

Nekovalentne interakcije mikotoksina sterigmatocistina sa humanim serumskim albuminom i ciklodekstrinom Sugammadex metodom izotermalne titracijske kalorimetrije

Kolić, Anastazija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:731005>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



Anastazija Kolić

**Nekovalentne interakcije mikotoksina
sterigmatocistina sa humanim serumskim
albuminom i ciklodekstrinom Sugammadex
metodom izotermalne titracijske kalorimetrije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023. godina

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 doc. dr. sc. Daniele Jakšić.

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, strpljenju, ažurnosti i pristupačnosti. Zahvaljujem i asistentu sa Zavoda za opću i anorgansku kemiju mag. chem. Robertu Kerepu na vodstvu u laboratoriju, dobroj volji, pomoći i savjetima. Najveće hvala upućujem svojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci i vjetru u leđa tijekom cijelog studija. Hvala Mislavu i mojim prijateljima bez kojih ovako dobar period studiranja prepun nezaboravnih trenutaka ne bi bio moguć.

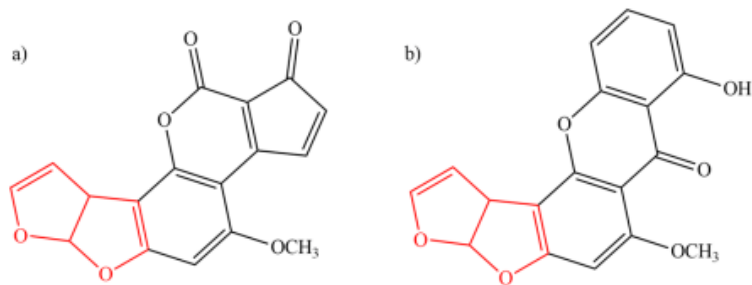
Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Sterigmatocistin- kemijska svojstva i biološki značaj	1
1.2. Jedinstvena svojstva STC-a u vodenim otopinama	2
1.3. Humani serumski albumin (HSA) i ciklodekstrini	2
1.4. Nekovalentne interakcije i njihova termodinamika	3
1.5. Mikrokalorimetrija.....	4
2. Obrazloženje teme	6
3. Materijali i metode.....	7
4. Rezultati i rasprava	8
4.1. Ispitivanje interakcije STC s HSA.....	8
4.2. Ispitivanje interakcija STC sa Sugammadexom	9
4.3. Kompeticijska titracija kompleksa STC-HSA sa Sugammadexom.....	11
5. Zaključci	13
6. Literatura.....	14
7. Sažetak	16
8. Summary	17
Temeljna dokumentacijska kartica	1
Basic documentation card.....	2

1. Uvod

1.1 Sterigmatocistin- kemijska svojstva i biološki značaj

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni koji zbog svoje široke rasprostranjenosti u hrani i prostorima predstavljaju prijetnju za zdravlje ljudi i životinja. Pretpostavlja se da je čak 25% zaliha hrane, ljudske i životinjske, kontaminirano mikotoksinima te se očekuje porast potaknut klimatskim promjenama. Najvažniji načini izloženosti mikotoksinima su oralni put i inhalacija, a još je moguć i kontakt preko kože, dok ciljne mete mogu biti svi sustavi organa. Među najistraživanijim mikotoksinima su aflatoksini, a posebni značaj ima aflatoksin B₁ (AFB₁) koji se smatra najpotentnijim hepatokarcinogenom za sisavce te ga Svjetska agencija za istraživanje raka (IARC) svrstava u skupinu 1 karcinogena (IARC, 2002). Sterigmatocistin (STC) je poliketidni mikotoksin kojeg proizvodi više od 50 vrsta plijesni, među kojima su najznačajniji aspergili iz serije *Versicolores* (Sklenář i sur., 2022). Mikotoksin STC je dokazano prisutan u kavi, začinima, orašastim plodovima, pivu te na površini sireva, s tim da obrada hrane može u određenoj mjeri smanjiti njegovu koncentraciju (EFSA, 2013). U većoj mjeri nego u hrani, STC se može pronaći u uzorcima uzetim iz unutarnjih prostora, osobito u prašini (Jakšić i sur., 2021). Usprkos vrlo sličnim strukturama i putu biosinteze, akutna i kronična toksičnost STC-a za ljude se smatra puno manjom u odnosu na AFB₁ (EFSA, 2013). Prema Svjetskoj Agenciji za Istraživanje Raka (engl. International Agency for Research on Cancer, IARC) STC se svrstava u karcinogene 2B skupine (IARC, 1972). Akutna oralna toksičnost STC-a je relativno niska, a organi na kojima se ispoljava su jetra i bubrezi. STC djeluje kao mutagen u bakterijskim stanicama i stanicama sisavaca na način da tvori DNA adukte preko reaktivne epoksi skupine (EFSA, 2013). Unatoč tome što im je bifuranski prsten zajednički dio strukture (slika 1), STC je karakteriziran većom aromatskom i hidrofobnom površnom od AFB₁ što može rezultirati izraženijim nekovalentnim interakcijama STC s drugim biomakromolekulama.



Slika 1. Strukture AFB1 (a) i STC-a (b)

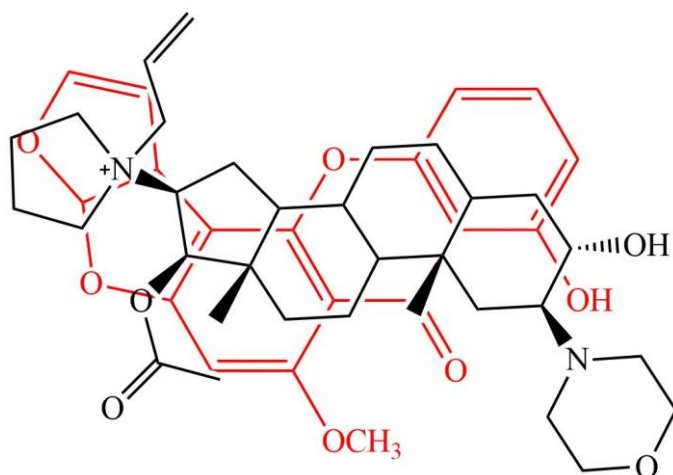
1.2. Jedinствена svojstva STC-a u vodenim otopinama

Znamo da su velike, nenabijene, aromatske molekule najčešće netopljive u vodi, međutim takve molekule mogu stvarati kristale ili agregate zahvaljujući π slaganju i disperzijskim silama. Dokazano je da STC, za razliku od AFB₁, može tvoriti homogenu otopinu na način da stvara vrlo stabilne agregate. Koristeći različite spektroskopske, kalorimetrijske i mikroskopske metode dokazano je da je STC značajno topljiviji i stabilniji u vodenim otopinama u koncentracijama od 0,1 do 10 μ M uz prisutnost niske koncentracije organskog otapala (<0,1%). Veliki značaj ima i otkriće da u takvim vodenim otopinama STC pokazuje koncentracijski ovisan, linearni signal cirkularnog dikroizma (CD) u UV području s maksimumom na 350 nm te s intenzitetom 1000 puta većim od bazne linije u mikromolarnom području. Takav signal je vrlo specifičan te ga ne pokazuje niti jedan srodni mikotoksin, uključujući i aflatoksine. Rezultati istraživanja su pokazali da taj signal ne potječe od kiralnosti STC već da je to posljedica specifičnog procesa agregacije. Ovo otkriće omogućilo je novi pristup detekciji i kvantifikaciji STC te ispitivanju interakcija s biomakromolekulama (Jakšić i sur., 2019).

1.3. Humani serumski albumin (HSA) i ciklodekstrini

Kao najzastupljeniji protein plazme, humani serumski albumin (HSA) ima brojne fiziološke uloge poput regulacije koloidno osmotskog tlaka i transporta raznih endogenih molekula do ciljnih organa i tkiva. Uz hormone, masne kiseline i druge endogene molekule, HSA veže i veliki broj lijekova i drugih ksenobiotika uključujući i toksine. Vežanje za vezno mjesto HSA ne samo da osigurava distribuciju, već utječe i na metabolizam i eliminaciju ksenobiotika (Hassan i sur., 1997). Od posebnog je značaja mogućnost istiskivanja lijekova/ksenobiotika sa HSA te kompeticija više supstrata za isto vezno mjesto. Istraživanja su pokazala da je najvjerojatnije mjesto vezanja STC u hemskom području HSA te da se veže umjerenim

afinitetom s konstantom disocijacije reda veličine 10^{-4} M (Fliszár-Nyúl i sur., 2022). Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi građeni od 6,7 ili 8 glukopiranoznih jedinica sa centralnom šupljinom koja tvori vezno mjesto za hidrofobne molekule prikladne veličine (Fenyvesi, 2015). Zahvaljujući lipofilnoj unutrašnjosti, ciklodekstrini dobro uklapaju hidrofobne molekule lijekova, a u isto vrijeme su topljivi u fiziološkim tekućinama zbog hidrofilne vanjske površine prekrivene hidroksilnim skupinama te ga ta svojstva čine široko iskoristivim u farmaceutskoj industriji (Heinz Frömming i Szejtli, 1993; Yang i Keam, 2009). Sugammadex je modificirani gama ciklodekstrin koji je registriran pod imenom Bridion (Registar lijekova u Hrvatskoj, 2022). Koristi se za reverziju rokuronijem uzrokovane regionalne blok anestezije (Mirakhur, 2009). Sugammadex ima visoki afinitet za rokuronij što potvrđuje niska konstanta disocijacije koja iznosi $1,79 \times 10^{-7}$ M (Zwiers i sur., 2012). Obzirom da STC pokazuje strukturno-konformacijsku podudarnost s molekulom rokuronija (slika 2), u ovom radu ispitan je afinitet vezanja, kao i tip nekovalentnih veza uključenih u interkacije STC agregata i Sugammadexa. Iz tih podataka može se zaključiti postoji li mogućnost korištenja gama tipa ciklodekstrina Sugammadex kod intoksikacije mikotoksinom STC.



Slika 2. Strukturna podudarnost STC i rokuronija (nacrtano u ChemDraw Ultra 12.0)

1.4. Nekovalentne interakcije i njihova termodinamika

Iako se nekovalentne veze smatraju “slabim” vezama, one imaju veliku ulogu u strukturi i dinamici biomakromolekula te u njihovim međusobnim interakcijama. Najvažnije nekovalentne veze su van der Waalsve sile, hidrofobne interakcije, elektrostatičke sile i vodikove veze. Važnost vodikovih veza i hidrofobnih interakcija posebno dolazi do izražaja u

stvaranju trodimenzionalnih struktura proteina, nukleinskih kiselina i staničnih membrana te su odgovorne za odvijanje procesa stanične signalizacije, stvaranje kompleksa enzima i supstrata, kao i za interakcije između lijekova i njihovih ciljnih molekula. Vodikove veze su međumolekulske veze u kojima je atom vodika vezan za atom visoke elektronegativnosti (F, O, N), hidrofobne interakcije su privlačne sile kojima se grupiraju dijelovi molekula koji ne reagiraju s vodom, van der Waalsove sile su privlačne sile između polariziranih atoma ili molekula koje su privremeno stvorene promjenom rasporeda elektrona, a elektrostatičke sile su sile između pozitivno i negativno nabijenih dijelova atoma ili molekula (Berg i sur., 2013). Svaki tip nekovalentne interakcije ima karakteristične termodinamičke parametre koji se mogu koristiti za opisivanje stabilnosti interakcije. Tako su primjerice vodikove veze i hidrofobne interakcije termodinamički stabilne veze što se očituje negativnim vrijednostima Gibbsove slobodne energije, negativne vrijednosti entalpije i pozitivne vrijednosti entropije. Kad je riječ o elektrostatičkim silama, one se također očituju negativnom vrijednošću Gibbsove slobodne energije i negativnom vrijednošću entalpije, međutim entropija se može povećati ili smanjiti ovisno o tipu elektrostatske interakcije (Claveria-Gimeno i sur., 2017).

1.5. Mikrokolorimetrija

Mikrokolorimetrija je metoda koja je zadnjih desetljeća potvrdila svoje mjesto jedne od ključnih tehnika u istraživanjima biomolekulskih interakcija. Gotovo svaki proces popraćen je promjenama u toplini stoga se ova metoda koristi u područjima termodinamike, kinetike, ali i u analitici (Wadsö, 2002). Dvije su glavne vrste mikrokolorimetrije, izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *Isothermal titration calorimetry*, ITC) i diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential scanning calorimetry*, DSC), a u ovom istraživanju korištena je ITC. Izotermalni kalorimetar je kompenzacijski kalorimetar koji mjeri u mikrovatskom rasponu održavajući temperaturu u ćeliji konstantnom. Općenito, vezanje liganda za makromolekulu može rezultirati ili otpuštanjem ili trošenjem energije, odnosno topline koju mjerimo ITC eksperimentom. Molekulska interakcija dva liganda može se definirati sljedećom jednačinom (1.1.) koja predstavlja osnovu ITC analize:

$$1.1. \Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$$

Prvi dio ove jednačine upućuje na to da Gibbsova slobodna energija korelira s konstantom asocijacije K_A , budući da su plinska konstanta R i apsolutna temperatura T konstantne. K_A je obrnuto razmjerna konstanti disocijacije K_D koja opisuje afinitet vezanja između dva liganda. Drugi dio ove jednačine prikazuje da suma promjene entalpije vezanja $\Delta_r H^\circ$ i promjene

entropije vezanja $\Delta_r S^\circ$ definira slobodnu energiju $\Delta_r G^\circ$, a samim time i afinitet interakcije. Prednost ove metode je da se u istom eksperimentu mogu dobiti vrijednosti K_A i $\Delta_r H^\circ$ čime lako možemo izračunati $\Delta_r G^\circ$ i $\Delta_r S^\circ$. Međutim, treba imati na umu da ova metoda ne može pouzdano odrediti konstantu vezanja već je pogodnija za karakterizaciju međumolekulskih interakcija. Osim toga, velika prednost ove metode je i njena osjetljivost (Krell, 2008). Nedostatak ove metode je izostanak specifičnosti, što znači da će kompleksni reakcijski sustavi dati nespecifičan signal koji je rezultat svih procesa koji se odvijaju u ITC ćeliji (protonacija/deprotonacija radnog pufera, solvatacija/desolvatacija liganda ili analita u kalorimetru) te ga je kao takvog ponekad teško interpretirati. Sukladno tome, potrebno je provoditi kontrolne eksperimente kako bi se izbjegli toplinski signali neželjenih interakcija (Wadsö, 2002).

2. **Obrazloženje teme**

STC je kancerogeni mikotoksin široko rasprostranjen u okolišu. Ovaj bisfuranski mikotoksin karakterizira velika aromatska i hidrofobna površina koja omogućava stupanje u nekovalentne interakcije s drugim biomakromolekulama. Metoda ITC omogućava provjeru afiniteta vezanja te karakterizaciju tipa kemijskih interakcija između različitih molekula.

Obzirom da postoji strukturno-konformacijska podudarnost molekula STC i lijeka rokuronija, a ciklodekstrin Sugammadex se primjenjuje kao lijek u reverziji blok anestezije rokuronijem, cilj ovoga rada je procijeniti primjenjivost Sugammadexa kod intoksikacije STC-om. Pri tome će se odrediti tip nekovalentnih interakcije između STC i HSA te STC i Sugammadexa metodom ITC te mogućnost istiskivanja STC iz pretpostavljenog kompleksa STC-HSA dodatkom Sugammadexa. Afinitet vezanja STC sa Sugammadexom usporedit će se i s literaturnim podacima afiniteta kojim Sugammadex veže lijek rokuronij.

3. Materijali i metode

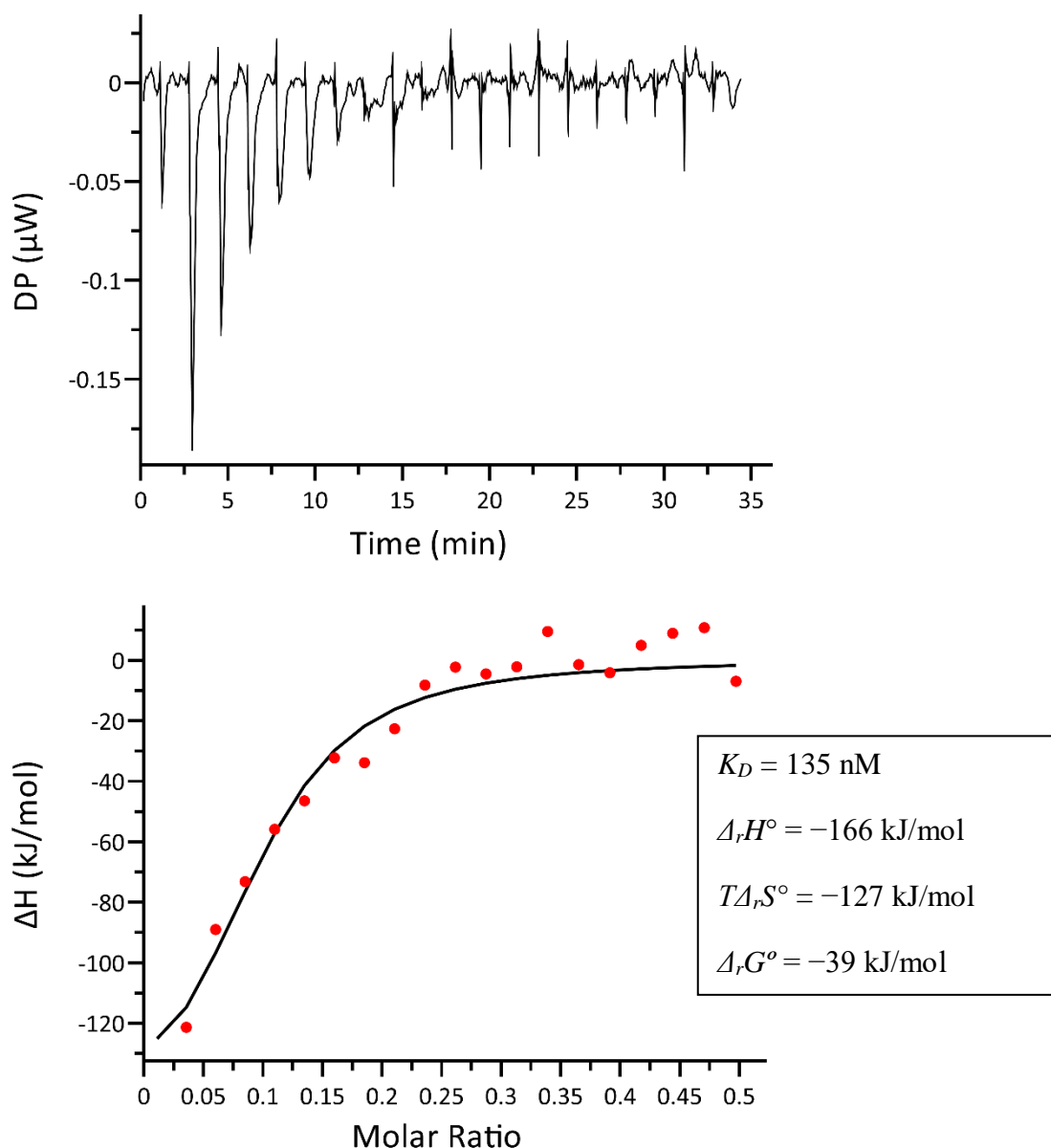
STC i HSA nabavljeni su od tvrtke Sigma Aldrich iz Darmastada u Njemačkoj, a Sugammadex (Bridion®, Merck Sharp & Dohme Limited, Hertfordshire, UK) ljubazno je doniran od tvrtke Medika d.d. Zagreb, Hrvatska. Matična otopina STC (0,015 M) pripravljena je u dimetilsulfoksidu (DMSO). Za razrjeđivanje originalne otopine Sugammadexa, pripremu otopine HSA te pripremu agregata STC (10^{-5} M) priređena je otopina NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska) *ex tempore* u redestiliranoj vodi ($I = 1,5$ mM, $\text{pH } 7,40 \pm 0,02$).

Termodinamički parametri za interakcije STC sa HSA i Sugammadex-om izmjereni su pri 25°C na MicroCal PEAQ-ITC kalorimetru (MalvernPanalyticalLtd., Malvern, UK). Kako bi se pripremio stabilni agregat STC u vodenom mediju (10^{-5} M), matična otopina STC u DMSO (0,015 M) razrjeđena je otopinom NaCl (1,5 mM otopina NaCl u redestiliranoj vodi, $\text{pH } 7,40$) kako bi udio organskog otapala bude minimalan (0,067%). Isti udio organskog otapala prilagođen je u otopinama Sugammadexa i HSA korištenim u titracijama. Sve otopine osim agregata STC su prije titracija temeljito odzračene 10 minuta u vakuumu kako bi se izbjeglo stvaranje mjehurića u ćeliji s uzorkom. Ćelija je volumena $200 \mu\text{L}$, a volumen birete je $40 \mu\text{L}$. Titracije su provedene dodavanjem alikvota od $1 \mu\text{L}$ otopine HSA ($2,5 \times 10^{-5}$ M) ili otopine Sugammadexa (5×10^{-4} M) u ćeliju kalorimetra s prethodno formiranim STC agregatom. Otopina u ćeliji se konstantno miješala brzinom vrtnje od 500 rpm. U referentnu ćeliju je stavljena redestilirana voda. Diferencijalna snaga (DP) je proizvoljno namještena za svaku titraciju, a interval između uzastopnih dodataka alikvota je bio 100 s. Provedeni su kontrolni eksperimenti u kojima su otopine HSA ili Sugammadexa dodane otapalu, kao i oni u kojima je otapalo dodano otopini STC agregata te su ti eksperimenti izvedeni u jednakim uvjetima kao i originalne titracije. Toplinske promjene dobivene kontrolnim eksperimentima korištene su za korekciju podataka dobivenih u STC-HSA i STC-Sugammadex titracijama. U kompetitivnom eksperimentu, obje titracije su izvedene na jednak način kao prethodno navedene titracije gdje je, na kraju titracije STC (10^{-5} M) s HSA ($2,5 \times 10^{-5}$ M), bireta očišćena i napunjena Sugammadexom (5×10^{-4} M) koji je u malim alikvotima dodan prethodno formiranom STC-HSA kompleksu. Dobivene vrijednosti promjene entalpije korigirane su za entalpiju razrjeđenja titransa. Svi ITC podaci analizirani su u MicroCal PEAQ-ITC softveru korištenjem modela stehiometrije vezaja 1:1 (engl. *One Set Sites Fitting Model*).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Ispitivanje interakcija STC s HSA

Rezultati kalorimetrijske titracije STC agregata i HSA prikazani su na slici 3. Nakon korekcije $\Delta H_{\text{razrjeđenja}}$, podaci o entalpiji dobiveni su modelom s jednim veznim mjestom. Titracija STC agregata s HSA pokazuje da se radi o egzotermnoj reakciji vezanja s vrlo malim stehiometrijskim faktorom ($N \sim 0,1$), a ta promjena topline proizlazi iz odcjepljivanja pojedinačnih STC molekula iz agregata, odnosno iz procesa deagregacije.



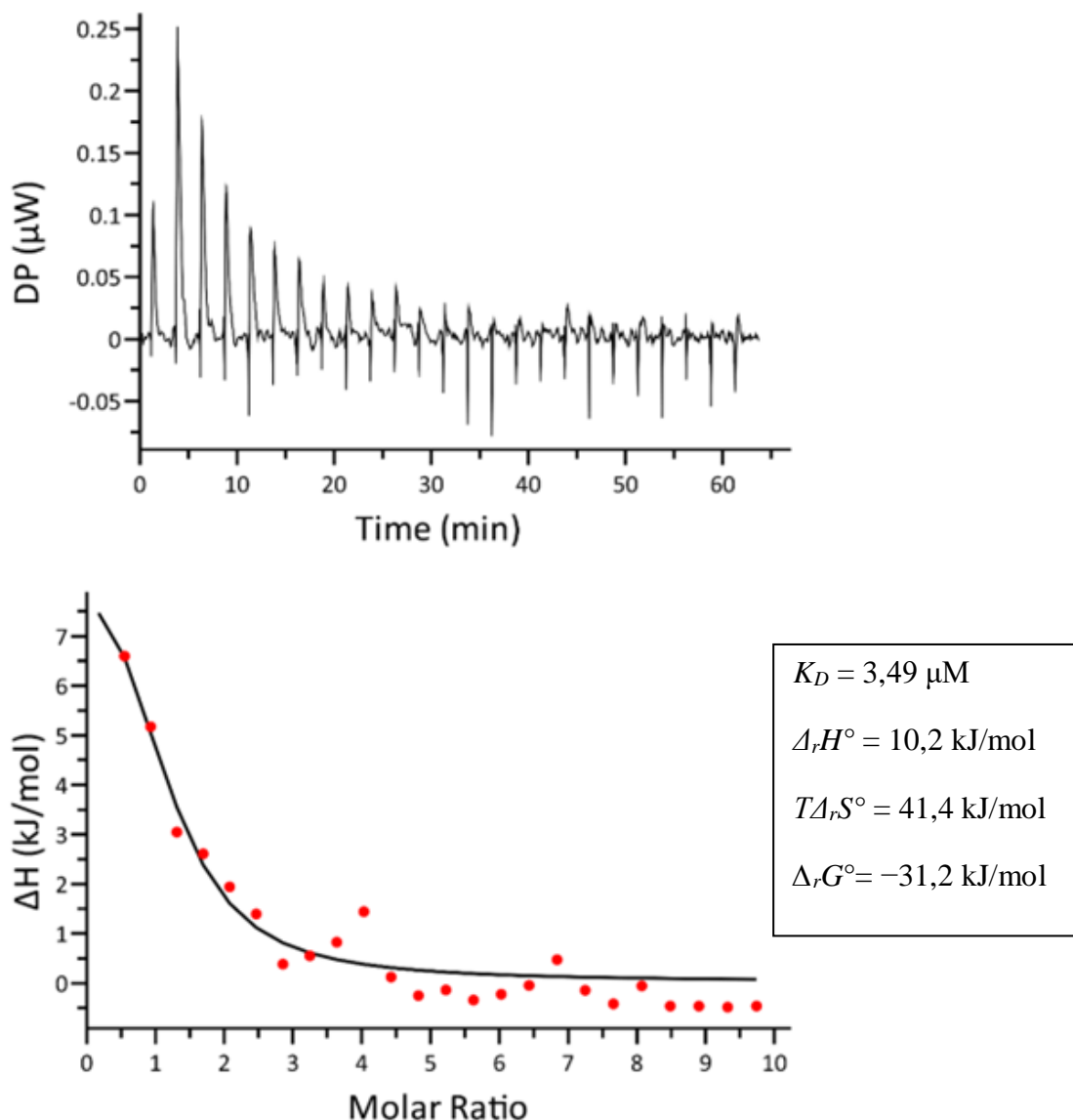
Slika 3. Mikrokolorimetrijska titracija STC-a (10^{-5} M) s HSA ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) u dodacima od $1 \mu\text{L}$ pri temperaturi od 25°C . Gornji graf prikazuje toplinu (μW) po dodatku uz korekciju

bazne linije. Donji graf prikazuje promjenu entalpije (kJ/mol) kao funkciju molarnog odnosa HSA i STC-a.

Iz prikaza termodinamičkih parametara ($\Delta_r H^\circ, \Delta_r S^\circ, \Delta_r G^\circ$) možemo uvidjeti da Gibbsovoj slobodnoj energiji doprinose povoljna negativna vrijednost entalpije i nepovoljna negativna vrijednost entropije. Ove promjene mogu proizlaziti iz hidrofobnih interakcija i vodikovih veza između STC i HSA. Negativna Gibbsova energija upućuje na to da se radi o spontanom procesu. Dobivena konstanta disocijacije je za nekoliko redova veličine niža od pretpostavljene vrijednosti dokazane drugim metodama (Fliszár-Nyúl i sur., 2022), a to odstupanje pripisuje se činjenici da ITC metoda nije pouzdana metoda za određivanje konstante. Dodatno ograničenje predstavljaju koncentracijski uvjeti za stvaranje agregata STC odgovarajuće stabilnosti.

4.2. Ispitivanje interakcija STC sa Sugammadexom

Rezultati kalorimetrijske titracije STC agregata i HSA prikazani su na slici 4. Nakon korekcije $\Delta H_{\text{razrjeđenja}}$, podaci o entalpiji dobiveni su modelom s jednim veznim mjestom. Za razliku od HSA, dodatak Sugammadexa STC agregatu rezultirao je endotermnom reakcijom vezanja, dok je Gibbsova energija i u ovom procesu negativna. Osim toga, usporedbom vrijednosti K_D , može se zaključiti da su interakcije STC sa Sugammadexom puno jače nego s HSA, zato što je vrijednost K_D dobivena ovom titracijom niža od prethodno dokazane K_D za interakciju STC s HSA.

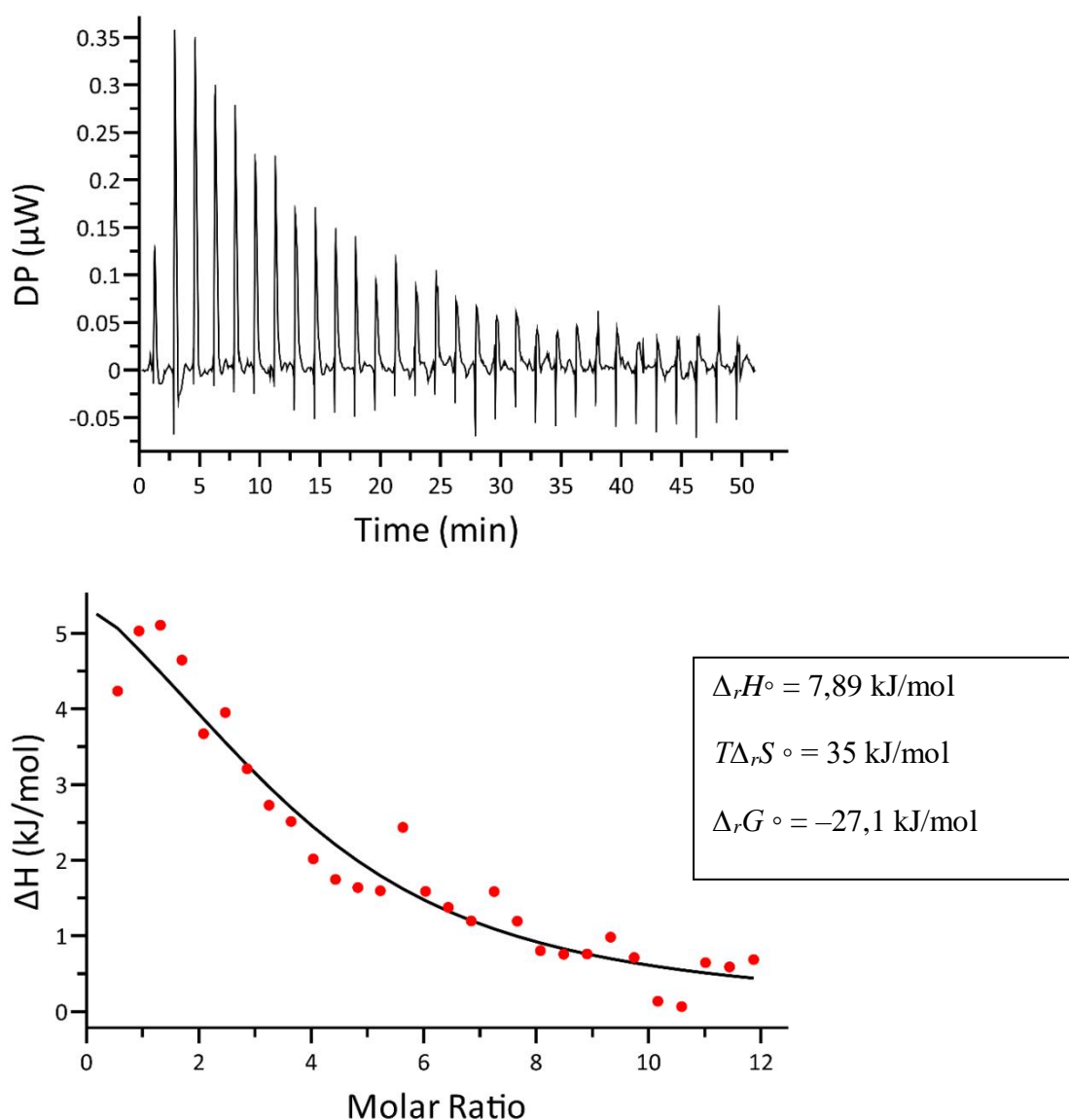


Slika 4. Mikrokalorimetrijska titracija STC (10^{-5} M) sa Sugammadexom ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) u bireti s dodacima od $1 \mu\text{L}$ pri temperaturi od 25°C . Gornji graf prikazuje toplinu u μW po dodatku uz korekciju bazne linije. Gornji graf prikazuje promjenu entalpije (kJ/mol) kao funkciju molarnog odnosa Sugammadexa i STC.

Pretpostavlja se da je proces deagregacije STC jednak u titraciji sa HSA i sa Sugammadexom, stoga se razlike u termodinamičkim parametrima pripisuju isključivo različitom tipu nekovalentnih interakcija STC sa HSA i Sugammadexom. Sukladno povoljnom iznosu entropije, može se zaključiti da prevladavaju hidrofobne interakcije što bi odgovaralo vezanju neutralnog liganda (STC) unutar izrazito hidrofobne unutrašnjosti Sugammadexa.

4.3. Kompeticijska titracija kompleksa STC-HSA sa Sugammadexom

Kako bismo pouzdanije procijenili primjenjivost Sugammadexa kod intoksikacije sa STC napravljen je i kompeticijski eksperiment istiskivanja STC iz pretpostavljenog kompleksa sa HSA, titracijom prethodno formiranog STC-HSA kompleksa (unutar ITC ćelije) sa Sugammadexom. Nakon korekcije $\Delta H_{\text{razrjeđenja}}$, podaci o entalpiji dobiveni su modelom s jednim veznim mjestom. Rezultati titracije pokazuju da je reakcija vezanja endotermna, dok povoljna negativna vrijednost Gibbsove energije upućuje na spontani proces. Entropija ovog procesa je povoljna dok je entalpija nepovoljna.



Slika 5. Mikrokolorimetrijska titracija predstvorenog kompleksa STC-HSA sa Sugammadexom ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) u bireti s dodacima od $1 \mu\text{L}$ pri temperaturi od 25°C . Gornji graf

prikazuje toplinu u μW po dodatku uz korekciju bazne linije. Donji graf prikazuje promjenu entalpije (kJ/mol) kao funkciju molarnog odnosa Sugammadexa i STC-HSA kompleksa.

Pozitivna promjena entropije pokazuje da su pretežito prisutne hidrofobne interakcije, a mala pozitivna vrijednost promjene entalpije pokazatelj je prisutnosti i nekoliko elektrostatskih interakcija koje mogu potjecati od interakcija između negativnih karboksilnih skupina Sugammadexa, negativnih amino skupina HSA lanaca te slabo pozitivno nabijenog karbonilnog ugljika STC molekule. Budući da je vrijednost promjene entropije veća od vrijednosti promjene entalpije, ova reakcija vezanja pretežito je vođena promjenama entropije.

ITC analiza pokazala je da između STC i Sugammadexa prevladavaju hidrofobne reakcije te da je vezanje karakterizirano značajno visokim afinitetom što potvrđuje konstanta disocijacije od $3,49 \times 10^{-6} \text{ M}$. Da bi se dokazao značaj ovog rezultata potrebnoga je usporediti s konstantama disocijacije Sugammadexa za rokuronij i vekuronij za koje ima dokazano najveće afinitete. Konstanta disocijacije za rokuronij iznosi $1,79 \times 10^{-7} \text{ M}$, a za vekuronij $5,72 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Zweirs i sur., 2012). Negativno nabijene karboksilne skupine Sugammadexa tvore elektrostatske interakcije s kvarternim dušikom rokuronija i vekuronija, a vezanje je dodatno učvršćeno hidrofobnim interakcijama (FDA, 2015). Osim rokuronija i vekuronija, Zweirs i suradnici (2012) ispitali su interakcije Sugammadexa s više od 300 molekula. Lijekovi koji su pokazali značajni afinitet za Sugammadex, flukloksacilin ($K_D=5,2210 \times 10^{-4} \text{ M}$), fusidična kiselina ($K_D=3,14 \times 10^{-5} \text{ M}$) i toremifen ($K_D=5,43 \times 10^{-6} \text{ M}$), imaju mogućnost termodinamičkih interakcija ovih lijekova ukoliko se primjenjuju zajedno sa anestheticima rokuronijem ili vekuronijem. Obzirom da STC pokazuje još veći afinitet za Sugammadex od spomenutih lijekova, možemo pretpostaviti da ovaj mikotoksin može ometati djelovanje Sugammadexa u reverziji blok anestezije, posebno uzimajući u obzir njegovu široku rasprostranjenost u okolišu.

5. Zaključci

- Interpretacijom termodinamičkih parametara dobivenih metodom mikrokalorimetrije omogućen je uvid u tipove interakcija koje se odvijaju između STC i HSA odnosno STC i Sugammadexa.
- Prilikom stvaranja kompleksa STC-Sugammadex, konstanta disocijacije iznosi $3,49 \times 10^{-6}$ M što dokazuje puno veći afinitet vezanja nego što je afinitet između STC i HSA za koje je konstanta disocijacije reda veličine 10^{-4} M.
- Kompeticijskim eksperimentom prikazana je uspješna ekstrakcija STC s veznog mjesta HSA primjenom Sugammadexa, što je potvrdilo jače interakcije STC i Sugammadexa u odnosu na STC i HSA.
- Mehanizam kompeticije sličan je mehanizmu disocijacije kompleksa rokuronija i HSA primjenom Sugammadexa te je konstanta disocijacije za STC i Sugammadex ($3,49 \times 10^{-6}$ M) usporediva s konstantom disocijacije rokuronija i Sugammadexa ($1,79 \times 10^{-7}$ M). Veći afinitet interakcije rokuronija i Sugammadexa u odnosu na STC i Sugammadex može se pripisati doprinosu izraženih elektrostatskih interakcija između rokuronija i Sugammadexa.
- Rezultati istraživanja upućuju na mogućnost korištenja gama tipa ciklodekstrina kod intoksikacije mikotoksinom STC, ali i na mogućnost termodinamičkih interakcija između rokuronija i STC kada se Sugammadex primjenjuje kod reverzije anestezije. Daljnja istraživanja trebaju razjasniti klinički značaj pretpostavljenih interakcija.

6. Literatura

- Claveria-Gimeno R, Vega S, Abian O, Velazquez-Campoy A. A look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery*, 2017, 12, 363-377.
- EFSA Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J*, 2013,11, 3254.
- Fenyvesi É, Vikmon M, Szente L Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2016, 56, 1981-2004.
- Fliszár-Nyúl E, Faisal Z, Skaper R, Lemli B, Bayartsetseg B, Hetényi C, Gömbös P, Szabó A, Poór M. Interaction of the Emerging Mycotoxins Beauvericin, Cyclopiazonic Acid, and Sterigmatocystin with Human Serum Albumin. *Biomolecules*, 2022, 12, 1106.
- Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Application Number:022225Orig1s000, Medical Review(s). 2015; http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/022225Orig1s000SumR.pdf pristupljeno 4.5.2023.
- Hassan M, E Azzazy, Robert H Christenson, All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. *Clin. Chem.*, 1997, 2014a–2015.
- Heinz Fromming K i Szejtli J. Cyclodextrins in Pharmacy, Dordrecht, SpringerDordrecht, 1993.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-Nitroso Compounds, and Natural Products. 1972,175-177.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. 2002, 82,1-556.
- J. M. Berg, J. L: Tymoczko, L. Stryer, BIOKEMIJA, Školska knjiga, 2013.
- Jakšić D, Šegvić Klarić M, Crnolatac I, Šijaković Vujičić N, Smrečki V, Górecki M, Pescitelli G, Piantanida I. Unique Aggregation of Sterigmatocystin in Water Yields Strong and Specific Circular Dichroism Response Allowing Highly Sensitive and Selective Monitoring of Bio-Relevant Interactions. *Mar Drugs*, 2019, 17,629.

- Jakšić, D., Sertić M., Kifer D, Mornar Turk A., Nigović B., Šegvić Klarić M. Fungi and their secondary metabolites in water-damaged indoors after a major flood event in eastern Croatia. *Indoor Air*, 2021,31,730-744.
- Krell T. Microcalorimetry: a response to challenges in modern biotechnology. *Microb Biotechnol.* 2008, 1, 126-136.
- Medicinskanaklada.REGISTARLIJEKOVAUHRVATSKOJ2022.,
<https://www.medicinskanaklada.hr/registar-lijekova-u-hrvatskoj/>pristupljeno:
18.4.2023.
- Mirakhur R. K. Sugammadex in clinical practice. *Anaesthesia*, 2009, 64, 45-54.
- Sklenář F, Glässnerová K, Jurjević Ž, Houbraken J, Samson RA, Visagie CM, Yilmaz N, Gené J, Cano J, Chen AJ, Nováková A, Yaguchi T, Kolařík M, Hubka V. Taxonomy of *Aspergillus* series *Versicolores*: species reduction and lessons learned about intraspecific variability. *Stud Mycol.*, 2022,102, 53-93.
- Wadsö I. Isothermal microcalorimetry in applied biology. *Thermochim. Acta*, 2002,394, 305-311.
- Yang, L.P.H, Keam, S.J. Sugammadex: A review of its use in anaesthetic practice. *Drugs* 2009, 69, 919–942.
- Zwiers A, van den Heuvel M, Smeets J, Rutherford S. Assessment of the potential for displacement interactions with sugammadex: a pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling approach. *Clin Drug Investig.*2011,31(2),101-11.

7. Sažetak

Sterigmatocistin (STC) je kancerogeni mikotoksin (IARC 2B) čiji su najznačajniji proizvođači plijesni roda *Aspergillus* iz serije *Versicolores* koje su široko rasprostranjene u okolišu. Sugammadex je gama tip ciklodekstrina koji se primjenjuje za reverziju rokuronijem izazvane anestezije. S obzirom na strukturno konformacijsku podudarnost molekula STC i rokuronija, ovim radom se htjela provjeriti mogućnost korištenja Sugammadexa kod intoksikacije sa STC. U tu svrhu korištena je metoda izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC). Iz dobivenih termodinamičkih parametara proizlazi da između STC i HSA prevladavaju hidrofobne interakcije i vodikove veze. Ispitivanje je također pokazalo da se uklapanje STC toksina u hidrofobnu unutrašnjost Sugammadexa temelji na hidrofobnim interakcijama te konstanta disocijacije od $3,49 \times 10^{-6}$ dokazuje veći afinitet nego prema HSA. Proveden je i kompetitivni eksperiment kojim je potvrđena mogućnost Sugammadexa da istisne STC iz kompleksa s HSA zahvaljujući većem afinitetu vezanja STC za Sugammadex. Usporedbom s literaturnim podacima dobivenim istom metodom za rokuronij i Sugammadex, afinitet vezanja rokuronija za Sugammadex ($K_D=1,79 \times 10^{-7}$ M) usporediv je sa afinitetom STC i Sugammadexa. Na temelju ovih rezultata, može se zaključiti da postoji mogućnost primjene Sugammadexa kao antidota kod intoksikacije mikotoksinom STC, a klinički značaj potrebno je dalje istražiti na odgovarajućim staničnim i/ili in vivo modelima.

8. Summary

Sterigmatocystin (STC) is a carcinogenic mycotoxin (IARC 2B) produced mainly by molds from the series *Versicolores* of the genus *Aspergillus*, which are widely distributed in the environment. Sugammadex is a gamma-cyclodextrin derivative used for the reversal of rocuronium-induced anesthesia. Considering the structural-conformational similarity between the molecules of STC and rocuronium, this study aimed to investigate the possibility of using Sugammadex in STC intoxication. The isothermal titration calorimetry (ITC) method was employed for this purpose. The obtained thermodynamic parameters indicate that hydrophobic interactions and hydrogen bonds prevail between STC and HSA. The study also demonstrated that the incorporation of the mycotoxin STC into the hydrophobic cavity of Sugammadex is based on hydrophobic interactions, while the corresponding dissociation constant of 3.49×10^{-6} M suggests a higher affinity compared to HSA. A competitive experiment was conducted, confirming the ability of Sugammadex to displace STC from the complex with HSA due to a higher binding affinity of STC for Sugammadex. Comparison with literature data obtained using the same method for rocuronium and Sugammadex showed that the binding affinity of rocuronium for Sugammadex ($K_D = 1.79 \times 10^{-7}$ M) is comparable to the affinity of STC and Sugammadex. Based on these results, it can be concluded that Sugammadex has the potential to be used as an antidote in STC mycotoxin intoxication, but further investigation conducted on appropriate cellular and/or in vivo models is needed to elucidate the clinical significance of these results.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Nekovalentne interakcije mikotoksina sterigmatocistina sa humanim serumskim albuminom i ciklodekstrinom Sugammadex metodom izotermalne titracijske kalorimetrije

Anastazija Kolić

SAŽETAK

Sterigmatocistin (STC) je kancerogeni mikotoksin (IARC 2B) čiji su najznačajniji proizvođači plijesni roda *Aspergillus* iz serije *Versicolores* koje su široko rasprostranjene u okolišu. Sugammadex je gama tip ciklodekstrina koji se primjenjuje za reverziju rokuronijem izazvane anestezije. S obzirom na strukturno konformacijsku podudarnost molekula STC i rokuronija, ovim radom se htjela provjeriti mogućnost korištenja Sugammadexa kod intoksikacije sa STC. U tu svrhu korištena je metoda izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC). Iz dobivenih termodinamičkih parametara proizlazi da između STC i HSA prevladavaju hidrofobne interakcije i vodikove veze. Ispitivanje je također pokazalo da se uklapanje STC toksina u hidrofobnu unutrašnjost Sugammadexa temelji na hidrofobnim interakcijama te konstanta disocijacije od $3,49 \times 10^{-6}$ dokazuje veći afinitet nego prema HSA. Proveden je i kompetitivni eksperiment kojim je potvrđena mogućnost Sugammadexa da istisne STC iz kompleksa s HSA zahvaljujući većem afinitetu vezanja STC za Sugammadex. Usporedbom s literaturnim podacima dobivenim istom metodom za rokuronij i Sugammadex, afinitet vezanja rokuronija za Sugammadex ($K_D = 1,79 \times 10^{-7}$ M) usporediv je sa afinitetom STC i Sugammadexa. Na temelju ovih rezultata, može se zaključiti da postoji mogućnost primjene Sugammadexa kao antidota kod intoksikacije mikotoksinom STC, a klinički značaj potrebno je dalje istražiti na odgovarajućim staničnim i/ili in vivo modelima.

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

Rad sadrži: 17 stranica, 5 grafičkih prikaza i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sterigmatocistin, humani serumski albumin, ciklodekstrin, izotermalna titracijska kalorimetrija, hidrofobne interakcije, intoksikacija, antidot, kompeticijsko vezanje

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

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

Dr. sc. Ana Karković Marković, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Hrvoje Rimac

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of microbiology Schrottova39, 10000Zagreb,
Croatia

Diploma thesis

Study of noncovalent interactions between mycotoxin sterigmatocystin, human serum albumin and cyclodextrin Bridion by isothermal titration calorimetry

Anastazija Kolić

SUMMARY

Sterigmatocystin (STC) is a carcinogenic mycotoxin (IARC 2B) produced mainly by molds from the series *Versicolores* of the genus *Aspergillus*, which are widely distributed in the environment. Sugammadex is a gamma-cyclodextrin derivative used for the reversal of rocuronium-induced anesthesia. Considering the structural-conformational similarity between the molecules of STC and rocuronium, this study aimed to investigate the possibility of using Sugammadex in STC intoxication. The isothermal titration calorimetry (ITC) method was employed for this purpose. The obtained thermodynamic parameters indicate that hydrophobic interactions and hydrogen bonds prevail between STC and HSA. The study also demonstrated that the incorporation of the mycotoxin STC into the hydrophobic cavity of Sugammadex is based on hydrophobic interactions, while the corresponding dissociation constant of 3.49×10^{-6} M suggests a higher affinity compared to HSA. A competitive experiment was conducted, confirming the ability of Sugammadex to displace STC from the complex with HSA due to a higher binding affinity of STC for Sugammadex. Comparison with literature data obtained using the same method for rocuronium and Sugammadex showed that the binding affinity of rocuronium for Sugammadex ($K_D = 1.79 \times 10^{-7}$ M) is comparable to the affinity of STC and Sugammadex. Based on these results, it can be concluded that Sugammadex has the potential to be used as an antidote in STC mycotoxin intoxication, but further investigation conducted on appropriate cellular and/or in vivo models is needed to elucidate the clinical significance of these results.

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

Thesis includes: 17 pages, 5 figures and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Sterigmatocystin, human serum albumin, cyclodextrin, isothermal titration calorimetry, hydrophobic interactions, intoxication, antidote, competitive binding

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

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Karković Marković, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, Ph.D

The thesis was accepted: June 2023.