

Genotoksični učinak aflatoksina B1, okratoksina A i sterigmatocistina na ljudske keratinocite

Mužinić, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:199771>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Vedran Mužinić

**Genotoksični učinak aflatoksina B₁, okratoksina
A i sterigmatocistina na ljudske keratinocite**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Primijenjena mikrobiologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu pri izradi ovoga rada, ali i na svojoj ostaloj pomoći što mi je pružila u posljednje tri godine na Zavodu za mikrobiologiju, uvodeći me u zanimljivo područje mikrobiologije.

Zahvaljujem dr.sc. Nevenki Kopjar na ukazanom povjerenju i ljubaznosti, bez koje realizacija ovog rada ne bi bila moguća.

Također zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za mikrobiologiju na svojoj ukazanoj pomoći i stvaranju ugodne radne atmosfere.

I na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KOŽA.....	1
1.2. MIKOTOKSINI.....	2
1.1.1. Aflatoksin B1.....	3
1.1.2. Oktratoksin A.....	7
1.1.3. Sterigmatocistin.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. MIKOTOKSINI.....	15
3.2. UZGOJ I TRETIRANJE STANICA.....	16
3.2.1. Uzgoj stanica.....	16
3.2.2. Tretiranje stanica mikotoksinima.....	16
3.3. IZVOĐENJE KOMET TESTA.....	17
3.3.1. Priprema otopina.....	17
3.3.2. Priprema stanica za elektroforezu.....	18
3.4. STATISTIČKA OBRADA.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
5. ZAKLJUČAK.....	33
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	40
7.1. SAŽETAK.....	40
7.2. SUMMARY.....	41

1. UVOD

1.1. KOŽA

Koža je najveći organ čovjeka, u prosjeku mase 4 kg i pokriva površinu između 1 i 2 m². Sastoji se od tri sloja: epidermisa, dermisa (kutisa) i subkutisa (potkožnog tkiva). Potkožno tkivo građeno je od masnih stanica i vezivnog tkiva sa pripadajućim krvnim žilama i živcima. Dermis je građen od kolagenskih, elastičnih i retikularnih vlakana koje koži daju čvrstoću i elastičnost. Ujedno sadrži krvne i limfne žile, živce, osjetna tjelešca, žlijezde te stalne i upalne stanice (Lipozenčić, 2008). Epidermis je građen od više slojeva orožnjelih stanica keratinocita, između kojih se u manjem broju pojavljuju druge stanice (melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice). Keratinociti nastaju diobom u najdubljem sloju epidermisa (stratum basale), te migriraju prema površini kože u procesu keratinizacije prolazeći kroz ostale slojeve mijenjajući oblik, gubeći unutarstanične organele i gomilajući keratohijalin, međuprodukt u sintezi keratina, sve dok u konačnom sloju (stratum corneum) ne postanu mrtve, metabolički neaktivne, orožnjele stanice bogate keratinom, bez jezgre. Takve mrtve stanice se neprestano troše sitnim ljuštenjem (Lipozenčić, 2008), pri čemu ih zamjenjuju nove stanice. U rožnatom sloju keratinociti su poslagani kao opeke jedan između drugoga povezani vezivom od sfingolipidnog matriksa. Budući da su dublji slojevi kože bogatiji vodom, lipofilnost postepeno pada kroz kožu. Takva promjena lipofilnosti predstavlja glavnu kemijsku barijeru protiv dehidracije i pretjeranog isparavanja vode iz kože i organizma, ali i barijeru koja otežava laku penetraciju stranim kemijskim tvarima i mikroorganizmima.

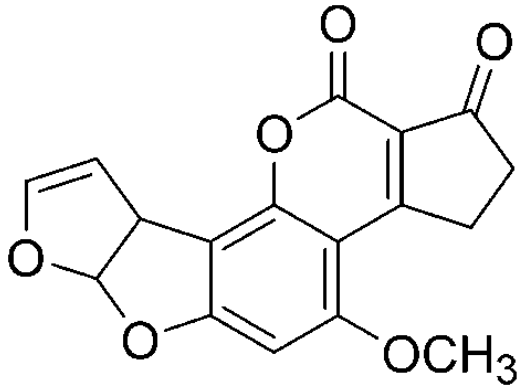
Međutim, usprkos lipofilnoj barijeri koža predstavlja vrlo značajno mjesto moguće apsorpcije. Štoviše, iako je poznato da su mikotoksini, toksični sekundarni metaboliti medicinski značajnih plijesni, male i lipofilne molekule koje bi lako mogle penetrirati kroz kožu, njihova moguća dermalna apsorpcija je vrlo malo istražena. Način prolaska mikotoksina kroz kožu ovisi o karakteristikama samog toksina poput molekularne mase i relativne topljivosti u ulju i vodi, te o svojstvima kože poput debljine rožnatog sloja, okolne vlage, stupnja hidracije kože, prisustva ozljeda ili bolesti, etničke pripadnosti, tjelesne temperature, i broja i aktivnosti imunih stanica.

Mikotoksini mogu prolaziti kroz kožu na tri načina; paracelularno (između keratinocita sfingolipidnim matriksom), transcelularno (izravno kroz keratinocite) i transfolikularno (kroz folikule dlaka). Nakon prodora kroz rožnati sloj, moguća je daljnja penetracija i apsorpcija preko krvnih i limfnih žila u sistemsku cirkulaciju, ali i akumulacija u epidermisu i dermisu, ovisno o lipofilnosti. Toksini se mogu vezati na makromolekule poput proteina i nukleinskih kiselina tijekom prolaza kroz stanice te tako ispoljiti cito- i imunotoksični učinak, ali i genotoksičnost koja se može u konačnici manifestirati kancerogeno. Zbog toga, kao i zbog mogućeg učinka na udaljene organe preko apsorpcije u sistemsku cirkulaciju, važno je istražiti genotoksične učinke mikotoksina na jezgre keratinocita.

1.2. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su toksični sekundarni produkti metabolizma plijesni. Otkriveni su sredinom 20. stoljeća nakon masovnog pomora purana u Engleskoj izolacijom aflatoksina iz krmiva kontaminiranim plijesni *Aspergillus flavus* (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 2005). Ubrzo su otkriveni i drugi mikotoksini poput okratoksina, versikolorina, trihotecena, sterigmatocistina, fumonizina i dr. U ljudski organizam najčešće dolaze preko hrane ili udisanjem te pokazuju različite štetne učinke poput hepato-, neuro-, nefro-, imuno-, cito- i genotoksičnosti, kao i kancerogenog djelovanja na npr. jetru, pluća i bubrege. Od važnosti u ovome radu biti će dva hepatotoksina aflatoksin B1 i sterigmatocistin, te nefrotoksin okratoksin A.

1.2.1. AFLATOKSIN B1



Aflatoksini su skupina mikotoksina koje produciraju plijesni *Aspergillus flavus*, *A. tamari*, *A. parasiticus*. Postoji u više podvrsta; AFB1, AFB2, AFBG1, AFBG2 itd., od kojih je aflatoksin B1 dokazano najpotentniji teratogen, mutagen, hepatotoksin i hepatokarcinogeni predstavnik; Međunarodna agencija za istraživanje raka ga je svrstala u 1. kategoriju karcinogenosti (IARC, 1993), a najveća dozovljena količina u EU kreće se između 4 µg/kg i 15 µg/kg, ovisno o proizvodu (IARC, 2002). Prema kemijskoj strukturi AFB1 je derivat furanokumarina, zbog čega se može detektirati pod UV svjetlom, gdje fluorescira plavo pa mu otuda naziv B1, za razliku od G derivata koji fluoresciraju zeleno (Fetaih i sur., 2014). Biosinteza mu počinje od poliketidnog prekursora zatvaranjem prstena i adicijom preko metabolita averantina, averufina, versikonal acetata, versikolorina A i sterigmatocistina (Steyn, 1980a).

Nakon ulaska u stanicu AFB1 se metabolizira preko citokrom-P450 enzima u endoplazmatskom retikulumu do aflatoksin-8,9-epoksida koji se kao aktivni metabolit veže na DNA stvarajući adukte (Lu i sur., 2013). Taj metabolit razgrađuje enzim glutation-S-transferaza (GST) (Ilić i sur., 2010). Toksikološka istraživanja rađena su na štakorima i miševima, pri čemu su štakori osjetljiviji na štetne učinke AFB1. Veća otpornost miševa proizlazi iz građe GST, odnosno iz visoke katalitičke aktivnosti A3 podjedinice; nakon ekscizije određenih egzona i stvaranja miševa bez ekspresije A3 podjedinice pokazano je povećanje toksičnosti AFB1 od oko 100 puta, međutim, bioaktivacija toksina je veća (Ilić i

sur., 2010). Zamijećen je i drugi metabolit, hidroksilirani aflatoksin M1, sa manjom cito- i genotoksičnošću (Green i sur., 1982), kao i aflatoksikol (Luthy i sur., 1980). Taj alkoholni derivat pokazuje kraće poluvrijeme života u plazmi i veću distribuciju po različitim tkivima, ali se u štakorskim hepatocitima može oksidirati ponovo u AFB₁, što dodatno povećava osjetljivost na toksin (Wong, 1979).

U svinja je glavni put izlučivanja feces, a samo manjim dijelom (20%) izlučuje se urinom, a poluvrijeme eliminacije metabolita vezanih za proteine plazme je oko 6 sati (Luthy i sur., 1980). Nasuprot tome, kod *Rhesus* majmuna izlučivanje je podjednako na oba načina, opet blago prevladavajući fecesom (Dalezios i Hsieh, 1974). Opseg, ali i količina izlučenih metabolita ovisna je o dozi; veća doza vodi većem i bržem izlučivanju (Dalezios i Hsieh, 1974).

Mehanizam djelovanja AFB₁ je formiranje DNA adukta vezanjem na N⁷ atom gvanina, vodeći do nastanka formamido-pirimidinskog prstena, najstabilnijeg DNA-adukta(*trans*-8,9-dihidro-8-(N⁷-gvanil)-9-hidroksi-AFB₁) (Guo i sur., 2006). Ovo omogućuje izravni mutageni učinak, ali i utjecaj na unutrastaničnu signalizaciju, posebno preko puta p53 proteina (Josse i sur., 2012). Taj signalni put u normalnom stanju zadržava stanicu u G2 fazi staničnog ciklusa kako bi se omogućilo više vremena za popravak oštećenja DNA prije ulaska u diobu. Pri izlaganju aflatoksinu B1 kontrola može izostati, što dovodi do prenošenja DNA oštećenja u daljnje diobe stanica. Pri izlaganju aflatoksinu B1 otkrivena je promjena u ekspresiji mnogo gena; FAS, LRDD, PPM1D i TP5313 su geni koji promoviraju apoptozu i prekomjerno su eksprimirani nakon izlaganja AFB₁, dok je smanjena ekspresija utvrđena za DDB2 i RRM2B(povezani sa popravkom oštećenja DNA), SESN1(povezan s regulacijom staničnog ciklusa), te ostale navodni i/ili potvrđene tumor supresore, poput BTG2, FHIT, GNMT, IQGAP2 i dr., (Josse i sur., 2012). Mutacija ovih gena omogućava nakupljanje oštećenja koje dovodi do karcinogeneze ili apoptoze. Osim gena povezanih sa staničnim ciklusom, primjećen je i porast ekspresije gena koji kodiraju enzime važne za detoksikaciju i upalni odgovor; aldehyd dehidrogenaza porodice 1, član A1 (ALDH1A1) djeluje antioksidativno, a Jam3 kodira adhezivnu molekulu C, koja regulira rani ulazak leukocita u upaljenu stanicu (Lu i sur., 2013). Genotoksičnost aflatoksina očituje se i na nivou kromosomskih oštećenja; u štakorima se pojavljuju smanjenja centromera, prekidi u kromatidama, fragmentacije kromosoma, delecije, dicentrični kromosomi, poliploidija i dr., pri čemu su češće strukturne od numeričkih anomalija (Fetaih i sur., 2014).

AFB1 uzrokuje oksidativni stres u stanici preko prekomjernog stvaranja reaktivnih oksidnih spojeva (vodikov peroksid, hidroksilni radikal, superoksidni anion) preko mitohondrijskog lanca transportera elektrona i oksidacije arahidonske kiseline iz stanične membrane (Mary i sur., 2012). Osim ROS-a, povećana je i permeabilnost membrane mitohondrija, te se pretpostavlja da porast ROS-ova uzrokuje poprečno povezivanje proteina membrane mitohondrija. Smanjenje membranskog potencijala i povećanje propusnosti membrane dovodi do otpuštanja citokroma c koji aktiviraju kaspazu i time apoptozu.

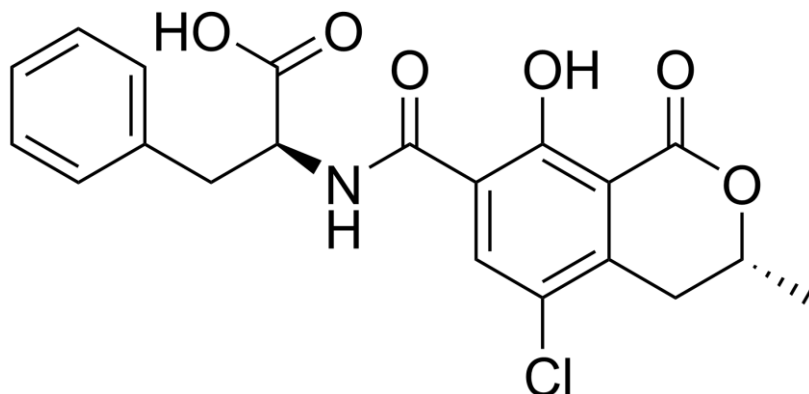
Ciljni organ aflatoksina B1 u čovjeka i životinja je jetra. Akutno izlaganje visokim dozama izaziva hepatotoksičnost karakteriziranu hepatocelularnom nekrozom, ozlijedom žučnog trakta i unutarnjim krvarenjem, dok je kronična izloženost jedan od glavnih faktora rizika u razvoju hepatocelularnog karcinoma (Lu i sur., 2013). Jetre štakora su uvećane mase (Corcuera i sur., 2012), a negdje je prisutno i začepljenje portalne vene (Towner i sur., 2000). Smrt štakora deficitarnih na vitamin A dodatno potvrđuje prooksidativno djelovanje AFB1, pri čemu je i raspodjela oštećenja drugačija, a ženke preživljavaju (Reddy i sur., 1973). Teratogeno djelovanje očituje se na mladim štakorima smanjenjem kalcifikacije kosti glave, smanjenjem veličine kralježaka, i nepotpunim okoštavanjem proksimalnih kosti udova (Fetaih i sur., 2014). Osim na jetru, AFB1 može u štakora djelovati i na bubrege uzrokujući intersticijsko krvarenje i nekrozu, u plućima dovesti do intersticijske pneumonije, te u crijevima blagi akutni enteritis (Fetaih i sur., 2014). Istraživanje genotoksičnog učinka (kometni test) pokazalo je povećanu razinu AFB1 u krvi pastrve nakon 4 h, no koncentracija AFB1 u jetri povećana je tek nakon 24 h, uz smanjenje razine u krvi, što upućuje na ireverzibilno tkivno vezanje i nakupljanje u hepatobilijarnom traktu (Abd-Allah i sur., 1999).

Kombinacije mikotoksina mogu imati aditivan, sinergistički, ili antagonistički učinak. Pri testiranju na MDBK stanicama kombinacija AFB1 i okratoksina A (OTA) pokazala je slabiji citotoksični učinak u odnosu na kombinaciju sa fumonizinom B (Clarke i sur., 2014), no na bubrežnim stanicama majmuna pokazano je aditivno djelovanje AFB1+OTA kombinacije, pri čemu AFB1 pojedinačno pokazuje jači genotoksični učinak u odnosu na OTA (Golli-Bennour i sur., 2010).

Dermalna apsorpcija i toksičnost su tek u zadnje vrijeme počeli dobivati na značaju, budući da je glavnina istraživanja bila usmjerena na izlaganje preko gastrointestinalnog i dišnog sustava, ali i koža predstavlja granicu organizma prema okolini i, prema tome, značajno mjesto za apsorpciju. U *in vitro* ispitivanjima na epidermalnoj i punoj debljini kože,

AFB1 pokazuje sporiju apsorpciju u odnosu na neke druge mikotoksine, odnosno, vrijeme zadržavanja (eng. lag phase) mu je veće nego kod drugih mikotoksina, no rane *in vivo* studije pokazuju proturječne rezultate; u nekoliko slučajeva dokazana je sistemska toksičnost u štakora nakon dermalne primjene, no predloženo je objašnjenje po kojem su ti učinci uzrokovani ingestijom kože tijekom češkanja, iz čega se zaključuje da je kod takvih studija važno spriječiti takvu pojavu (Kemppainen i sur., 1988). Također, korištenjem okluzivnog sredstva povećanja je perkutana apsorpcija AFB1 za 68 puta (Kemppainen i sur., 1988). Budući da su CYP450 enzimi prisutni i u ljudskoj koži, za očekivati je da AFB1 ispoljava lokalne toksične učinke; dokazano je transformirajuće djelovanje na ljudske fibroblaste (Kurian i sur., 1990). Prva studija o dermalnoj genotoksičnosti AFB1 pokazala je da AFB1 djeluje kao inicijator tumora pojavom karcinoma skvamoznih stanica u dozi od 80 nmol, no ne dovodi do pojave tumora kada se primjenjuje zasebno, niti kao promotor tumora (Rastogi i sur., 2006). Također je dokazana povećana aktivnost kožnog CYP1A2 enzima, te smanjena aktivnost GST u odnosu na jetru (Rastogi i sur., 2006). Korištenje alkoholnog ekstrakta listova biljke *Ocimum sanctum*, široko rasprostranjene u Indiji, dovelo je do smanjenja razine kutanog GGT-a i GST-P, enzima koji se smatraju markerima tumorske progresije, te je smanjilo kancerogeni učinak i antioksidativnim djelovanjem na slobodne radikale (Doi i Uetsuka, 2014). Ispitivanje dermalne apsorpcije i učinka AFB1 naročito je važno radi kozmetičkih proizvoda; u slučajno uzorkovanim kozmetičkim proizvodima pronađene su mjerljive količine AFB1 (El-Dessouki, 1992). Međutim, nema mnogo ispitivanja na kozmetičkim proizvodima.

1.2.2. OKRATOKSIN A



Okratoksin A(OTA) prvi puta je otkriven 1965. kao sekundarni metabolit *Aspergillus ochraceus*, a tvore ga i *Aspergillus* vrste iz sekcije *Nigri*, te *Penicillium verrucosum* (Šegvić Klarić i sur., 2010). Po kemijskoj strukturi OTA je 7-karboksi-5-klor-3,4-dihidro-3R-metil izokumarin. Za razliku od aflatoksina B1, ne postoje točno propisane granice dozvoljene kontaminacije u proizvodima za široku upotrebu. Sintetizira se adicijom fenilalanina na izokumarinsku kiselinu nastalu iz aktiviranog acetata biosintetskim putem šikiminske kiseline (Steyn, 1980b).

OTA se apsorbira pasivnom difuzijom iz proksimalnog jejunuma. Nakon apsorpcije se veže 99% na serumski albumin, što je djelom odgovorno i za dugo poluvrijeme života u plazmi, koje je ujedno najdulje kod čovjeka (35 dana) (Šegvić Klarić i sur., 2010). Oralno primjenjeni OTA je kraćeg poluvremena eliminacije u odnosu na intravensku primjenu, vjerojatno zbog prolaska kroz jetru i izlučivanja putem žuči (Ringot i sur., 2006). Među tkivima OTA se najviše nakuplja u bubrezima, potom u jetri, mišićnom i masnom tkivu (Harwing i sur., 1983). Dokazan je i prijenos preko placente; koncentracije u fetalnom serumu veće su dva puta od onih u majčinom serumu, što upućuje na aktivni transport (Zimmerli i Dick, 1995). OTA je kumulativan toksin sa brзом apsorpcijom i sporim izlučivanjem što pogoduje nakupljanju u organizmu. Izlučivanje je renalno i fekalno kod svih vrsta, a kod sisavaca je važno i izlučivanje u mlijeku (Ringot i sur., 2006). Zbog velikog vezanja za proteine plazme, OTA nije podložan glomerularnoj filtraciji, već tubularnoj sekreciji. Nakon sekrecije, OTA se reapsorbira duž cijele duljine nefrona, najviše u proksimalnom tubulu.

Reapsorpcija u ovom području je aktivnog mehanizma transporterima, dok se u distalnom tubulu i sabirnim kanalima odvija pasivna neionska difuzija (Dahlman i sur., 1998). Zbog pogodne molekulske mase moguće je i izlučivanje fecesom, u koje se ubrajaju spomenuto izlučivanje žuči i izlučivanje crijevima, koje ovisi o sadržaju himusa, i najveće je u nižim dijelovima crijeva (Kumagai i Aibara, 1982).

Glavna metabolička reakcija razgradnje je hidroliza OTA u okratoksin α , kidanjem fenilalanina. Glavnina reakcije odvija se u debelom crijevu uz pomoć anaerobnih mikroorganizama, iako su i enzimi gušterače poput (α -kimo)tripsina i karboksipeptidaze A sposobni za istu reakciju u *in vitro* uvjetima (Pitout, 1969). Male količine OTA se hidroksiliraju enzimima faze I u 4-OH OTA, u ljudi pretežno R epimer, a u svinjama S epimer (Stormer i sur., 1981). U ljudi je hidroksilirani OTA značajno manje toksičnosti, moguće zbog brze eliminacije. U *in vitro* studijama na ljudskim stanicama bronhalnog epitela otkriven je i 10-OH metabolit (Pinelli i sur., 1999).

Mehanizmi toksičnosti okratoksina A su raznovrsni: stvaranje DNA-adukata, inhibicija respiratornog lanca mitohondrija, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i utjecaj na signalne putove i apoptozu, ali i specifično vezanje i inhibicija fenilalanin hidroksilaze i fosfoenolpiruvat karboksikinaze (Ringot i sur., 2006). Struktura DNA adukata dugo vremena nije bila rasvjetljena, ali je sigurno da je stvaranje istih povezano sa oksidativnim stresom; fenolni radikal OTA u *in vitro* uvjetima može stvarati adukt C8-deoksigvanozin (Dai i sur., 2003). Pojava DNA-adukata međutim ovisi o tehnici označavanja; adukti su dokazani koristeći ^{32}P , no kod korištenja ubrzavanja masenim spektrometrom adukti nisu zamijećeni (Mally i sur., 2004). Prooksidativno djelovanje povezuje se sa nastankom OTA kinonskih derivata, koji su dokazani fotokemijski (Dai i sur., 2000), ali ne i u mikrosomima jetre i bubrega (Zepnik i sur., 2001). Retinol pokazuje protektivno djelovanje djelujući na metabolizam OTA, ali i moguće neutralizacijom slobodnih radikala (Kumari i Sinha, 1994). Vitamin C također može djelovati antioksidativno, reakcijom sa OTA metabolitima, te neutralizacijom slobodnih radikala (Bose i Sinha, 1994). Kao i AFB1, OTA može uzrokovati apoptozu i nekrozu stanica. Apoptoza se općenito smatra kompenzatornim mehanizmom povratka normalnog broja stanica i veličine organa nakon inicijalne hiperplazije. OTA djeluje na transkripciju gena za klusterin i aneksin V bitnih za apoptozu (Ringot i sur., 2006). U proksimalnim stanicama bubrega OTA aktivira c-Jun terminalnu kinazu (JNK), dok u jetri štakora aktivira p38 i ERK (Sauvant i sur., 2005). Za razliku od apoptoze, nekroza je neuređena i nekontrolirana smrt stanice, koja se ovisno o modelnom sustavu može dogoditi bez ili u prisutnosti apoptoze; u

jednom radu na proksimalnim tubularnim stanicama pri dvije primjenjene koncentracije OTA apoptoza nastupa u oba slučaja, dok se nekroza javlja samo pri većoj koncentraciji (Sauvant i sur., 2005). Apoptoza nastupa zastojećem staničnog ciklusa u S fazi, a primjećena je smanjena ekspresija ciklina A2 i E1, kao i CDK2 (Yang i sur., 2014). Oštećenja DNA mogu se pojaviti s prooksidativnim djelovanjem; mogućnost cinka da djeluje antioksidativno i smanjuje oštećenja DNA u jetrenim stanicama govori tome u prilog (Zheng i sur., 2013).

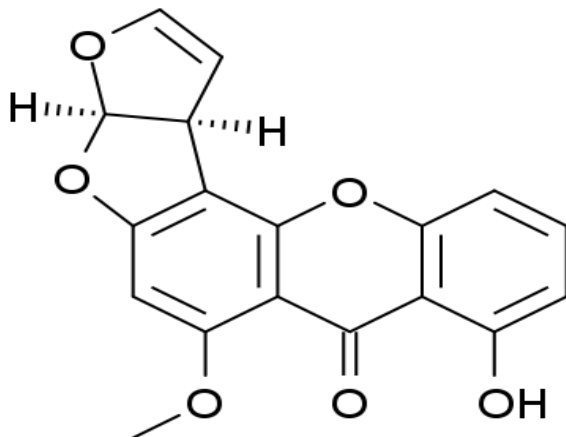
Glavni organ u kojem se ispoljavaju toksični učinci OTA jest bubreg. Uloga OTA u nastanku svinjske nefropatije dokazana je istraživanjima u Danskoj, Mađarskoj, Poljskoj i skandinavskim zemljama (Krogh i sur., 1973). U tim svinjama otkriveno je smanjenje organela, pogotovo peroksisoma uz nestanak integriteta membrane i curenja sadržaja u citosol (Elling i sur., 1985), kondenzacija kromatina i nestanak jezgrine ovojnice (Stoev i sur., 1998). U kasnijoj fazi oboljenja pojavljuje se zadebljanje bazalne mebrane proksimalnog tubula i fibroza tubularnog intersticija (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Vjerojatno najpoznatiji slučaj ljudskog otrovanja jest fenomen balkanske endemske nefropatije, progresivnog kroničnog bubrežnog zatajenja zabilježenog na seoskim područjima bivše Jugoslavije, Bugarske i Rumunjske od sredine prošlog stoljeća. Degenerativne promjene tubularnih epitelnih stanica u ranijoj fazi prate difuzna fibroza intersticija, smanjena masa bubrega, te hijalinizacija glomerula uz česte glavobolje, anemiju, žeđ, osjećaj gorčine u ustima, uz izostanak znakova akutne i kronične upale, hipertenzije, nefrotskog sindroma i edema (Vukelić i sur., 1992; Plestina i sur., 1991). Nefropatija je ponegdje povezana i sa pojavom tumora urinarnog trakta (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007).

Osnova imunotoksičnosti je inhibicija proliferacije B i T limfocita, inhibicija izlučivanja IL-2 (Lea i sur., 1989), te inhibicija aktivnosti NK stanica (Luster i sur., 1987). U eksperimentu na svinjama koje su konzumirale hranu kontaminiranu OTA u konc. 1-3 ppm dokazana je povećana osjetljivost na bakterijsku vrstu *Salmonella choleraesuis* izolacijom iz fecesa. Ponovnom primjenom pljesnive hrane nakon imunizacije svinja dogodio se hemoragijski proljev, što osim imunosupresivnog učinka dokazuje i zakašnjelu imunizaciju (Stoev i sur., 2000). Teratogenost je dokazana osim na ljudima i na miševima (Hayes i sur., 1974), štakorima (Brown i sur., 1976), zečevima (Wangikar i sur., 2004), hrčcima (Hood i sur., 1976) i kokošima (Gilani i sur., 1978). U gravidnim ženka Wistar štakora dokazan je hidrocefalus, mikroftalmija, povećanje zdjelice i renalna hipoplazija (Patil i sur., 2006). Mužjacisu osjetljiviji na takav učinak nego ženke, moguće zbog razlike u kapacitetu

biotransformacije. Osim toga, moguće mete karcinogenog djelovanja OTA su testisi i mliječne žlijezde (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007).

Podataka o topikalnoj penetraciji okratoksina A nema u obimu kao za AFB1, ali smatra se da je penetracija moguća zbog veće vrijednosti koeficijenta razdijeljenja, odnosno veće topljivosti okratoksina A u mastima. Tumorigeno kutano djelovanje prvi je puta dokazano na miševima kometnim testom; povećana je razina γ -H2AX markera oštećenja DNA, a smanjena razina nuklearnog faktora eritroidnog receptora 2(Nrf2), glavnog regulatora razine ROS-ova u stanici, što upućuje na nastanak oksidativnog stresa (Doi i Uetsuka, 2014). U dozi raspona 20-80 μ g OTA izravno aktivira ERK1/2 signalni put, te potom neizravno, preko ROS-ova, p38 i JNK (Doi i Uetsuka, 2014). OTA djeluje kao inicijator, ali i promotor kožnih tumora; inicijatorsko djelovanje događa se preko oksidativnog stresa i aktivacije MAPK signalnog puta i oštećenja DNA, dok je promotorsko djelovanje povezano s EGFR i aktivacijom MAPK signalnog puta i Akt signalnim putem, te transkripcijskim faktorima Nf- κ B i AP-1, a ciljni geni njihova djelovanja su ciklin D1 i COX-2 (ciklooksigenaza 2) (Doi i Uetsuka, 2014).

1.2.3. STERIGMATOCISTIN



Sterigmatocistin je poliketidni mikotoksin kojeg produciraju aspergile iz sekcija *Versicolores* i *Nidulantes* te neke vrste iz roda *Chaetomium* (Veršilovskis i Saeger, 2010). Često kontaminira žitarice, kukuruz, kruh i sir. Maksimalna dozvoljena količina u hrani je zakonski ograničena jedino u Češkoj i Slovačkoj (5 µg/kg u riži, povrću, brašnu, mesu i mlijeku, te 20 µg/kg u ostalim namirnicama) (Veršilovskis i Saeger, 2010). Sterigmatocistin je ujedno jedan od intermedijera u biosintezi aflatoksina B1 pa nastaje istim biosintetskim putem (Steyn, 1980a).

Podataka o farmakokinetici sterigmatocistina nema mnogo: u studiji na majmunima otkrivena je apsorpcija malog obima zbog slabe hidrofilnosti STC i izlučivanje oko 70% doze nepromijenjeno fecesom, te izlučivanje više od 50% apsorbirane frakcije urinom u obliku glukuronida, a manji dio (15% apsorbirane frakcije) izlučuje se kroz žuč, također kao glukuronidski konjugat (Steyn i Thiel, 1976). Dokazano je da je sposoban vezati se za albumin (Kononenko i sur., 2003).

Za biološku aktivnost sterigmatocistina važna je nezasićena veza između položaja 2 i 3 u bisdihydrofuranskom prstenu, jer se ona posredovanjem enzima citokrom P450 oksidira u epoksid koji se potom veže na makromolekule poput DNA (Terao, 1983). Glavni izolirani adukt je 2,3-dihidro-2-(N7-gvanil)-3-hidroksisterigmatocistin.

Citotoksični učinak STC je dokazan smanjenom ugradnjom 3H-uridina u RNA, te dodatno potvrđen mikroskopskim promjenama u građi jezgrice (Terao, 1983). U *in vitro* uvjetima sterigmatocistin pokazuje jednaku toksičnost i kancerogeni učinak na ciljane stanice

jetre kao i aflatoksin B1, no u in vivo studijama isti takvi učinci su puno slabije izraženi nego za AFB1; 500 µg STC ima učinak ekvivalentan kao 4 µg AFB1 na indukciju hiperplazije žučovoda (Lillehoj i Ciegler, 1967), a u pilećim embrijima LD50 vrijednost iznosi 14,9 µg, što je oko sedamnaest puta veće od iste vrijednosti za AFB1 (Terao, 1983). Ovakvi rezultati tumače se slabom topljivošću STC-a u vodi te posljedično nedovoljno velikom mogućnosti apsorpcije iz digestivnog trakta. Nakon intraperitonealne primjene primjećen je akutni peritonitis, što ukazuje da je STC sposoban štetno djelovati na mjestu primjene. Također, histološki nalazi su bili drugačiji ovisno o mjestu primjene; oralna primjena rezultirala je centrilobularnom nekrozom, a intraperitonealna periportalnom nekrozom jetrenog tkiva (Terao, 1983).

STC posjeduje hepatokancerogeno djelovanje u dozama već od 10 ppm. Mikroskopski izgled uzrokovanih lezija bio je sličan izgledu lezija uzrokovanih drugim uobičajenim kancerogenim kemikalijama. Kancerogeni učinak ovisan je o dozi; povećanje doze povećava incidenciju i skraćuje duljinu trajanja procesa karcinogeneze. STC djeluje sinergistički kancerogeno sa nitrozodimetilaminom, što mu povećava značaj obzirom na sveprisutnost nitrozo spojeva. Kod većine ispitivanih životinja zaključeno je da su mlađi mužjaci osjetljiviji na kancerogenost, međutim iznimka je primjećena kod ribe medake (*Oryzias latipes*). Osim jetre, STC može djelovati i na bubrege; u štakora koji su primali 10-100 mg/kg primijećeno je kortikalno krvarenje te izrazita glomerularna i tubularna nekroza u kortikalnom sloju. U miševa STC djeluje i na pluća uzrokujući adenome, te na masno tkivo uzrokujući angiosarkome. STC je sposoban izazvati mezoteliom u Wistar štakorima; na preživjelim štakorima primjećeni su difuzni papilomatozni sivkastobijeli i ružičasti tumori. Općenito se iz istraživanja indukcije tumora na mjestima primjene zaključuje da je STC sam po sebi već kancerogen, ali je za indukciju tumora u udaljenim organima važna metabolička aktivacija (Terao, 1983).

Dokazano je kancerogeno djelovanje nakon topikalne primjene u štakora. STC je primjenjen otopljen u acetonu i dimetilsulfoksidu. Kao i kod AFB1 prisutna je lag faza koja je ovdje trajala 39 tjedana, nakon čega je uslijedila pojava papiloma, karcinoma skvamoznih stanica, te karcinoma bazalnih stanica. U velikom postotku tretiranih štakora primjećene su i jetrene lezije (Terao, 1983). Ovakvi rezultati ukazuju na potencijalni kancerogeni učinak STC-a pri topikalnoj primjeni u ljudi, čime bi dodatno mogla pridonijeti njegova lipofilnost i netopljivost u vodi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ljudska koža je najveći organ ljudskog tijela te predstavlja barijeru prodoru vanjskih kemijskih tvari i patogena, ali i barijeru prekomjernom gubitku vlage. Kao takva je i najizloženija utjecajima okoline, a osim barijerne, posjeduje i osjetilnu, termoregulacijsku, ali i vrlo važnu psihološku ulogu.

Mikotoksini su vrlo potente toksične tvari prirodnog podrijetla odgovorne za brojne opisane i neopisane slučajeve trovanja (mikotoksikoze), a kroničnim unosom mnogi od njih predstavljaju rizik od nastanka karcinoma u različitim organima. Većina slučajeva akutnog i kroničnog trovanja uzrokovani su konzumacijom pljesnive hrane unosom kroz gastrointestinalni sustav, ali i udisanjem (inhalacijom) spora plijesni producenata. Unos mikotoksina inhalacijom predstavlja značajnu opasnost za zdravlje kod profesionalne izloženosti (životinjske farme, silosi žitarica, mlinovi, drvna industrija) te u vlažnim stambenim prostorima gdje su ljudi dugotrajno izloženi većim koncentracijama aerogenih čestica plijesni, a zbog brže apsorpcije toksina u dišnom sustavu njihova toksičnost može biti i do 10 puta veća (Straumfors Halstensen i sur., 2004) nego kod unosa ingestijom.

O unosu mikotoksina preko kože kao i njihovom dermatoksičnom potencijalu vrlo se malo zna. Opasnost za zdravlje može se pojaviti kod profesionalne izloženosti te zbog kontaminacije sirovina za proizvodnju preparata za primjenu na kožu. Topikalna izloženost, kao i toksični učinci i mehanizmi djelovanja, iako prisutni u manjem obimu, vrlo su važni za procjenu zdravstvenog rizika pri korištenju potencijalno kontaminiranih topikalnih ljekovitih pripravaka, ali i u današnje vrijeme sve prisutnijih kozmetičkih preparata sa prirodnim sastojcima. Također, u prirodi mikotoksini vrlo često dolaze u smjesama, što može potencirati štetne učinke.

Sposobnost mikotoksina da induciraju fragmentaciju DNA i uzrokuju kromosomalne anomalije smatra se osnovom njihovom njihovog mutagenog, kancerogenog i citotoksičnog djelovanja. U ovom radu izabrana su tri mikotoksina: aflatoksin B₁(AFB₁) i sterigmatocistin (STC) zbog svojeg dokazanog kancerogenog učinka, te okratoksin A(OTA) zbog svoje visoke topljivosti u mastima. U prethodno provedenom ispitivanju citotoksičnog učinka AFB₁, STC i OTA na HaCaT stanicama pokazano je da najveći citotoksični potencijal ima STC (IC₅₀ = 44,4 μM). Okratoksin A je dvostruko manje citotoksičan (IC₅₀ = 98,5 μM), dok AFB₁ u

koncentracijama od 30 do 150 μM smanjuje vijabilnost stanica za 30 do 40% (neobjavljeni podaci). Uzimajući u obzir rezultate testa citotoksičnosti odabrane su subcitotoksične koncentracije mikotoksina koje su korištene u ispitivanju njihovog genotoksičnog djelovanja na HaCaT stanicama.

Specifični ciljevi rada su:

- odrediti genotoksični učinak aflatoksina B1, okratoksina A i sterigmatocistina primjenjenih pojedinačno u koncentracijama od 1 μM i 10 μM na humane keratinocite (HaCaT stanice) korištenjem alkalnog komet testa
- odrediti genotoksični učinak binarnih kombinacija mikotoksina (AFB1 i OTA, AFB1 i STC te OTA i STC) primjenjenih u svim kombinacijama obaju navedenih koncentracija (1 μM i 10 μM) na humane keratinocite (HaCaT) stanice korištenjem alkalnog komet testa

3.MATERIJALI I METODE

3.1. MIKOTOKSINI

Početna otopina aflatoksina B1 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) je dobivena otapanjem u smjesi otapala 80% DMSO/etanol ($\gamma = 3,12 \text{ mg mL}^{-1}$). Sterigmatocistin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) je otapan u DMSO ($\gamma = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$), a okratoksin A (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) u apsolutnom etanolu ($\gamma = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Koncentracije ispitivanih otopina prikazane u tablici (Tablica 1) dobivene su razrjeđivanjem početnih otopina mikotoksina medijem za uzgoj stanica. Kontrolna otopina je sadržavala 0,2% DMSO i 0,18% etanola u staničnom mediju.

Tablica 1. Prikaz koncentracija mikotoksina kojima su tretirane HaCaT stanice. AFB1 = aflatoksin B1, OTA = okratoksin A, STC = sterigmatocistin.

AFB1	OTA	STC	AFB1 + OTA	AFB1 + STC	OTA + STC
1 μM	1 μM	1 μM	1 μM + 1 μM	1 μM + 1 μM	1 μM + 1 μM
10 μM	10 μM	10 μM	1 μM + 10 μM	1 μM + 10 μM	1 μM + 10 μM
			10 μM + 1 μM	10 μM + 1 μM	10 μM + 1 μM
			10 μM + 10 μM	10 μM + 10 μM	10 μM + 10 μM

3.2. UZGOJ I TRETIRANJE STANICA

Postupak uzgoja i tretiranja stanica izvodio se u sterilnim uvjetima, uz pomoć sterilne aparature unutar uređaja sa laminarnim strujanjem zraka (engl. *laminar flow hood*).

3.2.1. Uzgoj stanica

U ovom ispitivanju korištena je spontano transformirana aneuploidna stanična linija besmrtnih keratinocita HaCaT izoliranih iz kože odraslog čovjeka. Njihova je prednost da dobro odražavaju svojstva ljudskih keratinocita uz visoku sposobnost diferencijacije i proliferacije *in vitro* uvjetima.

Stanice su uzgajane u Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (1:1) (Gibco, Invitrogen, Paisley) mediju koji ne sadrži L-glutamin, natrijev hidrogenkarbonat i fenolno crvenilo. Medij je prije kultivacije stanicama obogaćen L-glutaminom (Gibco, Invitrogen, Waltham) do koncentracije 4 mmol L⁻¹, te toplinom inaktiviranim fetalnim telećim serumom (Gibco, Invitrogen, Paisley) do masenog udjela od 10 %. Kako bi se spriječila kontaminacija bakterijama dodani su i antibiotici penicilin ($c = 100$ IU mL⁻¹) i streptomycin ($\gamma = 100$ μ g mL⁻¹) (Gibco, Invitrogen, Paisley).

Stanice su uzgojene plastičnoj boci (7,5 cm²) za adhezivni uzgoj staničnih linija (TPP, Trasadingen) u pripremljenom mediju u inkubatoru pod uvjetima konstante temperature (37 °C), relativne vlažnosti (80 %) i udjela ugljikovog dioksida (5 %).

3.2.2. Tretiranje stanica mikotoksinima

Stanice su odvojene od podloge tripsinom (Gibco, Invitrogen, Paisley) te je po 1,5 mL suspenzije stanica u DMEM-u, u koncentraciji $1,5 \times 10^5$ stanica mL⁻¹ presađeno u pločice s 12 rupica (TPP, Trasadingen). Nakon 24-satne inkubacije stanice su tretirane AFB1, OTA i STC, pojedinačno ili u kombinaciji prema koncentracijama navedenima u tablici (Tablica 1.) u periodu kroz 24 sata. Nakon isteka vremena, stanice su tripsinizirane (150 μ L tripsina), resuspendirane dodatkom 150 μ L kompletnog staničnog medija te centrifugirane na 1000 rpm/2 min. Supernatant je uklonjen, a talogu je dodano 100 μ L kompletnog staničnog medija. Ovako priređeni uzorci podvrgnuti su kometnom testu.

3.3. IZVOĐENJE KOMET TESTA

3.3.1. Priprema otopina

Fosfatni pufer (PBS) sastoji se od 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ i 0,2 g KH₂PO₄ otopljenih u 800 mL redestilirane vode (pH 7,4).

NMP 1% otopina priprema se otapanjem 0,1 g agaroze NMP (normal melting point) u 10 mL destilirane vode zagrijavanjem do potpunog otapanja u mikrovalnoj pećnici. LMP 0,5% otopina (LMP-low melting point) pripremi se otapanjem 0,05 g LMP agaroze u 10 mL PBS bez kalcija i magnezija.

Pri izradi pufera za liziranje prvo se priredi matična otopina otapanjem 146,4 g NaCl ($c = 2,5 \text{ M}$), 37,2 g Na₂EDTA ($c = 100 \text{ mM}$) i 1,2 g Tris pufera ($c = 10 \text{ mM}$). Matičnoj otopini za liziranje se namjesti pH na 10 sa otopinom NaOH ($c = 1 \text{ M}$) na sobnoj temperaturi te doda 10 g natrij-laurilsarkozina i nadomjesti s redestiliranom vodom do 890 mL. Za neposrednu upotrebu načini se svježa otopina tako da se pomiješa 89 mL matične otopine s 1 mL Triton X-100 ($w/w = 1\%$) i 10 mL DMSO ($w/w = 10\%$). Svježa radna otopina čuva se na +4°C do upotrebe.

Pufer za denaturaciju izrađuje se miješanjem 30 mL matične otopine NaOH ($c = 1 \text{ M}$, $\gamma = 400 \text{ g L}^{-1}$) s 5 mL otopine Na₂EDTA ($c = 200 \text{ mM}$, $\gamma = 37,5 \text{ g L}^{-1}$) u 965 mL redestilirane vode. Konačni pH otopine je 13.

Pufer za neutralizaciju (Tris) izrađuje se otapanjem Tris-a ($\gamma = 60,63 \text{ g L}^{-1}$, $c = 0,4 \text{ M}$) u 800 mL redestilirane vode te se nadomjesti pH na 7,5 s koncentriranom HCl ($c > 10 \text{ M}$) i nadopuni se do 1 L.

Pri izradi otopine etidij-bromida za bojanje prvo se priredi matična otopina otapanjem 20 mg etidij-bromida u 100 mL redestilirane vode ($\gamma = 200 \text{ g L}^{-1}$). Otopina se čuva na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Zatim se izrađuje radna otopina miješanjem 1 mL matične otopine i 9 mL redestilirane vode ($\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$).

3.3.2. Priprema stanica za elektroforezu

Na predmetno stakalce Pasteurovom pipetom nakapa se svježe pripremljena otopina 1%-tne NMP agaroze. Nakon polimerizacije agaroze, 24h na sobnoj temperaturi, stakalca se pospreme na suho i mogu se koristiti dulje vrijeme. 2. Priredi se otopina 0,5%-tne LMP agaroze prema gore opisanom postupku (dio 3.3.1).

Pomiješa se 20 μL (zbog rada u duplikatu za svaki uzorak) suspenzije stanica dobivene opisanim postupkom (dio 3.2.2.) i 80 μL 0,5 %-tne otopine LMP agaroze.

Na pripremljena stakalca nanosi se 100 μL prethodno priređene smjese koja se polimerizira 10 min na ledu.

Liza staničnih struktura

Nakon polimerizacije na ledu skinu se pokrovnice te se preparati potom drže u puferu za lizu napravljenom neposredno prije upotrebe, 24 h na $+4^{\circ}\text{C}$, zaštićeni od svjetla (zbog osjetljivosti tehnike) u uspravnom košiću.

Denaturacija

Preparati se prebace u svježe napravljeni pufer za denaturaciju, na 20 minuta, zaštićen od svjetla, na $+4^{\circ}\text{C}$ u uspravnom košiću.

Elektroforeza

Ostatak neiskorištenog pufera za denaturaciju $\text{pH} = 13$ stavi se u kadicu za horizontalnu elektroforezu. Elektroforeza se provodi pri jakosti struje od 300 mA, pri naponu 25V, 20 minuta.

Neutralizacija

Nakon elektroforeze, preparati se ispiru tri puta po 5 minuta u Tris-u pH 7,4. Stakalca se potom stavljaju u vlažnu komoru (posudica s poklopcem i mokrom staničevinom na dnu) u mrak na +4°C do bojanja.

Bojenje preparata

Nakon ispiranja, preparati se boje sa 100-250 µL radne otopine etidij-bromida 10 minuta, s pokrovnicom. Po potrebi, kratko još jednom isprati s Tris-om, vratiti pokrovnicu i radi stabilizacije boje držati preparate u mraku, u vlažnoj komori (zatvorena posudica s mokrom staničevinom na dnu) 10-ak minuta.

Mikroskopska analiza

Analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom od 515-560 nm. Mjerenja duljine repa, repnog intenziteta i repnog momenta provedena su pomoću programa za analizu slike *Comet Assay IV*, proizvođača *Perceptive Instruments Ltd.* Za svaki uzorak izmjereno je 200 kometa. Duljina repa mjerena je od središta jezgre, a izmjerene vrijednosti izražene su u mikrometrima. Repni intenzitet izražava se kao postotak DNA u repu, a repni moment izračunat je primjenom računalnog programa za analizu slike.

3.4. STATISTIČKA OBRADA

Rezultati dobiveni komet testom (duljina repa, repni intenzitet i repni moment) izražene su kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, standardnom pogreškom aritmetičke sredine, minimumom, 25%-tnim i 75%-tnim percentilom, medijanom i maksimumom. Testiranje značajnosti promjena repnog intenziteta u pokusnim skupinama u odnosu na kontrolu te promjenama izazvanih djelovanjem pojedinačnih toksina u odnosu na njihove kombinacije, provedeno je Kruskal-Wallis testom i Dunn-post testom multiple komparacije na razini značajnosti $P < 0,05$.

Odnos očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti i njihovih standardnih pogrešaka za kombinacije mikotoksina testiran je t-testom kako bi se utvrdilo djeluju li kombinacije mikotoksina aditivno, sinergistički ili antagonistički. Izračun je proveden prema formulama:

$$X_{(\text{očekivana za kombinaciju toksina})} = X_{(\text{izmjerena za prvi toksin})} + X_{(\text{izmjerena za drugi toksin})} - X_{(\text{kontrola})}$$

$$SEM_{(\text{očekivana za kombinaciju toksina})} = [(SEM)_{(\text{izmjerena za prvi toksin})}^2 + (SEM)_{(\text{izmjerena za drugi toksin})}^2]^{0,5}$$

Vrijednost t izračunata je prema slijedećoj formuli:

$$t = \frac{X_{\text{očekivana}} - X_{\text{izmjerena}}}{\sqrt{(SEM)_{\text{očekivana}}^2 + (SEM)_{\text{izmjerena}}^2}}$$

Dobivena vrijednost t uspoređuje se s brojem iz tablice(1,97). Ako je t veći od 1,97, onda je $X_{(\text{očekivana})}$ statistički značajno različita od $X_{(\text{izmjerena})}$.

Rezultati se interpretiraju na slijedeći način:

$X_{(\text{izmjerena})}$ i $X_{(\text{očekivana})}$ bez statistički značajne razlike ($P > 0,05$) = Aditivno međudjelovanje

$X_{(\text{izmjerena})}$ statistički značajno veća od $X_{(\text{očekivana})}$ ($P < 0,05$) = Sinergizam

$X_{(\text{izmjerena})}$ statistički značajno manja od $X_{(\text{očekivana})}$ ($P < 0,05$) = Antagonizam

4.REZULTATI I RASPRAVA

U tablici 2. prikazane su duljine repa kometa nakon tretiranja mikotoksinima i elektroforeze HaCaT stanica, a u tablici 3. prikazani su rezultati statističke obrade Dunnovim post-testom multiple komparacije sa pripadajućim P vrijednostima. U tablici 4. i 5. prikazane su vrijednost repnog intenziteta uz statističku obradu a u tablici 6. i 7. vrijednosti repnog momenta i statistička obrada. U svakoj od navedenih tablica prikazana je i vrijednost istih veličina za kontrolne stanice (tretirane sa EtOH i DMSO). Pokusne stanice bile su tretirane pojedinačno i u kombinacijama mikotoksina; AFB1 1 μ M, AFB1 10 μ M, OTA 1 μ M, OTA 10 μ M, STC 1 μ M, STC 10 μ M, AFB1 + OTA (1+1 μ M), AFB1 + OTA (1+10 μ M), AFB1 + OTA (10+1 μ M), AFB1 + OTA (10+10 μ M), AFB1 + STC (1+1 μ M), AFB1 + STC (1+10 μ M), AFB1 + STC (10+1 μ M), AFB1 + STC (10+10 μ M), OTA + STC (1+1 μ M), OTA + STC (1+10 μ M), OTA + STC (10+1 μ M) i OTA + STC (10+10 μ M).

Za interpretaciju rezultata koristi se repni intenzitet jer je ta veličina povezana sa postotkom fragmentirane DNA koja zaostaje u repovima kometa u odnosu na nefragmentiranu DNA koja ostaje u središtu kometa. Stoga se u tablici 3. nalaze i oznake statističke značajnosti pojedinačno tretiranih stanica u odnosu na kontrolu, te stanica tretiranih kombinacijama mikotoksina u odnosu na stanice tretirane pojedinačnim mikotoksinima u istim koncentracijama. Iste oznake se nalaze i u tablici 5. i 7. za repnu duljinu odnosno repni moment.

Svi mikotoksini primjenjeni pojedinačno i u kombinacijama su postigli značajan genotoksični učinak u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Najmanje povećanje repnog intenziteta je postigao AFB1 u koncentraciji od 1 μ M, a najveće STCu koncentraciji od 10 μ M. Kod primjene kombinacija toksina najmanje povećanje postignuto je kod primjene kombinacije OTA i STC (1+10 μ M), a najveće povećanje je postigla kombinacija AFB1 i STC (1 μ M +10 μ M).

Kombinacija AFB1 + OTA (1+10 μ M) ostvarila je značajno povećanje repnog intenziteta (3,92 %) u odnosu na pojedinačnu primjenu AFB1 u koncentraciji od 1 μ M (1,68 %). Kombinacije AFB1 + OTA (10+1 μ M) i AFB1 + OTA (10+10 μ M) su povećale repni intenzitet (4,27 %, odnosno 4,57 %) u odnosu na AFB1 primjenjen u koncentraciji od 10 μ M (2,48 %). Međutim, kombinacija AFB1+OTA (1+1 μ M) ne razlikuje se značajno od pojedinačno primjenjenog AFB1 u koncentraciji od 1 μ M. Ta kombinacija povećala je repni

intenzitet u odnosu na pojedinačno primjenjeni OTA u koncentraciji od 1 μM (3,22 % naprama 2,19 %). Kombinacija AFB1 + OTA (10+1 μM) povećala je repni intenzitet u odnosu na OTA u koncentraciji od 1 μM . Kombinacije sa OTA u većoj koncentraciji, (1+10 μM), odnosno (10+10 μM), povećanog su intenziteta u odnosu na pojedinačni OTA u koncentraciji od 10 μM (2,47 %). Odnos očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti repnog intenziteta sa pripadajućim standardnim pogreškama prikazan je Grafom 1. Budući da ni u jednoj od svih četiriju kombinacija toksina razlika između očekivanih i izmjerenih vrijednosti nije značajna ($t < 1,97$), zaključuje se da ova dva toksina u svim ispitivanim kombinacijama djeluju aditivno.

AFB1 i STC u kombinacijama AFB1 + STC (1+1 μM) i AFB1 + STC (1+10 μM) (3,79 %, odnosno 5,76 %) postižu povećanje repnog intenziteta u odnosu na AFB1 1 μM (1,68 %). Povećanje je i u odnosu na AFB1 10 μM (2,48 %) za kombinacije AFB1 + STC (10+1 μM) (4,33 %) i AFB1 + STC (10+10 μM) (4,05 %). Kombinacija AFB1 + STC (1+1 μM) (2,75 %) povećala je repni intenzitet u odnosu na STC 1 μM , kao i kombinacija AFB1 + STC (10+1 μM) (4,33 %). Kombinacija AFB1 + STC (1+10 μM) je povećala repni intenzitet u odnosu na STC 10 μM (4,74 %), dok se kombinacija AFB1 + STC (10+10 μM) ne razlikuje značajno u odnosu na pojedinačno primjenjeni STC 10 μM . U Grafu 2. prikazani su odnosi očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti repnog intenziteta sa pripadajućim standardnim pogreškama. Kod kombinacija u kojima je AFB1 prisutan u nižoj koncentraciji ((1+1 μM) i (1+10 μM)) opaža se aditivno djelovanje ($t < 1,97$), dok kod drugih dvaju kombinacija, AFB1 + STC (10+1 μM) i AFB1 + STC (10+10 μM) opaža se antagonizam ($t > 1,97$; Xoč.>>Xizmj.).

Kombinacija OTA + STC (1+1 μM) povećala je repni intenzitet (2,49 %) u odnosu na OTA 1 μM (2,19 %), no kombinacija OTA + STC (1+10 μM) ne razlikuje se značajno u odnosu na OTA 1 μM . Kombinacije OTA +STC (10+1 μM) i OTA + STC (10+10 μM) povećale su repni intenzitet(3,50 %, odnosno 2,73 %) u odnosu na OTA 10 μM (2,47 %). Kombinacija OTA + STC (1+1 μM) ne postiže značajan učinak na repni intenzitet u odnosu na STC 1 μM , dok kombinacija OTA + STC (10+1 μM) povećava repni intenzitet u odnosu na STC 1 μM (2,75 %). Kombinacije OTA + STC (1+10 μM) i OTA + STC (10+10 μM) ne razlikuju se značajno po repnom intenzitetu od STC 10 μM . Graf 3. prikazuje odnose očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti i standardnih pogrešaka za sve kombinacije OTA + STC. Kod svih kombinacija zapaža se antagonizam ($t > 1,97$; Xoč.>>Xizmj.).

Dobiveni rezultati potvrđuju genotoksično djelovanje svih toksina, primjenjenih pojedinačno i u kombinacijama. AFB1 postigao je značajno povećanje repnog intenziteta što upućuje na mogućnost uzrokovanja prekida u jednoj ili obadvije vrpce DNA. Vrijednosti repnog intenziteta niže su u odnosu na one postignute u A549 stanicama humanog adenokarcinoma pluća (Jakšić i sur., 2012), kao i u hepatocitima (Ghaderi i sur., 2011). Budući da se povećana osjetljivost hepatocita diferenciranih iz matičnih stanica krvi pupkovine u odnosu na matične stanice iz istog izvora, kao i CD34⁺ pozitivne matične stanice, tumači razlikama u ekspresiji CYP450 enzima, napose CYP3A4 (Ghaderi i sur., 2011), to bi razlike u ekspresiji CYP450 enzima mogle poslužiti kao objašnjenje razlike u učinku na HaCaT stanice u odnosu na ostale vrste stanica. Metabolička aktivacija preko CYP450 enzimskog sustava, kao i stvaranje DNA adukata, su višestruko i nesumnjivo potvrđeni kao mehanizam genotoksičnog djelovanja AFB1. U in vivo uvjetima pokazane su drukčije vrijednosti (Madhusudhanan i sur., 2006; Slizewska i sur., 2010). Takav rezultat je moguće očekivati ponajprije zbog nepostojanja tkivne interakcije pri ispitivanju na pojedinačnim stanicama, a potom i zbog specifičnosti modelnog organizma. Međutim, u istom sustavu pokazano je smanjenje genotoksičnosti s vremenom, što se pripisuje popravku DNA oštećenja (Madhusudhanan i sur., 2006). Obzirom na stvaranje adukta, najvjerojatnije je u pitanju popravak izrezivanjem nukleotida ili izrezivanjem baze.

Genotoksičnost OTA dokazana je na PK15 stanicama (Šegvić Klarić i sur., 2010), MDCK bubrežnim stanicama (Lebrun i Follmann, 2002), HK-2 stanicama (Arbillaga i sur., 2007), A549 stanicama humanog adenokarcinoma pluća (Šegvić Klarić i sur., 2015) i štakorima (Kuroda i sur., 2013; Želježić i sur., 2006). OTA je u koncentraciji 1 μ M pokazao jači genotoksični učinak u odnosu na AFB1 u istoj koncentraciji, no učinak nije značajno veći pri koncentraciji 10 μ M. Dobivene vrijednosti repnog intenziteta niže su nego one dobivene na PK15 i A549 stanicama. Za razliku od AFB1, kod OTA je točan mehanizam genotoksičnog djelovanja još uvijek dobrim dijelom nerasvjetljen; dokazana je prisutnost oksidativnog oštećenja i odsutnost DNA-adukta (Kamp i sur., 2005; Mally i sur., 2005; Mally i sur., 2004), uz adukte dokazane u nekim životinjskim vrstama (Mally i Dekant, 2005), smatra se da je uključen još jedan mehanizam djelovanja obzirom da je značajno oštećenje vidljivo već alkalnim komet testom bez dodatnih modifikacija metode (Domijan i sur., 2006). Genotoksični učinak je povećan dodatkom mikrosomskih enzima (Lebrun i Follmann, 2002), što dokazuje moguću ulogu aktivnih metabolita. Na bubrežnim HK-2 stanicama značajan genotoksični učinak primjećen je tek nakon 6 h izlaganja, ali pri značajno citotoksičnim

koncentracijama (Arbillaga i sur., 2007), što upućuje na povezanost cito- i genotoksičnog učinka te dovodi do pretpostavke da je genotoksični učinak indirektan, te nastaje kao posljedica općenite citotoksičnosti. U štakorima je dokazana proporcionalnost genotoksičnosti u odnosu na vrijeme (Želježić i sur., 2006).

Od svih pojedinačno primjenjenih toksina STC je pokazao najjači učinak na repni intenzitet, ali i najveću razliku u vrijednosti repnog intenziteta između dvije koncentracije, što mu uz lipofilnost daje potencijalno veliki mutageni i kancerogeni značaj. Veća vrijednost repnog intenziteta u odnosu na AFB1, ali i u odnosu na vrijednosti u ovome radu, pokazana je i na A549 stanicama humanog adenokarcinoma pluća (Jakšić i sur., 2012), te na humanim epitelnim želučanim GES-1 stanicama (www.plosone.org). U istome radu dokazana je indukcija zastoja staničnog ciklusa u G2 fazi i inicijacija popravka DNA oštećenja preko p53 signalnog puta. I ovdje je moguće pretpostaviti da se razlike u vrijednosti repnih intenziteta pojavljuju zbog razlika u ekspresiji CYP450 enzima. Na HepG2 stanicama STC se pokazao toksičnijim od AFB1 (Liu, 2014). Na istim stanicama dokazan je o dozi ovisan genotoksični učinak mjerenjem 8-hidroksideoksigvanozina kao indikatora oksidativnog oštećenja (Gao i sur., 2015). Svi navedeni rezultati potvrđuju značajan potencijalni kancerogeni učinak STC-a.

Aditivni učinak kombinacije AFB1 i OTA u skladu je sa njihovim aditivnim citotoksičnim učinkom na bubrežne stanice majmuna (Golli-Bennour i sur., 2010). Međutim, pri istovremenoj primjeni obaju toksina u pokusnih životinja dolazi do različitih učinaka ovisno o ciljnom organu; OTA u jetri štakora smanjuje toksični učinak AFB1, dok AFB1 nema utjecaja na toksičnost OTA u bubregu (Corcuera i sur., 2015). Antagonizam između dvaju toksina dodatno je potvrđen alkalnim komet testom (Corcuera i sur., 2011). U oba slučaja kao moguće objašnjenje navodi se kompeticija za CYP450 enzime, koja u konačnici dovodi do većeg stvaranja ROS-ova, ali manjeg stvaranja AFB1 adukata. S druge strane, u pilićima je pokazan sinergizam između dva toksina u povećanju želuca, bubrega, smanjenju rasta i povećanju mortaliteta, međutim, OTA je spriječio akumulaciju lipida u jetri koja je tipična pojava kod pileće aflatoksikoze, a najuočljiviji je simptom bio nefropatija (Huff i Doerr, 1981). AFB1 i OTA stoga u in vitro uvjetima pokazuju aditivno, a u in vivo uvjetima aditivno, antagonističko ili sinergističko djelovanje, ovisno o pokusnoj životinji, ciljnim organima, primjenjenim koncentracijama i ostalim uvjetima ispitivanja.

Kombinacija AFB1 i STC pokazala je aditivno djelovanje u slučajevima kada je AFB1 bio prisutan u nižoj koncentraciji (1 μ M). Za sada je potvrđeno aditivno djelovanje ovih dvaju

toksina u indukciji apoptoze preko narušavanja integriteta mitohondrija i povećanja ekspresije apoptotskih proteina (Liu, 2014). U kombinacijama u kojima je AFB1 bio prisutan u većoj koncentraciji (10 μ M) dokazan je antagonizam. Točan mehanizam ove interakcije je nepoznat, ali moguće je pretpostaviti da razlog leži u strukturnoj sličnosti i kompeticije za vezanje na DNA. Ovaj je rad prvi primjer ispitivanja genotoksičnog djelovanja kombinacije OTA i STC, a mehanizam njihovog antagonizma postaje poticaj budućih istraživanja.

Tablica 2. Prikaz repnih duljina sa pripadajućim statističkim veličinama nakon tretmana HaCaT stanica mikotoksinima pojedinačno i u kombinacijama.

Mikotoksini	Duljina repa(μm)							
	X	SD	SEM	Min	25% perc.	M	75% perc.	Max
Kontrola(EtOH+DMS O)	22,63*	4,38	0,31	12,92	19,17	22,92	25,83	40,00
AFB1 1 μM	25,99* ^a	5,23	0,37	15,00	22,08	25,83	28,75	47,50
AFB1 10 μM	28,09* ^b	4,73	0,33	18,75	25,00	27,50	31,15	46,67
OTA 1 μM	26,20* ^c	4,50	0,32	16,67	23,02	25,83	28,33	42,08
OTA 10 μM	28,17* ^d	4,78	0,34	16,25	24,69	28,13	30,83	43,33
STC 1 μM	26,53* ^e	4,22	0,30	17,92	23,75	26,67	29,58	38,75
STC 10 μM	28,39* ^f	6,51	0,46	13,75	25,00	27,50	30,83	56,25
AFB1 + OTA (1+1)	26,94*	4,72	0,33	17,08	23,33	27,08	29,58	43,33
AFB1 + OTA (1+10)	29,00* ^a	6,91	0,49	15,83	24,27	27,92	32,50	60,83
AFB1 + OTA (10+1)	26,30* ^b	5,14	0,36	14,17	22,92	25,42	29,48	41,25
AFB1 + OTA (10+10)	30,52* ^{b,d}	6,59	0,47	19,17	25,83	29,17	34,06	52,92
AFB1 + STC (1+1)	29,36* ^{a,e}	6,65	0,47	7,083	26,25	28,54	32,40	52,92
AFB1 + STC (1+10)	34,46* ^{a,f}	9,86	0,70	6,250	26,67	31,88	42,29	57,50
AFB1 + STC (10+1)	31,27* ^{b,e}	8,70	0,62	10,00	26,67	29,79	34,90	57,50
AFB1 + STC (10+10)	31,43* ^{a,f}	9,68	0,68	3,750	25,83	28,33	35,63	62,08
OTA + STC (1+1)	25,73*	6,11	0,43	3,750	22,50	25,83	27,81	65,00
OTA + STC (1+10)	28,00*	7,35	0,52	9,176	24,17	27,08	30,42	57,08
OTA + STC(10+1)	30,30* ^e	8,70	0,62	16,67	25,00	27,71	33,23	57,08
OTA + STC (10+10)	29,19*	8,82	0,62	15,00	23,75	27,50	31,67	65,83

*pokusne skupine u odnosu na kontrolu

^a AFB1 1 μM u odnosu na AFB1+OTA i AFB1+STC (1+1 μM; 1+10 μM) (P<0,05)

^b AFB1 10 μM u odnosu na AFB1+OTA i AFB1+STC (10+1 μM; 10+10 μM) (P<0,05)

^c OTA 1 μM u odnosu na OTA+AFB1 i OTA+STC (1+1 μM; 1+10 μM) (P<0,05)

^d OTA 10 μM u odnosu na OTA+AFB1 i OTA+STC (10+1 μM; 10+10 μM) (P<0,05)

^e STC 1 μM u odnosu na STC+AFB1 i STC+OTA (1+1 μM; 1+10 μM) (P<0,05)

^f STC 10 μM u odnosu na STC+AFB1 i STC+OTA (10+1 μM; 10+10 μM) (P<0,05)

X – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; SEM – standardna pogreška aritmetičke sredine; Min – minimum; 25 % perc. – 25-postotni percentil vrijednosti; M – medijan; 75 % perc. – 75-postotni percentil vrijednosti; Max – maksimum

Tablica 3. Usporedba značajnosti između eksperimentalnih skupina i kontrole te između pojedinačno i u kombinaciji primijenjenih mikotoksina (repna duljina).

Duljina repa	Rank 1(K)	Rank 2	Razlika	P-vrijednost
Skupine				
K vs. AFB1 1 µM	390,7	653,2	-262,5	P < 0,05
K vs. AFB1 10 µM	390,7	827,5	-436,8	P < 0,05
K vs. OTA 1 µM	390,7	673,5	-282,8	P < 0,05
K vs. OTA 10 µM	390,7	839,4	-448,8	P < 0,05
K vs. STC 1 µM	390,7	711,0	-320,4	P < 0,05
K vs. STC 10 µM	390,7	808,3	-417,6	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 1+1 µM	347,7	663,8	-316,1	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 10+10 µM	347,7	861,5	-513,9	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 10+1 µM	347,7	603,9	-256,2	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 1+10 µM	347,7	763,0	-415,3	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 1+1 µM	347,7	814,9	-467,2	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 10+10 µM	347,7	848,8	-501,1	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 10+1 µM	356,1	860,2	-504,1	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 1+10 µM	356,1	949,0	-592,9	P < 0,05
K vs. OTA+STC 1+1 µM	356,1	561,6	-205,5	P < 0,05
K vs. OTA+STC 10+10 µM	356,1	716,4	-360,3	P < 0,05
K vs. OTA+STC 10+1 µM	356,1	773,6	-417,5	P < 0,05
K vs. OTA+STC 1+10 µM	356,1	686,4	-330,3	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+OTA) 1+1 µM	374,3	428,5	-54,27	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+OTA) 1+10 µM	374,3	501,4	-127,1	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+STC) 1+1 µM	374,3	535,9	-161,6	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+STC) 1+10 µM	374,3	662,4	-288,1	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+OTA) 10+10 µM	462,9	552,8	-89,93	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+OTA) 10+1 µM	462,9	366,0	96,91	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+STC) 10+10 µM	462,9	548,0	-85,11	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+STC) 10+1 µM	462,9	572,9	-110,1	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+AFB1) 1+1 µM	483,8	531,7	-47,82	P > 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+AFB1) 1+10 µM	483,8	481,4	2,443	P > 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+STC) 1+1 µM	483,8	452,9	30,98	P > 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+STC) 1+10 µM	483,8	552,7	-68,87	P > 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+AFB1) 10+10 µM	478,5	558,4	-79,83	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+AFB1) 10+1 µM	478,5	487,9	-9,358	P > 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+STC) 10+10 µM	478,5	466,8	11,71	P > 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+STC) 10+1 µM	478,5	510,9	-32,34	P > 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+AFB1) 1+1 µM	425,7	555,9	-130,1	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+AFB1) 1+10 µM	425,7	610,9	-185,1	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+OTA) 1+1 µM	425,7	371,8	53,94	P > 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+OTA) 1+10 µM	425,7	538,2	-112,5	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+AFB1) 10+10 µM	450,7	536,1	-85,37	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+AFB1) 10+1 µM	450,7	631,2	-180,5	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+OTA) 10+10 µM	450,7	455,0	-4,253	P > 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+OTA) 10+1 µM	450,7	429,5	21,25	P > 0,05

Tablica 4. Prikaz repnih intenziteta sa pripadajućim statističkim veličinama nakon tretmana HaCaT stanica mikotoksinima pojedinačno i u kombinacijama.

Mikotoksini	Repni intenzitet(%)							
	X	SD	SEM	Min	25% perc.	M	75% perc.	Max
Kontrola(EtOH+DMS O)	0,57	1,03	0,07	0,00	0,01	0,08	0,76	7,63
AFB1 1 μ M	1,68 ^{*,a}	3,70	0,26	0,00	0,05	0,22	1,15	27,42
AFB1 10 μ M	2,48 ^{*,b}	3,61	0,26	0,00	0,05	0,64	4,25	19,19
OTA 1 μ M	2,19 ^{*,c}	3,46	0,24	0,00	0,02	0,19	3,34	14,46
OTA 10 μ M	2,47 ^{*,d}	3,92	0,28	0,00	0,05	0,30	3,17	21,38
STC 1 μ M	2,75 ^{*,e}	4,18	0,30	0,00	0,04	0,32	4,33	16,81
STC 10 μ M	4,74 ^{*,f}	6,44	0,46	0,00	0,06	1,00	8,30	36,08
AFB1 + OTA (1+1)	3,22 ^{*,a,c}	4,96	0,35	0,00	0,07	0,49	4,90	26,46
AFB1 + OTA (1+10)	3,92 ^{*,a,d}	5,70	0,40	0,00	0,11	0,03	6,11	22,30
AFB1 + OTA (10+1)	4,27 ^{*,b}	6,68	0,47	0,00	0,03	0,67	6,23	46,38
AFB1 + OTA (10+10)	4,57 ^{*,b,d}	5,49	0,38	0,00	0,24	1,85	7,74	26,57
AFB1 + STC (1+1)	3,79 ^{*,a,e}	5,37	0,38	0,00	0,18	1,17	5,66	23,57
AFB1 + STC (1+10)	5,76 ^{*,a,f}	5,89	0,42	0,00	0,82	3,48	9,56	24,54
AFB1 + STC (10+1)	4,33 ^{*,b,e}	4,89	0,35	0,00	0,31	2,26	7,23	20,82
AFB1 + STC (10+10)	4,05 ^{*,b}	8,19	0,58	0,00	0,16	1,05	5,88	95,36
OTA + STC (1+1)	2,49 ^{*,c}	3,47	0,25	0,00	0,06	0,93	3,53	15,65
OTA + STC (1+10)	2,41 [*]	3,63	0,26	0,00	0,10	0,78	3,66	22,71
OTA + STC(10+1)	3,50 ^{*,d,e}	4,14	0,29	0,00	0,21	1,84	5,93	17,97
OTA + STC (10+10)	2,73 ^{*,d}	3,53	0,25	0,00	0,18	1,14	4,29	18,22

*pokusne skupine u odnosu na kontrolu

^a AFB1 1 μ M u odnosu na AFB1+OTA i AFB1+STC (1+1 μ M; 1+10 μ M) (P<0,05)

^b AFB1 10 μ M u odnosu na AFB1+OTA i AFB1+STC (10+1 μ M; 10+10 μ M) (P<0,05)

^c OTA 1 μ M u odnosu na OTA+AFB1 i OTA+STC (1+1 μ M; 1+10 μ M) (P<0,05)

^d OTA 10 μ M u odnosu na OTA+AFB1 i OTA+STC (10+1 μ M; 10+10 μ M) (P<0,05)

^e STC 1 μ M u odnosu na STC+AFB1 i STC+OTA (1+1 μ M; 1+10 μ M) (P<0,05)

^f STC 10 μ M u odnosu na STC+AFB1 i STC+OTA (10+1 μ M; 10+10 μ M) (P<0,05)

X – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; SEM – standardna pogreška aritmetičke sredine; Min – minimum; 25% perc. – 25-postotni percentil vrijednosti; M – medijan; 75% perc. – 75-postotni percentil vrijednosti; Max – maksimum

Tablica 5. Usporedba značajnosti između eksperimentalnih skupina i kontrole te između pojedinačno i u kombinaciji primijenjenih mikotoksina (rejni intenzitet).

Rejni intenzitet (%)				
Skupine	Rank 1	Rank 2	Razlika	Značajno
K vs. AFB1 1 µM	509,6	663,0	-153,4	P < 0,05
K vs. AFB1 10 µM	509,6	755,1	-245,5	P < 0,05
K vs. OTA 1 µM	509,6	675,3	-165,7	P < 0,05
K vs. OTA 10 µM	509,6	734,8	-225,1	P < 0,05
K vs. STC 1 µM	509,6	736,6	-226,9	P < 0,05
K vs. STC 10 µM	509,6	829,1	-319,4	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 1+1 µM	418,1	687,1	-269,0	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 10+10 µM	418,1	825,3	-407,2	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 10+1 µM	418,1	702,1	-284,0	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 1+10 µM	418,1	746,2	-328,1	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 1+1 µM	418,1	766,6	-348,5	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 10+10 µM	418,1	758,1	-340,1	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 10+1 µM	375,4	827,9	-452,5	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 1+10 µM	375,4	916,5	-541,1	P < 0,05
K vs. OTA+STC 1+1 µM	375,4	657,6	-282,2	P < 0,05
K vs. OTA+STC 10+10 µM	375,4	710,4	-335,1	P < 0,05
K vs. OTA+STC 10+1 µM	375,4	766,8	-391,5	P < 0,05
K vs. OTA+STC 1+10 µM	375,4	649,0	-273,7	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+OTA) 1+1 µM	366,2	464,6	-98,42	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+OTA) 1+10 µM	366,2	508,1	-141,9	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+STC) 1+1 µM	366,2	521,5	-155,3	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+STC) 1+10 µM	366,2	642,2	-276,0	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+OTA) 10+10 µM	425,6	550,1	-124,5	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+OTA) 10+1 µM	425,6	465,3	-39,72	P > 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+STC) 10+10 µM	425,6	498,7	-73,10	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+STC) 10+1 µM	425,6	562,7	-137,1	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+AFB1) 1+1 µM	441,0	514,7	-73,72	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+AFB1) 1+10 µM	441,0	523,7	-82,75	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+STC) 1+1 µM	441,0	513,9	-72,92	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+STC) 1+10 µM	441,0	509,3	-68,34	P > 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+AFB1) 10+10 µM	478,5	558,4	-79,83	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+AFB1) 10+1 µM	478,5	487,9	-9,358	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+STC) 10+10 µM	478,5	466,8	11,71	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+STC) 10+1 µM	478,5	510,9	-32,34	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+AFB1) 1+1 µM	424,8	516,1	-91,28	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+AFB1) 1+10 µM	424,8	576,0	-151,3	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+OTA) 1+1 µM	424,8	453,3	-28,49	P > 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+OTA) 1+10 µM	424,8	532,3	-107,6	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+AFB1) 10+10 µM	489,0	489,6	-0,6300	P > 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+AFB1) 10+1 µM	489,0	620,1	-131,1	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+OTA) 10+10 µM	489,0	472,5	16,49	P > 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+OTA) 10+1 µM	489,0	431,3	57,72	P > 0,05

Tablica 6. Prikaz repnih momenata sa pripadajućim statističkim veličinama nakon tretmana HaCaT stanica mikotoksinima pojedinačno i u kombinacijama.

Mikotoksini	Repni moment							
	X	SD	SEM	Min	25% perc.	M	75% perc.	Max
Kontrola(EtOH+DMS O)	0,07	0,12	0,01	0,00	0,00	0,01	0,09	0,77
AFB1 1 μ M	0,07* ^a	0,12	0,01	0,00	0,00	0,01	0,09	0,77
AFB1 10 μ M	0,20* ^b	0,43	0,03	0,00	0,01	0,07	0,46	2,60
OTA 1 μ M	0,23* ^c	0,37	0,03	0,00	0,00	0,02	0,35	1,94
OTA 10 μ M	0,29* ^d	0,46	0,03	0,00	0,00	0,03	0,46	2,24
STC 1 μ M	0,31* ^e	0,46	0,03	0,00	0,00	0,04	0,47	2,11
STC 10 μ M	0,55* ^f	0,75	0,05	0,00	0,01	0,13	0,90	5,05
AFB1 + OTA (1+1)	0,34* ^{a,c}	0,55	0,04	0,00	0,01	0,06	0,52	3,13
AFB1 + OTA (1+10)	0,47* ^{a,d}	0,64	0,05	0,00	0,02	0,17	0,69	3,02
AFB1 + OTA (10+1)	0,46* ^{b,c}	0,72	0,05	0,00	0,00	0,09	0,69	4,83
AFB1 + OTA (10+10)	0,58* ^{b,d}	0,66	0,05	0,00	0,04	0,32	0,95	2,92
AFB1 + STC (1+1)	0,47* ^{a,e}	0,65	0,05	0,00	0,02	0,15	0,73	3,05
AFB1 + STC (1+10)	0,88* ^{a,f}	0,95	0,07	0,00	0,13	0,62	1,27	4,90
AFB1 + STC (10+1)	0,56* ^{b,e}	0,60	0,04	0,00	0,06	0,33	0,94	2,84
AFB1 + STC (10+10)	0,54* ^{b,f}	0,94	0,07	0,00	0,03	0,18	0,69	9,53
OTA + STC (1+1)	0,28* ^{c,e}	0,40	0,03	0,00	0,01	0,12	0,37	3,11
OTA + STC (1+10)	0,29* ^{c,f}	0,40	0,03	0,00	0,01	0,13	0,45	2,29
OTA + STC(10+1)	0,45* ^{d,e}	0,52	0,04	0,00	0,04	0,25	0,72	2,55
OTA + STC (10+10)	0,38* ^{d,f}	0,49	0,03	0,00	0,02	0,17	0,61	2,83

*pokusne skupine u odnosu na kontrolu

^a AFB1 1 μ M u odnosu na AFB1+OTA i AFB1+STC (1+1 μ M; 1+10 μ M) (P<0,05)

^b AFB1 10 μ M u odnosu na AFB1+OTA i AFB1+STC (10+1 μ M; 10+10 μ M) (P<0,05)

^c OTA 1 μ M u odnosu na OTA+AFB1 i OTA+STC (1+1 μ M; 1+10 μ M) (P<0,05)

^d OTA 10 μ M u odnosu na OTA+AFB1 i OTA+STC (10+1 μ M; 10+10 μ M) (P<0,05)

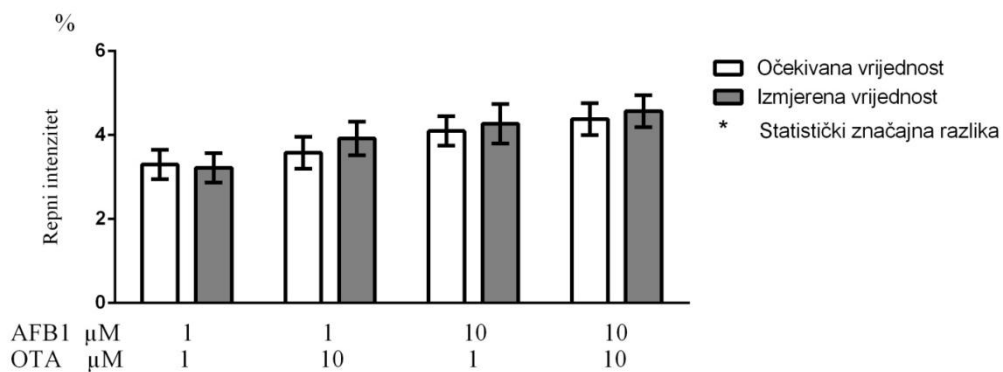
^e STC 1 μ M u odnosu na STC+AFB1 i STC+OTA (1+1 μ M; 1+10 μ M) (P<0,05)

^f STC 10 μ M u odnosu na STC+AFB1 i STC+OTA (10+1 μ M; 10+10 μ M) (P<0,05)

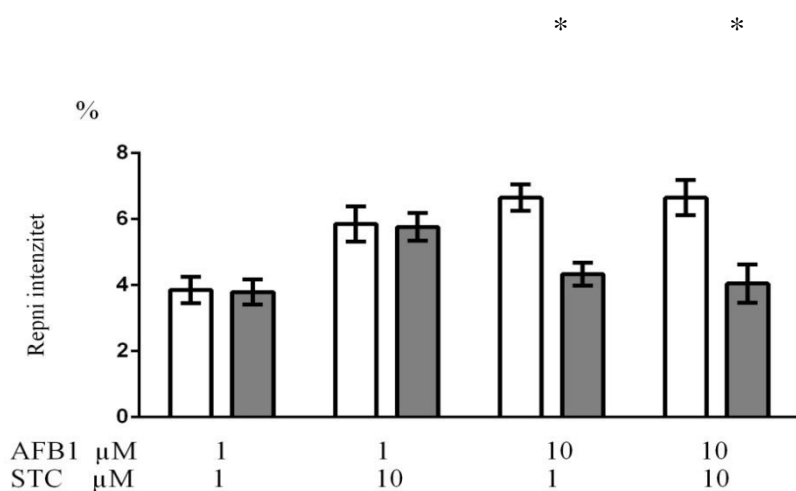
X – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; SEM – standardna pogreška aritmetičke sredine; Min – minimum; 25% perc. – 25-postotni percentil vrijednosti; M – medijan; 75% perc. – 75-postotni percentil vrijednosti; Max – maksimum

Tablica 7. Usporedba značajnosti između eksperimentalnih skupina i kontrole te između pojedinačno i u kombinaciji primijenjenih mikotoksina (rejni moment).

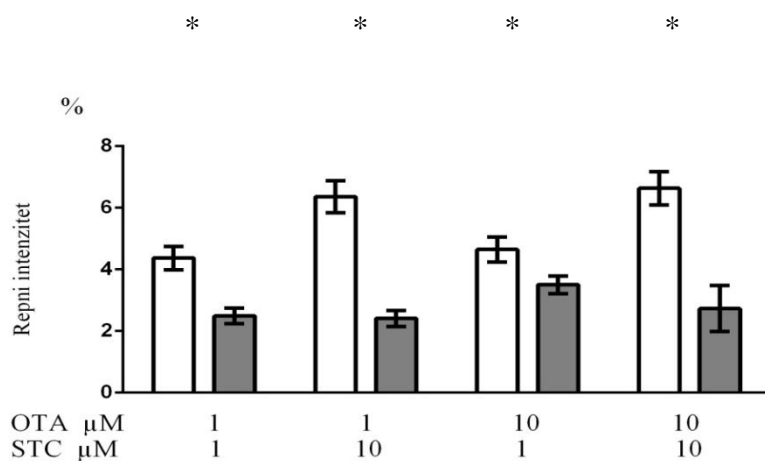
Rejni moment	Rank 1	Rank 2	Razlika	Značajno
Skupine				
K vs. AFB1 1 µM	524,8	655,0	-130,2	P < 0,05
K vs. AFB1 10 µM	524,8	769,4	-244,6	P < 0,05
K vs. OTA 1 µM	524,8	666,7	-142,0	P < 0,05
K vs. OTA 10 µM	524,8	733,7	-208,9	P < 0,05
K vs. STC 1 µM	524,8	731,1	-206,3	P < 0,05
K vs. STC 10 µM	524,8	822,9	-298,2	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 1+1 µM	416,5	661,6	-245,2	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 10+10 µM	416,5	844,5	-428,0	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 10+1 µM	416,5	676,0	-259,6	P < 0,05
K vs. AFB1+OTA 1+10 µM	416,5	752,3	-335,9	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 1+1 µM	416,5	767,4	-350,9	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 10+10 µM	416,5	785,2	-368,8	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 10+1 µM	359,1	840,9	-481,7	P < 0,05
K vs. AFB1+STC 1+10 µM	359,1	943,5	-584,4	P < 0,05
K vs. OTA+STC 1+1 µM	359,1	629,0	-269,8	P < 0,05
K vs. OTA+STC 10+10 µM	359,1	711,6	-352,5	P < 0,05
K vs. OTA+STC 10+1 µM	359,1	773,7	-414,5	P < 0,05
K vs. OTA+STC 1+10 µM	359,1	645,7	-286,5	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+OTA) 1+1 µM	524,8	655,0	-130,2	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+OTA) 1+10 µM	524,8	769,4	-244,6	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+STC) 1+1 µM	524,8	666,7	-142,0	P < 0,05
(AFB1) 1 µM vs. (AFB1+STC) 1+10 µM	524,8	733,7	-208,9	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+OTA) 10+10 µM	524,8	731,1	-206,3	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+OTA) 10+1 µM	524,8	822,9	-298,2	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+STC) 10+10 µM	416,5	661,6	-245,2	P < 0,05
(AFB1) 10 µM vs. (AFB1+STC) 10+1 µM	416,5	844,5	-428,0	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+AFB1) 1+1 µM	416,5	676,0	-259,6	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+AFB1) 1+10 µM	416,5	752,3	-335,9	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+STC) 1+1 µM	416,5	767,4	-350,9	P < 0,05
(OTA) 1 µM vs. (OTA+STC) 1+10 µM	416,5	785,2	-368,8	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+AFB1) 10+10 µM	359,1	840,9	-481,7	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+AFB1) 10+1 µM	359,1	943,5	-584,4	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+STC) 10+10 µM	359,1	629,0	-269,8	P < 0,05
(OTA) 10 µM vs. (OTA+STC) 10+1 µM	359,1	711,6	-352,5	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+AFB1) 1+1 µM	359,1	773,7	-414,5	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+AFB1) 1+10 µM	359,1	645,7	-286,5	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+OTA) 1+1 µM	524,8	655,0	-130,2	P < 0,05
(STC) 1 µM vs. (STC+OTA) 1+10 µM	524,8	769,4	-244,6	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+AFB1) 10+10 µM	524,8	666,7	-142,0	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+AFB1) 10+1 µM	524,8	733,7	-208,9	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+OTA) 10+10 µM	524,8	731,1	-206,3	P < 0,05
(STC) 10 µM vs. (STC+OTA) 10+1 µM	524,8	822,9	-298,2	P < 0,05



Graf 1. Genotoksični učinak kombinacije AFB1 i OTA prikazan kao očekivane i izmjerene vrijednosti repnog intenziteta



Graf 2. Genotoksični učinak kombinacije AFB1 i STC prikazan kao očekivane i izmjerene vrijednosti repnog intenziteta. * Označava antagonizam ($P < 0,05$)



Graf 3. Genotoksični učinak kombinacije OTA i STC prikazan kao očekivane i izmjerene vrijednosti repnog intenziteta. *Označava antagonizam ($P < 0,05$)

ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenim ispitivanjem genotoksičnog učinka aflatoksina B₁, okratoksina A i sterigmatocistina pomoću povećanja repnog intenziteta HaCaT stanica alkalnim komet testom, može se zaključiti sljedeće:

1. Svi navedeni mikotoksini primijenjeni pojedinačno i u binarnim kombinacijama djeluju genotoksično značajno fragmentirajući DNA u odnosu na kontrolu.
2. Od svih toksina primjenjenih pojedinačno na HaCaT stanicama najpotentniji genotoksični učinak pokazao je sterigmatocistin.
2. Kombinacija aflatoksina B₁ i okratoksina A djeluje aditivno na repni intenzitet, i značajno se razlikuje od pojedinačno primjenjenih toksina, osim kombinacije AFB₁ + OTA (1+1 μM) u odnosu na AFB₁ 1 μM.
3. Kombinacija aflatoksina B₁ i sterigmatocistina djeluje aditivno na povećanje repnog intenziteta kada je aflatoksin B₁ prisutan u nižoj koncentraciji, no pri višoj koncentraciji istog toksina dolazi do pojave antagonizma. Ovo se može tumačiti strukturnom sličnošću dvaju toksina i kompeticijom za vezanje na CYP450 enzime.
4. Kombinacija okratoksina i sterigmatocistina pokazala je antagonizam u svim slučajevima. Mehanizam ove interakcije potrebno je tek odrediti, a ovaj je rad prvo ispitivanje genotoksičnog djelovanja kombinacije ovih dvaju toksina.

LITERATURA

- Abd-Allah GA, El-Fayoumi RI, Smith MJ, Heckmann RA, O'Neill KL. A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the Comet assay. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*, 1999, 446, 181–188.
- Arbillaga L, Azqueta A, Ezpeleta O, Lopez de Cerain A. Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis*, 2007, 22, 35–42.
- Bose S, Sinha SP. Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Food Chem Toxicol*, 1994, 32, 533–537.
- Brown MH, Szczeck GM, Purmalis BP. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1976, 37, 331–338.
- Clarke R, Connolly L, Frizzell C, Elliot CT. Cytotoxic assessment of regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. *Toxicon*, 2014, 1–12.
- Corcuera LA, Arbillaga L, Vettorazzi A, Azqueta A, Lopez de Cerain A. Ochratoxin A reduces aflatoxin B1 induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49, 2883–2889.
- Corcuera LA, Vettorazzi A, Arbillaga L, González-Peñas E, López de Cerain A. An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50, 3440–3446.
- Corcuera LA, Vettorazzi A, Arbillaga L, Pérez N, Gil AG, Azqueta A, González-Peñas E, García-Jalón JA, López de Cerain A. Genotoxicity of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A after simultaneous application of the in vivo micronucleus and comet assay. *Food Chem Toxicol*, 2015, 76, 116–124.
- Dahlman A, Dantzker WH, Silbernagl S, Gekle M. Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 286, 157–162.
- Dai J, Park G, Wright MW, Adams M, Akman SA, Manderville RA. Detection and characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A. *Chem Res Toxicol*, 2000, 15, 1581–1588.
- Dai J, Wright MW, Manderville R a. Ochratoxin A forms a carbon-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct: Implications for C8 reactivity by a phenolic radical. *J Am Chem Soc*, 2003, 125, 3716–3717.
- Dalezios JI, Hsieh DPH. Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin b1 by rhesus monkeys. *Food Cosmet Toxicol*, 1974, 11, 605–616.
- Doi K, Uetsuka K. Mechanisms of Mycotoxin-induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis Through Oxidative Stress-related Pathways. *J Toxicol Pathol*, 2014, 27, 1–10.
- Domijan A, Želježić 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.

- El-Dessouki S. Brief communication: Aflatoxins in cosmetics containing substrates for aflatoxin-producing fungi. *Food Chem Toxicol*, 1992, 30, 993–994.
- Elling F, Nielsen JP, Lillehoj EB, Thomassen MS, Stormer F. Ochratoxin A induced porcine nephropathy: Enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicon*, 1985, 23, 247–254.
- Fetaih HA, Dessouki AA, Hassanin AAI, Tahan AS. Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats. *Pathol - Res Pract*, 2014, 210, 1079–1089.
- Gao W, Jiang L, Ge L, Chen M, Geng C, Yang G, Li Q, Ji F, Yan Q, Zou Y, Zhong L, Liu X. Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicol Vitro*, 2015, 29, 1–7.
- Ghaderi M, Allameh A, Soleimani M, Rastegar H, Ahmadi-Ashtiani HR. A comparison of DNA damage induced by aflatoxin B1 in hepatocyte-like cells, their progenitor mesenchymal stem cells and CD34+ cells isolated from umbilical cord blood. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2011, 719, 14–20.
- Gilani SH, Bancroft J, Reily M. Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978, 46, 543–546.
- Golli-Bennour EE, Kouidhi B, Bouslimi A, Abid-Essefi S, Hassen W, Bacha H. Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B1, ochratoxin A, and their combination in cultured vero cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 2010, 24, 42–50.
- Green CE, Rice D, Hsieh DPH, Byard J. The comparative metabolism and toxic potency of aflatoxin b1 and aflatoxin M1 in primary cultures of adult-rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol*, 1982, 20, 53–60.
- Guo Y, Breeden LL, Fan W, Zhao LP, Eaton DL, Zarbl H. Analysis of cellular responses to aflatoxin B(1) in yeast expressing human cytochrome P450 1A2 using cDNA microarrays. *Mutat Res*, 2006, 593, 121–142.
- Harwing J, Kuiper-Goodman T, Scott PM. Microbial food toxicant: ochratoxins. U: Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin. Rechcigl M, urednik, Boca Raton, CRC Press, 1983, str. 192–238.
- Hayes AW, Hood RD, Lee HL. Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. *Teratology*, 1974, 9, 93–98.
- Hood RD, Naughton MJ, Hayes AW. Prenatal effects of Ochratoxin A in hamsters. *Teratology*, 1976, 13, 11–14.
- Huff WE, Doerr J. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poult Sci*, 1981, 60, 550–555.
- IARC. , 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. 1993.
- IARC. , 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. 2002.

- Ilić Z, Crawford D, Egner P, Sell S. Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242, 241–246.
- Jakšić D, Puel O, Canlet C, Kopjar N, Kosalec I, Klarić MŠ. Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5-methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Arch Toxicol*, 2012, 86, 1583–1591.
- Josse R, Dumont J, Fautrel A, Robin MA, Guillouzo A. Identification of early target genes of aflatoxin B1 in human hepatocytes, inter-individual variability and comparison with other genotoxic compounds. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 258, 176–187.
- Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb, Merkur A.B.D., 2005
- Kamp HG, Eisenbrand G, Schlatter J, Wurth K, Janzowski C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*, 2005, 206, 413–425.
- Kemppainen BW, Riley RT, Pace JG. Skin Absorption as a Route of Exposure for Aflatoxin and Trichothecenes. *Toxin Rev*, 1988, 7, 95–120.
- Kononenko GP, Burkin A, Soboleva N. Specific Features of Albumin Interactions with Hemiacetals of Aflatoxins and Sterigmatocystin. *Appl Biochem Microbiol*, 2003, 39, 105–110.
- Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1973, 81, 689–695.
- Kumagai S, Aibara K. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982, 64, 94–102.
- Kumari D, Sinha SP. Effect of retinol on ochratoxin-produced genotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol*, 1994, 32, 471–475.
- Kurian P, Nesnow S, Milo GE. Quantitative evaluation of the effects of human carcinogens and related chemicals on human foreskin fibroblasts. *Cell Biol Toxicol*, 1990, 6, 171–184.
- Kuroda K, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Kijima A, Matsushita K, Masumura K, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, Sakai H, Yanai T, Nohmi T, Ogawa K, Umemura T. Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of gpt delta rats. *Mutagenesis*, 2013, 29, 1–10.
- Lea T, Steien K, Stormer FC. Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 1989, 107, 153–159.
- Lebrun S, Follmann W. Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch Toxicol*, 2002, 75, 734–741.
- Lillehoj EB, Ciegler A. Biological activity of sterigmatocystin. *Mycopathologia*, 1967, 35, 373–376.
- Lipozenčić J. Dermatovenerologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2008
- Liu Y. Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicology Reports* 1, str. 1076-1086, 2014. *Toxicol Reports*, 2014, 1, 1076–1086.

- Lu X, Hu B, Shao L, Tian Y, Jin T, Jin Y, Ji S, Fan X. Integrated analysis of transcriptomics and metabonomics profiles in aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55, 444–455.
- Luster MI, Germolec DR, Burlison GR, Jameson CW. Selective immunosuppressions in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res*, 1987, 47, 2259–2263.
- Luthy J. Metabolism and tissue distribution of (14C)aflatoxin B1 in pigs. *Food Cosmet Toxicol*, 1980, 18, 253–256.
- Madhusudhanan N, Kavithalakshmi NR, Shanmugasundaram ERB, Shanmugasundaram KR. Aflatoxin B1-Induced DNA Damage in *Labeo rohita*: Protective Effect of an Antioxidant Supplement, Amrita Bindu. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006, 98, 473–479.
- Mally A, Dekant W. DNA adduct formation by ochratoxin A: review of the available evidence. *Food Addit Contam*, 2005, 22 Suppl 1, 65–74.
- Mally A, Pepe G, Ravoori S, Fiore M, Gupta RC, Dekant W, Mosesso P. Ochratoxin A Causes DNA Damage and Cytogenetic Effects but No DNA Adducts in Rats. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18, 1253–1261.
- Mally A, Zepnik H, Wanek P, Eder E, Dingley D, Ihmels H, Volkel W, Dekant W. Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17, 234–242.
- Mary VS, Theumer M, Arias S, Rubinstein H. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology*, 2012, 302, 299–307.
- Patil RD, Dwivedi P, Sharma AK. Critical period and minimum single oral dose of ochratoxin A for inducing developmental toxicity in pregnant Wistar rats. *Reprod Toxicol*, 2006, 22, 679–687.
- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51, 61–99.
- Pinelli E, Adlouni CE, Pipy B, Quartulli F, Pfohl-Leszkowicz A. Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1999, 7, 95–107.
- Pitout MJ. The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem Pharmacol*, 1969, 18, 485–491.
- Plestina R, Stavljenić A, Ceović R, Fuchs R. Haematological features of the population of the area of Croatia, Yugoslavia, endemic for Balkan nephropathy. U: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, urednici, Lyon, IARC, 1991, str. 43–46.
- Rastogi S, Dogra R, Khanna S, Das M. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44, 670–677.
- Reddy GS, Tilak TBG, Krishnamurthi D. Susceptibility of vitamin A deficient rats to aflatoxin. *Food Cosmet Toxicol*, 1973, 11, 467–470.

- Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact*, 2006, 159, 18–46.
- Sauvant C, Holzinger H, Gekle M. The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 15, 125–134.
- Slizewska K, Nowak A, Libudzisz Z, Blasiak J. Probiotic preparation reduces the faecal water genotoxicity in chickens fed with aflatoxin B1 contaminated fodder. *Res Vet Sci*, 2010, 89, 391–395.
- Steyn M, Thiel PG. Biliary excretion of sterigmatocystin by vervet monkeys. *Biochem Pharmacol*, 1976, 25, 265–266.
- Steyn PS. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. U: The biosynthesis of mycotoxins - a study in secondary metabolism. 1980a, str. 149.
- Steyn PS. Ochratoxin and related dihydroisocoumarins. U: The biosynthesis of mycotoxins - a study in secondary metabolism. Academic Press, 1980b, str. 399.
- Stoev SD, Goundasheva D, Mirtcheva T, Mantle P. Susceptibility to bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Exp Toxicol Pathol*, 2000, 52, 287–296.
- Stoev SD, Stoeva JK, Anguelov G, Hald B. Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneous cases with different frequency of porcine nephropathy in Bulgaria. *J Vet Med*, 1998, 45, 229–236.
- Stormer FC, Støren O, Hansen CE, Pedersen JJ, Hvistendahl G, Aarsen AJ. Formation of (4R)- and (4S)- hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42, 1051–1056.
- Straumfors Halstensen A, Nordby KC, Elen O, Eduard W. Ochratoxin A in grain dust--estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Ann Agric Environ Med*, 2004, 11, 245–254.
- Šegvić Klarić M, Daraboš D, Rozgaj R, Kašuba V, Pepeljnjak S. Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: single and combined genotoxic action. *Arch Toxicol*, 2010, 84, 641–650.
- Šegvić Klarić M, Jakšić D, Kopjar N, Rašić D, Kocsube S, Varga J. Cytotoxic and genotoxic potencies of single and combined spore extracts of airborne OTA-producing and OTA-non-producing *Aspergilli* in Human lung A549 cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2015, 120, 206–214.
- Terao K. Sterigmatocystin - A masked potent carcinogenic mycotoxin. *J Toxicol - Toxin Rev*, 1983, 2, 77–110.
- Towner RA, Hashimoto H, Summers P. Non-invasive in vivo magnetic resonance imaging assesment of acute aflatoxin B1 hepatotoxicity in rats. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, 2000, 1475, 314–320.
- Veršilovskis A, Saeger SD. Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136–147.

- Vukelić M, Šostarić B, Belicza M. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*, 1992, 30, 193–200.
- Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effects. *World Rabbit Sci*, 2004, 12, 159–171.
- Wong ZA. Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B1 in rats in vivo and in primary hepatocyte culture. *Food Cosmet Toxicol*, 1979, 17, 481–486.
- Yang Q, He X, Li X, Xu W, Luo Y, Yang X, Wang Y, Li Y, Huang K. DNA damage and S phase arrest induced by Ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK 293). *Mutat Res Mol Mech Mutagen*, 2014, 765, 22–31.
- Zepnik H, Pahler A, Schauer U, Dekant W. Ochratoxin A-Induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? *Toxicol Sci*, 2001, 59, 59–67.
- Zheng J, Zhang Y, Xu W, Luo Y, Hao J, Shen X, Yang X, Li X, Huang K. Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 268, 123–131.
- Zimmerli B, Dick R. Determination of ochratoxinA at ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up; methodology and Swiss data. *J Chromatogr*, 1995, 666, 85–99.
- Želježić D, Domijan A, Peraica M. DNA damage by ochratoxin A in rat kidney assessed by the alkaline comet assay. *Brazilian J Med Biol Res*, 2006, 39, 1563–1568.

SAŽETAK

Ljudska koža najveći je organ ljudskog tijela, a kao takva je izložena brojnim potencijalno štetnim kemikalijama iz okoline. Mikotoksini aflatoksin B₁ (AFB₁), okratoksin A (OTA) i sterigmatocistin (STC) su produkti sekundarnog metabolizma filamentoznih plijesni različitih rodova (najčešće *Aspergillus*), a pri dugotrajnom izlaganju predstavljaju rizične čimbenike za razvoj hepatocelularnog i karcinoma bubrega. Njihova akutna i kronična toksičnost uglavnom je istraživana kroz unos hranom (zbog kontaminacije hrane suspektnim plijesnima) i inhalacijom (zbog mogućnosti udisanja spora plijesni pri profesionalnoj izloženosti), no još ne postoji mnogo istraživanja usredotočenih na perkutani unos toksina, kao i na njihove moguće kutane toksične učinke.

Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti genotoksični učinak navedenih mikotoksina na HaCaT stanice kao modelni sustav humanih epidermalnih keratinocita. Stanice su tretirane toksinima pojedinačno i u binarnim kombinacijama, sa koncentracijama toksina od po 1 i 10 μM, nakon čega je genotoksični potencijal mikotoksina određen kometnim testom u alkalnim uvjetima.

Rezultati su pokazali da svi toksini značajno fragmentiraju DNA pri pojedinačnoj primjeni i primjeni u kombinacijama. Kombinacije toksina uglavnom pokazuju značajne razlike u odnosu na pojedinačno primjenjene toksine.

Zaključujemo da svi navedeni toksini djeluju genotoksično na HaCaT stanice primjenjeni pojedinačno i u kombinacijama. STC pojedinačno pokazuje najveći genotoksični učinak. Kombinacija AFB₁ i OTA pokazuje aditivno djelovanje, kombinacija OTA i STC pokazuje antagonistički učinak, a kombinacija AFB₁ i STC pokazuje aditivno ili antagonističko djelovanje ovisno o koncentraciji AFB₁. Ovi bi se nalazi mogli objasniti kompeticijom toksina na CYP450 enzime. Ujedno je ovaj rad prvi primjer ispitivanja genotoksičnosti kombinacije OTA i STC čiji se mehanizam djelovanja tek treba objasniti.

SUMMARY

Human skin is the largest organ of a human body, commonly exposed to potentially harmful environmental chemicals. The mycotoxins aflatoxin B₁, ochratoxin A and sterigmatocystin are produced by filamentous fungi of various genera (most commonly *Aspergillus*), and present risk factors for the development of hepatocellular and renal carcinoma during prolonged exposure. The acute and chronic toxicity of these toxins have most usually been studied through dietary (because of food contamination by suspect fungi) and inhalatory intake (because of a possibility of inhaling the spores during professional exposure). However, percutaneous intake, as well as possible cutaneous toxic effects of *Aspergillus* mycotoxins have been poorly investigated.

The aim of this study was to investigate the toxin's genotoxic effect on HaCaT cells as a model system for human epidermal keratinocytes. The cells were treated with toxins individually and in binary combinations, at concentrations of 1 and 10 µM, and genotoxic effect were determined by alkaline comet assay.

The results have shown all toxins significantly fragment the DNA both individually and in combinations. The combinations usually show significant difference against the individually applied toxins.

We conclude that all toxins exert genotoxicity upon the HaCaT cells at individual and combinatory application. Single STC showed the highest genotoxic effect, comparing to AFB₁ and OTA. The combination of AFB₁ and OTA showed an additive effect, the combination of OTA and STC exerted an antagonistic effect, and the combination of AFB₁ and STC showed both the additive and antagonistic effect depending on concentration of AFB₁. These findings could be explained by competitive binding of the toxins to the CYP450 enzymes. To our knowledge this is the first report on genotoxicity of the combination of OTA and STC, whose mechanism has yet to be explained.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za Mikrobiologiju
Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

GENOTOKSIČNI UČINAK AFLATOKSINA B₁, OKRATOKSINA A I STERIGMATOCISTINA NA LJUDSKE KERATINOCITE

Vedran Mužinić

SAŽETAK

Ljudska koža najveći je organ ljudskog tijela, a kao takva je izložena brojnim potencijalno štetnim kemikalijama iz okoline. Mikotoksini aflatoxin B₁ (AFB₁), okratoksin A (OTA) i sterigmatocistin (STC) su produkti sekundarnog metabolizma filamentoznih plijesni različitih rodova (najčešće *Aspergillus*), a pri dugotrajnom izlaganju predstavljaju rizične čimbenike za razvoj hepatocelularnog i karcinoma bubrega. Njihova akutna i kronična toksičnost uglavnom je istraživana kroz unos hranom (zbog kontaminacije hrane suspektnim plijesnima) i inhalacijom (zbog mogućnosti udisanja spora plijesni pri profesionalnoj izloženosti), no još ne postoji mnogo istraživanja usredotočenih na perkutani unos toksina, kao i na njihove moguće kutane toksične učinke. Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti genotoksični učinak navedenih mikotoksina na HaCaT stanice kao modelni sustav humanih epidermalnih keratinocita. Stanice su tretirane toksinima pojedinačno i u binarnim kombinacijama, sa koncentracijama toksina od po 1 i 10 μM, nakon čega je genotoksični potencijal mikotoksina određen kometnim testom u alkalnim uvjetima. Rezultati su pokazali da svi toksini značajno fragmentiraju DNA pri pojedinačnoj primjeni i primjeni u kombinacijama. Kombinacije toksina uglavnom pokazuju značajne razlike u odnosu na pojedinačno primjenjene toksine. Zaključujemo da svi navedeni toksini djeluju genotoksično na HaCaT stanice primjenjeni pojedinačno i u kombinacijama. STC pojedinačno pokazuje najveći genotoksični učinak. Kombinacija AFB₁ i OTA pokazuje aditivno djelovanje, kombinacija OTA i STC pokazuje antagonistički učinak, a kombinacija AFB₁ i STC pokazuje aditivno ili antagonističko djelovanje ovisno o koncentraciji AFB₁. Ovi bi se nalazi mogli objasniti kompeticijom toksina na CYP450 enzime. Ujedno je ovaj rad prvi primjer ispitivanja genotoksičnosti kombinacije OTA i STC čiji se mehanizam djelovanja tek treba objasniti.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 6 grafičkih prikaza, 7 tablica i 84 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: aflatoxin B₁, okratoksin A, sterigmatocistin, genotoksičnost, keratinociti

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

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

Dr. sc. Sanja Dabelić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Nevenka Kopjar, *znanstveni savjetnik Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10 000 Zagreb

Diploma thesis

GENOTOXIC EFFECT OF AFLATOXIN B₁, OCHRATOXIN A AND STERIGMATOCYSTIN ON HUMAN KERATINOCYTES

Vedran Mužinić

SUMMARY

Human skin is the largest organ of a human body, commonly exposed to potentially harmful environmental chemicals. The mycotoxins aflatoxin B₁, ochratoxin A and sterigmatocystin are produced by filamentous fungi of various genera (most commonly *Aspergillus*), and present risk factors for the development of hepatocellular and renal carcinoma during prolonged exposure. The acute and chronic toxicity of these toxins have most usually been studied through dietary (because of food contamination by suspect fungi) and inhalatory intake (because of a possibility of inhaling the spores during professional exposure). However, percutaneous intake, as well as possible cutaneous toxic effects of *Aspergillus* mycotoxins have been poorly investigated. The aim of this study was to investigate the toxin's genotoxic effect on HaCaT cells as a model system for human epidermal keratinocytes. The cells were treated with toxins individually and in binary combinations, at concentrations of 1 and 10 μM, and genotoxic effect were determined by alkaline comet assay. The results have shown all toxins significantly fragment the DNA both individually and in combinations. The combinations usually show significant difference against the individually applied toxins. We conclude that all toxins exert genotoxicity upon the HaCaT cells at individual and combinatory application. Single STC showed the highest genotoxic effect, comparing to AFB₁ and OTA. The combination of AFB₁ and OTA showed an additive effect, the combination of OTA and STC exerted an antagonistic effect, and the combination of AFB₁ and STC showed both the additive and antagonistic effect depending on concentration of AFB₁. These findings could be explained by competitive binding of the toxins to the CYP450 enzymes. To our knowledge this is the first report on genotoxicity of the combination of OTA and STC, whose mechanism has yet to be explained.

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

Thesis includes: 43 pages, 6 figures, 7 tables and 84 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Aflatoxin B₁, ochratoxin A, sterigmatocystin, genotoxicity, keratinocytes

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

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sanja Dabelić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Nevenka Kopjar, Ph.D. Scientific advisor, Institute for Medical Research and Occupational Health

The thesis was accepted: June 2015.

