

Review

KEMIZAM I BIOLOŠKI UČINCI GLIOTOKSINA

Ivan KOSALEC i Stjepan PEPELJNJAK

Zavod za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno u travnju 2004.

Gliotoksin je mikotoksin iz skupine epipolitiiodioksopiperazina s biološki aktivnim internim disulfidnim mostom. Gliotoksin ima antibakterijski i virucidan učinak (nekada se rabio kao antibiotik, no zbog toksičnosti je izbačen iz kliničke uporabe). Najviše proučavan učinak gliotoksina je na stanice imunskog sustava, pa se pokušavaju gliotoksinom ili njegovim analogima obraditi presadci *ex situ* radi smanjenja učestalosti odbacivanja organa i tvorbe "imunoso tihih" presađaka. Toksičnost gliotoksina dokazana je na nizu staničnih linija (makrofazi, timociti, splenociti, fibroblasti) gdje izaziva apoptozu i nekrozu te inhibiranjem niza enzima (farnesil-transferazu, NF- κ B, alkohol-dehidrogenazu). Toksičnost gliotoksina povezana je sa stvaranjem kovalentnih i miješanih disulfidnih veza te oksidativnim učincima. Gliotoksin tvore plijesan *Aspergillus fumigatus* i gljivica *Candida albicans* te se pretpostavlja da će tvorba ovog toksina, zbog dokazanih toksičkih učinaka na mjestu mikoze (invazivne aspergiloze i kandidijaze) imati učinak na egzacerbaciju mikoze odnosno pridonijeti invazivnosti gliotoksinogenih gljivica.

KLJUČNE RIJEČI: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, gljivice, mikotoksin, plijesni

Epipolitiiodioksopiperazini

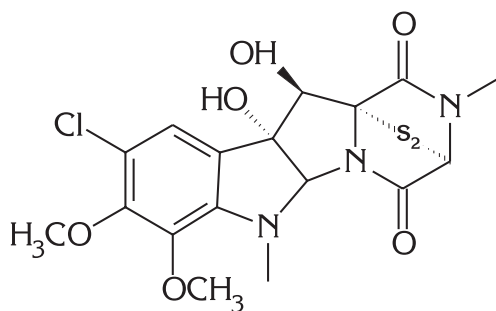
Biološki aktivni spojevi s jednom ili više disulfidnih veza u molekuli izolirani su iz velikog broja mikroorganizama, biljaka i životinja. U biljnom carstvu poznati su npr. asparagušična kiselina iz mladih izdanaka šparoge (*Asparagus officinalis* L.) i alicin iz češnjaka (*Allium sativum* L.). Spojeve s jednom ili više disulfidnih veza u molekuli u ljudi i životinja najčešće nalazimo među polipeptidima, gdje su sastavni dio molekule aminokiseline cisteina sa slobodnom sulfhidrilnom skupinom. Osim kovalentnih veza koje vežu pojedine aminokiseline u peptide, disulfidna veza (\sim S-S \sim), kao dio cikličke strukture peptida, odražava njihovu terciarnu strukturu i biološki učinak. Primjeri su hormoni inzulin i oksitocin (1). No, uz odražavanje terciarne strukture odnosno djelovanja samih peptida, spojevi s disulfidnim vezama imaju i regulacijske učinke u stanicama. Primjer su enzimi tioredoksin i glutation. Izmjena između oksidacijskih stanja sumpora (iz disulfida do tiola i obrnuto) omogućuje tim spojevima ulogu redoks regulatora u stanicama.

Iako su biološka uloga spojeva s (poli)sulfidnom

vezom, kao i njihov mehanizam djelovanja relativno dobro poznati, biološki učinci spojeva s (poli)sulfidnom vezom koji su izolirani izvan organizma nisu dobro poznati i shvaćeni (2). Kod gljivica, svi dosada poznati spojevi koji u strukturi imaju (poli)sulfidni most, tvore se kao metaboliti sekundarnog metabolizma te se po kemijskoj strukturi svrstavaju u skupinu spojeva epipolitiiodioksopiperazina i svi izolirani spojevi pokazuju određene biološke učinke (2). Sekundarni metaboliti u epipolitiiodioksopiperazinskoj skupini spojeva izvode se iz osnovnog diketopiperazinskog prstena premoštenog polisulfidnim mostom na položaju C₃-C₆.

Prirodno stanište gljivica koje tvore sekundarne metabolite iz skupine epiditioksopiperazina je tlo, s izuzetkom vrste *Candida albicans*, koja je i dio endogene flore čovjeka i životinja.

S gledišta veterinarske toksikologije, najvažniji predstavnici spojeva skupine epiditioksopiperazina, koji pokazuju toksičke učinke u životinjama jesu sporidezmini (slika 1) i ketomin. Sporidezmini su sekundarni metaboliti plijesni *Pithomyces chartarum* (Berk. i Curt.) M. B. Ellis (raniji naziv *Sporidesmium*



Slika 1 Kemijska struktura sporidezmina

bakeri) i uzrokuju sporidezminotoksikozu odn. facijalni egzem u ovaca i goveda. Naime, plijesan *Pithomyces chartarum* kao saprofit kolonizira pokošenu travu i slamu, ali u odnosu na druge plijesni ima vrlo malen udio. *Pithomyces chartarum*, na biljnom supstratu pod određenim uvjetima vlažnosti i temperature može brzo sporulirati i tvoriti sekundarne metabolite – sporidezmine te do intoksikacije životinja dolazi ingestijom ili kontaktom s tako kontaminiranom biljnom hranom. Ispitivanjem toksinogenog potencijala izolata plijesni *Pithomyces chartarum* iz tla dokazana je u većine izolata sposobnost stvaranja sporidezmina u laboratorijskim uvjetima (0,3 odn. 1,5 $\mu\text{g/mL}$) (3). U laboratorijskih životinja inficiranih sporama plijesni *Pithomyces chartarum* razvila se ista klinička slika kao i u životinja (ovaca i goveda) u ispaši na poljima što dokazuje da su sporidezmini uzročnici facijalnog egzema (3). U akutnoj fazi bolest se u ovaca i goveda očituje kao egzem po usnama, vjeđama, licu, uškama i kruni na papcima te kao kolangitis s mrljastom dekoloracijom jetre. Pri kroničnoj intoksikaciji dolazi do biljarne ciroze jetre (atrofija jetre) s opstrukcijom žučovoda i generaliziranom žuticom (4). Bolest se može spriječiti ili reducirati uništavanjem spora plijesni *Pithomyces chartarum* odnosno obrađivanjem pokošene trave, slame ili drugog biljnog materijala koji služi za ishranu ovaca fungicidima - dugolančanim masnim kiselinama ili 2-(tiazolil-2)-benzimidazolom (3). Osim primjene fungicida, primijećeno je da unos cinka također smanjuje ili uklanja toksično djelovanje sporidezmina. No, nedostatak ovih metoda je u negativnom djelovanju rezidua fungicida i djelovanju cinka na smanjenje tvorbe mlijeka, kao i taloženje rezidua cinka u kostima (5). Facijalni egzem je ozbiljna, bolna i stresna bolest, najčešće ovaca, i zabilježena je u Novom Zelandu, Australiji, Južnoj Americi i Francuskoj.

Osim utvrđivanja mikotoksina sporidezmina kao etiološkog uzročnika facijalnog egzema u ovaca,

daljnja istraživanja pokazala su da i drugi mikotoksini iz skupine epipolitiiodioksopiperazina mogu biti toksični za životinje. Naime, primijećeno je da janjad na farmama Nove Škotske sporije raste i gubi na tjelesnoj težini, posebice tijekom ljeta i jeseni. Ubrzo su iz biljnog materijala rabljenog za ishranu janjadi izolirane plijesni iz roda *Chaetomium* (*C. cochliodes* Palliser i *C. globosum* Kunze) koje su tvorile spoj karakterističan za epiditioksopiperazinsku skupinu spojeva. Izolirani spoj je dobio ime po vrstama plijesni koje ga tvore – ketomin (3). Osim smanjenja prirasta životinja, za ketomine se pretpostavlja da sudjeluju u razvoju "ill-thrift" sindroma u ovaca (6).

Između prvih identificiranih i opisanih spojeva iz skupine epiditioksopiperazina, gliotoksin je danas najproučavaniji. Naime, tragajući za sekundarnim metabolitima plijesni kao mogućim kemoterapeutskim sredstvima, botaničar Weindling je 1932. otkrio da sekundarni metabolit plijesni *Trichoderma (Gliocladium) lignorum* pokazuje antagonistički učinak na plijesni vrsta *Rhizoctonia solani* i *Phytophthora parasitica*. Utvrđeno je da je antagonizam uzrokovan tvorbom tzv. letalnog izvora iz plijesni *Trichoderma lignorum*. Weindling i Emerson su 1936. godine uspjeli izolirati tvar s antifungalnim učinkom u kristalnom obliku iz plijesni *Gliocladium fimbriatum (Trichoderma viride)* i dano joj je ime gliotoksin, prema imenu vrste iz koje je izolirana (3, 7). Disulfidni most u molekuli gliotoksina opisan je 1943. (8), a 1966. utvrđena je točna kemijska struktura, kad i stereokemija molekule (9). Daljnjim istraživanjima utvrđeno je da gliotoksin nije sekundarni metabolit samo vrsta iz roda *Trichoderma*, već je identificiran i u drugih gljivičnih vrsta (*Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. chevalieri*, *Penicillium terlikowskii*, *P. obscurum*, *P. cinerascens*, *Thermoascus crustaceus*, *Dichotomomyces cejpai*, *Candida albicans*) (10-12).

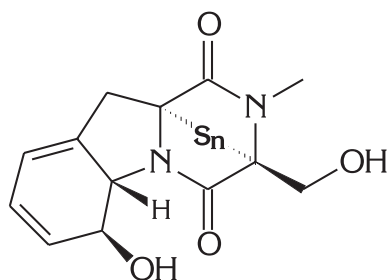
U novije su vrijeme iz lišaja *Xanthoparmelia scabrosa* izolirani skabrozini, koji se također svrstavaju u grupu epiditiiodioksopiperazina (2).

Osim navedenih mikotoksina, u skupinu epipolitiiodioksopiperazina ubrajaju se i emestrin, arantoin, ketracin, ketocin i slični spojevi.

Kemijska svojstva gliotoksina

Gliotoksin [2,3,5a,6-tetrahidro-6-hidroksi-3-(hidroksimetil)-2-metil-1OH-3a,10a-epitiopirazinno[1,2a]indol-1,4-dion] klasičan je predstavnik skupine epipolitiiodioksopiperazina. Karakterizira ga disulfidni most – najreaktivniji dio molekule kao i

u ostalih članova epipolitiiodioksopiperazina. No, osim disulfidnog mosta, izolirani su gliotoksini E i G s trisulfidnim i tetrasulfidnim mostom (slika 2). Za razliku od sporidezminske podskupine, nemaju klor u molekuli. Molekularna masa gliotoksina je 326,4 g mol⁻¹, a talište 221 °C. Osjetljiv je na oksidacijske procese i povišenu temperaturu. Lako je topljiv u piridinu, kloroformu i dimetilformamidu (3, 12).



- n=2 GLIOTOKSIN
- n=3 GLIOTOKSIN E
- n=4 GLIOTOKSIN G

Slika 2 Kemijske strukture gliotoksina

Putovi biosinteze gliotoksina kao sekundarnoga glijivičnog metabolita do danas nisu razjašnjeni, ali se pretpostavlja da gliotoksin nastaje pentozafosfatnim putem, preko šikiminske i korizmove kiseline do aromatskih aminokiselina (3, 13, 14). Pretpostavlja se da pentozafosfatnim putem nastaju i neki drugi sekundarni metaboliti plijesni, kao na primjer verukulogen, penitrem, ciklopijazonična kiselina, fumitremorgen, faloini, amanitini i ergot-alkaloidi (13, 14).

Biološki učinci gliotoksina

Antimikrobni učinak

Ubrzo nakon otkrića fungicidnog učinka gliotoksina, ispitan je i njegov baktericidni učinak u želji da se pronađu novi antibiotici s mogućom kliničkom primjenom. U pokusima *in vitro* Waksman i Woodruff (1942) utvrđuju baktericidni učinak na širok spektar gram-pozitivnih bakterijskih vrsta. Istraživanja su pokazala i vrlo jak baktericidni učinak na *Mycobacterium tuberculosis*. Ispitivanjem baktericidnog učinka gliotoksina u kulturama stanica sisavaca utvrđena je vrlo uska terapijska širina u odnosu na toksičan učinak u kulturama stanica sisavaca te se zbog toksičnog djelovanja odbacio kao mogući kemoterapeutik (3). Toksičnost gliotoksina potvrđena je u miševima i štakorima (LD₅₀

za miševe=25 mg kg⁻¹), a u dvostruko višoj dozi danj oralno ili parenteralno, svi ispitivani miševi i štakori uginuli su 24 sata nakon aplikacije (3).

Osim *in vitro* baktericidnog i fungicidnog učinka gliotoksina, utvrđen je i virucidni učinak. Gliotoksin inhibira multiplikaciju RNA poliovirusa, herpes virusa i virusa azijske influence u kulturama bubrežnih stanica majmuna, HEp2 i KB staničnih linija. Utvrđeno je da gliotoksin nema virucidni učinak na viruse kada se nalaze izvan stanice te da je za inhibiciju sinteze RNA virusa potrebna manja koncentracija gliotoksina u odnosu na inhibiciju sinteze RNA u ispitivanim staničnim kulturama (50 %-tna inhibicija sinteze RNA Coxsackie A21 virusa pri koncentraciji gliotoksina od 0,002 μg mL⁻¹, inhibicija sinteze RNA HeLa-stanica pri koncentraciji 0,5 μg mL⁻¹). No, citotoksični učinak, tj. uzak omjer terapijske i toksične koncentracije onemogućava uporabu gliotoksina kao mogućeg kemoterapeutika (3).

Učinci na stanice imunskog sustava *in vitro*

Gliotoksin pokazuje imunomodulatorne učinke kao i sekundarni metaboliti nekih drugih glijivica, npr. aflatoksini, okratoksini, fumonizini i trihoteceni (15, 16).

Prilikom slučajne kontaminacije stanične kulture makrofaga s plijesni *Aspergillus fumigatus*, primijećena je inhibicija atherencije makrofaga na plastično dno posude (6). U *in vitro* uzgoju sposobnost fagocitoze makrofaga izravno je vezana za širenje i atherenciju makrofaga na plastično dno posude. Kasnije je utvrđeno da je inhibicija fagocitoze u kulturi makrofaga uvjetovana gliotoksinogenim sojem plijesni *Aspergillus fumigatus* (17). Osim inhibicije fagocitoze, na makrofazima su uočene i morfološke promjene, kao gubitak mikrovila i kondenzacija kromatina (6).

Gliotoksin pri nanomolarnim koncentracijama inhibira proliferaciju T i B-limfocita nakon stimulacije antigenom, kao i učinkovitost citotoksičnih T-limfocita (5, 6). Pri koncentraciji od 300 nmol L⁻¹, gliotoksin inhibira tvorbu vodik-peroksida u polimorfonuklearnim leukocitima za 65 %, a smatra se da ujedno smanjuje i baktericidni učinak makrofaga (6).

Daljnijim istraživanjima dokazana je inhibicija vezanja NFκB na DNA. Naime, NFκB je dimerni transkripcijski čimbenik koji se nalazi u većini stanica te nakon podražaja inducira ekspresiju gena. NFκB ima značajne antiapoptotičke učinke u različitim modelima apoptoze, kao i u različitim staničnim linijama. Gliotoksin u kulturi zvjezdastih stanica jetre

inhibira vezanje NF- κ B na DNA te time više nisu izraženi njegovi antiapoptotički učinci (18).

Gliotoksin modulira tvorbu reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u polimorfonuklearnim leukocitima (PMN). *Tsunawaki et al.* (19) dokazuju da gliotoksin značajno inhibira tvorbu O₂⁻ (stimuliranog forbol-miristatacetatom) kao prekursora reaktivnih kisikovih spojeva u polimorfonuklearnim leukocitima.

Pretpostavlja se da će inhalacija spora i/ili dijelova micelija koji se šire slobodno zrakom, a sadržavaju mikotoksine, uz ostale čimbenike pridonijeti razvoju alergija, osobito u djece (20). Utjecaj gliotoksina na tvorbu citokina koji posebice utječu na sintezu IgE-protutijela, ispitali su *Wichmann et al.* (20) te utvrđuju da gliotoksin u nižoj koncentraciji (34,2 ng mL⁻¹) inhibira tvorbu IFN- γ (čimbenika supresije sinteze IgE), a u višoj koncentraciji (82,8 ng mL⁻¹) inhibira tvorbu IL-4 za 50% (ID₅₀). Pretpostavka je da će jačom inhibicijom Th1-limfocita koji tvore IFN- γ izazvati veći rizik od razvoja alergija, osobito u djece.

Mehanizmi toksičnosti

a) Kovalentne interakcije

Uspostavljanjem kemijske strukture gliotoksina i ostalih pripadnika epipolitiiodioksopiperazina te utvrđivanjem njihovih bioloških učinaka, bilo je nužno odrediti na strukturalnoj razini koji je dio molekule u epipolitiiodioksopiperazinskoj skupini spojeva odgovoran za biološke učinke. Ispitivanjem baktericidnog učinka gliotoksina i sporidezmina utvrđeno je da sporidezmin pokazuje jači baktericidni učinak (npr. na *Bacillus subtilis*) od gliotoksina, što je vjerojatno vezano uz izraženiju lipofilnost sporidezmina, ali i prisutnost kloriranog aromatskog prstena u molekuli. Daljnjim istraživanjima je utvrđeno da upravo prisutnost disulfidnog mosta u molekuli gliotoksina i sporidezmina uvjetuje biološke učinke (3). Naime, pri ispitivanju virucidnog učinka gliotoksina, uz intaktni gliotoksin ispitao se i reducirani gliotoksin. Disulfidni most se reducirao u ditiolne skupine s pomoću ditiotreitola. Primijećeno je da reducirani gliotoksin, odnosno gliotoksin bez prisutnosti disulfidnog mosta ne izaziva inhibiciju sinteze RNA virusa. Istovjetni rezultati dobiveni su metilacijom disulfidnog mosta. Osim inhibicije sinteze RNA virusa, ispitivana je i sposobnost inhibicije atherencije makrofaga na plastične materijale i drugih pripadnika gliotoksinske podskupine epipolitiiodioksopiperazina – dehidrogliotoksin i sporidezmin. Najjače djelovanje ima sporidezmin u koncentraciji 15 nmol L⁻¹, a za

gliotoksinsku podskupinu vrijednosti su između 90 i 160 nmol L⁻¹ (6).

Daljnjim istraživanjima dokazivan je mehanizam toksičnosti gliotoksina. On ovisi o stvaranju miješanih disulfidnih veza između molekule gliotoksina (i aktivnog mjesta – disulfidnog mosta) i sulfhidrilnih grupa na aminokiselinskim ostacima u molekuli staničnih proteina. Inkubacijom [³⁵S]-gliotoksina s pročišćenim serumskim albuminom goveda dokazana je interakcija radio-označenog gliotoksina i ovisnost vezanja o temperaturi i vremenu inkubacije, što je potvrđeno kromatografijom i dijalizom. Reakcija je bila reverzibilna i vjerojatno uzrokovana kovalentnim disulfidnim vezama između tioskupine na aminokiselinskom ostatku proteina i disulfidnog mosta u molekuli gliotoksina (6). Tezu o tvorbi miješanih disulfidnih kovalentnih veza ispitali su *Hurne et al.* (21) na reakciji između gliotoksina i enzima kreatin-kinaze izoliranog iz mišića zeca. Kreatin-kinaza je enzim koji katalizira reverzibilnu tvorbu ATP-a iz kreatin-fosfata i ADP-a. Inhibitori kreatin-kinaze ujedno imaju i učinak na nekoliko linija tumorskih stanica (22). Zbog toga što je inaktivacija kreatin-kinaze uvjetovana reaktivnim kisikom i tiol-specifičnim reagensima, ispitan je učinak gliotoksina na kreatin-kinazu. Zečja kreatin-kinaza sastoji se od 4 cisteinska ostatka po 42 kDa podjedinice i aktivna je u otopinama kao dimer. U molekuli enzima ključno je Cys-282 mjesto, tj. modifikacija tog cisteinskog dijela dovodi do inaktivacije enzima (21).

Novija istraživanja također potvrđuju tvorbu tiol-disulfidnih interakcija, što dovodi do inaktivacije enzima. *Bernardo et al.* (23) potvrđuju nastanak disulfidnih veza između enzima i gliotoksina na primjeru glutationa. Mehanizam inaktivacije enzima gliotoksina je interakcija disulfidne veze sa sumpornukleofilima i tiol-disulfidnim mehanizmom razmjene, što je dokazano stvaranjem miješanih disulfida između gliotoksina i glutationa. Stvaranjem veza između glutationa i gliotoksina, tj. inaktivacijom glutationa pri *in vitro* uvjetima inkubacije (pH 7.0 i 25 °C), potvrđuje se ne samo mehanizam toksičnog učinka gliotoksina već i njegov učinak *in vivo* (23).

Osim inaktivacije navedenih enzima dokazan je isti mehanizam pri inaktivaciji enzima alkohol-dehidrogenaze (kovalentne veze na tiolnim skupinama odgovornim za biološko djelovanje – Cys-281 i/ili Cys-282) (6). Gliotoksin inhibira farnezil-transferazu i RNA-polimerazu (2), kao i transkripcijski čimbenik NF- κ B (24-26). Inaktivacijom NF- κ B, transkripcijskog čimbenika ključnog za indukciju mnogih gena

povezanih s imunskim i upalnim procesima, razjasnili bi se mehanizmi imunosupresivnog učinka gliotoksina. Gliotoksin također stimulira oslobađanje kalcija iz mitohondrija čiji je mehanizam povezan s tiolnim skupinama u membrani mitohondrija (27).

b) Oksidativni učinci

Osim inhibicije proteina prema mehanizmu tio-disulfidne razmjene, primijećeno je da sporidezmin inducira oksidativan stres u kulturi izoliranih eritrocita, odnosno tvorbu superoksida (Munday 1984). Pretpostavilo se da prelazak reduciranog oblika epipolitiiodioksopiperazina natrag u oksidirani oblik tvori superoksid, vodikov peroksid i hidroksilne radikale, koji su izravno odgovorni za oštećenje stanica (2). Gliotoksin u redoks sustavu izaziva oštećenja na plazmidnoj DNA. No, oksidirani (disulfidni) oblik gliotoksina ne pokazuje toksičan učinak na plazmidnu DNA. Kada je uz gliotoksin prisutna i reducirajuća tvar u stanici, reducirani oblik gliotoksina izaziva kidanje plazmidne DNA. Pretpostavlja se da ovaj mehanizam uzrokuje indukciju apoptoze stanica slezene i makrofaga (2, 28).

c) Apoptoza

Gliotoksin izaziva programiranu smrt stanice – apoptozu u nekoliko staničnih linija, ponajprije stanica imunskog sustava (timocita, perifernih limfocita, makrofaga) u koncentraciji od 0.3 do 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dok u višim koncentracijama (iznad 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) izaziva njihovu nekrozu. Niska koncentracija gliotoksina za izazivanje apoptoze tipična je kao i za mnoge druge toksine. Pokušaj inhibicije apoptoze uzrokovane gliotoksinom s "hvatačima" slobodnih kisikovih radikala nije uspio, što govori da reaktivni kisikovi spojevi nisu potpuno odgovorni za izazivanje apoptoze (2). Inhibicija sinteze proteina također je samo jedan od mehanizama nastanka apoptoze. Naime, u timocitima, u kojih nije moguće inhibirati sintezu proteina, apoptoza može biti uzrokovana mobiliziranjem kalcija i povećanjem njegove unutarstanične koncentracije (27). Mogući mehanizam apoptoze predložili su *Sutton et al.* (29) u kulturi splenocita, gdje je gliotoksin smanjio koncentraciju cAMP, što je posljedično izazvalo apoptozu. Slične zaključke donose *Waring et al.* (27).

U kulturi makrofaga gliotoksin izaziva inhibiciju fagocitoze. Naime, makrofazi posjeduju na plazmatskoj membrani tiolne skupine (od cisteinskih aminokiselinskih ostataka) koje su odgovorne za

proces fagocitoze. *Waring et al.* (5) ispitivali su ulogu epipolitiiodioksopiperazinske skupine mikotoksina, poglavito gliotoksina i mehanizam toksičnog učinka na makrofage, na modelu jednostavnog spoja 1,4-dimetil-3,6-ditioacetildioksopiperazina. Mogućnost fagocitoze ispitivanih makrofaga bila je inhibirana u prisutnosti reduciranog oblika (ditiola) 1,4-dimetil-3,6-ditioacetildioksopiperazina, koji nastaje iz oksidiranog oblika - disulfida. Nadalje, gliotoksin u koncentracijama između 0,3 i 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ inducira apoptozu zvjezdastih stanica jetre koje imaju ključnu ulogu u fibrinogenezi jetre. U istih stanica gliotoksin inducira depolarizaciju mitohondrijske membrane i smanjenje koncentracije ATP-a i posljedično tomu otpuštanje citokroma C i aktivaciju kaspaza3, dok u većim koncentracijama (>32,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) izaziva nekrozu zvjezdastih stanica jetre. Apoptoza i nekroza zvjezdastih stanica jetre također su uvjetovane tvorbom reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (18).

Na primjeru ljudskih neuroblastomskih stanica (linije SH-SY5Y) ispitivan je potencijalni neurodegenerativni i neurotoksični potencijal gliotoksina. Utvrđeno je da gliotoksin smanjuje sadržaj ukupnih proteina (koji korelira s citotoksičnošću) i smanjuje broj staničnih neurita. Degenerativne promjene na neuritima primijećene su pri koncentracijama gliotoksina od 0,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a citotoksični učinak pri dvostruko većoj koncentraciji gliotoksina (30).

Moguća terapijska uporaba gliotoksina

Nakon što je utvrđen antimikrobni učinak gliotoksina, želja da se uvede u kliničku praksu ubrzo je napuštena zbog uskog omjera povoljnog (antimikrobnog) i toksičnog učinka (citotoksičnog na niz staničnih linija). No, otkrićem imunotoksičnog učinka (posebice inhibicije fagocitoze) njegova moguća terapijska uloga ponovno je ispitana. Naime, makrofazi su stanice koje, uz ostale, sudjeluju u regulaciji imunskog sustava. One ne samo da fagocitiraju mikroorganizme i ostale nekorisne tvari već sudjeluju i kao stanice koje prezentiraju antigen i izvor su citokina (interleukina, čimbenika nekroze tumora, interferona). Istraživanjem uloge makrofaga kao izvora antigena i njihove uloge na limfocite, kao i toksičnog učinka gliotoksina na te stanice, pretpostavilo se da bi se gliotoksin mogao iskoristiti u terapijske svrhe pri obrađivanju presađenih organa *ex situ*. U transplantacijskoj imunologiji je poznato da strano tkivo (ili organ) koji se želi presaditi nužno mora biti "imunološki tih", odnosno ne smije u primatelja

izazvati reakciju odbacivanja. Histokompatibilnost, odnosno imunosna podudarnost tkiva kod darovatelja i primatelja idealna je u jednojajčanih blizanaca. Dosadašnji postupci stvaranja "imunološki tihih" tkiva (ili organa) zadovoljavali su za tkiva ili organe koji su mogli biti tretirani kisikom duže vrijeme (tjednima). Ali takav postupak obrade nije bio moguć za presađeni bubreg ili srce. Uspjeh presađivanja također se smanjuje uporabom imunosupresivnih kemoterapeutika, koji oslabljuju imunosni sustav primatelja, povećavajući rizik od razvoja infekcija uzrokovanih oportunističkim mikroorganizmima.

Moguća uporaba gliotoksina ohrabrila je istraživače nakon uspješno provedenog presađivanja štitne žlijezde iz jednog miša u drugog, genski različitog miša. Štitna žlijezda je prije presađivanja obrađivana *ex situ* gliotoksinom tijekom 16 sati i nakon presađivanja miš-primatelj nije odbacio presadak (25). Istraživanjem presađivanja koštane srži u miševa dokazano je selektivno imunotoksično djelovanje gliotoksina, odnosno obrađivanjem koštane srži *ex situ* gliotoksinom primijećeno je da su stanice zrelih limfocita osjetljivije na toksički učinak gliotoksina od matičnih stanica. Zreli T-limfociti najodgovorniji su za odbacivanje tkiva ili organa (*graft-versus-host disease*). Presađivanjem koštane srži tretirane *ex situ* gliotoksinom (300 nmol L^{-1}) u miša kojemu je imunosni sustav bio uništen radijacijom, nije došlo do odbacivanja presadaka za razliku od kontrolne skupine miševa (kojima transplahirana koštana srž nije tretirana *ex situ* gliotoksinom). Nakon uspješno provedenog presađivanja, hemopoetski sustav miša-primatelja bio je potpuno rekonstruiran davateljevim hemopoetskim stanicama iz presađene koštane srži (5, 31).

ZAKLJUČAK

Gliotoksin je mikotoksin s vrlo širokim spektrom toksičkih učinaka. *In vitro*, gliotoksin inducira apoptozu timocita, perifernih limfocita, makrofaga, mastocita, fibroblasta i zvjezdastih stanica jetre, a *in vitro* štitne žlijezde, slezene i jetre. Mehanizam izazivanja apoptoze nije do kraja razriješen, ali se pretpostavlja putem inhibicije NF κ B, tvorbom reaktivnih kisikovih spojeva i aktivnošću kaspaza3 (3, 18).

U životinja, gliotoksikoza je najčešće posljedica ishrane biljnom hranom kontaminiranom gliotoksinogenim gljivičnim sojevima. U ljudi, poglavito imunodeficientnih bolesnika (npr. bolesnici

oboljeli od hematoloških malignih bolesti, bolesnici s presađenom koštanom srži ili solidnim organima), a inficiranih gliotoksinogenim gljivičnim sojevima (npr. vrste *Aspergillus fumigatus*), gliotoksin stvoren na mjestu infekcije može pridonijeti invazivnosti gljivice. Tako je u serumu bolesnika oboljelih od plućne aspergiloze dokazan gliotoksin (32). Slične nalaze o tvorbi gliotoksina *in situ* navode Shah *et al.* (33) koji su dokazali prisutnost gliotoksina (odnosno metabolita sličnih gliotoksinu) u sekretu rodnice žena s klinički manifestnim vaginitisom uzrokovanim gliotoksinogenim sojem kvasca *Candida albicans*. Danas se smatra da sposobnost lučenja gliotoksina, uz posjedovanje athezina, pigmenta, enzima (proteinaze, fosfolipaze, ribonukleaze, katalaze) i hemolizina, pridonosi virulentnosti i invazivnosti gljivičnih sojeva.

Stvaranje gliotoksina na mjestu gljivične infekcije može se spriječiti tvarima koje nemaju antimikotičko djelovanje što nameće zaključak da bi se istodobnom primjenom tih tvari i antimikotika postigao sinergistički učinak i povećala učinkovitost sprječavanja nastanka gljivičnih infekcija u ljudi i životinja (34).

LITERATURA

1. Pine SH, Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS. Organska kemija, Zagreb: Školska knjiga; 1984.
2. Chai CLL, Waring P. Redox sensitive epidithiodioxopi perazines in biological mechanisms of toxicity. Redox Report 2000;5:257-264.
3. Taylor A. The toxicology of sporidesmins and other epipolythiodioxopiperazines. U: Kadis S, Ciegler A, Ajl SJ, urednici. Microbial toxins, VII. volumen, New York (NY): Academic Press; 1971.
4. Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze, Zagreb: Školska knjiga; 1995.
5. Waring P, Eichner RD, Müllbacher A. The chemistry and biology of the immunomodulating agent gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. Med Res Rev 1988;8:499-524.
6. Waring P, Beaver J. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. Gen Pharmacol 1996; 27:1311-1316.
7. Raper KB, Thom C, Fennel DI. A Manual of the Penicillia, Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1949.
8. Johnson JR, Bruce WF, Dutcher JD. Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. Production, physical and biological properties. J Am Chem Soc 1943;65:2005-9.
9. Beecham AF, Fridrichsons J, Mathieson A. The structure and absolute configuration of gliotoxin and sporidesmin. Tetrahedron Lett 1966;120:3131-8.

10. Shah DT, Larsen B. Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance. *Mycopatholog* 1991;116:203-8.
11. Richard JL, DeBey MC, Chermette R, Pier AC, Hasegawa A, Lund A, Bratberg AM, Padhye AA, Connole MD. Advances in veterinary mycology. *J Med Vet Myco* 1994;32(Suppl 1):169-87.
12. Windholz M, urednik. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Rahway (NJ): Merck; 1983.
13. Muntañola-Cvetković M. Opšta mikologija: NIRO Književne novine Beograd; 1987.
14. Gedek BR. Health risks of mycotoxins for humans. *Mycoses* 1994;37(Suppl 1):43-9.
15. Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Env Health* 2000;3:109-43.
16. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:497-516.
17. Müllbacher A, Waring P, Eichner RD. Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity *in vitro*. *J Gen Microbiol* 1985;131:1251-58.
18. Kweon Y, Paik Y, Schnabl B, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells. *J Hepatolog* 2003;39:38-46.
19. Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun* 2004;72:3373-82.
20. Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- γ rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Env Tox* 2002;17:211-8.
21. Hurne AM, Chai CLL, Waring P. Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by reversible formation of an internal disulfide bond induced by the fungal toxin gliotoxin. *J Biol Chem* 2000;275:25202-6.
22. Lillie JW, O'Keefe M, Valinski H, Hamlin HA, Varban ML, Kaddurah-Daouk R. Cyclocreatine (1-carboxymethyl-2-iminoimidazolidine) inhibits growth of a broad spectrum of cancer cells derived from solid tumors. *Cancer Res* 1993;53:3172-8.
23. Bernardo PH, Chai CLL, Deeble GJ, Liu X.-M, Waring P. Evidence for gliotoxin-glutathione conjugate adducts. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:483-5.
24. Pahl HL, Kraub B, Schulze-Osthoff K. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J Exp Med* 1996;183:829-40.
25. Kroll M, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Thomas D, Friguet B, Conconi M. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem Biol* 1999;6:689-98.
26. Źmezawa K, Ariga A, Matsumoto N. Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF- κ B functions (Review). *Anti-Cancer Drug Res* 2000;15:239-44.
27. Waring P, Khan T, Sjaarda A. Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *J Biol Chem* 1997;272:17929-36.
28. Sutton P, Newcombe NR, Waring P, Mullbacher A. *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun* 1994;62:1192-98.
29. Sutton P, Beaver J, Waring P. Evidence that gliotoxin enhances lymphocyte activation and induces apoptosis by effects on cyclic AMP levels. *Biochem Pharmacol* 1995;50:2009-14.
30. Wenehed V, Solyakov A, Thylin I, Häggblom P, Forsby A. Cytotoxic response of *Aspergillus fumigatus*-produced mycotoxins on growth medium, maize and commercial animal feed substrates. *Food Chem Tox* 2003;41:395-403.
31. Waring P, Müllbacher A. The possible role of gliotoxin in health and disease. *Endeavour* 1992;16:14-6.
32. Lewis RE, Chi J, Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Han X, Prince RA. Detection of gliotoxin, an immunologically-active metabolite secreted by *Aspergillus fumigatus*, in animals and humans with invasive aspergillosis (IA) [abstract]. 43rd ICAAC; 14-17 Sep 2003; Chicago, USA; 2003. p. 1015.
33. Shah DT, Glover DD, Larsen B. *In situ* mycotoxin production by *Candida albicans* in women with vaginitis. *Gyn Obstet Invest* 1995;39:67-69.
34. Shah DT. Production of gliotoxin by *Candida albicans* and its effect on human polymorphonuclear leukocytes [dissertation]. West Virginia Uni.; 1993.

Summary

CHEMISTRY AND BIOLOGICAL EFFECTS OF GLIOTOXIN

Gliotoxin is a mycotoxin from the epipolythiodioxypiperazine family with biological active internal disulfide bridge. Gliotoxin has an antibacterial and antiviral activity, but it was discarded from clinical practice due to its toxicity. The most studied effect of gliotoxin is its influence on the cell of the immune system. Today, researches are focused on treating transplantation organs *ex situ* and making them *immunologically silent*. Its toxicity has been proven on several cells (macrophages, thymocytes, splenocytes, and fibroblasts) causing apoptosis and necrosis and it has acted as inhibitor of several enzymes (farnesyl-transferases, NF- κ B, and alcohol-dehydrogenases). Its mechanism of toxicity is connected with the production of mixed disulfide and covalent bonds, and oxidative effects. An important medical mould *Aspergillus fumigatus* and yeast *Candida albicans* can secrete gliotoxin in infected tissues and, because of the proven toxic effects of gliotoxin, it is suggested that gliotoxin can exacerbate mycoses (invasive aspergillosis or candidiasis). Gliotoxin can also affect the invasiveness of fungi and their dissemination from the primary site throughout the organism.

KEY WORDS: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, fungi, moulds, mycotoxin,

REQUESTS FOR REPRINTS:

mr.sc. Ivan Kosalec
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39/I, HR-10000 Zagreb
E-mail: ivan.kosalec@zg.htnet.hr