

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Daniela Jakšić

**Citotoksičnost nekih furofuranskih prekursora
biosinteze aflatoksina**

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Šegvić Klarić i doc. dr. sc. Ivana Kosalca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008/2009.

SADRŽAJ

1. UVOD I HIPOTEZA	4
2. TEORETSKI DIO.....	5
2.1. KEMIJSKA SVOJSTVA AFLATOKSINA I PRODUCENTI.....	5
2.2. TOKSIČNI UČINCI AFLATOKSINA	5
2.3. BIOSINTETSKI PUT AFLATOKSINA.....	6
2.4. TOKSIČNOST AFLATOKSINSKIH INTERMEDIJERA	9
2.5. LEGISLATIVA.....	9
3. MATERIJAL I METODE.....	11
3.1. KULTURA STANICA.....	11
3.2. AFLATOKSINSKI PREKURSORI.....	11
3.3. MTT TEST.....	12
3.4. STATISTIČKA OBRADA	13
4. REZULTATI	14
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČCI.....	21
7. LITERATURA	22
8. SAŽETAK	26
9. SUMMARY	27
ZAHVALE	28
ŽIVOTOPIS.....	28

1. UVOD I HIPOTEZA

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni, koji neopažajno ugrožavaju zdravlje ljudi i životinja već od samog početka razvoja poljoprivredne proizvodnje. Ovisno o toksičnom potencijalu, dovode do akutnih i kroničnih trovanja- mikotoksikoza. Čovjek je izložen djelovanju mikotoksina i njihovih rezidua uglavnom putem hrane biljnog ili životinjskog podrijetla, aerogeno (mikotoksini u sporama i dijelovima micelija) te preko kože. Posebna pozornost mikotoksinima počela se pridavati 60-tih godina 20 stoljeća, otkrićem aflatoksina koji su prouzročili masovni pomor purana u Velikoj Britaniji. Analizom kikirikijevog brašna korištenog za prehranu purana izolirana je plijesan *Aspergillus flavus* i otkriven do tada nepoznat spoj koji je nakon osvjetljavanja UV svjetlom fluorescirao plavo. Taj difurokumarin danas je poznat kao aflatoksin B₁ i najtoksičniji je sekundarni metabolit nekih vrsta roda *Aspergillus*. Biosinteza aflatoksina odvija se u više koraka preko različitih prekursora koji su strukturno slični aflatoksinu.

Mnogobrojnim istraživanjima potvrđeni su citotoksični, mutageni i kancerogeni učinci aflatoksina. Njihovi potencijalni producenti mogu u svojim sporama i dijelovima micelija osim aflatoksina sadržavati i njihove prekursore ovisno o fazi biosinteze. Sami aflatoksini su vrlo potentni otrovi te se nameće pitanje kakav utjecaj na zdravlje čovjeka mogu imati pojedini prekursori njihovog biosintetskog puta. Do sada je mali broj istraživanja posvećen ispitivanju bioloških učinaka aflatoksinških prekursora među kojima neki sadrže furofuranski prsten koji se smatra odgovornim za toksičnost i mutagenost aflatoksina.

Stoga smo ovim radom željeli ispitati citotoksičnost nekih dihidrofurofuranskih (verzikolorin A, 6-deoksiverzikolorin A i 5-metilsterigmatocistin) i tetrahidrofurofuranskih intermedijera (verzikolorin B). Za ispitivanje citotoksičnosti u uvjetima *in vitro* odabrana je kultura stanica adenokarcinoma pluća čovjeka (A549), a preživljavanje stanica je mjereno kolorimetrijskim MTT testom. Za kulturu stanica A549 odlučili smo se iz razloga što ove stanice zadržavaju morfološke i biokemijske karakteristike normalnih alveolarnih epitelnih stanica tipa 2 (AII) kao i sposobnost metaboličke aktivacije određenih prokarcinogena. Naime, ove stanice sadrže enzime citokrom P₄₅₀ sustava, prostaglandin-H-sintazu, lipooksigenazu, epoksid hidrolazu i druge bioaktivacijske enzime što ih čini pogodnim modelom za istraživanje toksičnih učinaka. Treba uzeti u obzir da se u stanicama nalazi i detoksifikacijski enzimski sustav, primjerice glutation-S-transferaze (GST), pa osjetljivost alveolarnih stanica na toksični učinak mikotoksina ovisi o omjeru bioaktivacijskih i detoksifikacijskih učinaka. Drugi razlog za izbor A549 stanica proizlazi iz činjenice da aflatoksini i njihovi prekursori mogu dospjeti u pluća inhalacijom spora plijesni i tamo ispoljiti svoje djelovanje.

2. TEORETSKI DIO

2.1. KEMIJSKA SVOJSTVA AFLATOKSINA I PRODUCENTI

Aflatoksini su smjese kemijski srodnih spojeva derivata difurokumarina, a sintetiziraju ih neke *Aspergillus* vrste. Do danas je opisano desetak vrsta producenata aflatoksina, a organizirani su u tri sekcije (Frisvad i sur., 2005):

- 1) sekcija *Flavi*: *A. flavus*, *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. parasiticus*, *A. toxicarius*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. zhaoqingensis*, *A. bombycis* ;
- 2) sekcija *Nidulantes*: *Emericella venezuelensis* i *Emericella astellata*;
- 3) sekcija *Ochraceorosei*: *Aspergillus ochraceoroseus*. *Aspergillus rambellii*, nova vrsta iz sekcije *Ochraceorosei*, akumulira vrlo velike količine sterigmatocistina, 3-O-metilsterigmatocistin i aflatoksin B1. Sterigmatocistin je biokemijski prekursor aflatoksina, kancerogenost je potvrđena na životinjskim modelima, a potencijalni je kancerogen za ljude te se nalazi u skupini 2B prema IARC (IARC, 1993).

Aspergillus flavus sintetizira šest vrsta aflatoksina: B1, B2, G1, G2, B2a i G2a (Pepeljnjak i Ožegović, 1995). Ograničen broj producenata ovog mikotoksina objašnjava se izrazito kompleksnim biosintetskim putem koji zahtjeva aktivnost brojnih gena, a to pak implicira značaj takve biosinteze za samog producenta. Produkcija tako toksičnog metabolita osigurava prednost plijesni pred drugim organizmima, npr. insektima i manjim sisavcima, u kompeticiji za hranom, a omogućava i vrlo široku rasprostranjenost u biljnom svijetu tropskih i suptropskih regija. Plijesni producenti aflatoksina su najčešći nametnici na plodovima kikirikija, oraha, badema, lješnjaka, kakaovca te na žitaricama kukuruzu, zobi i pšenici (Moss, 2002).

2.2. TOKSIČNI UČINCI AFLATOKSINA

Dva su važna aspekta toksičnosti aflatoksina. Prvi je taj da se kod nekih životinjskih vrsta kao što je štakor, aflatoksin B₁ (AFB₁) pokazao najkancerogenijim metabolitom plijesni, a drugi aspekt je širok raspon toksičnosti aflatoksina B₁ različitog intenziteta među životinjskim vrstama, a unutar iste vrste mužjaci su osjetljiviji od ženki. LD₅₀ vrijednost za zeca, mačku ili psa manja je od 1 mg/kg tjelesne mase, a za rezistentnije vrste poput hrčka LD₅₀ je oko 10,2 mg/kg tjelesne mase. LD₅₀ vrijednost za ljude vjerojatno se kreće negdje između ovih vrijednosti (Pepeljnjak i Ožegović, 1995.). Nekoliko je izvještaja o fatalnim ishodima trovanja kontaminiranom hranom. Jedan od značajnijih je slučaj iz 1974. koji je pogodio Indiju. Gotovo tisuću ljudi je oboljelo, a

više od stotinu je umrlo od posljedica trovanja kontaminiranim kukuruzom. (Krishnamachari i sur., 1975.).

Prema epidemiološkim podacima iz 1977. utvrđena je snažna korelacija između pojave raka jetre kod ljudi u Africi i aflatoksina u hrani, iako se i hepatitis B infekcija povezuje s tako velikom učestalošću raka. Kada je razjašnjen molekularni mehanizam prema kojem je AFB₁ akutno toksičan i jetreni kancerogen na laboratorijskim životinjama, možemo zaključiti da je AFB₁ i potencijalni ljudski kancerogen. Također je jasno da aflatoksin i hepatitis B mogu sinergistički utjecati na razvoj raka jetre (Moss, 2002).

Smatra se da AFB₁ sam po sebi nije toksičan već se metaboliziranjem u organizmu prevodi u toksični oblik. U jetrenim stanicama se metabolizira pomoću nekoliko različitih enzima. Prvim oksidacijskim korakom stvara se epoksid koji je potencijalni kancerogen koji se veže za guaninske ostatke DNA. Epoksid se dalje može metabolizirati u dihidroksi oblik koji bi mogao biti odgovoran za akutnu toksičnost budući se veže za lizinske ostatke na enzimima. O omjeru količina ovih metabolita ovisit će hoće li se na nekoj životinjskoj vrsti ispoljiti kancerogeni učinak ili akutno toksični učinak (Dave i Gallhager, 1994).

Jedan od metabolita aflatoksina je aflatoksin M1, hidroksilirani derivat aflatoksina, koji se izlučuje u mlijeko sisavaca. Ova tvar je gotovo toksična kao aflatoksin B1 kada se unese u organizam putem kontaminiranog mlijeka i mliječnih proizvoda, a također se preko majčinog mlijeka prenosi na dijete (JECFA, 2001).

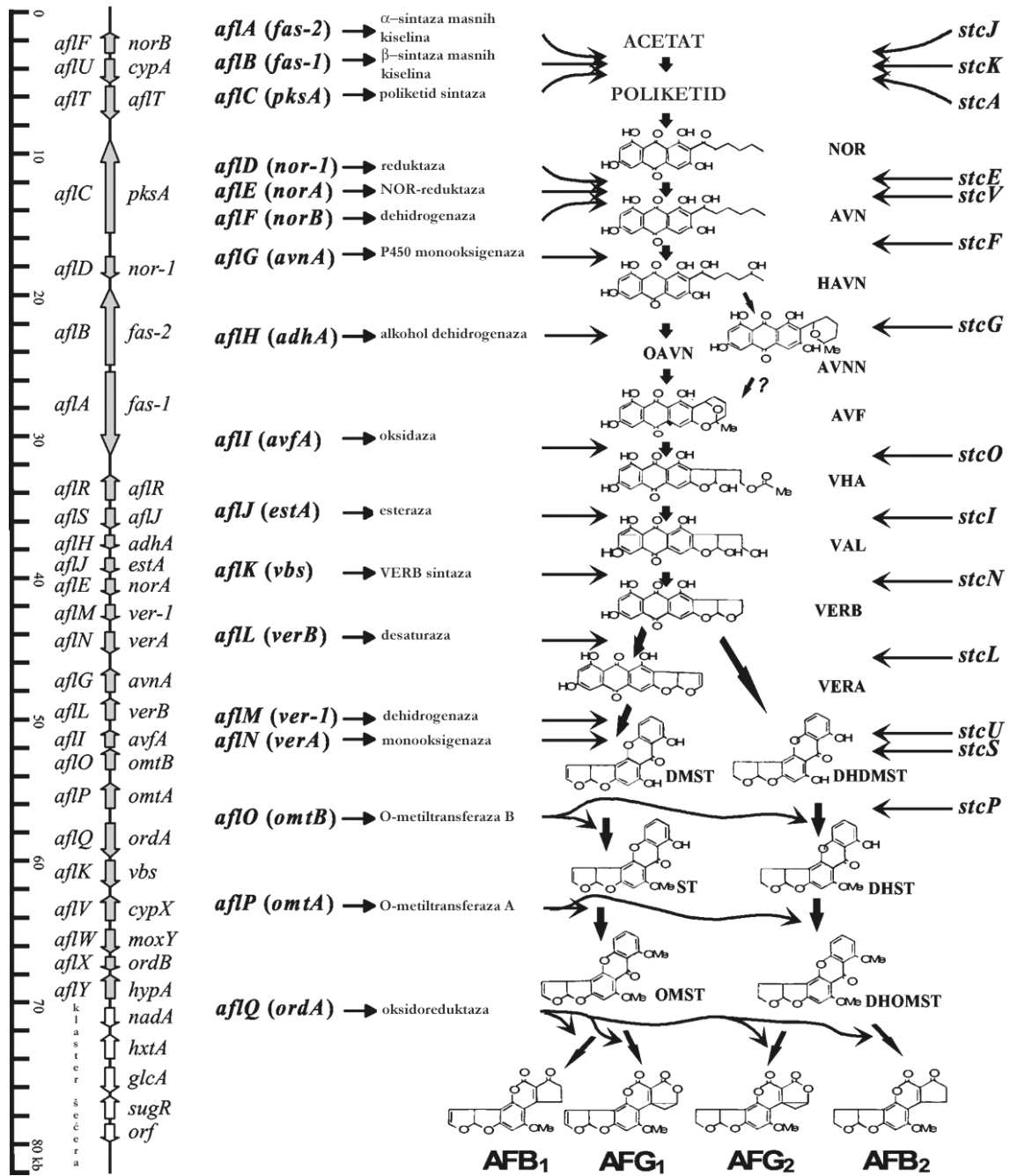
2.3. BIOSINTETSKI PUT AFLATOKSINA

Više od dva desetljeća rada bilo je potrebno da se identificiraju svi intermedijeri uključeni u biosintezu aflatoksina. Istraživanja su uglavnom provedena na vrsti *A. parasiticus* korištenjem prekursora obilježenih izotopima ¹⁴C, ²H, ¹³C i ¹⁸O, a tehnikom nuklearne magnetne rezonance identificirani su pojedini intermedijeri biosintetskog puta (Dutton, 1988.).

Slika 1. prikazuje biosintetske intermedijere kao i gene koji kodiraju enzime uključene u njihovu sintezu. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je furofuranski prsten važan za njihove potencijalne biološke učinke. Naime, furofuranski prsten smatra se odgovornim za toksično djelovanje aflatoksina. Potencijalno toksične intermedijere biosinteze aflatoksina obzirom na strukturu možemo podijeliti u dvije skupine: a) dihidrofurofuranska i b) tetrahidrofurofuranska (Rodricks, 1969). Dihidrofurofuranskim intermedijerima pripadaju verzikolorin A (VERA), deoksiverzikolorin A (DOVERA), sterigmatocistin (ST), i O-metilsterigmatocistin (OMST). U ovu skupinu također spadaju AFB₁ i AFG₁. ST je inače krajnji toksični produkt kod vrste *A.*

versicolor jer ta plijesan ne posjeduje gene koji kodiraju enzime potrebne za nastavak biosinteze do aflatoksina (Calvo i sur., 2002). Tetrahidrofurofuranskoj skupini pripadaju verzikolorin B (VERB), dihidrodemetilsterigmatocistin (DHDMST), dihidrosterigmatocistin (DHST) i dihidro-O-metilsterigmatocistin (DHOMST). Skupini tetrahidrofurofuranskih derivata pripadaju i AFB₂ i AFG₂. Ostali intermedijeri uključujući norsolorinsku kiselinu (NOR), averantin (AVN), 5-hidroksiaverantin (HAVN), oksoavernatin (OAVN), averufanin (AVNN), averufin (AVF), verzikonal hemiacetal acetat (VHA) i verzikonal (VAL) nemaju furofuranski prsten (Jiujiang i sur., 2004). Geni koji kodiraju sintezu aflatoksina dobro su očuvani unutar roda *Aspergillus*, a raspoređeni su u velikim genskim klasterima. Među njima su od velikog značaja *afIR* i *afII* geni koji imaju regulatornu ulogu. Delecija *afIR* onemogućava sintezu ST i aflatoksina te smanjuje sporulaciju plijesni. Uloga *afII* nije do kraja razjašnjena ali je poznato da gubitak ovog gena također onemogućava sintezu aflatoksina (Calvo i sur., 2002). Aflatoksini slijede poliketidni put biosinteze: acetat → poliketid → antrakinoni → ksantoni → aflatoksini.

Sekundarni metaboliti plijesni nastaju u stacionarnoj fazi rasta (idiofaza) kojoj prethodi faza eksponencijalnog rasta (trofofaza). Smatra se da su okidači ovog prijelaza koncentracija ATP-a i reduciranih koenzima te prisutnost metalnih iona, posebno cinka (Bhatnager i sur. 1986.). Također je utvrđeno da povećana aktivnosti piruvat kinaze te dostupnosti kisika povećava sintezu aflatoksina dok prisutnost veće koncentracije anorganskog dušika i fosfata inhibira njihovu sintezu (Mateles i Adye, 1965; Dutton 1988).



Slika 1. Genski klasteri i enzimi biosinteze aflatoksinskih intemedijara (preuzeto iz Jiujiang i sur., 2004)

2.4. TOKSIČNOST AFLATOKSINSKIH INTERMEDIJERA

Iako su mnogi prekursori sinteze aflatoksina otkriveni 60-tih godina prošlog stoljeća, o njihovim biološkim učincima još uvijek se relativno malo zna. Istraživanja su uglavnom bila usmjerena na genotoksičnost, odnosno mutagenost s obzirom da su krajnji produkti-aflatoksini karcinogeni za životinje i ljude (IARC, 1993.). Budući da se karcinogeneza mikotoksina uglavnom odnosila na jetru, kao idealan model u istraživanju genotoksičnosti poslužile su primarne kulture hepatocita štakora i miša u kojima je promatran popravak DNA nakon izlaganja stanica pojedinim aflatoksinskim prekursorima. Pri tom je u kulturi hepatocita štakora dokazano da sterigmatocistin ima 100 puta jači genotoksični učinak od AFB₁, dok O-metilsterigmatocistin ima 30 puta slabije djelovanje od AFB₁. Također je zabilježeno da verzikolorin A ima 10 puta jači učinak od O-metilsterigmatocistina, dok verzikolorin B ima sličan genotoksični potencijal kao i verzikolorin A. Međutim, genotoksični potencijal ovih supstancija razlikuje se ovisno o odabranom eksperimentalnom modelu. Naime, hepatociti štakora su osjetljiviji na djelovanje aflatoksina i verzikolorina B od hepatocita miša (Mori i sur., 1984, 1985a, 1986). Osim toga, isti autori su izvjestili o genotoksičnosti pojedinih verzikolorinskih derivata uključujući 6,8-O-dimetil-verzikolorin A i B te 6-deoksiverzikolorin A, dok norsolorinska kiselina, koja nema furofuranski prsten, nije pokazala genotoksično djelovanje (Mori i sur., 1985b). Mutageni učinak aflatoksina B₁, sterigmatocistina, 5-metoksisterigmatocistina, verzikolorina A i B, 6,8-O-dimetil-verzikolorina A i B te 6-deoksiverzikolorina A dokazan je Ames-ovim testom na sojevima TA98 i TA100 *Salmonella* vrste nakon metaboličke aktivacije sa S-9 mikrosomalnom frakcijom jetre štakora (Ueno i sur., 1978; Mori i sur., 1984, 1985a, 1986).

Nakon ovih istraživanja znanstvenici su se dalje posvetili ispitivanju toksičnog i karcinogenog potencijala aflatoksina i sterigmatocistina u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Mehanizam toksičnog i karcinogenog djelovanja aflatoksina i sterigmatocistina temelji se na epoksidaciji furofuranskog prstena koji se kovalentno vezuje za gvaninske ostatke u molekuli DNA (Moss, 2002). Stoga bi se moglo očekivati da će ostali dihidrofurofuranski prekursori slijediti takav mehanizam aktivacije te ispoljavati slične toksične učinke.

2.5. LEGISLATIVA

Zbog činjenice da je aflatoksin B₁ kancerogen, mnoge zemlje su postavile prihvatljive granice sadržaja mikotoksina u hrani. Europska komisija limitirala je sadržaj mikotoksina u žitaricama i orašastim plodovima na vrijednost od 2 do 8 µg/kg, a za dječju hranu limit je 0,1 µg/kg. Posebno je strog limit za aflatoksin M1 u mlijeku koji iznosi 0,05 µg/kg kako bi se djeca zaštitila od dugotrajne izloženosti (Regulativa EU br. 1881/2006). Kao posljedica ovih odredbi

nastao je problem uvoza hrane budući da granične koncentracije nisu iste u svim zemljama, a zemlje izvoznice uglavnom dozvoljavaju više koncentracije aflatoksina od zemalja uvoznica. *Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani* (za ljude) iz Narodnih novina br. 154/2008., harmoniziran je sa prihvatljivim koncentracijama aflatoksina koje propisuje EU. Najveće količine aflatoksina nalaze se kod neprikladno skladištene hrane gdje visok sadržaj vlage i temperatura pogoduju brzom rastu plijesni. Ovakva kontaminacija može se kontrolirati skladištenjem hrane pri propisanim uvjetima.

Iznimno kompleksne interakcije nalazimo između aflatoksin producirajućih vrsta roda *Aspergillus* i biljnih vrsta kao što su kukuruz i orašasti plodovi. Mogu ostvariti benigni endofitni odnos sa sjemenkom biljke, pa primjerice u razdoblju suše neki aflatoksini mogu biti producirani u sjemenu biljke i tako prisutni u žitaricama nakon žetve. Iako su ove količine znatno niže od onih koje su povezane sa neprikladnim skladištenjem ipak su značajne i mogu biti više od granice propisane u pojedinoj državi. Problem je i što je ovakvu kontaminaciju aflatoksinima teže prevenirati budući su mikotoksini detektirani i kod žitarica tretiranih fungicidima (Moss, 2002).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. KULTURA STANICA

Stanice adenokarcinomatозnog tkiva pluća soja A549 uzete su iz Europske zbirke staničnih kultura (ECACC – *European Collection of Cell Cultures*, Velika Britanija). Stanice se uzgajaju u RPMI 1640 mediju (Imunološki zavod, Zagreb) bez fenolnog crvenila uz dodatak 2 mM glutamina i toplinski inaktiviranog 10% (V/V) telećeg fetalnog seruma (Sigma) te antibiotika penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100 µg/mL) i amfotericina B (2,5 µg/mL). Inkubacija se provodi na temperaturi 37° C u atmosferi s 95% vlažnosti i 5 % CO₂. Stanice su uzgajane u navedenom mediju do približno 80 % konfluentnosti nakon čega su presađene, odnosno tretirane mikotoksinima. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS; pH 7,4) i tretiraju s tripsinom (EDTA) te se resuspendiraju u novom mediju.

3.2. AFLATOKSINSKI PREKURSORI

Iz vrste *A. parasiticus* izolirani su sljedeći prekursori biosintetskog puta aflatoksina i sterigmatocistina, a njihova struktura je potvrđena tehnikom tekućinske kromatografije u sprezi s masenom spektrometrijom (LC-MS) (INRA, UR66 Pharmacologie-Toxicologie F-31931 Toulouse, Francuska).

- **5-metoksi sterigmatocistin, 5-MET-ST** (Mr= 354,31)
- **Verzikolorin A, VER A** (Mr= 338,268)
- **Verzikolorin B, VER B** (Mr= 340,284)
- **6-deoksiverzikolorin A, 6-deoksi-VER A** (Mr= 322,268)

Priređene su matične otopine navedih prekursora u 20% DMSO/etanol u koncentracijama od 3 mM (5-MET-ST, VER B i 6-deoksi-VER A), odnosno 2 mM (VER A).

3.3. MTT TEST

U staničnoj kulturi moguće je u uvjetima *in vitro* upotrebom MTT reagensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) ispitati citotoksične učinke vanjskih čimbenika na stanice. Postupak u kojemu se upotrebljava tetrazolijeva sol (MTT) temelji se na sposobnosti živih stanica odnosno specifičnog mitohondrijskog enzima sukcinat-dehidrogenaze da primarnu tamnožutu boju reducira u plavo do ljubičasto obojeni formazan. Stanična membrana živih stanica nepropusna je za kristale formazana pa se oni nakupljaju u stanicama. Primjenom kiselog izopropanola, oslobađaju se kristali formazana i otapaju u mediju. Intenzitet boje nastao oslobađanjem kristala formazana iz živih stanica u okolinu može se kvantitativno mjeriti pomoću ELISA čitača na valnoj duljini 595 nm. Princip MTT postupka je da je broj preživjelih stanica nakon inkubacije stanične kulture sa citotoksičnom tvari, a nakon bojanja MTT reagensom, proporcionalan sadržaju obojenog formazana kojeg odredimo spektrofotometrijski. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole.

Za izvođenje MTT testa korištene su sljedeće kemikalije:

- MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Sigma) otopljen je u PBS-u u koncentraciji 10 mg/ml
- 0,04 M HCl u apsolutnom izopropanolu (Kemika, Zagreb)

POSTUPAK:

1. Uzgoj kulture stanica A549 do eksponencijalne faze rasta (24-satna inkubacija pri 37° C, 95% vlažnosti i 5% CO₂).
2. Razrjeđivanje stanica RPMI 1640 hranjivim medijem (Imunološki zavod, Zagreb) do gustoće od 70 000 stanica/mL.
3. Aplikacija 100 µL suspenzije stanica u određeni broj jažica mikrotitarske pločice sa 96 jažica, inkubacija 24 h.
4. Promjena medija i inkubacija u mediju bez seruma 18 h.
5. Stanicama dodajemo mikotoksine i otapalo (20%DMSO/etanol) kao kontrolu (3,4% i 8,8%), inkubacija 24 h.
6. Pažljivo uklonimo medij i dodamo u svaku jažicu po 100 µL MTT-a razrijeđenog hranjivim medijem do koncentracije 0,5 mg MTT/ mL medija, inkubiramo 3,5 sata pri temperaturi 37° C, 95% vlažnosti, 5% CO₂.
7. Pažljivo uklonimo medij odsisavanjem s vakuum sisaljkom.

8. U svaku jažicu doda se po 200 μ L 0,04M HCl u apsolutnom izopropanolu i ostavi 15 minuta na tresilici kako bi nastali formazan prešao iz stanice u medij.
9. Pomoću čitača mikrotitarske pločice (VICTOR³ 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer) očitamo apsorbanciju pri 595 nm.

3.4. STATISTIČKA OBRADA

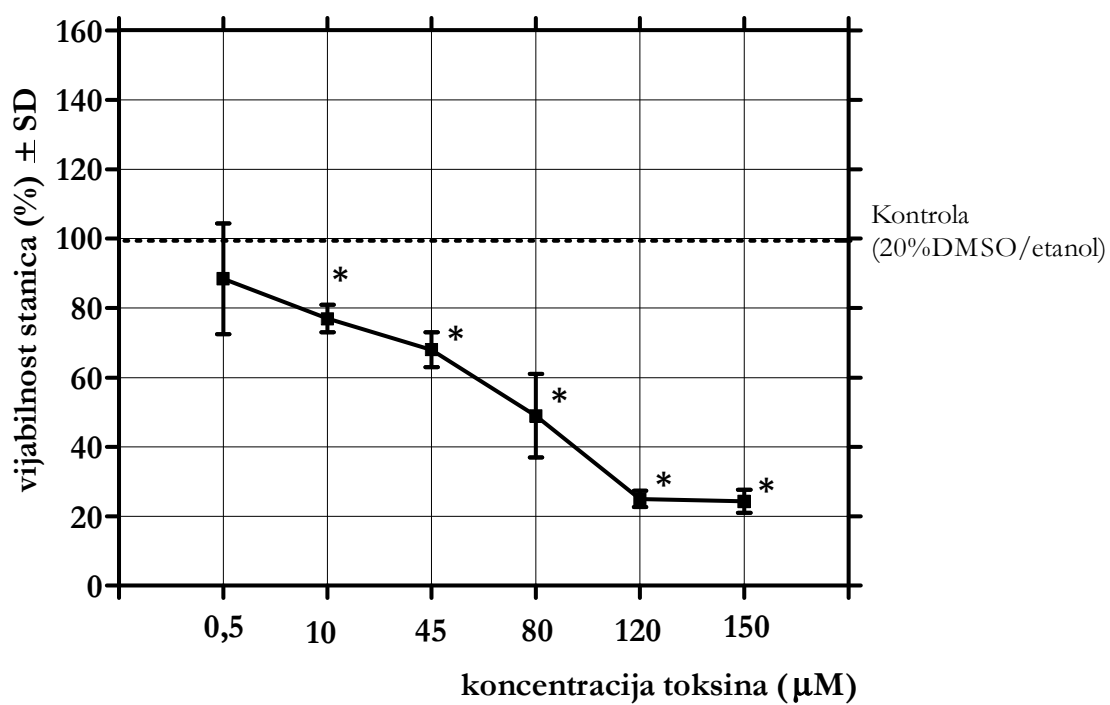
Rezultati dobiveni mjerenjem vijabilnosti (n=4) MTT testom izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD). Testiranje značajnosti promjena u pokusnim skupinama u odnosu na kontrolu (20% DMSO/etanol) provedeno je jednosmjernom analizom varijance (One way-ANOVA) i Tukey post testom multiple komparacije na razini značajnosti $P < 0,05$. Linearnom regresijom procjenjene su citotoksične koncentracije koje smanjuju vijabilnost A549 stanica za 50% (IC_{50}).

4. REZULTATI

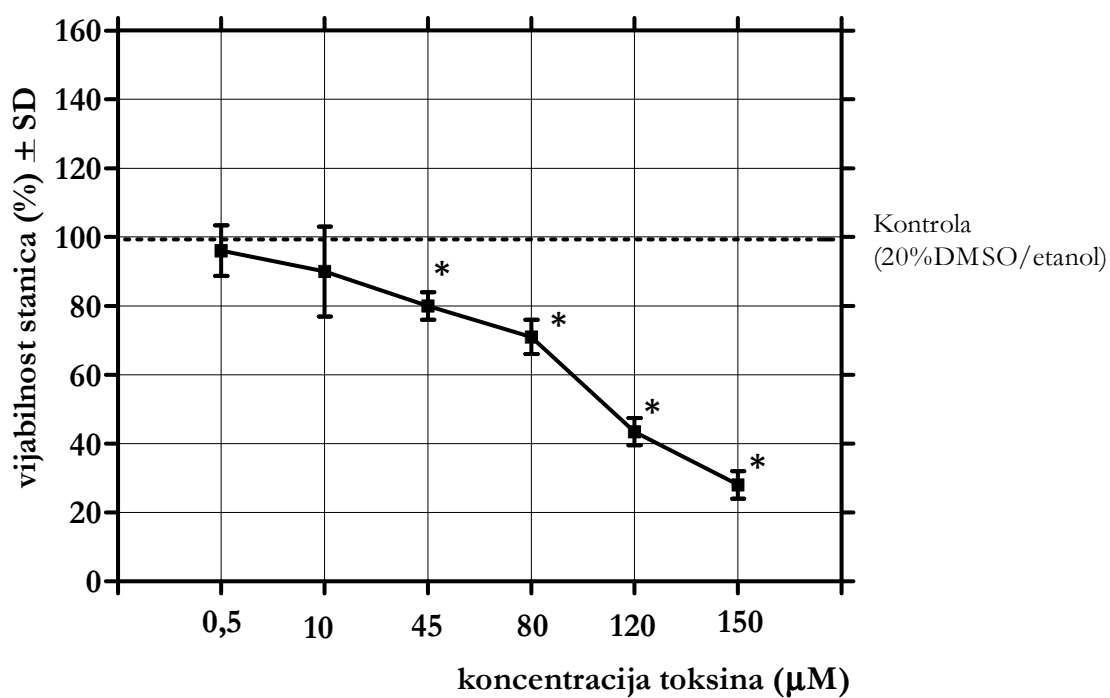
Rezultati ispitivanja citotoksičnosti VER A, VER B, 6-DEOKSI-VER A i 5-MET-ST na A549 stanicama prikazani su na slikama 3-6. Stanice su bile izložene djelovanju rastućih koncentracija pojedinih prekursora tijekom 24 h: VER A i 6-DEOKSI-VER A aplicirani su u koncentracijama 0,5, 10, 45, 80, 120 i 150 μM , a VER B i 5-MET-ST u koncentracijama 0,5, 10, 45, 80, 150, 200 i 250 μM .

Iz rezultata je vidljivo da najtoksičnije djeluje 6-DEOKSI-VER A koji već kod koncentracije od 10 μM statistički značajno smanjuje vijabilnost (za 23%) u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Nešto manje toksično djelovanje pokazao je VER A koji značajnije smanjuje preživljavanje stanice (za 20%) kod koncentracije 45 μM . VER B i 5-MET-ST su znatno manje toksični jer značajno smanjuju vijabilnost stanica (za oko 20%) u koncentraciji od 80 μM . Također, VER B i 5-MET-ST u najmanjoj koncentraciji (0,5 μM) djeluju proliferativno na A549 stanice. Naime, vijabilnost stanica je za 15%, odnosno 4% veća u usporedbi s kontrolom. Nakon tretmana s najvećim koncentracijama pojedinih aflatoksinskih prekursora vijabilnost stanica se smanjuje za oko 70%.

Na temelju rezultata dobivenih MTT testom procijenjene su citotoksične koncentracija ispitivanih prekursora tj. koncentracija (IC_{50}) koja za 50% smanjuje vijabilnost stanica: $78 \pm 12 \mu\text{M}$ (6-DEOKSI-VER A); $109 \pm 3,5 \mu\text{M}$ (VER A); $172 \pm 4 \mu\text{M}$ (VER B) i $181 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (5-MET-ST). Iz vrijednosti IC_{50} vidljivo je da je 6-DEOKSI-VER A za 30% toksičniji od VER A, odnosno dvostruko toksičniji od VER B i 5-MET-ST.

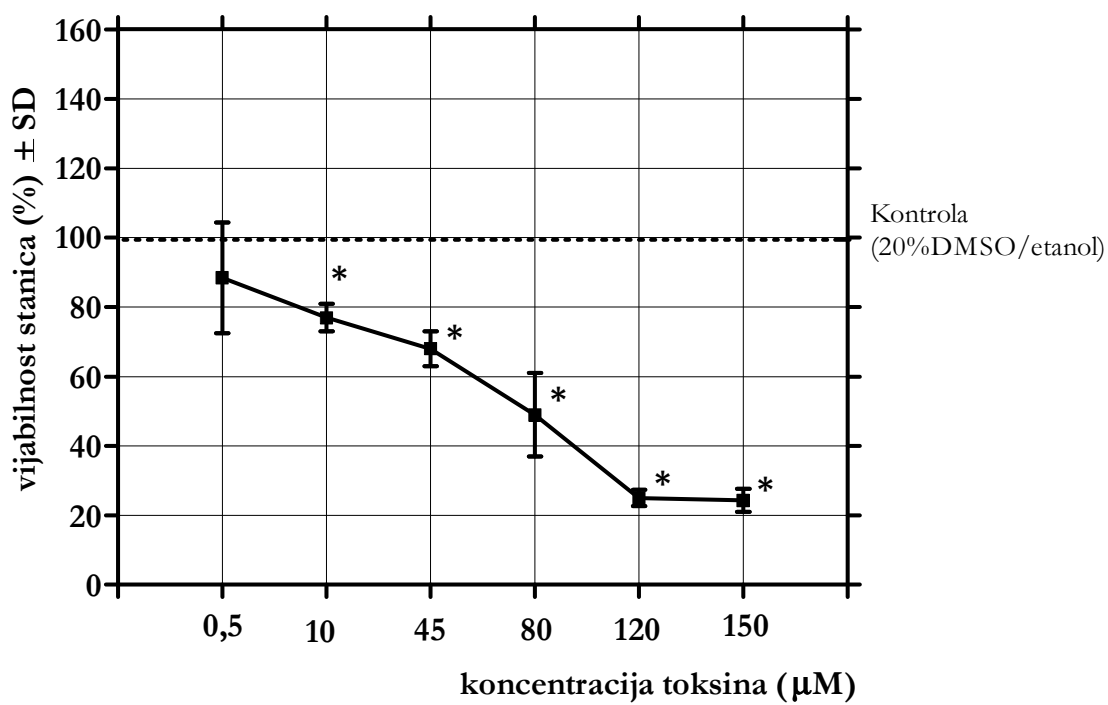


a)

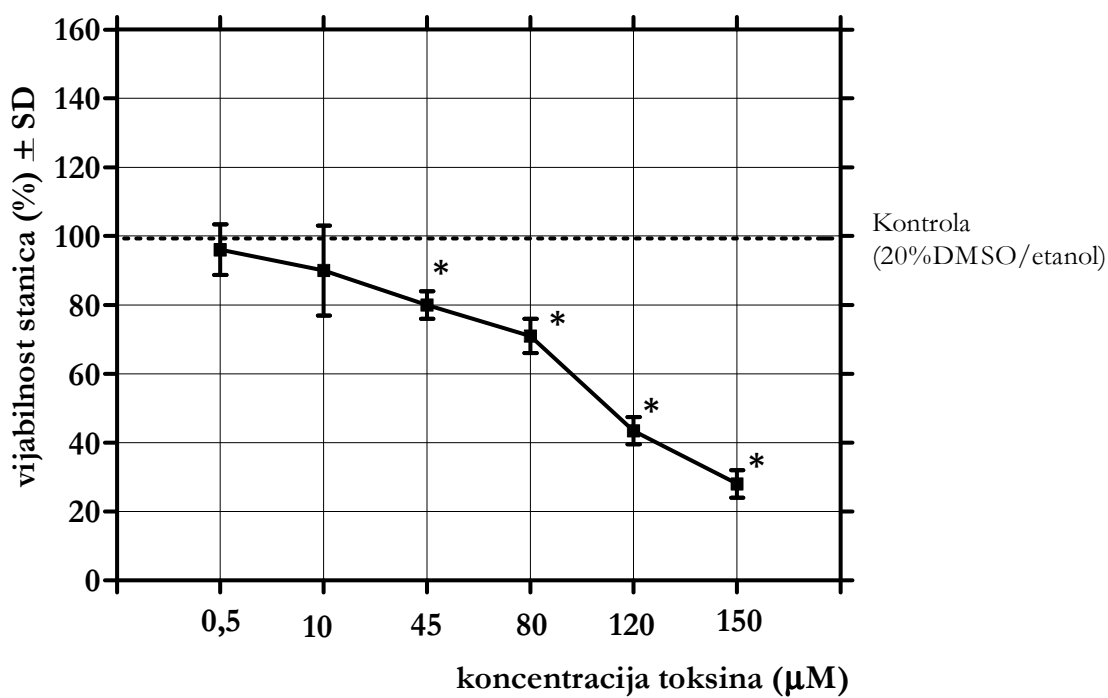


b)

Slika 3. Citotoksičnost 6-DEOKSI-VER A (a) i VER A (b) na A549 stanicama. * statistička značajnost u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).

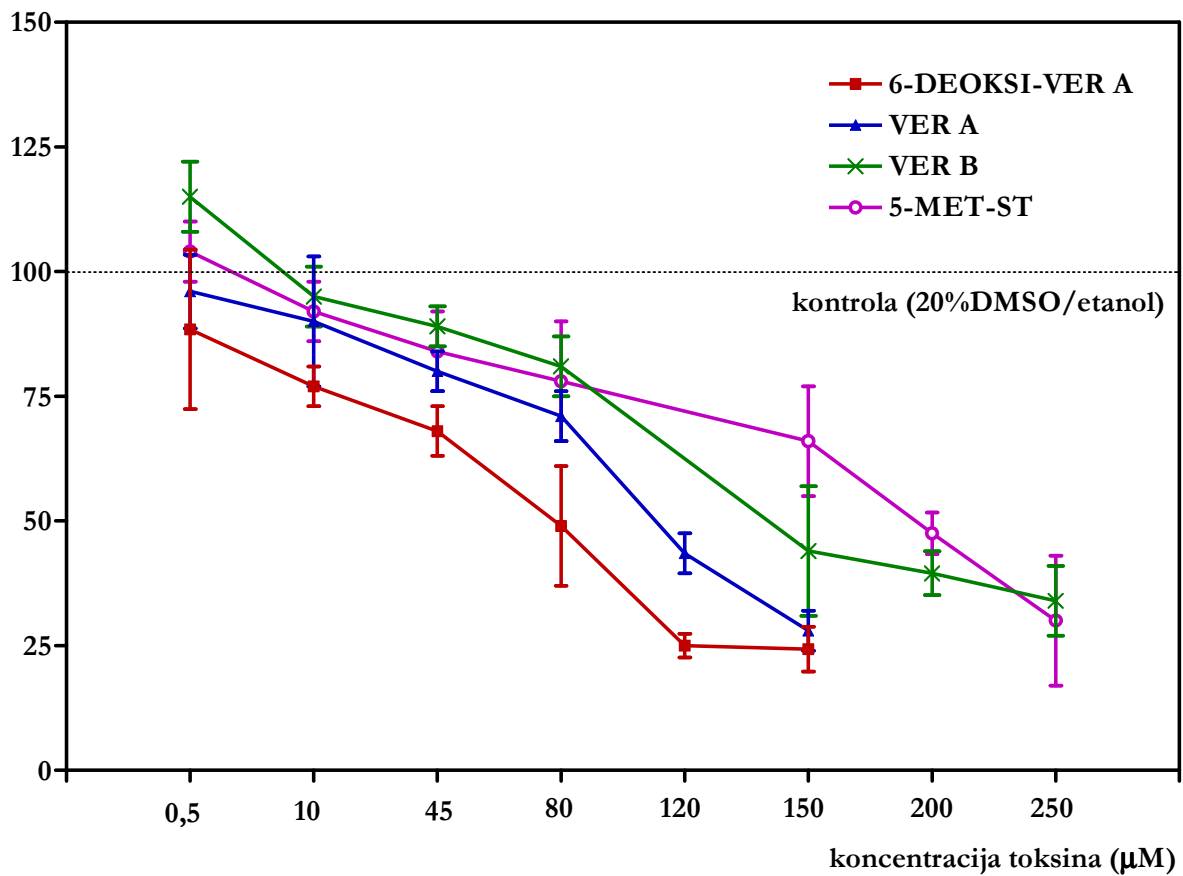


a)



b)

Slika 4. Citotoksičnost VER B (c) i 5-MET-ST (d) na A549 stanicama. * statistička značajnost u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).



Slika 5. Usporednih prikaz citotoksičnosti aflatoksinskih prekursora na A549 stanicama

5. RASPRAVA

U proteklih 50-tak godina provedena su brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja mehanizama toksičnosti i karcinogenosti aflatoksina i njihovog prekursora sterigmatocistina (ST). Također je odavno razjašnjen biosintetski put aflatoksina te su izolirani i kemijski karakterizirani svi njihovi prekursori (Dutton 1988) od kojih nekolicina ima furofuranski prsten koji se smatra odgovornim za biološke učinke aflatoksina. Međutim, nema podataka o citotoksičnom djelovanju tih biosintetskih intermedijera furofuranske strukture. Stoga je ovaj rad prvo izvješće o citotoksičnom potencijalu nekih prekursora u biosintezi aflatoksina uključujući VER A, VER B, 6-DEOKSI-VER A i 5-MET-ST. Uspoređujući IC_{50} ST ($3,7 \mu M$) i AFB_1 ($10 \mu M$) za A549 stanice (Bünger i sur. 2004; Mckean i sur. 2005) sa IC_{50} vrijednostima procjenjenim za 6-DEOKSI-VER A, VER A, VER B i 5-MET-ST vidljiva je znatna razlika u citotoksičnom potencijalu. Naime, 6-DEOKSI-VER A ($IC_{50}=78 \pm 12 \mu M$) je oko 8 puta manje toksičan od AFB_1 , odnosno oko 20 puta manje toksičan od ST za A549 staničnu liniju. Citotoksičnost ostalih ispitivanih prekursora je čak između 10 i 20 puta manja od AFB_1 te između 30 i 50 puta manja od ST. Primjenom 5-MET-ST i VER B u koncentraciji $0,5 \mu M$ uočeno je proliferativno djelovanje. Naime, 5-MET-ST povećavao je vijabilnost stanica za oko 5%, a VER B za oko 15% u odnosu na kontrolu. Ove razlike u citotoksičnom potencijalu aflatoksinskih prekursora mogle bi se dovesti u vezu s razlikama u njihovim lipofilnim svojstvima i mehanizmu biotransformacije. Naime, AFB_1 i ST imaju dihidrofurofuransku lipofilnu jezgru koja omogućava lako prolaženje kroz stanične membrane, a ujedno je i ciljno mjesto biotransformacije. Na mjestu C_8-C_9 dihidrofurofurana biotransformacijom nastaje epoksid koji iskazuje visok afinitet za nukleofilne centre kao što su lizinski ostaci na proteinima ili pak guaninski ostaci na molekuli DNA. Ukoliko je upravo ovo glavni mehanizam toksičnosti AFB_1 i ST, logična je pretpostavka da bi i ostali dihidrofurofuranski metaboliti kao što su VER A, 6-DEOKSI-VER A i 5-MET-ST mogli slijediti isti put biotransformacije, a onda i ispoljavati slične toksične učinke. Međutim, male promjene u strukturi ovih prekursora očito značajno utječu na omjer lipofilnost/hidrofilnost što se odražava na prolaz kroz staničnu membranu, a time i na njihovu biotransformaciju. S druge strane, VER B ima približno istu lipofilnost kao i VER A, ali njegov tetrahidrofurofuranski prsten vjerojatno ne podliježe istom procesu biotransformacije čime se može objasniti njegova slabija citotoksičnost. Valja pripomeniti da s citotoksičnošću interferira obrambeni detoksifikacijski sustav stanice, primjerice glutation-S-transferaze (GST). Drugi mogući scenarij mehanizma citotoksičnosti ovih supstancija uključuje njihovo nakupljanje u staničnoj membrani što može dovesti do poremećaja u njezinoj fluidnosti. To će opet ovisiti o veličini, konformaciji i polarosti toksina (Thompson i Wannemacher, 1984).

Ako uspoređujemo citotoksičnost AFB₁ i ST na različitim staničnim linijama uočavamo znatne razlike između IC₅₀ vrijednosti. Pri tom su se A549 stanice pokazale izrazito osjetljive. Primjerice za ST je procijenjena IC₅₀ vrijednost 3,7 μM za staničnu liniju A549, 40,1 μM za staničnu liniju mišje neuroblastome Neuro-2a, a čak 163,3 μM za vezivne mišje L-929 stanice odnosno 286,1 μM za humane hepatoma Hep-G2 stanice (Bünger i sur. 2004). Najmanja IC₅₀ za AFB₁ izmjerena je na transformiranim humanim stanicama bronhalnog epitela B-CMV1A2 (0,065 μM), dok su veće citotoksične koncentracije utvrđene za HepG₂ stanice (1,0 μM), A549 stanice (10 μM) te 14 μM za embrionalne stanice vola BE12-6 (Mckean i sur. 2005; Lewis i sur. 1999; Terse i sur. 1993.). Ove varijacije proizlaze iz činjenice da enzimski sastav i aktivnost određenih enzima kao i ekspresija gena za određene enzime ovise o vrsti organizma i tkiva. Ova hipoteza dokazana je testom citotoksičnosti AFB₁ na stanicama humanog bronhalnog epitela BEAS-2B koje ne stvaraju aktivne metabolite aflatoksina. MTT testom određena IC₅₀ koncentracija iznosila je 348 μM (Mckean i sur. 2005). Stoga su stanice A549 koje sadrže enzime citokrom P₄₅₀ sustava, prostaglandin-H-sintazu, lipooksigenazu, epoksid hidrolazu i druge bioaktivacijske enzime bile dobar model za ispitivanje citotoksičnosti aflatoksinskih prekursora.

Aflatoksini i njihovi prekursori mogu se ovisno o fazi biosinteze nalaziti u sporama i dijelovima micelija. Ove aerogene čestice plijesni mogu biti prisutne u zatvorenim prostorima u manjim ili većim koncentracijama što ovisi o temperaturi i aktivitetu vode. *Aspergillus* vrste pripadaju primarnim kolonizatorima što znači da mogu na vlažnim zidovima rasti pri aktivitetu vode < 0,8 dok sekundarni (primjerice alternarije i kladosporije) i tercijarni kolonizatori (primjerice *Stachybotrys*) zahtijevaju veću količinu slobodne vode ($a_w > 0,8$, tj., >0,96) (Nielson, 2003). Sporulacija, ali i tvorba toksina kod različitih vrsta roda *Aspergillus* različito je osjetljiva na varijabilnost ovih okolišnih čimbenika. Tako će na sporulaciju vrsta *A. nidulans*, *A. niger* i *A. ochraceus* više utjecati temperaturne promjene, dok će varijabilnost temperature i aktiviteta vode podjednako utjecati na sporulaciju vrsta *A. flavus* i *A. versicolor*. Primjerice, najviše koncentracije AFB₁ i G₁ (> 100 mg/kg) akumulirane su u konidijama i sklerocijima vrste *A. flavus* pri aktivitetu vode $a_w = 0,96$ i temperaturi $t = 26$ °C (Vujanović i sur., 2001). Analizom građevnih materijala (žbuka, drvo, gips i različiti sintetski materijali) iz vlažnih zatvorenih prostora utvrđena je dominantna kontaminacija vrstama roda *Aspergillus*, posebice *A. versicolor* (41%) (Šegvić Klarić i sur., 2007). Tuomi i sur. (2000) su u 24% uzoraka građevnog materijala dokazali ST u koncentraciji 0,8-320 μg/kg. Obzirom na ove relativno visoke koncentracije AFB₁ u sporama plijesni, odnosno ST u građevnom materijalu, mogli bismo očekivati i veće koncentracije ispitivanih aflatoksinskih prekursora u navedenim materijalima, ovisno o fazi biosinteze kod plijesni-producenata. Obzirom na činjenicu da novija vrsta plijesni *A. rambellii* uz AFB₁ akumulira

i veliku količinu 3-O-metilsterigmatocistina, jednog od biosintetskih preteča (Frisvad i sur. 2005), moguće je da postoje vrste plijesni koje će akumulirati veće količine ovim radom ispitanih toksičnih prekursora aflatoksina- VER A, VER B, 6-DEOKSI-VER A i 5-MET-ST.

Poznato je da kod ljudi koji žive u vlažnim stanovima simptomi bolesti kao što su infekcije dišnog sustava, iritacije respiratornih mukoznih membrana, akutna i kronična oštećenja respiratornih organa, konjunktivitis te mikotoksikoze mogu biti posljedica alergijskih i/ili toksičnih učinaka sastojaka staničnog zida plijesni i mikotoksina (Flappan i sur. 1999; Schulz i sur. 2004). Ipak, ne može se procijeniti rizik inhalacije mikotoksina na temelju analize uzoraka građevnog materijala i zraka vlažnih stanova, čak i ako je poznata doza odgovora na mikotoksin (Tuomi i sur. 2000). No, važno je pripomenuti kako inhalacija mikotoksina rezultira nekoliko puta većom toksičnošću od dermalne ili sistemske administracije (Pang i sur. 1988; Creasia i sur. 1987; Nikulin i sur 1997). *Aspergillus* toksini direktnim djelovanjem na respiratorni trakt uzrokuju oštećenje epitela i mukozne membrane. Jesenská i suradnici 1994. ispitali su djelovanje mikotoksina u uvjetima *in vitro* na pokretljivost trepetljivog epitela dušnika izoliranog iz pilića starih jedan dan. Toksini AFB₁, AFB₂, AFM₁ i ST primjenjeni su u koncentraciji od 30 µg/L. AFB₁, AFB₂ i AFM₁ pokazali su gotovo istu učinkovitost i nakon šest dana postignuta je inhibicija pokretljivosti cilija, dok je primjenom ST do inhibicije došlo već nakon dva dana. Na istom je modelu ispitano i ciliostatsko djelovanje kloroformskih ekstrakata metabolita plijesni izoliranih iz uzoraka vlažnih zidova. Među njima je dominantno bila prisutna plijesan *Aspergillus versicolor*. Primjenom ekstrakta plijesni *A. versicolor*, potencijalnog producenta ST, u koncentraciji 20 µg/ml uočeno je ciliostatsko djelovanje nakon 72 sata. Dokazano je i imunosupresivno djelovanje nakon nazalne primjene AFB₁ aerosola (16,8 µg/kg) štakorima. Učinak je trajao dva tjedna, a očitovao se sprječavanjem fagocitoze alveolarnih makrofaga (Jakab i sur. 1994). Na temelju ovih saznanja možemo pretpostaviti da bi i furofuranski prekursori aflatoksina i sterigmatocistina koji se mogu naći u sporama plijesni mogli imati sličan učinak na pokretljivost cilijarnog epitela kao i na aktivnost alveolarnih makrofaga pogotovo kod dugotrajne izloženosti ljudi visokim koncentracijama spora plijesni bilo zbog nepovoljnih životnih uvjeta (vlažni stanovi) ili zbog profesionalne izloženosti. Kočenjem imunološkog odgovora povećava se osjetljivost dišnog sustava na različite alergene i mikroorganizme. Tako aflatoksini mogu uzrokovati ili pogoršavati postojeće kronične bolesti respiratornog trakta. Primjerice, AFB₁ je dokazan u plućima jednog tekstilnog radnika i dvaju poljoprivrednika koji su umrli od pulmonarne intersticijalne fibroze te inženjera kemije koji je umro od plućne adenomatoze nakon dugotrajne izloženosti aflatoksinima putem inhalacije prašine kikirikija (Dvorackova i Pichova, 1986; Dvorackova 1976). Mnoge kronične plućne bolesti čiji su simptomi vrlo slični uobičajnim nespecifičnim plućnim bolestima

(npr. kronični bronhitis) ili pogrešno dijagnosticiranom alergijskom alveolitisu mogle bi biti izazvane dugotrajnim izlaganjem aflatoksinima (May i sur. 1986; Ghio i Roggli 1995).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja toksičnosti furofuranskih prekursora biosinteze aflatoksina može se zaključiti sljedeće:

- Ispitivani prekursori su toksični za A549 stanice u koncentracijama IC_{50} : $78 \pm 12 \mu\text{M}$ (6-DEOKSI-VER A); $109 \pm 3,5 \mu\text{M}$ (VER A); $172 \pm 4 \mu\text{M}$ (VER B) i $181 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (5-MET-ST).
- Iz vrijednosti IC_{50} vidljivo je da je 6-DEOKSI-VER A za 30% toksičniji od VER A, odnosno dvostruko toksičniji od VER B i 5-MET-ST.
- 6-DEOKSI-VER A je oko 8 puta manje toksičan od AFB_1 ($10 \mu\text{M}$), odnosno oko 20 puta manje toksičan od ST ($3,7 \mu\text{M}$) za A549 staničnu liniju. Citotoksičnost ostalih ispitivanih prekursora je čak između 10 i 20 puta manja od AFB_1 te između 30 i 50 puta manja od ST.
- VER B i 5-MET-ST u koncentraciji $0,5 \mu\text{M}$ djeluju proliferativno na A549 stanice.
- Razlike u citotoksičnom potencijalu aflatoksinskih prekursora vjerojatno su posljedica malih promjena u strukturi koje očito značajno utječu na omjer lipofilnost/hidrofilnost što se odražava na prolaz kroz staničnu membranu, a time i na njihovu biotransformaciju.
- Obzirom da aflatoksini i sterigmatocistin uzrokuju oštećenja stanica respiratornog sustava može se pretpostaviti da bi njihovi furofuranski prekursori mogli doprinjeti razvoju takvih poremećaja, posebice kod dugotrajne izloženosti većim koncentracijama spora plijesni-producenta.

7. LITERATURA

- Bhatnagar R. K., Ahmad S., Mukerji K. G., Subramanian T. A. V., Nitrogen metabolism in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin production, J. Appl. Bacteriol. 60 (1986) 203-211.
- Bhatnagar R. K., Ahmad S., Mukerji K. G., Subramanian T. A. V., Pyridine nucleotides and redox state regulation of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*, J. Appl. Bacteriol. 60 (1986) 135-141.
- Brown D., Yu J.-H., Kelkar H., Fernandes M., Nesbitt T., Keller N. P., Adams T. H., Leonard T., Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 1418-1422.
- Bünger J., Westphal G., Mönnich A., Hinnendahl B., Hallier E., Müller M., Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins, Toxicology 202 (2004) 199-211.
- Calvo A. M., Wilson R. A., Bok J. W., Keller N. P., Relationship between secondary metabolism and fungal development, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66 (2002) 447-459.
- Creasia D., Thurman J. D., Jones L. J., Nealley M. L., York C. G., Wannemacher R. W., Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice, Fund. Appl. Toxicol. 8 (1987) 230-235.
- Dave E. L., Gallhager E. P., Mechanism of aflatoxin carcinogenesis, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 34 (1994) 135-172.
- Dutton M. F., Enzymes and aflatoxin biosynthesis, Microbiol. Rev. 52 (1988) 274-295.
- Dvorackova I., Aflatoxin and alveolar cell carcinoma, Br. Med. J. I (1976) 691.
- Dvorackova I., Pichova V., Pulmonary interstitial fibrosis with evidence of aflatoxin B₁ in lung tissue, J. Toxicol. Environ. Health 18 (1986) 153-157.
- Flappan S.M., Portnoy J., Jones P., Barnes C., Infant pulmonary hemorrhage in a suburban home with water damage and mold (*Stachybotrys atra*), Environ. Health Perspect. 107 (1999) 927-930.
- Frisvad J. C., Skouboe P., Samson R. A., Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-

- O- methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov., Syst. Appl. Microbiol. 28 (2005) 442-453.
- Ghio A. J., Roggli V. L., Mycotoxins and interstitial lung disease, Chest 108 (1995) 1185- 1186.
- IARC, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. WHO, Lyon, France (1993).
- Jakab G., Hmieleski R. R., Zarba A., Hemenway D. R., Groopman J. D., Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice, Toxicol. Appl. Pharmacol. 125 (1994) 198-205.
- JECFA, Aflatoxin M₁. U: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (ur.), Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO/FAO Food additives Series 47. IPCS – International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva (2001).
- Jesenská Z., Bernát D., Effect of mycotoxins on in vitro movement of tracheal cilia from one-day-old chicks, Folia Microbiol. 39 (1994) 155-158.
- Krishnamachari K. A., Bhat V. R., Nagarajon R. V., Tilek T. B. G., Hepatitis due to aflatoxicosis, Lancet 1 (1975) 1061-1063.
- Lewis C. W., Smith J. E., Anderson J. G., Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines *in vitro* via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay, Mycopathologia 148 (1999) 97-102.
- Mateles R. I., Abye J. C., Production of aflatoxins in submerged culture, Appl. Microbiol. 13 (1965) 208-211.
- May J. J., Stallones L., Darrow D., Pratt D. S., Organic dust toxicity (pulmonary mycotoxicosis) associated with silo unloading, Thorax 41 (1986) 919-923.
- McKean C., Tang L., Tang M., Billam M., Wang Z., Theodorakis C. W., Kendall R. J., Wang J. S., Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ in animals and human cells, Food Chem. Toxicol. 44 (2006) 868-876.
- Mori H., Kawai K., Ohbayashi F., Kuniyasu T., Yamazaki M., Hamasaki T., Williams G. M., Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes, Cancer Res. 44 (1984) 2918-2923.

- Mori H., Kitamura J., Sugie S., Kawai K., Hamasaki T., Genotoxicity of fungal metabolites related to aflatoxin B₁ biosynthesis, *Mutat. Res.* 143 (1985) 121-126.
- Mori H., Sugie S., Yoshimi N., Kitamura J., Niwa M., Hamasaki T., Kawai K., Genotoxic effects of a variety of sterigmatocystin-related compounds in the hepatocyte/ DNA- repair test and the Salmonella microsome assay, *Mutat. Res.* 173 (1986) 217-222.
- Moss M. O., Mycotoxin review- 1. *Asperillus* and *Penicillium*, *Mycologist* 16 (2002) 116-119.
- Nielsen K. F., Mycotoxin production by indoor molds, *Fungal Genet. Biol.* 39 (2003) 103-117.
- Nikulin M., Reijula K., Jarvis B., Veijalainen P., Hintikka E. L., Effects of intranasal exposure to spores of *Stachybotrys atra* in mice, *Fund. Appl. Toxicol.* 35 (1997) 182-188.
- Ožegović L., Pepeljnjak S., Mikotoksikoze, Školska knjiga, Zagreb (1995).
- Palanee T., Dutton M. F., Chutugoon A. A., Cytotoxicity of aflatoxin B₁ and its chemically synthesised epoxide derivative on the A549 human epitheloid lung cell line, *Mycopathologia* 151 (2000) 155-159.
- Palanee T., Dutton M. F., Chuturgoon A. A., Cytotoxicity of aflatoxin B₁ and its chemically synthesised epoxide derivative on the A549 human epitheloid lung cell line. *Mycopathologia* 151 (2000) 155-159.
- Pang V., Lambert R. J., Felsburg P. J., Beasley V. R., Buck W. B. Haschek W. M., Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: clinical signs and effects on hematology, serum biochemistry and immune response, *Fund. Appl. Toxicol.* 11 (1988) 100-109.
- Piecková E., Jesenská Z., Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans, *Ann Agric. Environ. Med.* 6 (1999) 1-11.
- Piecková E., Jesenská Z., Molds on house walls and the effect of their chloroform-extractable metabolites on the respiratory cilia movement of one-day-old chicks *in vitro*, *Folia Microbiol.* 43 (1998) 672-678.
- Rodricks J. V., Fungal metabolites which contain substituted 7,8- dihydrofuro-[2,3-*b*]furans (DHFF) and 2,3,7,8- tetrahydrofuro [2,3-*b*]furans (THFF) *J. Agr. Food Chem.* 17 (1969) 457-461.

- Schulz T., Senkpiel K., Ohgke H., Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 267-277.
- Šegvić Klarić M., Kosalec I., Mastelić J., Piecková E., Pepeljnjak S., Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings, *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (2007) 36-42.
- Terse P., Madhyastha M. S., Zurovac O., Stringfellow D., Marquardt R. P., Kemppainen B. W., Comparison of *in vitro* and *in vivo* biological activity of mycotoxins, *Toxicon* 31 (1993) 1-7.
- Thompson W. L., Wannemachere R. W., Detection and quantitation of T-2 toxin with a simplified protein synthesis inhibition assay, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 1176-1180.
- Trail F., Mahanti N., Linz J., Molecular biology of aflatoxin biosynthesis, *Microbiology* 141 (1995) 755-765.
- Tuomi T., Reijula K., Johnsson T., Hemminki K., Hintikka E.-L., Lindroos O., Kalso S., Koukila-Kähkölä P., Mussalo-Rauhamaa H., Haahtela T., Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 1899-1904.
- Tuomi T., Reijulä K., Mycotoxins of aspergilli; exposure and health effects, *Front. Biosci* 8 (2003) 232-235.
- Ueno Y., Kubota K., Ito T., Nakamura Y., Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.* 38 (1978) 536-542.
- Vujanović V., Smoragiewicz W., Krzysztyniak K., Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air, *Environ. Toxicol.* 16 (2001) 1-8.
- Yu J., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Cloning of a sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*, *Biochem. Biophys. Acta* 1493 (2000) 211-214.
- Yu J., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*, *FEBS Lett.* (2004) 126-130.

8. SAŽETAK

Mnogobrojnim istraživanjima potvrđeni su citotoksični, mutageni i kancerogeni učinci aflatoksina. Neke *Aspergillus* vrste koje su potencijalni producenti aflatoksina mogu u svojim sporama i dijelovima micelija osim aflatoksina sadržavati i njihove prekursore ovisno o fazi biosinteze. Mali broj istraživanja posvećen je ispitivanju bioloških učinaka aflatoksinskih prekursora među kojim mnogi sadrže furofuranski prsten koji se smatra odgovornim za biološke učinke aflatoksina.

Stoga smo ovim radom željeli ispitati citotoksičnost nekih dihidrofurofuranskih (verzikolorin A ili VER A, 6-deoksiverzikolorin A ili 6-DEOKSI-VER A i 5-metilsterigmatocistin ili 5-MET-ST) i tetrahidrofurofuranskih intermedijera (verzikolorin B ili VER B). Za ispitivanje citotoksičnosti u uvjetima *in vitro* odabrana je kultura stanica adenokarcinoma pluća čovjeka (A549), a preživljavanje stanica je mjereno kolorimetrijskim MTT testom na 595 nm. Stanice su bile izložene rastućim koncentracijama 6-DEOKSI-VER A i VER A (od 0,5 do 150 μM), odnosno VER B i 5-MET-ST (od 0,5 do 250 μM) tijekom 24 h. Pri tom su utvrđene citotoksične koncentracije koje smanjuju vijabilnost stanica za 50%: $\text{IC}_{50}=78 \pm 12 \mu\text{M}$ (6-DEOKSI-VER A) ; $109 \pm 3,5 \mu\text{M}$ (VER A); $172 \pm 4 \mu\text{M}$ (VER B) i $181 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (5-MET-ST). VER B i 5-MET-ST u koncentraciji 0,5 μM djeluju proliferativno na A549 stanice. Razlike u citotoksičnom potencijalu aflatoksinskih prekursora vjerojatno su posljedica malih promjena u strukturi koje očito značajno utječu na omjer lipofilnost/hidrofilnost što se odražava na prolaz kroz staničnu membranu, a time i na njihovu biotransformaciju. Ovaj rad je ujedno i prvo izvješće o citotoksičnom potencijalu furofuranskih prekursora biosinteze aflatoksina.

Ključne riječi: aflatoksini, sterigmatocistin, furofuranski prsten, stanična linija A549, citotoksičnost

9. SUMMARY

Many studies have been carried out to elucidate cytotoxic, mutagenic and carcinogenic activity of aflatoxins. Some aspergilli that produce aflatoxins may contain some of the precursors of aflatoxin biosynthesis in their spores depending on the stage of aflatoxin production. A limited number of research has been carried out on biological effects of aflatoxin precursors that contain furofuran ring, which is incriminated for toxic effects of aflatoxins.

Therefore, the purpose of our study was to determine cytotoxicity of some dihydrofurofurans (vericolorin A or VER A, 6-deoxyversicolorin A or 6-DEOXY-VER A and 5-methoxysterigmatocystin or 5-MET-ST) and tetrahydrofurofurans (versicolorin B or VER B). Cytotoxicity of these compounds was determined for human adenocarcinoma cell line A549 using colorimetric MTT assay (at 595 nm). Cells were exposed to various concentrations of VER A and 6-DEOXY-VER A (from 0.5 to 150 μM) as well as VER B and 5-MET-ST (from 0.5 to 250 μM) for 24 hours. Cytotoxic concentrations of tested compounds that inhibited 50% of cell viability (IC_{50}) were: $\text{IC}_{50}=78 \pm 12 \mu\text{M}$ (6-DEOXY-VER A); $109 \pm 3,5 \mu\text{M}$ (VER A); $172 \pm 4 \mu\text{M}$ (VER B) i $181 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (5-MET-ST). VER B and 5-MET-ST applied at 0.5 μM exerted proliferative effect. Differences in cytotoxic potential of tested compounds are probably the result of some changes in their structure which might affect lipophilicity/hydrophilicity ratio and therefore their transfer through cell membrane as well as their biotransformation. To our knowledge this is the first report on cytotoxic potential of furofuran precursors in afltoxin biosynthesis.

Key words: aflatoxins, sterigmatocystin, furofuran ring, cell line A549, cytotoxicity.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na uloženom trudu i vremenu te posebno na ukazanom povjerenju, podršci i svom znanju i vještinama koje sam stekla tijekom izrade ovoga rada. Vjerujem da će mi itekako koristiti u budućnosti. Također se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Ivanu Kosalecu koji je ostvario suradnju s dr. Oliver Puel-om s instituta «Institut National de la Recherche Agronomique» u Francuskoj (INRA, UR66 Pharmacologie-Toxicologie F-31931 Toulouse, Francuska) te tako omogućio ovo istraživanje.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. rujna 1985. godine u Splitu gdje sam završila osnovnu i srednju zdravstvenu školu usmjerenja farmaceutski tehničar. Maturirala sam 2004. godine. Po završetku srednje škole odradila sam pripravnički staž u ljekarni (Z.U. PHYTO PHARMA) u trajanju od 12 mjeseci. Godine 2005. upisala sam Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu i trenutno sam redovna studentica četvrte godine smjera farmacija. Od travnja 2009. stipendistica sam Atlantic grupe. Još od srednje škole privlačio me istraživački rad te sam bila član organizacije SEMEP (South Eastern Mediterranean Sea Project) i sudjelovala u Ljetnoj školi na otoku Visu 2003. te Hrvatskim danima SEMEP-a u Bakru 2003. Tijekom studija, istraživačka ambicija se nastavila, a poseban interes prema temama iz mikrobiologije rezultirao je sudjelovanjem u ovom znanstvenom radu.

Curriculum Vitae

I was born in Split on 13th September 1985 where I finished Elementary School and Medical High School for pharmaceutic technician. Since 2005 I am a student of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry on the University of Zagreb and now I am on the 4th year. From the April 2009 I am a stipendiary of Atlantic group.

During highschool I was interested in research projects so I was a member of the organisation SEMEP (South Eastern Mediterranean Sea Project) and I attended Summer school which took place on the island of Vis 2003, and in the same year I was in Bakar where was assembly anent of the Croatian days of SEMEP.

During studying, ambition for scientific work continued, and special interest for the microbiology have led to this project.