

# Utjecaj sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina na koncentraciju albumina i aktivnost laktat dehidrogenaze u bronholaveolarnoj tekućini Wistar štakora

---

Molnar, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:319896>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivona Molnar

**Utjecaj sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina  
na koncentraciju albumina i aktivnost laktat  
dehidrogenaze u bronhoalveolarnoj tekućini u muških**

**Wistar štakora**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Rašić, više znanstvene suradnice i prof. dr. sc. Domagoja Đikića, redovitog profesora na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar/magistra eksperimentalne biologije.

Rezultati ovoga rada dio su znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA IP-09-2014-5982) koji je financirala Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ.

## Zahvale

Prije svega, posebno hvala mentorici dr. sc. Dubravki Rašić na podršci, trudu i vremenu.

Hvala mentoru prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pomoći i usmjerenju na stručnu praksu iz koje je proizašao ovaj diplomski rad.

Hvala obitelji na razumijevanju, posebno mami Anici.

Hvala dragim ljudima s faksa koji su mi uljepšali studiranje – Marijani, Ani i Marinu.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina na koncentraciju albumina i aktivnost laktat dehidrogenaze u bronhoalveolarnoj tekućini u muških Wistar štakora

Ivona Molnar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mikotoksini su raznolika skupina sekundarnih metabolita plijesni koji se mogu pronaći u hrani za ljude i životinje te zraku pljesnivih stambenih prostora. Uzrokuju bolesti (mikotoksikoze) konzumiranjem kontaminirane hrane, dermalnim putem ili inhalacijom spora. Mikotoksini se istražuju zbog toksičnih učinaka, gubitaka u poljoprivredi te povezanosti s klimatskim promjenama. Sterigmatocistin je sekundarni metabolit koji najčešće proizvode plijesni iz roda *Aspergillus*. Strukturno je sličan najtoksičnijem karcinogenu u prirodi – aflatoksinu. Toksični učinci sterigmatocistina nisu dovoljno istraženi, ali je klasificiran kao mogući karcinogen za ljude. Neke plijesni iz roda *Aspergillus* često uz sterigmatocistin proizvode 5-metoksisterigmatocistin, pogotovo u vlažnim stambenim prostorima. Pojam sindrom bolesnih zgrada opisuje skup simptoma bolesti respiratornog i središnjeg živčanog sustava te se mogu povezati s mikotoksinima. U ovom su pokusu mužjaci štakora soja Wistar jednokratno tretirani intratrahealnom instilacijom sterigmatocistinom, 5-metoksisterigmatocistinom i njihovom kombinacijom. U bronhoalveolarnoj tekućini mjerena je koncentracija albumina kao indikatora propusnosti membrane krvnih žila i aktivnost laktat dehidrogenaze u svrhu određivanja citotoksičnosti. Povećana koncentracija albumina i povećana aktivnost laktat dehidrogenaze ukazuju na toksičnost ovih mikotoksina. Iako rezultati nisu statistički značajni, važan su doprinos poznavanju toksičnosti ovih mikotoksina izloženima putem dišnog sustava te ukazuju na potrebu budućih istraživanja o dugotrajnoj izloženosti sterigmatocistinu i 5-metoksisterigmatocistinu.

(35 stranica, 6 slika, 2 tablice, 83 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: mikotoksini, plijesni, poplava, sindrom bolesne zgrade, toksičnost

Voditelj: dr. sc. Dubravka Rašić, v. zn. sur.

Suvoditelj: prof. dr. sc. Domagoj Đikić, redoviti profesor

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Domagoj Đikić, redoviti profesor

prof. dr. sc. Božena Mitić, redoviti profesor

doc. dr. sc. Sandra Hudina, docent

Rad prihvaćen: 25. studenoga 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

Effect of sterigmatocystin and 5-metoxysterigmatocystin on albumin concentration and lactate dehydrogenase activity in bronchoalveolar lavage fluid in male Wistar strain rats

Ivona Molnar

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mycotoxins are a diverse group of secondary metabolites produced by molds and can be found in food and feed or air of moldy indoor spaces. They cause diseases (mycotoxicosis) via ingestion of contaminated food, through skin or inhalation of spores. Mycotoxins are studied for their toxic effects, because they cause agricultural losses, and in association with climate change. Sterigmatocystin is a secondary metabolite mostly produced by *Aspergillus* molds. Structurally it is similar to the most potent carcinogen found in nature – aflatoxin. Even though the toxic effects of sterigmatocystin are not well-known, it is classified as possibly carcinogenic to humans. Some *Aspergillus* molds often produce 5-metoxysterigmatocystin together with sterigmatocystin, especially in moldy indoor environments. The term sick building syndrome describes a group of respiratory and central nervous system disease symptoms that can be related to mycotoxins. In the present experiment, male Wistar strain rats were intratracheally instilled with a single dose of sterigmatocystin, 5-metoxysterigmatocystin and their combination. In bronchoalveolar lavage fluid, the following parameters were measured: concentration of albumin as an indicator of vascular membrane permeability and lactate dehydrogenase activity as an indicator of cytotoxicity. Results of acute treatment showed an increase in albumin concentration and increase of lactate dehydrogenase activity. Even though our results were not statistically significant, they contribute to the general knowledge on the toxicity of these mycotoxins and they are important for future research into long-term exposure to mycotoxins.

(35 pages, 6 figures, 2 tables, 83 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: flood, molds, mycotoxins, sick building syndrome, toxicity

Supervisor: Dubravka Rašić, PhD, senior research associate

Co-supervisor: Prof. Domagoj Đikić, PhD, full professor

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić, PhD, full professor

Prof. Božena Mitić, PhD, full professor

Prof. Sandra Hudina, PhD, assistant professor

Thesis accepted: 25<sup>th</sup> November 2021

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Mikotoksini .....	1
1.2. Sindrom bolesne zgrade .....	2
1.3. Sterigmatocistin .....	3
1.3.1. Biosinteza i metabolizam.....	4
1.3.2. Toksičnost i mehanizmi toksičnosti sterigmatocistina .....	7
1.4. 5-metoksisterigmatocistin .....	9
1.4.1. Biosinteza i metabolizam.....	10
1.4.2. Toksičnost 5-metoksisterigmatocistina .....	10
1.5. Biomarkeri toksičnosti .....	10
1.5.1. Laktat dehidrogenaza.....	11
1.5.2. Albumin .....	11
2. Cilj istraživanja .....	12
3. Materijali i metode .....	13
3.1. Kemikalije.....	13
3.2. Instrumenti .....	13
3.3. Priprema otopina .....	13
3.4. Pokusne životinje i plan pokusa .....	14
3.4.1. Priprema toksina za instilaciju.....	14
3.4.2. Tretman životinja i uzimanje uzoraka .....	14
3.5. Metode .....	15
3.5.1. Mjerenje aktivnosti LDH .....	15
3.5.2. Mjerenje koncentracije albumina.....	17
3.6. Statistička obrada podataka.....	19

4. Rezultati .....	20
4.1. Aktivnost LDH.....	20
4.2. Koncentracija albumina .....	20
5. Rasprava.....	22
6. Zaključak.....	25
7. Literatura.....	26
8. Životopis .....	35



## POPIS KRATICA

5-M-STC	5-metoksisterigmatocistin
AFB1	aflatoksin B1
AFG1	aflatoksin G1
BALF	bronhoalveolarna tekućina
BEA	beauvericin
BSA	goveđi serumski albumin
CAST	Council for Agricultural Science and Technology
DMSO	dimetil sulfoksid
DON	deoksinivelenol
ECHA	European Chemical Agency
EFSA	European Food Safety Authority
ENA	eniantin A
ENB	eniantin B
FB1	fumonizin B1
HLA	ljudski leukocitni antigen
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL	interleukin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD <sub>50</sub>	letalna doza 50 %
LDH	laktat dehidrogenaza
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PBS	natrij-fosfatni pufer
STC	sterigmatocistin
t.m.	tjelesna masa
ZEA	zearalenon

# 1. Uvod

## 1.1. Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koje, osim u hrani biljnog i životinjskog porijekla, nalazimo u zraku pljesnivih stambenih prostora (Peraica i sur. 2002; Jakšić i sur. 2012; Engelhart i sur. 2002). Oni su molekule različitih struktura i male molekulske mase te kao takvi ne potiču odgovor imunološkog sustava, već se distribuiraju po organima i uzrokuju toksične učinke (Pitt 2000). Bolesti uzrokovane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze. Pojam mikotoksikoze prvi put se spominje 1952. godine, a smrt 100 000 purica u Ujedinjenom Kraljevstvu (tzv. „X bolest“) dovela je do otkrića aflatoksina 1960-ih godina (Lancaster i sur. 1961; Pitt 2013). Najčešći uzrok bolesti jest konzumiranje kontaminirane hrane, ali nije zanemariv ni kontakt preko kože ili, primjerice, udisanjem spora (Bennett i Klich 2003).

Toksičnost mikotoksina poznata je još od srednjeg vijeka, kada su alkaloidi gljivice raži uzrokovali stanje pod nazivom „vatra svetog Antuna“. Simptomi su kod ljudi bili halucinacije, groznica i gangrena udova. Kasnije je otkriveno da je izvor bolesti bila konzumacija žitarica, brašna i kruha kontaminiranih gljivicama vrste *Claviceps purpurea*, odnosno alkaloid ergolin koji gljivica proizvodi. Bolest je nazvana ergotizam. Nakon toga je više pažnje posvećeno spremanju žitarica i hrane za životinje kako bi se izbjegla kontaminacija plijesnima (Armendáriz i sur. 2014).

Do sada je otkriveno od 300 do 400 vrsta mikotoksina, a samo je njih desetak istraženo te su za njih zakonski određene dozvoljene količine u hrani. Najviše istraživane plijesni pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Coppock i Dziwenka 2019; CAST 2003). Osim mikotoksina, postoje sekundarni metaboliti koji su korisni kao lijekovi i antibiotici, npr. ergometrin za kontrakcije maternice i penicilin. Plijesni se mogu pronaći u vlažnim stambenim prostorima i u hrani (npr. žitarice, riža, kukuruz, kava, začini, mlijeko, meso, pekmez, vino, pivo, itd.). Nastaju u polju ili u skladištima kada uvjeti skladištenja žitarica (vlaga i temperatura) nisu odgovarajući. Jedna vrsta plijesni može proizvoditi veći broj mikotoksina ili više različitih mikotoksina može kontaminirati jednu vrstu hrane (Armendáriz i sur. 2014).

Mikotoksini su strukturno vrlo raznoliki te imaju različite učinke na zdravlje ljudi i životinja. Ciljni organi njihovog djelovanja najčešće su jetra, bubrezi i živčani sustav (Pitt 2013). Također, većina mikotoksina može proći kroz placentu kod sisavaca te se izlučiti putem majčinog mlijeka (Coppock i Dziwenka 2019). Osim zbog karcinogenog, teratogenog i mutagenog učinka na zdravlje, istražuje ih se i zbog velikih gubitaka u poljoprivredi te povezanosti s klimatskim promjenama (Haschek 2013). Predviđa se da bi klimatske promjene, odnosno duga i vruća razdoblja u kombinaciji s jakim kišama i bujicama, mogle pogodovati kontaminaciji hrane mikotoksinima. Iako su mikotoksikoze poznate već stoljećima, istražen je vrlo mali broj mikotoksina te se za većinu njih tek treba istražiti utjecaj, njihova interakcija te identificirati biomarkere koji bi ukazali na izloženost organizma mikotoksinima i odredili njihovu toksičnost (Medina i sur. 2017).

## 1.2. Sindrom bolesne zgrade

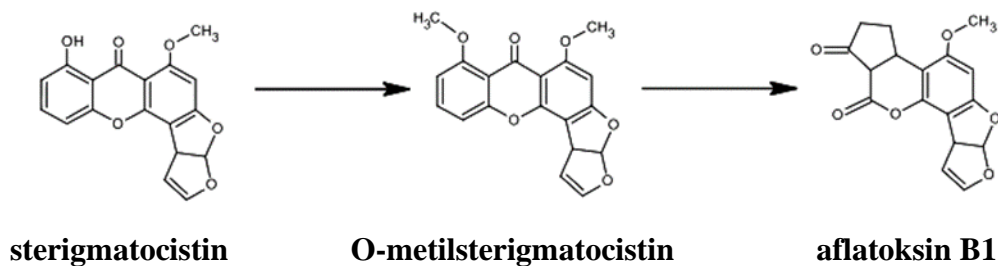
Sindrom bolesne zgrade (eng. *sick building syndrome*) pojam je koji opisuje skup simptoma bolesti respiratornog i središnjeg živčanog sustava (npr. iritacija nosa, grla, očiju, bolovi u prsima, vrtoglavica, svrbež, iritacija i crvenilo kože). Stanje se povezuje s različitim biološkim i kemijskim tvarima u radnom i stambenom okolišu poput hlapljivih spojeva iz namještaja i parketa, dima cigareta, kemikalija iz boja, ali i spora plijesni i mikotoksina koji su prisutni u vlažnim prostorima (Birks 2006).

Mikotoksini nisu hlapljivi spojevi, ali se mogu udahnuti vezani uz zrnca prašine te mogu uzrokovati iritaciju sluznice, glavobolju, stezanje u prsima, alergije ili astmu (Birks 2006; Li i Yang 2004).

Plijesni koje su najčešće pronađene u bolesnim zgradama pripadaju rodovima *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Stachybotrys* i *Chaetomium* (Birks 2006; Li i Yang 2004). Rodovi *Chaetomium* i *Aspergillus* značajni su jer proizvode mikotoksine, dok ostali navedeni rodovi uglavnom uzrokuju alergije. *Aspergillus* vrste, koje su primarni kolonizatori, mogu se prilagoditi aktivnosti vode manjoj od 0,8 te rasti u unutrašnjim prostorima češće nego ostale plijesni (Nielsen 2003; Schulz i sur. 2004). Vrste *Aspergillus versicolor* i *A. flavus* su najčešće vrste roda *Aspergillus* i one proizvode STC, odnosno aflatoksine (Piecková i Jesenská 1999).

### 1.3. Sterigmatocistin

Sterigmatocistin (STC), punog naziva prema IUPAC-u (3aR,12cS)-8-hidroksi-6-metoksi-3a,12c-dihidro-7H-furo-[3',2':4,5] furo[2,3-c]-ksanten-7-on), prvi je put izoliran 1950-ih godina iz plijesni roda *Aspergillus* (Rank i sur. 2011). *A. versicolor* je najveći proizvođač STC-a, no proizvodi ga više od 50 drugih vrsta, uključujući *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans* i dr., te vrste iz drugih rodova plijesni. Prekursor je u sintezi aflatoksina B1 (AFB1) te mu je strukturno i sličan (**Slika 1.**) (Coppock i Dziwenka 2019; Tabata 2011; EFSA 2013). AFB1 nastaje kondenziranjem acetata i malonata djelovanjem raznih enzima, od kojih su samo neki identificirani. Djelovanjem sintaze norsolorinske kiseline nastaje norsolorinska kiselina koja je prvi stabilni prekursor AFB1 te se prevodi u versikolorin B, a potom u versikolorin A. Versikolorin A se demetilsterigmatocistin sintazom prevodi u demetilsterigmatocistin. Metilacijom demetilsterigmatocistina nastaje STC, a iz STC-a O-metilsterigmatocistin djelovanjem O-metiltransferaze. O-metilsterigmatocistin prevodi se u AFB1 (Dutton 1988; Yabe i Nakajima 2004).



**Slika 1.** Skraćeni prikaz biosintetskog puta aflatoksina B1 iz sterigmatocistina.

Manje je toksičan od AFB1 iako im je biološka aktivnost slična. Furofuranski prsten odgovaran je za mutagenost AFB1 i STC-a (Jakšić i sur. 2012). Za usporedbu, LD<sub>50</sub> vrijednost STC-a za mužjake štakora jest 60 – 800 mg/kg, dok za AFB1 ta vrijednost iznosi 5,5 mg/kg (Tabata 2011). LD<sub>50</sub> vrijednost (eng. *lethal dose*) odnosi se na dozu neke tvari za koju se očekuje da uzrokuje smrt kod 50 % tretiranih životinja (ECHA 2016). Ciljni organi toksičnosti STC-a su jetra i bubrezi. Poznat je njegov karcinogeni i toksični učinak. Prema Tabatu (2011), svi štakori, kojima je u hranu uveden STC u dozi od 150 µg na dan tijekom perioda od 58 ± 4 tjedana,

razvili su hepatocelularne karcinome. Budući da uzrokuje tumore, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) smjestila ga je u skupinu 2B (mogući karcinogen za ljude) (1976).

Iako je STC potencijalno karcinogen za ljude, često se zanemaruje važnost prisutnosti STC-a u vlažnim stambenim prostorima. Izloženost STC-u može biti udisanjem prašine ili spora koje mogu prodrijeti u donji respiratorni sustav i pluća (Engelhart i sur. 2002; Despot i Šegvić Klarić 2014). Dokazana je prisutnost STC-a (i njegovih metabolita) u više istraživanja. Engelhart i sur. (2002) izolirali su ga iz prašine u tepisima, a pronađen je i u građevinskom materijalu (Nielsen i sur. 1999). U istraživanju problema s vlagom u finskim zgradama STC je bio dominantno prisutan mikotoksin (Tuomi i sur. 2000). U istraživanju Despot i Šegvić Klarić (2014) u Hrvatskoj pronađena je veća prisutnost plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Versicolores* (koje proizvode STC) u stanovima i podrumima nego u radnom okruženju kao što je mlin. Mikotoksini u vlažnim prostorima opravdano se povezuju s raznim stanjima – umorom, glavoboljom, mučninom i bolestima respiratornog sustava (Engelhart i sur. 2002; Bloom i sur. 2007). Plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Versicolores* potencijalno se povezuju sa sindromom bolesne zgrade (Piecková i Jesenská 1999; Tuomi i sur. 2000; Jussila i sur. 2002).

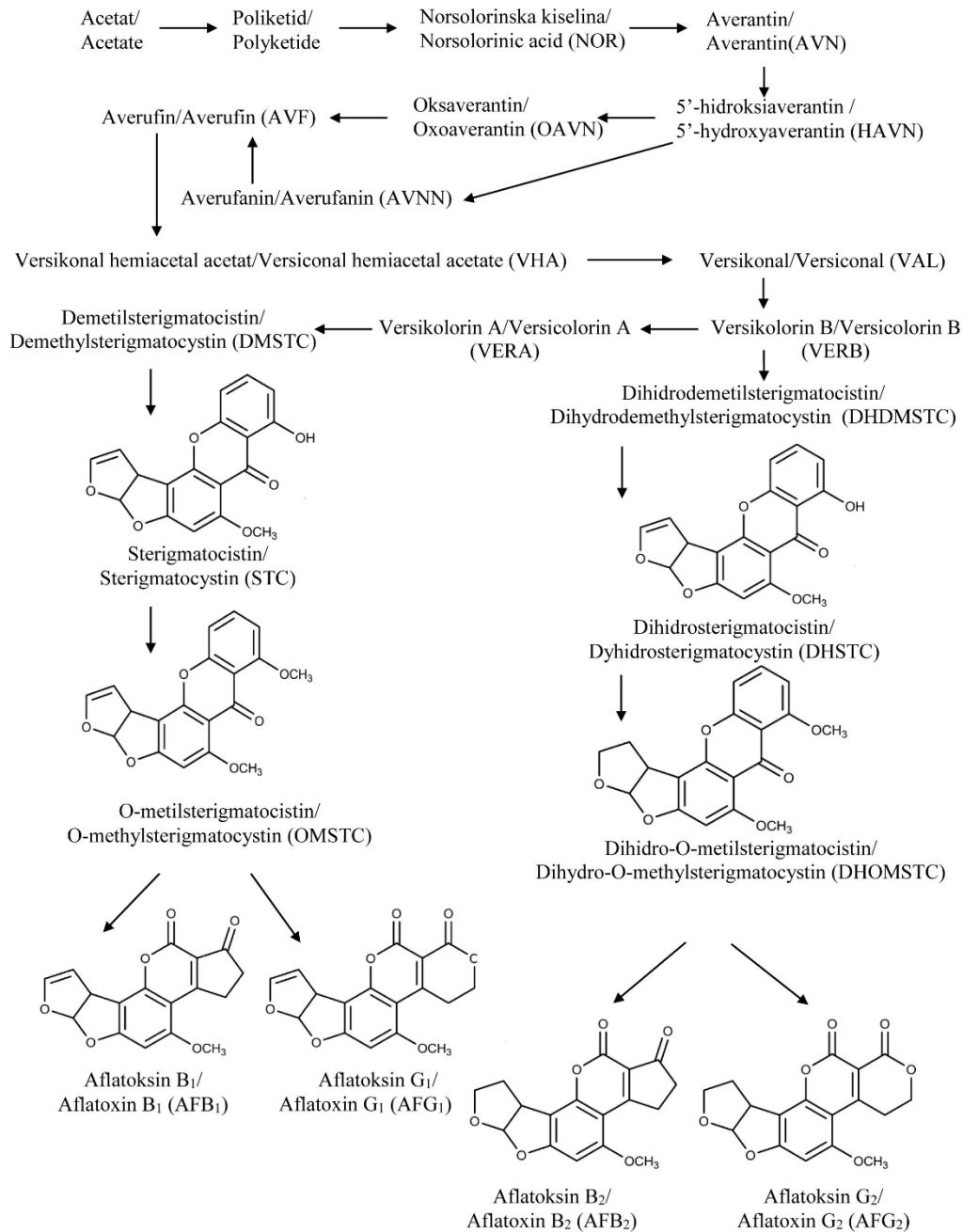
Iako je STC toksičan, nisu određene maksimalno dopuštene koncentracije u hrani ili okolišu. Zsigurno je nedostatak regulacije povezan s time da nema prijavljenih masovnih mikotoksikoza kod ljudi ili životinja povezanih sa STC-om, iako su plijesni koje ga proizvode sveprisutne (Tabata 2011).

### 1.3.1. Biosinteza i metabolizam

*Aspergillus nidulans* jedna je od filamentoznih plijesni koje proizvode STC (Yu i Leonard 1995). Koristi se kao model za istraživanje genetike plijesni od 1950-ih godina. Budući da *A. nidulans* proizvodi STC kao sekundarni metabolit, a STC je dio sintetskog puta aflatoksina, koristi se i za istraživanje molekularnih mehanizama koji reguliraju proizvodnju aflatoksina. Aflatoksine proizvode *A. parasiticus* i *A. flavus* te, uz *A. nidulans*, imaju konzervirani klaster gena koji kodira enzime i regulatorne proteine važne za proizvodnju aflatoksina i STC-a (Keller i Adams 1995). Iako je STC biogeni prekursor aflatoksinima, vrste koje primarno proizvode aflatoksine (npr. *A. flavus* i *A. parasiticus*) rijetko akumuliraju STC (Zingales i sur. 2020). Također, aflatoksini i STC sintetiziraju se pod različitim uvjetima okoliša, primjerice lužnati

pH pogoduje proizvodnji STC-a, dok kiseli pH više pogoduje aflatoksinima (Delgado-Virgen i Guzman-de-Peña 2009).

Put biosinteze STC-a vrlo je dobro istražen i poznat, budući da ga dijeli s najmoćnijim karcinogenom u prirodi aflatoksinom (IARC 2002). Kod vrsta koje proizvode aflatoksine, STC se konvertira u direktni prekursor AFB1 i aflatoksina G1 (AFG1) – O-metilsterigmatocistin. Vrste koje primarno proizvode STC ne mogu ga konvertirati u direktni prekursor aflatoksina, budući da nemaju gene koji kodiraju enzim za konverziju (Yabe i sur. 1989). Geni uključeni u biosintezu STC-a istraženi su na genomu *A. nidulans* i definirani kao klaster od 25 gena (Brown i sur. 1996). Acetat i malonat sudjeluju u prvom koraku biosinteze (**Slika 2.**) Većini gena odgovornih za put sinteze aflatoksina i STC-a su poznate funkcije (Yu i sur. 2004; Wilkinson i sur. 2004).



**Slika 2.** Biosinteza sterigmatocistina i aflatoksina.

Preuzeto iz Lešić i sur. 2019, uz dozvolu autora.

Općenito, sekundarni metabolizam najčešće je povezan sa sporulacijom kod plijesni i drugih mikroorganizama. Proizvodnja STC-a povezana je s reprodukcijom plijesni. Naime, neke plijesni, kao što su *A. flavus* i *A. parasiticus*, razmnožavaju se isključivo nespolnim putem – sporama koje se zovu konidije. S druge strane, *A. nidulans* se razmnožava i konidijama i

askosporama koje su vezane uz spolno razmnožavanje. Konidije oportunističkih patogena mogu, kod ljudi i životinja koji ih udišu, izazvati bolesti jer su bogate inokulumom. Proces nastanka konidija i biosinteze STC-a regulirani su zajedničkim putem prijenosa signala te se smatra da STC doprinosi preživljenju plijesni. Kao što je već spomenuto, većina gena odgovorna za regulaciju i biosintezu STC-a dobro je poznata (Calvo i sur. 2002; Wilkinson i sur. 2004).

STC se metabolizira u jetri i plućima pomoću enzima citokrom P450. Nastaju razni hidroksimetaboliti (kateholi) i reaktivni epoksidi (STC-1,2-epoksid) koji formiraju DNA adukte (EFSA 2013). Essigman i sur. (1979) prvi su predložili mehanizam mutagenosti stvaranjem reaktivnih epoksida koji se mogu kovalentno vezati na DNA i stvoriti STC-m7-gvaninske adukte. Pfeiffer i sur. su 2014. godine otkrili novi put metabolizma hidroksilacijom aromatskog prstena. Tako nastaju kateholi koji su također reaktivni te stvaraju DNA adukte. Ovaj bi put metabolizma mogao biti češći nego stvaranje epoksida. Druga faza metabolizma odnosi se na konjugaciju STC-a najčešće UDP-glukuronosiltransferazama i sulfotransferazama. Ekskrecija metabolita i konjugiranog STC-a odvija se putem urina i žuči (Cabaret i sur. 2010; EFSA 2013).

### 1.3.2. Toksičnost i mehanizmi toksičnosti sterigmatocistina

Prema EFSA-i (2013) akutna je toksičnost STC-a niska, no ne postoji dovoljno podataka da bi se procijenio rizik za ljude i životinje. LD<sub>50</sub> doza akutne toksičnosti iznosi između 120 i 166 mg/kg. Ciljni organi toksičnosti su jetra i bubrezi. Purchase i van der Watt (1969) dokazali su da se štakorima, tretiranim visokim dozama STC-a, pojavljuje nekroza jetre i bubrega ovisno o apliciranoj dozi STC-a. Kod doza većih od LD<sub>50</sub> (150 – 200 mg/kg t. m.) pojavljuje se teži oblik nekroze i krvarenje koje može dovesti do smrti, a kod bubrega može doći do degeneracije hijalina. Kod doza manjih od LD<sub>50</sub> pojavljuje se nekroza koja pogađa jednu stanicu ili grupu stanica te povećanje jezgara. Fujii i sur. (1976) dokazali su maksimalno toleriranu dozu STC-a na potomcima miševa 24 sata nakon rođenja. Miševima je instilirano 0,03 mL 1 %-tne želatine sa 100, 50, 5, 1 i 0,5 µg STC-a po gramu t.m. Većina je umrla 5 dana nakon instilacije, a statistički značajna smrtnost zabilježena je iznad doze od 5 µg/g t.m. U pokusu u kojem su miševi (*Swiss Webster*) tretirani STC-om inhalacijskim putem, izmjerena je značajna razlika u ekspresiji gena povezanima s upalnim procesima u usporedbi s kontrolnom skupinom. Razlika



je uočena na miševima žrtvovanima 12 sati nakon tretmana jednokratnom dozom STC-a od 13 mg/kg mase pluća. Stvaranje mukusa bilo je povećano te je epitel bio zadebljan kao znak upale (Miller i sur. 2010; EFSA 2013).

Kronična izloženost i karcinogenost pokazana je kod više eksperimentalnih životinja: miševa, štakora, riba, mongolskog skočimiša i majmuna (EFSA 2013). STC u koncentraciji od 5 mg/kg dodan je u hranu (0,75 mg/kg t.m.) miševima soja ICR kroz period od 54 do 58 tjedana, tako da su dva tjedna dobivali hranu sa STC-om pa bi uslijedilo dva tjedna pauze. Adenomi i adenokarcinomi primijećeni su nakon 50 tjedana izloženosti, a nakon 58 tjedana 84 % miševa imalo je neki oblik tumora na plućima u usporedbi s kontrolnom skupinom (Zwicker i sur. 1974). U dvogodišnjem istraživanju, Ohtsubo i sur. (1978) hranili su mužjake *Donryu* štakora rižom kontaminiranom *A. versicolor*. Koncentracija STC-a u tri skupine štakora bila je 0, 5 i 10 mg/kg hrane, što odgovara 0, 0,25 i 0,5 mg/kg t.m. U posljednje dvije skupine (svaka se sastojala od 13 štakora), gotovi svi štakori razvili su neki oblik tumora jetre. Ova studija ukazala je na to da je STC karcinogen i u nižim koncentracijama. Mnoga su istraživanja rađena u Aziji gdje je hrana često kontaminirana STC-om (EFSA 2013). Studija na mongolskom skočimišu povezala je prisutnost *Helicobacter pylori* u želucu i konzumiranje hrane kontaminirane STC-om s razvojem tumora želuca (Ma i sur. 2003). Razvoj tumora želuca i jetre povezan je sa prisutnošću STC-a u žitaricama u dijelovima Kine i kod ljudi (Lou i sur. 1995).

Pretpostavlja se da je STC imunotoksičan, no nema dovoljno studija *in vivo* i *in vitro* koje bi potvrdile tu pretpostavku. Najveći nedostatak kod *in vitro* studija jest korištenje visokih koncentracija STC-a (EFSA 2013). STC je, u kombinaciji s AFB1, značajno smanjio aktivnost komplementa kod oralnog tretmana zamoraca, smanjio tjelesnu masu i uzrokovao hepatotoksičnost. Tretman samim STC-om nije značajno utjecao na komplement. Budući da se komponente komplementa proizvode u jetri, ne može se jednoznačno zaključiti utječe li STC (sam ili u kombinaciji s AFB1) izravno na imunološki sustav (Richard i sur. 1978). Liu i sur. (2012) u svom su istraživanju pokazali da se, 24 sata nakon jednokratnog tretmana BALB/c miševa STC-om, povećava postotak FoxP3<sup>+</sup> regulatornih T stanica. Posljedica je imunosupresija jer su ove stanice ključne u održavanju homeostaze imunološkog sustava. Nadalje, razne *in vitro* studije na ljudskim limfocitima periferne krvi i mišjim makrofagima ukazuju na utjecaj STC-a na ekspresiju IL-2, interferona  $\gamma$  i IL-4 (Huang i sur. 2002; EFSA

2013). Također, STC je smanjio ekspresiju HLA razreda I na razini RNA i proteina (Xing i sur. 2005). No, *in vivo* istraživanja koja bi potvrdila ove pronalaskes nisu objavljena.

Genotoksičnost STC-a istražena je *in vivo* i *in vitro*. Metabolički aktiviran STC uzrokuje oštećenja kromosoma *in vitro* i kod eksperimentalnih životinja. Uz to je dokazana mutagenost u bakterijskim stanicama i stanicama sisavaca također nakon metaboličke aktivacije (EFSA 2013). Kod ženki *Swiss* štakora, tretiranih dozama STC-a između 0,06 i 6 mg/kg t.m. češće su se događale kromatidne aberacije u stanicama koštane srži (Curry i sur. 1984). Kromosomske aberacije potvrđene su u stanicama koštane srži i kod intraperitonealne administracije STC-a kod štakora (Ueda i sur. 1984). *In vitro* uzrokuje pojavu mikronukleusa, kromosomske aberacije, stvaranje gvaninskih adukata, jednostruke lomove DNA, mutacije u pojedinačnim bazama i pomak okvira čitanja (Crofton-Sleigh i sur. 1993; Ellard i Parry 1993; Black i sur. 1992; Baertschi i sur. 1989; Morita i sur. 1991; Mori i sur. 1986; McCann i sur. 1975). Mnoga istraživanja uspoređuju genotoksičnost STC-a i AFB1 zbog svoje strukturne sličnosti, ali je iz dosadašnjih istraživanja vidljivo da se tretmani istim koncentracijama ovih mikotoksina ne mogu uspoređivati budući da je AFB1 puno toksičniji. Isto tako metabolizam ova dva mikotoksina je različit, što ograničava njihovu usporedbu (EFSA 2013).

Dosadašnja su istraživanja toksičnih učinaka STC-a ograničena i nisu dovoljna za određivanje rizika za zdravlje ljudi i životinja (EFSA 2013). Istraživanja kombiniranog učinka STC-a i drugih mikotoksina također su oskudna (Zingales i sur. 2020).

#### 1.4. 5-metoksisterigmatocistin

Sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin (5-M-STC) su srodni mikotoksini koje u većim količinama proizvodi plijesan vrste *A. versicolor*, koja je sveprisutna u vlažnim zatvorenim prostorima. Strukturno se STC i 5-M-STC razlikuju samo u 5-metoksi skupini te se smatra da upravo metoksi skupina utječe na bioraspoloživost 5-M-STC-a (Jakšić i sur. 2012). Postoje mnoga istraživanja koja ukazuju na prisutnost STC-a u prašini vlažnih prostorija, ali vrlo mali broj studija bavi se problemom prisustva 5-M-STC-a (Engelhart i sur. 2002; Dabelić i sur. 2021). Prisutnost STC-a u hrani relativno je rijetka, no za 5-M-STC ne postoje istraživanja koja bi potvrdila njegovo prisustvo u hrani (Dabelić i sur. 2021). U objavljenim se istraživanjima 5-

M-STC većinom spominje u kontekstu materijala kontaminiranih s *A. versicolor* (Gravesen i sur. 1999; Nielsen i sur. 1999; Cabaret i sur. 2014).

#### 1.4.1. Metabolizam 5-metoksisterigmatocistina

5-M-STC metabolizira se konjugacijom u stanicama dišnih puteva. Kod 5-M-STC-a nije pronađen enzim koji bi ga aktivirao kao kod STC-a, ali postoji vrlo malo istraživanja koja su često međusobno kontradiktorna (Cabaret i sur. 2010; Cabaret i sur. 2014). Pretpostavljalo se da se 5-M-STC može hidrolizirati jer je strukturno gotovo identičan STC-u, te su Cabaret i sur. (2014) identificirali četiri nova metabolita.

#### 1.4.2. Toksičnost 5-metoksisterigmatocistina

Toksičnost 5-M-STC-a nije dovoljno istražena. Dokazano je njegovo mutageno djelovanje uz pomoć TA 100 *Salmonella typhimurium* testa za mutagenost te citotoksičnost i genotoksičnost u stanicama A549 (Jakšić i sur. 2012; Mori i sur. 1986).

Dabelić i sur. (2021) istraživali su citotoksičnost i genotoksičnost kombinacije STC-a i 5-M-STC-a na epitelne stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma HepG2 i epitelne stanice ljudskog adenokarcinoma pluća A549. Usporedbom sa zasebnim učincima subtoksičnih koncentracija svakog mikotoksina na spomenute stanice, zaključili su da kombinacija STC-a i 5-M-STC-a ima dominantno aditivan učinak na vijabilnost stanica. U manjem broju slučajeva dokazan je antagonizam, dakle slabiji učinak kombinacije mikotoksina naspram zasebnih učinaka. Također, zanimljivo je da je toksični učinak 5-M-STC-a na stanice bio 10 puta veći nego učinak STC-a. Autori, kao moguće razloge, navode agregacijska svojstva STC-a u vodi koja nisu dokazana kod 5-M-STC-a (Jakšić i sur. 2019) te dodatnu metoksi funkcionalnu skupinu koja povećava bioraspoloživost 5-M-STC-a.

### 1.5. Biomarkeri toksičnosti

Biomarkeri služe kao sredstva za određivanje i predviđanje toksičnih učinaka tvari i odgovara na njih. Trebaju biti osjetljivi, specifični, neinvazivni, povezani s biokemijskim mehanizmom i funkcionirati u realnim dozama. Također, moraju se lagano mjeriti i kvantificirati (Timbrell 1998). Važni su za otkrivanje izloženosti mikotoksinama te procjene toksikoloških učinaka i

osjetljivosti. Detekcija toksina u hrani i zraku može biti siguran pokazatelj njihovoj izloženosti. Uz to, izloženost se može dokazati analiziranjem prisutnosti prekursora ili metabolita mikotoksina u tkivima i tjelesnim tekućinama. Za procjenu toksikoloških učinaka može se koristiti, na primjer, promjena u nekom enzimatskom sustavu ili formiranje specifičnih DNA adukata. Osjetljivost na neki mikotoksin pokazuju razlike u metabolizmu (individualne ili između vrsta) (Coppock i Dziwenka 2019).

### 1.5.1. Laktat dehidrogenaza

Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim koji se nalazi u citoplazmi svake stanice. Kada se stanice oštete, npr. aptopotozom ili nekrozom, enzim izlazi iz stanice u izvanstanični prostor. Zbog toga se količina LDH može odrediti iz supernatanta kao pokazatelj (biomarker) oštećenosti stanične membrane te generalni pokazatelj vijabilnosti stanice i citotoksičnosti. Aktivnost LDH se, sukladno tome, može kvantificirati pomoću NADH koji nastaje prevođenjem laktata u piruvat aktivnošću LDH. NADH u reakciji sa specifičnom probom daje obojenje (Hiebl 2017; Kumar i sur. 2018).

### 1.5.2. Albumin

Povećana propusnost membrana krvnih žila za proteine i ostale makromolekule znak je oštećenja membrana i bolesti (Margaron i Soni 2002). Endotelni glikokaliks skupina je ugljikohidrata koji poput gela obavijaju krvne žile i on je barijera između krvi i stijenke krvnih žila (Aldecoa i sur. 2020). Ima važnu ulogu u homeostazi krvnih žila, regulaciji njihove propusnosti te, između ostaloga, ima protuupalnu ulogu. Sastoji se od glikoproteina, glikolipida te plazma proteina od kojih albumin regulira koloidni osmotski tlak te transportira sfingozin-1-fosfat koji ima zaštitnu ulogu u endotelu, imunomodulatorni i protuupalni učinak te „hvata“ slobodne radikale. Povećana propusnost membrana dovodi do smanjenja količine albumina u serumu, što je znak oštećenja membrana (Aldecoa i sur. 2020; Margaron i Soni 2002).

## 2. Cilj istraživanja

Promjena klime utjecala je na pojavu jakih kiša, bujica i poplava posljednjih godina. Kao posljedica poplava, nastaju vlažni zidovi stambenih prostora koji su dobra podloga za razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina, posebno STC-a i 5-M-STC-a. Budući da je djelovanje mikotoksina na ljude slabo poznato, u pokusu opisanom u ovom diplomskom radu cilj je izmjeriti toksični učinak STC-a i 5-M-STC-a na mužjacima štakora soja *Wistar*. Štakori su jednokratno tretirani intratrahealnom instilacijom STC-om i 5-M-STC-om te kombinacijom ova dva mikotoksina. Da bi se odredio njihov toksični učinak, u bronhoalveolarnoj tekućini mjerene su koncentracije albumina, kao indikatora propusnosti membrana krvnih žila, te aktivnost laktat dehidrogenaze, kao indikatora citotoksičnosti.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Kemikalije

- Sterigmatocistin (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, SAD)
- 5-metoksisterigmatocistin (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, SAD)
- Narketan (Chassot AG, Bern, Švicarska)
- Xylapan (Chassot AG, Bern, Švicarska)
- Dimetil sulfoksid (DMSO)
- Natrij-fosfatni pufer (PBS)
- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Izofluran (Piramal Enterprises LTD, Mumbai, Indija)
- Kit za analizu albumina (Abcam, Cambridge, UK)
- Kit za analizu LDH (Abcam, Cambridge, UK)

#### 3.2. Instrumenti

- Analitička vaga, Mettler Toledo, AE 200
- pH metar, SevenEasy, Mettler Toledo
- Centrifuga, Mikro 22R, Hettich, Kirchlengern, Njemačka
- Centrifuga, Universal 320 R, Hettich, Kirchlengern, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih pločica, Tecan Infinite M200PRO plate reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austrija)

#### 3.3. Priprema otopina

Natrijev fosfatni pufer 0,3 M, pH = 7,4

0,3 M  $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$  (107,44 g otopljeno u 1 L vode)

$$c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V = 1 \text{ dm}^3$$

$$M (Na_2HPO_4 \times 12H_2O) = 358,14 \text{ gmol}^{-1}$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M \times V} \Rightarrow m = c \times M \times V$$

$$m = 0,3 \text{ mol dm}^{-3} \times 358,14 \text{ gmol}^{-1} \times 1 \text{ dm}^3 = 107,44 \text{ g}$$

$$\begin{aligned}
 M(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}) &= 358,14 \text{ g mol}^{-1} \\
 1 \text{ M} &= 358,14 \text{ g mol}^{-1} \text{ na } 1 \text{ L} \Rightarrow 0,1 \text{ M} \\
 &= \frac{358,14 \text{ g mol}^{-1}}{10} \text{ na } 1 \text{ L} \Rightarrow 35,814 \text{ g mol}^{-1} \text{ na } 1 \text{ L} \\
 (\text{za } 2 \text{ L}) & 35,814 \times 2 = 71,628 \text{ g za } 2 \text{ L}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &0,3 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} \text{ (46,8 g otopljeno u 1 L vode)} \\
 &M = 156,01 \text{ g mol}^{-1} \\
 &0,1 \text{ M} = 15,601 \text{ g L}^{-1}
 \end{aligned}$$

U otopinu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  dodajemo otopinu  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  dok ne dobijemo pufer odgovarajućeg  $\text{pH} = 7,4$ .

### 3.4. Pokusne životinje i plan pokusa

Odrasli mužjaci štakora soja *Wistar*, stari 12 tjedana i teški između 300 i 400 grama, držani su u Makrolon kavezima pod kontroliranim uvjetima sobne temperature od  $22^\circ\text{C}$  i ciklusa dan/noć od 12 sati. Prosječna masa štakora bila je 343 grama. Životinje su imale slobodan pristup peletiranoj hrani (4RF21, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) te vodi iz slavine. Životinje ( $n = 24$ ) nasumično su grupirane u četiri skupine po šest jedinki. Ovaj eksperiment odobrilo je Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u skladu s direktivom Europske komisije iz 22. rujna 2010. godine (2010/63/EU).

#### 3.4.1. Priprema toksina za instilaciju

Radne otopine mikotoksina pripremljene su u DMSO te razrijeđene u radne otopine PBS-om (**poglavlje 3.3.**). U volumenu od  $300 \mu\text{L}$  DMSO/PBS otopljeno je  $0,4 \mu\text{g}$  STC-a ili  $5 \mu\text{g}$  5-M-STC-a te njihova kombinacija ( $0,4 + 5 \mu\text{g}$ ).

#### 3.4.2. Tretman životinja i uzimanje uzoraka

Svaka skupina životinja tretirana je jednokratno: 1. skupina: kontrola (DMSO + PBS), 2. skupina: STC, 3. skupina: 5-M-STC i 4. skupina: STC + 5-M-STC. Životinje su tretirane

intratrahealnom instilacijom između osam i devet sati ujutro. Prije instilacije životinje su anestetizirane izofluranom. Prema prosječnoj masi pluća štakora od 1,382 g, doze toksina iznosile su 0,3 mg STC/kg mase pluća i 3,6 mg 5-M-STC/kg mase pluća. Nakon instilacije držane su u uspravnom položaju dok se nisu probudile iz anestezije. Životinje su žrtvovane nakon 24 sata pod općom anestezijom. Korišteni anestetici su Narketan (80 mg/kg tjelesne mase) i Xylapan (12 mg/kg tjelesne mase).

Pluća su isprana u ledeno hladnom PBS-u 2 x 5 mL. Izvučena je bronhoalveolarna tekućina (BALF) koja je centrifugirana 10 minuta na 650 G i 4 °C. Pluća i BALF su bili zamrznuti do analize na -80 °C.

### 3.5. Metode

#### 3.5.1. Mjerenje aktivnosti LDH

Aktivnost laktat dehidrogenaze mjerila sam pomoću kita za analizu LDH (Abcam, Cambridge, UK). Mjerenje sam provela u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica za uzorke pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austrija).

Reakcija se temelji na redukciji NAD u NADH pomoću LDH koji potom reagira sa specifičnom probom i daje obojenje.

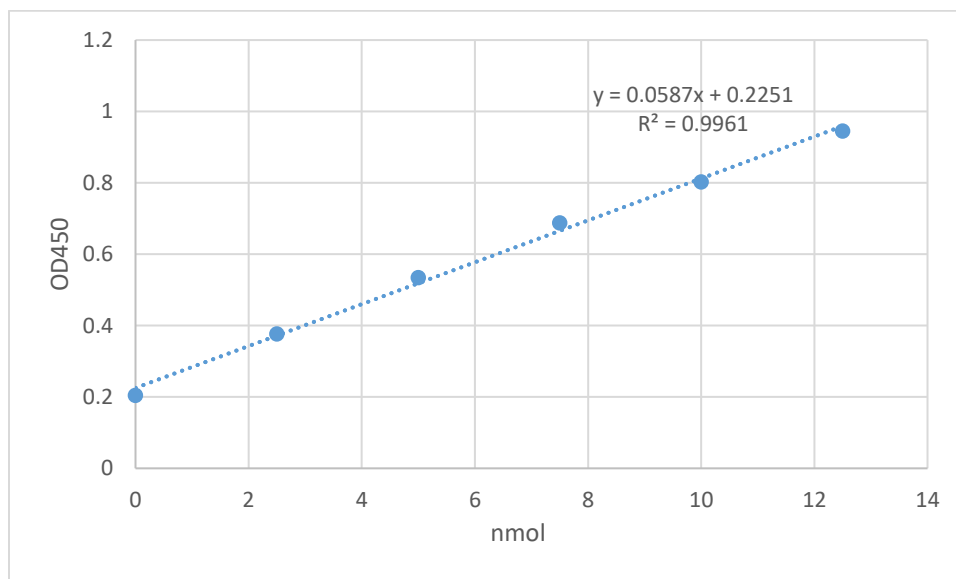
Prije mjerenja aktivnosti LDH u BALF-u, pripremila sam standardne otopine (NADH) (**Tablica 1.**).



**Tablica 1.** Priprema standardne otopine nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) koncentracija u rasponu od 0 do 12,5 nmol nikotinamid adenin dinukleotida po jažici.

Volumen standarda (NADH) (μL)	Volumen pufera (μL)	Koncentracija NADH po jažici (nmol/jažica)
0	125	2
5	120	2,5
10	115	5
15	110	7,5
20	105	10
25	100	12,5

Zatim sam napravila kalibracijsku krivulju standarda (**Slika 3.**).



**Slika 3.** Kalibracijska krivulja standarda nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) koncentracija od 0 do 12,5 nmol mjenjenih na 450 nm.

Reakcijske otopine pripremila sam prema uputama dobivenima u kitu za analizu LDH.

U jažice sam najprije dodala 50 μL standarda, uzorka ili pozitivne kontrole, a zatim 50 μL reakcijske smjese. Apsorbanciju sam mjerila nakon tri sata inkubacije na 450 nm, svake dvije

minute u periodu od 60 minuta, na 37 °C, zaštićeno od svjetla. Apsorbanciju sam korigirala oduzimanjem vrijednosti slijepe probe od srednje vrijednosti uzoraka.

Napravila sam krivulju u svim izmjerenim točkama te odabrala ravni dio krivulje iz kojeg sam izračunala:  $\Delta A = A_2 - A_1$  (pri čemu je  $A_2$  apsorbancija očitana u vremenu 2, a  $A_1$  apsorbancija očitana u vremenu 1). Aktivnost LDH izračunala sam iz kalibracijske krivulje (kao koncentracija NADH koji je nastao pomoću LDH). Aktivnost LDH =  $(B/(\Delta T \times V)) \times D$  (nmol/min/mL = mU/mL)

B = koncentracija NADH iz kalibracijske krivulje (nmol)

$\Delta T$  = vrijeme reakcije

V = volumen uzorka u jažici

D = čimbenik razrjeđenja

1U LDH je količina enzima koja katalizira reakciju pretvorbe laktata u piruvat, pri čemu se stvara 1 mol NAHD po minuti na pH = 8 pri 37 °C.

### 3.5.2. Mjerenje koncentracije albumina

Za mjerenje koncentracije albumina koristila sam kit za analizu albumina (Abcam, Cambridge, UK). Mjerenje sam napravila na mikrotitarkim pločicama s 96 jažica za uzorke pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austrija).

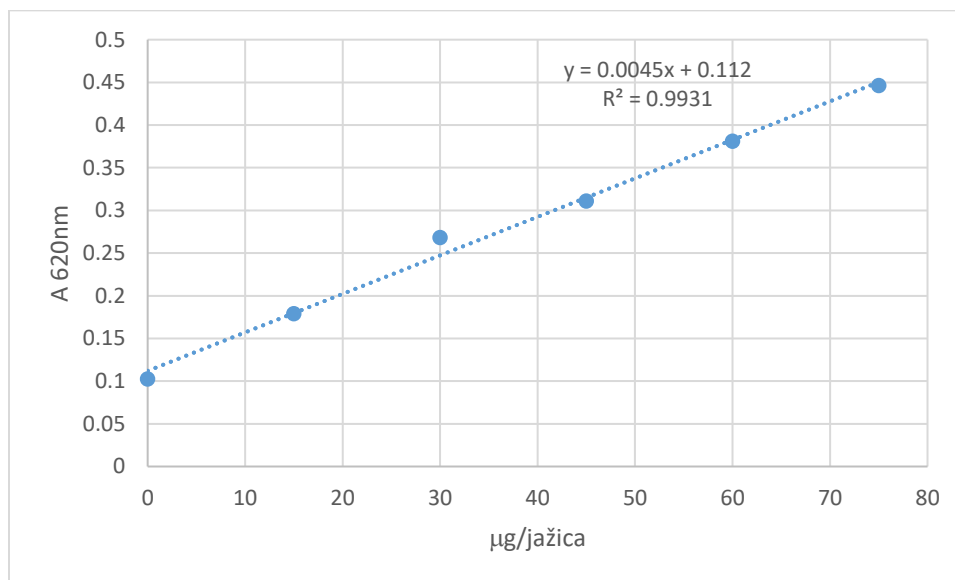
Reakcija se temelji na interakciji albumina i boje bromkrezol zeleno (BCG) pri čemu nastaje obojenje koje se može detektirati spektrofotometrijski. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji albumina u serumu. Ova metoda ne detektira ostale proteine prisutne u plazmi.

Pripremila sam otopine standarda za kalibracijsku krivulju (**Tablica 2.**). Sve sam uzorke napravila u duplikatu.

**Tablica 2.** Priprema otopine standarda za kalibracijsku krivulju koristeći goveđi serumski albumin (BSA) od 0 do 75 µg po jažici.

7,5 mg/mL BSA Standard (µL)	Volumen pufera (µL)	Konačna masa BSA u jažici (µg/jažica)
0	100	0
4	96	15
8	92	30
12	88	45
16	84	60
20	80	75

Iz pripremljenih koncentracija BSA napravila sam kalibracijsku krivulju standarda (**Slika 4.**).



**Slika 4.** Kalibracijska krivulja standarda albumina mase od 0 do 75 µg po jažici mjerenih na 620 nm.

Reakcijske otopine pripremila sam prema uputama dobivenima u kitu za analizu albumina.

U jažice sam najprije dodala 50 µL standarda, slijepu probe ili uzorka, a zatim 50 µL reakcijske smjese. Pločicu sam inkubirala 20 minuta na 25 °C, zaštićenu od svjetla. ApSORBANCIJU sam mjerila na 620 nm. Od svih izmjerenih vrijednosti apsorbancije oduzela sam vrijednost

apsorbancije slijepe probe. Napravila sam kalibracijsku krivulju te izračunala koncentraciju albumina.

Koncentracija albumina =  $(B/V)*D$

B = masa albumina u uzorku izračunata iz kalibracijske krivulje u  $\mu\text{g}$ .

V = volumen uzorka u jažicama.

D = čimbenik razrjeđenja.

### 3.6. Statistička obrada podataka

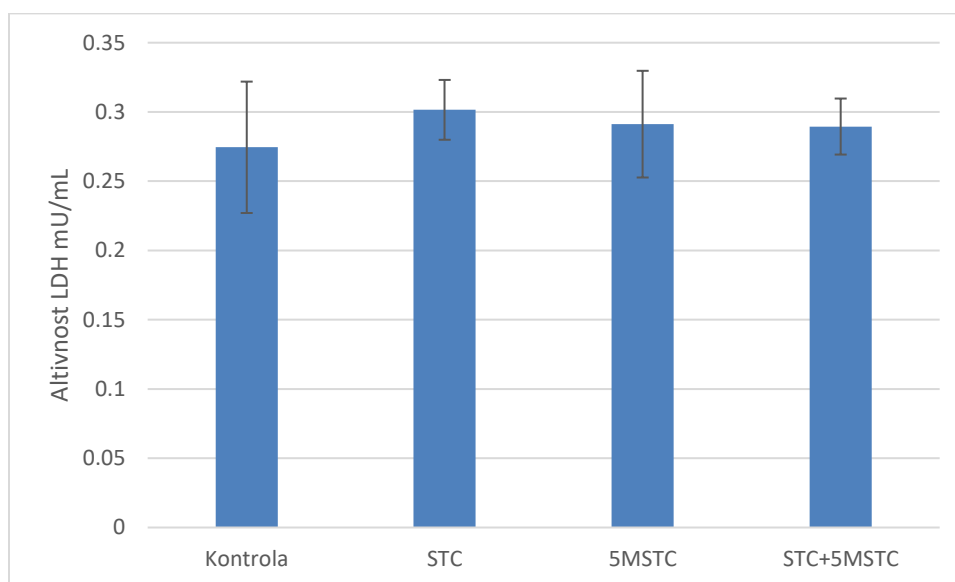
Rezultati aktivnosti LDH i koncentracije albumina statistički su obrađeni pomoću linearnih modela. Zavisna varijabla kod LDH bila je aktivnost, a skupina (kontrola, STC, 5-M-STC i STC+5-M-STC) je bila nezavisna varijabla. Kod albumina je koncentracija logaritmirana te je označena kao zavisna varijabla dok je skupina bila nezavisna varijabla. Korišten je t-test kao „post hoc“ test. Za statističku značajnost određena je vrijednost 0,05. Statistička analiza napravljena je u softveru R (R software version 3.6.3 (29 February 2020) for statistical computing).

## 4. Rezultati

Koncentracija LDH i albumina izmjerena je u bronhoalveolarnoj tekućini mužjaka štakora soja *Wistar* koji su intratrahealnom instilacijom tretirani otopinom DMSO/PBS (kontrolna skupina), mikotoksinima sterigmatocistinom, 5-metoksisterigmatocistinom i njihovom kombinacijom.

### 4.1. Aktivnost LDH

Aktivnost LHD u BALF-u štakora veća je u uzorcima BALF-a štakora tretiranih mikotoksinima nego u kontrolnim uzorcima, ali te vrijednosti nisu statistički značajne (**Slika 5.**).

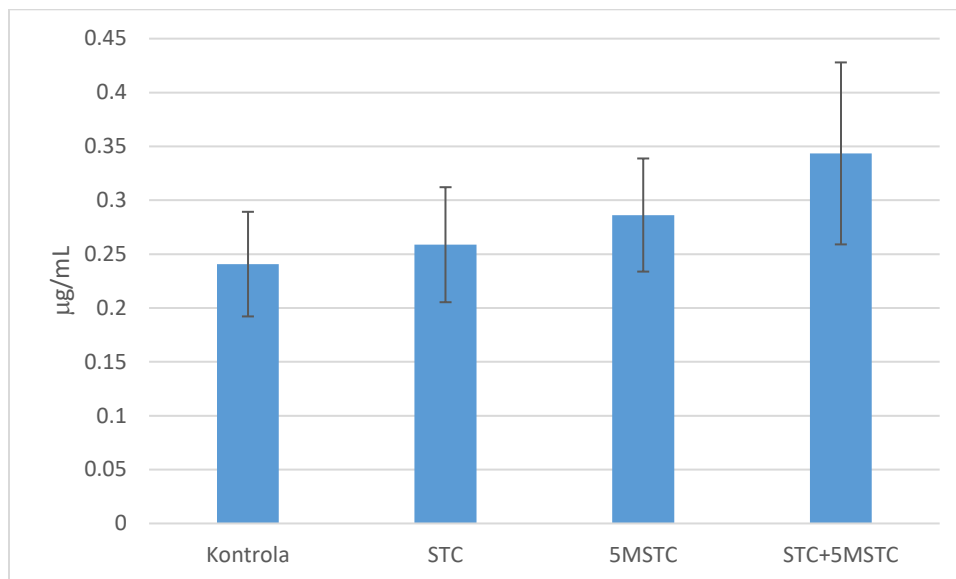


**Slika 5.** Aktivnost laktat dehidrogenaze u bronhoalveolarnoj tekućini štakora tretiranih kontrolom, sterigmatocistinom (STC), 5-metoksisterigmatocistinom (5MSTC) i kombinacijom sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina (STC + 5MSTC).

### 4.2. Koncentracija albumina

Koncentracija albumina u BALF-u štakora veća je u uzorcima BALF-a štakora tretiranih mikotoksinima nego u kontrolnim uzorcima. Najveća koncentracija albumina je u BALF-u štakora tretiranih s oba mikotoksina, nešto manja u BALF-u štakora tretiranih s 5-M-STC, a

najmanja u BALF-u štakora tretiranih sa STC. Iako su te vrijednosti veće od kontrolnih vrijednosti, one nisu statistički značajne (**Slika 6.**).



**Slika 6.** Koncentracija albumina u bronhoalveolarnoj tekućini štakora tretiranih kontrolom, sterigmatocistinom (STC), 5-metoksisterigmatocistinom (5MSTC) i kombinacijom sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina (STC + 5MSTC).

## 5. Rasprava

Istraživanja su pokazala da ljudi koji žive u vlažnim stambenim prostorima više obolijevaju od alergija, raznih respiratornih bolesti, umora i drugih stanja povezanih i s lošijim imunitetom (Nielsen 2003; Engelhart i sur. 2002). Te su bolesti, između ostaloga, posljedica plijesni prisutnih u vlažnim prostorima, odnosno spora i mikotoksina koje te plijesni proizvode.

Klima utječe na rast i rasprostranjenost plijesni i mikotoksina. Promjenom klime i vremenskih uvjeta – iznenadnih poplava i bujica, posebno na Mediteranu, mogle bi se pojaviti različite nove kombinacije plijesni i mikotoksina u područjima u kojima ih prije nije bilo. Ovo se najviše odnosi na plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (Moretti i sur. 2019).

Istraživanje prikazano u ovom diplomskom radu dio je istraživanja učestalosti i toksičnosti plijesni iz roda *Aspergillus* i mikotoksina koje te plijesni proizvode u području u Hrvatskoj pogođenom poplavom 2014. godine (Gunja i okolica). Šegvić Klarić i sur. (2018) svojim su istraživanjem u tim područjima zaključili da se u zatvorenim objektima (obnovljenim i neobnovljenim kućama i javnim prostorima) najčešće pojavljuju plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Versicolores*. Izolirani su mikotoksini koje ove plijesni proizvode i u većini je izolata pronađen sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin (Jakšić i sur. 2021). STC i 5-M-STC su, tijekom zimskog perioda istraživanja, pronađeni u 100 % odnosno 66,6 % kućanstava iz područja pogođenih poplavom, ali i u 90 % odnosno 80 % kućanstava u kontrolnom selu.

Budući da su ovim mikotoksinima ljudi najčešće izloženi inhalacijom, napravljen je pokus na mužjacima štakora soja *Wistar* kako bi se ispitali toksični učinci STC-a i 5-M-STC-a te njihove kombinacije *in vivo*. Mužjaci štakora soja *Wistar* jednokratno su intratrahealno instilirani ovim mikotoksinima i njihovom kombinacijom dozama koje su određene na temelju podataka iz analiziranih stambenih prostora nakon poplave.

U istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu, u bronhoalveolarnoj tekućini (BALF) štakora mjerena je aktivnost LDH kao pokazatelja vijabilnosti stanice i citotoksičnosti. Aktivnost LDH bila je malo viša u BALF-u tretiranih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali taj rezultat nije bio statistički značajan.

U literaturi većina istraživanja mikotoksina *in vivo* odnosi se na oralnu primjenu mikotoksina na životinjama, dok mnogi autori sugeriraju da bi upravo inhalacijski put unosa mogao biti

značajno više toksičan (Creasia i sur. 1987; Pang i sur. 1988; Tuomi i sur. 2000). U literaturi je opisan inhalacijski tretman štakora sporama plijesni ili aflatoksinima ili T-2 toksinom, no inhalacijski tretman STC-om i 5-M-STC-om opisan u ovom diplomskom radu je prvi takav pokus (Jakab i sur. 1994; Jussila i sur. 2002). U pokusu u kojem su miševi i štakori tretirani s 50 i 150 µg aflatoksina B1 intratrahealnom instilacijom, mjerena je proizvodnja faktora nekroze tumora  $\alpha$  koja je bila značajno smanjena nakon tretmana s AFB1 (Jakab i sur. 1994). Iako su AFB1 i STC strukturno slični, prema dostupnim podacima o toksičnosti, AFB1 je puno toksičniji i u navedenom je pokusu korištena visoka doza AFB1. Aktivnost LDH mjerena je u BALF-u miševa soja NIH/S jednokratno tretiranih sporama vrste *Aspergillus versicolor* ( $10^5$  –  $10^8$  spora/životinji) (Jussila i sur. 2002). Životinje su tretirane intratrahealnom instilacijom. Aktivnost LDH rasla je s primijenjenom dozom, no značajno je bila viša tek kod najveće primijenjene doze. Aktivnost LDH mjerena je u stanicama ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) nakon pojedinačnog i zajedničkog tretmana mikotoksinima deoksinivelenolom (DON), fumonizinom B1 (FB1), zearalenonom (ZEA), eniantinom A (ENA), eniantinom B (ENB) i beauvericinom (BEA) tijekom šest i 24 sata (Pérez-Fuentes i sur. 2021). Povećana aktivnost LDH izmjerena je u stanica tretiranih nereguliranim mikotoksinima (ENA, ENB i BEA), dok je u ostalim stanicama aktivnost LDH bila malo viša od kontrolnih stanica.

Iako jednokratni tretman STC-om opisan u ovom diplomskom radu ne uzrokuje značajan porast LDH u BALF-u, njegovo povećanje u odnosu na kontrolnu skupinu važan je podatak za buduće dugotrajnije tretmane intratrahealnom instilacijom, budući da su ljudi putem dišnog sustava dugotrajno izloženi ovim mikotoksinima.

Koncentracija albumina mjerena u BALF-u u pokusu opisanom u ovom diplomskom radu raste u smjeru STC > 5-M-STC > STC + 5-M-STC. Koncentracija albumina mjerena je u BALF-u miševa soja NIH/S jednokratno tretiranih sporama vrste *Aspergillus versicolor* (105 – 108 spora po životinji) (Jussila i sur. 2002). Životinje su tretirane intratrahealnom instilacijom. Koncentracija albumina rasla je s primijenjenom dozom. U navedenom su pokusu miševi tretirani sporama vrste plijesni koja proizvodi mikotoksine koji su korišteni u našem pokusu. U pokusu u kojem je *in vitro* istraživana utjecaj ekstrakta plijesni izoliranih s vlažnih zidova stambenih prostora na pokretljivost trepetljika u epitelu dušnika pilića, pronađeno je da je STC inhibitor pokretljivosti trepetljika (Piecková i Jesenská 1998). Štakori izloženi sporama plijesni



*A. versicolor* koje su rasle na zidovima njihovih kaveza, imali su oštećenja pluća i granulomatozne lezije nakon 30 dana izloženosti. Pretpostavlja se da su ti simptomi rezultat proizvodnje IL-1 (Sumi i sur. 1994). Upalni učinci spora plijesni *Aspergillus versicolor* izoliranih iz gipsanih ploča u vlažnim stambenim prostorima pronađeni su i na stanicama makrofaga miša (RAW264.7) (Murtoniemi i sur. 2001). Jakšić i sur. (2016) dokazali su citotoksičnost inhibitornih koncentracija čistog STC-a i ekstrakata različitih gljivica iz roda *Aspergillus* koje proizvode STC na A549 i THP-1 stanice slične makrofagima.

Iako izmjerene koncentracije albumina nisu statistički značajno veće u odnosu na albumin izmjeren u BALF-u kontrolne skupine, ukazuju na moguću toksičnost STC-a, 5-M-STC i kombinacije ovih mikotoksina tijekom dugotrajne izloženosti.

## 6. Zaključak

Istraživanje utjecaja STC-a i 5-M-STC-a na mjestima pogođenima poplavama, ili općenito u vlažnim stambenim prostorima, važno je zbog učestalosti nalaska plijesni iz roda *Aspergillus* koje proizvode STC, kojem su ljudi izloženi inhalacijom. Jednokratni tretmani mikotoksinima STC-om i 5-M-STC-om povećali su aktivnost laktat dehidrogenaze i koncentraciju albumina, no to povećanje nije bilo statistički značajno. Budući da se STC-a i 5-M-STC pojavljuju zajedno, važna su daljnja istraživanja njihovog zajedničkog djelovanja te otkrivanje djeluju li oni zajedno sinergistički, antagonistički ili aditivno. Istraživanja utjecaja na zdravlje ljudi i životinja pridonose potencijalnoj zakonskoj regulaciji maksimalne dozvoljene razine ovih mikotoksina u okolišu i hrani.

## 7. Literatura

- Aldecoa, C., Llau, J. V., Nuvials, X., Artigas, A. 2020. Role of Albumin in the Preservation of Endothelial Glycocalyx Integrity and the Microcirculation: A Review. *Annals of Intensive Care* 10(1): 1–12.
- Armendáriz, C. R., Fernández, Á. J. G., Gironés, M. C. L. R., Torre, A. H. 2014. Mycotoxins. U: Wexler, P. (ur.) *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press 424–427.
- Baertschi, S. W., Raney, K. D., Shimada, T., Harris, T. M., Guengerich, F. P. 1989. Comparison of rates of enzymatic oxidation of aflatoxin B1, aflatoxin G1, and sterigmatocystin and activities of the epoxides in forming guanyl-N7 adducts and inducing different genetic responses. *Chemical Research in Toxicology* 2: 114–122.
- Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497–516.
- Birks, Susan. 2006. Sick Building Syndrome. *Cleanroom Technology* 12(11): 3.
- Black, S. M., Ellard, S., Parry, J. M., Wolf, C. R. 1992. Increased sterigmatocystin-induced mutation frequency in *Saccharomyces cerevisiae* expressing cytochrome P450 CYP2B1. *Biochemical Pharmacology* 43: 374–376.
- Bloom, E., Bal, K., Nyman, E., Must, A., Larsson, L. 2007. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology* 73(13): 4211–4217.
- Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams T. H., Leonard, T. J. 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1418–1422.
- Cabaret, O., Puel, O., Botterel, F., Delaforge, M., Bretagne, S. 2014. Metabolic detoxification pathways for 5-methoxy-sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Xenobiotica* 44(1): 1–9.

- Cabaret, O., Puel, O., Botterel, F., Pean, M., Khoufache, K., Costa, J.-M., Delaforge, M., Bretagne, S. 2010. Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology* 23: 1673–1681.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology reviews* 66(3): 447–459.
- CAST. 2003. Mycotoxins: Risks in Plant Animal, and Human Systems. No. 139. Ames, IA. CAST: Task Force Report No. 139.
- Coppock, R. W., Dziwenka, M. M. 2019. Mycotoxins. U: Gupta R. C. (ur.) *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press 615–626.
- Creasia, D. A., Thurman, J. D., Jones, L. J., Nealley, M. L., York, C. G., Wannemacher, R. W., Bunner, D. L. 1987. Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 8: 230–235.
- Crofton-Sleigh, C., Doherty, A., Ellard, S., Parry, E. M., Venitt, S. 1993. Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase. *Mutagenesis* 8: 363–372.
- Curry, P. T., Reed, R. N., Martino, R. M., Kitchin, R. M. 1984. Induction of sister-chromatid exchanges in vivo in mice by the mycotoxins sterigmatocystin and griseofulvin. *Mutation Research* 137: 111–115.
- Dabelić, S., Kifer, D., Jakšić, D., Kopjar, N., Šegvić Klarić, M. 2021. Sterigmatocystin, 5-Methoxysterigmatocystin, and Their Combinations Are Cytotoxic and Genotoxic to A549 and Hepg2 Cells and Provoke Phosphorylation of Chk2, but Not Fancd2 Checkpoint Proteins. *Toxins* 13(7): 464.
- Delgado-Virgen, F., Guzman-de-Peña, D. 2009. Mechanism of Sterigmatocystin Biosynthesis Regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Brazilian journal of microbiology* 40(4): 933–942.
- Despot, D., Šegvić Klarić, M. 2014. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 65: 209–218.

- Dutton, M. F. 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews* 52: 274–295.
- ECHA. 2016. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.
- EFSA. 2013. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal* 11(6): 3254.
- Ellard, S., Parry, J. M. 1993. A comparative study of the use of primary Chinese hamster liver cultures and genetically engineered immortal V79 Chinese hamster cell lines expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Toxicology* 82: 131–149.
- Engelhart, S., Loock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Färber, H., Exner, M. 2002. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and environmental microbiology* 68(8): 3886–3890.
- Essigmann, J. M., Barker, L. J., Fowler, K. W., Francisco, M. A., Reinhold, V. N., Wogan, G. N., 1979. Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 179–183.
- Fujii, K., Kurata, H., Odashima, S., Hatsuda, Y. 1976. Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. *Cancer Research* 36(5): 1615–1618.
- Gravesen, S., Nielsen, P. A., Iversen, R., Nielsen, K. F. 1999. Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environmental Health Perspectives* 107: 505–508.
- Haschek, W. M., Kenneth, A. V. 2013. Mycotoxins. U: Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A. (ur.) *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press 1187–1258.
- Hiebl, B., Peters, S., Gemeinhardt, O., Niehues, S. M., Jung, F. 2017. Impact of Serum in Cell Culture Media on *in Vitro* Lactate Dehydrogenase (LDH) Release Determination. *Journal of Cellular Biotechnology* 3: 9–13.

- Huang, X., Zhang, X., Yan, X., Yin, G. 2002. Effects of sterigmatocystin on interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Journal of Hygiene Research* 31: 112–114.
- IARC. 1976. Sterigmatocystin. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 10: 245–251.
- IARC. 2002. Aflatoxins (Naturally occurring mixtures). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 82.
- Jakab, G. J., Hmielecki, R. R., Zarba, A., Hemenway, D. R., Groopman, J. D. 1994. Respiratory Aflatoxicosis: Suppression of Pulmonary and Systemic Host Defenses in Rats and Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 125(2): 198–205.
- Jakšić, D., Puel, O., Canlet, C., Kopjar, N., Kosalec, I., Šegvić Klarić, M. 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5- methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Archives of Toxicology* 86(10): 1583–1591.
- Jakšić, D., Kocsubé, S., Bencsik, O., Kecskeméti, A., Szekeres, A., Vágvölgyi, C., Varga, J., Šegvić Klarić, M. 2016. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycological Progress* 16: 63–72.
- Jakšić, D., Šegvić, M. K., Crnolatac, I., Vujičić, N. Š., Smrečki, V., Górecki, M., Pescitelli, G., Piantanida, I. 2019. Unique Aggregation of Sterigmatocystin in Water Yields Strong and Specific Circular Dichroism Response Allowing Highly Sensitive and Selective Monitoring of Bio-Relevant Interactions. *Marine Drugs* 17: 629.
- Jakšić, D., Sertić, M., Kifer, D., Kocsubè, S., Mornar Turk, A., Nigović, B., Šarkanj, B., Krska, R., Sulyok, M., Šegvić Klarić, M. 2021. Fungi and Their Secondary Metabolites in Water-Damaged Indoors after a Major Flood Event in Eastern Croatia. *Indoor Air* 31(3): 730–744.
- Jussila, J., Komulainen, H., Kosma, V.-M., Nevalainen, A., Pelkonen, J., Hirvonen, M.-R. 2002. Spores of *Aspergillus versicolor* isolated from indoor air of a moisture-damaged building provoke acute inflammation in mouse lungs. *Inhalation Toxicology* 12: 1261–1277.

- Keller, N. P., Adams, T.H. 1995. Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *SAAS bulletin, biochemistry and biotechnology* 8: 14–21.
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. D. 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols* 6.
- Lancaster, M., Jenkins, F., Philp, J. 1961. Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature* 192: 1095–1096.
- Lešić, T., Kmetič, I., Kiš, M., Vulić, A., Kudumija, N., Zadavec, M., Murati, T., Pleadin, J. 2019. Sterigmatocystin – prekursor aflatoksina B1 u hrani i hrani za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 14(3-4): 105–112.
- Li, D. W., Yang, C. S. 2004. Fungal Contamination as a Major Contributor to Sick Building Syndrome. *Advances in Applied Microbiology* 55: 31–112.
- Liu, Y., Xing, X., Wang, J., Xing, L., Su, Y., Yao, Z., Yan, X., Wang, J., Zhang, X. 2012. Sterigmatocystin alters the number of FoxP3+ regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells in BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1920–1926.
- Lou, J. L., Tian, H. J., Meng, Z. H., Gou, Z. Q. 1995. Detection of sterigmatocystin in food/feed samples from area with various liver/stomach cancer incidences by enzyme-linked immune-absorbent assay (in Chinese). *Wei Sheng Yan Jiu/Journal of Hygiene Research* 2: 28–31.
- Ma, F., Misumi, W., Zhao, K., Kudo, M. 2003. Long-term treatment with sterigmatocystin, a fungus toxin, enhances the development of intestinal metaplasia of gastric mucosa in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian Gerbils. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 4: 360–369.
- Margaron, M. P., Soni, N. C. 2002. Effects of Albumin Supplementation on Microvascular Permeability in Septic Patients. *Journal of Applied Physiology* 92(5): 2139–2145.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 5135–5139.

- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., Naresh, M. 2017. Climate change, food security and mycotoxins: do we know enough? *Fungal Biology Reviews* 31: 143–154.
- Miller, J. D., Sun, M., Gilyan, A., Roy, J., Rand, T. G. 2010. Inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs induced by low molecular weight compounds from fungi from the built environment. *Chemico-Biological Interactions* 183(1): 113–124.
- Moretti, A., Pascale, M., Logrieco, A. F. 2019. Mycotoxin Risks under a Climate Change Scenario in Europe. *Trends in Food Science and Technology* 84: 38–40.
- Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Kitamura, J., Niwa, M., Hamasaki, T., Kawai, K. 1986. Genotoxic effects of a variety of sterigmatocystin-related compounds in the hepatocyte/DNA-repair test and the Salmonella microsome assay. *Mutation Research* 173: 217–222.
- Morita, H., Umeda, M., Ogawa, H. I. 1991. Mutagenicity of various chemicals including nickel and cobalt compounds in cultured mouse FM3A cells. *Mutation Research* 261: 131–137.
- Murtoniemi, T., Nevalainen, A., Suutari, M., Toivola, M. 2001. Induction of cytotoxicity and production of inflammatory mediators in raw264.7 macrophages by spores grown on six different plasterboards. *Inhalation Toxicology* 3: 233–247.
- Nielsen, K. F., Gravesen, S., Nielsen, P. A., Andersen, B., Thrane, U., Frisvad, J. C. 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia* 145: 43–56.
- Nielsen, K. F. 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology* 39(2): 103–117.
- Ohtsubo, K., Saito, M., Kimura, H. 1978. High incidence of hepatic tumours in rats fed mouldy rice contaminated with *Aspergillus versicolor* containing sterigmatocystin. *Food and Cosmetics Toxicology* 16: 143–149.
- Pang, V., Lambert, R. J., Felsburg, P. J., Beasley, V. R., Buck, W. B., Haschek, W. M. 1988. Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: clinical signs and



- effects on hematology, serum biochemistry and immune response. *Fundamental and Applied Toxicology* 11: 100–109.
- Peraica, M., Domian, A., Jurjević, Ž., Cvjetković, B. 2002. Prevention of Exposure To Mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 53(4): 229–237.
- Pérez-Fuentes, N., Alvariño, R., Alfonso, A. González-Jartín, J., Gegunde, S., Vieytes, M. R., Botana, L. M. 2021. Single and Combined Effects of Regulated and Emerging Mycotoxins on Viability and Mitochondrial Function of SH-SY5Y Cells. *Food and Chemical Toxicology* 154.
- Pfeiffer, E., Fleck, S. C., Metzler, M. 2014. Catechol formation: a novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology* 27: 2093–2099.
- Piecková, E., Jesenská, Z. 1998. 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 Microbiologica* 43(6): 672–678.
- Piecková, E., Jesenská, Z. 1999. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 6: 1–11.
- Pitt, JI. 2000. Toxigenic Fungi and Mycotoxins. *Food Science Australia* 56: 184–92.
- Pitt, JI. 2013. Mycotoxins. U: Glenn, M. (ur.) *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press 409–418.
- Purchase, I. F., van der Watt, J. J. 1969. Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. *Food and Cosmetics Toxicology* 7(2): 135–139.
- Rank, C., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Varga, J., Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology* 115: 406–420.
- Richard, J. L., Thurston, J. R., Lillehoj, E. B., Cysewski, S. J., Booth, G. D. 1978. Complement activity, serum protein, and hepatic changes in guinea pigs given sterigmatocystin or aflatoxin, alone or in combination. *American Journal of Veterinary Research* 39: 163–166.

- Schulz, T., Senkpiel, K., Ohgke, H. 2004. Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207(3): 267–277.
- Sumi, Y., Takeuchi, M., Miyakawa, M., Nagura, H. 1994. Granulomatous Lesions in the Lung Induced by Inhalation of Mold Spores. *Virchows Archiv* 424(6): 661–668.
- Šegvić Klarić, M., Jakšić, D., Kocsubé, S., Kifer, D., Sulyok, M., Jelić, D., Šarkanj, B. 2018. Post-flood indoor occurrence of toxigenic Aspergilli from the Versicolores clade: Is it dangerous? In Proceedings of the *Romanian Journal of Laboratory Medicine*, Timisoara, Romania, Volume 26, pp. S12–S13.
- Tabata, S. 2011. Yeasts and Molds | Mycotoxins: Aflatoxins and Related Compounds. U: Fuquay, J. W. (ur.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press 801–811.
- Timbrell, J. A. 1998. Biomarkers in Toxicology. *Toxicology* 129: 1–12.
- Tuomi, T., Reijula, K., Johnsson, T., Hemminki, K., Hintikka, E-L., Lindroos, O., Kalso, S., Koukila-Kähkölä, P., Mussalo-Rauhamaa, H., Haahtela, T. 2000. Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1899–1904.
- Ueda, N., Fujie, K., Gotoh-Mimura, K., Chattopadhyay, S. C., Sugiyama, T. 1984. Acute cytogenetic effect of sterigmatocystin on rat bone-marrow cells in vivo. *Mutation Research* 139: 203–206.
- Wilkinson, H. H., Ramaswamy, A., Sim, S. C., Keller, N. P. 2004. Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia* 96(6): 1190–1198.
- Xing, L. X., Zhang, X. H., Li, Y. H., Yan, X., Wang, J., Wang, F. 2005. Effects of sterigmatocystin on HLA expression of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Journal of Hygiene Research* 34: 454–456.
- Yabe, K., Ando, Y., Hashimoto, J., Hamasaki, T. 1989. Two distinct O-methyltransferases in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2172–2177.

- Yabe, K., Nakajima, H. 2004. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(6): 745–755.
- Yu, J. H., Leonard, T. J. 1995. Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *Journal of Bacteriology* 177: 4792–4800.
- Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., Bennett, J. W. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology* 70(3): 1253–1262.
- Zingales, V., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M. J. 2020. Sterigmatocystin: Occurrence, toxicity and molecular mechanisms of action - A review. *Food and Chemical Toxicology* 146: 111802.
- Zwicker, G. M., Carlton, W. W., Tuite, J. 1974. Long-term administration of sterigmatocystin and *Penicillium viridicatum* to mice. *Food and Cosmetics Toxicology* 12: 491–497.

## 8. Životopis

Rođena sam u Zagrebu, 13. veljače 1996. Ovdje sam završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2015. godine. Nakon završenog preddiplomskog studija, upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija. Odradila sam dvije stručne prakse – na Institutu Ruđer Bošković i Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, gdje je i napravljen ovaj diplomski rad. Tijekom studija bila sam članica Udruge studenata biologije (BIUS) u sekciji „Biologija mora“. Sudjelovala sam u projektu „Istraživanje podmorja silbanskih grebena 2018.“ u sklopu Udruge.

Trenutno sam zaposlena u području farmakovigilancije. Planiram se usavršavati u smjeru tog područja, ali toksikologija mi svakako ostaje kao interes.