Citotoksičnost fumonizina B1 i B2 na A549 i HepG2 stanicama

Lovrinčević, Ana

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:163:713637

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ana Lovrinčević

Citotoksičnost fumonizina B_1 i B_2 na A549 i HepG2 stanicama

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 stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić. Diplomski rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta (MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

Hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, na stručnom i profesionalnom vodstvu te cjelokupnoj pomoći i savjetima koji su mi trebali tijekom izrade ovog diplomskog rada! Hvala mom tati Anti, sestrama Luciji i Mili te dobrim prijateljima na svemu u ovih 5 godina studiranja na FBF-u. Bili ste mi velika podrška, oslonac i tako učinili da sve prođe što lakše!

Na poseban način želim ovaj rad posvetiti svojoj mami Zlati koja je i sama bila magistar farmacije i cijeli svoj radni vijek provela u potpunom predanju svom farmaceutskom zvanju. Time mi je bila i uzor i poticaj da i sama krenem u farmaceutske vode. Iskreno joj hvala za sve!

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Mikotoksini (definicija) 1
1.2 Fumonizini 2
1.2.1 Otkriće, kemijska struktura i svojstva 3
1.2.2 Rasprostranjenost i dopuštene doze fumonizina 4
1.2.3 Toksikološka svojstva fumonizina 7
1.2.4 Mehanizam toksičnosti fumonizina 9
2 OBRAZLOŽENJE TEME 11
3 MATERIJALI I METODE 11
3.1 Kulture stanica 12
3.2 Tretiranje stanica fumonizinom B1 i B2 12
3.3 MTS test 13
3.4 Obrada podataka 14
3.4.1 Statistička obrada podataka 14
4 REZULTATI 15
4.1 Citotoksičnost fumonizina B1 i B2 za A549 stanice 15
4.2 Citotoksičnost fumonizina B1 i B2 za HepG2 stanice 18
4.3 Rasprava 21
5 ZAKLJUČCI 23
6 LITERATURA 24
7 SAŽETAK / SUMMARY 33
7.1 Sažetak 33
7.2 Summary 34

1 UVOD

1.1 Mikotoksini

Mikotoksini (mykes - grč. gljiva, toxikon - grč. otrov) su izvanstanični metaboliti plijesni koji su toksični ili imaju druge negativne biološke učinke na ljude i životinje. Njihova važnost za rast i razvoj plijesni još uvijek nije razjašnjena. Ti su spojevi vrlo različitih kemijskih struktura te onečišćuju žitarice i druge namirnice, posebice u tropskim krajevima, jer viša temperatura i vlažnost pogoduju nastanku i rastu plijesni.

Čovjek je najčešće izložen mikotoksinima konzumacijom hrane, no, u nekim slučajevima, može ih i udahnuti, oni mogu proći kroz kožu ili je izloženost parenteralna. Akutna i kronična trovanja, izazvana mikotoksinima, nazivaju se mikotoksikoze. Za neke mikotoksine se pretpostavlja, ili je dokazano, da su karcinogeni za ljude. Mikotoksikoze, na sreću, nisu često zabilježene kod ljudi (Marriott i Gravani, 2006).

Plijesni, koje imaju značaj za prehrambenu industriju, zbog potencijalne proizvodnje mikotoksina, uključuju članove rodova: *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Alternaria, Trichothecium, Byssochlamys* i *Sclerotinia*. Ove plijesni kontaminiraju žitarice prilikom neadekvatnog skladištenja i posljedično se mogu naći u hrani za životinje i ljude. Žitarice su najčešće kontaminirane aflatoksinom, deoksinivalenolom (vomitoksin, DON), zearalenonom, fumonizinima i T-2 toksinom (Sokolović, 2005).

Iako se preradom žitarica u krajnjim proizvodima vidljiva plijesan može ukloniti, većina mikotoksina zaostaje u takvim supstratima. Mikotoksini su vrlo stabilni. Ne inaktiviraju ih uobičajeni postupci proizvodnje i prerade hrane. Daljnji postupci skladištenja hrane također mogu povoljno djelovati na proizvodnju mikotoksina. Kontrola proizvodnje mikotoksina je složena i teška. Najbolji pristup za uništavanje mikotoksina u hrani je sprječavanje rasta plijesni u svim fazama proizvodnje, prikupljanja, prijenosa, obrade, skladištenja i prodaje. Sprječavanje štete djelovanjem insekata i mehaničke štete, tijekom cijelog procesa od proizvodnje do konzumacije, kao i kontrola vlažnosti, su ključni faktori. Zemlje članice EU su uskladile zakonsku regulativu o maksimalnim dopuštenim koncentracijama mikotoksina u hrani za životinje i ljude (EC/576/2006 i EC/1881/2006).

1.2 Fumonizini

Fumonizini su mikotoksini koje najčešće proizvode vrste *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (European Food Safety Agency (EFSA) Contam Panel, 2014). Od svog otkrića, fumonizini se smatraju mikotoksinima uglavnom proizvedenima *Fusarium* vrstama (Logrieco i sur., 2003). B-skupina fumonizina (FB_1, FB_2 i FB_3) se često otkriva u kukuruzu i u hrani na bazi kukuruza. Toksikološka svojstva fumonizina B_1 (FB_1), kao glavnog fumonizina u fuzarija, brojni su znanstvenici opsežno proučavali godinama.

Unos FB_1 uzrokuje toksikološke učinke specifične za vrstu životinja uključujući leukoencefalomalaciju kod konja i plućne edeme kod svinja te hepatotoksično, nefrotoksično, imunosupresivno i kancerogeno djelovanje kod laboratorijskih životinja. Osim toga FB_1 se povezuje s ljudskim karcinomom jednjaka u južnoj Africi i Kini (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001). Na temelju strukturnih sličnosti FB_{1-3}, maksimalan dopušteni dnevni unos (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake (PMTDI)) je 2 μg/kg (European Food Safety Agency, 2014).

Kod vrsta *Fusarium*, *fum* geni kodiraju enzime uključene u biosintetski put fumonizina. Osim kod fuzarija, proizvodnja FB je potvrđena i kod nekih *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Nigri*, uključujući *A. niger* i *A. welwitschiae* (ranije *A. awamori*) (Palumbo i sur., 2013; Perrone i sur., 2011; Varga i sur., 2011; Varga i sur., 2010). Iako su crni aspergili česte gljivice u zraku, rasprostranjenost i raznolikost vrsta ove skupine u zatvorenom prostoru slabo je istražena.

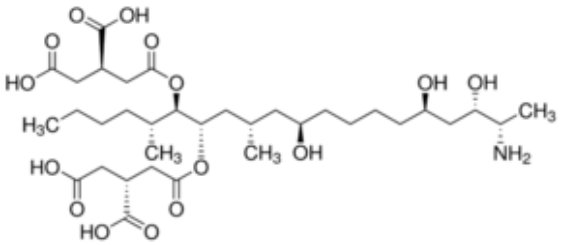
Sekcija *Nigri* obuhvaća nekoliko vrsta koje su široko rasprostranjene u okolišu. Ove vrste zaslužuju posebnu pozornost zbog svog utjecaja na zdravlje ljudi i životinja: iz poljoprivrednog gledišta, članovi sekcije *Nigri* javljaju se kao biljni patogeni i uzrokuju kvarenje različitih namirnica, uključujući žitarice, voće, povrće, pamuk, orašaste plodove, meso i mliječne proizvode (Varga i sur., 2011; Perrone i sur., 2007); u biotehnologiji se koriste neke vrste za proizvodnju organskih kiselina, hidrolitičkih enzima i fermentirane hrane (Hong i sur., 2013; Samson i sur., 2007); u medicinskoj mikologiji je sve veći broj infekcija uzrokovan crnim aspergilima, naročito otomikoze i keratomikoze u tropskim i subtropskim područjima (Szigeti i sur., 2012a; Szigeti i sur., 2012b; Kredics i sur., 2008). S toksikološkog stajališta, crni aspergillusi mogu proizvoditi mikotoksine, uključujući izomere fumonizina,

koji se uglavnom unose u organizam kontaminiranom hranom (Varga i sur., 2011; Samson i sur., 2007; Samson i sur., 2004), ali se također mogu unositi inhalacijom.

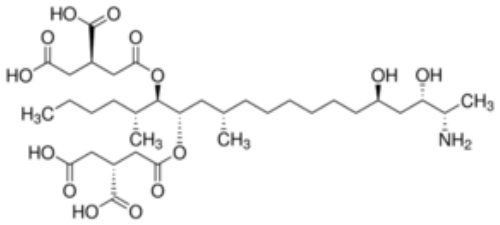
U nedavno objavljenom istraživanju (Jakšić i sur., 2018) među aerogenim izolatima crnih aspergila identificirane su vrste *A. welwitschiae, A. tubingensis, A. luchuensis, A. piperis* i *A. niger*; FB_2 je kvantificiran u 8 od 15 izolata *A. welwitschiae* te u izolatu *A. niger*. Nasuprot tome, FB_1 nije otkriven ni u jednom uzorku. Dvije vrste *A. welwitschiae* su proizvele otprilike 10 µg/mL FB_2; tri izolata su proizveli FB_2 u količinama između 3 i 8 µg/mL, a tri izolata su proizveli FB_2 u koncentracijama ispod 1 µg/mL. Najslabiji proizvođač je bio soj *A. niger* (0,015 µg/mL). FB_2 nije nađen u izolatima *A. tubingensis, A. luchuensis* i *A. piperis* vrste, a odsutnost gena *fum1* i *fum8* potvrđuje da ti izolati nisu gljivice koje proizvode FB_2 (Jakšić i sur., 2018).

1.2.1 Otkriće, kemijska struktura i svojstva

Fumonizini su prvi put izolirani i kemijski karakterizirani 1988. godine. Danas je poznato najmanje 28 različitih fumonizina, a većina njih označena je kao A-, B-, C- i P-serija (Munkvold i Schmale, 2018). Najznačajniji su fumonizini B-serije, a od njih fumonizin B_1 (FB_1) te fumonizin B_2 (FB_2) koji su gotovo jednake toksičnosti. U prirodi se FB_1, kojeg proizvode fuzarije, pojavljuje 3 puta češće od FB_2. Strukturna formula FB_1 i FB_2 prikazana je na Slici 1.



Fumonizin B₁



Fumonizin B₂

Slika 1. *Strukturne formule fumonizina B_1 i fumonizina B_2.*

U terminologiji kemijskih struktura, fumonizini su dugolančani aminopolioli s dva postranična trikarboksilna (TCA) lanca. Najpoznatiji predstavnici, fumonizini B-tipa, se razlikuju u broju i položaju hidroksi-grupa na kraju lanca (EFSA Contam Panel, 2018). Najvažniji modificirani oblici su hidrolizirani fumonizin B (HFB) i djelomično hidrolizirani fumonizin B (pHFB) (Golderblom i sur., 1998; Cawood i sur., 1991).

Fumonizini mogu reagirati tijekom prerade hrane dajući tako Maillard-tip fumonizina kao što su N-(karboksimetil)fumonizin B (NCM-FB) i N-(1-deoksi-D-fruktoz-1-il)fumonizin B (NDF-FB) (Rheeder i sur., 2002). Zbog svoje kemijske strukture, fumonizini mogu snažno reagirati nekovalentnim interakcijama s matriksom makrokonstituenata dajući tzv. maskirane fumonizine (EFSA Contam Panel, 2018). Maskirani oblici fumonizina se otpuštaju nakon probave hrane i tako doprinose ukupnoj količini otpuštenih nepromijenjenih „roditeljskih“ oblika fumonizina u gastrointestinalnom traktu.

1.2.2 Rasprostranjenost i dopuštene doze fumonizina

Fumonizini se u hrani pronalaze diljem svijeta. U Kini i Južnoj Africi nađene su osobito visoke koncentracije koje prelaze 100 ppm. Značajno niže koncentracije, oko 1 ppm, nalaze se u kukuruzu u SAD-u i Južnoj Americi, dok u kukuruzu Kanade gotovo da nema fumonizina. Američka agencija za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) preporučuje maksimalne razine fumonizina od 4 ppm-a u hrani za ljude i do 100 ppm-a u hrani za životinje, ovisno o kojoj se vrsti hrane i životinja radi (Tablica 1 i Tablica 2).

Tablica 1. *Preporučene maksimalne doze fumonizina u ljudskoj hrani.*

LJUDSKA HRANA	
PROIZVOD	*UKUPNI FUMONIZINI (FB_1, FB_2, FB_3)*
Proizvodi od suhog mljevenog kukuruza (npr. granulati, kukuruzno brašno, kukuruzno brašno s udjelom masti <2,25% prema osnovi suhe tvari)	2 ppm
Cijeli ili djelomično degenerirani suhi mljeveni proizvodi od kukuruza (npr. granulati, granulirano kukuruzno brašno, kukuruzno brašno sa sadržajem masti >2,25% prema osnovi suhe tvari)	4 ppm
Suhi mljeveni kukuruz	4 ppm
Očišćeni kukuruz namijenjen za proizvodnju mase	4 ppm
Očišćeni kukuruz namijenjen kokicama	3 ppm

(https://www.fda.gov/, pristupljeno 31.7.2019.)

Tablica 2. *Preporučene maksimalne doze fumonizina u životinjskoj hrani.*

ŽIVOTINJSKA HRANA	
KUKURUZ I PROIZVODI OD KUKURUZA	*UKUPNI FUMONIZINI (FB_1, FB_2, FB_3)*
Kopitari i zečevi	5 ppm (ne više od 50% prehrane) **
Svinje i somovi	20 ppm (ne više od 50% prehrane) **
Preživači, perad, telad *	30 ppm (ne više od 50% prehrane) **
Preživači > 3 mjeseca uzgajeni za klanje i proizvodnju krzna	60 ppm (ne više od 50% prehrane) **
Perad uzgajana za klanje	100 ppm (ne više od 50% prehrane) **
Sve druge vrste ili klase stoke i kućnih ljubimaca	10 ppm (ne više od 50% prehrane) **

* Uključuje laktaciju mliječnih goveda i kokoši koja polažu jaja za ljudsku prehranu

** Na osnovi suhe mase

(https://www.fda.gov/, pristupljeno 31.7.2019.)

Geografski, koncentracije fumonizina značajno variraju i često se razlikuju i između obližnjih lokacija. Tako npr. na kontaminaciju kukuruza fumonizinima iznimno utječu klimatski uvjeti u kojima je kukuruz uzgajan. Proizvodnji fumonizina pogoduju visoka temperatura (20-30°C) i vlaga (relativna vlaga zraka iznad 98%), genotip kukuruza (neki hibridi su otporniji na kontaminaciju fumonizinima od tradicionalnog kukuruza) te oštećenja zrna insektima (Domijan, 2013). Kada insekt ošteti biljku, omogućen je lakši ulazak fuzarija i proizvodnja toksina.

Koncentracija fumonizina niža je u hrani pripremljenoj iz kukuruza i namijenjenoj ljudskoj prehrani (tortilje, kokice, cornflakes) nego u kukuruzu jer se, prilikom pripreme te hrane, koriste alkalna otopina, voda i visoka temperatura koje snižavaju koncentraciju fumonizina u njoj. Kuhanje na visokoj temperaturi, uz dodatak glukoze, pokazalo se kao obećavajuća metoda za smanjenje koncentracije fumonizina i njegove toksičnosti (Voss i sur., 2011).

Do sada nema puno podataka o FB_{1-3} u životinjama s farmi i dostupne studije su uglavnom ograničene na FB_1. U studiji „Risk for animal health related to the presence of fumonisins, their modifed forms and hidden forms in feed“, (EFSA Contam Panel, 2018) analizirana je hrana i njezin utjecaj na različite vrste životinja. Izloženost fumonizinima procjenjivana je u 18,140 uzoraka stočne hrane i dokazana je njihova prisutnost u većini uzoraka.

Uzorci su skupljani između 2003. i 2016. godine u 19 različitih Europskih zemalja, a većina njih su zemlje članice EU. Najviše vrsta stočne hrane bile su one obogaćene žitaricama - kukuruzom, pšenicom i ječmom. Ostale vrste stočne hrane sadržavale su životinjske produkte, sjemenke mahunarki, uljne sjemenke i lukovice. Visokokvantificirane vrijednosti fumonizina utvrđene su za kukuruznu i pšeničnu stočnu smjesu. Izloženost fumonizinima i njegovim maskiranim oblicima primarno dolazi iz potrošnje kukuruza i njegovih prerađevina.

1.2.3 Toksikološka svojstva fumonizina

Biološka raspoloživost, distribucija i toksokinetika fumonizina proučavana je u više vrsta. Konji su najosjetljivija vrsta životinja na fumonizine jer ingestijom kontaminirane hrane razvijaju sindrom poznat kao leukoencefalomalacija kopitara (Equine Leukoencephalomalacia (ELEM)). Početni klinički znakovi mogu biti nedostatak apetita, besciljno lutanje, depresija, hiperosjetljivost te iznenadna smrt. Kardiovaskularna disfunkcija uključuje smanjenje brzine otkucaja srca što može pridonijeti znakovima dispneje i edema, a konji s oštećenjem jetre mogu pokazivati hemoragiju i depresiju. Vrijeme od početka kliničkih znakova do smrti može trajati od 24 sata do 7 dana. Ako se dogodi samo oštećenje jetre i prestanak izloženosti fumonizinu, oštećenja jetre mogu biti reverzibilna. Poput ELEM, svinjski plućni edem povezan je s potrošnjom pljesnive hrane. Perad i preživači su manje osjetljivi na fumonizine, a za eksperimentalne je glodavce FB_1 nefrotoksičan i hepatotoksičan.

U ljudi je izloženost FB_1 povezana s razvojem primarnog karcinoma jetre i karcinoma jednjaka koji se učestalo pojavljuju u regijama svijeta (primjer je Transkeiska regija u Južnoj Africi) u kojima ljudi konzumiraju kukuruz u dnevnoj prehrani. Pojavljivanje defekta neuralne cijevi u nekim je zemljama Srednje Amerike (npr. u Meksiku i Hondurasu) povezano s učestalom konzumacijom kukuruzne hrane kontaminirane FB_1. Bez obzira na to, ne može se sa sigurnošću povezati razvoj navedenih bolesti u ljudi s izloženosti FB_1. Kako je FB_1 uzročnik ELEM-a, poremećaja središnjega živčanog sustava (SŽS) u konja, to upućuje na mogućnost da FB_1 uzrokuje promjene u mozgu. Nekoliko studija na pokusnim životinjama i na staničnim kulturama, podrijetlom iz SŽS-a, potvrdilo je da je FB_1 neurotoksičan iako mehanizam neurotoksičnosti FB_1 još nije do kraja razjašnjen.

Utvrđeno je da su, u organizmu životinja, koje su konzumirale stočnu hranu, FB_{1-3} slabo bioraspoloživi i brzo distribuirani uglavnom u jetru i bubrege, opsežno biotransfomirani i brzo izlučeni većinom fekalnim putem. Hidrolizirani fumonizin B_1 (HFB_1) i djelomično hidrolizirani fumonizin B_1 ($pHFB_1$) su glavni metaboliti hidrolitičke biotransformacije i nađeni su u analiziranim tkivima. Zabilježene su male količine izlučenih fumonizina u mlijeku i neznatne količine izlučene u jajima.

Podaci o preživačima pokazuju slabu oralnu bioraspoloživost i opsežnu biotransformaciju hidroliziranih $pHFB_1$ i HFB_1. Kod svinja, FB_1 su slabo bioraspoloživi, ali visoko hidrolizirani u $pHFB_1$ i HFB_1 u probavnom traktu.

Bioraspoloživost FB_2 je puno niža nego FB_1. Dokazane su mjerljive količine toksina i oba hidrolizirana metabolita u jetri i bubrezima i do nekoliko dana nakon prestanka uzimanja takve hrane. Fekalni put izlučivanja uvelike nadmašuje urinarni, a izlučivanje bilijarnim putem može varirati ovisno o dozi i vremenu izloženosti. Na osnovi ograničene baze podataka, preživači su manje osjetljivi nego konji i svinje (Caloni i sur., 2000; Gurung i sur., 2000; Smith i Thakur, 1996). Histopatološke lezije i izmijenjeni serumski enzimi govore u prilog oštećenju jetrene i bubrežne funkcije (Mahur i sur., 2001). Za preživače je određena najviša doza koja ne uzrokuje oštećenje (No Observed Adverse Effect Level - NOAEL) od 31 mg FB_1/kg hrane na temelju povećanja serumskih enzima, kolesterola i bilirubina te smanjenja limfocitne blastogeneze (Erdington i sur., 1995).

Sindrom svinjskog plućnog edema je specifičan poremećaj uzrokovan FB_1 u svinjama. Posljedica je to toksičnog učinka FB_1 na kardiovaskularni sustav (Stoev i sur., 2012; Fodor i sur., 2005; Piva i sur., 2005). Također, kod svinja je zabilježeno povećanje sfinganin/sfingozin (Sa/So) omjera u serumu i tkivima, jetrena i bubrežna toksičnost, kašnjenje spolnog sazrijevanja i promijena reproduktivne sposobosti, oštećenje urođene i stečene imunosti, lezije unutarnjih organa te promijenjena fiziologija moždanih stanica (Bgoere i sur., 2010; Fodor i sur., 2005).

NOAEL od 1 mg FB_1/kg stočne hrane određen je na temelju lezije pluća nakon 8 tjedana hranjenja (Grenier i sur., 2012). Kod peradi, fumonizini oštećuju jetru i imunološki sustav (Henry i sur., 2000). Smanjen unos hrane i gubitak na težini zabilježeni su u studijama na patkama i prepelicama, ali ne i u studijama na pilićima i puricama (Cheng i sur., 2000). Već nakon manjeg unosa hrane, zabilježeno je povećanje vrijednosti Sa i Sa/So omjera. Na temelju jetrenih lezija i povećanja jetrenih lipida, određen je NOAEL od 8 mg/kg stočne hrane kod patki i NOAEL od 20 mg/kg kod pilića i purica (Grenier i sur., 2015). Na temelju neuroloških i kardiovaskularnih oštećenja, određen je NOAEL od 0,2 mg FB_1/kg hrane kod konja.

Nakon što su zečevi izloženi FB_1, zabilježena je izmijenjena krvna slika, zatajenje jetre i bubrega, oštećenje spermatogeneze i odgođen početak puberteta kao i povećanje nivoa Sa i Sa/So omjera u urinu, serumu i jetri (Evuola i sur., 2008; Orsi i sur., 2007).

Nema puno podataka o učinku fumonizina na organizam riba, ali zabilježena su oštećenja hematološkog i imunološkog sustava (Kovacic i sur., 2009; Tuan i sur., 2003). Do sada nema podataka o učinku FB_1 na pse i mačke.

1.2.4 Mehanizam toksičnosti fumonizina

Fumonizini B su strukturalni analozi sfingoidnih baza i oni inhibiraju sintezu ceramida. Na taj način ometaju metabolizam sfingolipida i dovode do patoloških promjena. Iako je utjecaj na metabolizam sfingolipida u ranom stadiju usko povezan s toksinima fumonizina, nema jasnih dokaza kako je fumonizinima inducirana inhibicija ceramid sintaze sama po sebi štetan učinak (Bryla i sur., 2015; DallAsta i sur., 2009).

Upletenost u ometanje metabolizma sfinoglipida, kao štetan učinak, još uvijek treba razjasniti (EFSA Contam Panel, 2018). Na staničnom nivou FB_1, FB_2 i FB_3 imaju isti način djelovanja, sličan toksikološki profil i potencijal. Nedavne su evaluacije, uključujući Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) i European Food Safety Agency (EFSA) Contam Panel, 2018. godine, opisale način djelovanja fumonizina.

Zbog strukturalne sličnosti s ceramidima, fumonizini kompetitivno inhibiraju CerS (ceramid sintazu), grupu enzima uključenih u biosintezu ceramida i mnogo kompleksnijih sfingolipida. Inhibicija ovih enzima rezultira ometanjem de novo sinteze ceramida kao i metabolizma sfingolipida što za posljedicu ima izmijenjen put lipida. Opisano je šest izoformi CerS u sisavaca koje se međusobno razlikuju u specifičnoj dužini lanca masne kiseline i u rasprostranjenosti u tkivima (Loiseau i sur., 2015).

Ranijim studijama dokazana je FB_{1-3} posredovana inhibicija CerS u jetri štakora u ekvimolarnoj količini (Noreed i sur., 1997). Iako se studije o toksičnosti odnose uglavnom na FB_1, smatra se kako i drugi oblici, FB_2 i FB_3, imaju sličan toksikološki potencijal (EFSA, 2018).

Inhibicija CerS dovodi do povećanja sfingozina (So) u krvi i tkivima kao i do još većeg povećanja sfinganina (Sa). Promijenjen Sa/So omjer zamijećen je nakon izloženosti fumonizinima i stoga se smatra potencijalnim biomarkerom izloženosti FB_1 kod različitih životinjskih vrsta (Masching i sur., 2016). Biomarkeri variraju ovisno o vrsti životinja, dozi i trajanju izloženosti (Masching i sur., 2016; Zomborszky-Kovacs i sur., 2002).

Sfingolipidi su visoko aktivni spojevi i važne strukturalne komponente stanične membrane. Inhibicija CerS uzrokuje poremećaj stanične signalizacije i posljedično dovodi do apoptoze, inhibicije proliferacije stanica, promijenjene funkcije sfingozin-1-fosfat (S1P) receptora i interakcije stanica-stanica te stanica-matriks. Utjecaj na metabolizam sfingolipida usko je povezan s ranom fazom toksičnosti, ali i dalje nema jasnih dokaza o fumonizinima induciranoj inhibiciji CerS niti u jednoj životinjskoj ili ljudskoj bolesti (EFSA, 2018).

Utvrđeno je i da je oksidacijski stres, iako se pojavljuje poslije drugih zabilježenih promjena, jedan od mehanizama toksičnosti fumonizina. Uz to, nedavne studije pokazale su da fumonizini onemogućuju normalnu homeostazu kalcija u stanici i tako potencionalno uzrokuju staničnu smrt. Međutim, niti jedan od spomenutih mehanizama toksičnosti fumonizina ne isključuje drugoga već je toksični učinak fumonizina vjerojatno kombinacija svih spomenutih mehanizama. Smatra se da će daljnja istraživanja ukazati i na druge mehanizme toksičnosti fumonizina (Domijan, 2013; Domijan, 2012).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je procijeniti citotoksične koncentracije pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50% (IC_{50}) fumonizina B_1 i fumonizina B_2 na dvije različite stanične linije: ljudske stanice adenokarcinoma pluća, A549, i ljudske stanice hepatocelularnog karcinoma, HepG2. Određivanje IC_{50} služi za odabir subcitotoksičnih koncentracija tih dvaju vrsta fumonizina koje će se koristiti u ispitivanju citotoksičnog učinka FB_1 i FB_2 u kombinaciji s drugim mikotoksinima koji se pojavljuju u kućnoj prašini vlažnih prostora, zraku i u hrani.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Kulture stanica

U radu su korištene ljudske stanice plućnog adenokarcinoma A549 i stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma HepG2 (ATCC – American Type Culture Collection, Sjedinjene Američke Države). Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima, a svi postupci su se provodili unutar uređaja s laminarnim strujanjem zraka (eng. *Laminar flow hood*).

Stanice A549 i HepG2 uzgojene su u Roswell Park Memorial Institute (RPMI) mediju (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund Germany), s glutaminom (2 mM) i toplinski inaktiviranim fetalnim telećim serumom masenog udjela 10% (Sigma). U svrhu sprječavanja bakterijske kontaminacije, dodaju se i antibiotici - penicilin (c = 100 IU/ml) te streptomicin (γ = 100 μg/ml) (Gibco, Invitrogen, Paisley). Stanice su uzgajane u plastičnoj boci (75cm^2 *flask*, Thermo Scientific ™ Nunc™ Cell Culture Treated EasYFlask™) na konstantnoj temperaturi od +37°C, pri relativnoj vlažnosti od 95%, a udio ugljikovog dioksida iznosio je 5%.

Prilikom presađivanja, stanice A549 i HepG2 su ispirane dodatkom 2-3 mL sterilnog fosfatnog pufera bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS, pH=7,4). Potom su tretirane s 500 - 1000 μL otopine tripsin-EDTA (0,25%) što omogućava da se stanice odlijepe od podloge. Stanice se, na kraju, resuspendiraju u svježem mediju, umnože se 1x unutar 24 sata inkubiranjem na 37°C pri relativnoj vlažnosti od 95% i uz 5% CO_2. Zatim su se stanice tretirale različitim koncentracijama fumonizina B_1 i fumonizina B_2 (od nižih prema višim koncentracijama).

3.2 Tretiranje stanica fumonizinom B_1 i B_2

Stanice su se prvo tretirale tripsinom, centrifugirale, a potom resuspendirale u RPMI mediju. Uz pomoć hemocitometra odredio se ukupni broj stanica po jednom mL suspenzije. Stanična suspenzija se razrijedila RPMI medijem do koncentracije 10^5/mL te se 100 μL po jažici apliciralo u mikrotitarske pločice s ukupno 96 jažica (Thermo Scientific Nunc 96-well plate). Postupak za pripremu A549 i HepG2 stanica nema razlika. U dvije jažice, svake mikrotitarske pločice, stanice A549 i HepG2 nisu nasađene jer su te jažice predstavljale

slijepu probu kojoj je dodan samo RPMI medij te, u kasnijem postupku, i tetrazolijev unutarnji (MTS) reagens.

Stanice su zatim inkubirane 24 sata, nakon toga tretirane fumonizinom B_1/B_2. Početna otopina FB_1 i FB_2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) koncentracije 0,01 mol/L dobivena je otapanjem FB_1/FB_2 u sterilnoj vodi. Od početne otopine, napravljene su razrijeđene otopine u 10 različitih koncentracija, a koncentracije tih ispitivanih otopina bile su redom: 10 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM, 300 μM, 350 μM, 400 μM, 500 μM. Svaki tretman ispitivane otopine FB_1/FB_2, iste koncentracije, primijenjen je u 7 replikata.

Kontrole sterilne vode primijenjene su u dvije različite koncentracije kao K1 (2%) i K2 (1%), na obje mikrotitarske pločice, također u 7 replikata. Kontrolni tretmani nisu utjecali na vijabilnost stanica. Nakon tretiranja stanica toksinom, slijedila je ponovna inkubacija od 24 sata.

3.3 MTS test

Kako bi se ispitao citotoksični učinak FB_1 i FB_2 na ljudske stanice A549 i HepG2, primijenio se MTS proliferacijski test (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). Riječ je o kolorimetrijskoj metodi 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 završetka inkubacije u trajanju od 24 sata, u svaku jažicu dodano je 10 μL MTS reagensa te su mikrotitarske pločice ponovno inkubirane 1-2 sata. Vijabilne stanice su metabolički aktivne, zato su njihove nikotinamid adenin dinukleotid (fostat) (NAD(P)H) ovisne dehidrogenaze metabolizirale žuto obojeni MTS reagens u ljubičasti formazan. Nastali formazan je topljiv u staničnom mediju te mu je, bez dodatnih postupaka, mjerena apsorbancija na 490 nm spektrofotometrom za mikrotitarske pločice s 96 jažica (PerkinElmer VictorX3). Što je veća količina nastalog formazana u pojedinoj jažici, veća je i izmjerena apsorbancija formazana na 490 nm te je izmjerena apsorbancija tako proporcionalna koncentraciji živih stanica u pojedinoj jažici.

3.4 Obrada podataka

Za obrađivanje dobivenih 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 apsorbancije na 490 nm tretiranih stanica i kontrolnih stanica oduzeta je srednja vrijednost apsorbancija dviju slijepih proba koje su sadržavale samo medij RPMI i MTS reagens. Rezultati vijabilnosti stanica izražavaju se u odnosu na kontrolu prema formuli:

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

Kontrolne stanice predstavljaju 100% preživjelih stanica obzirom da nisu tretirane toksinom.

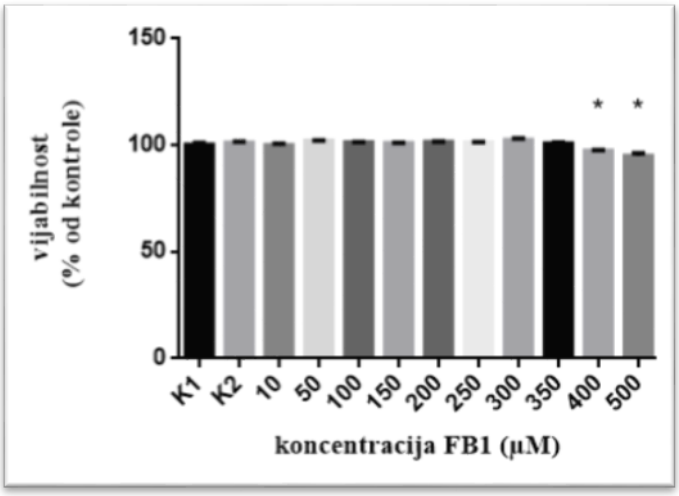
3.4.1 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu dobivenih podataka korišten je software *Prism 6* (GraphPad Software, Inc., San Diego). Rezultati, koji su dobiveni izračunom vijabilnosti stanica, izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim pogreškama aritmetičke sredine ($\bar{x}$ ± SEM). Testiranje značajnosti razlika između pokusnih skupina, u odnosu na kontrolu, provedeno je jednosmjernom analizom varijance (One-Way ANOVA) i višestrukim usporednim testom (eng. *Dunnett's multiple comparisons test*). Sve vrijednosti, za koje je $P < 0,05$, smatrane su statistički značajnim vrijednostima. Citotoksične koncentracije fumonizina B_1 i B_2, na stanicama sojeva A549 i HepG2 (tj. IC_{50}), dobivene su interpolacijom na temelju nelinearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka te izražene kao IC_{50} ± SEM.

4 REZULTATI

4.1 Citotoksičnost fumonizina B_1 i B_2 za A549 stanice

Djelovanje FB_1 i FB_2 na vijabilnost stanica A549 nakon 24-satnog tretmana u različitim koncentracijama, prikazano je grafički na Slici 2 i Slici 3.



Slika 2. *Grafički prikaz vijabilnosti tretiranih stanica A549 (%) za različite koncentracije FB_1 (µM) u odnosu na 2 kontrole (K1 i K2). Kolone prikazuju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji FB_1, a stupci pogreške, iznad svake kolone, predstavljaju standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji FB_1. *kontrola* vs *tretman $p<0,05$.*

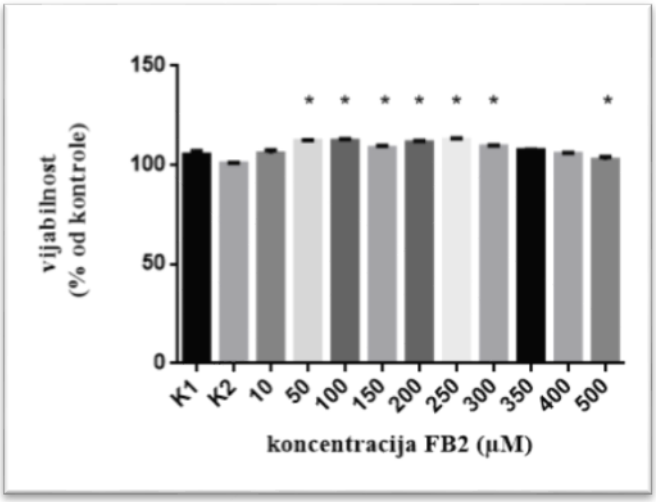
Vrijednosti statističkih parametara, koji su dobiveni statističkom obradom replikata, tj. rezultata vijabilnosti stanica A549, za pojedinu koncentraciju FB_1, prikazane su u tablici (Tablica 3)

Tablica 3. *Statistički parametri vijabilnosti stanica A549 za određenu koncentraciju FB_1.*

Koncentracija FB_1 [μM]	K1	K2	10	50	100	150	200	250	300	350	400	500
Srednja vrijednost	100.2	101.0	100.0	102.0	101.4	100.9	101.4	101.3	102.5	100.6	97.28	94.98
Standardna devijacija	2.107	1.657	1.177	0.3694	0.4701	0.5874	0.5162	0.4011	1.275	1.346	0.8062	2.340
Standardna pogreška srednje vrijednosti	1.053	0.6263	0.5883	0.1874	0.2350	0.2627	0.2581	0.2005	0.6373	0.6730	0.4654	1.170

FB_1 statistički je značajno smanjio vijabilnost A549 stanica u koncentracijama 400 μM i 500 μM. Pri tim je koncentracijama izračunata srednja vrijednost vijabilnosti stanica od 97,28% za koncentraciju FB_1 od 400 μM i 94,98% za koncentraciju FB_1 od 500 μM.

Kakav je utjecaj različitih koncentracija FB_2 na vijabilnost stanica linije A549 može se vidjeti iz grafičkog prikaza na Slici 3. Koncentracije FB_2, u odnosu na kontrole, na grafu su prikazane uz naznačenu statističku značajnost.



Slika 3. *Grafički prikaz vijabilnosti tretiranih stanica A549 za različite koncentracije FB_2 u odnosu na kontrole (K1 i K2). Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji FB_2, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji FB_2.* kontrola* vs *tretman $p<0,05$.*

Vrijednosti statističkih parametara, koji su dobiveni statističkom obradom replikata, tj. rezultata vijabilnosti stanica A549, za pojedinu koncentraciju FB_2, prikazane su u tablici (Tablica 4).

Tablica 4. *Statistički parametri vijabilnosti stanica A549 za određenu koncentraciju FB_2.*

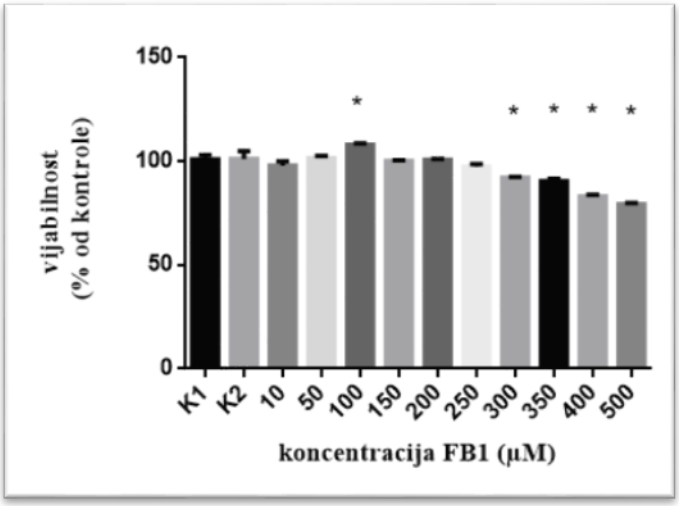
Koncentracija FB_2 [μM]	K1	K2	10	50	100	150	200	250	300	350	400	500
Srednja vrijednost	105.1	100.8	105.8	112.2	112.2	108.7	111.4	112.6	109.3	107.4	105.6	102.7
Standardna devijacija	2.018	0.3373	1.556	0.3865	0.7932	0.9648	0.8256	0.9606	0.6199	0.3399	0.5248	1.351
Standardna pogreška srednje vrijednosti	0.8239	0.2385	0.8981	0.1729	0.3547	0.4824	0.4767	0.5546	0.3099	0.1962	0.3030	0.7799

Može se vidjeti kako je FB_2 u periodu od 24 sata značajno povećao vijabilnost stanica A549 u koncentracijama od 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM, 300 μM i 500 μM jer je vijabilnost tih tretiranih stanica statistički veća od kontrole. Pri tim su koncentracijama izračunate sljedeće srednje vrijednosti vijabilnosti stanica: 112,2%, 112,2%, 108,7%, 111,4%, 112,6%, 109,3%, 102,7% za odgovarajuće primijenjene koncentracije FB_2: 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM, 300 μM i 500 μM.

Nelinearnom regresijom nije bilo moguće odrediti IC_{50} za FB_1 i FB_2 u A549 stanicama jer niti jedna od primijenjenih koncentracija FB_1 nije uzrokovala pad vijabilnosti stanica veći od 50%.

4.2 Citotoksičnost fumonizina B_1 i B_2 za HepG2 stanice

Slike 4 i 5 grafički prikazuju vijabilnost stanica HepG2 nakon 24-satnog tretmana s FB_1 i FB_2. Koncentracije oba fumonizina, u odnosu na 2 kontrole (K1 i K2), na grafu su prikazane uz istaknutu statističku značajnost.



Slika 4. *Grafički prikaz vijabilnosti tretiranih stanica HepG2 (%) za različite koncentracije FB_1 (µM) u odnosu na 2 kontrole (K1 i K2). Kolone prikazuju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji FB_1, a stupci pogreške, iznad svake kolone, predstavljaju standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji FB_1. *kontrola* vs *tretman $p<0,05$.*

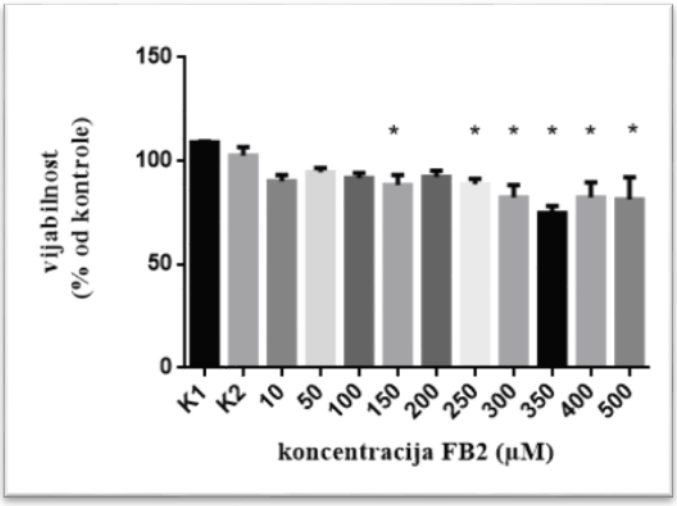
Vrijednosti statističkih parametara, koji su dobiveni obradom replikata, tj. rezultata vijabilnosti stanica HepG2, za pojedinu koncentraciju FB_1, prikazane su u tablici (Tablica 5).

Tablica 5. *Statistički parametri vijabilnosti stanica HepG2 za određenu koncentraciju FB_1.*

Koncentracija FB_1 [μM]	K1	K2	10	50	100	150	200	250	300	350	400	500
Srednja vrijednost	101.0	101.2	97.91	101.5	108.1	100.2	100.7	97.44	92.05	90.42	83.20	79.50
Standardna devijacija	4.079	7.551	4.233	2.032	1.113	0.7684	0,7354	2,483	1.134	2.469	1.559	1.002
Standardna pogreška srednje vrijednosti	2.039	3.775	2.117	1.016	0.5567	0.3842	0.3677	1.242	0.4629	1.104	0.7793	0.4091

FB_1 je u periodu od 24 sata inkubacije značajno smanjio vijabilnost stanica HepG2 u koncentracijama od 300 μM do 500 μM. Pri tim je koncentracijama srednja vrijednost vijabilnosti stanica pala za približno 10% odnosno 20% u odnosu na kontrolu. .

Kakav je utjecaj različitih koncentracija FB_2 na vijabilnost stanica linije HepG2 može se vidjeti iz grafičkog prikaza na Slici 5. Koncentracije FB_2, u odnosu na kontrole, na grafu su prikazane uz naznačenu statističku značajnost.



Slika 5. *Grafički prikaz vijabilnosti tretiranih stanica HepG2 za različite koncentracije FB_2 u odnosu na kontrole (K1 i K2). Kolone predstavljaju izračunatu srednju vrijednost vijabilnosti stanica pri pojedinoj koncentraciji FB_2, a stupci pogreške iznad svake kolone predstavljaju*

*standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SEM) za vijabilnost pri pojedinoj koncentraciji FB_2. *kontrola* vs *tretman p<0,05.*

Vrijednosti statističkih parametara, koji su dobiveni statističkom obradom replikata, tj. rezultata vijabilnosti stanica HepG2, za pojedinu koncentraciju FB_2, prikazane su u tablici (Tablica 6).

Tablica 6. *Statistički parametri vijabilnosti stanica HepG2 za određenu koncentraciju FB_2.*

Koncentracija FB_2 [μM]	K1	K2	10	50	100	150	200	250	300	350	400	500
Srednja vrijednost	109.1	102.6	90.15	94.51	91.87	88.36	92.32	88.81	82.49	74.90	82.44	81.39
Standardna devijacija	0.3881	5.954	5.998	4.031	3.982	9.913	6.111	5.783	11.79	5.954	16.08	18.50
Standardna pogreška srednje vrijednosti	0.1941	4.210	2.999	2.016	2.299	4.956	3.055	2.586	5.983	3.437	7.190	10.68

Može se vidjeti kako je FB_2 u periodu od 24 sata značajno smanjio vijabilnost stanica HepG2 u koncentracijama 150 μM, 250 μM, 300 μM, 350 μM, 400 μM i 500 μM. Pri tim je koncentracijama vijabilnost smanjena za 20% do 25%u odnosu na kontrolu. Nelinearnom regresijom nije bilo moguće odrediti IC_{50} za FB_1 i FB_2 u HepG2 stanicama jer niti jedna od primijenjenih koncentracija FB_1 nije uzrokovala pad vijabilnosti stanica veći od 50%.

4.3 Rasprava

U nedavno objavljenom istraživanju ispitana je citotoksičnost FB_1 i FB_2 na stanicama A549, ljudskim stanicama monocitne leukemije (THP-1), diferenciranim u makrofage (Jakšić i sur., 2018). MTT test je pokazao da su i FB1 i FB2 slabo citotoksični za A549 stanice i makrofage izvedene iz THP-1 stanica; iako sve primijenjene koncentracije pojedinačnih fumonizina (10-150 μM) značajno smanjuju vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom, ipak nije došlo do smanjenja vijabilnosti za više od 50% te nije bilo moguće procijeniti IC_{50}. THP-1 stanice slične makrofagima bile su osjetljivije na fumonizine nego A549 stanice, posebno na FB_1.

U istom istraživanju (Jakšić i sur., 2018) primjena FB_1 rezultirala je povećanjem svih izmjerenih citokina (IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α) dok je najizraženiji učinak zapažen na IL-8. FB_1 je uzrokovao povećanje IL-6, povećanje IL-1β nije bilo statistički značajno veće od vrijednosti u kontroli, dok je deset puta veća koncentracija FB_1 uzrokovala obrnuti učinak: povećanje IL-1β i smanjenje IL-6. U oba slučaja, koncentracija TNF- α ostala je povećana. Za razliku od FB_1, FB_2 je izazvao značajno smanjenje IL-1β i nije imao učinka na IL-8. Oba fumonizina, koja su primijenjena u 10 puta nižoj koncentraciji, značajno su uzrokovala porast IL-6.

Genotoksični učinci procijenjeni su u A549 stanicama primjenom alkalnog komet testa. Općenito, FB_1 uzrokuje nešto veće oštećenje DNA nego li FB_2. Značajno povećanje intenziteta repa je opaženo kada su FB_1 i FB_2 primijenjeni u koncentraciji od 10 μM. Za razliku od toga, primjena 100 μM FB_1/FB_2 rezultirala je intenzitetom repa sličnom onom kontrolnog uzorka.

MTT test (Jakšić i sur., 2018) je pokazao da su i FB_1 i FB_2 bili slabo toksični za ljudske plućne stanice A549 i THP-1 makrofagne stanice što je u skladu s rezultatima našeg rada u kojem je korišten MTS reagens. Također, ovi rezultati su u skladu s podacima iz literature o citotoksičnosti fumonizina na različite stanične linije, uključujući ljudske bronhoalveolarne stanice BEAS-2B u kojima su koncentracije IC_{50} za FB_1 i FB_2 bile iznad 150 μM nakon 24h izlaganja (McKean i sur., 2006; Gutleb i sur., 2002; Shier i sur., 1991).

Obzirom na sličan obrazac oštećenja DNA izazvan fumonizinima u A549 stanicama, dobiven alkalnim kometskim testom, možemo pretpostaviti da ti toksini dijele isti mehanizam genotoksičnosti (Jakšić i sur., 2018). Na temelju istraživanja u nekoliko *in vitro* i *in vivo* studija, FB_1 inducira o dozi ovisno povećanje genotoksičnosti izraženo kao povećani intenzitet repa kometa ili kao povećanje formacije mikronukleusa i oksidativni stres kao jedan od mehanizama oštećenja DNA (Peraica i sur., 2008; Domijan i sur., 2006; Galvano i sur., 2002a; Galvano i sur., 2002b).

U stanicama HepG2, nakon 24 satnog tretmana fumonizinom B_1, MTT testom dobivena je IC_{50} = 155 μM (Gayathri i sur., 2015). U našem pokusu, u kojem je korišten MTS reagens, nije bilo moguće procijeniti IC_{50} za FB_1 i FB_2; razlike se mogu pripisati različitim eksperimentalnim uvjetima, odnosno drugačijoj korištenoj metodi. Također, FB_1 je pokazao genotoksični učinak za HepG2 stanice u koncentraciji ≥25 μg/mL (Ehrlich i sur., 2002).

Dobiveni i dostupni literaturni podaci prilično se poklapaju s podacima i zaključcima dobivenima u ovom radu. Moguće razlike posljedica su različitih staničnih linija koje su korištene u eksperimentima te MTT test u odnosu na MTS test koji je korišten u ovome radu.

FB_1 i FB_2, kao i ekstrakti njihovih proizvođača, aspergilija, imaju potencijal citotoksičnosti i genotoksičnosti, ali i utjecaja na imunomodulaciju. MTT test je pokazao da su i FB_1 i FB_2 slabo citotoksični za plućne i krvne stanice iako sve primijenjene koncentracije pojedinačnih FB (10-150 μM) značajno utječu na vitalnost stanica u usporedbi s kontrolom nakon izloženosti od 24h. Krvne stanice su osjetljivije na FB od plućnih, posebno na FB_1. FB_1 je uzrokovao povećanje IL-6; IL-1β nije se razlikovao od kontrole dok je deset puta veća koncentracija FB_1 uzrokovala obrnuti učinak: povećanje IL-1β i smanjenje IL-6. U oba slučaja, koncentracija TNF-α ostala je povećana. Za razliku od FB_1, FB_2 je izazvao značajno smanjenje IL-1β i nije imao učinka na IL-8.

Nekoliko studija na različitim *in vivo* i *in vitro* modelima pokazalo je kontradiktorne rezultate u vezi s učinkom FB_1 na otpuštanje citokina - u nekim slučajevima FB_1 stimulira proizvodnju upalnih citokina dok je u nekim slučajevima on imao inhibitorni učinak (Taranu i sur., 2005). U ljudskim staničnim linijama želuca i debelog crijeva, FB_1 je uzrokovao povećanu proizvodnju TNF-α i IL-1β (Mahmoodi i sur., 2012). U istoj studiji uočeno je smanjenje u proizvodnji IL-8. Učinak FB_1 na oštećenje DNA bila je nešto veća od one FB_2.

U budućim studijama bi bilo iznimno korisno istražiti kombinirane učinke sekundarnih metabolita crnog aspergillusa i enzima za razjašnjavanje njihovih interakcija u toksičnom djelovanju i mogućem sudjelovanju u kroničnim respiratornim bolestima.

5 ZAKLJUČCI

Rezultati su dobiveni nakon spektrofotometrijskog mjerenja nastalog formazana koji je produkt u metabolički aktivnim, odnosno vijabilnim, stanicama linija A549 i HepG2.

Te su dvije vrste stanica prethodno tretirane FB_1 i FB_2, zasebno, u različitim koncentracijama. Radilo se o nizu od 10 različitih koncentracija (od 10 do 500 μM). Zaključci rada su sljedeći:

- FB_1 je slabo citotoksičan za A549 stanice, tj. značajno smanjuje vijabilnost stanica samo nakon primjene u najvećim koncentracijama (400 μM i 500 μM) u odnosu na kontrolu
- FB_2 povećanjem koncentracije potiče proliferaciju A549 stanica
- stanice HepG2 su osjetljivije na djelovanje oba fumonizina pri čemu FB_2 ima nešto jači citotoksični učinak od FB_1; FB_2 značajno smanjuje vijabilnost stanica u koncentraciji od 150 μM, a FB_1 u dvostruko većoj
- za oba fumonizina nije bilo moguće odrediti IC_{50} u stanicama A549 i HepG2 jer fumonizini aplicirani u rasponu koncentracija od 10 μM do 500 μM nisu uzrokovali pad vijabilanosti za više od 50% stanica

6 LITERATURA

Abado-Becognee KTA, Fleurat-Lessard, F, Shier WT, Badria F, Ennamany R, Creppy EE. Cytotoxicity of fumonisin B1: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. *Arch Toxicol*, 1998, 72, 233-236.

Abel S, Gelderblom WCA. Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology*, 1998, 131, 121-131.

Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichotecenes and fumonisins in Fusarium. *Toxin Rev*, 2009, 28, 198-215.

Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. Molecular identification of Aspergillus species collected for the transplant-associated infecion surveillance network. *J Clin Microbiol*, 2009, 47, 3138-3141.

Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Sperijers G, Stroka J. Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57, 165-186.

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

Carre PC, Mortenson RL, King TE, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased espression of the interleukin-8 gene by alveolar macropjages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Ivest*, 1991, 88, 1802-1810.

Chako S. Comparison of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1α and IL-1β) released by MPI and MARCO (-/-) knockout cells when stimulated by heat killed fungi – Candida albicans and Aspergillus niger. *Plymouth Student Sci*, 2016, 9, 4-23.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 2004, 26, 249-261.

Collins AR, Oscoz AA, Giovanelli L, Brunborg G, Gaiva I, Kruszewski M, Smith CC. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 2008, 23, 143-151.

Domijan AM. Fumonizin B1: neurotoksični mikotoksin. Zagreb, 2012.

Domijan AM. Rezultati nedavnih studija o mehanizmu neurotoksičnosti fumonizina B1. *Krmiva*, 2013, 55, 25-30.

Domijan AM, Zeljezić D, Kopjar N, Peraica M. Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A and fumonisin B1 treated rats. *Toxicology*, 2006, 222, 53-59.

Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. Front Immunol, 2014, 5, 491.

Eder C. Mechanisms of interleukin-1b release. Immunobiology, 2009, 214, 543-553.

EFSA. Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA J*, 2014, 1-61.

EFSA. Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA related to uncertainties in dietary exposure assessmet. *EFSA J*, 2006, 438, 1-54.

EFSA. Use of the EFSA Comprehensive Food Consumption Database in exposure assessment. *EFSA J*, 2011, 9, 2097.

Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Zsivkovits M. Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, 2002, 17, 257-260.

Fairbairn DW, Olive PL, Neill KLO. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 1995, 339, 37-59.

Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. Fumonisin B2 production by Aspergillus niger. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 9727-9732.

Fumonisin Toxicosis, https://www.msdvetmanual.com, pristupljeno 30.7.2019.

Galvano F, Campisi A, Russo A, Galvano G, Palumbo M, Renis M, Barcellona ML, Perez-Polo JR, Vanella A. DNA damage in astrocytes exposed to fumonisin B1. *Neurochem Res*, 2002, 27, 345-351.

Galvano F, Russo A, Cardile V, Glavano G, Vanella A, Renis M. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B1. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40, 25-31.

Gautier M, Ollivier CL, Cassagne C, Reynaud-Gaubert M, Dubus J, Hendricks M, Gomez C, Piarroux R. Aspergillus tubingensis: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. Med Mycol, 2016, 54, 459-470.

Gherbawvy Y, Elhariry H, Koscube S, Bahobial A, Deeb BE, Altalhi A, Varga J, Vagvolgyi C. Molecular characterization of black Aspergillus species from onion and their potential for ochratoxin A and fumonisin B2 production. *Foodborne Pathog Dis*, 2015, 12. 414-423.

Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds, 2001., https://www.fda.gov, pristupljeno 31.7.2019.

Gupta, RC. Reproductive and Developmental Toxicology. Cambridge, 2011, Academic Press, str. 725-737.

Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. Environ Toxicol Pharmacol, 2002, 11, 309-320.

Haschek W, Rousseaux C, Wallig M. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Cambridge, 2013, Academic Press, str. 1187-1258.

Hiort J, Maksimenka K, Reichert M, Perović-Ottstadt S, Lin WH, Wray V, Steube K, Schaumann K, Weber H, Proksch P, Ebel R, Muller WEG, Bringmann G. New natural products from the sponge-derived fungus Aspergillus niger. *J Nat Prod*, 2004, 67, 1532-1543.

Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA. Aspergillus luchuensis, an industrially important black Aspergillus in East Asia. *PLoS One*, 2013, 8.

Huang HB, Xiao Z, Feng X, Huang C, Zhu X, Ju J, Li M, Lin Y, Liu L, She Z. Cytotoxic naphto-g-pyrones from the mangorve endophytic fungus Aspergillus tubingensis (GX1-5E). *Helv Chim Acta*, 2011, 94, 1732-1740.

Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, Jelić D, Dojder A, Čepelak I, Rumora L. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. Cell Stress Chaperones, 2017, 23, 373-384.

Huybrechts I, Sioen I, Boon PE, Ruprich J, Lafay L, Turrini A, Amiano P, Hirvonen T, De Neve M, Arcela D, Moschandreas J, Westerlund A, Ribas-Barbd L, Hilbig A, Papoutsou S, Christensen T, Oltarzewski M, Virtanen S, Rehurkova I, Azpiri M, Sette S, Kersting M, Walkiewicz A, Serra-Majem L, Volatier JL, Trolle E, Tornaritis M, Busk L, Kafatos A, Fabiansson S, De Henuauw S, Van Kaveren J. Dietary exposure assessments for children in Europe (the EXPOCHI projcet): rationale, methods and design. *Arch Public Health*, 2011, 69, 4.

IARC. Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphtalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, 2002, IARC Press.

Jakšić D, Kocsubé S, Bencsik O, Kesckeméti A, Szekeres A, Jelić D, Kopjar N, Vagvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Fumonisin production and toxic capacity in airborne black Aspergilli. *Toxicol In Vitro*, 2018, 53, 160-171.

Jakšić Despot D, Kocsube S, Bencsik O, Kecskemeti A, Szekeres A, Vagvolgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing Aspergilli from the section Versicolores. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296-304.

Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65, 209-218.

JEFCA. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fumonisins. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2002, 906, 16-27.

JEFCA. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Fumonisins. *World Health Organ Food Addit Ser*, 2012, 65, 325-794.

Jurjević Ž, Peterson SW, Stea G, Solfrizzo M, Varga J, Hubka V, Perrone G. Two novel species of Aspergillus section Nigri from indoor air. *IMA Fungus*, 2012, 3, 159-173.

Kothary MH, Chase T, MacMillan JD. Correlation of elastase production by some strains of Aspergillus fumigatus with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun*, 1984, 43, 320-325.

Kouadio JH, Mobio A, Baudrimont I, Moukha S. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 2005, 213, 56-65.

Kredics L, Varga J, Antala Z, Samson RA, Sandor K, Narendranc V, Bhaskard M, Manoharanr C, Csaba V, Manikandanc P. Black aspergilli in tropical infections. *Rev Med Microbiol*, 2008, 19,65-78.

Kwon OS, Sandberg JS, Slikker Jr W. Effects of fumonisin B1 treatment on blood brain barrier transfer in developing rats. *Neurotoxicol Teratol*, 1997, 19, 151-155.

Kwon OS, Slikker Jr W, Davies DL. Biochemical and morphological effects of fumonisin B1 on primary cultures of rat cerebrum. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22, 565-572.

Lamboni Y, Nielsen KF, Linnemann AR, Gezgin Y, Hell K, Nout MJR, Smid EJ, Tamo M, van Boekel MAJS, Hoof JB, Frisvad JC. Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of Aspergillus section Nigri isolated from raw cashew nuts from Benin, West Africa. *PLoS One*, 2016, 11.

Mahmoodi M, Alizadeh AM, Sohaneki H, Rezaei N, Amini-Najafi F. Impact of fumonisin B1 on the production of inflammatory cytokines by gastric and colon cell lines. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2012, 11, 165-173.

Mansson M, Klejstrup ML, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gotfredsen CH, Larsen TO. Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from Aspergillus niger. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 949-953.

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

McQueen CA. Comprehensive toxicology. Amsterdam, 2018, Elsevier Science, str. 163.

Minervini F, Garbetta A, Antuono ID, Cardinali A, Antonio N, Lucantonio M, Visconti A. Toxic mechanisms induced by fumonisin B1 mycotosin on human intestinal cell line. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2014, 67, 115-123.

Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res*, 1997, 393, 99-106.

Nielsen KF, Frisvad JC, Logriesco A. Analyses of black Aspergillus species of peanut and maize for ochratoxins and fumonisins. *J Food Prot*, 2015, 78, 6-12.

Odhay B, Adam JK, Bhoola KD. Modulating effects of fumonisin B1 and ochratoxin A on leukocytes and messenger cytokines of the human immune system. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8, 799-809.

Palumbo JD, O'Keefe TL, Gorski L. Multiples PCR analysis of fumonisin biosynthetic genes in fumonisin-nonproducing Aspergillus niger and A. awamori strains. *Mycologia*, 2013, 105, 277-284.

Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to Aspergillus species. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22, 535-551.

Peraica M, Ljubanovi D, Domijan AM. The effect of a single dose of fumonisin B1 on rat kidney. *Croat Chem Acta*, 2008, 81, 119-124.

Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Aspergillus niger contains the cryptic phylogenetic species A. awamori. *Fungal Biol*, 2011, 115, 1138-1150.

Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Noonim P, Mahajamchanakul W, Samson RA. Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products. *Stud Mycol*, 2007, 59, 53-66.

Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busman M, ButchKO RAE. Fumonisin production in the maize pathogen Fusarium verticillioides: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem*, 2006, 54, 2424-2430.

Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Jens C, Lyngby DK. New ochratoxin A or sclerotium producing species in Aspergillus section Nigri. *Stud Mycol*, 2004, 50, 45-61.

Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series, 2010.

Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black Aspergilli. Stud Myol, 2007, 59, 129-145.

SCF. Opinion on Fusarium toxins. Part 3: fumonisin B1. Bruxelles, 2000.

SCF. Updated opinion of the Scientific Committee on Food on fumonisin B1, B2 and B3. Bruxelles, 2003.

Sen B, Asan A. Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): seasonal distribution and relationship with climatic factors. *Environ Monit Assess*, 2009, 151, 209-219.

Seo JA, Proctor RH, Plattner RD. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in Fusarium verticillioides. *Fungal Genet*, 2001, 34, 155-165.

Sharma D, Dutta BK, Singh AB. Exposure to indoor fungi in different working environments: a comparative study. *Aerobiologia*, 2010, 26, 327-337.

Shier WT, Abbas HK, Mirocha CJ. Toxicity of the mycotoxins fumonisin B1 and B2 and Alternatia alternata f. sp. Lycopersici toxin (AAL) in culture mammalian cells. *Mycopathologia*, 1991, 116, 97-104.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schnedider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175, 184-191.

Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Advances in brief essential role of tumor necrosis factor (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. Cancer Res, , 1999, 59, 4516-4518.

Susca A, Proctor RH, Butchko RAE, Haidukowski M, Stea G, Logrieco A, Moretti A. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. *Fungal Genet Biol*, 2014, 73, 39-52.

Susca A, Proctor RH, Mule G, Stea G, Ritieni A, Logrieco A, Moretti A. Correlation of mycotosin fumonisin B2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene fum8 in Aspergillus niger from grape. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 9266-9272.

Szigeti G, Koscube S, Doczi I, Bereczki L, Vagvolgyi C, Varga J. Molecular identification and antifungal susceptibilities of black Aspergillus isolates from otomycosis cases in Hungary. *Mycopathologia*, 2012, 174, 143-147.

Szigeti G, Sedaghati E, Mahmoudabadi AZ, Naseri A, Kocsube S, Vagvolgyi C, Varga J. Species assignement and antifungal susceptibilities of black aspergilli recovered from otomycosis cases in Iran. *Mycoses*, 2012, 55, 333-338.

Taranu I, Marin DE, Bouhet S, Pascale F, Bailly J, Miller JD, Pinton P, Oswald IP. Mycotoxin fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol Sci*, 2005, 84, 3017-307.

Tice RR, Yage JW, Andrews P, Crecelius E. Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treted with sodium arsenite. *Mutat Res*, 1997, 386, 315-334.

Varga J, Frisvad JC, Koscube S, Brankovics B, Toth B, Szigeti G, Samson RA, Varga A, Frisvad A. New and revisited species in Aspergillus section Nigri: Extrolite analysis. *Stud Mycol*, 2011, 69, 1-17.

Varga J, Koscube S, Suri K, Szigeti G, Szekeres A, Varga M, Toth B, Bartok T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. *Int J Food Microbiol*, 2010, 143, 143-149.

Varga J, Koscube S, Szigeti G, Barany N, Vagylogyi C, Despot Jakšić, D, Magyar D, Meijer M, Samson RA, Šegvić Klarić, M. Occurence of black Aspergilli in indoor environments of six countries. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65, 219-223.

Voss KA, Smithe GW, Haschek WM. Fumonisins: toxicokinetics, mechanism of action and toxcity. *Animal Feed Sci Technol*, 2007, 137, 299-325.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merill Jr AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem*, 1991, 266, 14486-14490.

Wang H, Gloer JB, Wicklow DT, Dowd PF. Aflavinine and other antiinsectan metabolites from the ascostromata of Eupenicillium crustaceum and related species. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61, 4429-4435.

Waskiewicz A, Golinski P. Mycotoxins in foods and their components. *Krmiva*, 2013, 55, 35-45.

WHO. Uncertainty and dana quality in exposure assessment. Part 1: Guidance document on characterizing and communicating uncertainty in exposure. Part 2: Hallmarks of dana quality in chemical exposure assessmet. Ženeva, WHO Publications, 2008.

Zhang G, Neumeister-Kemp H, Garrett M, Kemp P, Stick S, Franklin P. Exposure to airborne mould in school environments and nasal potency in children. *Indoor Built Environ*, 2013, 22, 608-617.

7 SAŽETAK/SUMMARY

7.1 Sažetak

Izvanstanični metaboliti plijesni, koji su toksični ili imaju druge negativne biološke učinke na ljude i životinje, čine skupinu mikotoksina. Ti su spojevi vrlo različitih kemijskih struktura te onečišćuju žitarice i druge namirnice, posebice u tropskim krajevima jer viša temperatura i vlažnost pogoduju nastanku i rastu plijesni. Čovjek je najčešće izložen mikotoksinima konzumacijom hrane, no, u nekim slučajevima, može ih i udahnuti, oni mogu proći kroz kožu ili je izloženost parenteralna.

Fumonizini su mikotoksini koje najčešće proizvode vrste *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. Od svog otkrića, fumonizini se smatraju mikotoksinima uglavnom proizvedenima *Fusarium* vrstama. B-skupina fumonizina (FB_1, FB_2 i FB_3) se često otkriva u kukuruzu i u hrani na bazi kukuruza. Danas je poznato najmanje 28 različitih fumonizina, a većina njih označena je kao A-, B-, C- i P-serija. Najznačajniji su fumonizini B-serije, a od njih fumonizin B_1 (FB_1) te fumonizin B_2 (FB_2) koji su gotovo jednake toksičnosti. U prirodi se FB_1 pojavljuje 3 puta češće od FB_2.

Cilj ovog rada je procijeniti citotoksične koncentracije pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50% (IC_{50}) fumonizina B_1 i fumonizina B_2 na dvije različite stanične linije: ljudske stanice adenokarcinoma pluća, A549, i ljudske stanice hepatocelularnog karcinoma, HepG2. Određivanje IC_{50} služi za odabir subcitotoksičnih koncentracija tih dvaju vrsta fumonizina koje će se koristiti u ispitivanju citotoksičnog učinka FB_1 i FB_2 u kombinaciji s drugim mikotoksinima koji se pojavljuju u kućnoj prašini vlažnih prostora, zraku i u hrani. Kako bi se ispitao citotoksični učinak FB_1 i FB_2, A549 i HepG2 stanice tretirane su toksinima u koncentracijama od 10 do 500 μM tijekom 24 h. Vijabilnost je određena MTS proliferacijskim testom (490 nm). Na ljudske stanice A549 i HepG2 primijenio se MTS proliferacijski test.

FB_1 je slabo citotoksičan za A549 stanice, tj. značajno smanjuje vijabilnost stanica samo nakon primjene u najvećim koncentracijama (400 μM i 500 μM) u odnosu na kontrolu. FB_2 povećanjem koncentracije potiče proliferaciju A549 stanica. Stanice HepG2 su osjetljivije na djelovanje oba fumonizina pri čemu FB_2 ima nešto jači citotoksični učinak od FB_1; FB_2 značajno smanjuje vijabilnost stanica u koncentraciji od 150 μM, a FB_1 u dvostruko

većoj. Za oba fumonizina nije bilo moguće odrediti IC_{50} u stanicama A549 i HepG2 jer fumonizini, aplicirani u rasponu koncentracija od 10 μM do 500 μM, nisu uzrokovali pad vijabilnosti za više od 50% stanica.

7.2 Summary

Extracellular mold metabolites, which are toxic or have other adverse biological effects on humans and animals, form a group of mycotoxins. These compounds are of very different chemical structures and contaminate cereals and other foods, especially in the tropics because high temperatures and humidity favor mold formation and growth. People are often exposed to mycotoxins by consuming food, but in some cases it can be inhaled, they can pass through the skin or the exposure is parenteral.

Fumonisins are mycotoxins most commonly produced by *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. Since its discovery, fumonisins have been considered mycotoxins mainly produced by *Fusarium* species. The B-group of fumonisins (FB_1, FB_2, and FB_3) is often detected in maize and maize-based foods. Today, at least 28 different forms of fumonisin are known, and most of them are designated as A-, B-, C-, and P-series. The most significant are B-series fumonisins, of which fumonisin B_1 (FB_1) and fumonisin B_2 (FB_2) are of almost equal toxicity. In nature, FB_1 occurs 3 times more frequently than FB_2.

The aim of this study is to evaluate the cytotoxic concentrations at which cell survival is reduced by 50% (IC50) of fumonisin B_1 and fumonisin B_2 on two different cell lines: human lung adenocarcinoma cells, A549, and human hepatocellular carcinoma cells, HepG2. The determination of IC50 is used to select the subcytotoxic concentrations of these two types of fumonisins to be used in the study of the cytotoxic effect of FB_1 and FB_2 in combination with other mycotoxins occurring in dust of humid, air and food. To examine the cytotoxic effect of FB_1 and FB_2, A549 and HepG2 cells were treated with toxins at concentrations of 10 to 500 μM within 24 h. The viability was determined by MTS proliferation assay (490 nm). MTS proliferation assay was applied to human A549 and HepG2 cells.

FB_1 is poorly cytotoxic to A549 cells, that means that it significantly reduces cell viability only after administration at the highest concentrations (400 μM and 500 μM) relative to control. FB_2 promotes proliferation of A549 cells by increasing concentration. HepG2 cells are more sensitive to the action of both fumonisins with FB_2 having a slightly stronger

cytotoxic effect than FB_1; FB_2 significantly reduces cell viability at a concentration of 150 μM and FB_1 at twice as high. For both fumonisins it was not possible to determine IC50 in A549 and HepG2 cells, because the fumonisins, administered in the concentration range of 10 μM to 500 μM, didn`t cause a viability decrease of more than 50% of the cells.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Citotoksičnost fumonizina B_1 i B_2 na A549 i HepG2 stanicama

Ana Lovrinčević

SAŽETAK

Izvanstanični metaboliti plijesni, koji su toksični ili imaju druge negativne biološke učinke na ljude i životinje, čine skupinu mikotoksina. Ti su spojevi vrlo različitih kemijskih struktura te onečišćuju žitarice i druge namirnice, posebice u tropskim krajevima jer viša temperatura i vlažnost pogoduju nastanku i rastu plijesni. Čovjek je najčešće izložen mikotoksinima konzumacijom hrane, no, u nekim slučajevima, može ih i udahnuti, oni mogu proći kroz kožu ili je izloženost parenteralna.
Fumonizini su mikotoksini koje najčešće proizvode vrste *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. Od svog otkrića, fumonizini se smatraju mikotoksinima uglavnom proizvedenima *Fusarium* vrstama. B-skupina fumonizina (FB_1, FB_2 i FB_3) se često otkriva u kukuruzu i u hrani na bazi kukuruza. Danas je poznato najmanje 28 različitih fumonizina, a većina njih označena je kao A-, B-, C- i P-serija. Najznačajniji su fumonizini B-serije, a od njih fumonizin B_1 (FB_1) te fumonizin B_2 (FB_2) koji su gotovo jednake toksičnosti. U prirodi se FB_1 pojavljuje 3 puta češće od FB_2.
Cilj ovog rada je procijeniti citotoksične koncentracije pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50% (IC_{50}) fumonizina B_1 i fumonizina B_2 na dvije različite stanične linije: ljudske stanice adenokarcinoma pluća, A549, i ljudske stanice hepatocelularnog karcinoma, HepG2. Određivanje IC_{50} služi za odabir subcitotoksičnih koncentracija tih dvaju vrsta fumonizina koje će se koristiti u ispitivanju citotoksičnog učinka FB_1 i FB_2 u kombinaciji s drugim mikotoksinima koji se pojavljuju u kućnoj prašini vlažnih prostora, zraku i u hrani. Kako bi se ispitao citotoksični učinak FB_1 i FB_2, A549 i HepG2 stanice tretirane su toksinima u koncentracijama od 10 do 500 μM tijekom 24 h. Vijabilnost je određena MTS proliferacijskim testom (490 nm). Na ljudske stanice A549 i HepG2 primijenio se MTS proliferacijski test.
FB_1 je slabo citotoksičan za A549 stanice, tj. značajno smanjuje vijabilnost stanica samo nakon primjene u najvećim koncentracijama (400 μM i 500 μM) u odnosu na kontrolu. FB_2 povećanjem koncentracije potiče proliferaciju A549 stanica. Stanice HepG2 su osjetljivije na djelovanje oba fumonizina pri čemu FB_2 ima nešto jači citotoksični učinak od FB_1; FB_2 značajno smanjuje vijabilnost stanica u koncentraciji od 150 μM, a FB_1 u dvostruko većoj. Za oba fumonizina nije bilo moguće odrediti IC_{50} u stanicama A549 i HepG2 jer fumonizini, aplicirani u rasponu koncentracija od 10 μM do 500 μM, nisu uzrokovali pad vijabilnosti za više od 50% stanica.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 5 grafičkih prikaza, 6 tablica i 88 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: mikotoksini, fumonizin B_1, fumonizin B_2, plućne stanice, jetrene stanice, citotoksičnost

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

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

Prof. dr. sc. Ana-Marija Domijan, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Cytotoxicity of fumonisin B_1 and B_2 on A549 i HepG2 cells

Ana Lovrinčević

SUMMARY

Extracellular mold metabolites, which are toxic or have other adverse biological effects on humans and animals, form a group of mycotoxins. These compounds are of very different chemical structures and contaminate cereals and other foods, especially in the tropics because high temperatures and humidity favor mold formation and growth. People are often exposed to mycotoxins by consuming food, but in some cases it can be inhaled, they can pass through the skin or the exposure is parenteral.
Fumonisins are mycotoxins most commonly produced by *F. verticillioides* and *F. proliferatum.* Since its discovery, fumonisins have been considered mycotoxins mainly produced by *Fusarium* species. The B-group of fumonisins (FB_1, FB_2, and FB_3) is often detected in maize and maize-based foods. Today, at least 28 different forms of fumonisin are known, and most of them are designated as A-, B-, C-, and P-series. The most significant are B-series fumonisins, of which fumonisin B_1 (FB_1) and fumonisin B_2 (FB_2) are of almost equal toxicity. In nature, FB_1 occurs 3 times more frequently than FB_2.
The aim of this study is to evaluate the cytotoxic concentrations at which cell survival is reduced by 50% (IC50) of fumonisin B_1 and fumonisin B_2 on two different cell lines: human lung adenocarcinoma cells, A549, and human hepatocellular carcinoma cells, HepG2. The determination of IC50 is used to select the subcytotoxic concentrations of these two types of fumonisins to be used in the study of the cytotoxic effect of FB_1 and FB_2 in combination with other mycotoxins occurring in dust of humid, air and food. To examine the cytotoxic effect of FB_1 and FB_2, A549 and HepG2 cells were treated with toxins at concentrations of 10 to 500 μM within 24 h. The viability was determined by MTS proliferation assay (490 nm). MTS proliferation assay was applied to human A549 and HepG2 cells.
FB_1 is poorly cytotoxic to A549 cells, that means that it significantly reduces cell viability only after administration at the highest concentrations (400 μM and 500 μM) relative to control. FB_2 promotes proliferation of A549 cells by increasing concentration. HepG2 cells are more sensitive to the action of both fumonisins with FB_2 having a slightly stronger cytotoxic effect than FB_1; FB_2 significantly reduces cell viability at a concentration of 150 μM and FB_1 at twice as high. For both fumonisins it was not possible to determine IC50 in A549 and HepG2 cells, because the fumonisins, administered in the concentration range of 10 μM to 500 μM, didn`t cause a viability decrease of more than 50% of the cells.

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

Thesis includes: 35 pages, 5 figures, 6 tables and 88 references. Original is in Croatian language.

Keywords: mycotoxins, fumonisin B_1, fumonisin B_2, lung cells, liver cells, cytotoxicity

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

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

Ana-Marija Domijan, **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

The thesis was accepted: September 2019.