

Citotoksičnost okratoksina A za ljudske stanice pluća i jetre

Pecotić, Roko

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:190645>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Roko Pecotić

**Citotoksičnost okratoksina A za ljudske stanice
pluća i jetre**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, koja mi je pomogla u izradi ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima na Zavodu za mikrobiologiju na pomoći i stvaranju izvrsne radne atmosfere.

I na kraju zahvaljujem se svojoj obitelji, djevojci i prijateljima na podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1	MIKOTOKSINI.....	1
1.1.1	Toksikologija mikotoksina	1
1.2	OKRATOKSIN A	2
1.2.1	Biosinteza okratoksina A.....	3
1.2.2	Toksikokinetika okratoksina A.....	3
1.2.3	Okratoksin A u hrani	5
1.2.4	Okratoksin A u zraku.....	5
1.2.5	Biomarkeri izloženosti okratoksinu A.....	6
1.2.6	Nefrotoksičnost okratoksina A	6
1.2.7	Imunotoksičnost okratoksina A	7
1.2.8	Neurotoksičnost okratoksina A	8
1.2.9	Kancerogeni učinak okratoksina A.....	9
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3.	MATERIJALI I METODE.....	11
3.1	OKRATOKSIN A	11
3.2	UZGOJ I TRETIRANJE STANICA	11
3.2.1	Uzgoj stanica	11
3.2.2	Tretiranje stanica s OTA.....	11
3.2.3	Ispitivanje citotoksičnog učinka MTS testom.	12
3.3	OBRADA PODATAKA	12
3.3.1	Statistička obrada podataka	13
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	14
4.1	CITOTOKSIČNO DJELOVANJE OTA NA A549 STANICAMA	14
4.2	CITOTOKSIČNO DJELOVANJE OTA NA HEPG2 STANICAMA.....	16
4.3	RASPRAVA.....	19

5.	ZAKLJUČCI.....	21
6.	LITERATURA	22
7.	SAŽETAK/SUMMARY	29
	7.1 SAŽETAK.....	29
	7.2 SUMMARY.....	30
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1 MIKOTOKSINI

Mikotoksini su male molekule koje filamentozne gljivice sintetiziraju kao sekundarne metabolite. Predstavljaju rizik za zdravlje i u nekim slučajevima mogu uzrokovat smrt čovjeka i ostalih kralježnjaka (Bennett, 1987).

Termin mikotoksin prvi put je korišten 1962. godine nakon veterinarske krize kraj Londona, tijekom koje je uginulo oko 100,000 purica. Kada se pomor purica povezao s kikirikijem kontaminiranim sekundarnim metabolitima plijesni *Aspergillus flavus*, poznato kao aflatoksin, znanstvenicima je sinula ideja da postoji mogućnost da bi i ostali metaboliti plijesni mogli biti smrtonosni (Forgacs, 1962)

U periodu između 1960. i 1975. godine odvijala se tkz. mikotoksinska zlatna groznica. Tada je mnogo znanstvenika počelo istraživati ove toksogene supstancije i danas poznajemo više od 400 mikotoksina (Bennett i Klich, 2003).

Postoji nekoliko pristupa u klasifikaciji mikotoksina; primjerice biolozi ih razvrstavaju u generične grupe kao što su teratogeni, mutageni, karcinogeni i alergeni; kliničari ih dijele ovisno o ciljnom organu djelovanja na hepatotoksine, nefrotoksine, neurotoksine, imunotoksine; kemičari prema organskoj strukturi, na primjer laktoni ili kumarini; biokemičari prema putu biosinteze kao što su poliketidi ili derivirani iz aminokiselina; mikolozi prema plijesni koja ih proizvodi, na primjer *Aspergillus* toksini ili *Penicillium* toksini. Niti jedna od ovih vrsta klasifikacije nije idealna i često se događa da se metabolit nađe u više grupa unutar jedne vrste klasifikacije. Na primjer, aflatoksin je ujedno klasificiran kao hepatotoksičan, mutagen i karcinogen (Bennett i Klich, 2003).

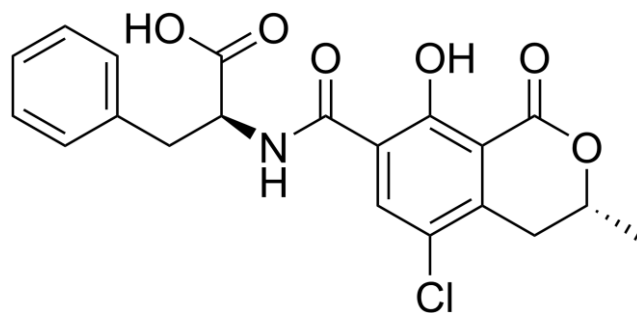
1.1.1 Toksikologija mikotoksina

Bolesti uzrokovane mikotoksinima nazivamo mikotoksikoze. Da bi se bolest mogla predstaviti kao mikotoksikoza potrebno je dokazati vezu između doze, odgovora mikotoksina i bolesti, odnosno potrebno je napraviti epidemiološku studiju. Uz tu epidemiološku studiju valja priložiti i studiju koja povezuje simptome bolesti i taj mikotoksin u nekom životinjskom modelu. Izloženost ljudi mikotoksinu dalje se utvrđuje okolišnim i biološkim praćenjem, gdje okolišno praćenje obuhvaća mjerenje mikotoksina u hrani, zraku ili, vodi. Biološko praćenje obuhvaća mjerenje metabolita, odnosno biomarkera izloženosti kao i dokazivanjem mikotoksininskih rezidua u tkivu, tjelesnim tekućinama ili izlučevina ljudi koji žive na određenom području (Hsieh, 1988).

Veća izloženost populacije mikotoksinima je više zastupljena u područjima gdje su metode rukovanja i skladištenja hrane neadekvatne, gdje je malnutricija veliki problem i gdje nije uspostavljen adekvatan zakonski propisani nadzor zdravstvene sigurnosti hrane. Iako se i u razvijenijim državama javljaju slučajevi gdje su određene podskupine ljudi više izloženi mikotoksinima, na primjer u Sjedinjenim Američkim Državama latino populacija konzumira više kukuruza u odnosu na ostatak stanovništva, pa radi toga imaju veću šansu biti izloženi mikotoksinima koji kontaminiraju kukuruz, npr. *Fusarium* toksinima (Barrett, 2000). Upravo zbog toga države svijeta provode razne metode s ciljem držanja razine kontaminacije hrane mikotoksinima na najnižu moguću razinu. Te metode za kontrolu mikotoksina su većinom preventivne, a one uključuju dobru poljoprivrednu praksu, kontinuirano praćenje razine kontaminacije mikotoksinima, regulaciju temperature i vlage, i sušenje usjeva nakon žetve. Trenutno se razvijaju mnoge metode koje bi prevenirale kontaminaciju usjeva. Neke od tih metoda su razvoj biljaka koje su rezistentne na gljivične infekcije, korištenje agensa za biokontrolu, uvođenje bezopasnih plijesni kao supstitucija toksogenim, korištenje adsorbensa koji bi na sebe vezao mikotoksin pa tako smanjio njegovu bioraspoloživost zavrijeme digestije, dekontaminacija pomoću mikroorganizama poput *Eubacterium* ili kvasca i ciljanje regulatornih gena koji sudjeluju u biosintezi mikotoksina. Nažalost, ni jedna ovih metoda nije riješila problem kontaminacije mikotoksinima (Abdallah i sur., 2015).

1.2 OKRATOKSIN A

Okratoksin A (Slika 1) je otkriven 1965. godine u Južnoj Afričkoj Republici, izolirali su ga van der Merwe i suradnici iz kukuruznog jela kontaminiranim s vrstom *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe i sur., 1965). Nedugo nakon toga, okratoksin A (OTA) je izoliran iz komercijalnog kukuruznog jela u Sjedinjenim Američkim Državama i tad je prepoznat kao snažan nefrotoksin (Shotwell i sur., 1969). OTA i srodni metaboliti pronađeni su u mnogim *Aspergillus* vrstama, kao što su *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus carbonarius* i *Aspergillus niger* (Bui-Klimke i Wu, 2015; Frisvad i sur., 2004). Osim roda *Aspergillus*, OTA nalazimo i u rodu *Penicillium*, točnije u vrsti *Penicillium verrucosum* koji je uobičajen zagađivač ječma (Chu, 1974; Pitt, 1987).



Slika 1. Struktura okratoksina A

1.2.1 Biosinteza okratoksina A

Mnogo faktora utječe na sintezu okratoksina A (OTA) u pojedinim vrsta producenata. Ti faktori su temperatura, aktivitet vode, pH, vrsta substrata, prisutnost kompetitivne mikrobiote, integritet sjemenke, plin u atmosferi i korišteno zaštitno sredstvo (Marquardt i Frohlich, 1992; Pitt i sur., 2000). Najpovoljnija temperatura za sintezu OTA je od 12 do 37°C za rod *Aspergillus* i 4 do 31°C za vrstu *Penicillium verrucosum* (Northolt i sur., 1979). Optimalni aktivitet vode je 0.95-0.99, a pH između 6 i 7, iako je pokazano da se sinteza vrši i ispod 10 (Northolt i sur., 1979; Pitt i sur., 2000). Često je prisutan u uljaricama kao što su kikiriki i soja, a rijede u zrnatim kulturama kao pšenica i kukuruz (Madhyastha i sur., 1990).

Primarni organi toksičnog djelovanja OTA su bubrezi. On je nefrotoksičan za sve životinjske vrste i studije upućuju na to da je toksičan i za čovjeka. Pored toga, OTA djeluje neurotoksično, imunosupresivno, karcinogeno i citotoksično (Kuiper-Goodman i Scott, 1989). Uzrokuje poremećaje u staničnoj fiziologiji na mnogo načina od kojih je najbitniji njegov utjecaj na enzime u metabolizmu fenilalanina gdje uglavnom djeluje kao inhibitor enzima potrebnih za sintezu fenilalanin-tRNA kompleksa (Bunge i sur., 1979). Uz to OTA ima pro-oksidativno djelovanje stimulirajući lipidnu peroksidaciju te inhibira tvorbu ATP-a u mitohondijima (Meisner i Meisner, 1981; Rahimtula i sur., 1988).

1.2.2 Toksikokinetika okratoksina A

Mehanizmi apsorpcije, distribucije i eliminacije OTA su nam dobro poznati, a mehanizmi biotransformacije još nisu potpuno razjašnjeni. Udio apsorpcije OTA razlikuje se među vrstama i u tom procesu veliku ulogu igraju fenilalaninska komponenta i hidroksilna skupina izokumarinskog dijela OTA (Ringot i sur., 2006). Ulaskom u krv OTA se u visokom postotku veže albumin i ostale proteine seruma što olakšava pasivnu apsorpciju OTA i

1.2.3 Okratoksin A u hrani

Najčešća izvješća o kontaminaciji hrane s OTA odnose se na žitarice, a nešto manje na grožđe i vino (Creppy, 1999; Speijers i van Egmond, 1993). OTA je još pronađen i u grahu, kavi, kakau, dječjoj hrani, orašastim plodovima, pivu i u začinima kao što su crni papar, korijandar, đumbir, kurkuma i čili u prahu (Speijers i van Egmond, 1993). Najobuhvatniji provedeni izvještaj o kontaminaciji OTA u hrani je proveden 2002. godine pod nazivom Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States (Miraglia i Brera, 2002). Ovo iznimno detaljno izvješće pruža pregled podataka o kontaminaciji hrane s OTA i o izloženosti koja se temelji na raznim studijama gdje se mjerila koncentracija u tjelesnim tekućinama kao što su serum i majčino mlijeko. Na temelju analiza doneseno je više zaključaka; razina kontaminacije s OTA u žitaricama mnogo je niža od predloženih limita u EU; nedostatak podataka o razini kontaminacije u mnogim proizvodima veliki je problem jer je nemoguće procijeniti sveukupnu izloženost ovom mikotoksinu u državama Europske Unije; unatoč lošoj harmonizaciji u skupljanju uzoraka i analitičkim metodama, prikupljeni podaci su dovoljni da se dobije generalna slika o kontaminaciji koja se može upotrijebiti u uspostavi standarda u EU; broj pozitivnih uzoraka u ovoj analizi puno je veći od uzoraka u prijašnjim analizama u EU, što je vjerojatno posljedica uvođenja osjetljivijih analitičkih metoda. Pokazalo se da je najveća zastupljenost OTA u žitaricama (50%), vinu (13%), kavi (10%), začinima (8%), pivu (5%), kakau (4%), sušenom voću (3%), mesu (1%).

1.2.4 Okratoksin A u zraku

Unos OTA hranom više je istražen od unosa inhalacijom, no izloženost OTA inhalacijom svejedno predstavlja veliki rizik za zdravlje. Najizloženiji su ljudi koji rade u poljoprivrednoj proizvodnji poput silosa žitarica i mlinova, te ljudi koji žive u zgradama s problemom vlage i curenja vode zbog čega dolazi do razvoja plijesni (Hope i Hope, 2012). U ljudi koji žive u takvim uvjetima su zabilježene povišene razine OTA u urinu. Najbolji pokazatelj rizika koji predstavlja inhalirani OTA je slučaj akutnog zatajivanja bubrega u radnika koji su bili izloženi OTA za vrijeme rada u silosu, koji je bio zatvoren nekoliko godina. U njemu se dokazala visoka razina OTA u zraku zbog razvoja *Aspergillus ochraceus* (Di Paolo i sur., 1994). Radnici su uz zatajenje bubrega imali poteškoće s disanjem, retrosternalnu bol i asteniju. Istraživanje provedeno 2012. godine u Hrvatskoj je zabilježilo da je prosječna koncentracija plijesni u zraku bila 160 puta veća od koncentracije u stanovima i podrumima zgrada što upućuje na potrebu dodatnog istraživanja mogućeg citotoksičnog i genotoksičnog utjecaja mikotoksina u zraku na zdravlje čovjeka (Šegvić Klarić i sur., 2015).

1.2.5 Biomarkeri izloženosti okratoksinu A

Biomonitoring OTA je najbolja metoda određivanja ljudske izloženosti tom mikotoksinu (Degen, 2011). Najbitniji biomarkeri su koncentracija OTA u majčinom mlijeku, u krvnom serumu, u urinu i bubrezima koje se obavlja post-mortem ili nakon nefrektomije (Duarte i sur., 2011). Prve studije koje su govorile o pristunosti OTA u krvi čovjeka bile su na Balkanu 70-ih godina 20. stoljeća (Hult i sur., 1982). Peter M. Scott opisuje krvni serum kao specifičan uzorak zbog visokog afiniteta vezanja okratoksina A na serumski albumin i ostale male proteine krvi, što rezultira povećanim koncentracijama OTA u krvi i njegovim dužim zadržavanjem. Stoga se krvni serum koristi za promatranje izloženosti tijekom nekog dužeg razdoblja, dok se urin koristi za procjenu dnevnog unosa (Scott, 2005). Koncentracije OTA u majčinom mlijeku su niže od onih u krvi, ali pokazuju ovisnost o geografskom području i prehranbenim navikama majke (Breitholtz-Emanuelsson i sur., 1993; Micco i sur., 1991; Skaug i sur., 2001). Pristunost OTA u bubrezima izravno dokazuje izloženost ovom mikotoksinu, međutim broj publikacija koje to potvrđuju je vrlo mali zbog prirode biološkog uzorka (Malir i sur., 2012).

Problem precizne procjene populacije OTA proizlazi iz niza razloga; primjerice postoje razlike u kontaminaciji usjeva iste biljke koja se požnjela iste godine; mjerenjem razina OTA u krvi, urinu i majčinom mlijeku ne može se točno identificirati izvor kontaminacije OTA (Hald, 1991). Ovi nedostaci bi se mogli prevladati na dva načina; jedna studija bi trebala biti veća kohort ili *case-control* studija u različitim područjima na svijetu gdje bi se kontrolirali sociodemografski i ostali rizični faktori; druga studija bi trebala analizirati sadržaj OTA u hrani koju ispitanici dnevno konzumiraju uz praćenje biomarkera u biološkim uzorcima (krv/urin); studija bi trebala trajati najmanje mjesec dana zbog relativno dugog vremena poluživota OTA i zbog renalne eliminacije. Takve studije bi omogućile točniju procjenu rizika unosa OTA ali i drugih mikotoksina koji je pojavljuju kao kontaminanti hrane (Bui-Klimke i Wu, 2015).

1.2.6 Nefrotoksičnost okratoksina A

Nefritički sindrom ili glomerulonefritis je bolest glomerula koju karakterizira edem, povišeni krvni tlak i prisutnost eritrocita u urinu. Uzrok je multifaktorijalan, može biti posljedica streptokokne upale kao što je gnojna angina, ili može biti posljedica upala pluća, apcesa u trbušnim organima, vodenih kozica i još raznih drugih infekcija. Osim navedenog uzrok nefritičkog sindroma može biti i OTA, ovisno o koncentraciji u kojoj je prisutan u organizmu (Bui-Klimke i Wu, 2015). Pretpostavlja se da OTA oštećuje epitelne stanice bubrega na proksimalnim tubulima, a mehanizam djelovanja još nije sasvim razjašnjen.

Dosadašnja istraživanja OTA (OTA) potaknuta su većinom zbog moguće uloge u nastanku endemskih nefropatija (EN). U područja karakteristična za EN kao što su Hrvatska, Bugarska, Srbija i Tunis izloženost OTA je podrobno istraživana, no mehanizam i dalje nije u potpunosti razjašnjen (Bui-Klimke i Wu, 2015). Pretpostavka je da djeluje citotoksično, smanjenjem unutarstanične koncentracije kalcija, indukcijom stvaranja reaktivnih kisikovih radikal, smanjenjem aktivnosti superoksid dismutaze, pucanjem DNA, oksidacijom i hipometilacijom DNA (Zheng i sur., 2013). Pri kroničnoj izloženosti dolazi do smanjenja bubrega i do nastupanja intestinalne fibroze. Na koncu dolazi do poremećaja bubrežne funkcije koja vodi do enzimurije, poliurije, glavobolje, lumbalne boli i anemije (Plestina i sur., 1991). Provedene studije nisu uspjele povezati OTA s EN-om te se uzrok EN-u i dalje ne zna.

1.2.7 Imunotoksičnost okratoksina A

Različiti mehanizmi imunotoksičnosti OTA nisu još potpuno poznati zbog relativno malog broja provedenih studija i zbog nekih proturječnih studija. Povrh toga, mnogo studija bile su provedene na peradi, što dodatno komplicira situaciju zbog varijacija među vrstama. Usprkos tome, očito je da OTA uzrokuje promjenu raznih funkcija imunološkog sustava u ljudi, miševima, peradi i svinja. OTA uzrokuje smanjenje veličine organa imunološkog sustava, pogoršanje imunološkog odgovora, modulaciju citokina i utječe na stanice imunološkog sustava i koštanu srž (Al-anati i Petzinger, 2006).

Smanjenjem veličine timusa manifestira se imunosupresivni učinak OTA. Jedno provedeno istraživanje zabilježilo je histološke promjene unutaršnjeg korteksa bubrega i redukciju timusa u miševa 24 sata nakon sedmodnevnog tretmana s OTA (20-80 mg/kg) (Boorman i sur., 1984). Uz timus zabilježena je i redukcija slezene u peradi (Singh i sur., 1990; Stoev i sur., 2000a, 2000b) i na osnovu svih tih promjena je donešen zaključak da OTA svojim djelovanjem cilja imunološki sustav, ali da imunološki sustav nije osjetljiviji od bubrega i mozga. Generalni koncenzus među znanstvenicima je da OTA uzrokuje smanjenje veličinu organa, ali još nije potpuno razjašnjeno događa li se to zbog degenerativnih i nekrolitičkih učinaka ili je posljedica apoptoze (Al-anati i Petzinger, 2006).

Citotoksičnim djelovanjem OTA na limfne čvorove smanjuje se produkcija protutijela. To smanjenje je uočeno u više vrsta životinja zaraženih nekim antigenom. Na primjer, miševi zaraženi bakterijom *Brucella abortus* (Prior i Sisodia, 1982), štakori zaraženi PR8 virusom (Thuvander i sur., 1996), miševi zaraženi *E. coli* (Müller i sur., 1995). Ispitivanja provedena s kombinacijom OTA i aflatoksina su pronašla da je smanjenje produkcije protutijela jače kada

je OTA u toj kombinaciji. Razlog tome još nije razjašnjen, no pretpostavlja se da nastaje zbog oštećenja DNA uzrokovano djelovanjem OTA i aflatoksinom (Ul-Hassan i sur., 2012).

Redukcija makrofag-granulocit progenitora u koštanoj srži, redukcija broja matičnih krvnih stanica i redukcija eritropoeze uočene su u miševa tretiranih s OTA (Boorman i sur., 1984). U peradi (Chang i sur., 1979) i zečeva (Verma i Mathew, 1998) je pokazano da tretiranje s OTA uzrokuje limfocitopeniju i monocitopeniju. Neke studije na miševima su pokazale i smanjenje svih bijelih krvnih stanica, dok je većina ostalih studija zabilježila limfopeniju, neutrofiliju i eozinofiliju. Osim što OTA smanjuje broj ovih stanica, on utječe i na njihovu funkciju.

Jednako bitan je i utjecaj OTA na stvaranje citokina. Citokini su regulacijski faktori u humoralnoj imunosti i na njihovu proizvodnju mogu utjecati razni mikotoksini. OTA povećava proizvodnju TNF- α i IL-6. Oba citokina potiču apoptozu koja dovodi do smanjenja veličine organa i smanjenja broja stanica imunološkog sustava (Al-anati i Petzinger, 2006).

1.2.8 Neurotoksičnost okratoksina A

Neurotoksični učinak OTA je manje izučavan od učinka OTA na imunološki i mokraćni sustav, no u posljednje vrijeme broj provedenih istraživanja na živčani sustav raste. Pokazalo se da je mozak, koji je u razvoju, najpodložniji toksičnom učinku OTA (Belmadani i sur., 1998a). Istraživanja na glodavcima su zabilježili da OTA utječe na proliferaciju i migraciju neurona (Fukui i sur., 1992) te da smanjuje količinu DNA u mozgu (Tamaru i sur., 1988). Također, pokazalo se da je neurotoksičnost više izražena u određenim područjima živčanog sustava, mezencefalom, hipokampus, striatus i cerebellum (Belmadani i sur., 1998b). Nedavne studije upućuju na to da OTA ima uloga i u razvoju sistemskih promjena kao što su neurodegenerativne bolesti i disfunkcija mozga u ljudi i životinjama (Sava i sur., 2006a) te da može utjecati na proces neurogeneze u mozgu odraslog čovjeka (Song i sur., 2002).

Sava i sur. (2006a) su istražili vremenski tijek akutnog genotoksičnog učinka OTA, popravku DNA i oksidativnom stresu na živčani sustav malih miševa. Pokazali su da OTA pro-oksidativnim mehanizmom uzrokuje redukciju strijatalnog dopamina i njegovih metabolita te redukciju imunoreaktivnosti tirozin hidroksilaze u sivoj tvari neurona. Oksidacijski stres se manifestira kao povišenje lipidne peroksidacije, oksidativno oštećenje DNA i kao kratkotrajna inhibicija mehanizma popravka DNA. Oksidacijski stres je uzrokovao apoptozu stanica u substanciji nigri, strijatumu i hipokampusu. Uz to postavljena je hipoteza da OTA uzrokuje Parkinsonovu bolest (Sava i sur., 2006b) što je testirano na mužjacima miševa kroničnom primjenom niskih doza OTA. Pokazano je da kontinuiranim davanjem niskih doza OTA s

ugrađenim subkutanim Alzet minipumpama dolazi do malih, ali značajnih smanjenja nivoa strijatalnog dopamina. Ovi podaci upućuju na to da postoji mogućnosti da izloženost malim dozama OTA može rezultirati ranijim nastupanjem Parkinsonove bolesti zbog toga što dolazi do pada dopamina. Također, studija je pokazala da nisu sva područja živčanog sustava jednako osjetljiva na toksin. Najosjetljivi dijelovi su bili kaudat i putamen, dok je mali mozak bio najrezistentniji.

Osim samih toksičnih učinaka OTA na živčane stanice, Zurich i sur. (2005) su istraživali vezu između OTA i reaktivnosti glija u kulturi stanica mozga štakora bez seruma. Pronašli su da OTA utječe na citoskelet astrocita i na ekspresiju gena bitnih u upalnom procesu mozga te da postoji veza između upalnih procesa mozga i citoskeletalnih promjena koje je uzrokovao OTA. Povrh toga, sugerirali su da takvom indukcijom atipične reaktivnosti glije, OTA smanjuje neuroprotektivni kapacitet glije.

1.2.9 Kancerogeni učinak okratoksina A

Kancerogenost okratoksina A (OTA) se još istražuje. 1976. i 1983. IARC (The International Agency for Research on Cancer) su prvi put istražili rizik koji predstavlja OTA. Zbog nedostatka rezultata epidemioloških studija, veza između OTA i tumora se nije uspjela pronaći, pa je IARC klasificirala OTA u skupinu 3 odnosno, u skupinu tvari koje se ne mogu klasificirati kao kancerogene čovjeku. Tek 1993. kada se proizašle nove studije provedene na životinjama, IARC je reklasificirao OTA u skupinu 2B (mogući karcinogen za čovjeka), ali se i dalje pokušava naći veza između mehanizama toksičnog djelovanja OTA s nastankom tumora. Istraživanja pokazuju da u kancerogenezi važnu ulogu igra oksidacijski stres. Brojne studije dokazuju da OTA znatno povećava stopu lipidne peroksidacije u jetri štakora i bubrežnim mikrosomima *in vitro* i *in vivo* mjerući količinu malonaldehida (MDA). MDA je produkt lipidne peroksidacije i poznat je po svom mutagenom i kancerogenom djelovanju koje se manifestira kao tvorba DNA adukta, pogotovo adukta deoksigvanozina. Prema tome, moguće je da povećanjem količine MDA, dolazi do povećanja rizika za oštećenje DNA i naposljetku do razvoja raka što dovodi do zaključka da bi možda IARC trebao još jednom reklasificirati OTA i svrstati ga barem u grupu 2A (vjerojatno karcinogen za čovjeka) ili čak grupu 1 (karcinogen za čovjeka) (Malir i sur., 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mikotoksini predstavljaju rizik za zdravlje životinja i ljudi, pri čemu unos putem kontaminirane hrane predstavlja najveći rizik na globalnoj razini i ujedno je i najbolje proučen. Prema procjeni UN Food and Agriculture Organization (FAO) 25-50% svih proizvoda proizvedenih na svjetskoj razini na neki način je kontaminirano mikotoksinima (Bhat i Miller, 1991; Mannon i Johnson, 1985). Unos mikotoksina inhalacijom je izučavan u manjoj mjeri ali se nikako ne smije zanemariti, jer predstavlja opasnost za zdravlje posebice ako se radi o vlažnim stambenim prostorima u kojima ljudi borave veći dio dana. Također, povećani unos inhalacijom prisutan je kod profesionalne izloženosti, na primjer u drvnoj industriji, kod farmera i u silosima ili mlinovima žitarica. Toksičnost mikotoksina može biti i do 10 puta veći pri unosu inhalacijom zbog brže apsorpcije (Halstensen i sur., 2004).

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti citotoksični učinak OTA i odrediti inhibitornu koncentraciju za 50% stanica (IC_{50}) i to za, epitelne stanice ljudskog adenokarcinoma pluća (A549) i ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Određivanje IC_{50} omogućit će odabir subcitotoksičnih koncentracija OTA koje će se koristiti u ispitivanju citotoksičnog učinka OTA u kombinaciji s drugim mikotoksinima koji se pojavljuju u kućnoj prašini vlažnih prostora, odnosno u hrani.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 OKRATOKSIN A

Okratoksin A (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, SAD) je otopljen 100% DMSO do koncentracije 0,01 mol/L. Iz te otopine su priređena razrjeđenja u mediju za uzgoj staničnih kultura (medij je opisan pod 3.2.): 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 0,5 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 75 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 150 $\mu\text{mol/L}$ i 200 $\mu\text{mol/L}$. Uz otopine s OTA priređeni su i uzorci kontrole otapala toskina; K1 sadržava 0.67% DMSO u staničnom mediju, dok K2 sadržava 0,3% DMSO u staničnom mediju.

3.2 UZGOJ I TRETIRANJE STANICA

Postupak uzgoja i tretiranja stanica okratoksinom A izvodio se u sterilnim uvjetima u uređaju s lamiranim strujanjem zraka (engl. *Laminar flow hood*), uz pomoć sterilnog pribora.

3.2.1 Uzgoj stanica

U ispitivanju korištene su epitelne stanice ljudskog adenokarcinoma pluća A549 i ljudskog hepatocelularnog karcinoma HepG2 (ATCC- American Type Culture Collection, Sjedinjene Američke Države).

Stanice se uzgajaju u RPMI mediju (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) uz dodatak 2 mM glutamina i toplinski inaktiviranog 10% (V/V) telećeg fetalnog seruma (Sigma). Kako bi se spriječila kontaminacija s bakterijama dodani su i antibiotici penicilin ($c = 100 \text{ IU/ml}$) i streptomycin ($\gamma = 100 \mu\text{g/mL}$) (Gibco, Invitrogen, Paisley).

Stanice su uzgojene u plastičnoj boci za adhezivni uzgoj staničnih linija (Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flask) u pripremljenom mediju i inkubirane u inkubatoru pod stalnim uvjetima relativne vlažnosti od 95%, konstantne temperature u iznosu od $+37^\circ\text{C}$ i udjela ugljikovog dioksida od 5%. Prilikom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS, PH7,4) i tretiraju otopinom tripsin-EDTA (0,25%) jer tripsin omogućava da se stanice odlijepe od podloge te se potom stanice resuspendiraju u svježem mediju. Stanice su uzgajane u mediju do približno 80% konfluentnosti nakon čega slijedi tretiranje mikotoksinom.

3.2.2 Tretiranje stanica s OTA

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 $10^5/\text{mL}$ te se 100 μL po jažici aplicira u mikrotitarske pločice s

ukupno 96 jažica (Thermo Scientific Nunc 96-well plate). Postupak je isti za A549 i HepG2. Na svakoj priređenoj mikrotitarskoj pločici dvije jažice ostaju prazne i služe kao slijepa probe u kojima se dodaje samo RPMI medij te kasnije u postupku i MTS reagens. Stanice se potom inkubiraju 24 sata, nakon čega su tretirane razrijeđenim otopinama OTA, K1 i K2 koje su opisane pod 3.1. Svaka koncentracija OTA kao i kontrola primjenjene su u 7 replikata. Potom se mikrotitarske pločice ponovno inkubiraju 24 sata nakon čega slijedi odčitavanje pomoću MTS reagensa.

3.2.3 Ispitivanje citotoksičnog učinka MTS testom.

U ispitivanju citotoksičnog učinka OTA na A549 i HepG2 stanicama primjenjen je MTS proliferacijski test. Ta kolorimetrijska metoda sadži reagens (CellTiter 96® AQueous One Solution) s tetrazolinskom komponentom [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(-3-karboksimetilfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolin] i s komponentom koja služi kao hvatač elektrona (fenazin etosulfat). Metabolički aktivne stanice sadrže enzim NAD(P)H dehidrogenazu koja metabolizira žuto obojeni MTS reagens u ljubičasto obojani formazan koji je topljiv u staničnom mediju.

U svaku jažicu se doda po 10 µL MTS reagensa i mikrotitarska pločica se stavlja na inkubaciju 1-2 sata. Apsorbancija nastalog formazana je proporcionalna koncentraciji preživjelih stanica, a mjeri se pri 490nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (PerkinElmer VictorX3).

3.3 OBRADA PODATAKA

Za obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel, Office 365 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

Od dobivenih apsorbancija oduzeta je srednja vrijednost slijepih proba kako bi se zanemario udio apsorbancije medija RPMI i reagensa. Rezultati vijabilnosti stanica se izražavaju u odnosu na kontrolu prema formuli:

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

Kontrolna otopina K1 se koristila u izračunu postotka vijabilnosti stanica tretiranih ispitivanom otopinom OTA koncentracija 150µmol/L i 200µmol/L, dok se kontrolna otopina K2 koristila u izračunu vijabilnosti preostalih otopina. Te kontrolne otopine predstavljaju 100% preživjelih stanica s obzirom da nisu tretirane toksinom.

3.3.1 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je software *Prism 6* (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD).

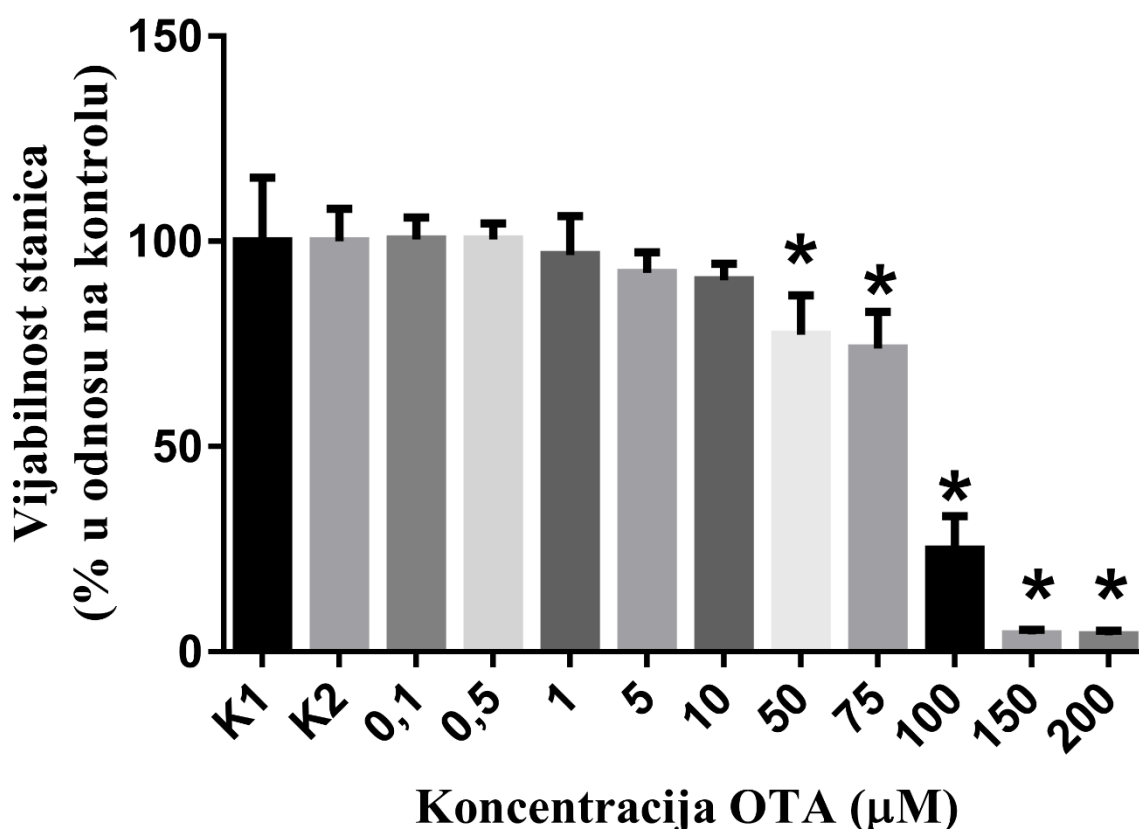
Rezultati dobiveni iz izračuna vijabilnosti stanica izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama aritmetičke sredine ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). S jednosmjernom analizom varijance (One way-ANOVA) i Dunnettovim post-testom multiple komparacije provedeno je testiranje značajnosti razlika između pokusnih skupina u odnosu na kontrolu. Vrijednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnima. Citotoksične koncentracije (IC_{50}) OTA na A549 i HepG2 stanicama dobivene su interpolacijom na temelju nelinearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Citotoksičnost okratoksina A (OTA) na A549 i HepG2 staničnim linijama se procjenila s MTS testom nakon 24 satne inkubacije i indirektno odredila mjerenjem metaboličke aktivnosti vijabilnih stanica. Na obje stanične linije je izmjeren pad vijabilnosti stanica ovisno o primjenjenoj dozi mikotoksina. Taj pad je vidljiv u krivuljama nelinearne regresije (Slika 4 i Slika 6)

4.1 CITOTOKSIČNO DJELOVANJE OTA NA A549 STANICAMA

Utjecaj OTA, koji je primjenjen u više različitih koncentracija, na vijabilnost stanične linije A549 prikazan je grafički (Slika 3). Koncentracije OTA koje se razlikuju u odnosu na kontrolu su naznačene u grafu.



Slika 3- Vijabilnost A549 stanica nakona 24-satnog tretmana s rastućim koncentracijama OTA.

Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji OTA, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji OTA. Statistički značajna odstupanja od kontrole su označena zvijezdicom „*“.

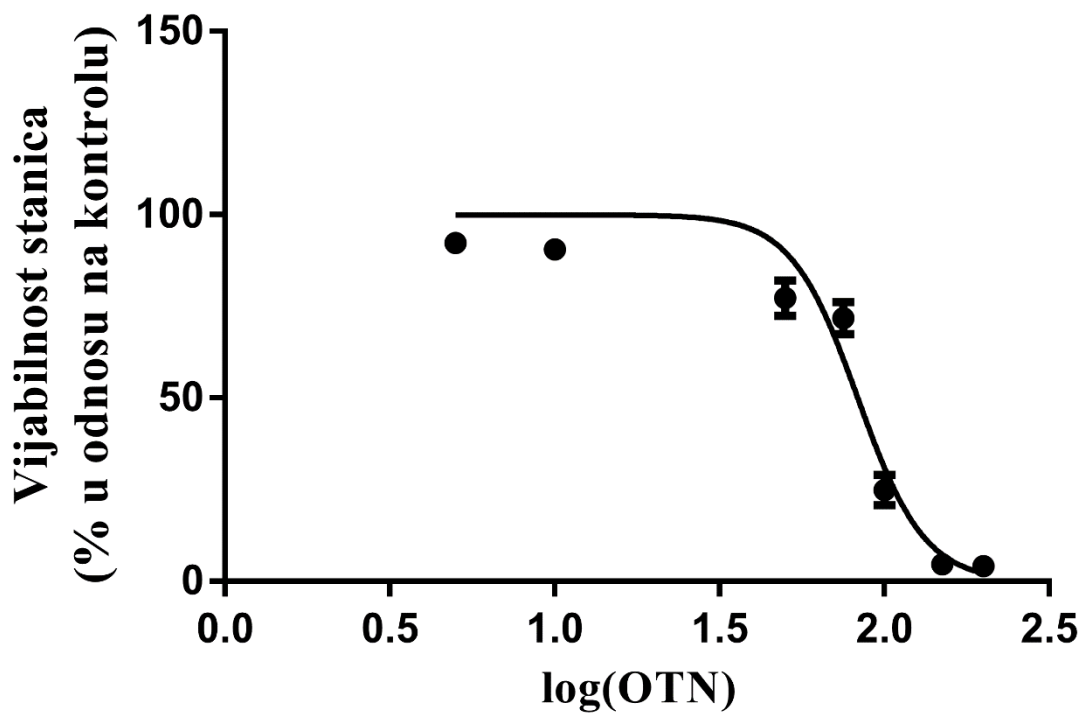
Vrijednosti statističkih parametara prikazane su u tablici (Tablica 1). Dobivene su statističkom obradom replikata rezultata vijabilnosti stanica A549 za pojedinu koncentraciju OTA.

Tablica 1.- Statistički parametri vrijednosti A549 stanica

	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Standardna pogreška aritmetike sredine
K1	100,0	15,54	6,948
K2	100,0	9,970	2,818
0,1 μM	100,6	5,361	3,905
0,5 μM	100,6	3,905	1,746
1 μM	96,74	9,502	4,249
5 μM	92,31	5,097	2,549
10 μM	90,58	4,058	2,343
50 μM	77,25	9,605	4,803
75 μM	73,90	8,960	4,007
100 μM	24,90	8,219	4,109
150 μM	4,286	1,089	0,4117
200 μM	4,029	1,173	0,4433

Rezultati pokazuju da OTA značajno smanjuje vijabilnost u koncentracijama od 50 μM do 200 μM pri čemu najveće koncentracije (150 i 200 μM) smanjuju vijabilnost na oko 4%.

Transformacijom vrijednosti koncentracija OTA u logaritamski oblik, dobivena je Krivulja nelinearne regresije (Slika 4) koja prikazuje pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije OTA. Za određivanje IC_{50} uzete su vrijednosti vijabilnosti stanica za raspon koncentracija od 10 do 200 μM .

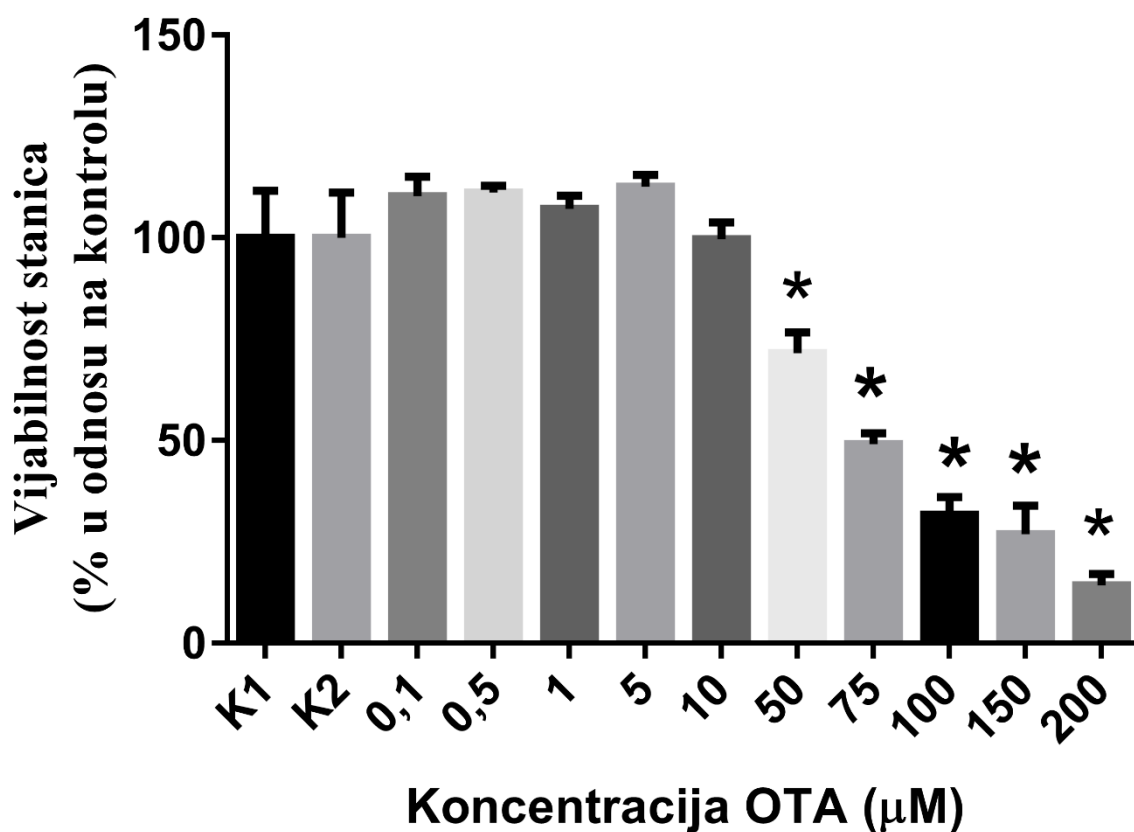


Slika 4.- Krivulja nelinearne regresije za određivanje IC_{50} OTA na A549 stanicama (A- $R^2=0.9886$; B- $R^2=0.9875$). Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost \pm SEM vijabilnosti stanica za koncentracije OTA u rasponu od 10 do 200 μ M. IC_{50} OTA iznosi $83,09 \pm 1,04 \mu$ M.

4.2 CITOTOKSIČNO DJELOVANJE OTA NA HEPG2 STANICAMA

HepG2 stanična linija je najbolji model jetrenih stanica za iskazivanje metabolizma ksenobiotika jer stanice eksprimiraju netaknute i inducirane enzime prve i druge faze, koji su bitni u aktivaciji i u detoksifikaciji raznih ksenobiotika (Mersch-Sundermann i sur., 2004; Zheng i sur., 2013).

Grafički je prikazan (Slika 5) utjecaj OTA na vijabilnost stanica HepG2 stanične linije. Istaknute se koncentracije OTA koje se razlikuju u odnosu na kontrolu.



Slika 5.- Vijabilnost HepG2 stanica nakon 24-satnog tretmana s rastućim koncentracijama OTA. Kolone predstavljaju izračunutu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji OTA, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji OTA. Statistički značajna odstupanja od kontrole su označene zvjezdicom „*“.

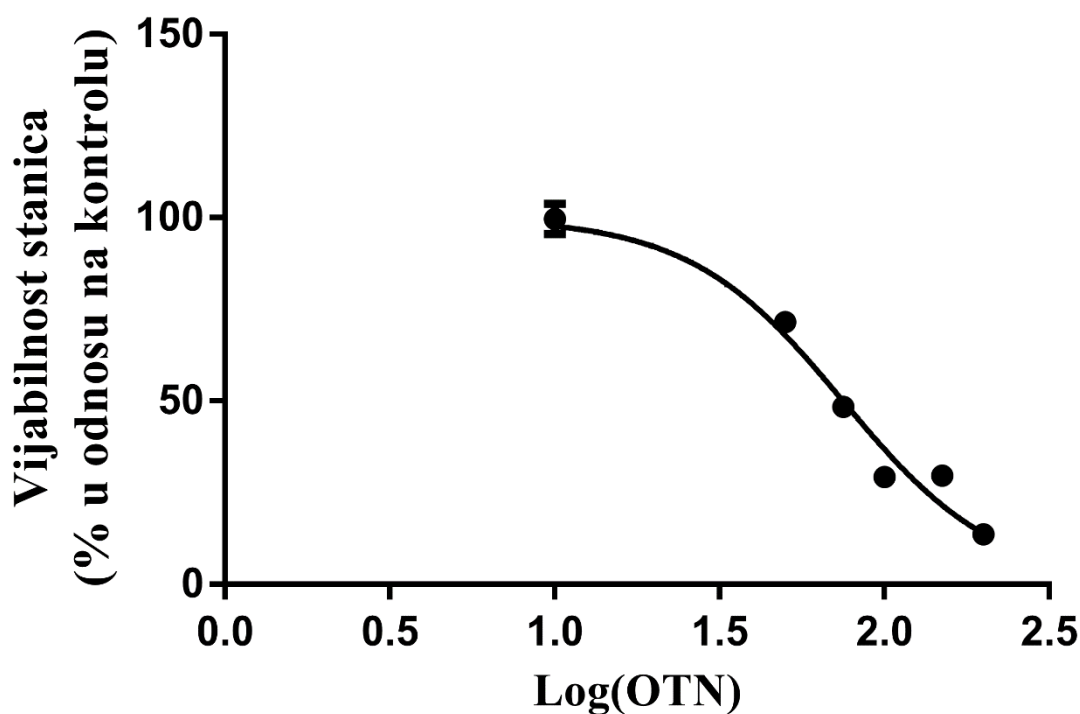
Tablica (Tablica 2) sadrži vrijednosti statističkih parametara dobivenih statističkom obradom replikata rezultata vijabilnosti stanica HepG2 za pojedinu koncentraciju OTA.

Tablica 2.- Statistički parametri vijabilnosti HepG2 stanica.

	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Standardna pogreška aritmetike sredine
K1	100,0	11,67	5,217
K2	100,0	11,19	5,004
0,1 μM	110,3	4,812	2,152
0,5 μM	111,2	1,696	0,7586
1 μM	107,1	7,971	3,254
5 μM	112,7	2,896	1,094
10 μM	99,67	9,235	4,130
50 μM	71,61	5,153	2,304
75 μM	49,21	2,612	1,066
100 μM	31,79	4,371	1,652
150 μM	26,97	7,052	2,879
200 μM	14,39	2,751	1,040

Rezultati pokazuju da OTA značajno smanjuje vijabilnost u koncentracijama od 50 μM do 200 μM pri koncentracije od 150 i 200 μM smanjuju vijabilnost na 26,97% i 14,39%.

Transformacijom vrijednosti koncentracija OTA u logaritamski oblik, dobivena je Krivulja nelinearne regresije koja prikazuje pad vrijednosti stanica s povećanjem koncentracije OTA (Slika 6). Za određivanje IC_{50} uzete su vrijednosti vijabilnosti stanica za raspon koncentracija od 10 do 200 μM .



Slika 6.- Krivulja nelinearne regresije za određivanje IC_{50} OTA na HepG2 stanicama ($A-R^2=0.9886$; $B-R^2=0.9875$). Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost \pm SEM vijabilnosti stanica za koncentracije OTA u rasponu od 10 do 200 μ M. IC_{50} OTA iznosi $75,00 \pm 1,04 \mu$ M.

4.3 RASPRAVA

Poznato je da se OTA pripisuje mehanizam inhibicije enzima fenilalanin-tRNA sintetaza zbog čega dolazi do redukcije sinteze proteina (Creppy i sur., 1983, 1979). Uz to što smanjuje sintezu proteina, OTA djeluje i na sintezu DNA i RNA (Dirheimer i Creppy, 1991; Størmer i Lea, 1995), inhibira sukcinat-citokrom C reduktazu i sukcinat dehidrogenazu koji su glikolitički enzimi i preko degradacije mRNA utječe na enzim fosfoenolpiruvat karboksikinazu, koji je ključni enzim u glukoneogenezi (Subramanian i sur., 1989; Wei i sur., 1985). Također, OTA može inducirati apoptozu različitim tipovima stanica. Indukcija apoptoze povezana je s inhibicijom oksidativne fosforilacije (Schwerdt i sur., 2004). Nadalje, uz izloženost OTA može doći i do nekroze stanica. Nekroza je uočena u jetri, miocitima i germinativnim centrima slezene i limfnih čvorova štakora (Aydin i sur., 2003; Kanisawa i sur., 1977; Okutan i sur., 2004). Hoće li prevladat smrt stanice apoptozom ili nekrozom ovisi o dozi OTA i vremenu izloženosti. Na primjer, tjedan dana nakon tretiranja miševa uočena je apoptoza stanica jetre, dok je nakon 2 tjedna bila zabilježena nekroza i apoptoza plućnih stanica. Studija Gekle i sur. (2000) je pokazala da OTA u niskim dozama uzrokuje apoptozu, a nekrozu u većim dozama. S druge

stane, Domijan i sur. (2004) zabilježili su apoptozu stanica jetre štakora, bez obzira na primjenjenu dozu i duljinu trajanja pokusa.

Kronična inhalacija mikotoksina može dovesti do negativnih posljedica za zdravlje. U literaturi se za sada nalazi malo podataka o toksičnosti OTA pri unosu inhalacijom (Kelman i sur., 2004). U ovom istraživanju primjenjene su ljudske stanične linije A549 i HepG2 zbog njihovog ljudskog podrijetla, a zatim za samu procjenu citotoksičnog učinka OTA korišten je široki raspon koncentracija toksina (0,1 do 200 μM). U nedavnom istraživanju citotoksičnosti OTA na A549 stanicama dobivena je vrijednosti IC_{50} od 131,4 μM (Šegvić Klarić i sur., 2015), što je za 1,5 puta veće od IC_{50} u ovom istraživanju. U navedenom istraživanju korišten je MTT test pri čemu se nekoliko koraka u metodi razlikuje od ovdje prikazanog MTS testa koji je po načinu izvođenja osjetljivija metoda. Osim na A549 staničnoj liniji, postoje istraživanja na plućnim fibroblastima kineskog hrčka V79 (Föllmann i sur., 2014) gdje je pomoću testa s neutralnim crvenilom izmjerena oko 5 puta niža IC_{50} (17 μM) negoli u ovdje prikazanom istraživanju. Ovakve razlike u rezultatima uvjetovane su staničnim modelom/porijeklom stanica kao i metodom određivanja citotoksičnog potencijala.

Hepatotoksičnost mikotoksina je važan pokazatelj toksičnog potencijala mikotoksina koji se unose ingestijom jer u jetri mikotoksini prolaze kroz procese biotransformacije i detoksifikacije. Za vrijeme hepatičkog metabolizma može potencijalno doći do stvaranja raznih metabolita. Većina nastalih metabolita se eliminira iz tijela, no ponekad jedan ili više metabolita mogu biti toksičniji od ishodišnog mikotoksina (Gayathri i sur., 2018; Hansen i sur., 1982). U ovdje prikazanom istraživanju na HepG2 stanicama, toksičnost OTA ovisi o dozi te izmjerena IC_{50} iznosi $75,00 \pm 1,04 \mu\text{M}$, što je u skladu s izvješćem Bouaziz i sur. (2008) gdje je IC_{50} iznosila 90 μM . U ostalim istraživanjima provedenim na istom staničnom modelu postoje znatne razlike u izmjerenoj IC_{50} ; Zheng i sur. (2013) su MTT proliferacijskim testom, pokazali da je IC_{50} na HepG2 35,27 μM , dok su Gayathri i sur. (2018) testom s neutralnim crvenilom izmjerili vrijednost od 210 μM . Kao što je već ranije rečeno, razlike u rezultatima se mogu pripisati korištenoj metodi. Ipak, iz svih istraživanja uključujući i naše, može se zaključiti da OTA ima citotoksično djelovanje i na plućnim i jetrenim stanicama ljudskog porijekla. Također, IC_{50} vrijednosti u našem istraživanju pokazuju da su A549 i HepG2 stanice gotovo jednako osjetljive na OTA.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih mjerenjem vijabilnosti stanica u staničnim linijama A549 i HepG2 s MTS proliferacijskim testom, koristeći 10 različitih koncentracija OTA, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Citotoksične koncentracije OTA za A549 stanice koje su se značajno razlikovale od kontrolnih otopina iznosile su 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM i 200 μM .
- IC_{50} odnosno, koncentracija OTA koja je smanjila vijabilnost A549 stanica za 50% iznosila je $83,09 \pm 1,04 \mu\text{M}$.
- Statistički značajne koncentracije OTA koje su djelovale citotoksično za HepG2 stanice su također: 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM i 200 μM .
- IC_{50} odnosno, koncentracija OTA koja je smanjila vijabilnost HepG2 stanica za 50% iznosila je $75,00 \pm 1,04 \mu\text{M}$.
- Dobiveni rezultati pokazuju da OTA ima citotoksično djelovanje i na plućnim i na jetrenim stanicama ljudskog porjekla pri čemu su A549 i HepG2 stanice gotovo jednako osjetljive na OTA.

6. LITERATURA

- Abdallah MF, Girgin G, Baydar T. Occurrence, prevention and limitation of mycotoxins in feeds. *Anim Nutr Feed Technol*, 2015, 15, 471–490.
- Al-anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J Vet Pharmacol Ther*, 2006, 29, 79–90.
- Aydin G, Ozçelik N, Çiçek E, Soyöz M. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by Ochratoxin A and melatonin in rats. *Hum Exp Toxicol*, 2003, 22, 383–391.
- Barrett JR. Mycotoxins: of molds and maladies. *Environ Health Perspect*, 2000, 108, 20–23.
- Belmadani A, Tramu G, Betbeder AM, Creppy EE. Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener. *Hum Exp Toxicol*, 1998a, 17, 380–386.
- Belmadani A, Tramu G, Betbeder AM, Steyn PS, Creppy EE. Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Arch Toxicol*, 1998b, 72, 656–662.
- Bennett JW. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 1987, 100, 3–5.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497–516.
- Bhat R V., Miller JD. Mycotoxins and food supply, 1991, <http://www.fao.org/docrep/U3550t/u3550t0e.htm#mycotoxinsandfoodsupply>, pristupljeno 11. 5. 2019.
- Boorman GA, Hong HL, Dieter MP, Hayes HT, Pohland AE, Stack M, Luster MI. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984, 72, 304–312.
- Bouaziz C, Dein OS, Golli E, Essefi SA, Brenner C, Lemaire C, Bach H. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*, 2008, 254, 19–28.
- Breitholtz-Emanuelsson A, Olsen M, Oskarsson A, Palminger I, Hult K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *JAOAC Int*, 1993, 76, 842–846.

- Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55, 1860–1869.
- Bunge I, Heller K, Roschenthaler R. Isolation and purification of ochratoxin A. *Eur Food Res Technol*, 1979, 168, 457–458.
- Chang CF, Huff WE, Hamilton PB. A Leucocytopenia Induced in Chickens by Dietary Ochratoxin A,.. *Poult Sci*, 1979, 58, 555–558.
- Chu F. Studies on ochratoxins. *Crit Rev Toxicol*, 1974, 2, 499–524.
- Chu FS. Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch Biochem Biophys*, 1971, 147, 359–366.
- Creppy EE. Human Ochratoxicosis. *J Toxicol Toxin Rev*, 1999, 18, 277–293.
- Creppy EE, Lugnier AAJ, Fasolo F, Heller K, Roschenthaler R, Dirheimer G. In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxinA. *Chemo-Biological Interact*, 1979, 24, 257–262.
- Creppy EE, Størmer FC, Kern D, Röschenthaler R, Dirheimer G. Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chem Biol Interact*, 1983, 47, 239–247.
- Degen G. Tools for investigating workplace-related risks from mycotoxin exposure. *World Mycotoxin J*, 2011, 4, 315–327.
- Di Paolo N, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M. Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 1994, 9 Suppl 4, 116–120.
- Dirheimer G, Creppy EE. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC Sci Publ*, 1991, 171–186.
- Domijan A-M, Peraica M, Ferencić Z, Cuzić S, Fuchs R, Lucić A, Radić B. Ochratoxin A-induced apoptosis in rat kidney tissue. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2004, 55, 243–248.
- Duarte SC, Pena A, Lino CM. Human ochratoxin A biomarkers—From exposure to effect. *Crit Rev Toxicol*, 2011, 41, 187–212.
- Fink-Gremmels J, Blom M, Nijnanten FW van. In vitro investigations on ochratoxin A

metabolism. U: Human ochratoxicosis and its pathologies. Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, urednici, Francuska, John Libbey Eurotext, 1993, str. 67–74.

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.

Forgacs J. Mycotoxicoses—the neglected diseases. *Feedstuffs*, 1962, 124–134.

Frisvad JC, Frank JM, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 2004, 50, 23–43.

Fukui Y, Hayasaka S, Itoh M, Takeuchi Y. Development of neurons and synapses in ochratoxin A-induced microcephalic mice: a quantitative assessment of somatosensory cortex. *Neurotoxicol Teratol*, 1992, 14, 191–196.

Gayathri L, Karthikeyan BS, Rajalakshmi M, Dhanasekaran D, Li AP, Akbarsha MA. Metabolism-dependent cytotoxicity of citrinin and ochratoxin A alone and in combination as assessed adopting integrated discrete multiple organ co-culture (IdMOC). *Toxicol Vitro*, 2018, 46, 166–177.

Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Wilflingseder D, Pollack V, Dander M, Schramek H. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293, 837–844.

Hald B. Ochratoxin A in human blood in European countries. U: Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumors. Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky I., Bartsch H, urednici, Lyon, Francuska, International Agency for Research on Cancer, 1991, str. 159–164.

Halstensen AS, Nordby K-C, Elen O, Eduard W. Ochratoxin A in grain dust—estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Ann Agric Environ Med*, 2004, 11, 245–254.

Hansen CE, Dueland S, Drevon CA, Størmer FC. Metabolism of ochratoxin A by primary cultures of rat hepatocytes. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43, 1267–1271.

Hope JH, Hope BE. A review of the diagnosis and treatment of Ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental

glomerulosclerosis. *J Environ Public Health*, 2012, 2012, 835–859.

Hsieh D. Potential human health hazards of mycotoxins. U: Mycotoxins and phytotoxins. Natori S, Hashimoto K, Ueno Y, urednici, Amsterdam, Nizozemska, Elsevier Science Publishers, 1988, str. 69–80.

Hult K, Pleština R, Habazin-Novak V, Radić B, Čeović S. Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch Toxicol*, 1982, 51, 313–321.

Kanisawa M, Suzuki S, Kozuka Y, Yamazaki M. Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1977, 42, 55–64.

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

Kuiper-Goodman T, Scott PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*, 1989, 2, 179–248.

Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, Vitti TG, Crow G. Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 145, 82–90.

Madhyastha SM, Marquardt RR, Frohlich AA, Platford G, Abramson D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J Agric Food Chem*, 1990, 38, 1506–1510.

Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins (Basel)*, 2016, 8.

Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Roubal T. Ochratoxin A exposure biomarkers in the Czech Republic and comparison with foreign countries. *Biomarkers*, 2012, 17, 577–589.

Mannon J, Johnson E. Fungi down on the farm. *New Sci*, 1985, 105, 12–16.

Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci*, 1992, 70, 3968–3988.

Meisner H, Meisner P. Ochratoxin A, an in vivo inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 208, 146–153.

Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu X, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived

liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 2004, 198, 329–340.

Micco C, Miraglia M, Ambruzzi M., Brera C, Onori R, Benelli I. Contamination of human milk with Ochratoxin A. U: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky I., Bartsch H, urednici, Lyon, Francuska, International Agency for Research on Cancer, 1991, str. 105–108.

Miraglia M, Brera C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, Reports on tasks for scientific cooperation. Rim, Italija, 2002,

Müller G, Kielstein P, Köhler H, Berndt A, Rosner H. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model. *Mycoses*, 1995, 38, 85–91.

Northolt MD, Van egmond HP, Paulsch WE. Ochratoxin A Production by Some Fungal Species in Relation to Water Activity and Temperature. *J Food Prot*, 1979, 42, 485–490.

Okutan H, Aydin G, Ozcelik N. Protective role of melatonin in ochratoxin a toxicity in rat heart and lung. *J Appl Toxicol*, 2004, 24, 505–512.

Pitt JI. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53, 266–269.

Pitt JI, Basílico JC, Abarca ML, López C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*, 2000, 38 Suppl 1, 41–46.

Plestina R, Stavljenic A, Ceovic R, Fuchs R. Haematological features of the population of the area of Croatia, Yugoslavia, endemic for Balkan nephropathy. U: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, urednici, Lyon, Francuska, International Agency for Research on Cancer, 1991, str. 43–46.

Prior MG, Sisodia CS. The effects of ochratoxin A on the immune response of Swiss mice. *Can J Comp Med Rev Can Med Comp*, 1982, 46, 91–96.

Rahimtula AD, Béréziat JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37, 4469–4477.

Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of

ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact*, 2006, 159, 18–46.

Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Roschenthaler R, Dirheimer G. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, 1988, 48, 293–308.

Sava V, Reunova O, Velasquez A, Harbison R, Sanchezramos J. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 2006a, 27, 82–92.

Sava V, Reunova O, Velasquez A, Sanchez-Ramos J. Can low level exposure to ochratoxin-A cause parkinsonism? *J Neurol Sci*, 2006b, 249, 68–75.

Schwerdt G, Freudinger R, Schuster C, Silbernagl S, Gekle M. Inhibition of Mitochondria and Extracellular Acidification Enhance Ochratoxin A-induced Apoptosis in Renal Collecting Duct-derived MDCK-C7 Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14, 47–56.

Scott PM. Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Addit Contam*, 2005, 22, 99–107.

Šegvić Klarić M, Jakšić Despot D, Kopjar N, Rašić D, Kocsubé S, Varga J, Peraica M. Cytotoxic and genotoxic potencies of single and combined spore extracts of airborne OTA-producing and OTA-non-producing *Aspergilli* in Human lung A549 cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2015, 120, 206–214.

Shotwell OL, Hesseltine CW, Goulden ML. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Appl Microbiol*, 1969, 17, 765–766.

Singh GS, Chauhan H V, Jha GJ, Singh KK. Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *J Comp Pathol*, 1990, 103, 399–410.

Skaug MA, Helland I, Solvoll K, Saugstad OD. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Addit Contam*, 2001, 18, 321–327.

Song H, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci*, 2002, 5, 438–445.

Speijers GJA, van Egmond HP. Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds. U: Human ochratoxicosis and its pathologies. Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, urednici, Francuska, John Libbey Eurotext, 1993, str. 85–100.

Stoev SD, Anguelov G, Ivanov I, Pavlov D. Influence of ochratoxin A and an extract of

artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks. *Exp Toxicol Pathol*, 2000a, 52, 43–55.

Stoev SD, Goundasheva D, Mirtcheva T, Mantle PG. Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Exp Toxicol Pathol*, 2000b, 52, 287–296.

Størmer FC, Lea T. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology*, 1995, 95, 45–50.

Subramanian S, Kanthasamy A, Balasubramanian N, Sekar N, Govindasamy S. Ochratoxin A toxicity on carbohydrate metabolism in rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1989, 43, 180–184.

Tamaru M, Hirata Y, Matsutani T. Neurochemical effects of prenatal treatment with ochratoxin A on fetal and adult mouse brain. *Neurochem Res*, 1988, 13, 1139–1147.

Thuvander A, Funseth E, Breitholtz-Emanuelsson A, Hallén IP, Oskarsson A. Effects of ochratoxin A on the rat immune system after perinatal exposure. *Nat Toxins*, 1996, 4, 141–147.

Ul-Hassan Z, Zargham Khan M, Khan A, Javed I. Immunological status of the progeny of breeder hens kept on ochratoxin A (OTA)- and aflatoxin B₁ (AFB₁)-contaminated feeds. *J Immunotoxicol*, 2012, 9, 381–391.

van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 1965, 205, 1112–1113.

Verma RJ, Mathew S. Alterations in total and differential counts of WBC during ochratoxicosis in rabbits. *Indian J Exp Biol*, 1998, 36, 424–425.

Wei YH, Lu CY, Ln TN, Wei RD. Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology*, 1985, 36, 119–130.

Zheng J, Zhang Y, Xu W, Luo YB, Hao J, Shen XL, Yang X, Li X, Huang K. Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 268, 123–131.

Zurich M-G, Lengacher S, Braissant O, Monnet-Tschudi F, Pellerin L, Honegger P. Unusual astrocyte reactivity caused by the food mycotoxin ochratoxin A in aggregating rat brain cell cultures. *Neuroscience*, 2005, 134, 771–782.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1 SAŽETAK

Okratoksin A (OTA) je sekundarni metabolit plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* koji je toksičan za životinje i ljude. Pri kroničnoj izloženosti može dovesti do nefrotoksičnih, imunotoksičnih, hepatotoksičnih, neurotoksičnih učinaka i do nastanak tumora.

Unos OTA hranom predstavlja najznačajniji rizik za zdravlje koji je ujedno i najviše izučavan. Unos OTA inhalacijom nije toliko proučen, postoji tek nekoliko istraživanja koja ukazuju na značajnu opasnost zbog unosa OTA respiratornim putem tijekom profesionalne izloženosti u silosima ili mlinu žitarica.

Svrha ovog rada bila je odrediti citotoksične koncentracije i IC_{50} OTA na ljudskim stanicama adenokarcinom pluća A549 i hepatocelularnog karcinom HepG2. Te koncentracije određene su primjenom MTS proliferacijskog testa i mjerenjem apsorbancije uz pomoć spektrofotometra na 490 nm.

Rezultati su pokazali da su citotoksične koncentracije OTA za obje stanične linije iznosile 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M i 200 μ M, a dobivena IC_{50} za A549 stanice je iznosila $83,09 \pm 1,04$ μ M, dok je za HepG2 stanice iznosila $75,00 \pm 1,04$ μ M.

Dobiveni rezultat pokazuju da OTA ima citotoksično djelovanje i na plućnim i jetrenim stanicama ljudskog porjekla pri čemu su A549 i HepG2 stanice gotovo jednako osjetljive na OTA.

7.2 SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by filamentous fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. Chronic exposure can lead to nephrotoxicity, immunotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity and cancer.

The intake of OTA by food represents the biggest risk for human health and it is by far the most studied. Although, inhaled intake has not been studied as much, few studies showed significant impact on human health due to OTA respiratory intake, especially when it comes to people working in grain storage and mills.

The aim of this study was to determine the cytotoxic concentrations and IC₅₀ of OTA in human cell models A549 and HepG2. Those concentrations were determined by using MTS proliferation assay after which the absorbance was measured using a spectrophotometer at 490 nm.

Results showed that the cytotoxic concentrations of OTA for both cell models were 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM i 200 µM and the measured IC₅₀ for A459cells and HepG2 cells were 83,09±1,04 µM and 75,00±1,04 µM, respectively.

This study shows that OTA is cytotoxic to both A549 and HepG2 cells and both cell lines are equally susceptible to OTA.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

CITOTOKSIČNOST OKRATOKSINA A ZA LJUDSKE STANICE PLUĆA I JETRE

Roko Pecotić

SAŽETAK

Okratoksin A (OTA) je sekundarni metabolit plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* koji je toksičan za životinje i ljude. Pri kroničnoj izloženosti može dovesti do nefrotoksičnih, imunotoksičnih, hepatotoksičnih, neurotoksičnih učinaka i do nastanak tumora.

Unos OTA hranom predstavlja najznačajniji rizik za zdravlje koji je ujedno i najviše izučavan. Unos OTA inhalacijom nije toliko proučen, postoji tek nekoliko istraživanja koja ukazuju na značajnu opasnost zbog unosa OTA respiratornim putem tijekom profesionalne izloženosti u silosima ili mlinu žitarica.

Svrha ovog rada bila je odrediti citotoksične koncentracije i IC_{50} OTA na ljudskim stanicama adenokarcinom pluća A549 i hepatocelularnog karcinom HepG2. Te koncentracije određene su primjenom MTS proliferacijskog testa i mjerenjem apsorbancije uz pomoć spektrofotometra na 490 nm.

Rezultati su pokazali da su citotoksične koncentracije OTA za obje stanične linije iznosile 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M i 200 μ M, a dobivena IC_{50} za A549 stanice je iznosila $83,09 \pm 1,04$ μ M, dok je za HepG2 stanice iznosila $75,00 \pm 1,04$ μ M.

Dobiveni rezultat pokazuju da OTA ima citotoksično djelovanje i na plućnim i jetrenim stanicama ljudskog porijekla pri čemu su A549 i HepG2 stanice gotovo jednako osjetljive na OTA.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 6 grafičkih prikaza, 2 tablice i 84 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Okratoksin A, A549, HepG2, IC_{50}

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, Institut za medicinska istraživanja i medicine rada.

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

CYTOTOXIC EFFECTS OF OCHRATOXIN A IN HUMAN LUNG AND LIVER CELLS

Roko Pecotić

SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by filamentous fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. Chronic exposure can lead to nephrotoxicity, immunotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity and cancer.

The intake of OTA by food represents the biggest risk for human health and it is by far the most studied. Although, inhaled intake has not been studied as much, few studies showed significant impact on human health due to OTA respiratory intake, especially when it comes to people working in grain storage and mills. The aim of this study was to determine the cytotoxic concentrations and IC₅₀ of OTA in human cell models A549 and HepG2. Those concentrations were determined by using MTS proliferation assay after which the absorbance was measured using a spectrophotometer at 490 nm.

Results showed that the cytotoxic concentrations of OTA for both cell models were 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM i 200 µM and the measured IC₅₀ for A459cells and HepG2 cells were 83,09±1,04 µM and 75,00±1,04 µM, respectively.

This study shows that OTA is cytotoxic to both A549 and HepG2 cells and both cell lines are equally susceptible to OTA.

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

Thesis includes: 30 pages, 6 figures, 2 tables and 84 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ochratoxin A, A549, HepG2, IC₅₀

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. *Permanent Scientific Advisor*, Institute for Medical Research and Occupational Health

The thesis was accepted: June 2019.