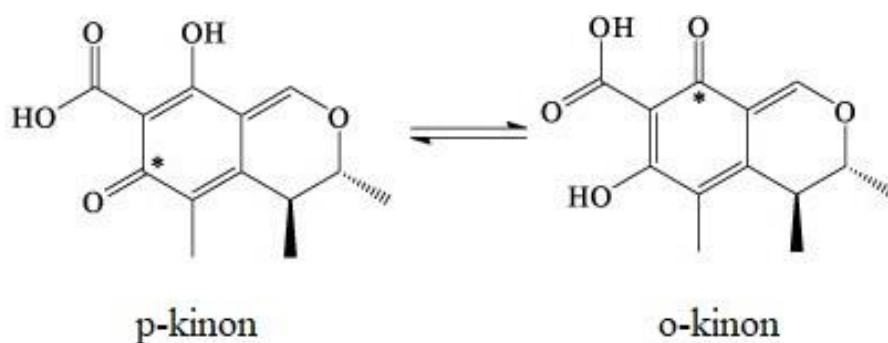
Jedan od rodova koji imaju sposobnost proizvodnje CTN, rod *Monascus*, u posljednjim je desetljećima osobito zainteresirao javnost. Razni sojevi roda *Monascus* (*M. pilosus*, *M.purpureus*, *M.ruber* i *M.floridanus*) tradicionalno se koriste u Kini i ostalim istočnim zemljama već više od tisuću godina (Sabater-Vilar i sur., 1999). Njihovi

fermentacijski produkti koriste se kao bojila za hranu, pojačivači okusa, za konzerviranje mesa i pri fermentiranju crnog vina, a jedna od suvremenijih upotreba je kao dodatak prehrani za snižavanje kolesterola u krvi i krvnoga tlaka (EFSA, 2012). Prednost crvenog i žutog pigmenta koji nastaju kao fermentacijski produkti plijesni roda *Monascus* je njihova niska toksičnost i mutagenost u usporedbi sa sintetskim bojilima koja se koriste kao bojila za hranu, tako da oni predstavljaju dobre kandidate za zamjenu jer im je neškodljivost utvrđena tradicionalnom primjenom (Flajs i Peraica, 2009). Problem vezan uz pigmente roda *Monascus* nastao je nakon što su 1981. godine Wong i Kohler izolirali blijedo-žuti pigment monascidin A iz *M. purpureus*, za koji je tek 1995. godine utvrđeno da strukturno odgovara već odavno poznatom mikotoksinu CTN (Wong i Koehler, 1981; Blanc i sur., 1995). Od tada su provedena brojna ispitivanja koncentracije CTN u proizvodima koji sadrže fermentacijske produkte roda *Monascus*, te je u gotovo svakom takvom proizvodu koji potječe iz Kine pronađen CTN u mjerljivim koncentracijama. U interpretaciji se treba uzeti u obzir da se ti *Monascus* fermentacijski produkti kao aditivi koriste u izrazito niskim koncentracijama, no bez obzira na to ciljana uporaba *Monascus* produkata kao aditiva nije dozvoljena u državama Europske Unije (EFSA, 2012).

### 1.2.1 Kemijska svojstva citrinina

Strukturu CTN razriješili su Whalley i njegovi suradnici 1948. godine, te je on jedan od prvih spojeva kojemu je identificirana poliketidna struktura (Brown i sur., 1948). CTN je prema IUPAC-u (3R, 4S)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3H-2-benzopiran-7-karboksilna kiselina. Molekulska masa CTN iznosi 250,25 g/mol.

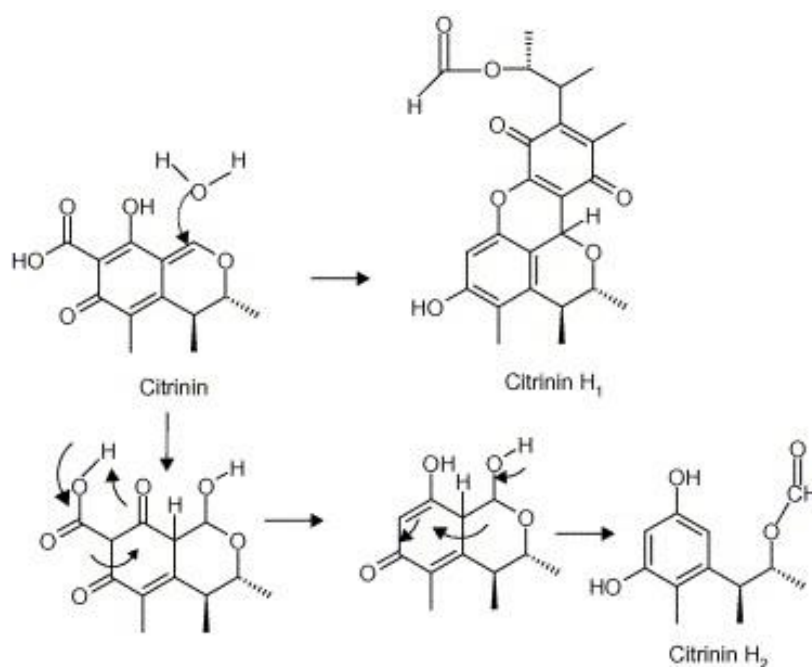
CTN se nalazi u obliku žutih kristala i to u dva tautomerna oblika (Slika 1), p-kinon i o-kinon koji se u čvrstom stanju nalaze u dinamičkoj ravnoteži (Poupko i sur., 1997).



**Slika 1.** Strukturna formula dva izomera CTN

Kristali CTN imaju maksimum apsorpcije ultraljubičaste (UV) svjetlosti na 250 i 333 nm, a točka tališta im je na 175 °C. Citrinin zahvaljujući konjugiranoj i planarnoj strukturi ima sposobnost fluorescencije, a najveću fluorescenciju pokazuje neionizirani oblik CTN pri pH = 2,5 (Franco i sur., 1996). Topljivost u vodi mu je loša, no topljiv je u otopinama natrijeva hidroksida, natrijeva karbonata ili natrijeva acetata, u metanolu, acetonitrilu, etanolu i većini drugih polarnih organskih otapala (Desphande, 2002).

Provedene su brojne studije u kojima su se proučavali produkti razgradnje CTN te je ustanovljeno da razgradnja nastupa u suhim uvjetima pri temperaturama >175 °C, a u prisustvu vode već pri temperaturama >100 °C. Izolirana su 2 produkta razgradnje CTN, CTN H1 koji je pokazao još veću toksičnost od samog toksina te CTN H2 (Slika 2), kojemu je toksičnost u odnosu na CTN smanjena (Trivedi i sur., 1993; Hirota i sur., 2002).



**Slika 2.** Mehanizam razgradnje CTN kojim nastaju razgradni produkti CTN H1 i H2

Sukladno otkriću razgradnih produkata, otkriveno je da se prokuhavanjem u trajanju od 20 minuta koncentracija CTN smanji za 50% (Shu i Lin, 2002). To upućuje na termolabilnost i nestabilnost CTN u vodenim otopinama, što je bitna činjenica koja ukazuje



na potrebu za osjetljivom analitičkom metodom pri određivanju CTN u uzorcima poput hrane (Xu i sur., 2006).

## 1.2.2 Analitičke metode za dokazivanje i određivanje citrinina

### 1.2.2.1 Uzorkovanje

U analizi CTN jedan od glavnih izazova njegova je nestabilnost ovisna o temperaturi, sastavu korištenih otapala, mobilnih faza i pripremi standardne otopine CTN (Xu i sur., 2003). Pritom je uzorkovanje ključan korak jer predstavlja glavni izvor varijabilnosti rezultata u analizi CTN, stoga je bitno obratiti posebnu pozornost na taj korak radi dobivanja pouzdanih rezultata. Do velike varijabilnosti uzoraka dovodi heterogena distribucija CTN i mikotoksina općenito u agrikulturalnim proizvodima kao posljedica toga što rast plijesni i sinteza mikotoksina uvelike ovise o raznolikosti usjeva, agronomskoj praksi, vremenskim uvjetima tijekom žetve, procesima sušenja i čišćenja tijekom žetve, o uvjetima skladištenja i prerade te o samom toksičnom potencijalu određene vrste plijesni (Köppen i sur., 2010).

### 1.2.2.2 Instrumentalne kvantitativne tehnike

U kvantitativnoj analizi CTN koriste se kolorimetrijske, kromatografske i imunokemijske tehnike. Tehnike se međusobno razlikuju ovisno o tome jesu li kvalitativne, polukvantitativne ili kvantitativne, omogućuju li detekciju više analita odjednom te po limitima detekcije (LOD) prema čemu su neke osjetljivije, a neke manje osjetljive (Tablica 1).

**Tablica 1.** Pregled svojstava i LOD najbitnijih analitičkih metoda za citrinin

Analitička tehnika	Karakteristike metode	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Kolorimetrija	Probiranje (kvalitativna – polukvantitativna)	100 – 8000
TLC	Probiranje (kvalitativna – polukvantitativna)	15 – 40
HPLC-FLD	Potvrda (polukvantitativna – kvantitativna) Moguća detekcija više analita istovremeno	0,1 – 10
LC-MS	Potvrda (polukvantitativna – kvantitativna) Moguća detekcija više analita istovremeno	0,1 – 100
ELISA	Probiranje (polukvantitativna – kvantitativna)	2 – 15000

Kolorimetrijske tehnike temelje se na fluorescenciji CTN, no metoda je podložna interferencijama što rezultira visokim LOD vrijednostima, stoga se više ne koristi (Trantham i Wilson, 1984; Vazquez i sur., 1997).

Najjednostavnija kromatografska tehnika je tankoslojna kromatografija (TLC) koja se koristila pretežno za kvalitativnu analizu CTN, no zamijenila ju je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Najčešće se koristi obrnuto-fazna HPLC uz fluorescentni detektor (FLD) jer su ponovljivost i osjetljivost te metode visoke (EFSA, 2012). Tekućinsku kromatografiju spregnutu s masenim spektrometrom (LC-MS) za određivanje CTN prvi put su upotrijebili Toumi i njegovi suradnici 2001. godine, pri čemu se za identifikaciju i kvantifikaciju koristila elektrosprej ionizacija (ESI) molekula u masenom spektrometru (Toumi i sur., 2001). Ovo se pokazala kao izuzetno dobra metoda za simultanu analizu širokog spektra mikotoksina u uzorcima hrane, no mali broj razvijenih metoda uključuje CTN (Spanjer i sur., 2008; Rasmussen i sur., 2010).

Imunokemijske tehnike su visoko specifične za pojedini mikotoksin jer se temelje na interakciji antigen – antitijelo. Više se koriste kao metoda detekcije CTN u uzorku nego za kvantifikaciju. Od imunokemijskih tehnika najviše se primjenjuje imunoenzimaska (ELISA) metoda. Za rutinsku analizu CTN, metoda izbora je HPLC – FLD jer je moguće postići vrijednosti LOD i od 0,1 µg/kg.

### **1.2.3 Toksikološka svojstva citrinina**

#### **1.2.3.1 Toksikokinetika**

Za CTN zasad nisu provedena toksikokinetička ispitivanja u kojima bi se CTN primjenjivao oralnim putem. Metabolizam CTN ispitan je u jednoj studiji provedenoj na modelnom organizmu, crvu *Caenorhabditis elegans*, koji je nahranjen UV-inaktiviranom bakterijom tretiranom CTN. Crvi su nakon petodnevne kultivacije analizirani pomoću HPLC-MS/MS tehnike kako bi se detektirali metaboliti CTN. Kao glavni metabolit otkiven je dihidrocitrinon (DH-CTN) nastao oksidacijskim metabolizmom u *C. elegans* (Keller i sur., 2018). Za DH-CTN dokazano je da je njegova formacija zapravo mehanizam detoksifikacije jer je njegov citotoksični i genotoksični potencijal manji nego od CTN (Föllmann i sur., 2014).

U pokusima provedenima na eksperimentalnim životinjama otkriveno je da se CTN izlučuje primarno renalnim putem. U studiji provedeno na skotnim ženkama štakora, one su tretirane subkutanom injekcijom radioaktivno obilježenog CTN ( $C^{14}$ -CTN) u dozi od 35mg/kg na 12. dan gestacije. Otkiveno je da je eliminacija  $C^{14}$ -CTN bifazična, brzoj ( $\alpha$ ) fazi poluvrijeme eliminacije iznosi 1,95 sati, dok sporijoj ( $\beta$ ) fazi poluvrijeme eliminacije iznosi 39,7 sati. U prvih 24 sata u urinu je pronađeno 74% od primijenjenog  $C^{14}$ -CTN, nakon 48 sata 1,7%, a nakon 72 sata samo 1,4% (Reddy i sur.,1982).

O mogućem procesu prijenosa i pohrane CTN u jestiva tkiva i jaja putem životinjske hrane provedena je samo jedna studija. Kokoši koje su lijegale jaja konzumirale su hranu koja je sadržavala CTN u koncentraciji od 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tijekom 6 tjedana. Izmjereni su ostaci CTN u sljedećim koncentracijama:  $10,4 \pm 2,12^{11}$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  u žumanjku jajeta,  $6,16 \pm 1,22$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  u bjelanjku jajeta,  $10,3 \pm 1,75$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  u bijelom mesu i  $9,84 \pm 1,45$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  u crvenom mesu (Abdelhamid i Dorra, 1990). 2 tjedna nakon prestanka konzumacije hrane s toksinom u mesu i jajima više nisu pronađeni ostaci CTN.

### 1.2.3.2 Mehanizam toksičnosti

Iako mehanizam toksičnog učinka CTN nije u potpunosti razjašnjen, provedene su brojne *in vitro* studije kojima je otkriveno nekoliko mogućih mehanizama: inhibicija sinteze RNA i DNA, indukcija oksidativnog stresa, oštećenje mitohondrija i poremećaj u prometu kalcija u mitohondrijima, indukcija apoptoze stanica, inhibicija mitoze i zaustavljanje staničnog ciklusa (EFSA, 2012).

U provedenim *in vitro* studijama otkriveno je da oksidativni stres ima veliku ulogu u toksičnosti CTN. Otkriveno je da CTN modificira antioksidativne enzimske mehanizme u jetri štakora tako što inhibira GSSG-reduktazu i transhidrogenazu, no nije dokazan učinak na drugim antioksidativnim enzimima poput GSH-peroksidaze, katalaze, glukoza-6-fosfataze, superoksid dismutaze itd. (Ribeiro i sur., 1997). CTN time uzrokuje povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih specija u respiratornom lancu što uzrokuje oksidativni stres koji u konačnici dovodi do citotoksičnih učinaka i smrti stanica. Toksičnost kojoj je posrednik oksidativni stres manifestirala se i u obliku povećane lipidne peroksidacije u Vero stanicama bubrega, koja je ustanovljena izmjerenim povećanjem razine malonaldehida u stanicama (Bouslimi i sur., 2008). U studiji u kojoj su epitelne alveolarne stanice tretirane subtoksičnim dozama CTN, također je primijećen pad u razini antioksidansa glutaciona (GSH) što upućuje na povećani oksidativni stres i smanjeno enzimatsko obnavljanje GSH (Johannssen i sur.,

2007). Ovo otkriće ukazuje na upalni proces koji se razvija kao posljedica oksidativnog stresa kod ljudi izloženih plijesnima zbog udisanja kontaminiranog zraka.

Još jedan od istraživanih mehanizama toksičnosti je mogućnost da CTN mijenja mitohondrijsku funkciju, što je proučeno u studiji na bubrežnim stanicama mladih hrčaka gdje je elektronskim mikroskopom uočeno bubrenje normalnih mitohondrija i posljedično stanična smrt (Chagas i sur., 1994). U drugoj je studiji pak otkriven učinak na inhibiciju influksa i povećanje efluksa kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) što dovodi do smanjenja njihove akumulacije u matriksu mitohondrija (Chagas i sur., 1995).

Apoptozni učinak CTN uočen je u studiji provedenoj na stanicama ljudske promijelocitne leukemijske linije (HL-60) i svinjskim bubrežnim PK15 stanicama. U dozama CTN većima od 50  $\mu\text{g}$ , broj apoptotičnih stanica izrazito se povećao. Ustanovljeno je da dolazi do o dozi ovisne formacije kaspaza 3,6,7 i 9 te da se povećava otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citoplazmu koji dodatno potiče aktivaciju navedenih kaspaza regulatora apoptoze (Lu i sur., 2006; Šegvić Klarić i sur., 2007).

### **1.2.3.3 Toksični učinci citrinina**

Gotovo od otkrića CTN, poznata su njegova nefrotoksična svojstva što je bio i glavni razlog zbog kojeg nikad nije zaživjela primjena CTN kao antibiotika. Provedena su brojna istraživanja primjenjivanjem ponovljenih doza CTN na različitim vrstama životinja čime je ustanovljeno da je bubreg ciljani organ toksičnih učinaka CTN, iako su različite životinje različito reagirale na toksin. Osim životinja, otkriveno je da CTN pogađa i ljudski renalni sustav i to vjerojatno utjecajem na mitohondrijski respiratorni lanac (Doughari, 2016). Jedna od poznatih nefropatija s kojom se povezuje CTN je svinjska nefropatija, do koje može doći različitim načinima unosa toksina: preko hrane koja je zaražena plijesnima producentima, direktnom ingestijom plijesni ili direktnom administracijom CTN (Krogh i sur., 1973; Krogh, 1976). Citrinin se često može pronaći u istoj hrani u kojoj se nalazi ohratoksin A (OTA), poznati jaki nefrotoksin. Sinergistički učinak CTN i OTA na smanjenu sintezu RNA u bubrežnom tkivu može dovesti do fatalnog zatajenja bubrega u ljudi, poznatog kao Balkanska endemska nefropatija (Ostry i sur., 2013).

Provedene su brojne studije koje u fokusu imaju mogući imunotoksični učinak CTN, no mnoge od tih studija zastarjele su i nedorečene. U jednoj od novijih studija pomoću MTT testa mjeren je učinak CTN na vijabilnost perifernih monocita, a utjecaj CTN na otpuštanje

citokina IFN- $\gamma$  i IL-4 iz T-4 stanica mjereno je pomoću ELISA testa i polimerazne lančane reakcije u stvarnome vremenu (real-time PCR). Ustanovljeno je da CTN ima mali učinak na pad vijabilnosti monocita, a najveći učinak ima na pad proizvodnje IFN- $\gamma$ . Inhibitorna doza CTN (ID<sub>50</sub>) iznosila je 8,3  $\mu$ g/ml za IFN- $\gamma$  i 21,6  $\mu$ g/ml za IL-4 (Wichmann i sur., 2002). I druge studije potvrdile su da CTN uzrokuje smanjenu produkciju IFN- $\gamma$ , bez citotoksičnih učinaka na periferne monocite (Tammer i sur., 2007).

Brojne studije vezane uz moguću genotoksičnost CTN također su provedene, no genotoksični učinak nije moguće u potpunosti potvrditi s obzirom da su u različitim ispitivanjima dobiveni i pozitivni i negativni rezultati. Na primjer, tri različite studije koristile su metodu komete, gel elektroforezu cijeloga staničnoga genoma, na tri različite stanične linije. Povećano oštećenje DNA uočeno je samo u stanicama epitela bubrega soja Vero, koje su bile izložene CTN u periodu od 24 sata (Bouslimi i sur., 2008). Ista metoda dala je negativne rezultate na staničnim linijama ljudskih jetrenih stanica HepG2 i na ljudskim embrijskim bubrežnim stanicama HEK293 (Knasmüller i sur., 2004; Liu i sur., 2003).

Dokazi koji mogu potvrditi karcinogenost CTN na eksperimentalnim životinjama ograničeni su, tako da se ne može procijeniti niti moguća karcinogenost CTN za ljude. Citrinin je iz tog razloga klasificiran u 3. skupinu kancerogena – bez karcinogenog učinka na ljude (IARC, 1986).

Studije provedene *in vitro* i *in vivo* potvrdile su reproduktivnu toksičnost CTN i njegove embriotoksične i teratogene učinke (FESA, 2012). Embriocidni i fetotoksični učinci CTN potvrđeni su na miševima (Hood i sur., 1976). Istraživanje provedeno na štakorima dalo je različite rezultate ovisno o gestacijskom danu skotnih štakorica. CTN primijenjen subkutano u jednokratnoj dozi od 35 mg/kg u razdoblju od 3. do 15. gestacijskog dana nije smanjio broj implantiranih fetusa niti uzrokovao malformacije u kosturu fetusa, no veličina fetusa bila je za 22% manja od fetusa u kontrolnoj skupini (Reddy i sur., 1982). Kad je na istom soju skotnih štakorica primijenjena jednokratna doza CTN od 30 mg/kg u razdoblju od 5. do 14. gestacijskog dana, ona je rezultirala u nekoliko resorpcija fetusa i minimalnim malformacijama u preživjelim fetusima (Mayura i sur., 1984). Ovi rezultati dobiveni *in vivo* potvrđeni su i novijim *in vitro* eksperimentima na mišjim embrijskim stanicama. Blastociste tretirane CTN imale su veću razinu apoptoze i stopa implantacije bila im je manja (Chan i Shiao, 2007).

## 1.2.4 Izloženost ljudi

Otkad je ustanovljeno da CTN ima nefrotoksični učinak te da je čest kontaminant u hrani, porasla je zabrinutost zbog moguće štete koju takva prisutnost CTN može imati za zdravlje ljudi. Unatoč podignutoj svijesti o mogućim posljedicama prisutnosti CTN, proveden je iznimno mali broj istraživanja, stoga nije moguće direktno donijeti procjenu izloženosti ljudi CTN putem hrane (EFSA, 2012). Alternativni način određivanja izloženosti ljudi putem hrane kontaminirane CTN je poznavanjem koncentracije CTN u hrani koju konzumiraju ljudi. Odabirom određene vrste hrane, poput žitarica i proizvoda s prerađenim žitaricama namijenjenih za ljudsku konzumaciju, moguće je napraviti procjenu rizika za ljude i odrediti je li unos manji od najviše koncentracije CTN koja nema toksične učinke (NOAEL, no-observed-adverse-effect-level). Korištenjem dostupnih podataka o konzumaciji tih namirnica može se indirektno izračunati kritična koncentracija CTN u pojedinoj namirnici koja bi odgovarala vrijednosti NOAEL.

Osim žitarica, CTN može biti prisutan i u povrću, riži, voću, voćnim sokovima, orašastim plodovima poput badema, kikirikija, lješnjaka, u suncokretovim sjemenkama, začинима i već spomenutim dodacima prehrani na bazi crvene riže (Jimenez i sur., 1991; Dietrich i sur., 2001; El Adlouni i sur., 2006). Ipak, najviše literaturnih podataka o prisutnosti CTN vezano je uz žitarice i hranu s prerađenim žitaricama, no i ti podaci su nepotpuni i nepouzdana što dovodi do zaključka da se ne može pouzdano odrediti premašuje li CTN prisutan u hrani koncentracije koje mogu biti toksične za ljude.

U istraživanju provedenom u Hrvatskoj, analizirala se pojavnost CTN, aflatoksina B1 i ohratoksina A u domaćim i industrijskim mesnim prerađevinama (Markov i sur., 2013). Prikupljeno je 90 uzoraka mesnih prerađevina od 90 različitih industrijskih postrojenja i samostalnih proizvođača. Koncentracija CTN određena je pomoću HPLC metode s fluorescentnim detektorom. U samo 5,55% od ukupnog broja uzoraka CTN se nalazio u koncentraciji većoj od limita određivanja (LOQ). Unatoč tome što je EFSA zaključila da je rizik kontaminacije mikotoksinima putem mesa neznatan (EFSA, 2004), ovo istraživanje pokazalo je da iako 96% mesnih uzoraka nije bilo kontaminirano plijesnima, veliki broj njih bilo je kontaminirano mikotoksinima. To ukazuje na potrebu za konstantnim praćenjem mikotoksina u hrani, s obzirom da oni mogu predstavljati rizik za ljude, osobito zato što ne postoji jednostavan način kojim bi se moglo uočiti da je hrana kontaminirana mikotoksinima kao što je to često slučaj s plijesni.

Iako je kontaminirana hrana najčešći put izloženosti ljudi CTN, ukupna izloženost uključuje i inhalaciju te transdermalni unos do kojeg lako može doći u zatvorenim prostorima visokog sadržaja vlage. U jednom od rijetkih provedenih istraživanja o prisutnosti CTN u zatvorenim prostorima, analizirano je 79 uzoraka plijesnivih površina na prisustvo 17 različitih vrsta mikotoksina. Uzorci su uzeti iz zgrada u Finskoj koje imaju problema s povišenim sadržajem vlage. Samo 3 od 79 uzoraka bila su kontaminirana CTN u koncentracijama od 20 do 35000 ng CTN po gramu uzorka (Tuomi i sur., 2000).

Općenito je malo poznato o tome kakav rizik za zdravlje mogu predstavljati mikotoksini koji su ušli putem inhalacije ili kože (Mayer i sur., 2007). Unatoč tome, može se pretpostaviti da i ti putevi unosa doprinose ukupnoj izloženosti ljudi CTN i mogu predstavljati zdravstveni rizik (EFSA, 2012).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Mikotoksini su sveprisutni sekundarni metaboliti plijesni, te najčešće kontaminiraju hranu koju jedu ljudi i životinje, no plijesni ih prirodno mogu proizvoditi i u zatvorenim vlažnim prostorima na građevinskom materijalu. Iako su mikotoksini oko nas prisutni u velikoj mjeri, svijest o njihovim štetnim učincima nije na razini na kojoj bi trebala biti. Izlaganje ljudi i životinja mikotoksinima može uzrokovati različite zdravstvene tegobe, počevši od akutnih trovanja pa sve do raka i imunodeficijencija koje mogu biti posljedica dugotrajnog izlaganja mikotoksinima (<https://www.who.int/>).

Unatoč tome što su brojni mikotoksini relativno dobro istraženi, CTN je još uvijek prilična nepoznanica. Čak ni pokušaj EFSA-e da u svom obuhvatnom radu o ovom mikotoksinu iz 2012. godine donese zaključak o procjeni rizika i maksimalnih koncentracija CTN koje ne bi predstavljale opasnost za ljude, nije urodio plodom i mnogo je pitanja ostalo otvoreno. Mnogi štetni učinci CTN poznati su gotovo od njegovog otkrića, poput nefrotoksičnosti, a nagađa se i o njegovoj imunotoksičnosti, genotoksičnosti i embriotoksičnosti. Provedena *in vitro* i *in vivo* istraživanja većinom su davala rezultate u kojima bi CTN imao određen toksičan učinak. Zaključak većine provedenih istraživanja nije bio jednoznačan, a gotovo uvijek je izražena potreba za daljnim i detaljnijim istraživanjima i procjenama.

Iako je CTN jedan od prvih otkrivenih mikotoksina, novijih istraživanja je vrlo malo. Rizik za ljude ingestijom hrane kontaminirane CTN, inhalacijom zraka ili transdermalnim prijenosom ne može se točno procijeniti, niti se mogu izračunati toksične koncentracije CTN za ljude jer za to postoji premalo literaturnih podataka. Stoga je potrebno provoditi što više toksikoloških studija CTN kojima bi se mogli uvidjeti njegovi potencijalni korisni učinci i kontrolirati štetni učinci (Doughari, 2016).

Cilj ovog rada je utvrditi citotoksične koncentracije ( $IC_{50}$ ) CTN za dvije različite linije stanica: ljudske stanice adenokarcinoma pluća A549 i stanice hepatocelularnog karcinoma HepG2. Određivanje  $IC_{50}$  omogućit će odabir subcitotoksičnih koncentracija CTN koje će se koristiti u ispitivanju citotoksičnog učinka CTN u kombinaciji s drugim mikotoksinima koji se pojavljuju u kućnoj prašini vlažnih prostora, odnosno u hrani.



## 3 MATERIJALI I METODE

### 3.1 STANIČNE KULTURE

Postupak uzgoja i tretiranja stanica izvodio se u sterilnim uvjetima, korištena je sterilna aparatura, a sve se provodilo unutar uređaja s laminarnim strujanjem zraka (engl. *Laminar flow hood*). U ispitivanju su korištene epitelne stanice ljudskog adenokarcinoma pluća A549 i ljudskog hepatocelularnog karcinoma HepG2 (ATCC- American Type Culture Collection, Sjedinjene Američke Države).

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

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 da se stanice odlijepe od podloge, te se stanice na kraju resuspendiraju u svježem mediju. Stanice su se u daljnjem postupku tretirale mikotoksinom CTN.

### 3.2 TRETIRANJE STANICA CITRININOM

Stanice se tripsiniziraju i resuspendiraju u RPMI mediju te se uz pomoć hemocitometra određuje ukupni broj stanica po 1 mL suspenzije. Stanična suspenzija se razrjeđuje s RPMI medijem do koncentracije 10<sup>5</sup>/mL te se 100  $\mu$ L po jažici aplicira u mikrotitarske pločice s ukupno 96 jažica (Thermo Scientific Nunc 96-well plate). Postupak je isti za A549 i HepG2 stanice. 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.

Stanice su potom inkubirane 24 sata, nakon čega su tretirane s CTN. Početna otopina CTN (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) koncentracije 0,01 mol/L dobivena je otapanjem CTN u 100% DMSO otapalu. Od početne otopine napravljene su

razrijeđene otopine u 10 različitih koncentracija, a koncentracije tih ispitivanih otopina su sljedeće: 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ . Svaki tretman ispitivane otopine CTN iste koncentracije primijenjen je u 7 replikata.

Kontrole DMSO primijenjene 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, slijedi ponovna inkubacija od 24 sata.

### 3.3 MTS TEST

Kako bi se ispitao citotoksični učinak CTN na stanice A549 i HepG2, primijenjen je MTS proliferacijski test (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). To je kolorimetrijska metoda koja 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).

Nakon što je prošlo vrijeme inkubacije od 24 sata, u svaku jažicu dodano je 10  $\mu\text{L}$  MTS reagensa te su mikrotitarske pločice ponovno inkubirane 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 formazan topljiv je u staničnom mediju te mu je bez dodatnih postupaka mjerena apsorbancija na 490 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice s 96 jažica (PerkinElmer VictorX3). Što je veća količina nastalog formazana u pojedinoj jažici, veća je i izmjerena  $A(490)$  formazana te je izmjerena apsorbancija time proporcionalna koncentraciji živih stanica u pojedinoj jažici.

### 3.4 OBRADA PODATAKA

U obradi podataka korišten je računalni program Microsoft Excel, Microsoft Office 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD). 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 koje su sadržavale samo medij RPMI i MTS reagens. Rezultati vijabilnosti stanica izražavaju se u odnosu na kontrolu prema formuli:

$$\text{vijabilnost stanica (\%)} = A(\text{tretirane stanice}) / A(\text{kontrolne stanice}) \times 100\%.$$

Srednja vrijednost apsorbancije kontrolnih stanica tretiranih kontrolnom otopinom K1 koristila se u izračunu postotka vijabilnosti stanica tretiranih ispitivanim otopinama CTN

koncentracija 150 i 200  $\mu\text{M}$ . Srednja vrijednost apsorbancije kontrolnih stanica tretiranih kontrolnom otopinom K2 koristila se u izračunu postotka vijabilnosti stanica tretiranih preostalim koncentracijama ispitivanih otopina CTN. Kontrolne stanice predstavljaju 100% preživjelih stanica s obzirom da nisu tretirane toksinom.

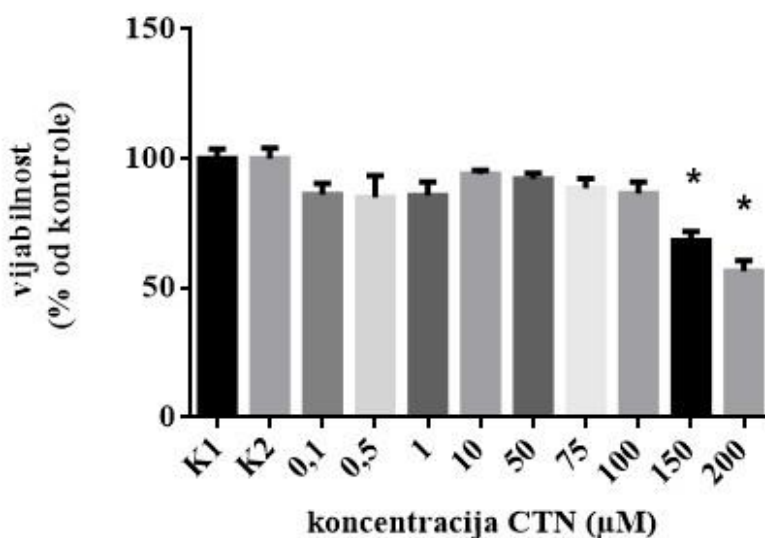
### **3.4.1 Statistička obrada podataka**

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 devijacijama 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 CTN na stanicama sojeva A549 i HepG2 ( $\text{IC}_{50}$ ) dobivene su interpolacijom na temelju nelinearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka i izražene su kao  $\text{IC}_{50} \pm$  standardna devijacija (SD).

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 CITOTOKSIČNOST CITRININA ZA A549 STANICE

Utjecaj CTN na vijabilnost stanica linije A549 primijenjenog u različitim koncentracijama prikazan je grafički (Slika 3). Koncentracije CTN u odnosu na kontrole na grafu su prikazane uz naznačenu statističku značajnost.



**Slika 3.** Grafički prikaz vijabilnosti tretiranih stanica A549 za različite koncentracije CTN u odnosu na kontrole. Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji CTN, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji CTN. Statistički značajna odstupanja od kontrole označene su zvjezdicom „\*“.

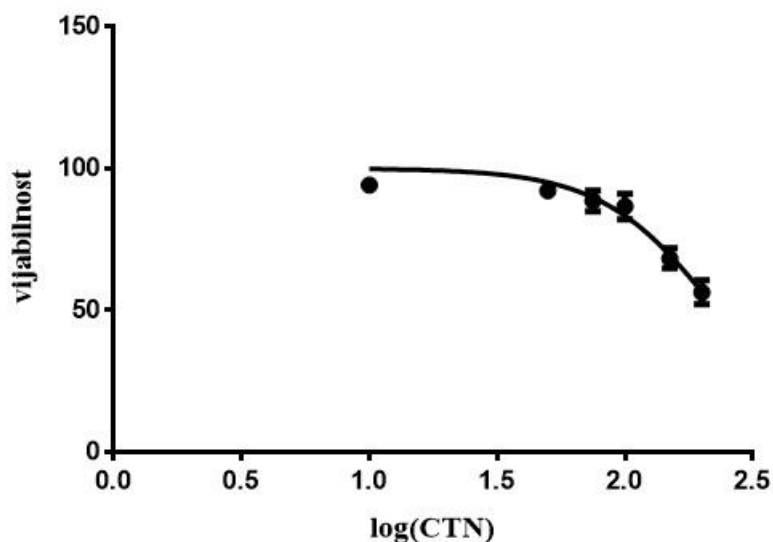
Vrijednosti statističkih parametara dobivenih statističkom obradom replikata rezultata vijabilnosti stanica A549 za pojedinu koncentraciju CTN prikazane su u tablici (Tablica 2).

**Tablica 2.** Statistički parametri dobiveni provođenjem Kolmogorov–Smirnov testa kojim su statistički obrađeni replikati izračunate vijabilnosti stanica A549 za određenu koncentraciju CTN.

Konc. CTN [ $\mu\text{M}$ ]	K1	K2	0,1	0,5	1,0	10	50	75	100	150	200
Srednja vrijednost	100.0	100.0	86.05	84.96	85.83	94.10	92.18	88.56	86.58	68.29	56.39
Standardna devijacija	8.662	8.463	11.49	22.53	10.38	3.136	4.739	6.436	11.04	8.608	9.638
Standardna pogreška aritmetičke sredine	3.874	4.232	4.344	8.514	5.192	1.403	2.119	3.716	4.508	3.514	4.310

Kako je vidljivo iz statistički značajno različitih pokusnih skupina, CTN je u periodu od 24 sata iskazao toksičnost na stanicama A549 tek u primijenjenim koncentracijama od 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$ . Pri tim je koncentracijama izračunata srednja vrijednost vijabilnosti stanica od 68,29% za koncentraciju CTN od 150  $\mu\text{M}$  i 56,39% za koncentraciju CTN od 200  $\mu\text{M}$ .

Transformiranjem vrijednosti koncentracija CTN u logaritamski oblik, dobivena je krivulja nelinearne regresije kojom je grafički prikazan pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije CTN (Slika 4). U obzir su uzete samo koncentracije CTN  $\geq 10 \mu\text{M}$  jer je pri tim koncentracijama vijabilnost pokusnih stanica počela padati u odnosu na kontrolu.



**Slika 4.** Prikaz pada vijabilnosti stanica A549 u ovisnosti o koncentraciji CTN pomoću krivulje nelinearne regresije. Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost  $\pm$  SEM stanične vijabilnosti za koncentracije CTN u rasponu od 10 do 200 $\mu$ M.

Iz krivulje nelinearne regresije dobivena je koncentracija CTN koja smanjuje vijabilnost pokusnih stanica linije A549 na 50%,  $IC_{50} = 228,9 \pm 1,1 \mu\text{M}$ .

Kako je CTN jedan od najmanje proučavanih toksina, a po toksičnosti se nalazi na samom dnu ljestvice (Hesseltine, 1986), postoji samo mali broj provedenih istraživanja citotoksičnosti. Dostupni literaturni podaci dobiveni su provođenjem testa unosa neutralno-crvene boje (neutral red (NR) uptake assay) na stanicama plućnih fibroblasta mužjaka kineskog hrčka soja V79.

U prvoj studiji, testirana je citotoksičnost 14 različitih mikotoksina uključujući i CTN. U toj studiji za CTN je dobivena  $IC_{50} = 53 \pm 10 \mu\text{M}$ , što je znatno manja vrijednost nego ona dobivena u ovome eksperimentu (Behm i sur., 2012). Smanjenje vijabilnosti pokusnih stanica V79 ovisno o koncentraciji toksina u navedenoj studiji mjerilo se 48 sati nakon tretiranja, za razliku od ovog eksperimenta u kojem se vijabilnost mjerila 24 sata od tretmana. Iz tog razloga izračunate vrijednosti  $IC_{50}$  ne mogu se direktno uspoređivati te to može doprinjeti prilično velikoj razlici između tih vrijednosti jer je očekivano da će se kroz dulji period vijabilnost dodatno smanjiti, a time i  $IC_{50}$ . Također, do razlika u rezultatima sigurno su

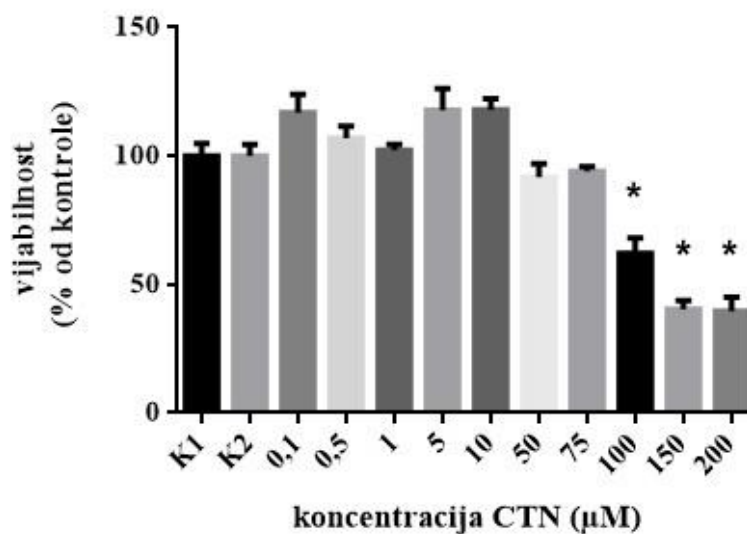
pridonijeli i različiti sojevi stanica na kojima je ispitivanje provedeno, te različita metoda kojom je mjerena vijabilnost stanica. U toj studiji CTN je stavljen u kategoriju srednje toksičnih toksina s obzirom na  $IC_{50}$ , dok veća vrijednost  $IC_{50}$  CTN u ovome radu upućuje na vrlo nisku toksičnost CTN za plućne stanice linije A549.

Literaturni podaci iz druge studije gotovo se jednako razlikuju od rezultata ovog eksperimenta u vrijednosti  $IC_{50}$ , koja iznosi  $IC_{50} = 70 \mu M$ , nakon 24 sata (Föllmann i sur., 2014). Može se primijetiti da je vrijednost  $IC_{50}$  nakon 24 sata ipak nešto veća nego  $IC_{50}$  mjerene nakon 48 sati u prethodnoj studiji, no svejedno se dosta razlikuje od  $IC_{50}$  dobivene u ovome eksperimentu. Utjecaj na razlike u ovim studijama ponovno mogu imati stanice na kojima je eksperiment proveden jer su Föllmann i suradnici također koristili soj V79, te provodili NRU test vijabilnosti isto kao i Behm i suradnici u prethodnoj navedenoj studiji.

U opisanim studijama, rizik od citotoksičnosti CTN za plućne stanice nije smatran velikim jer koncentracije CTN koje su korištene u takvim *in vitro* eksperimentima znatno su veće od onih koje uistinu dopijaju unutar samih stanica putem inhalacije. U *in vivo* studijama koncentracija cirkulirajućeg toksina može se odrediti samo na temelju plazmatske koncentracije, a ne postoji metoda kojom se može sa sigurnošću odrediti unutarstanična koncentracija toksina.

## **4.2 CITOTOKSIČNOST CITRININA ZA HepG2 STANICE**

Kakav je utjecaj različitih koncentracija CTN na vijabilnost stanica linije HepG2 može se vidjeti iz grafičkog prikaza (Slika 5). Koncentracije CTN u odnosu na kontrole na grafu su prikazane uz naznačenu statističku značajnost.



**Slika 5.** Grafički prikaz vijabilnosti tretiranih stanica HepG2 za različite koncentracije CTN u odnosu na kontrole. Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji CTN, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji CTN. Statistički značajna odstupanja od kontrole označene su zvjezdicom „\*“.

Vrijednosti statističkih parametara dobivenih statističkom obradom replikata izračunatih rezultata vijabilnosti stanica za različite koncentracije CTN prikazane su u tablici (Tablica 3).

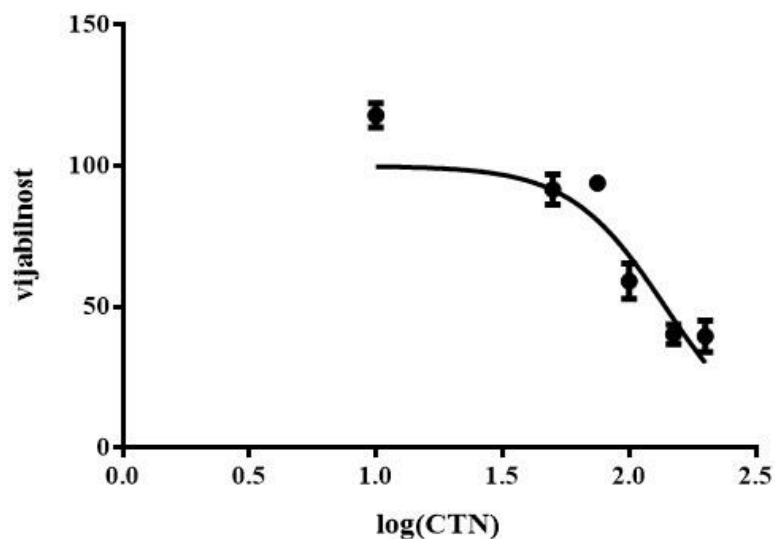


**Tablica 3.** Statistički parametri dobiveni provođenjem Kolmogorov–Smirnov testa kojim su statistički obrađene izračunate vijabilnosti stanica HepG2 za određenu koncentraciju CTN.

Konc. CTN [ $\mu\text{M}$ ]	K1	K2	0,1	0,5	1,0	5,0	10	50	75	100	150	200
Srednja vrijednost	100.0	100.0	116.8	107.0	102.3	117.8	118.0	91.69	93.96	62.24	40.33	39.59
Standardna devijacija	11.11	9.022	18.69	12.21	5.820	22.37	8.683	11.92	3.802	14.68	7.734	11.06
Standardna pogreška aritmetičke sredine	4.968	4.511	7.063	4.614	2.200	8.455	4.342	5.332	1.901	5.991	3.459	5.532

Može se vidjeti kako je CTN u periodu od 24 sata iskazao toksičnost na stanicama HepG2 u primijenjenim koncentracijama od 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$  jer je vijabilnost tih pokusnih skupina statistički značajno manja od kontrole. Pri tim su koncentracijama izračunate sljedeće srednje vrijednosti vijabilnosti stanica: 62,24%, 40,33%, 39,59% za odgovarajuće primijenjene koncentracije CTN: 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ .

Transformacijom vrijednosti koncentracija CTN u logaritamski oblik, dobivena je krivulja nelinearne regresije koja grafički prikazuje pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije CTN (Slika 6). U obzir su uzete samo koncentracije CTN  $\geq 10 \mu\text{M}$  jer je pri tim koncentracijama vijabilnost pokusnih stanica počela padati u odnosu na kontrolu.



**Slika 6.** Prikaz pada vijabilnosti stanica HepG2 u ovisnosti o koncentraciji CTN pomoću krivulje nelinearne regresije. Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost  $\pm$  SEM stanične vijabilnosti za koncentracije CTN u rasponu od 10 do 200 $\mu$ M.

Iz krivulje nelinearne regresije dobivena je koncentracija CTN koja smanjuje vijabilnost pokusnih stanica linije HepG2 na 50%,  $IC_{50} = 139,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ .

Za razliku od eksperimenta provedenog na plućnim stanicama, vrijednost  $IC_{50}$  dobivena ispitivanjem toksičnosti CTN na jetrenim stanicama prilično se poklapa s onima iz dostupnih literaturnih podataka. U studiji provedenoj na stanicama ljudskog hepatocelularnog karcinoma soja Hep3B stanična vijabilnost mjerila se MTT testom, a dobivena vrijednost  $IC_{50}$  za CTN iznosila je  $124 \pm 4,4 \mu\text{M}$  u periodu 24 sata nakon tretmana (Anninou i sur., 2014).  $IC_{50}$  vrijednost iz studije nešto je manja od  $IC_{50}$  u ovome eksperimentu, no kako su vrijednosti vrlo slične zaključak koji su donijeli Anninou i suradnici u svojoj studiji može se primijeniti i na ovaj eksperiment. Iako su razlike u rezultatima male, mogući razlozi koji su do njih doveli su različite stanične linije koje su korištene u ta dva eksperimenta te MTT test koji uključuje još jedan dodatni korak u odnosu na MTS test koji je proveden u ovome eksperimentu.

U drugoj dostupnoj studiji MTT test vijabilnosti proveden je na HepG2 stanicama jednako kao i u ovome eksperimentu, tako da su rezultati vjerojatno bolji za međusobnu usporedbu. U spomenutoj studiji dobivena je  $IC_{50} = 155 \mu\text{M}$ , nakon 24 sata (Gayathri i sur.,

2015). Kao i u studiji koju su proveli Anninou i suradnici, vrijednost  $IC_{50}$  iz druge studije bliska je vrijednosti dobivenoj u ovome eksperimentu no ovaj put je nešto veća. Bez obzira na to, vrijednosti su dovoljno bliske da se rezultati mogu tumačiti na sličan način, a razlike se ponovno mogu pripisati različitim eksperimentalnim uvjetima, odnosno drugačijoj korištenoj metodi.

## 5 ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem nastalog formazana kao produkta u metabolički aktivnim, vijabilnim stanicama linija A549 i HepG2 koje su prethodno tretirane s CTN u koncentracijskom nizu od 10 različitih koncentracija, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- citotoksične koncentracije CTN za plućne stanice linije A549 iznosile su 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$ , što se moglo zaključiti iz toga što je vijabilnost stanica pri tim koncentracijama iznosila 68,29 %, odnosno 56,39 % što se statistički značajno razlikovalo od 100% vijabilnosti kontrolnih stanica.
- koncentracija CTN koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 %, iznosila je  $\text{IC}_{50} = 228 \pm 1,1 \mu\text{M}$ .
- koncentracije CTN koje su imale citotoksični učinak na hepatocelularne stanice linije HepG2 iznosile su redom: 100, 150 i 200  $\mu\text{M}$ . To se može zaključiti iz toga što su te koncentracije dovele do statistički značajno manje vijabilnosti stanica HepG2 u odnosu na vijabilnost kontrolnih stanica, a vijabilnosti stanica su za navedene koncentracije CTN iznosile redom: 62,24 %, 40,33 %, 39,59 %.
- $\text{IC}_{50}$  citrinina za HepG2 stanice iznosila je  $139,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ .
- citrinin je gotovo dvostruko toksičniji za HepG2 stanice u odnosu na staničnu liniju A549, odnosno može se zaključiti da su stanice jetre osjetljivije nego plućne stanice.

## 6 LITERATURA

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

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

Behm C, Föllmann W, Degen GH. Cytotoxic Potency of Mycotoxins in Cultures of V79 Lung Fibroblast Cells. *J Toxicol Environ Heal Part A*, 2012, 75, 1226–1231.

Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int J Food Microbiol*, 1995, 27, 201–213.

Bouslimi A, Bouaziz C, Ayed-Boussema I, Hassen W, Bacha H. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicol*, 2008, 251, 1–7.

Bragulat MR, Martínez E, Castellá G, Cabañes FJ. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126, 43–48.

Brown JP, Cartwright NJ, Robertson A, Whalley WB. Structure of citrinin. *Nature*, 1948, 162, 72–73.

Carlton WW, Tuite J. Metabolites of *P. viridacatum*: toxicology. U: Mycotoxins in human and animal health. Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, urednici, Park Forest South, Pathotox, 1977, str. 525–555.

Chagas GM, Klüppel MLW, Campello A de P, Buchi D de F, Oliveira MBM de. Alterations Induced by Citrinin in Cultured Kidney Cells. *Cell Struct Funct*, 1994, 19, 103–108.

- Chagas GM, Oliveira MBM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV—Effect on Ca<sup>2+</sup> transport. *Cell Biochem Funct*, 1995, 13, 53–59.
- Chan WH, Shiao NH. Effect of citrinin on mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Toxicol*, 2007, 24, 120–125.
- Chrevatidis A. MYCOTOXINS | Occurrence and Determination. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier, 2003, str. 4089–4096.
- Deshpande S. Handbook of Food Toxicology. U: Handbook of Food Toxicology. Marcel Dekker, urednik, New York, 2002, str. 163–218.
- Dietrich R, Schmid A, Märtlbauer E. Citrinin in fruit juices. *Mycotoxin Res*, 2001, 17, 156–159.
- Doughari JH. The Occurrence, Properties and Significance of Citrinin Mycotoxin. *J Plant Pathol Microbiol*, 2016, 6.
- Edite Bezerra da Rocha M, Freire F da CO, Erlan Feitosa Maia F, Izabel Florindo Guedes M, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 2014, 36, 159–165.
- El Adlouni C, Tozlovanu M, Naman F, Faid M, Pfohl-Leszkowicz A. Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “Greek style” of Moroccan origin. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50, 507–512.
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *EFSA J*, 2004, 101.
- Flajs D, Peraica M. Toxicological properties of citrinin. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009, 60, 457–464.
- Föllmann W, Behm C, Degen GH. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A *in vitro*. *Arch Toxicol*, 2014, 88, 1097–1107.

- Franco CM, Fente CA, Vazquez B, Cepeda A, Lallaoui L, Prognon P, Mahuzier G. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography--fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *J Chromatogr, A*, 1996, 723, 69–75.
- Gayathri L, Dhivya R, Dhanasekaran D, Periasamy VS, Alshatwi AA, Akbarsha MA. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. *Food Chem Toxicol*, 2015, 83, 151–163.
- Gupta M, Sasmal D, Bandyopadhyay S, Bagchi G, Chatterjee T, Dey S. Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. *Toxicol*, 1983, 26, 55–62.
- Hetherington AC, Raistrick H. Studies on biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow coloring matter, citrinin produced from glucose by *Penicilium citrininum* Thom. *Phil Trans Roy Soc London, Ser B*, 1931, 220, 269–296.
- Hirota M, Menta A, Yoneyama K, Kitabatake N. A Major Decomposition Product, Citrinin H<sub>2</sub>, from Citrinin on Heating with Moisture. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 66, 206–210.
- Hood RD, Hayes AW, Scammell JG. Effects of prenatal administration of citrinin and viriditoxin to mice. *Food Cosmet Toxicol*, 1976, 14, 175–178.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of cancerogenic risks to humans, Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components. Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. *IARC Press*, 1986, 40, 66–77.
- Jimenez M, Mateo R, Querol A, Huerta T, Hernandez E. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*, 1991, 115, 121–127.
- Johannessen LN, Nilsen AM, Lovik M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. *Toxicol Lett*, 2007, 168, 103–112.

- Keller J, Borzekowski A, Haase H, Menzel R, Rueß L, Koch M. Toxicity assay for citrinin, zearalenone and zearalenone-14-sulfate using the nematode *Caenorhabditis elegans* as model organism. *Toxins (Basel)*, 2018, 10.
- Klaric MS, Zeljezic D, Domijan A-M, Peraica M, Pepeljnjak S. Cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis induced by ochratoxin A and citrinin in porcine kidney PK15 cells: Effects of single and combined mycotoxins. *Toxicol Lett*, 2007, 172, S56.
- Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW, Ehrlich VA. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in humanderived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. *Nutr Cancer*, 2004, 50, 190–197.
- Köppen R, Koch M, Siegel D, Merkel S, Maul R, Nehls I. Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86, 1595–1612.
- Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 1973, 81, 689–695.
- Krogh P. Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nord Vet Med*, 1976, 28, 452–458.
- Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. Evaluation of genotoxic risk on oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 191, 255–263.
- Mannon J, Johnson E. Fungi down on the farm. *New Sci*, 1985, 12–16.
- Markov K, Pleadin J, Bevardi M, Vahčić N, Sokolić-Mihalak D, Frece J. Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 2013, 34, 312–317.
- Mayer S, Engelhart S, Kolk A and Blome H. The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace-related hazards. *Gefahrst Reinhalt L*, 2007, 67, 407–417.



- Mayura K, Parker R, Berndt WO, Phillips TD. Effect of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and citrinin in the rat. *J Toxicol Environ Health*, 1984, 13, 553–561.
- Mycotoxins, 2018., <https://www.who.int>, pristupljeno 9. 5. 2019.
- Niculita-Hirzel H, Hantier G, Storti F, Plateel G, Roger T. Frequent Occupational Exposure to Fusarium Mycotoxins of Workers in the Swiss Grain Industry. *Toxins (Basel)*, 2016, 8, 370.
- Ostry V, Malir F, Ruprich J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins (Basel)*, 2013, 5, 1574–1586.
- Pitt JI, Basílico JC, Abarca ML, López C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*, 2000, 38, 41–46.
- Poupko R, Luz Z, Destro R. Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions. *J Phys Chem A*, 1997, 101, 5097–5102.
- Rasmussen RR, Storm IMLD, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 765–776.
- Reddy R, Hayes A, Berndt W. Disposition and metabolism of C-14-labeled citrinin in pregnant rats. *Toxicol*, 1982, 25, 161–174.
- Reddy RV, Mayura K, Hayes AW, Berndt W. Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats. *Toxicol*, 1982, 25, 150–160.
- Ribeiro SMR, Chagas GM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem Funct*, 1997, 15, 203–209.
- Sabater-Vilar M, Maas RF, Fink-Gremmels J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutat Res*, 1999, 444, 7–16.
- Saito M, Enomoto M, Tatsuno T, Uruguchi K. Yellowed rice toxins: Luteoskyrin and related compounds, chlorine-containing compounds and citrinin. *Microb Toxins*, 1971, 6, 299–380.

- Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J*, 2012, 10, 2605.
- Scott PM, van Walbeek W, Kennedy B, Anyeti B. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J Agric Food Chem*, 1972, 20, 1103–1109.
- Sforza S, Dall’Asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25, 54–76
- Shu P-Y, Lin C-H. Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. *Anal Sci*, 2002, 18, 283–287.
- Smith M-C, Madec S, Coton E, Hymery N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins (Basel)*, 2016, 8, 94.
- Spanjer MC, Rensen PM, Scholten JM. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit Contam Part A*, 2008, 25, 472–489.
- Tammer B, Lehmann I, Nieber K, Altenburger R. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. *Toxicol Lett*, 2007, 170, 124–133.
- Tanaka H, Umekawa T, Kikukawa T, Toyoda N. Autoimmune hepatitis complicated with antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 2002, 47, 142–145.
- Tran-Dinh N. Mycotoxins and food. *Microbiol Aust*, 2015, 34, 70.
- Trantham AL, Wilson DM. Fluorometric screening method for citrinin in corn, barley, and peanuts. *J Assoc Off Anal Chem*, 1984, 67, 37–38.
- Trivedi A Ben, Hirota M, Doi E, Kitabatake N. Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 2004, 0, 2167.

- Tuomi T, Johnsson T, Hintikka EL, Reijula K. Detection of aflatoxins (G(1-2), B(1-2)), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes. *Analyst*, 2001, 126, 1545–1550.
- Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kahkola P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 1899–1904.
- Vazquez BI, Fente C, Franco CM, Quinto E, Cepeda A, Prognon P. Rapid semi-quantitative fluorimetric determination of citrinin in fungal cultures isolated from cheese and cheese factories. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24, 397–400.
- Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ Toxicol*, 2002, 17, 211–218.
- Wong HC, Koehler PE. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J Food Sci*, 1981, 46, 589–592.
- Xu B, Jia X, Gu L, Sung C. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 2006, 17, 271–285.
- Xu BJ, Wang QJ, Lee JH, Jia XQ, Sung CK. HPLC analysis of citrinin in red yeast rice. *Food Sci Biotechnol*, 2003, 12, 376–380.
- Yu FY, Liao YC, Chang CH, Liu BH. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol Lett*, 2006, 161, 143–151.

## 7 SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1 SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni kojima su ljudi u najvećem broju slučajeva izloženi putem hrane, a rjeđe inhalacijom ili transdermalnim putem. Sveprisutnost mikotoksina može imati velike posljedice na zdravlje ljudi pa se iz tog razloga nastoje donijeti ograničenja za dozvoljeni sadržaj mikotoksina u hrani koji nema štetan učinak za ljude.

Citrinin (CTN) je jedan od prvih otkrivenih mikotoksina, ali unatoč tome jedan od najneistraženijih. Iako je u početku otkriven kao potencijalni antibiotik, ubrzo je daljnim istraživanjima utvrđena i njegova nefrotoksičnost. Osim nefrotoksičnosti, sumnja se i na imunotoksičnost, genotoksičnost i reproduktivnu toksičnost CTN. Kao posljedica manjka literaturnih podataka, nije moguće odrediti ukupnu izloženost ljudi CTN putem hrane, inhalacije i transdermalnog unosa niti koje su maksimalne koncentracije CTN koje još uvijek ne ostvaruju štetne učinke.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi citotoksične koncentracije CTN za ljudske stanice adenokarcinoma pluća A549 i stanice hepatocelularnog karcinoma HepG2 te na temelju tih citotoksičnih koncentracija dobiti koncentraciju CTN koja smanjuje vijabilnost stanica pojedine linije na 50%. Za određivanje citotoksičnog učinka CTN primijenjenog u 10 različitih koncentracija (0,1-200  $\mu\text{M}$ ) tijekom 24 sata, izvodio se MTS proliferacijski test kojim se dobio podatak o vijabilnosti tretiranih stanica.

Citrinin je ostvario citotoksične učinke u koncentracijama od 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$  na stanicama A549 te u koncentracijama od 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$  na stanicama HepG2. Koncentracija CTN koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 %, iznosila je  $\text{IC}_{50} = 228 \pm 1,1 \mu\text{M}$ , a pokusnih stanica linije HepG2 iznosila je  $\text{IC}_{50} = 139,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ . Rezultati citotoksičnosti i  $\text{IC}_{50}$  pokazuju da je CTN gotovo dvostruko toksičniji za HepG2 stanice u odnosu na staničnu liniju A549, odnosno može se zaključiti da su stanice jetre osjetljivije negoli plućne stanice.

## 7.2 SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds. They cause toxic effects in humans mainly by ingestion of contaminated food, and more rarely through inhalation or skin contact. Since mycotoxins are ubiquitous, they can do great damage to human health and that is the reason why the limits of mycotoxins' quantity in food should be set, so there could be no harm done to humans by ingestion of such food.

Citrinin (CTN) is one of the first discovered mycotoxines, nevertheless it is still quite uninvestigated. Even though CTN was first recognised as a potential antibiotic, soon it was discovered to be nephrotoxic. Apart from nephrotoxicity, CTN is also suspected to cause immunotoxicity, genotoxicity and reproductive toxicity. In the absence of relevant data, it is impossible to determine total human exposure by food consumption, inhalation or through dermal exposure. The critical CTN concentration that would result in an exposure equal to the level of no concern for toxicity could not be determined either.

The aim of this study was to determine cytotoxic concentrations of CTN in human adenocarcinoma cells A549 and hepatocellular carcinoma cells HepG2. Knowing the cytotoxic concentrations made it possible to calculate CTN concentration that is required to lower the cell viability of each cell line to 50% of maximum viability. The MTS assay was performed to measure the viability of cells after 24 h treatment with 10 different concentrations of CTN (0.1-200  $\mu\text{M}$ ).

Concentrations of CTN that resulted in cytotoxic effect in A549 cells were 150  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  in HepG2 cells respectively. Concentration of CTN that lowered the viability of treated A549 cells to 50% was  $\text{IC}_{50} = 228 \pm 1.1 \mu\text{M}$ , and that concentration for HepG2 cells was  $\text{IC}_{50} = 139.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ . In conclusion, CTN is twice as toxic to HepG2 cells comparing to A549 cells, suggesting that liver cells are more susceptible to toxicity of CTN than lung cells.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Citotoksičnost citrinina za ljudske stanice pluća i jetre

Lara Mamić Subašić

### SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni kojima su ljudi u najvećem broju slučajeva izloženi putem hrane, a rijeđe inhalacijom ili transdermalnim putem. Sveprisutnost mikotoksina može imati velike posljedice na zdravlje ljudi pa se iz tog razloga nastoje donijeti ograničenja za dozvoljeni sadržaj mikotoksina u hrani koji nema štetan učinak za ljude. Citrinin (CTN) je jedan od prvih otkrivenih mikotoksina, ali unatoč tome jedan od najneistraženijih. Iako je u početku otkriven kao potencijalni antibiotik, ubrzo je daljnim istraživanjima utvrđena i njegova nefrotoksičnost. Osim nefrotoksičnosti, sumnja se i na imunitoksičnost, genotoksičnost i reproduktivnu toksičnost CTN. Kao posljedica manjka literaturnih podataka, nije moguće odrediti ukupnu izloženost ljudi CTN putem hrane, inhalacije i transdermalnog unosa niti koje su maksimalne koncentracije CTN koje još uvijek ne ostvaruju štetne učinke. Cilj ovoga rada bio je utvrditi citotoksične koncentracije CTN za ljudske stanice adenokarcinoma pluća A549 i stanice hepatocelularnog karcinoma HepG2 te na temelju tih citotoksičnih koncentracija dobiti koncentraciju CTN koja smanjuje vijabilnost stanica pojedine linije na 50%. Za određivanje citotoksičnog učinka CTN primijenjenog u 10 različitih koncentracija (0,1-200  $\mu\text{M}$ ) tijekom 24 sata, izvodio se MTS proliferacijski test kojim se dobio podatak o vijabilnosti tretiranih stanica. Citrinin je ostvario citotoksične učinke u koncentracijama od 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$  na stanicama A549 te u koncentracijama od 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$  na stanicama HepG2. Koncentracija CTN koja je smanjila vijabilnost pokusnih stanica linije A549 za 50 %, iznosila je  $IC_{50} = 228 \pm 1,1 \mu\text{M}$ , a pokusnih stanica linije HepG2 iznosila je  $IC_{50} = 139,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ . Rezultati citotoksičnosti i  $IC_{50}$  pokazuju da je CTN gotovo dvostruko toksičniji za HepG2 stanice u odnosu na staničnu liniju A549, odnosno može se zaključiti da su stanice jetre osjetljivije negoli plućne stanice.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 6 grafičkih prikaza, 3 tablice i 70 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: mikotoksini, citrinin, plućne i jetrene stanice, citotoksičnost

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

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

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Nevenka Kopjar**, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju Instituta za medicinska istraživanja i medicine rada u Zagrebu

Rad prihvaćen: lipanj 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Cytotoxicity of citrinin to human lung and liver cells

Lara Mamić Subašić

#### SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds. They cause toxic effects in humans mainly by ingestion of contaminated food, and more rarely through inhalation or skin contact. Since mycotoxins are ubiquitous, they can do great damage to human health and that is the reason why the limits of mycotoxins' quantity in food should be set, so there could be no harm done to humans by ingestion of such food. Citrinin (CTN) is one of the first discovered mycotoxines, nevertheless it is still quite uninvestigated. Even though CTN was first recognised as a potential antibiotic, soon it was discovered to be nephrotoxic. Apart from nephrotoxicity, CTN is also suspected to cause immunotoxicity, genotoxicity and reproductive toxicity. In the absence of relevant data, it is impossible to determine total human exposure by food consumption, inhalation or through dermal exposure. The critical CTN concentration that would result in an exposure equal to the level of no concern for toxicity could not be determined either. The aim of this study was to determine cytotoxic concentrations of CTN in human adenocarcinoma cells A549 and hepatocellular carcinoma cells HepG2. Knowing the cytotoxic concentrations made it possible to calculate CTN concentration that is required to lower the cell viability of each cell line to 50% of maximum viability. The MTS assay was performed to measure the viability of cells after 24 h treatment with 10 different concentrations of CTN (0.1-200  $\mu\text{M}$ ). Concentrations of CTN that resulted in cytotoxic effect in A549 cells were 150  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  in HepG2 cells respectively. Concentration of CTN that lowered the viability of treated A549 cells to 50% was  $\text{IC}_{50} = 228 \pm 1.1 \mu\text{M}$ , and that concentration for HepG2 cells was  $\text{IC}_{50} = 139.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ . In conclusion, CTN is twice as toxic to HepG2 cells comparing to A549 cells, suggesting that liver cells are more susceptible to toxicity of CTN than lung cells.

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

Thesis includes: 33 pages, 6 figures, 3 tables and 70 references. Original is in Croatian language.

Keywords: mycotoxins, citrinin, lung and liver cells, cytotoxicity

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

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Nevenka Kopjar, Ph.D.** *Scientific Advisor*, Institute for Medical Research and Occupational Health

The thesis was accepted: June 2019.