

# Utjecaj sterigmatocistina na oksidacijski stres u mužjaka štakora soja Wistar

---

Šunić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:498678>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Iva Šunić

UTJECAJ STERIGMATOCISTINA NA OKSIDACIJSKI STRES U MUŽJAKA ŠTAKORA  
SOJA WISTAR

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Rašić, predan je 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) kojega financira Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ.

## ZAHVALA

Dr.sc. Dubravki Rašić zahvaljujem na uloženom trudu, vremenu i ukazanom povjerenju što mi je omogućila studentsku praksu iz koje je nastao ovaj rad.

Prof.dr.sc. Domagoju Đikiću zahvaljujem na pomoći i suradnji.

Zahvaljujem i svima u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada na pomoći i susretljivosti te što su mi omogućili korištenje laboratorija.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška tokom svih godina školovanja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UTJECAJ STERIGMATOCISTINA NA OKSIDACIJSKI STRES U MUŽJAKA ŠTAKORA SOJA WISTAR

Iva Šunić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sterigmatocistin je mikotoksin strukturno sličan aflatoksinu te je prekursor u biosintezi aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) i G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>). Sintetizira ga 55 različitih vrsta plijesni koje pripadaju filogenetički i ekološki različitim rodovima. Pronađen je u različitim prehrambenim namirnicama i nakon procesa obrade te u unutrašnjim vlažnim prostorima i prašini. Ciljni organi njegovog djelovanja tijekom akutne izloženosti su bubrezi i jetra. LD<sub>50</sub> za oralnu izloženost iznosi 160 mg kg<sup>-1</sup> t.m. Do sada poznati mehanizam djelovanja povezan je s nastankom egzo-epoksida te formiranjem DNA-adukata te se zbog toga pretpostavlja da je mehanizam djelovanja povezan s nastankom oksidacijskog stresa. U ovom radu istražena je uloga sterigmatocistina u nastanku oksidacijskog stresa u muških štakora soja Wistar. Štakori su jednokratno tretirani sterigmatocistinom u tri različite doze: 1/4, 1/8 i 1/16 LD<sub>50</sub> (40, 20 i 10 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). U tkivima bubrega i jetre te krvnoj plazmi mjereni su različiti parametri oksidacijskog stresa: aktivnosti enzima superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze, koncentracija reduciranog glutationa i malondialdehida. Iz rezultata je vidljivo da sterigmatocistin uzrokuje oksidacijski stres, no u svrhu otkrivanja mehanizma toksičnosti sterigmatocistina potrebna su daljnja istraživanja.

(41 stranica, 14 slika, 2 tablice, 128 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mikotoksini, antioksidativni enzimi, slobodni radikali

Voditelj 1: dr. sc. Dubravka Rašić, zn. sur.

Voditelj 2: dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

Ocjenitelji:

dr.sc. Domagoj Đikić, red.prof.

dr.sc. Romana Gračan, doc.

dr.sc. Biljana Balen, red.prof.

Rad prihvaćen: 18. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### EFFECT OF STERIGMATOCYSTIN ON OXIDATIVE STRESS IN MALE WISTAR STRAIN RATS

Iva Šunić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Sterigmatocystin is a mycotoxin structurally similar to aflatoxin and is a precursor to aflatoxin B1 (AFB1) and G1 (AFG1) in their biosynthesis. It is synthesized by 55 different mold species belonging to phylogenetically and ecologically diverse genera. It has been found in various foodstuffs even after the processing and in indoor humid spaces and the dust. Target organs during acute exposure are the kidneys and liver. The LD<sub>50</sub> for oral exposure is 160 mg kg<sup>-1</sup> b.w. The currently known mechanism of action is associated with the formation of exo-epoxides and the formation of DNA adducts and it is therefore assumed that the mechanism of action is related to the occurrence of oxidative stress. This study investigates the role of sterigmatocystin in the generation of oxidative stress in male Wistar rats. Rats were treated once with sterigmatocystin at three different doses: 1/4, 1/8, and 1/16 LD<sub>50</sub> (40, 20, and 10 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Different parameters of oxidative stress have been measured in kidney and liver tissues and blood plasma: the activities of the enzyme superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, the concentration of reduced glutathione and malondialdehyde. The results show that sterigmatocystin causes oxidative stress. However, further studies are needed to discover the mechanism of sterigmatocystin toxicity.

(41 pages, 14 figures, 2 tables, 128 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: mycotoxins, oxidative stress, antioxidant enzymes

Supervisor 1: dr. sc. Dubravka Rašić, scientific associate

Supervisor 2: dr. sc. Domagoj Đikić, Prof.

Reviewers:

dr.sc. Domagoj Đikić, Prof.

dr.sc. Romana Gračan, Asst. Prof.

dr.sc. Biljana Balen, Prof.

Thesis accepted: 18<sup>th</sup> September 2019.

## Sadržaj

1.	Uvod .....	1
1.1.	Plijesni i mikotoksini.....	1
1.2.	Sterigmatocistin .....	2
1.3.	Biosinteza i metabolizam .....	3
1.4.	Izloženost sterigmatocistinu .....	4
1.5.	Mehanizam toksičnosti i toksični učinci sterigmatocistina .....	5
1.6.	Oksidacijski stres .....	7
1.6.1.	Glutation .....	9
1.6.2.	Malondialdehid .....	9
1.6.3.	Superoxid dismutaza .....	10
1.6.4.	Katalaza .....	10
1.6.5.	Glutation peroksidaza .....	11
2.	Cilj istraživanja .....	11
3.	Materijali i metode .....	12
3.1.	Kemikalije .....	12
3.2.	Instrumenti.....	13
3.3.	Priprema pufera i otopina .....	13
3.4.	Životinje .....	14
3.4.1.	Tretman.....	14
3.5.	Metode.....	15
3.5.1.	Mjerenje koncentracije glutaciona .....	15
3.5.2.	Aktivnost enzima.....	16
3.6.	Statistička obrada podataka .....	18
4.	Rezultati .....	19
4.1.	Masa životinja.....	19
4.2.	Oksidacijsko oštećenje .....	19
4.2.1.	Glutation .....	19
4.2.2.	Malondialdehid .....	21
4.2.3.	Superoxid dismutaza .....	22
4.2.4.	Katalaza .....	24
4.2.5.	Glutation peroksidaza .....	25
5.	Rasprava .....	27

6.	Zaključak .....	30
7.	Literatura.....	31
8.	Životopis .....	40



## POPIS KRATICA

AFB <sub>1</sub>	aflatoksin B <sub>1</sub>
AFG <sub>1</sub>	aflatoksin G <sub>1</sub>
BHT	butilirani hidroksitoluen
BSA	goveđi serumski albumin
CAT	katalaza
CONTAM	The Panel on Contaminants in the Food Chain
DTNB	5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoat
EC-SOD	izvanstanična superoksid dismutaza
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
GPx	glutation peroksidaza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
HLA-I	ljudski leukocitni antigen I
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFN	interferon
IL	interleukin
i.p.	intraperitonealna primjena
LD <sub>50</sub>	letalna doza 50%
MDA	malondialdehid
p.o.	<i>per os</i> - oralna primjena
ROS	reaktivne kisikove čestice
SOD	superoksid dismutaza
STC	sterigmatocistin
t.m.	tjelesna masa
TNF	faktor nekroze tumora

# 1. Uvod

## 1.1. Plijesni i mikotoksini

Plijesni su organizmi koji obuhvaćaju velik broj vrsta iz nekoliko rodova (Willey i sur. 2017). Budući da vole topla i vlažna staništa, na kojima obitavaju kao saprofiti, često ih nalazimo na prehrambenim proizvodima ili vlažnim mjestima (npr. stari podrumi, tavani i sl.). Rastu u formi višestaničnih niti zvanih hife. Hife čine tijelo gljive ili micelij. On je odgovoran za lučenje enzima koji razlažu organske tvari na jednostavne šećere koje potom hife upijaju (Willey i sur. 2017).

Takve filamentozne gljive sintetiziraju niz sekundarnih metabolita. Mnogi imaju korisne učinke kao što su npr. antibiotici, pigmenti, enzimi, vitamini, lipidi i spojevi koji se koriste u dobivanju lijekova. Osim njih, plijesni proizvode i mikotoksini koji pripadaju među najtoksičnije prirodne spojeve (Adrio i Demain 2003; Bennett i Klich 2003; Carbone i sur. 2007). Mikotoksini su male molekule (oko 50 Da) različitih struktura koje ne potiču odgovor imunološkog sustava jer ih on ne raspoznaje kao strane molekule (Pitt 2000). Postoji nekoliko klasa mikotoksina ovisno o kemijskim i strukturnim svojstvima. U poliketide pripadaju sterigmatocistin i aflatoksin, postoje još ciklički peptidi, alkaloidi, seskviterpenoidi i epipolitioidiokso piperazini (Carbone i sur. 2007; Desjardins i sur. 1993; Gardiner i sur. 2005; Payne i Brown 1998).

Mikotoksini i njihovi metaboliti mogu se naći u hrani životinjskog porijekla (meso, mlijeko, jaja, sir) ako su životinje bile izložene kontaminiranom krmivu (Peraica i sur. 2002). Proizvodnja mikotoksina ovisi o genskom potencijalu plijesni, temperaturi i vlažnosti okoliša. Mogu ući u organizam putem kože, dišnog i probavnog sustava, distribuirati se u organima sisavaca te izazvati probleme u normalnom funkcioniranju organizma (Soriano del Castillo 2007; Flores-Flores i sur. 2015; Wagacha i Muthomi 2008).

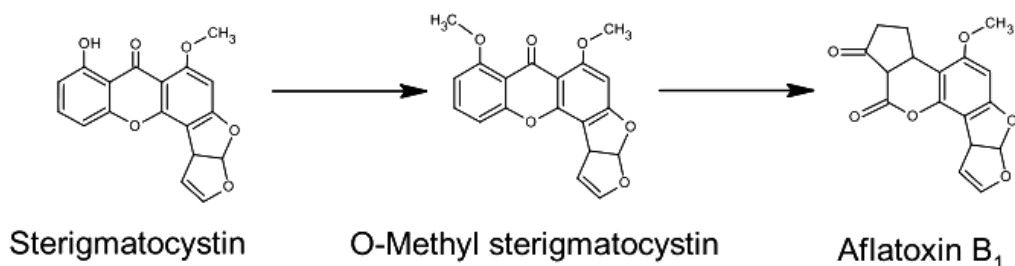
Bolesti uzrokovane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze. Primarne mikotoksikoze su one koje su nastale zbog konzumacije mikotoksina to jest prehrambenih proizvoda koji sadrže mikotoksine. Sekundarne mikotoksikoze nastaju indirektno tj. konzumacijom hrane životinjskog porijekla od životinja koje su hranjene kontaminiranim namirnicama (Flores-Flores i sur. 2015).

Do sada je pronađeno više od 300 različitih mikotoksina, a najviše se istražuju oni kojima je dokazano karcinogeno ili toksično djelovanje (Ji i sur. 2016). Najveći broj vrsta plijesni koji proizvode mikotoksine, a povezani su s proizvodnjom hrane dolaze iz tri roda: *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. U vlažnim prostorijama prevladavaju plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys* i *Memnoniella* (Ammann 2005).

## 1.2. Sterigmatocistin

Sterigmatocistin (STC) je jedan od najčešćih mikotoksina pronađen u vlažnim zgradama (Bloom i sur. 2007). Osim u zatvorenim prostorima prisutan je i u hrani i krmivu (Díaz Nieto i sur. 2018; EFSA 2013). STC mogu sintetizirati 55 različitih vrsta plijesni koje pripadaju filogenetički i ekološki različitim rodovima: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monocillium* i *Podospora* (Blackwell i sur. 2006; EFSA 2013; Rank i sur. 2011). IUPAC-ov naziv STC-a je (3aR,12cS)-8-hidroksi-6-metoksi-3a,12c-dihidro-7H-furo-[3',2':4,5] furo[2,3-c]-ksanten-7-on).

STC je derivat poliketida, velike skupine sekundarnih metabolita koje proizvode mikroorganizmi i biljke. Poliketidi su strukturno građeni od acetata i kratkih karboksilnih kiselina, a značajni su zbog široke primjene u medicini, industriji i agronomiji. Mogu djelovati štetno (npr. mikotoksini) ili mogu biti korisni (npr. antibiotici) (Calvo i sur. 2002; Huffman i sur. 2010). Među njih se ubraja i aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), najsnažniji poznati kancerogeni mikotoksin. AFB<sub>1</sub> i STC imaju slične strukture, a kod vrsta koje sintetiziraju aflatoksine STC je predzadnji prekursor u biosintezi AFB<sub>1</sub> i aflatoksina G<sub>1</sub> (Slika 1.) (Calvo i sur. 2002; Soriano del Castillo 2007; Díaz Nieto i sur. 2018; Frisvad 2003; IARC 1976, 1987).



**Slika 1.** Biosintetski put aflatoksina B<sub>1</sub> (Díaz Nieto i sur. 2018).

STC kristalizira u svjetlo žutoj boji, a kristali su oblika igle. Molekularna masa mu je 324.29 g mol<sup>-1</sup> (Veršilovskis i de Saeger 2010). Valna duljina maksimalne apsorpcije ovisi o otapalu u kojem se nalazi (Septien i sur. 1994).

### 1.3. Biosinteza i metabolizam

STC je prvi puta izoliran iz vrste *Aspergillus versicolor* te se ona i danas najviše koristi za produkciju STC-a za različita istraživanja (Soriano del Castillo 2007; Díaz Nieto i sur. 2018). Osim o vrsti, količina proizvedenog STC-a ovisi i o pH okoliša te izvoru ugljikohidrata za prehranu odnosno koristi li se glukoza ili laktoza (Delgado-Virgen i Guzman-de-Peña 2009; Karaffa i Keller 2016).

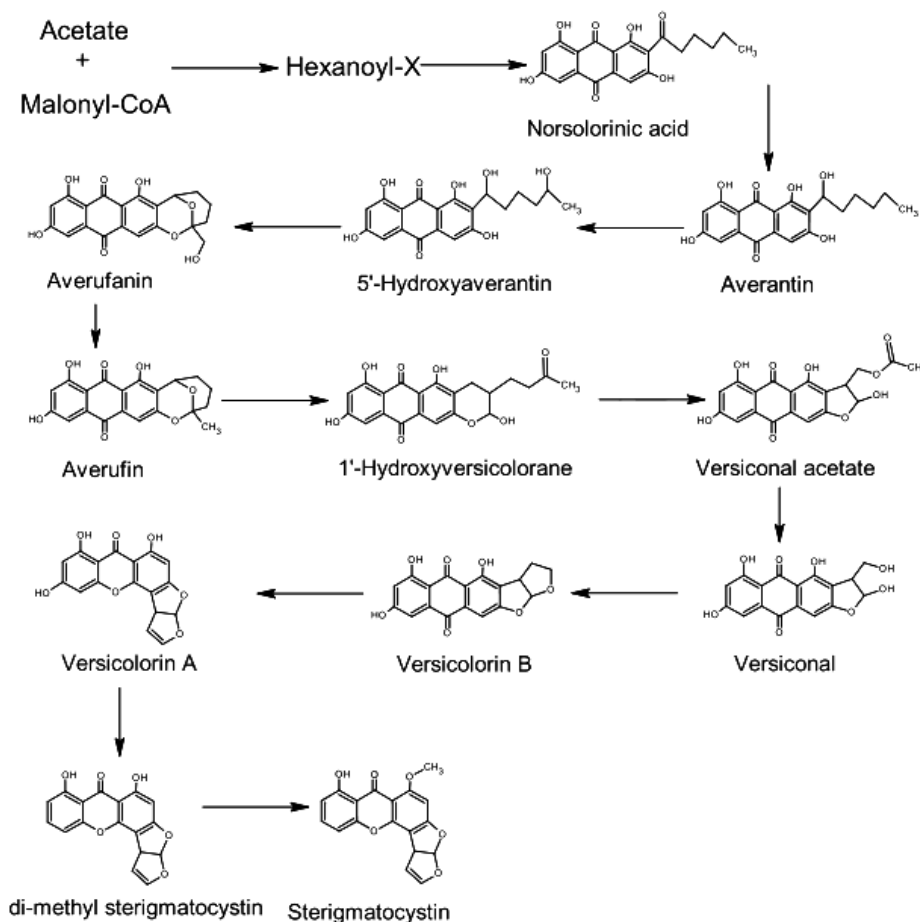
Biosinteza STC-a je među najpoznatijim i najistraživanijim. Sintetizira se acetat-malonatnim putem (**Slika 2.**). Kao i kod drugih organizama biosinteza prirodnih metabolita je povezana sa diferencijacijom stanica odnosno razvojem organizma. Za STC je karakteristično da je njegova proizvodnja direktno u vezi sa stanjem konidija odnosno konidiospora koje se nalaze na vršcima hifa. STC (i drugi prirodni spojevi) dijele biosintetske putove i molekule sa morfološkim procesima u miceliju gljiva. Smatra se da se na ovaj način koordiniraju morfološki razvoj i proizvodnja mikotoksina s obzirom na uvjete u okolišu (pH, vlažnost, dostupnost svjetla i sl.). Isto tako prisutnost STC-a pridonosi uspješnijem preživljavanju odnosno povećava sposobnost opstanka jer štiti jedinku od kompeticije (Calvo i sur. 2002; Wilkinson i sur. 2004).

Biotransformacija STC-a odvija se u jetri i plućima, a sastoji se od dva koraka. Faza I metabolizma odvija se pomoću enzima citokrom P450. Nastaju hidroksimetaboliti i reaktivni epoksidi koji potiču stvaranje DNA adukata. Osim stvaranja reaktivnih epoksida, dolazi i do hidroksilacije aromatskog prstena i nastanak katehola koji također reagiraju sa DNA molekulom (Essigmann i sur. 1979; Pfeiffer i sur. 2014; Gopalakrishnan i sur. 1992).

Ti reaktivni spojevi nastaju kako bi ih prepoznale molekule faze II metabolizma te pokrenule proces konjugacije. Faza II metabolizma uključuje formiranje konjugata koji smanjuju reaktivnost molekula te potiču njihovo izlučivanje iz organizma putem urina i žuči. Grupe koje najčešće formiraju konjugate su glukuronska kiselina, sulfati, glutation, aminokiseline, metil i acetil (Gupta 2016). STC prolazi glukuronidizaciju te nastaje STC glukuronid koji je ujedno i

najčešći spoj u urinu i fecesu, te monoglukuronid i monosulfat koji su rjeđi (Cabaret i sur. 2010, 2011; Olson i Chu 1993; Walkow i sur. 1985).

Ekskrecija konjugiranog STC-a i njegovih metabolita odvija se fecesom i urinom, a količina eliminiranog STC-a ovisi o životnoj dobi i spolu štakora (Walkow i sur. 1985). To potvrđuje i pronalazak Wanga i sur. koji su pronašli najveću koncentraciju u jetri, bubrezima, želucu, duodenumu i plućima štakora nakon oralne primjene. Manja količina je pronađena u masnom tkivu, mišićnom tkivu, testisima, kostima i rektalnom tkivu (Wang i sur. 1991).



**Slika 2.** Biosintetski put sterigmatocistina (Díaz Nieto i sur. 2018).

#### 1.4. Izloženost sterigmatocistinu

Organizam može biti izložen STC-u na dva načina: unosom putem hrane ili udisanjem spora plijesni. Spore se nalaze u prirodi, u zraku. U unutrašnjim prostorima unos STC-a udisanjem

može se dogoditi udisanjem kućne prašine ili spora plijesni koje se razvijaju na vlažnim mjestima kao što su zidovi, tepisi, tapete, namještaj itd. (Díaz Nieto i sur. 2018). Međutim veća količina STC-a može se unijeti hranom. Budući da je STC pronađen u raznim žitaricama, orašastim plodovima, zrnima kave, začинима, pivu i siru u kojima se plijesni razvijaju tijekom skladištenja ili dozrijevanja (Bokhari i Aly 2009; Díaz Nieto i sur. 2018; EFSA 2013; Metwally i sur. 1997; Veršilovskis i Bartkevičs 2012). STC je pronađen u manjim količinama u krajnjim proizvodima i nakon obrade kao što su mljevenje smeđe riže, pečenje kruha, sazrijevanje sira te prženje zrna kave.

Mikotoksini općenito pa tako i STC ne mogu se ukloniti iz hrane tijekom prerade namirnica. Nadalje, ako su kontaminirane žitarice namijenjene za prehranu stoke i domaćih životinja dolazi do sekundarnog unosa STC-a konzumacijom mesa tih životinja (Díaz Nieto i sur. 2018; EFSA 2013).

### **1.5. Mehanizam toksičnosti i toksični učinci sterigmatocistina**

Akutna toksičnost oralno unesenog STC-a je relativno niska. Kod muških štakora  $LD_{50}$  intraperitonealno unesenog (i.p.) STC-a je  $166 \text{ mg kg}^{-1} \text{ t.m.}$ , dok kod oralno unesenog (p.o.)  $LD_{50}$  iznosi  $60 \text{ mg kg}^{-1} \text{ t.m.}$  (Purchase i Van der Watt 1969). Ciljni organi toksičnosti su jetra i bubrezi, kao primarni organi u kojima se odvija metabolizam i ekskrecija ovog mikotoksina. Dolazi do degenerativnih promjena i nekroza tkiva, ovisno o dozi. Doze niže od  $LD_{50}$  uzrokuju nekrozu jedne ili nekoliko stanica, povećanje veličine jezgra te nastanak nekoliko jezgrića. Doze veće od  $LD_{50}$  uzrokuju ozbiljnu nekrozu i krvarenja unutar tkiva te čak degeneraciju hijalina u bubrezima (EFSA 2013; Purchase i Van der Watt 1969). Kod akutnog unosa inhalacijom, pronađena je povećana proizvodnja mukusa u bronhiolima i alveolama, epitel dišnih putova je pokazivao znakove upale odnosno pronađena su zadebljanja epitela koji imaju izgled edema (EFSA 2013; Miller i sur. 2010).

Kod kronične izloženosti pronađeno je da STC ima značajan utjecaj na tkiva, posebice jetre i bubrega (Purchase i van der Watt 1970a, 1970b). U jetri izaziva upalu i nekrozu tkiva, a što je duža izloženost, to dolazi do sve težih komplikacija odnosno nastanka kroničnog hepatitisa, nastanak novotvorina i fibroza, te poremećaj pravilne tkivne građe.

Imunotoksično djelovanje STC-a nije do kraja potvrđeno, ali je poznato da utječe na imunološki sustav iako rezultati nisu uvijek jednoznačni (EFSA 2013). Podaci dobivenei u uvjetima *in vivo* se ne mogu interpretirati kao specifična imunotoksičnost jer nije ispitan utjecaj STC-a i na druge moguće ciljeve u organizmu, što bi dalo cjelovitu sliku o mogućoj specifičnoj imunotoksičnosti STC-a (Betts i sur. 2007; Liu i sur. 2012; Schmidt i sur. 2012; Zhang i sur. 2012), dok se relevantnost podataka dobivenih u uvjetima *in vitro* teško može interpretirati jer su značajnije promjene zamijećene tek kod velike koncentracije STC-a (0.5, 1 i 2 mg L<sup>-1</sup>) (EFSA 2013; Xing i sur. 2005).

Neposredno djelovanje na imunološki sustav se događa zbog hepatotoksičnosti STC-a. Utjecajem STC-a mijenja se fiziološka aktivnost stanica jetre te one sintetiziraju manje količine komponenti komplementa. Zabilježena je i promijenjena količina citokina zbog utjecaja STC-a. Smanjena je količina faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukina IL-12p35, a povećana količina interleukina IL-6 koji je poznati proupalni citokin (Andreis i sur. 2010). Ovakav učinak karakterističan je za imunosupresivne tvari (Zhang i sur. 2012). Utječe i na koncentraciju IL-12, IL-2, IL-4, interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), te smanjuje ekspresiju ljudskih leukocitnih antigena I (HLA-I). HLA-I ima važnu ulogu kod reakcija imunološkog sustava, uključujući i autoimune bolesti. Ovo ukazuje da STC ima imunomodulacijski utjecaj (Andreis i sur. 2010; Huang i sur. 2002; Xing i sur. 2005; Zhang i sur. 2012). Nakon primjene STC-a pronađena je i povećana koncentracija FoxP3<sup>+</sup> regulatornih T stanica u perifernoj krvi, slezeni i timusu. Te stanice su ključne u održavanju imunohomeostaze odnosno reguliraju imunosni odgovor različitih stanica imunološkog sustava (Andreis i sur. 2010; Betts i sur. 2007; Liu i sur. 2012; Schmidt i sur. 2012).

Genotoksičnost STC-a je često testirana skupa sa drugim mikotoksinima radi usporedbe. Najčešće se koristi aflatoksin zato što ih proizvode iste vrste plijesni i zato što dijele biosintetski put. Također, aflatoksin je jedan od najtoksičnijih mikotoksina što je pogodno za usporedbu (EFSA 2013). Kod većine standardnih testova za mutagenost STC je dao pozitivne rezultate. Potvrđeno je da uzrokuje *frame-shift* mutacije, promjene na pojedinačnim bazama, nastajanje gvaninskih adukata, jednostruke lomove DNA, kromosomske aberacije, izmjene između sestrinskih kromatida i pojavu mikronukleusa kao i povećana aktivnost sustava za popravak DNA (Black i sur. 1992; Curry i sur. 1984; EFSA 2013; Kuczuk i sur. 1978; McCann i sur.

1975; Mori i sur. 1986; Tang i Friedman 1977; Ueda i sur. 1984; Ueno i sur. 1978; Wehner i sur. 1978). Dokazana je mutagenost na stanicama sisavaca i bakterija (Baertschi i sur. 1989; Black i sur. 1992; Crofton-Sleigh i sur. 1993; Curry i sur. 1984; EFSA 2013; Krivobok i sur. 1987; Ueda i sur. 1984). Sterigmatocistin uzrokuje kromosomska oštećenja nakon metaboličke aktivacije u uvjetima i *in vitro* i *in vivo*, međutim količina oštećenja ovisi o vrsti stanica i količini STC-a.

Zbog takvog djelovanja na molekulu DNA, STC inducira nastanak tumora kod nekoliko vrsta životinja i to nakon oralne, intraperitonealne, potkožne i kožne primjene (Díaz Nieto i sur. 2018). Nakon oralne primjene došlo je do pojave premalignih i malignih lezija u obliku hepatocelularnog karcinoma i hemangiosarkoma u jetri, angiosarkoma u smeđem masnom tkivu te adenoma u plućima. To su najčešće incidencije tumora, dok su rjeđe lezije u drugim organima (EFSA 2013; Enomoto i sur. 1982; Maekawa i sur. 1979; Ohtsubo i sur. 1978; Purchase i van der Watt 1970a; Terao 1978). Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer* - IARC) klasificira STC u grupu 2B - mogući ljudski karcinogen, dok je *The Panel on Contaminants in the Food Chain* (CONTAM) donio zaključak da je sterigmatocistin genotoksičan i karcinogen (EFSA 2013; IARC 1976, 1987).

## 1.6. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres u organizmu nastaje kada se poremeti ravnoteža slobodnih radikala i zaštitnih mehanizama (antioksidacijskih procesa), koji poništavaju njihovo toksično djelovanje (Betteridge 2000; Limón-Pacheco i Gonsebatt 2009). Slobodni radikali su molekule ili atomi koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona ( $\cdot$ ) u vanjskoj elektronskoj ljusci (Gutteridge i Halliwell 1989; Halliwell 1994; Halliwell i sur. 1993, 1995; Halliwell i Gutteridge 1990a; Rice-Evans i Burdon 1993; Slater 1984; Södergren 2000). Nespareni elektroni povećavaju kemijsku reaktivnost atoma i molekula (Betteridge 2000).

Najčešći slobodni radikali su reaktivne kisikove čestice (eng. *reactive oxygen species*, ROS). Njima pripadaju hidroksil radikal ( $\text{OH}\cdot$ ), superoksid radikal anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ostali slobodni radikali su dušikov monoksid radikal ( $\text{NO}\cdot$ ), dušikov dioksid radikal ( $\text{NO}_2\cdot$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ), alkoksi radikal ( $\text{RO}\cdot$ ), peroksil radikal ( $\text{ROO}\cdot$ ) i triklorometil radikal ( $\text{CCl}_3\cdot$ ) (Betteridge 2000; Södergren 2000). Slobodni radikali reagiraju s makromolekulama u organizmu i stvaraju nove radikale te tako nastaje lančana reakcija koja može dovesti do oštećenja tkiva (Södergren 2000).



Slobodni radikali nastaju djelovanjem endogenih i egzogenih čimbenika. Najčešći endogeni uzroci nastanka slobodnih radikala su reakcije oksidacije, enzimatska aktivnost (oksidaze, kasboksilaze, hidroksilaze, peroksidaze), transportni lanac elektrona u mitohondrijskoj respiraciji te stanice imunološkog sustava koje imaju sposobnost fagocitoze (neutrofili, monociti, makrofazi i eozinofili) koje stvaraju ROS-ove kako bi uništile mikroorganizme (Betteridge 2000; Curnutte i Babior 1987; Halliwell 1994; Halliwell i sur. 1993, 1995; Rice-Evans i Burdon 1993; Roos 2019; Södergren 2000). Egzogeni čimbenici nastanka slobodnih radikala uključuju ionizacijsko zračenje, UV zračenje, utjecaj onečišćenog okoliša, teške metale, metaloide, pesticide, policikličke aromatske ugljikovodike, pušenje cigareta te djelovanje nekih lijekova (Betteridge 2000; Halliwell 1994; Halliwell i sur. 1993, 1995; Limón-Pacheco i Gonsebatt 2009; Rice-Evans i Burdon 1993; Sies 1999; Södergren 2000).

Kako bi se organizam obranio od štetnih učinaka slobodnih radikala postoji antioksidacijski sustav. Antioksidansi mogu biti prisutni u tijelu ili se mogu unijeti prehranom. Antioksidacijski sustav uključuje procese: katalitičko uklanjanje slobodnih radikala pomoću katalaze (eng. *catalase*, CAT), superoksid dismutaze (eng. *superoxide dismutase*, SOD), peroksidaza i antioksidansa specifičnih za tiolne skupine, zatim vezanje proteina (transferin, metalotionein, haptoglobini, ceruloplazmin) za oksidacijske metale ( $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Cu}^+$ ), potom proteine stresa i toplinskog šoka koji štite makromolekule od oštećenja te elektron donore koji reduciraju slobodne radikale među koje ubrajamo glutation (GSH), vitamin E ( $\alpha$  tokoferol), vitamin C (askorbinska kiselina), bilirubin i mokraćnu kiselinu (Limón-Pacheco i Gonsebatt 2009).

Unatoč mnogim antioksidacijskim mehanizmima, organizam se često ne može obraniti od prevelikih oksidacijskih oštećenja. Kod velikog oksidacijskog stresa nastupa smrt stanice nekrozom ili apoptozom. Međutim ako stanica nakuplja oštećenja, ona gubi svoju funkciju i može doprinijeti razvitku patoloških promjena. Oksidacijski stres je povezan sa nastankom niza bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes, kronične upale i neurodegenerativne promjene (Delanty i Dichter 1998; Dypbukt i sur. 1994; Gutteridge 1993; Halliwell 1997; Halliwell i sur. 1992; Halliwell i Gutteridge 1990a, 1999; Hampton i Orrenius 1997; Sastre i sur. 2000; Södergren 2000; Southorn i Powis 1988; Stoian i sur. 1996)

### 1.6.1. Glutation

Glutation (GSH) je najobilniji stanični antioksidant. To je tripeptid, građen od glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Specifičan je po tome što je cistein vezan na  $\gamma$ -karboksilnu skupinu glutamata (dok je uobičajeno vezanje za  $\alpha$ -karboksilnu skupinu). Zbog takve posebne strukture jedini enzim koji ga može hidrolizirati je  $\gamma$ -glutamiltranseptidaza (GGT) koja se nalazi izvan stanice, stoga je GSH otporan na unutarstaničnu razgradnju (Kaplowitz i sur. 1985; Lu 2013; Meister i Anderson 1983; Sies 1999).

Postoji u dva oblika: reducirani (GSH) i oksidirani glutacion disulfid (GSSG). Kod reduciranog GSH cisteinska skupina može donirati elektron te tako smanjuje reaktivnost drugih molekula (odnosno ROS-ova). Kada donira elektron sam GSH postaje reaktivan, ali se poveže sa drugim reaktivnim GSH i nastaje oksidirani GSSG. Enzim koji sudjeluje u ovim procesima, GSH peroksidaza (eng. *glutathione peroxidase*, GPx) u citosolu i mitohondrijima može metabolizirati vodikov peroksid i organske peroksidge. Osim toga GSH reagira sa oksidiranim cisteinom te tvori mješovite disulfide koji se kasnije mogu reducirati. Na ovaj se način štite osjetljivi proteinski tioli od oksidacijskih oštećenja, a i sprječava se gubitak GSH u oksidacijskim uvjetima. Na sličan način (stvaranjem disulfida) sprječava se nakupljanje GSSG u stanici i promjena GSH/GSSG ravnoteže odnosno redukcijskog potencijala u stanici (Fernández-Checa i sur. 1997; Garcia-Ruiz i Fernández-Checa 2006; Limón-Pacheco i Gonsébat 2009; Lu 2009, 2013).

Osim što štiti stanicu od oksidacijskog oštećenja, GSH sudjeluje i u sintezi proteina i DNA, transportu molekula, aktivnosti enzima, metabolizmu, sudjeluje u reakcijama kao koenzim te stvara konjugate sa molekulama u procesima biotransformacije (Anderson 1998; Meister i Anderson 1983).

### 1.6.2. Malondialdehid

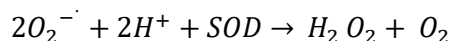
Malondialdehid (MDA) je produkt lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Lipidna peroksidacija je degradacija lipida uzrokovana slobodnim radikalima. Slobodni radikali preuzimaju vodikov atom iz polinezasićenih masnih kiselina, koje su podložne oštećenjima zbog reaktivnih metilenskih mostova ( $-\text{CH}_2-$ ). Kako bi molekula ostala stabilna, dolazi do preuređivanja veza i daljnjih reakcija sa slobodnim radikalima. Tako započinje lančana reakcija koja se širi i na ostale lance polinezasićenih masnih kiselina te nastaju lipidni hidroperoksidge. Njihovim raspadom nastaje niz sekundarnih produkata lipidne peroksidacije, između ostalog i

malondialdehid (Gutteridge 1995; Halliwell i sur. 1993; Halliwell i Gutteridge 1990b, 1990a, 1999; Moore i Roberts 1998; Del Rio i sur. 2005; Södergren 2000; Zwart i sur. 1999). Iz tog se razloga koristi kao pokazatelj opsega peroksidacije lipidnih membrana u uvjetima *in vitro*. Budući da su nezasićene masne kiseline česte u biološkim membranama, lipidna peroksidacija predstavlja opasnost za stanicu i organizam (Buege i Aust 1978; Del Rio i sur. 2005).

### 1.6.3. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaze (SOD) su metaloenzimi koji kataliziraju raspad superoksidnog aniona na molekularni kisik i vodikov peroksid. Tako nastaju manje štetne molekule te su superoksid dismutaze važan čimbenik u obrani od toksičnih učinaka superoksida (Malstrom i sur. 1975).

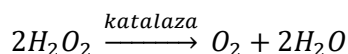
Sadrže metale koji promjenom oksidacijskog stanja mijenjaju aktivnost enzima, odnosno dolazi do oksidacije i redukcije superoksida. Kod ljudi postoje tri vrste enzima: u citosolu Cu/Zn-SOD, u mitohondrijima Mn-SOD i izvanstanična EC-SOD. Reakcija katalizirana SOD-om je brza, a prisutnost SOD-a ključna je za prevenciju nastanka bolesti vezanih uz oksidacijski stres (Liu 1996; Maier i Chan 2002; Malstrom i sur. 1975; Perry i sur. 2010; Sandström i sur. 1994; “Superoxide Dismutase Assay Kit (706002)” 2010).



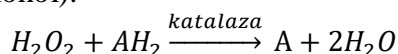
### 1.6.4. Katalaza

Katalaze (CAT) su enzimi koji kataliziraju kemijsku reakciju razgradnje vodikovog peroksida na molekule vode i kisika. Skupina se sastoji od Fe-hem enzima, Mn enzima i katalaza-peroksidaza. Sastoje se od 4 podjedinice od kojih svaka sadrži molekulu hema koji omogućuje razgradnju vodikovog peroksida. Kod katalaza-peroksidaza kao elektron donori mogu služiti i alkoholi (metanol, etanol, fenoli i mravlja kiselina). Katalaza djeluje unutar stanice, a kod ljudi najveće se količine katalaze nalaze u jetri, bubrezima i eritrocitima (“Catalase Assay Kit (707002)” 2017; Mates i sur. 1999; Nicholls 2012).

Katalitička aktivnost:

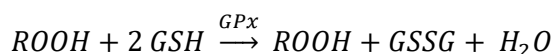


Peroksidativna aktivnost (A= alkohol):



### 1.6.5. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GPx) naziv je za skupinu izoenzima koji kataliziraju redukciju hidroperoksida i štite stanicu od oksidacijskog stresa. Izoenzimi GPx1-4 nalaze se u stanicama sisavaca te su različito raspoređene, ovisno o vrsti tkiva. U katalitičkom središtu se nalazi selenocistein koji je važan za enzimatsku aktivnost (Conrad i Friedmann Angeli 2017; Forstrom i sur. 1978; “*Glutathione Peroxidase Assay Kit ( 703102 )*” 2016; Mates i sur. 1999; Tappel 1978; Ursini i sur. 1985). Enzim GPx katalizira redukciju hidroperoksida ili organskih peroksida do vode ili odgovarajućih alkohola. Pritom koristi GSH kao elektron donor. Unatoč tome što dijeli ulogu sa katalazom, glutathion peroksidaza učinkovito reagira sa lipidnim i ostalim organskim hidroperoksidima što ga čini jednim od glavnih antioksidacijskih enzima (Mates i sur. 1999).



## 2. Cilj istraživanja

STC je mikotoksin pronađen u različitim prehrambenim namirnicama, krmivu za stoku te u vlažnim prostorijama. Tijekom akutne izloženosti ciljni organi djelovanja su jetra i bubreg. Nakon metaboličke aktivacije tvori adukte molekule DNA i hidroksilirane metabolite, zbog čega se pretpostavlja da sudjeluje u nastanku oksidacijskog stresa u stanici (EFSA 2013). Cilj ovog rada bio je provjeriti utjecaj STC-a na nastanak oksidacijskog stresa kod pokusnih životinja. Korišteni su mužjaci štakora soja Wistar koji su bili jednokratno tretirani sterigmatocistinom. LD<sub>50</sub> za oralnu izloženost je 160 mg kg<sup>-1</sup> t.m., a doze su 1/4, 1/8 i 1/16 LD<sub>50</sub> odnosno 40, 20 i 10 mg kg<sup>-1</sup> t.m. Utjecaj STC-a na nastanak oksidacijskog stresa istraživao je u bubrezima, jetri i krvnoj plazmi, a ispitani su različiti parametri oksidacijskog stresa. Mjerene su promjene katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaze, katalaze i glutathion peroksidaze, oštećenja lipida mjerenjem koncentracije malondialdehida te promjene u koncentraciji proteinskih karbonila, pokazatelja količine oksidiranih proteina i reduciranog glutationa, odnosno ukupnog oksidacijskog oštećenja.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Kemikalije

- Ultračista voda za HPLC (18Ω) proizvedena je u Milli-Q Gradient sustavu za vodu (Thermo Scientific Smart2pure 3 UV/UF)
- 1, 1, 3, 3 – tetrametoksi propan, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoat (DTNB), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Boja za proteine 'Serva-Blue G', Serva, Heidelberg, Njemačka
- Butilirani hidroksitoluen (BHT), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Fosforna kiselina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glutation (GSH), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Gvanidin hidroklorid, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev hidroksid, KOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kit za analizu glutacion peroksidaze, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
- Kit za analizu katalaze, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
- Kit za analizu superoksid dismutaze, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
- Klorovodična kiselina, HCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metanol HPLC čistoće, CH<sub>3</sub>OH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Narketan, Chassot AG, Bern, Švicarska
- Natrijev dihidrogenfosfat dodekahidrat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO<sub>3</sub>, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Sterigmatocistin, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
- Tiobarbituratna kiselina, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Trikloroetena kiselina, CCl<sub>3</sub>COOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Triton X-100, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD

- Xylapan, Chassot AG, Bern, Švicarska

### 3.2. Instrumenti

- Analitička vaga, Mettler Toledo, AE 200
- Spektrofotometar, Cecil 9000
- HPLC sustav, Shimadzu, Kyoto, Japan
  - Degaser (uređaj za uklanjanje otopljenih plinova) DGU 20A3
  - Gradijentna pumpa LC 20AD SP
  - UV-VIS detektor SPD 20AV
  - Fluorescentni detektor RF 20A
  - Termostat za kolonu CTO 20A
  - Autosampler – automatski uzorkivač SII 20 AC HT
  - Komunikator s računalom CBM 20A
- pH metar, SevenEasy, Mettler Toledo
- centrifuga, Mikro 22R, Hettich, Kirchlengern, Njemačka
- centrifuga, Universal 320 R, Hettich, Kirchlengern, Njemačka

### 3.3. Priprema pufera i otopina

- Fiziološka otopina (0,9 % otopina natrijevog klorida)
- Natrijev fosfatni pufer 0,3 M, pH= 7,4

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

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

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

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

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

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

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

$$1M = 358,14 \text{ gmol}^{-1} \text{ na } 1L \Rightarrow 0,1M$$

$$= \frac{358,14 \text{ gmol}^{-1}}{10} \text{ na } 1L \Rightarrow 35,814 \text{ gmol}^{-1} \text{ na } 1L$$

$$(\text{za } 2L) 35,814 \times 2 = 71,628 \text{ g za } 2L$$

- 0,3 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (46,8 g otopljeno u 1L vode)

$$M = 156,01 \text{ g mol}^{-1}$$

$$0,1M = 15,601 \text{ g L}^{-1}$$

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  $\text{pH}=7,4$ .

- 10 % trikloroocetna kiselina (104,8 g TCA otopljeno u 1 L vode)
- DTNB (0,396 g otopljeno u 1 L 0,3 M Na-fosfatnog pufera,  $\text{pH}=7,4$ )

### 3.4. Životinje

Odrasli mužjaci štakora soja Wistar (stari 10 tjedana, 230-270 g tjelesne mase – t.m.) bili su smješteni u kavezima na kontroliranoj sobnoj temperaturi od 22 °C i dnevno-noćnim ciklusima svjetla od 12 sati. Tijekom eksperimenta životinje su imale slobodan pristup standardnoj peletiranoj hrani (4RF21 iz Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i vodi iz slavine. Eksperiment je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada prema direktivi Europske komisije od 22. rujna 2010. godine (2010/63/EU).

#### 3.4.1. Tretman

Životinje su podijeljene u grupe po 5 životinja u grupi, osim kontrolne skupine tretirane vodom u kojoj su bile četiri životinje te su oralno tretirane dva dana otopinom sterigmatocistina u ulju kukuruza svaki dan između 8 i 9 sati ujutro. Štakori i uzorci označeni su kao što je navedeno u tablici (**Tablica 1.**).

**Tablica 1.** Oznake životinja i uzoraka tijekom pokusa.

Tretman					
Oznaka životinje	Kontrola voda	Kontrola otapalo - ulje kukuruzna	Životinje tretirane STC- om doze 1/16 LD <sub>50</sub> = 10 mg kg <sup>-1</sup> t.m.	Životinje tretirane STC- om doze 1/8 LD <sub>50</sub> = 20 mg kg <sup>-1</sup> t.m.	Životinje tretirane STC- om doze 1/4 LD <sub>50</sub> = 40 mg kg <sup>-1</sup> t.m.
	KV1	KO1	1/16 STC1	1/8 STC1	1/4 STC1
	KV2	KO2	1/16 STC2	1/8 STC2	1/4 STC2
	KV3	KO3	1/16 STC3	1/8 STC3	1/4 STC3
	KV4	KO4	1/16 STC4	1/8 STC4	1/4 STC4
		KO5	1/16 STC5	1/8 STC5	1/4 STC5

### 3.5. Metode

#### 3.5.1. Mjerenje koncentracije glutationa

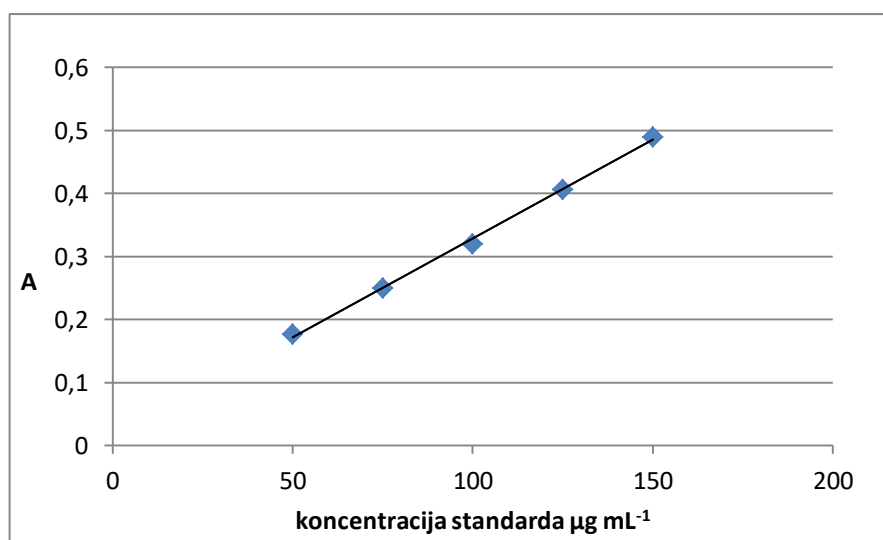
Koncentracija GSH mjerena je prema metodi po Ellmanu (Ellman 1958). Homogenati bubrega i jetre (10%) pripremljeni su u 0.3 M natrijevom fosfatnom puferu (pH=7.4) i centrifugirani 10 minuta na 3500 rpm. Proteini su uklonjeni dodavanjem 100  $\mu$ L 5% trikloroctene kiseline u 300  $\mu$ L supernatanta. Homogenati su potom promiješani na tresilici i centrifugirani 10 min na 3500 rpm.

Pripremljene su otopine slijepe probe, standarda GSH i uzoraka za mjerenje kao što je prikazano u tablici (**Tablica 2.**). Pripremljeni su standardi glutationa u vodi, izmjerena je njihova apsorbanca te napravljen baždarni dijagram (**Slika 3.**).



**Tablica 2.** Otopine slijepe probe, standarda GSH i uzoraka za mjerenje koncentracije GSH.

Slijepa proba	Standardi	Uzorak
100 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$	100 $\mu\text{L}$ standarda	100 $\mu\text{L}$ homogenata tkiva ili krvne plazme
50 $\mu\text{L}$ natrijevog fosfatnog pufera	50 $\mu\text{L}$ natrijevog fosfatnog pufera	50 $\mu\text{L}$ natrijevog fosfatnog pufera
50 $\mu\text{L}$ DTNB-a	50 $\mu\text{L}$ DTNB-a	50 $\mu\text{L}$ DTNB-a



**Slika 3.** Baždarni dijagram standarda glutationa. Koeficijent linearnosti iznosi  $r^2 = 0,9982$ , a jednadžba pravca je  $y = 0,0031x + 0,0156$ .

DTNB je dodan neposredno prije mjerenja apsorbancije svakog uzorka jer je razmjerno nestabilan na sobnoj temperaturi. Apsorbancije su mjerene na spektrofotometru (Cecil 9000, Cambridge, UK) na 412 nm. Koncentracija GSH je izračunata iz baždarnog dijagrama (kalibracijske krivulje standarda) i izražena je u  $\text{nmol g}^{-1}$  tkiva u tkivima odnosno  $\text{nmol mL}^{-1}$  u krvnoj plazmi.

### 3.5.2. Aktivnost enzima

Enzimska aktivnost mjerena je koristeći mikrotitarske pločice s 96 mjesta za uzorke pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO, Tecan Austria GmbH. Aktivnost enzima

izračunata je pomoću kalibracijske krivulje standarda koristeći predložak i upute proizvođača pločica (Cayman chemicals).

#### **3.5.2.1. Mjerenje aktivnosti glutation peroksidaze**

Enzimaska aktivnost GPx-a mjerena je korištenjem komercijalnog kompleta *GPx Assay Kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na mjerenju smanjenja apsorbancije u uzorku koja je proporcionalna smanjenju aktivnosti GPx-a u uzorku. Aktivnost GPx-a mjerena je svakih 30 sekundi tijekom 6 minuta na 340 nm, te se stopa apsorbancije smanjivala proporcionalno s aktivnosti GPx-a u uzorcima. Prema uputama proizvođača tkivo jetre i bubrega homogenizirano je u 50 mM Tris-HCl puferu, koji sadrži 5 mM EDTA i 1 mM DTT (pH 7,5). Homogenizirana tkiva centrifugirana su na 10 000 g 15 min na 4 °C. Testirana su različita razrjeđenja te su kao najpogodnija razrjeđenja odabrana 1:7 za plazmu, 1:30 za bubrege i 1:80 za jetru. Rezultati su izraženi u  $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$  za aktivnost GPx-a u krvnoj plazmi te  $\text{nmol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina za aktivnost GPx-a u tkivu bubrega i jetre.

#### **3.5.2.2. Mjerenje aktivnosti superosid dismutaze**

Enzimaska aktivnost SOD-a mjerena je korištenjem komercijalnog kompleta *SOD Assay Kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) prema uputama proizvođača. Upotreba komercijalnog paketa/kompleta temelji se na mjerenju superoksidnog radikala te mjeri aktivnost tri tipa SOD-a (Cu/Zn, Mn i FeSOD) dobivene ksantin oksidazom i hipoksantinom. Homogenati bubrega i jetre pripremljeni su u 20 mM puferu HEPES (pH 7,2), koji sadrži 1 mM EGTA, 210 mM manitol i 70 mM saharoze. Homogenizirana tkiva centrifugirana su na 10 000 g 5 min na 4 °C. Mjerena su različita razrjeđenja i apsorbancija na različitim valnim duljinama te je određena optimalna valna duljina od 435 nm, te razrjeđenja od 1:5 za krvnu plazmu, 1:200 za bubrege i 1:400 za jetru. Rezultati mjerenja aktivnosti SOD-a u krvnoj plazmi izraženi su u  $\text{U mL}^{-1}$ , a u tkivu bubrega i jetre u  $\text{U mg}^{-1}$  proteina.

#### **3.5.2.3. Mjerenje aktivnosti katalaze**

Enzimaska aktivnost CAT mjerena je korištenjem komercijalnog kompleta *CAT Assay Kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na reakciji enzima s metanolom u prisutnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  u uzorku. Nastali formaldehid se mjeri kolorimetrijski s 4-amino-3-hidrazini-5-merkaptio-1,2,4-triazolom kao kromogenom koji oksidirajući mijenja boju od bezbojne do ljubičaste. Tkiva bubrega i jetre homogenizirana su u

natrij-fosfatnom puferu (pH 7,0) koji sadrži 1 mM EDTA, te su centrifugirani na 10 000 g 15 min na 4 °C. Uzorci tkiva bubrega razrijeđeni su 1: 600, a jetre 1:1200. Apsorbancija je mjerena pomoću čitača mikrotitarskih pločica na 540 nm. Rezultati enzimske aktivnosti katalaze u krvnoj plazmi izraženi su u  $\text{nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , a u tkivu bubrega i jetre u  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteina.

#### **3.5.2.4. Mjerenje koncentracije malondialdehida**

Koncentracija MDA u tkivu bubrega i jetre te krvnoj plazmi izmjerena je prema metodi od Drury i sur. (Drury i sur. 1997). Homogenati tkiva bubrega i jetre (10%) pripremljeni su u 0,3 M natrij-fosfatnom puferu (pH 7.4). U 50  $\mu\text{L}$  uzorka (krvna plazma ili 10% homogenat tkiva) ili standarda (2,5  $\mu\text{M}$  1,1,3,3-tetraetoksi propan) dodani su 5  $\mu\text{L}$  BHT (0.2%, w/v), 750  $\mu\text{L}$  fosforne kiseline (1%, w/v), 250  $\mu\text{L}$  TBA (0,6%, w/v) te 445  $\mu\text{L}$  vode. Uzorci su promiješani i inkubirani u kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Reakcija je zaustavljena hlađenjem u vodi i 20  $\mu\text{L}$  uzorka injektirano je u sustav HPLC. Analiza je napravljena koristeći kromatografsku kolonu obrnute faze C-18 s česticama veličine 5  $\mu\text{m}$  (Zorbax Eclipse Plus, Agilent, 4.6x100 mm).

Iz mobilne faze koja se sastojala od 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i metanola (60:40, v/v, pH 6,8) uklonjen je otopljeni zrak u ultrazvučnoj kupelji (15 minuta). Protok mobilne faze bio je 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Koncentracija MDA mjerena je UV detektorom pri valnoj duljini od 532 nm. Injektirano je 20  $\mu\text{m}$  uzorka, a temperature kolone je bila 32 °C. Pri tim uvjetima vrijeme zadržavanja MDA na koloni bilo je 2,5 minute. Koncentracija MDA je izračunata iz kalibracijske krivulje i izražena u  $\text{nmol g}^{-1}$  tkiva u tkivu homogenatu bubrega i jetre, odnosno u  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  u krvnoj plazmi.

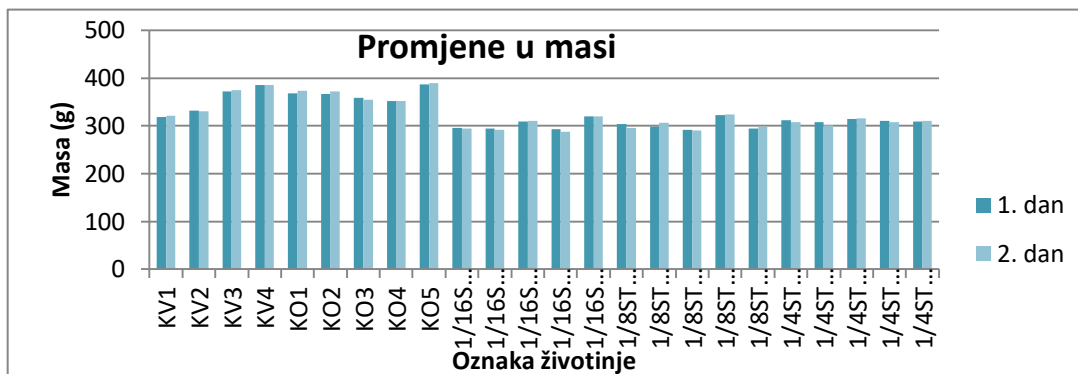
### **3.6. Statistička obrada podataka**

Analiza podataka i grafovi su napravljeni pomoću računalnog programa GraphPad Prism za Windows, verzija 5. Vrijednosti svih izmjerenih parametara su izražene kao srednja vrijednost i standardna devijacija, te su analizirane koristeći ANOVA test. P vrijednosti manje ili jednake 0,05 su smatrane statistički značajnima.

## 4. Rezultati

### 4.1. Masa životinja

Životinje su izvagane prije tretmana oba dana za vrijeme trajanja pokusa. Tijekom dva dana tretiranja masa pojedinačnih životinja nije se značajno promijenila (**Slika 4**).

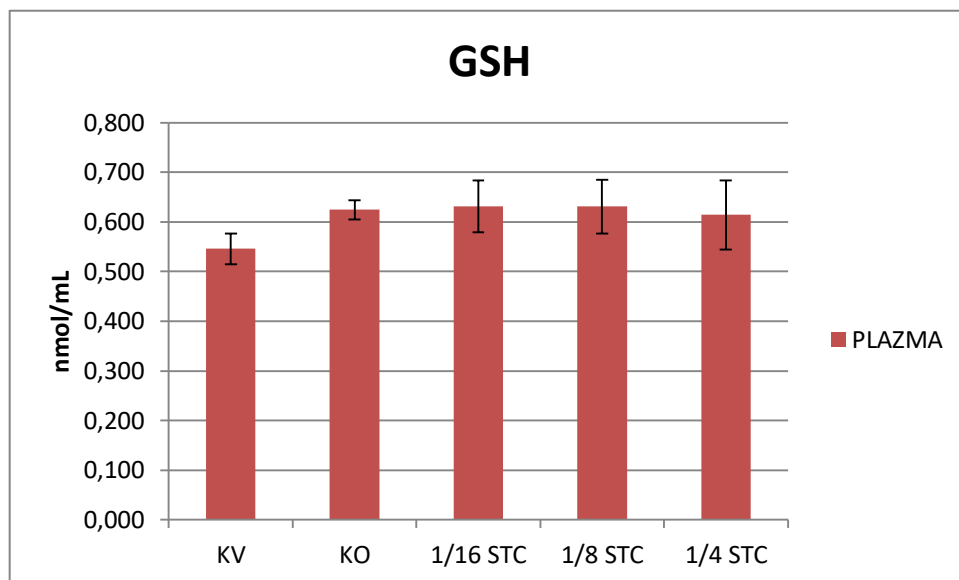


**Slika 4.** Promjene u masi životinja tijekom tretiranja otopinom sterigmatocistina. Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1**.

### 4.2. Oksidacijsko oštećenje

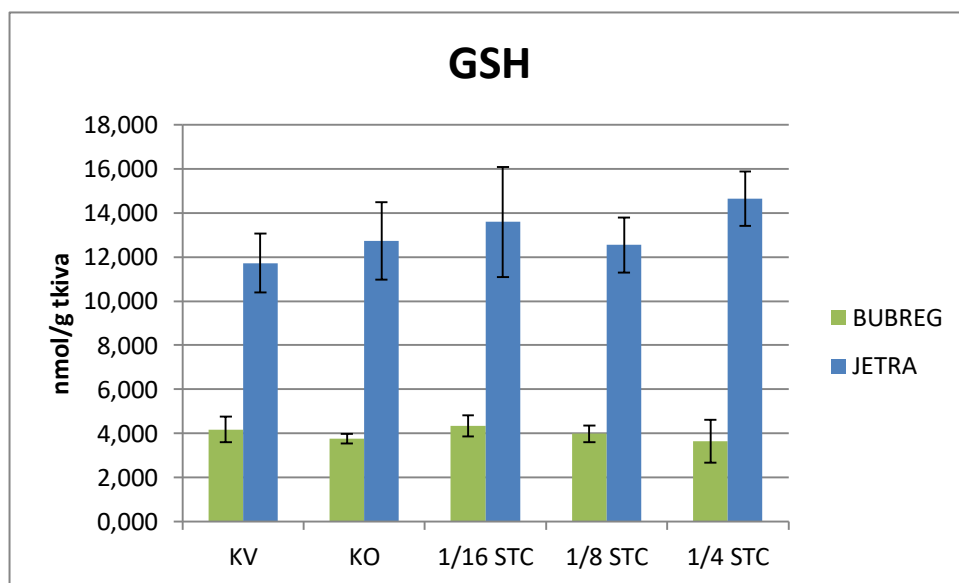
#### 4.2.1. Glutation

Koncentracija GSH mjerena je u krvnoj plazmi, bubregu i jetri pokusnih životinja tretiranih STC-om (1/4, 1/8 i 1/16 LD<sub>50</sub>) te uspoređena sa kontrolama (voda i otapalo-ulje kukuruza).



**Slika 5.** Koncentracija GSH u krvnoj plazmi kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1**.

Nakon dvodnevnog tretmana STC-om odraslih muških štakora soja Wistar koncentracija GSH u plazmi nije se značajno promijenila u usporedbi s koncentracijom GSH u plazmi kontrolnih štakora tretiranih vodom ili otapalom (**Slika 5.**).

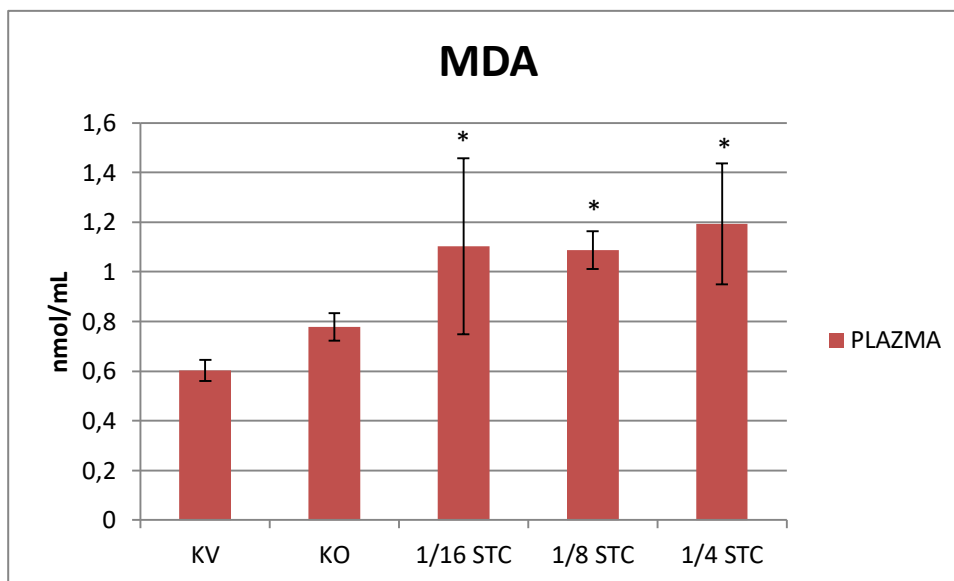


**Slika 6.** Koncentracija GSH u bubregu i jetri kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1**.

Koncentracija GSH veća je u jetri nego u bubregu svih tretiranih životinja (**Slika 6.**). Nije pronađena statistički značajna razlika koncentracije GSH u bubregu niti jetri tretiranih životinja u usporedbi s kontrolama.

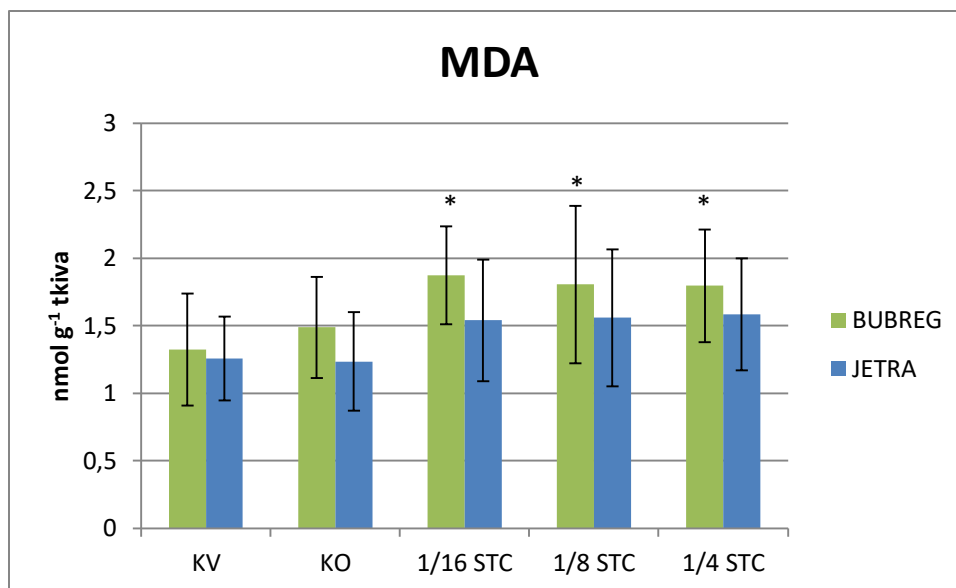
#### 4.2.2. Malondialdehid

Koncentracija MDA mjerena je u krvnoj plazmi, bubregu i jetri pokusnih životinja tretiranih STC-om (1/4, 1/8 i 1/16 LD<sub>50</sub>) te uspoređena s kontrolama (voda i otapalo-ulje kukuruza).



**Slika 7.** Koncentracija MDA u krvnoj plazmi kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (\* različito od kontrola). Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**

Nakon dvodnevnog tretmana STC-om odraslih muških štakora soja Wistar koncentracija MDA u plazmi statistički značajno se povećala u životinja tretiranih svim dozama STC-a u usporedbi s koncentracijom MDA u plazmi kontrolnih štakora tretiranih vodom ili otapalom (**Slika 7.**).

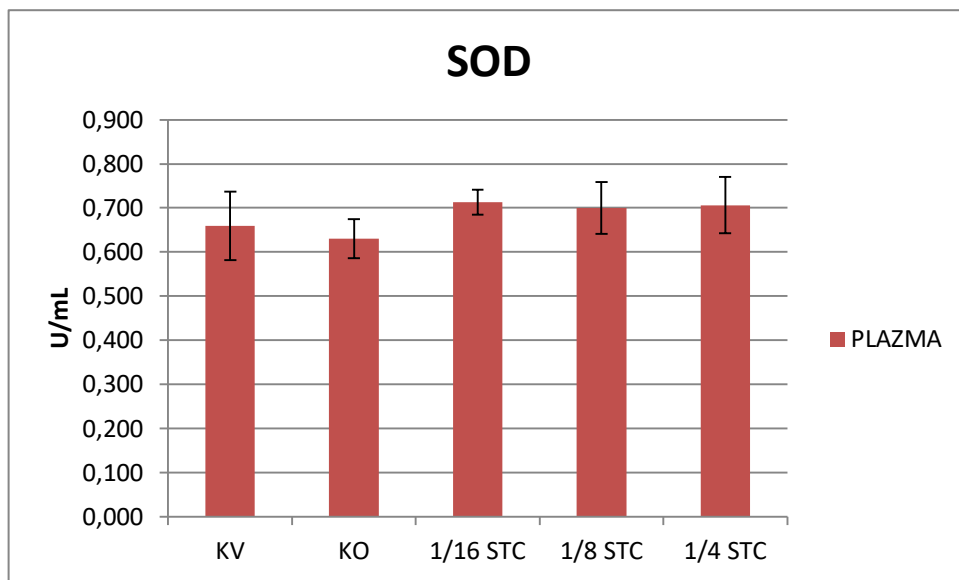


**Slika 8.** Koncentracija MDA u bubregu i jetri kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (\* različito od kontrola). Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1**.

Koncentracija MDA veća je u bubrezima nego u jetri svih tretiranih životinja (**Slika 8.**). U bubrezima je koncentracija MDA statistički značajno veća u životinja tretiranih STC-om u usporedbi s kontrolnim životinjama dok u jetri nije bilo statistički značajne promjene MDA.

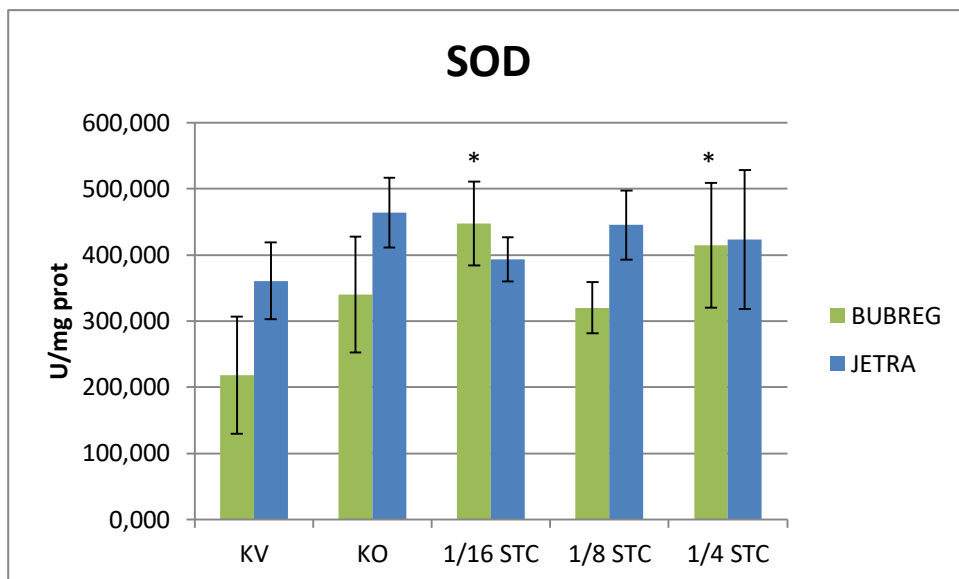
#### 4.2.3. Superoksid dismutaza

Enzimska aktivnost SOD-a mjerena je u krvnoj plazmi, bubregu i jetri pokusnih životinja tretiranih STC-om (1/4, 1/8 i 1/16 LD<sub>50</sub>) te uspoređena s kontrolama (voda i otapalo-ulje kukuruza).



**Slika 9.** Enzimski aktivnost SOD-a u krvnoj plazmi kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**

Enzimski aktivnost SOD-a u plazmi životinja tretiranih STC-om nije se značajno promijenila u usporedbi s enzimskom aktivnosti SOD-a u plazmi kontrolnih štakora tretiranih vodom ili otapalom (**Slika 9.**).



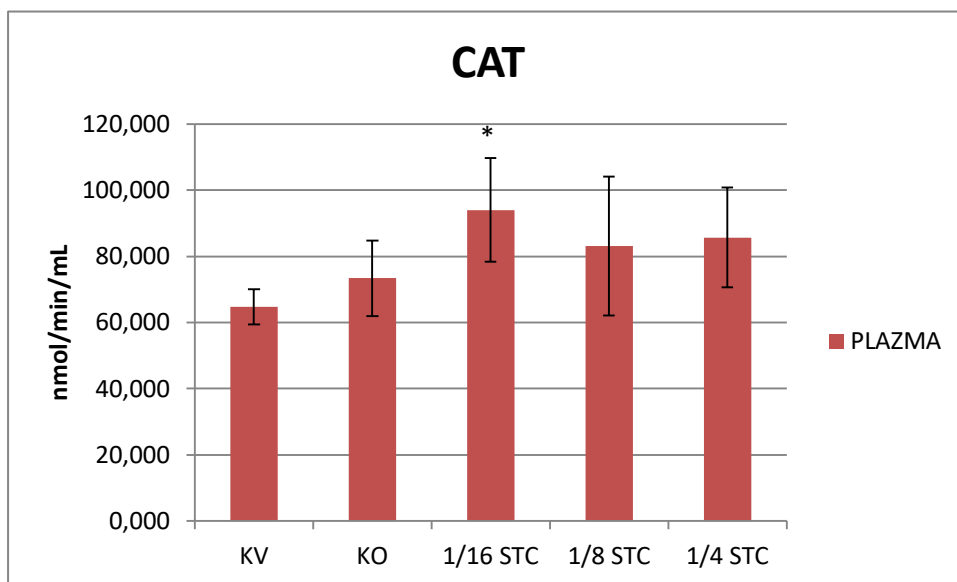
**Slika 10.** Enzimski aktivnost SOD-a u bubregu i jetri kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (\* različito od kontrola). Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**



Iako u jetri nije bilo statistički značajne promjene enzimske aktivnosti SOD-a, u bubrezima je ona statistički značajno veća u životinja tretiranih STC-om u usporedbi s kontrolnim životinjama (**Slika 10.**).

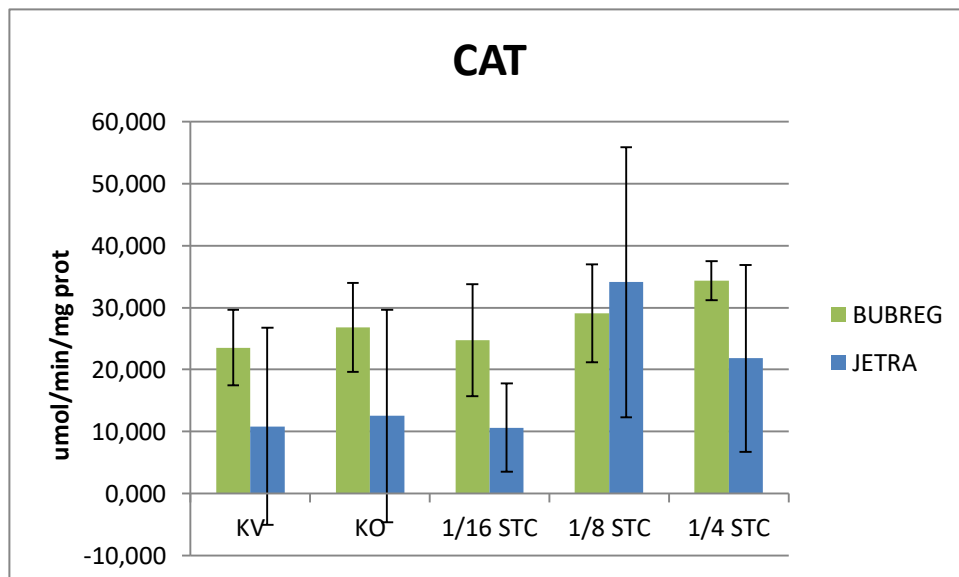
#### 4.2.4. Katalaza

Enzimska aktivnost CAT-a mjerena je u krvnoj plazmi, bubregu i jetri pokusnih životinja tretiranih STC-om (1/4, 1/8 i 1/16 LD<sub>50</sub>) te uspoređena sa kontrolama (voda i otapalo-ulje kukuruza).



**Slika 11.** Enzimska aktivnost CAT-a u krvnoj plazmi kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (\* različito od kontrola). Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**

Tretman najmanjom dozom STC-a uzrokovao je statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti CAT-a u plazmi štakora u odnosu na kontrolne životinje (**Slika 11.**).

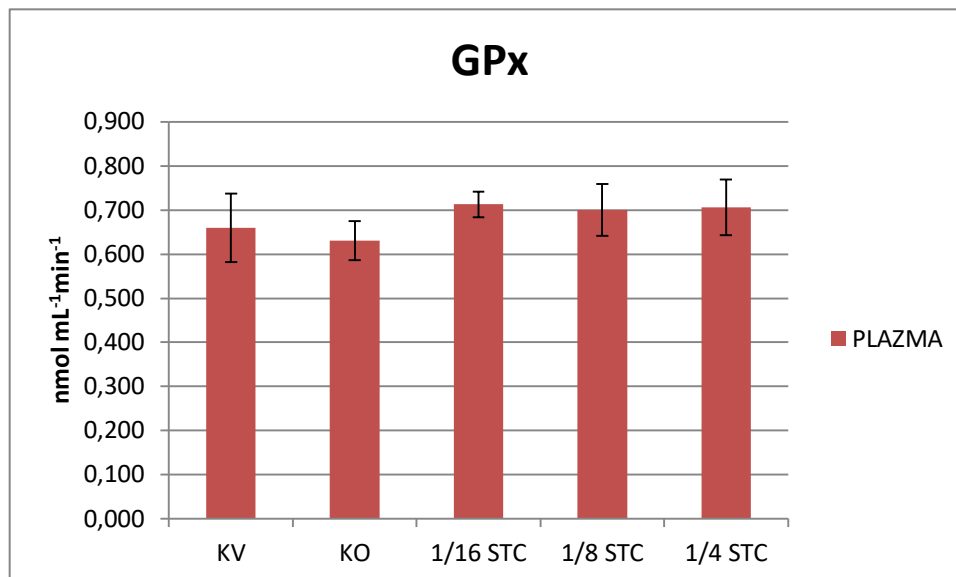


**Slika 12.** Enzimski aktivnost CAT-a u bubregu i jetri kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom ( $10, 20$  i  $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ t.m.}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Opis oznaka životinja naveden je u **Tablici 1.**

Enzimski aktivnost CAT-a u bubregu i jetri životinja tretiranih STC-om nije se značajno promijenila u usporedbi s enzimskom aktivnosti CAT-a u bubregu i jetri kontrolnih štakora tretiranih vodom ili otapalom (**Slika 12.**).

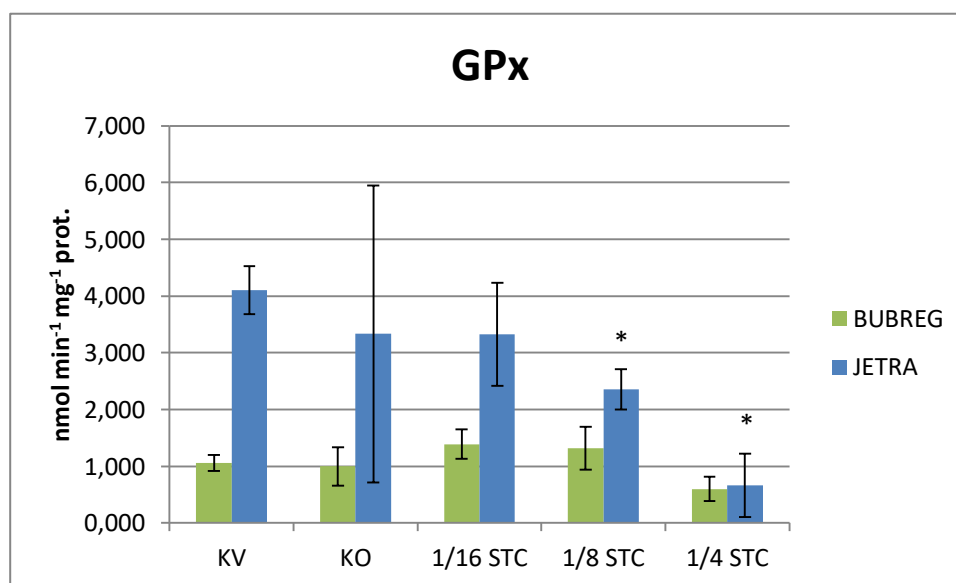
#### 4.2.5. Glutation peroksidaza

Enzimski aktivnost GPx-a mjerena je u krvnoj plazmi, bubregu i jetri pokusnih životinja tretiranih STC-om ( $1/4, 1/8$  i  $1/16 \text{ LD}_{50}$ ) te uspoređena sa kontrolama (voda i otapalo-ulje kukuruza).



**Slika 13.** Enzimsko aktivnost GPx-a u krvnoj plazmi kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**

Nakon dvodnevnog tretmana STC-om odraslih muških štakora soja Wistar enzimsko aktivnost GPx-a u plazmi nije se značajno promijenila u usporedbi s enzimskom aktivnosti GPx-a u plazmi kontrolnih štakora tretiranih vodom ili otapalom (**Slika 13.**).



**Slika 14.** Enzimsko aktivnost GPx-a u bubregu i jetri kontrolnih životinja tretiranih vodom i otapalom, te pokusnih životinja tretiranih sterigmatocistinom (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Opis oznaka životinja dan je u **Tablici 1.**

Iako u bubrezima nije bilo statistički značajne promjene enzimске aktivnosti GPx-a, u jetri se ona statistički značajno smanjila u životinja tretiranih srednjom i najvećom dozom STC-a u usporedbi s enzimskom aktivnosti GPx-a u jetri kontrolnih životinja (**Slika 14.**).

## 5. Rasprava

Poznato je da ROS-ovi koji nastaju tijekom oksidacijskog stresa reagiraju s biomolekulama kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline te ih oštećuju. Zbog zaštite organizma razvijen je složeni mehanizam obrane organizma u kojem sudjeluju GSH, SOD, CAT, GPx te neki vitamini. U ovom je radu proučavan utjecaj mikotoksina STC-a na nastanak oksidacijskog stresa u pokusnih životinja te su mjerene aktivnosti antioksidacijskih enzima u krvnoj plazmi te tkivu bubrega i jetre. Primijećeno je da kratkotrajni tretman STC-om uzrokuje oksidacijski stres u muških štakora soja Wistar, no tretman nije na sve parametre oksidacijskog stresa jednako utjecao.

U istraživanju prikazanom u ovom radu tretman navedenim dozama STC-a nije značajno utjecao na promjenu koncentracije GSH niti enzimsku aktivnost GPx u krvnoj plazmi i bubrezima. Toksični utjecaj STC-a proučavan je na muškim štakorima soja Wistar u kojem su životinje tretirane STC-om dozama 0,2, 0,3 i 0,4 mg kg<sup>-1</sup> t.m. svaki dan tijekom 30 dana (Sivakumar i sur. 2001). Štakori tretirani dozama 0,3 i 0,4 mg STC kg<sup>-1</sup> t.m. imali su smrtnost veću od 50% zbog čega je uzeta u obzir samo grupa tretirana s 0,2 mg STC kg<sup>-1</sup> t.m. Parametri oksidacijskog stresa proučavani su u tkivu jetre i krvnoj plazmi. Koncentracija GSH te aktivnost CAT su se značajno smanjile, dok je aktivnost SOD i GPx značajno porasla. Koncentracija GSH pokazuje ravnotežu između oksidacijskih i antioksidacijskih čimbenika, a njegova smanjena koncentracija u ovom pokusu te pojačana aktivnost antioksidacijskih enzima SOD i GPx upućuje na nastanak oksidacijskog stresa. U istraživanju prikazanom u ovom radu, tretman STC-om nije utjecao na promjenu koncentracije GSH, iako su korištene doze STC-a bile veće. Razlika u rezultatima vjerojatno je posljedica duljine tretmana. Štakori su u istraživanju prikazanom u ovom radu tretirani dva dana (akutna izloženost), dok su Sivakumar i sur. (2001) tretirali životinje svaki dan

tijekom 30 dana (subkronična izloženost). Velika smrtnost životinja kod većih doza (0,3 i 0,4 mg kg<sup>-1</sup> t.m.) ukazuje na veću toksičnost STC-a tijekom dulje izloženosti.

U ovom su radu sve tri istraživane doze STC-a uzrokovale statistički značajno povećanje koncentracije MDA u plazmi i bubregu u odnosu na kontrolne skupine, dok je koncentracija MDA u jetri tretiranih štakora bila veća od one u kontrolnih skupina, no ne i statistički značajno veća. Statistički značajno povećanje koncentracije MDA primijećeno je i u istraživanju u kojem su štakori bili tretirani STC-om dozom 0,2 mg STC kg<sup>-1</sup> t.m. tijekom 30 dana (Sivakumar i sur. 2001). Povećanje koncentracije MDA pokazatelj je lipidne peroksidacije. Zbog velike količine polinezasićenih masnih kiselina, biomembrane su posebno osjetljive na oksidacijski stres, te je lipidna peroksidacija zapravo sekundarni mehanizam toksičnosti sterigmatocistina.

U istraživanju prikazanom u ovom radu zabilježene su i značajne razlike u enzimskoj aktivnosti i to SOD-a u bubregu, te CAT u plazmi. Aktivnost SOD-a bila je statistički značajno veća u bubrezima kod skupina tretiranih najmanjom i najvećom dozom STC-a (10 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.), dok je CAT u plazmi statistički značajno povećana u skupini tretiranoj najmanjom dozom. U ostalim tkivima promjene enzimatske aktivnosti ovih enzima nisu bile statistički značajne. Aktivnost GPx-a pokazala je trend smanjenja, iako ne značajno, u štakora tretiranih dozama 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m., što može voditi do smanjene redukcije vodikovog peroksida.

U istraživanju u kojem su štakori bili tretirani dozom od 0.2 mg STC kg<sup>-1</sup> t.m. tijekom 30 dana, nađene su statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti SOD-a, CAT-a i GPx-a u jetri (Sivakumar i sur. 2001). Aktivnosti SOD-a i GPx-a bila je veća, dok je aktivnost CAT-a bila manja u usporedbi s kontrolnom skupinom (Sivakumar i sur. 2001). Iz dobivenih je rezultata zaključeno da je povećanje enzimatske aktivnosti SOD-a posljedica velike količine oksidacijskih procesa, dok se smanjenje CAT-a objašnjava velikom količinom nastalog vodikovog peroksida. Promjene enzimskih aktivnosti prikazane u ovom diplomskom radu upućuju na zaključak da su bubrezi ciljni organi djelovanja STC-a te da su osjetljiviji od jetre na nastanak oksidacijskog stresa urokovanog STC-om. Slična istraživanja provedena su još i na domaćoj kokoši (*Gallus gallus domesticus*) (Balogh i sur. 2019) te šaranu (*Cyprinus carpio* L.) (Kövesi i sur. 2019). U istraživanju od Balogha i sur. pijetlovi stari 150 dana tretirani su STC-om i AFB<sub>1</sub> (Balogh i sur. 2019). Budući da je AFB<sub>1</sub> 10 puta jači toksin od STC-a, napravljena je korekcija sukladno tome pa su dane koncentracije 1590 µg STC kg<sup>-1</sup> hrane i 149,1µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> hrane. Prikupljeni su

uzorci krvi i jetre nakon 1., 2., 3., 7. i 14. dana tretiranja. Količina pokazatelja lipidne peroksidacije (MDA) mjerena je u jetri, krvnoj plazmi i hemolizatu eritrocita. Koncentracija GSH i aktivnost GPx-a mjereni su u krvnoj plazmi, hemolizatu eritrocita i jetri. Oba mikotoksina su pokazali oksidacijske učinke na lipidnu peroksidaciju, ali nisu zabilježene značajne promjene drugih parametara što se objašnjava time da oksidacijski stres nije dosegao kritičnu razinu nužnu za aktivaciju. GSH i GPx nisu pokazali značane promjene kod tretmana STC-om, što je u skladu s našim rezultatima. U navedenom radu mjerene su i promjene u ekspresiji nekih gena koji kodiraju proteine glutation redoks sustava. Promjene pokazuju da je došlo do blagog oksidacijskog stresa što je utjecalo na aktivaciju gena, ali nije došlo do promjene u količini proteina. Takvi rezultati upućuju na zaključak da učinci STC-a ovise o vremenu izloženosti. U pokusu je korištena druga životinjska vrsta od onih u istraživanju opisanom u ovom diplomskom radu, ali su rezultati bili slični što potvrđuje tvrdnju da je duljina tretmana bitna za otkrivanje mehanizma toksičnosti STC-a te da bi bilo dobro istražiti i gensku ekspresiju.

U kratkotrajnom istraživanju (24 h) na šaranima starim jednu godinu i tretiranim s 1, 2 i 4 mg STC-a  $\text{kg}^{-1}$  hrane mjereni su parametri oksidacijskog stresa (konjugirani dieni i trieni, reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline, MDA, GSH, GPX te promjene u genskoj ekspresiji gena II. faze metabolizma i gena antioksidacijskih enzima) u jetri (Kövesi i sur. 2019).

Primijećeno je malo povećanje koncentracije MDA i GSH te smanjenje aktivnosti GPx-a u jetri (Kövesi i sur. 2019). Ovaj se rezultat slaže s mojim istraživanjem te je moguće da postoji razlika u mehanizmu toksičnosti STC-a ovisno o duljini tretmana. Parametri lipidne peroksidacije nisu pokazali značajnije promjene, osim malondialdehida koji je bio povećan kod najmanje primjenjene doze nakon 16 h te kod srednje doze nakon 24 h. Takvi rezultati sugeriraju da niske doze STC-a izazivaju stvaranje slobodnih radikala u jetri, dok kod velikih doza učinci nastaju tek nakon dužeg vremena odnosno STC ima produžen učinak na lipidnu peroksidaciju što je u skladu s našim rezultatima. GSH je također bio značajno povećan kod najmanje primjenjene doze nakon 16 h, dok je aktivnost GPx-a bila značajno manja kod srednje doze nakon 24 h. Slično tome u mojem istraživanju je zabilježen mali porast koncentracije GSH i pad aktivnosti GPx, iako ne statistički značajno. Zaključeno je da vrijeme uzorkovanja ima značajan utjecaj na koncentraciju GSH i da kod STC-a postoji tzv. *sampling time x treatment effect*. Promjene u koncentraciji GSH i aktivnosti GPx-a nisu pratile promjene u genskoj ekspresiji, što se

objašnjava nedostatkom potrebnih aminokiselina te da je vrijeme od tretmana do uzorkovanja bilo prekratko i da se promjene koncentracije proteina uzrokovane promjenom ekspresije njihovih gena javljaju puno kasnije. Zaključeno je da niske doze STC-a izazivaju blagi oksidacijski stres, dok veće doze moguće imaju zakašnjeni učinak.

## **6. Zaključak**

Korištene doze STC-a u ovom istraživanju (10, 20 i 40 mg kg<sup>-1</sup> t.m.) uzrokovale su umjereni oksidacijski stres u mužjaka štakora soja Wistar. Izmjereno je statistički značajno povećanje koncentracije MDA i enzimske aktivnosti SOD-a u tkivu bubrega, koncentracije MDA i enzimske aktivnosti CAT u plazmi te enzimske aktivnosti GPx-a u jetri. Oksidacijski stres više je bio izražen u tkivu bubrega nego u jetri i plazmi, što potvrđuje hipotezu da su bubrezi ciljni organi toksičnosti STC-a. Jako je bitna i duljina tretmana koja utječe na mehanizam toksičnosti STC-a.

## 7. Literatura

1. Adrio J.L., Demain A.L. (2003): Fungal biotechnology. *Int. Microbiol.* **6**: 191–199.
2. Ammann (2005): Mycotoxins in indoor environments. *Mycotoxin Res.* **21**: 157–163.
3. Anderson M.E. (1998): Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* **111–112**: 1–14.
4. Baertschi S.W., Raney K.D., Harris T.M., Shimada T., 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. *Chem. Res. Toxicol.* **2**: 114–122.
5. Balogh K., Kövesi B., Zándoki E., Kulcsár S., Ancsin Z., Erdélyi M., Dobolyi C., Bata-Vidács I., Inotai K., Szekeres A., Mézes M., Kukolya J. (2019): Effect of sterigmatocystin or aflatoxin contaminated feed on lipid peroxidation and glutathione redox system and expression of glutathione redox system regulatory genes in broiler chicken. *Antioxidants* **8**: 201.
6. Bennett J., Klich M. (2003): Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* **16**: 497–516.
7. Betteridge D.J. (2000): What is oxidative stress? *Metabolism.* **49**: 3–8.
8. Betts G., Twohig J., Van Den Broek M., Sierro S., Godkin A., Gallimore A. (2007): The impact of regulatory T cells on carcinogen-induced sarcogenesis. *Br. J. Cancer* **96**: 1849–1854.
9. Black S.M., Ellard S., Parry J.M., Wolf C.R. (1992): Increased sterigmatocystin-induced mutation frequency in *Saccharomyces cerevisiae* expressing cytochrome P450 CYP2B1. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 374–376.
10. Blackwell M., Hibbett D.S., Taylor J.W., Spatafora J.W. (2006): Research coordination networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* **98**: 829–837.
11. 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. **73**: 4211–4217.
12. Bokhari F.M., Aly M. (2009): Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Adv. Biol. Res.* **3**: 71–78.
13. Buege J.A., Aust S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302–310.



14. Cabaret O., Puel O., Botterel F., Pean M., Bretagne S., Delaforge M. (2011): Contribution of uniformly <sup>13</sup>C-enriched sterigmatocystin to the study of its pulmonary metabolism. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**: 2704–2710.
15. 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. *Chem. Res. Toxicol.* **23**: 1673–1681.
16. Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.P. (2002): Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 447–459.
17. Carbone I., Ramirez-Prado J.H., Jakobek J.L., Horn B.W. (2007): Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. *Evol. Biol.* **12**: 1–12.
18. Conrad M., Friedmann Angeli J.P. (2017): Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**: 3289-3303.
19. 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.
20. Curnutte J., Babior B. (1987): Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet* **16**: 229–297.
21. 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. *Mutat. Res. Toxicol.* **137**: 111–115.
22. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **15**: 316–328.
23. Delanty N., Dichter M.A. (1998): Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* **98**: 145–153.
24. Delgado-Virgen F., Guzman-de-Peña D. (2009): Mechanism of sterigmatocystin biosynthesis regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Braz. J. Microbiol.* **40**: 933–942.
25. Desjardins A., Hohn T., McCormick S. (1993): Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev* **57**: 595–604.
26. Díaz Nieto C.H., Granero A.M., Zon M.A., Fernández H. (2018): Sterigmatocystin: a mycotoxin to be seriously considered. *Food Chem. Toxicol.* **118**: 460–470.

27. Drury J.A., Nycyk J.A., Cooke R.W.I. (1997): Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin. Chim. Acta* **263**: 177–185.
28. Dybukt J., Ankarcona M., Burkitt M., Sjöholm A., Ström K., Orrenius S., Nicotera P. (1994): Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem* **269**: 30553–30560.
29. Ellman G.L. (1958): A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* **74**: 443–450.
30. Enomoto M., Hatanaka J., Igarashi S., Uwanuma Y., Ito H., Asaoka S., Iyatomi A., Kuyama S., Harada T., Hamasaki T. (1982): High incidence of angiosarcomas in brown-fat tissue and livers of mice fed sterigmatocystin. *Food Chem. Toxicol.* **20**: 547–556.
31. 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 179–183.
32. Fernández-Checa J., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Mai M., Ardite E., Morales A. (1997): GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* **273**: 7–17.
33. Flores-Flores M.E., Lizarraga E., López de Cerain A., González-Peñas E. (2015): Presence of mycotoxins in animal milk: a review. *Food Control* **53**: 163–176.
34. Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. (1978): Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**: 2639–2644.
35. Frisvad J.C. (2003): Mycotoxins in grain, compounds other than aflatoxin. *Trends Food Sci. Technol.* **5**: 235–236.
36. Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. (2006): Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**: 3–6.
37. Gardiner D., Waring P., Howlett B. (2005): The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **151**: 1021–1032.
38. Gopalakrishnan S., Liu X., Patel D.J. (1992): Solution structure of the covalent sterigmatocystin-DNA adduct. *Biochemistry* **31**: 10790–10801.
39. Gutteridge J.M.C. (1993): Free radicals in disease processes: a compilation of cause and

- consequence. *Free Radic. Res.* **19**: 141–158.
40. Gutteridge J.M.C. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* **41**: 1819–1828.
  41. Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1989): Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres. Clin. Haematol.* **2**: 195–256.
  42. Halliwell B. (1994): Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.* **52**: 253–265.
  43. Halliwell B. (1997): Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* **55**: 44-49.
  44. Halliwell B., Chirico S., Crawford M.A., Bjerve K.S., Gey K.F. (1993): Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 715-725.
  45. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990a): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1–85.
  46. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990b): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* **15**: 129–135.
  47. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. (1992): Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**: 598–620.
  48. Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S., Aruoma O.I. (1995): Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**: 7–20.
  49. Hampton M., Orrenius S. (1997): Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: Implications for apoptosis. *FEBS Lett.* **414**: 552–556.
  50. Huang X., Zhang X., Yan X., Yin G. (2002): Effects of sterigmatocystin on interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Wei Sheng Yan Jiu* **31**: 112–114.
  51. Huffman J., Gerber R., Du L. (2010): Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* **93**: 764–776.
  52. Ji C., Fan Y., Zhao L. (2016): Review on biological degradation of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol. *Anim. Nutr.* **2**: 127–133.
  53. Kaplowitz N., Aw T.Y., Ookhtens M. (1985): The regulation of hepatic GSH. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **25**: 714–744.
  54. Nemeth Z., Molnar A.P., Fejes B., Novak L., Karaffa L., Keller N.P., Fekete E. (2016):

- Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*. *Toxins* **8**: 354–367.
55. Kövesi B., Pelyhe C., Zándoki E., Mézes M., Balogh K. (2019): Effect of short-term sterigmatocystin exposure on lipid peroxidation and glutathione redox system and expression of glutathione redox system regulatory genes in common carp liver. *Toxicon* **161**: 50–56.
  56. Krivobok S., Olivier P., Marzin D.R., Seigle-Murandi F., Steiman R. (1987): Study of the genotoxic potential of 17 mycotoxins with the SOS chromotest. *Mutagenesis* **2**: 433–439.
  57. Kuczuk M.H., Benson P.M., Heath H., Wallace Hayes A. (1978): Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **53**: 11–20.
  58. Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. (2009): The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **674**: 137–147.
  59. Liu D. (1996): The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Neurosci.* **7**: 159–167.
  60. 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 Chem. Toxicol.* **50**: 1920–1926.
  61. Lou J., Tian H., Meng Z., Gou Z. (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 Hyg. Res.* **2**: 28–31.
  62. Lu S.C. (2009): Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Asp. Med* **30**: 42–59.
  63. Lu S.C. (2013): Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**: 3143–3153.
  64. Maekawa A., Kajiwara T., Odashima S., Kurata H. (1979): Hepatic changes in male ACI/N rats on low dietary levels of sterigmatocystin. *Gan* **70**: 777–81.
  65. Maier C.M., Chan P.H. (2002): Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* **8**: 323–334.
  66. Mates J., Perez-Gomez C., I Nunezez de Castro (1999): Antioxidant Enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**: 595–603.

67. McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N. (1975): Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**: 5135–5139.
68. Meister A., Anderson M.E. (1983): Glutathione. Ann. Rev. Biochem. **52**: 711–760.
69. Metwally M.M., El-Sayed A.M. abd Alla., Mehriz A.M., Abu Sree Y.H. (1997): Sterigmatocystin - Incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. Mycotoxin Res. **13**: 61–66.
70. 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. Chem. Biol. Interact. **183**: 113–124.
71. Moore K., Roberts L. (1998): Measurement of lipid peroxidation. Free Radic Res **28**: 659–671.
72. 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. Mutat. Res. Lett. **173**: 217–222.
73. Nicholls P. (2012): Classical catalase: Ancient and modern. Arch. Biochem. Biophys. **525**: 95–101.
74. Ohtsubo K., Saito M., Kimura H., Tsuruta O. (1978): High incidence of hepatic tumours in rats fed mouldy rice contaminated with *Aspergillus versicolor* containing sterigmatocystin. Food Cosmet. Toxicol. **16**: 143.
75. Olson J.J., Chu F.S. (1993): Urinary Excretion of Sterigmatocystin and Retention of DNA Adducts in Liver of Rats Exposed to the Mycotoxin: An Immunochemical Analysis. J. Agric. Food Chem. **41**: 602–606.
76. Payne G., Brown M. (1998): Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annu. Rev. Phytopathol. **36**: 392–362.
77. Peraica M., Domian A., Jurjević Ž., Cvjetković B. (2002): Prevention of exposure to mycotoxins. Arh High Rada Toksikol **53**: 229–237.
78. Perry J.J.P., Shin D.S., Getzoff E.D., Tainer J.A. (2010): The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics **1804**: 245–262.
79. Pfeiffer E., Fleck S.C., Metzler M. (2014): Catechol formation: A novel pathway in the

- metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chem. Res. Toxicol.* **27**: 2093–2099.
80. Pitt J. (2000): Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull* **56**:184–192.
  81. Purchase I.F.H., van der Watt J.J. (1970a): Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Food Cosmet. Toxicol.* **8**: 289-295.
  82. Purchase I.F.H., Watt J.J. Van der (1969): Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **7**: 135–139.
  83. Rank C., Nielsen K.F., Larsen T.O., Varga J., Samson R.A., Frisvad J.C. (2011): Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol.* **115**: 406–420.
  84. Rice-Evans C., Burdon R. (1993): Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* **32**: 71–110.
  85. Roos D. (2019): Chronic granulomatous disease. *Methods Mol. Biol.* **1982**: 531–542.
  86. Sandström J., Nilsson P., Karlsson K., Marklund S.L. (1994): 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **269**: 19163–19166.
  87. Sastre J., Pallardó F. V., García De La Asunción J., Viña J. (2000): Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic. Res.* **32**: 189–198.
  88. Schmidt A., Oberle N., Krammer P. (2012): Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* **3**: 1–20.
  89. Septien I., Blanco J.L., Suarez G., Cutuli M.T. (1994): Solubility and stability of sterigmatocystin in aqueous solutions. *Mycotoxin Res.* **10**: 15–20.
  90. Sies H. (1999): Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 916–921.
  91. Sivakumar V., Thanislass J., Niranjali S., Devaraj H. (2001): Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **20**: 398–403.
  92. Slater T.F. (1984): Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**: 1–15.
  93. Southorn P., Powis G. (1988): Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* **63**: 390–408.
  94. Stoian I., Oros A., Moldoveanu E. (1996): Apoptosis and free radicals. *Biochem. Mol. Med.* **59**: 93–97.
  95. Tang T., Friedman M.A. (1977): Carcinogen activation by human liver enzymes in the Ames

- mutagenicity test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **46**: 387–394.
96. Tappel A.L. (1978): Glutathione Peroxidase and Hydroperoxides. *Methods Enzymol.* **52**: 506–513.
97. Terao K. (1978): Mesotheliomas induced by sterigmatocystin in Wistar rats. *Gan* **69**: 237–47.
98. 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*. *Mutat. Res. Lett.* **139**: 203–206.
99. Ueno Y., Kubota K., Ito T., Nakamura Y. (1978): Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.* **38**: 536–542.
100. Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *BBA - Gen. Subj.* **839**: 62–70.
101. Veršilovskis A., Bartkevičs V. (2012): Stability of sterigmatocystin during the bread making process and its occurrence in bread from the Latvian market. *Mycotoxin Res.* **28**: 123–129.
102. Veršilovskis A., Saeger S. de (2010): Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**: 136–147.
103. Wagacha J.M., Muthomi J.W. (2008): Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int. J. Food Microbiol.* **124**: 1–12.
104. Walkow J., Sullivan G., Maness D., Yakatan G.J. (1985): Sex and age differences in the distribution of 14c-sterigmatocystin in immature and mature rats: A multiple dose study. *Int. J. Toxicol.* **4**: 45–51.
105. Wang D., Sun H., Xiao F., Ji X., Liang Y., Han F. (1991): Distribution and excretion of 3H-sterigmatocystin in rats. *IARC Sci. Publ.* **105**: 424–426.
106. Wehner F.C., Thiel P.G., Rensburg S.J. van, Demasius I.P.C. (1978): Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutat. Res. Toxicol.* **58**: 193–203.
107. Wilkinson H.H., Ramaswamy A., Sim S.C., Keller N.P. (2004): Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia* **96**: 1190–119.
108. Xing L.X., Zhang X.H., Li Y.H., Yan X., Wang J., Wang F. (2005): Effects of

- sterigmatocystin on HLA- I expression of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. Wei Sheng Yan Jiu **34**: 454–456.
109. Zhang Y., Yao Z., Wang J., Xing L., Xia Y., Zhang X. (2012): Effects of sterigmatocystin on TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12 expression in murine peripheral blood mononuclear cells and peritoneal macrophages *in vivo*. Mol. Med. Rep. **5**: 1318–1322.
110. Zwart L. De, Meerman J., Commandeur J., Vermeulen N. (1999): Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med **26**: 202–226.
111. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010). Imunologija- sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
112. Gupta P. (2016). Biotransformation. U: Gupta P. Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts and Applications. London, Elsevier, str 73-85.
113. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine: 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press, Oxford.
114. Malstrom B., Andreasson L., Reinhammer B. (1975). XIIB. U: P.Boyer, The Enzymes. New York, Academic Press, str 533.
115. Purchase I.F.H., van der Watt J.J. (1970b). The acute and chronic toxicity of sterigmatocystin. U: Purchase I.F.H. Mycotoxins in Human Health: Proceedings of a Symposium held in Pretoria. London, MacMillan, str 209-213.
116. Soriano del Castillo J.M. (2007): Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz Santos, Spain.
117. Willey J., Sherwood L., Woolverton C. (2017). Prescott ' s Microbiology. McGraw-Hill Education, New York.
118. European Food Safety Authority- EFSA (2013): Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. EFSA J. **11**: 3254.
119. International Agency for Research on Cancer- IARC (1976). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 10. Some naturally occurring substances. str 245.



120. International Agency for Research on Cancer- IARC (1987). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Supplement 7, str 449.
121. Cayman Chemicals (2010): Superoxide Dismutase Assay Kit (706002). Cayman 1–5.
122. Cayman Chemicals (2016): Glutathione Peroxidase Assay Kit ( 703102 ). Cayman 1–3.
123. Cayman Chemicals (2017): Catalase Assay Kit (707002). Cayman 1–23.
124. Rašić D. (2013).Učinak oksidacijskog stresa u mehanizmu toksičnosti okratoksina A i citrinina. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:170687> (pristupljeno 16.06.2019.)
125. Södergren E. (2000). Lipid peroxidation *in vivo*. Evaluation and application of methods for measurement. Disertacija, Sveučilište u Uppsali, Medicinski fakultet. <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:160811/FULLTEXT01.pdf> (pristupljeno 30.08.2019.)
126. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=48733>  
(pristupljeno 14.06.2019.)
127. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinickafarmakologija/farmakokinetika/metabolizam>  
(pristupljeno 28.08.2019.)
128. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3540>  
(pristupljeno 16.06.2019.)

## 8. Životopis

Rođena sam 1994. u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu i II. opću gimnaziju. 2014. godine upisala sam preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2017. godine sam završila preddiplomski studij te sam upisala Sveučilišni diplomski studij Eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija na istom fakultetu.

Tijekom studija bila sam članica studentske udruge BIUS kao dio redakcije studentskog časopisa InVivo. Zbog toga sam 2019. godine dobila Rektorovu nagradu za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici. U sklopu BIUS-a također sam sudjelovala u Istraživačko – edukacijskom projektu „Insula Tilagus 2017.“

2016. i 2017. godine sudjelovala sam na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja, a 2018. i 2019. godine bila sam u Organizacijskom odboru tog simpozija.