

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Marica Malenica

Citotoksičnost i genotoksičnost egzo- i
endometabolita vrsta *Aspergillus versicolor* i
Stachybotrys chartarum

Zagreb, 2011.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Šegvić Klarić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010/2011.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PLIJESNI U VLAŽNIM ZATVORENIM PROSTORIMA.....	1
1.2. PLIJESNI I ETIOLOGIJA SINDROMA BOLESNE ZGRADE (SBS).....	4
1.3. ZDRAVSTVENI ASPEKTI AEROGENE IZLOŽENOSTI VRSTI <i>ASPERGILLUS</i> <i>VERSICOLOR</i>	7
1.4. ZDRAVSTVENI ASPEKTI AEROGENE IZLOŽENOSTI VRSTI <i>STACHYBOTRYS</i> <i>CHARTARUM</i>	8
2. HIPOTEZA.....	10
3. MATERIJAL I METODE	12
3.1. KULTURA STANICA.....	12
3.2. PRIPREMA EKSTRAKATA VRSTA <i>A. VERSICOLOR</i> I <i>S. CHARTARUM</i>	12
3.3. MTT TEST	13
3.4. KOMET TEST.....	14
3.5. STATISTIČKA OBRADA.....	17
4. REZULTATI.....	19
4.1. CITOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKATA EGZO- I ENDOMETABOLITA VRSTA <i>A. VERSICOLOR</i> I <i>S. CHARTARUM</i>	19
4.2. GENOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKATA EGZO- I ENDOMETABOLITA VRSTA <i>A. VERSICOLOR</i> I <i>S. CHARTARUM</i>	23
5. RASPRAVA.....	32
6. ZAKLJUČCI.....	35
7. LITERATURA	36
8. SAŽETAK	42
9. SUMMARY	44

1. UVOD

1.1. PLIJESNI U VLAŽNIM ZATVORENIM PROSTORIMA

Plijesni su organizmi sa sposobnošću kolonizacije raznovrsnih tipova supstrata te ih, zbog njihove mogućnosti preživljavanja i u ekstremnim uvjetima okoliša, možemo pronaći gotovo posvuda. Zbog štetnih učinaka koje mogu imati na ljudsko zdravlje, posebno zanimljiva i proučavana staništa plijesni su ona na kojima ljudi lako i učestalo dolaze u kontakt s njima, a to su zatvoreni prostori - kuće, zgrade i drugi vlažni objekti.

Brojna istraživanja provedena u SAD-u i europskim zemljama (Nizozemskoj, Finskoj, Danskoj, Velikoj Britaniji) pokazala su da udio objekata koji sadrže plijesni iznosi čak do 40% (Šegvić Klarić i sur., 2007), što je, uzmemo li u obzir patogenost pojedinih vrsta, izrazito značajan podatak.

Hoće li se neka vrsta plijesni razviti na određenom staništu, zavisi prije svega o okolišnim čimbenicima, između ostalog i aktivitetu vode, a_w .

Tako se plijesni, s obzirom na vrijednost a_w pri kojoj se razvijaju, mogu podijeliti u 3 skupine:

- a) plijesni koje rastu pri $a_w < 0,8$ – primarni kolonizatori (prije svega vrste *Penicillium chrisogenum* te *Aspergillus versicolor*, a slijede ih vrste *A. fumigatus*, *A. niger*, *Eurotium* spp., *Wallemia sebi* te *Paecilomyces variotii*);
- b) plijesni koje rastu pri vrijednosti a_w između 0,8 i 0,9 – sekundarni kolonizatori (različite vrste rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* i *Ulocladium*);
- c) plijesni koje rastu pri $a_w > 0,9$ – tercijarni kolonizatori (*Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma* spp.) (Nielsen, 2003; Šegvić Klarić i sur., 2007).

Studijama je pokazano da su vlažni objekti domaćini prije svega vrstama plijesni iz rodova *Penicillium*, *Cladosporium* i *Ulocladium* te vrstama *Geomyces pannorum* i *Sistonema birkmanni*. Vrsta *Stachybotrys chartarum* nije toliko česta

u okolišu te uglavnom obitava na područjima naseljenima drugim gljivicama-
 Budući da spada u tercijarne kolonizatore, nalazimo je tek na određenim
 staništima, na kojima joj je dostupna veća količina slobodne vode. Ova vrsta
 plijesni je izolirana iz supstrata poput gipsa, izolacija za cijevi, aluminijske folije i
 sl. (Kuhn i Ghannoum, 2003). S druge strane, *Aspergillus* vrste pripadaju
 primarnim kolonizatorima, što znači da na vlažnim zidovima mogu rasti pri nižem
 aktivitetu vode, te su u našim predjelima mnogo češće. Analizom građevnih
 materijala (žbuka, drvo, gips i različiti sintetski materijali) iz vlažnih zatvorenih
 prostora utvrđena je dominantna kontaminacija vrstama roda *Aspergillus*,
 posebice *A. versicolor* (41%) (Šegvić Klarić i sur., 2007). U tablici 1 prikazane su
 vrste gljivica detektirane u prašini i zraku zatvorenih prostora.

Tablica 1. Gljivice pronađene u prašini i uzorcima zraka ispitanih objekata (Miller
 i sur., 1988)

VRSTA	UDIO (%) OBJEKATA U KOJIMA JE VRSTA NAĐENA U UZORCIMA:	
	A) PRAŠINE	B) ZRAKA
<i>Penicillium</i> spp.	80	47
<i>Rhizopus</i> spp.	73	8
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	67	X ^a
<i>Alternaria alternate</i>	57	6
<i>Aspergillus niger</i>	55	6
<i>Penicillium viridicatum</i>	39	X
<i>Mucor</i> spp.	31	6
<i>Trichoderma viride</i>	25	4
<i>Ulocladium botrytis</i>	22	14
<i>Penicillium fellutinum</i>	20	10
<i>Penicillium decumbens</i>	18	
<i>Cladosporium herbarum</i>	16	
<i>Paecilomyces variotii</i>	10	
<i>Phoma</i> spp.	10	
<i>Arthrinium</i> spp.	8	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	6	
<i>Monilia sitophila</i>	6	
<i>Paecilomyces</i> spp.	6	
<i>Periconia</i> spp.	6	

<i>Aspergillus candidus</i>	4	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	4	X
<i>Aspergillus spp.</i>	4	8
<i>Phialophora melinii</i>	4	
Kvasci	82	6
<i>Aspergillus versicolor</i>	X	X
Basidiomycetes	X	X
<i>Cladosporium sp.</i>	X	
<i>Curvularia inaequalis</i>	X	
<i>Geotrichum candidum</i>	X	X
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	X	
<i>Penicillium brevicompactum</i>	X	6
<i>Penicillium chrysogenum</i>	X	X
<i>Penicillium digitatum</i>	X	X
<i>Penicillium janthinellum</i>	X	8
<i>Penicillium lividum</i>	X	X
<i>Penicillium purpurogenum</i>	X	
<i>Penicillium rugulosum</i>	X	X
<i>Penicillium simplicissimum</i>	X	
<i>Stachybotrys chartarum</i>	X	
<i>Thamnidium elegans</i>	X	
<i>Torula herbarum</i>	X	
<i>Verticillium sp.</i>	X	

^a X, pronađeno u jednom jedinom objektu.

Plijesni koje obitavaju u zatvorenim prostorima preko niza svojih komponenti utječu na ljudsko zdravlje. Pri tom su posebno značajni njihovi proteini koji mogu prouzročiti alergije (Gravesen i sur., 1999), zatim β -1,3-glukani (Rylander 1997), mikrobne lako hlapljive komponente (Pasanen i sur. 1998) te mikotoksini i drugi sekundarni metaboliti (Pieckova i Jesenska 1999). Premda mnoge gljivice mogu proizvoditi toksine (Tablica 2), njihova produktivna sposobnost mijenja se ovisno o okolišnim čimbenicima poput pH, temperature, razine vlage i dostupnosti hranjivih tvari. Za vrstu *S. chartarum*, primjerice, idealni uvjet za produkciju toksina pri temperaturi od 25 °C je vlažnost od 93%, dok pri većem udjelu

hranjivih tvari u supstratu i pri nešto povišenoj temperaturi, vlažnost za optimalnu produkciju toksina može biti i manja.

Tablica 2. Toksinogene vrste plijesni izolirane iz zraka unutarnjih prostora kuća (Flannigan i sur., 1991)

VRSTA	PROIZVEDENI TOKSINI
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksini
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumiklavini, fumigatoksin, fumigilin, gliotoksin
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocistin, versikolorin, asperkolorin, averufin, ciklopiazonična kiselina
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Brevianamid A, mikofenolična kiselina
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Citrinin, penicilična kiselina, PR-toksin, rokveortin C
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinin, cireoviridin, kojična kiselina
<i>Penicillium corylophilum</i>	Gliotoksin
<i>Penicillium cyclopium</i>	Penicilična kiselina
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin, citrinin
<i>Penicillium fellutanum</i>	Citreoviridin, citrinin
<i>Penicillium spinulosum</i>	Spinulozin
<i>Penicillium viridicatum</i>	Brevianamid A, citrinin, mikofenolična kiselina, penicilična kiselina, viomelein, ksantomegnin
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Roridin E, satratoksin H, sporidezmin G, trihoverini, verukarol
<i>Trichoderma viride</i>	Gliotoksin, T-2 toksin, trihodermin, trihodermol, viridiol

1.2. PLIJESNI I ETIOLOGIJA SINDROMA BOLESNE ZGRADE (SBS)

Termin "sindrom bolesne zgrade" ("sick building syndrome" ili SBS) je stanje karakterizirano nizom nespecifičnih simptoma među populacijom određene zgrade, a povezano je s boravkom u objektima koji su građeni i održavani na neodgovarajući način. Ipak, smatra se da u etiologiji SBS-a važnu ulogu igraju i drugi čimbenici. Naime, simptomi SBS-a rezultat su interakcije niza okolišnih čimbenika (karakteristika zgrade, izloženosti polutantima) (Burge 2004), ali i onih psiholoških (stres na radnom mjestu, nezadovoljstvo poslom i dr.) te

nekih osobnih karakteristika, poput pripadnosti ženskom spolu i urođene sklonosti alergijama (Gomzi i Bobić, 2009). Također, u nastanku navedenog sindroma značajna je i organizacija rada/života u određenom objektu, pa je tako primijećeno da je učestalost SBS-a povećana u uredima u kojima na malom prostoru radi velik broj ljudi (Gomzi i Bobić, 2009). U tablici 3 navedeni su potencijalni etiološki čimbenici SBS-a, među kojima plijesni imaju važnu ulogu.

Tablica 3. Pregled čimbenika koji mogu utjecati na razvoj SBS-a (Gomzi i Bobić, 2009.)

KARAKTERISTIKE ZGRADE	OKOLIŠNI ČIMBENICI I POLUTANTI	KARAKTERISTIKE POJEDINCA
<ul style="list-style-type: none"> • prisutnost klimatizacijskih uređaja • brzina ventilacije manja od 10L/s/osobi • visoka temperatura unutar zgrade (viša od 23 °C u zgradama s klimom) • slaba individualna kontrola temperature i svjetla • neadekvatno čišćenje i održavanje zgrade • relativna vlažnost manja od 30% 	<ul style="list-style-type: none"> • hlapljive organske supstance (formaldehid, otapala i sl.) • prašina i vlakna: azbest, stakloplastika i prljavština • bioaerosoli: bakterije, plijesni, virusi, pelud, grinje, životinjski ekskreti • plinoviti produkti izgaranja (SO₂, NO₂, CO₂, O₃) • fizikalni faktori: svjetlo, temperatura, buka, vibracije, gužva u prostoru • dim cigareta • povećano korištenje kompjutera 	<ul style="list-style-type: none"> • ženski spol • sklonost alergijskim reakcijama • nezadovoljstvo poslom

Najčešći simptomi SBS-a su:

- iritacija sluznica respiratornog sustava te oka,
- kihanje, šmrcanje, kašalj,
- pojačani umor,
- glavobolja i vrtoglavica,
- suhoća grla i kože,
- upala sinusa,
- mučnina.

O SBS-u govorimo ako su navedeni simptomi jako izraženi i široko rasprostranjeni među populacijom neke zgrade, te ako nestaju ili se značajno smanjuju kada ljudi napuste "bolesni" objekt.

Etiologija sindroma bolesne zgrade (pa tako i uloga plijesni u nastanku istog) još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Tako se već duže vremena smatra da postoji korelacija između izloženosti pljesnivom okolišu (bilo u vlastitom domu ili na radnom mjestu) te neželjenih zdravstvenih učinaka. Međutim uloga plijesni u razvoju SBS-a još je uvijek nerazjašnjena. Uspostavljanje uzročne veze između navedenih simptoma i vlažnih, pljesnivih objekata je složeno, budući da se u takvim prostorima nalazi čitav niz komponenti - od plinovitih produkata izgaranja (SO_2 , NO_2 , CO_2 , O_3) (Samet i sur., 1998) pa sve do hlapljivih organskih supstancija poput široko rasprostranjenog formaldehida. Osim navedenoga, zatvoreni prostori sadržavaju i širok spektar mikroorganizama i njihovih metabolita u koji spadaju i plijesni i njihovi toksini te različite bakterijske vrste (npr. *Legionella* i druge Gram negativne vrste te mikobakterije) (Pitten i sur., 2000).

Poznato je da stanovnici pljesnivih zgrada mogu imati zdravstvenih problema zbog inhalacije komponenata plijesni (živih ili mrtvih konidija i fragmenata micelija), koji se očituju najčešće u vidu iritacija, konjuktivitisa i problema respiratornog trakta, a ponekad i astme. Osim toga, sekundarni toksični metaboliti (satratoksini, aflatoksini, ohratoksin A i sterigmatocistin), koje proizvode *Aspergillus*, *Penicillium* i *Stachybotrys* vrste, a koji se mogu nalaziti i u udahnutim konidijama, zasigurno negativno utječu na zdravlje. Tome u prilog govori nekoliko studija provedenih u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Pieckova i sur., 2004; Schulz i sur., 2004; Šegvić Klarić i sur., 2007).

Osim toga, vlaga, koja potiče razvoj plijesni, također utječe na razinu ozona i grinja u prostoru, pa je teško razlučiti koji od navedenih čimbenika ima glavni utjecaj na razvoj SBS-a. Grinje su poznati uzročnici alergija te dovode do problema u gornjem dijelu respiratornog sustava koji su karakteristični i za SBS (Kuhn i Ghannoum, 2003). Stoga se nameće pitanje koliki značaj u etiologiji ove bolesti imaju same grinje, a koliki plijesni, koje često nalazimo s njima u

kombinaciji. Također, u vlažnim prostorima se zajedno s plijesnima mogu naći još i Gram negativne bakterije i mikobakterije, koje se također smatraju potencijalnim uzročnicima opisanih simptoma.

1.3. ZDRAVSTVENI ASPEKTI AEROGENE IZLOŽENOSTI VRSTI *Aspergillus versicolor*

Jedna od glavnih vrsta gljivica koje zimi možemo pronaći u zatvorenim prostorima, posebice u područjima vlažne i hladnije klime, je *A. versicolor*. Ova se plijesan često može izolirati iz zraka vlagom oštećenih objekata te se povezuje s negativnim učincima na ljudsko zdravlje, prije svega različitim alergijama (Jussila i sur., 2002; Benndorf i sur., 2007). Smatra se da su upravo spore ove vrste, tj. njihovi alergeni, ti koji su najodgovorniji za reakcije preosjetljivosti, budući da je količina spora koje se inhalacijom unose u organizam znatno veća od količina proteina micelija koji udisanjem dopijevaju u organizam. Jednom kada su inhalirani, proteini spora ali i micelija mogu prouzročiti različite poremećaje respiratornog sustava. Također, štetan učinak vrste *A. versicolor* na respiratorni sustav može biti posljedica djelovanja njezinih metabolita, odnosno mikotoksina (Benndorf i sur., 2007).

Ova vrsta proizvodi nekoliko mikotoksina kao i hlapljivih organskih supstancija (alkohola, ketona, furana), koje može otpustiti u svoju okolinu te ih čovjek unosi u organizam preko respiratornog sustava. Točan učinak njihove inhalacije još uvijek nije razjašnjen. Ipak, dokazano je da sterigmatocistin, ali i kloroformski ekstrakti egzometabolita spomenute plijesni, imaju ciliostatski učinak na trahealne stanice purana, što samo dijelom može objasniti utjecaj *A. versicolor* na nastanak respiratornih bolesti (Pieckova i Wilkins, 2004).

Osim sterigmatocistina, ova vrsta proizvodi i druge toksine - versikolorin, asperkolorin, averufin i ciklopiazoničnu kiselinu. Sterigmatocistin je biosintetski prekursor aflatoksina i potencijalni je kancerogen za ljude, dok je za životinje dokazano kancerogen – kod miševa uzrokuje pojavu adenokarcinoma (Engelhart

i sur., 2002). Njegovo kancerogeno djelovanje nastupa nakon biotransformacije u jetri pri čemu dolazi do epoksidacije furofuranskog prstena koji sadrži, a nastali epoksid je potencijalni kancerogen jer se veže na guaninske ostatke u molekuli DNA (Moss, 2002).

Nadalje, sterigmatocistin se smatra potentnim mutagenom i teratogenom (Rakkestad, 2010).

Nedavno je dokazano da i verzikolorin A i B dovode do oštećenja DNA te je moguće da bi i oni mogli imati učinak u karcinogenezi plućnih stanica (Jakšić i sur., 2009).

1.4. ZDRAVSTVENI ASPEKTI AEROGENE IZLOŽENOSTI VRSTI *Stachybotrys chartarum*

Mnoge vrste roda *Stachybotrys* proizvode toksine koji su odgovorni za niz patoloških stanja kod ljudi i životinja. Vrsta *S. chartarum* proizvodi 5 poznatih toksina - roridin E, satratoksin H, sporidezmin G, trihoverin i verukarol, koji mogu prouzrokovati respiratorne probleme, a povezuje ih se i s imunološkim, hematološkim, i neurološkim smetnjama (Kuhn i Ghannoum, 2003; Rakkestad, 2010).

Posljednjih godina posebna pozornost se počela pridavati opasnosti od respiratornih bolesti koje vrsta *S. chartarum* može uzrokovati. Zanimanje je potaknulo nekoliko slučajeva u kojima se pokazalo da bi ova plijesan mogla imati ulogu u razvoju plućnih bolesti. Jedan od takvih slučajeva je bio razvoj akutnih simptoma gornjih respiratornih putova kod radnika koji su bili u kontaktu s konjima zaraženima ovom vrstom plijesni (Ožegović i sur, 1971). Dodatni interes izazvan je saznanjima da je vrsta *S. chartarum*, a u nekim slučajevima i njezini mikotoksini, izolirani iz građevinskih materijala zgrada u kojima su postojali značajni problemi s vlagom, a tegobe stanara tih zgrada su se mogle povezati sa sindromom bolesne zgrade (Sudakin, 1998). Poznat je i slučaj četverogodišnjaka koji je putem zraka došao u kontakt sa sporama ove vrste

raspršenima u pljesnivom tepihu, što je prouzrokovalo napadaje astme (Pieckova i Jesenska, 1999).

Također, postojala je sumnja da bi vrsta *S. chartarum* mogla biti povezana sa slučajevima idiopatske pulmonalne hemoragije, poglavito onima koji su u razdoblju od 1993. do 1997. zabilježeni u Clevelandu. Naime, istraživanja tih slučajeva isključila su majčinu upotrebu kokaina i pesticide kao mogući uzrok, a istovremeno su pokazala su da je oboljela novorođenčad živjela u kućama gdje je utvrđena znatna koncentracija spora ove vrste plijesni. Budući da se još iz prijašnjih istraživanja znalo da vrsta *S. chartarum* može prouzrokovati hemoragiju kod životinja, postojala je opravdana sumnja da bi to i ovdje mogao biti slučaj. Ipak, zbog nedostatka jasnih dokaza, kao i činjenice da su uzorci iz navedenih kuća skupljani tjednima i mjesecima nakon potencijalnog izlaganja djece vrsti *S. chartarum*, takvo što nikada nije potvrđeno (Kuhn i Ghannoum, 2003; CDC, 1999; CDC, 2000).

Aerogena izloženost vrsti *S. chartarum* se u nekoliko navrata povezivala s neurološkim smetnjama, ali objektivni dokazi za takve učinke, bilo kod ljudi bilo kod životinja, nikada nisu nađeni.

Imunotoksično djelovanje vrste *S. chartaruma* pri aerogenoj izloženosti također je slabo razjašnjeno. Učinak trihotecena *Stachybotrys* vrsta je dobro proučena, ali su u ispitivanjima uglavnom korišteni različiti neinhalacijski načini primjere toksina, te stoga ne postoji izravna povezanost aerogene izloženosti i imunokompromitirajućeg učinka (Bondy i Pestka, 2000).

2. HIPOTEZA

Danas su astma i razne kronične infekcije dišnog sustava ljudi u stalnom porastu. Na njihov razvoj može utjecati niz čimbenika, a jedan od njih su i plijesni. Poznato je da oni mogu antigenima svojih spora i micelija prouzročiti različite reakcije preosjetljivosti. Osim toga, istraživanja pokazuju da se aerogena izloženost njihovim metabolitima može dovesti u vezu s razvojem različitih iritacija i bolesti dišnog sustava. Utjecaj plijesni i njihovih toksina na zdravlje značajan je problem i medicine rada, budući da se plijesni često povezuje sa sindromom bolesne zgrade, tj. bolestima povezanima s radom u vlažnim, neadekvatno održavanim prostorima.

Vrsta *A. versicolor* pri tom je posebno značajna, budući da je u našim predjelima u većem broju zastupljena u zraku zatvorenih prostora, bilo poslovnih objekata, bilo domaćinstava. Ova vrsta plijesni može proizvoditi toksične metabolite, primjerice sterigmatocistin i verzikolorine, za koje je dokazano toksično djelovanje, a koji se mogu naći u aerogenim sporama te u građevinskom materijalu na kojem je plijesan rasla (Engelhart, 2002). Pri većem sadržaju slobodne vode zidove tj. žbuku u unutaršnjim prostorima može kolonizirati vrsta *S. chartarum* koja također na takvom supstratu može proizvoditi različite toksine (Pieckova i Jesenska, 1999; Pieckova i sur., 2006).

Mehanizam toksičnog djelovanja navedenih vrsta plijesni u stanicama dišnog sustava još uvijek nije razjašnjen, a njihove moguće interakcije pri istodobnoj izloženosti potpuno su nepoznate. Stoga je hipoteza ovog rada da egzo- i endometaboliti vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* toksično djeluju na plućne epitelne stanice te da primijenjeni u kombinaciji imaju potencirajuće toksično djelovanje.

Kao eksperimentalni model korištena je kultura stanica humanog adenokarcinoma pluća A549 jer ove stanice zadržavaju morfološke i biokemijske karakteristike normalnih alveolarnih epitelnih stanica tipa 2 (AII). Osim toga, A549 stanice sadrže različite enzime poput citokrom P₄₅₀ sustava, lipooksigenaze, prostaglandin-H-sintaze, epoksid hidrolaze i druge

bioaktivacijske enzime, te detoksifikacijski enzimski sustav, poput glutation-S-transferaze (GST), što ih čini pogodnim modelom za istraživanje toksičnih učinaka različitih toksina iz okoliša.

Specifični ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti vijabilnost A549 stanica MTT testom nakon 24-satnog izlaganja rastućim koncentracijama ekstrakata egzo- i endometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*, pojedinačno i u kombinaciji.
2. Ispitati genotoksičnost navedenih ekstrakata na istom eksperimentalnom modelu primjenom alkalnog komet testa koji detektira jednolančane lomove DNA.
3. Procijeniti da li kombinacije ekstrakata egzo- i endometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* djeluju aditivno, sinergistički ili antagonistički na vijabilnost A549 stanica i razinu oštećenja DNA.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. KULTURA STANICA

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

3.2. PRIPREMA EKSTRAKATA VRSTA *A. versicolor* I *S. chartarum*

Ekstrakti navedenih vrsta plijesni dobiveni su ljubaznošću prof. dr. sc. Elene Pieckova (Medicinski fakultet, Bratislava), a priređeni su na sljedeći način:
1) Plijesni iz kojih su ekstrakti dobiveni uzgajane su 10 dana na 25 °C, u tekućem mediju koji sadrži 2% ekstrakta kvasca i 10% saharoze. Iz tako postavljenih biosinteza dobivena su 2 tipa kloroformskih ekstrakata.

2) Kloroformski ekstrakti medija u kojem su plijesni kultivirane (egzometaboliti): Nakon filtracije biomase, medij je ekstrahiran dva puta te su potom ekstrakti udruženi i sušeni bezvodnim Na₂SO₄ te upareni do suhog ostatka.

3) Kloroformski ekstrakti biomase plijesni (endometaboliti): Supstancije zaostale na filtru nakon filtracije biomase se 2 puta po 10 minuta ekstrahiraju u miješalici, te se potom suhi ekstrakti dobivaju na isti način kao i pod 2). (Pieckova i Wilkins, 2004).

4) Ekstrakti egzo- i endometabolita su izvagani i otopljeni u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentraciji: ekstrakt egzometabolita vrste *A. versicolor* 19 mg/mL i ekstrakt endometabolita 10 mg/mL; ekstrakt egzometabolita vrste *S. chartarum* 7 mg/mL i endometabolita 27 mg/mL. Iz matičnih otopina su neposredno prije izvođenja pokusa priređene radne otopine ekstrakata razrjeđivanjem sa RPMI medijem. Stanice su 24 sata tretirane sljedećim koncentracijama ekstrakata egzo- i endometabolita vrsta *A. versicolor* (AV) i *S. chartarum* (ST): 5, 10, 20, 40 i 80 µg/mL te kombinacijama AV+ST; 20+20, 10+40 i 40+10 µg/mL.

3.3. MTT TEST

Ispitivanje potencijalnih citotoksičnih učinaka vanjskih čimbenika na stanice može se provesti u staničnoj kulturi u uvjetima *in vitro*, i to upotrebom MTT reagensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid). Ovaj postupak temelji se na sposobnosti živih stanica da primarnu tamnožutu boju tetrazolijevih soli reduciraju u plavo do ljubičasto obojeni formazan. Redukciju navedenog spoja mogu vršiti samo žive stanice, budući da jedino one sadrže specifični mitohondrijski enzim sukcinat-dehidrogenazu, odgovaran za spomenutu reakciju redukcije. S obzirom da je stanična membrana živih stanica nepropusna je za kristale formazana, oni se, jednom kada nastanu, nakupljaju unutar stanica. Formazan se može osloboditi iz stanica uz primjenu kiselog izopropanola, te potom dolazi do otapanja oslobođenih kristala u mediju. Intenzitet boje nastao oslobađanjem kristala formazana iz živih stanica u okolinu može se kvantitativno mjeriti pomoću ELISA čitača, i to na valnoj duljini 595 nm. MTT postupka temelji se na principu da je broj preživjelih stanica nakon inkubacije stanične kulture sa citotoksičnom tvari i nakon bojanja MTT reagensom, proporcionalan sadržaju obojenog formazana, koji možemo odrediti spektrofotometrijski. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole.

Za izvođenje MTT testa korištene su sljedeće kemikalije:

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

POSTUPAK:

1. Uzgoj kulture stanica A549 do eksponencijalne faze rasta (24-satna inkubacija pri 37° C, 95% vlažnosti i 5% CO₂).
2. Razrjeđivanje stanica RPMI 1640 hranjivim medijem (Imunološki zavod, Zagreb) do gustoće od 10⁵ stanica/mL.
3. Aplikacija 100 µL suspenzije stanica u određeni broj jažica mikrotitarske pločice sa 96 jažica, inkubacija 24 h.
4. Promjena medija i inkubacija u mediju bez seruma 18 h.
5. Stanicama dodajemo priređene radne otopine ekstrakata i otapalo (1% DMSO) kao kontrolu, inkubacija 24 h.
6. Pažljivo uklonimo medij i dodamo u svaku jažicu po 100 µL MTT-a razrijeđenog hranjivim medijem do koncentracije 0,5 mg MTT/ mL medija, inkubiramo 3,5 sata pri temperaturi 37° C, 95% vlažnosti, 5% CO₂.
7. Pažljivo uklonimo medij odsisavanjem s vakuum sisaljkom.
8. U svaku jažicu doda se po 200 µL DMSO i ostavi 15 minuta na tresilici kako bi nastali formazan prešao iz stanice u medij.
9. Pomoću čitača mikrotitarske pločice (VICTOR³ 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer) odčitamo apsorbanciju pri 595 nm.

3.4. KOMET TEST

Komet-test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu djelotvorna je tehnika za brzo otkrivanje oštećenja i popravka u molekuli DNA. Analiza se može provesti na različitim vrstama stanica koje imaju jezgru,

primjerice krvnim stanicama, epitelnim stanicama, spermijima i dr. (Kopjar i sur. 2010). U ovom jednostavnom testu stanice se uklapaju u mikrogel agaroze. S pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamino-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta liziraju se citoplazma i membranske strukture u stanici te se oslobađa ukupna DNA. Ona se zatim denaturira u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava elektroforezi tijekom koje mali odsječci (fragmenti) DNA nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima putuju kroz pore gela prema anodi, dok glavina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost. Kraći fragmenti putuju brže kroz gel pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. DNA i tragovi putovanja njezinih fragmenata nakon bojenja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao "kometi" (Slika 1). Za njihovu analizu i mjerenje najčešće se rabi epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike. Mjeri se najmanje najčešće 100 kometa na kojima se utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa kometa (*engl. tail lenght*), intenzitet repa (*engl. tail intensity*) i repni moment (*engl. tail moment*). Dužina repa kometa jest najveća udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA. Obično se mjeri od sredine glave kometa ili od ruba glave i izražava u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se definira kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu, a izračunava ga računalni program s pomoću različitih formula (Albertini i sur. 2000). Osnovna i najviše primjenjivana je izvedba komet- testa u alkalnim uvjetima koja omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova i mjesta osjetljivih na lužine (apurinska i apirimidinska mjesta nastala kao posljedica oštećenja molekule DNA), praćenje popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica.

Izođenje komet testa sastoji se od nekoliko koraka.

Priprema uzorka za elektroforezu (stanice)

1. Predmetna stakalca pripremaju se za izvođenje pokusa uranjanjem u koncentrirani etanol (30 min), a potom u eter kroz pola sata. Tako odmašćena i suha stakalca uranjaju se u svježe pripremljenu otopinu vruće 1%-tne NMP agaroze. Stakalca se ostave 24 h na sobnoj temperaturi kako bi agarozna polimerizirala i adsorbirala na stakalca.
2. Stanicama uklonimo medij i ispirimo s PBS-om.
3. Stanicama dodamo 200 uL tripsina, kako bi doslo do odlijepljivanja stanica od podloge.
4. Otopiti 0,5% LMP agarozu.
5. Pomiješa se 20 μ L (zbog rada u duplikatu za svaki uzorak) suspenzije stanica i 100 μ L LMP agaroze.
6. Na pripremljena stakalca nanosi se 100 μ L smjese, pokrije pokrovnim stakalcem i ostavi da se polimerizira 10 min na ledu.

Liza staničnih struktura

Nakon uklanjanja pokrovnice, preparati se drže u puferu za lizu napravljenom neposredno prije upotrebe, najmanje 1h do 5 dana (24 h najčešće) na +4°C, zaštićene od svjetla (zbog osjetljivosti tehnike) u uspravnom košiću.

Denaturacija

Preparati se prebace u svježe napravljeni hladni pufer za denaturaciju, na 20 minuta, zaštićen od svjetla, na +4°C u uspravnom košiću.

Elektroforeza

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

Neutralizacija

Nakon elektroforeze, preparati se ispiru tri puta po 5 minuta u Tris-u pH 7,4 (kapalicom, ostaviti, odliti, pa opet nanijeti). Stakalca staviti u vlažnu komoru

(posudica s poklopcem i mokrom staničevinom na dnu) u mrak do bojanja na +4°C.

Bojenje preparata

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

Mikroskopska analiza

Analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom od 515-560 nm. Mjerenja dužine repa, repnog intenziteta i repnog momenta provedena su pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*, proizvođača *Perceptive Instruments Ltd*. Za svaki uzorak izmjereno je 150 kometa. Dužina repa mjerena je od središta jezgre, a izmjerene vrijednosti izražene su u mikrometrima. Repni moment izračunat je primjenom računalnog programa za analizu slike.

3.5. STATISTIČKA OBRADA

Vijabilnost A549 stanica (%) prikazana je kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD), odnosno standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM), a rezultati dobiveni komet testom (dužina repa, intenzitet repa i repni moment) prikazani su kao srednje vrijednosti sa SD i SEM, medijani s 25 percentilom i 75 percentilom te njihove minimalne i maksimalne vrijednosti.

Za testiranje normalnosti distribucije primijenjen je Kolmogorov-Smirnov test. Da bi se postigla normalizacija distribucije rezultati mjerenja su logaritmirani po bazi 10 nakon čega je statistička značajnost razlike između kontrolnih i tretiranih stanica testirana jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukey

post testom multiple komparacije. Nivo značajnosti $P < 0,05$ je uzet kao statistički značajna razlika.

Odnos očekivanih i izmjerenih srednjih vrijednosti i njihovih SEM za kombinacije ekstrakata egzo- i endometabolita plijesni (AV+ST) testiran je t-testom za nezavisne uzorke kako bi se utvrdilo djeluju li kombinacije ekstrakata aditivno, sinergistički ili antagonistički u pojedinom ispitivanom mehanizmu. Izračunavanje očekivanih srednjih vrijednosti za kombinacije mikotoksina prikazano je na primjeru kombinacije ekstrakata egzometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* testiranih MTT testom.

$$\bar{X}_{\text{(očekivana za AV+ST)}} = \bar{X}_{\text{(izmjerena za AV)}} + \bar{X}_{\text{(izmjerena za ST)}} - \bar{X}_{\text{(kontrola)}}$$

$$\text{SEM}_{\text{(očekivana za AV+ST)}} = [(\text{SEM}_{\text{(AV)}})^2 + (\text{SEM}_{\text{(ST)}})^2]^{1/2}$$

Rezultati su interpretirani na sljedeći način:

$$\bar{X}_{\text{(izmjerena)}} \geq \text{ili} \leq \bar{X}_{\text{(očekivana)}} \quad P > 0.05; \text{ ADITIVAN UČINAK}$$

$$\bar{X}_{\text{(izmjerena)}} < \bar{X}_{\text{(očekivana)}} \quad P < 0.05; \text{ SINERGIZAM}$$

$$\bar{X}_{\text{(izmjerena)}} > \bar{X}_{\text{(očekivana)}} \quad P < 0.05; \text{ ANTAGONIZAM}$$

4. REZULTATI

4.1. CITOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKATA EGZO- I ENDOMETABOLITA VRSTA *A. versicolor* I *S. chartarum*

Za određivanje vijabilnosti A549 stanica nakon 24-satnog izlaganja različitim koncentracijama ekstrakta egzo- i endometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* (od 5 do 80 µg/mL) primijenjen je MTT test. Grafovima 1a i 1b prikazana je vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu (1% DMSO), a grafovima 2a i 2b interakcije ekstrakata metabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*.

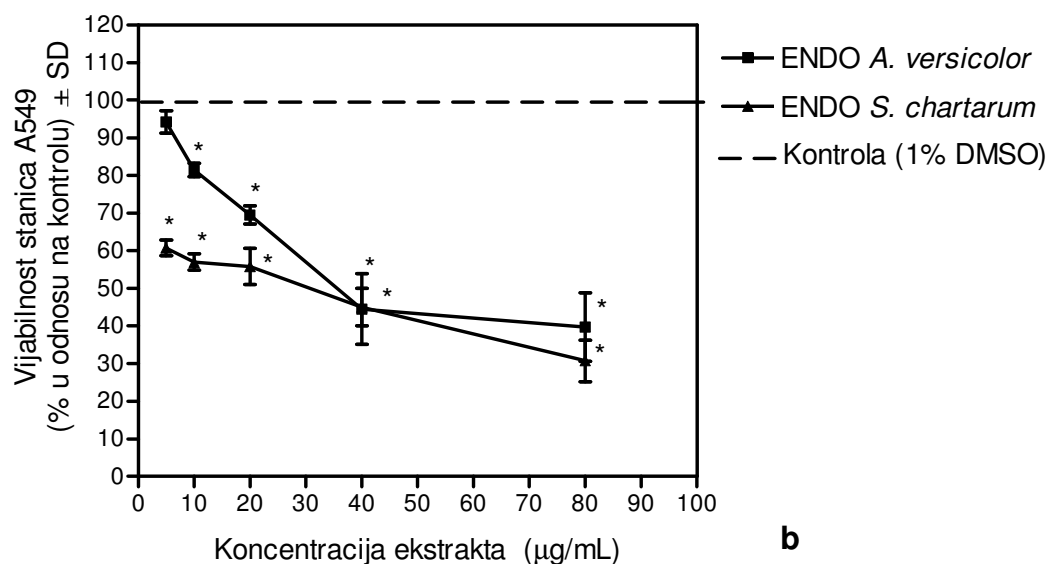
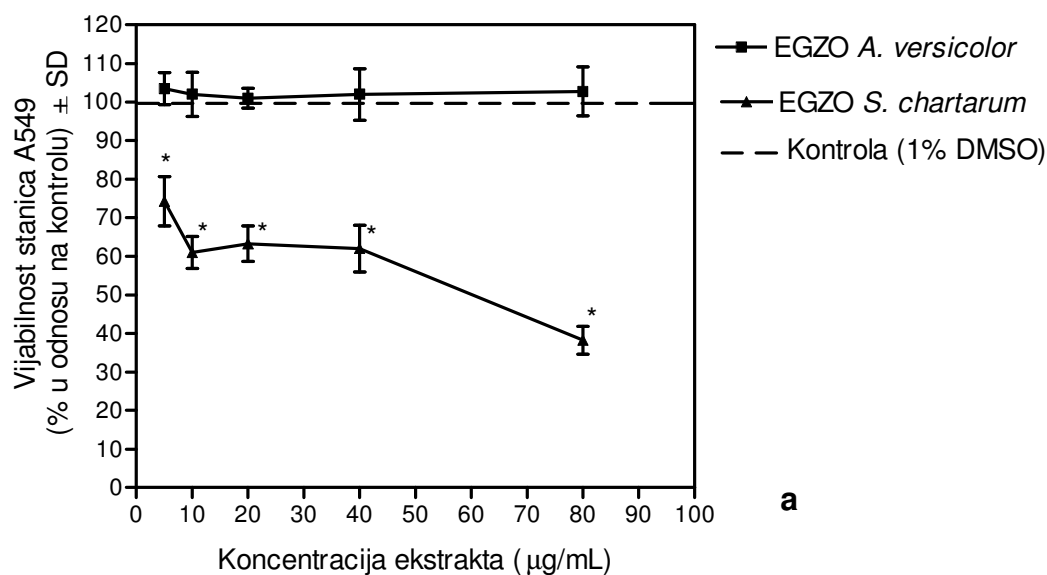
Ekstrakt egzometabolita vrste *A. versicolor* u koncentracijama od 5 do 80 µg/mL djelovao je blago proliferativno na A549 stanice (101-103%), ali bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. S druge strane, ekstrakt egzometabolita vrste *S. chartarum* već u najmanjoj koncentraciji (5 µg/mL) smanjuje vijabilnost stanica za 26% ($P < 0,05$). Tretiranje stanica s otopinama ekstrakta u koncentraciji 10 do 40 µg/mL smanjuje vijabilnost za oko 40% dok najveća koncentracija (80 µg/mL) uzrokuje pad vijabilnosti za 62% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).

Ekstrakti endometabolita obje vrste plijesni pokazuju veći toksični učinak na A549 stanice, pri čemu se očituje linearno smanjenje vijabilnosti stanica ovisno o koncentraciji. Ekstrakt endometabolita vrste *A. versicolor* u koncentraciji 10 µg/mL smanjuju vijabilnost za 19% ($P < 0,05$), a u najvećoj koncentraciji vijabilnost se smanjuje za 60% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Endometaboliti vrste *S. chartarum* pokazuju veću citotoksičnost. Najmanja koncentracija ekstrakta uzrokuje pad vijabilnosti za 40%, a najveća smanjuje vijabilnost za 70% ($P < 0,05$).

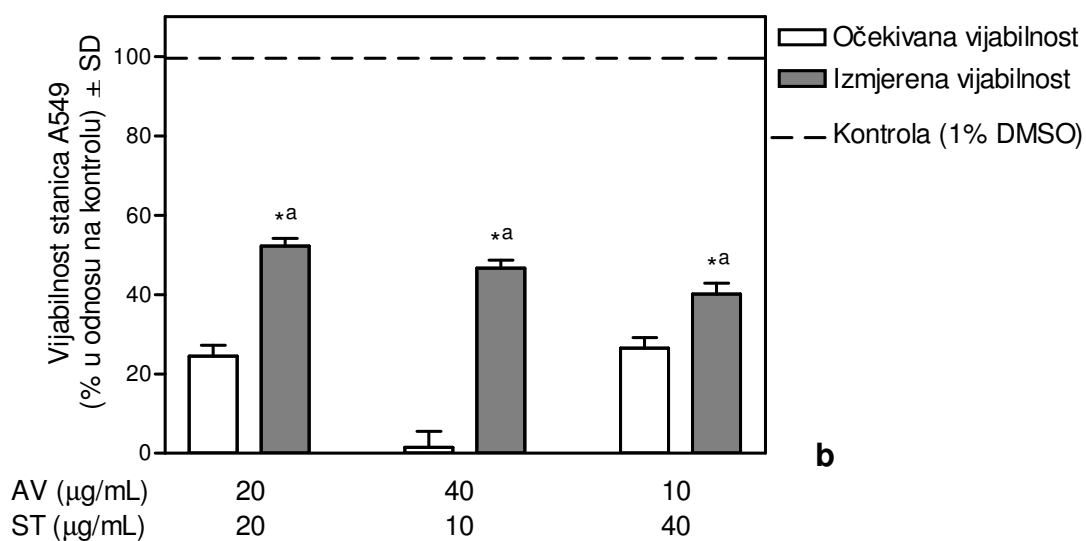
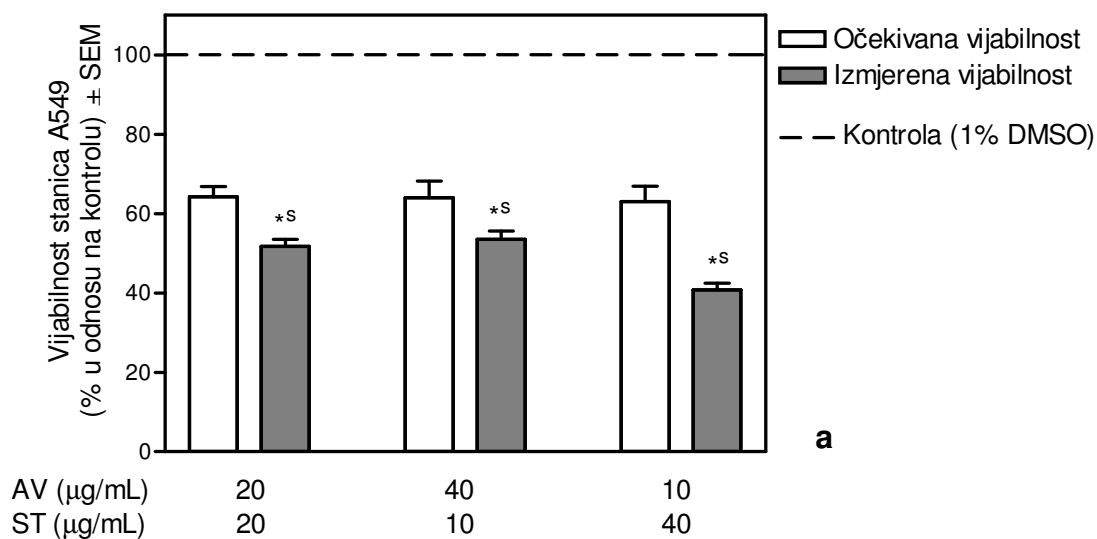
Kako bi se ispitale citotoksične interakcije ekstrakata egzometabolita (graf 2a) vrsta *A. versicolor* (AV) i *S. chartarum* (ST), kao i ekstrakata njihovih endometabolita (graf 2b), A549 stanice su 24 sata tretirane s kombinacijama koncentracija 10, 20 i 40 µg/mL (AV+ST 20+20, 40+10 i 10+40). Kombinacije ekstrakata egzometabolita AV+ST 20+20 i 40+10 smanjuju vijabilnost za oko 50% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), dok kombinacija AV+ST 10+40 pokazuje

nešto veću citotoksičnost te uzrokuje pad vijabilnosti za 60% ($P < 0,05$). Ekstrakti endometabolita plijesni primijenjeni u istim kombinacijama kao i ekstrakti egzometabolita pokazali su sličan citotoksični potencijal, tj. uzrokovali su pad vijabilnosti za 50 i 60% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).

Ispitivane kombinacije koncentracija ekstrakata egzometabolita imale su sinergistički citotoksični učinak. Iste kombinacije koncentracija ekstrakata endometabolita pokazale su antagonizam jer su izmjerene vijabilnosti bile statistički značajno veće od očekivanih vrijednosti za primijenjene kombinacije.



Graf 1. Vijabilnost A549 stanica nakon 24-satnog tretmana s rastućim koncentracijama (od 5 do 80 µg/mL) ekstrakata egzometabolita (a) i endometabolita (b) vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*. *P<0,05 statistička značajnost u odnosu na kontrolu



Graf 2. Vijabilnost A549 stanica nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama ekstrakata egzometabolita (a) i endometabolita (b) vrsta *A. versicolor* (AV) i *S. chartaru* (ST). * $P < 0,05$ statistička značajnost u odnosu na kontrolu; ^sSinergizam: očekivana vijabilnost vs izmjerena vijabilnost ($P < 0,05$); ^aAntagonizam: očekivana vijabilnost vs izmjerena vijabilnost ($P < 0,05$)

4.2. GENOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKATA EGZO- I ENDOMETABOLITA VRSTA *A. versicolor* I *S. chartarum*

Za ispitivanje genotoksičnog djelovanja ekstrakata na A549 stanice nakon 24-satnog izlaganja različitim koncentracijama ekstrakta egzo- i endometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* (10, 20 i 40 µg/mL) i njihovim kombinacijama primijenjen je komet-test. Tablicama 4, 5 i 6 prikazan je učinak spomenutih ekstrakata promatran s obzirom na vrijednosti triju parametra – duljine repa (Tablica 4) , intenziteta repa (Tablica 5) te parametra koji prethodna 2 uzima u odnos – repnog momenta (Tablica 6).

Tretiranje stanica egzometabolitima obaju vrsta, kao i njihovim kombinacijama (4a), dovodi do statistički značajnog porasta duljine repa u odnosu na kontrolu ($P < 0.05$). Pri tom egzometaboliti vrste *A. versicolor* uzrokuju maksimalan porast repnog momenta u odnosu na kontrolu ($P < 0.05$) pri koncentraciji od 20 µg/mL, dok egzometaboliti vrste *S. chartaruma* djeluju nešto jače i u prosjeku uzrokuju veći porast duljine repa, s tim da je maksimalna vrijednost (15,95 µm) postignuta pri koncentraciji 10 µg/mL. I njihove kombinacije dovode do porasta duljine repa, pri čemu je najjači učinak u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) zabilježen u kombinaciji u kojoj su ekstrakti obaju vrsta primijenjeni u koncentracijama od 20 µg/mL.

Ekstrakti endometabolita također dovode do statistički značajnog porasta ($P < 0.05$) vrijednosti duljine repa (4b), koji je približno jednak za endometabolite obaju vrsta. Međutim, njihove kombinacije dovode do većeg porasta vrijednosti duljine repa nego što je to bio slučaj s egzometabolitima. Najjači učinak na vrijednosti repnog momenta imala je kombinacija endometabolita AV+ST 10+40, za koju je vrijednost duljine repa bila 23% veća nego za kontrolu.

Tablica 4. Duljine repa (μm) dobivene komet-testom na A549 stanicama nakon

a) tretiranja egzometabolitima vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* ;

b) tretiranja endometabolitima vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*.

	Kontrola	EGZO AV 10	EGZO AV 20	EGZO AV 40	EGZO ST 10	EGZO ST 20	EGZO ST 40	EGZO AV+ST 10+40	EGZO AV+ST 20+20	EGZO AV+ST 40+10
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	14,12	14,85*	15,05*	14,76*	15,95*	15,79*	15,80*	14,86*	16,01*	15,03*
SD	1,404	1,829	1,514	2,022	2,138	3,459	2,112	1,712	4,199	1,589
SEM	0,115	0,149	0,124	0,165	0,175	0,282	0,173	0,140	0,343	0,130
M	14,10	14,74	14,74	14,74	15,38	14,74	15,38	14,74	15,38	14,74
25%-P	13,46	13,46	14,10	13,46	14,74	14,10	14,10	14,10	14,10	14,10
75%-P	14,74	15,38	16,03	16,03	16,67	16,03	16,67	15,38	16,03	16,03
Min	10,26	11,54	12,82	10,26	10,90	12,18	11,54	11,54	12,82	11,54
Max	18,59	27,56	19,87	25,00	26,28	32,05	27,56	25,00	48,72	21,79

a)

	Kontrola	ENDO AV 10	ENDO AV 20	ENDO AV 40	ENDO ST 10	ENDO ST 20	ENDO ST 40	ENDO AV+ST 10+40	ENDO AV+ST 20+20	ENDO AV+ST 40+10
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	14,12	15,33*	14,91*	14,92*	14,31*	15,19*	14,46*	17,38*	16,65*	16,28*
SD	1,40	1,90	2,66	1,731	2,007	1,868	1,994	5,275	4,691	3,112
SEM	0,115	0,155	0,217	0,141	0,164	0,153	0,163	0,431	0,383	0,254
M	14,10	15,38	14,74	14,74	14,10	14,74	14,10	16,03	15,38	15,38
25%-P	13,46	14,10	13,46	14,10	12,82	14,10	12,82	14,74	14,10	14,74
75%-P	14,74	16,67	16,03	15,38	15,38	16,03	15,38	17,95	17,31	17,31
Min	10,26	12,18	10,26	11,54	10,26	10,90	10,26	12,18	10,90	12,18
Max	18,59	23,08	36,54	22,44	26,28	21,79	23,08	49,36	56,41	41,02

b)

*pokusne skupine u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$); \bar{x} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; SEM - standardna pogreška aritmetičke sredine; M – medijan; 25%-P - 25. percentil; 75%-P - 75. percentil; Min – minimum; Max – maksimum

Učinak egzo- i endometabolita obaju vrsta na vrijednosti repnog intenziteta prikazan je u tablicama 5a i 5b. Primjećuje se pritom da ekstrakti egzometabolita obje vrste plijesni u svim primijenjenim koncentracijama uzrokuju statistički značajan ($P < 0.05$) porast vrijednosti repnog intenziteta. Za ekstrakte vrste *A. versicolor* najveći porast u odnosu na kontrolu (više nego 3 puta veća vrijednost) zabilježen je pri koncentraciji od 40 $\mu\text{g/mL}$. Kod iste koncentracije primijećen je i maksimalni pojedinačni učinak ekstrakata vrste *S. chartarum*, s tim da se ovdje radilo o više nego 4 puta većoj vrijednosti u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) Općenito, ekstrakti egzometabolita vrste *S. chartarum* pokazali su jače djelovanje na vrijednosti repnog intenziteta, nego oni vrste *A. versicolor*. Nadalje, za ekstrakte egzometabolita, najveći porast ovog parametra zabilježen je u kombinacijama, pri čemu je za kombinaciju AV+ST 20+20 izmjerena maksimalna vrijednosti repnog intenziteta (2,402 %).

Učinak ekstrakata endometabolita na repni intenzitet bio je nešto jači za ekstrakte vrste *A. versicolor*, koji su najjači pojedinačni učinak (4,6 puta veći repni intenzitet u odnosu na kontrolu, $P < 0,05$) pokazali u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$, dok im se povećanjem koncentracije učinak smanjivao. Slično je zabilježeno i za ekstrakte endometabolita vrste *S. chartarum*, koji su također najjače djelovali u najnižoj koncentraciji (10 $\mu\text{g/mL}$). Očekivano, najviše vrijednosti repnog intenziteta zabilježene su u kombinacijama endometabolita, posebice u kombinaciji AV+ST 10+40, za koji je repni moment čak 6, 7 puta veći u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).

Tablica 5. Repni intenziteti (%) dobiveni komet-testom na A549 stanicama nakona) tretiranja egzometabolitima vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*;b) tretiranja endometabolitima vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*

	Kontrola	EGZO AV 10	EGZO AV 20	EGZO AV 40	EGZO ST 10	EGZO ST 20	EGZO ST 40	EGZO AV+ST 10+40	EGZO AV+ST 20+20	EGZO AV+ST 40+10
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,505	1,336*	0,971*	1,559*	1,392*	1,626*	2,08*	0,9731*	2,402*	2,322*
SD	0,779	2,166	1,63	2,934	2,75	2,935	4,211	1,59	6,262	3,586
SEM	0,064	0,177	0,133	0,240	0,225	0,240	0,343	0,130	0,511	0,293
M	0,131	0,273	0,196	0,474	0,216	0,385	0,476	0,208	0,229	0,640
25%-P	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,005	0,0	0,0	0,103
75%-P	0,810	1,619	1,167	1,841	1,84	1,426	2,286	1,214	1,58	2,972
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	3,628	13,62	9,476	23,09	17,69	13,85	35,35	7,773	58,36	17,50

a)

	Kontrola	ENDO AV 10	ENDO AV 20	ENDO AV 40	ENDO ST 10	ENDO ST 20	ENDO ST 40	ENDO AV+ST 10+40	ENDO AV+ST 20+20	ENDO AV+ST 40+10
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,505	2,326*	1,269*	1,121*	1,49*	1,026*	1,436*	3,42*	2,39*	2,11*
SD	0,7786	4,127	2,076	1,994	2,347	1,818	3,087	5,931	4,82	3,598
SEM	0,0636	0,337	0,1695	0,1628	0,191	0,1484	0,2521	0,4842	0,3935	0,2938
M	0,1306	0,4238	0,2676	0,2163	0,255	0,1879	0,2085	0,9014	0,7471	0,3827
25%-P	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1066	0,0387	0,0
75%-P	0,8096	2,648	1,71	1,297	2,028	1,484	1,436	3,573	3,133	3,016
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	3,628	16,47	11,67	11,81	12,33	12,45	17,45	35,56	48,69	20,47

b)

*pokusne skupine u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$); \bar{x} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; SEM - standardna pogreška aritmetičke sredine; M - medijan; 25%-P - 25. percentil; 75%-P - 75. percentil; Min – minimum; Max – maksimum

Posljednji i ujedno najvažniji parametar komet-testa, koji oba prethodna parametra uzima u obzir, pokazao je statistički značajan porast u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) prilikom tretiranja ekstraktima egzometabolita obaju vrsta u svim navedenim koncentracijama (10, 20 i 40 $\mu\text{g/mL}$), kao i u kombinacijama (Tablice 6a i 6b). Za ekstrakte egzometabolita vrste *A. versicolor* već pri najnižoj koncentraciji (10 $\mu\text{g/mL}$) zabilježen je porast vrijednosti repnog momenta od 2,6 puta u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$), dok je u najvišoj koncentraciji (40 $\mu\text{g/mL}$) i porast bio najviši, tj. za 305 % veći u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Porast je bio nešto veći za ekstrakte egzometabolita vrste *S. chartarum*, kod kojih je za najnižu koncentraciju ekstrakata (10 $\mu\text{g/mL}$) izmjeren 3 puta veći repni moment u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Daljnjim povećanjem koncentracija, također dolazi do porasta vrijednosti momenta te je kod najviše pojedinačne koncentracije (40 $\mu\text{g/mL}$) zabilježena vrijednost repnog momenta koja je 4,4 puta veća od odgovarajuće vrijednosti za kontrolu ($P < 0,05$). U kombinacijama, najveća izmjerena vrijednost momenta (0,356) primijećena je za kombinaciju AV+ST 20+20.

Za ekstrakte endometabolita vrste *A. versicolor* najizraženiji pojedinačni učinak odgovara koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$, dok je najjači genotoksični učinak vrste *S. chartarum* zabilježen pri koncentraciji od 40 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$). Najveći porast repnog momenta za ekstrakte endometabolita pridružen je kombinaciji AV+ST 10+40.

Tablica 6. Repni momenti dobiveni komet-testom na A549 stanicama nakon

- a) tretiranja egzometabolitima vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*;
 b) tretiranja endometabolitima vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum*.

	Kontrola	EGZO AV 10	EGZO AV 20	EGZO AV 40	EGZO ST 10	EGZO ST 20	EGZO ST 40	EGZO AV+ST 10+40	EGZO AV+ST 20+20	EGZO AV+ST 40+10
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,067	0,178*	0,137*	0,204*	0,200*	0,240*	0,292*	0,129*	0,356*	0,305*
SD	0,105	0,280	0,233	0,368	0,418	0,450	0,594	0,209	0,963	0,476
SEM	0,009	0,022	0,019	0,030	0,034	0,036	0,049	0,017	0,079	0,039
M	0,018	0,040	0,027	0,060	0,029	0,056	0,064	0,031	0,032	0,087
25%-P	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,013
75%-P	0,097	0,223	0,166	0,244	0,259	0,189	0,326	0,176	0,205	0,395
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	0,441	1,572	1,519	2,517	3,027	2,308	4,985	1,09	8,231	2,242

a)

	Kontrola	ENDO AV 10	ENDO AV 20	ENDO AV 40	ENDO ST 10	ENDO ST 20	ENDO ST 40	ENDO AV+ST 10+40	ENDO AV+ST 20+20	ENDO AV+ST 40+10
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,067	0,318*	0,169*	0,154*	0,194*	0,142*	0,198*	0,533*	0,346*	0,305*
SD	0,105	0,564	0,282	0,275	0,316	0,250	0,443	0,986	0,652	0,522
SEM	0,009	0,046	0,023	0,023	0,026	0,020	0,036	0,081	0,053	0,043
M	0,018	0,054	0,036	0,029	0,030	0,024	0,028	0,130	0,103	0,053
25%-P	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,013	0,004	0,0
75%-P	0,097	0,366	0,212	0,174	0,245	0,201	0,191	0,507	0,470	0,440
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	0,442	2,428	1,721	1,741	1,581	1,596	2,789	7,41	5,93	3,411

b)

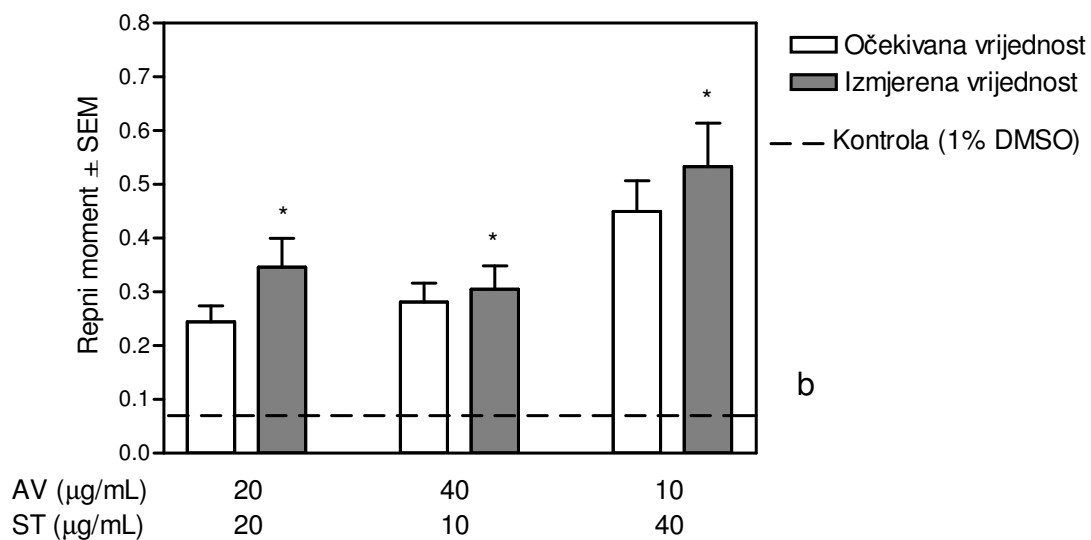
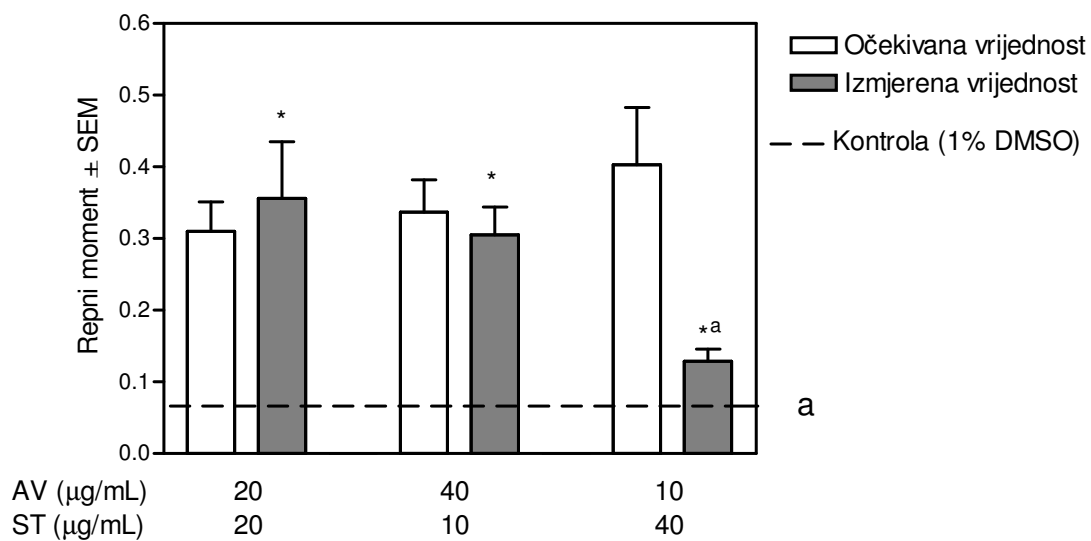
*pokusne skupine u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$); \bar{x} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; SEM - standardna pogreška aritmetičke sredine; M - medijan; 25%-P - 25. percentil; 75%-P - 75. percentil; Min – minimum; Max – maksimum

S namjerom da se ispitaju genotoksične interakcije ekstrakata egzometabolita (Graf 3a) vrsta *A. versicolor* (AV) i *S. chartarum* (ST), kao i ekstrakata njihovih endometabolita (Graf 3b), A549 stanice su tretirane s kombinacijama koncentracija 10, 20 i 40 µg/mL (AV+ST 20+20, 40+10 i 10+40).

Sve navedene kombinacije ekstrakata egzo- i endometabolita povećavaju repni moment u odnosu na kontrolu ($P < 0.05$), no ne nužno i u odnosu na očekivane vrijednosti.

Konkretno, od kombinacija ekstrakata egzometabolita jedino su za AV+ST 20+20 izmjerene vrijednosti veće od očekivanih, ali bez statistički značajne razlike. Preostale 2 kombinacije ekstrakata egzometabolita (AV+ST 40+10 i 10+40) imaju slabiji genotoksični učinak, te su za njih izmjerene vrijednosti repnog momenta manje od očekivanih. Ipak, jedino je za kombinaciju AV+ST 10+40 ta razlika i statistički značajna pa možemo reći da se tu radi o antagonizmu. Nasuprot tome, učinak kombinacija AV+ST 20+20 i 40+10, za ekstrakte egzometabolita, je aditivna.

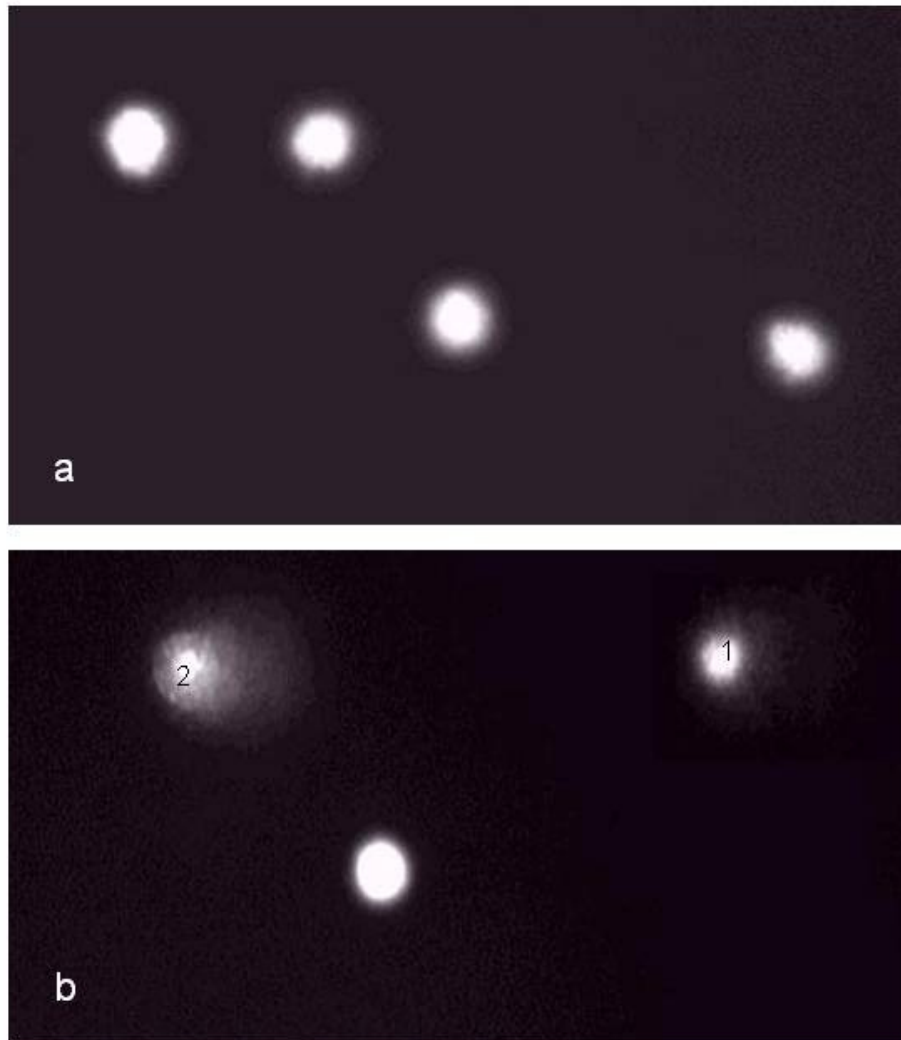
Ekstrakti endometabolita plijesni primijenjeni u istim kombinacijama kao i ekstrakti egzometabolita pokazali nešto viši genotoksični potencijal, te su u svim primijenjenim koncentracijama izmjerene vrijednosti repnog momenta bile veće od očekivanih, ali bez statistički značajne razlike. Zbog toga se kod sve tri kombinacije ekstrakata endometabolita radi o aditivnom učinku.



Graf 3. Repni moment A549 stanica nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama ekstrakata egzometabolita (a) i endometabolita (b) vrsta *A. versicolor* (AV) i *S. chartarum* (ST).

* $P < 0,05$ statistička značajnost u odnosu na kontrolu;

^aAntagonizam: očekivani repni moment vs izmjereni repni moment ($P < 0,05$)



Slika 1. Kometi A549 stanica:

a) neoštećena DNA (kontrola);

b) kometi A549 stanica tretiranih s kombinacijom AV+ST (10+40)
prikazuju neoštećenu DNA i različite stupnjeve oštećenja DNA
(1 i 2)

5. RASPRAVA

Izloženost većim koncentracijama aerogenih čestica plijesni (sporama i fragmentima micelija) kod ljudi često uzrokuje čitav niz poremećaja u dišnom sustavu uključujući infekcije, iritacije mukoznih membrana, akutna i kronična oštećenja dišnih organa, konjunktivitis te mikotoksikoze. Svi ti poremećaji mogu biti posljedica alergijskih i/ili toksičnih učinaka sastojaka staničnog zida plijesni (1→3-β-D-glukani i membranski vezani enzimi) i mikotoksina (Flappan i sur. 1999; Schulz i sur. 2004). Mikotoksikoze dišnog sustava dovode se u vezu s inhalacijom toksičnih metabolita koje proizvode neke vrste iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* i *Stachybotrys chartarum* (Kuhn i Ghannoum, 2003). U vlažnim zatvorenim prostorima najčešće je detektirana vrsta *A. versicolor* (oko 40%) koja spada u primarne kolonizatore ($a_w < 0,8$), dok se vrsta *S. chartarum* može naći jedino u uvjetima znatno veće količine slobodne vode u supstratu ($a_w > 0,9$) (Šegvić Klarić i sur., 2007). Iako se vrsta *S. chartarum* rjeđe pojavljuje u vlažnim zatvorenim prostorima (3% pozitivnih uzoraka) gotovo uvijek je izolirana kao ko-kontaminant s vrstom *A. versicolor* (Pieckova i Jesenska, 1999; Pieckova i sur., 2004; Pieckova i sur., 2006). Stoga je u ovom radu ispitano toksično djelovanje ekstrakata metabolita upravo ove dvije vrste plijesni. Za sada je poznato da vrsta *A. versicolor* može tvoriti sterigmatocistin i verzikolorine. Sterigmatocistin djeluju karcinogeno i mutageno, a takvo djelovanje temelji se na epoksidaciji furofuranskog prstena toksina koji se kovalentno vezuje za gvaninske ostatke u molekuli DNA (Moss, 2002). Do ovih spoznaja se došlo proučavanjem mehanizma toksičnog djelovanja nakon unosa toksina hranom, odnosno intraperitonealnom aplikacijom pokusnim životinjama, dok se o njegovoj toksičnosti za stanice dišnog sustava malo zna. Ispitivanjem citotoksičnog djelovanja na humane stanice adenokarcinoma pluća (A549) dokazano je da je sterigmatocistin ($IC_{50}=3,7 \mu M$) 30, odnosno 46 puta toksičniji od verzikolorina A ($IC_{50}=109 \mu M$) i verzikolorina B ($IC_{50}=172 \mu M$) (Bünger i sur., 2004; Jakšić i sur., 2009). Vrsta *S. chartarum* može biti potencijalni proizvođač nekoliko tipova toksina uključujući makrocikličke trihotecene i stahibotriotoksine (kemitip A),

diterpenoidne atranone i jednostavne trihotecene (kemotip B) te spirocikličke drimane (Anderson i sur., 2002). Ovi metaboliti pokazuju citotoksično i imunotoksično djelovanje, a nedavno je dokazano da u dišnom sustavu pokusnih životinja uzrokuju upalu (Nikulín i sur., 1996; Pestka i sur., 2008). Jesenská i Bernát (1994) su ispitali djelovanje sterigmatocistina u uvjetima *in vitro* na pokretljivost cilija trepetljivog epitela dušnika izoliranog iz pilića starih jedan dan pri čemu je ovaj mikotoksin uzrokovao inhibiciju cilija nakon 48 sati. Na istom je modelu ispitano i ciliostatsko djelovanje kloroformskih ekstrakata egzo- i endometabolita vrste *A. versicolor* i *S. chartarum* u koncentraciji 20 µg/mL te je ciliostatsko djelovanje oba tipa metabolita zabilježeno unutar 48 do 72 sata (Pieckova i Kunova, 2002; Pieckova i sur., 2004; Pieckova i sur., 2006). Citotoksično djelovanje ekstrakta endometabolita vrste *A. versicolor* na A549 stanice nije zabilježeno nakon 24-satnog tretmana niti u koncentraciji 80 µg/mL, dok je ekstrakt endometabolita u koncentraciji 10 µg/mL uzrokovao značajno smanjenje stanične vijabilnosti. Ekstrakti oba tipa metabolita vrste *S. chartarum* pokazali su se toksičniji za A549 stanice tj. u koncentracijama od 5, odnosno 10 µg/mL uzrokovali su značajan pad stanične vijabilnosti u odnosu na kontrolu. Nedavno je pokazano da ekstrakti egzo- i endometabolita *S. chartarum* kemotip B (20 µg/mL) uzrokuju upalu plućnog tkiva, citotoksično i hematotoksično djelovanje kod Wistar štakora nakon intratrachealne instilacije te se pretpostavlja da bi se takvo djelovanje moglo očekivati i kod ljudi posebice kod nekih profesionalnih kroničnih izloženosti (Pieckova i sur., 2006; 2009). S obzirom da se ove vrste plijesni pojavljuju kao ko-kontaminanti vlažnih zatvorenih prostora, bilo je važno ispitati njihove potencijalne toksične interakcije na A549 stanicama kao eksperimentalnom modelu. Rezultati pokazuju da ekstrakti egzometabolita ovih vrsta plijesni djeluju sinergistički citotoksično, dok se endometaboliti antagoniziraju. Ovakav bi se rezultat mogao objasniti činjenicom da su toksični metaboliti koje plijesni izlučuju u medij na kojem rastu različite kemijske strukture te se neće natjecati za iste receptore u stanici. S druge strane, komponente staničnog zida, koje su najzastupljenije u ekstraktima endometabolita, slične su građe kod svih vrsta plijesni te će se najvjerojatnije natjecati za iste receptore pri

čemu se međusobno antagoniziraju. O genotoksičnom učinku metabolita *A. versicolor* i *S. chartarum* ima malo saznanja. U ovom radu je alkalnim komet testom pokazano da ekstrakti egzo- i edometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* uzrokuju jednolanačane lomove DNA (apurinska i apirimidinska mjesta nastala kao posljedica oštećenja molekule DNA). Nedavno je pokazano da ekstrakti vrste *S. chartarum* oksidiraju glutation i induciraju reverzibilna i ireverzibilna oštećenja DNA (Wang i Yadav, 2006). Rakkestad i sur. (2010) su u kulturi humanih monocita THP-1 dokazali da vodena suspenzija spora vrste *S. chartarum* kemotipa A i B uzrokuje oksidacijsko oštećenje DNA što se najvjerojatnije može pripisati djelovanju toksičnih metabolita u sporama. Također je i suspenzija spora vrste *A. versicolor* uzrokovala veće oksidacijsko oštećenje DNA ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolne stanice (Rakkestad i sur., 2010). Međutim, kako anorganske i organske aerogene čestice uzrokuju oksidacijski stres i upalu u dišnom sustavu, tako i same spore koje ne sadržavaju toksine mogu imati isto djelovanje (Gonzalez-Flecha, 2004). Stoga ne čudi da su i ekstrakti endometabolita ispitivanih plijesni uzrokovali oštećenja DNA u A549 stanicama. Kombinacije ekstrakata egzo-, odnosno endometabolita ovih dviju vrsta plijesni imaju dominantno aditivno genotoksično djelovanje na A549 stanice.

Kronična izloženost ljudi većim koncentracijama spora ovih vrsta plijesni u zatvorenim prostorima mogla bi izazvati ozbiljne poremećaje u dišnom sustavu. Spore vrste *A. versicolor* su hrapave i sitne (3-5 μm) te mogu prodrijeti u dublje dijelove dišnog sustava gdje bi mogle izazivati upalu, nekrozu i oštećenja DNA ovisno o toksičnom potencijalu metabolita koji se u njima nalaze. Slično se može očekivati i u slučaju inhalacije spora vrste *S. chartarum*, međutim ljepljive spore ove plijesni se najvjerojatnije zadržavaju u gornjim dišnim putovima. S obzirom na pokazane interakcije ekstrakata metabolita ovih vrsta plijesni može se pretpostaviti njihovo potencirajuće toksično djelovanje na dišni sustav ljudi pri kroničnoj izloženosti u zatvorenim prostorima. Ovaj rad ujedno je i prvo izvješće o toksičnim interakcijama metabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* u plućnim stanicama.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata provedenih istraživanja, o učincima aerogene izloženosti endo- i egzometabolitima vrsta *S. chartarum* i *A. versicolor* može se zaključiti sljedeće:

- Ekstrakti egzometabolita vrste *A. versicolor* u ispitivanim koncentracijama (5 - 80 µg/mL) djeluju blago proliferativno na A549 stanice, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, ekstrakt egzometabolita vrste *S. chartarum* već u najmanjoj koncentraciji (5 µg/mL) djeluje značajno citotoksično na A549 stanice, a daljnjim povećanjem koncentracije citotoksični učinak mu se povećava.
- Ekstrakti endometabolita obaju ispitivanih vrsta pokazuju značajan citotoksični učinak na A549 stanice te se pritom primjećuje linearno smanjenje vijabilnosti stanica ovisno o koncentraciji.
- Ekstrakti egzometabolita obaju ispitivanih vrsta plijesni djeluju sinergistički citotoksično, a učinak kombinacija endometabolita je antagonistički.
- Genotoksični učinak na A549 stanice imaju ekstrakti egzo-, kao i endometabolita, odnosno uzrokuju jednolanačane lomova DNA, što se očituje povećanjem sva tri parametra komet testa (duljina repa, repni intenzitet i repni moment).
- Kombinacije ekstrakata i egzo- i endometabolita spomenutih vrsta pokazuju dominantno aditivno genotoksično djelovanje na A549 stanice.
- Kronična izloženost ljudi većim koncentracijama spora ovih vrsta plijesni u zatvorenim prostorima mogla bi izazvati ozbiljne poremećaje u dišnom sustavu. Spore vrste *A. versicolor* su hrapave i sitne (3-5 µm) te mogu prodrijeti u dublje dijelove dišnog sustava gdje bi mogle izazivati upalu, nekrozu i oštećenja DNA ovisno o toksičnom potencijalu metabolita koji se u njima nalaze. Slično se može očekivati i u slučaju inhalacije spora vrste *S. chartarum*, međutim ljepljive spore ove plijesni se najvjerojatnije zadržavaju u gornjim dišnim putovima. S obzirom na pokazane interakcije ekstrakata metabolita ovih vrsta plijesni može se pretpostaviti njihovo

potencirajuće toksično djelovanje na dišni sustav ljudi pri kroničnoj izloženosti u zatvorenim prostorima.

- Ovaj rad ujedno je i prvo izvješće o toksičnim interakcijama metabolita vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* u plućnim stanicama.

ZAHVALE

Posebno se zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, na velikoj pomoći, strpljivosti i podršci, koje su mi puno značile u izradi ovoga rada, kao i na svom znanju koje sam na ovaj način stekla. Također, zahvale dugujem i Danieli Jakšić, koja mi je svojim znanjem olakšala pisanje rada, dr. sc. Eleni Pieckovoj od koje su dobiveni ekstrakti korišteni u radu, te dr. sc. Nevenki Kopjar, koja je omogućila izvođenje dijela ovoga rada na Institutu za medicinska istraživanja u Zagrebu.

7. LITERATURA

Albertini R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa H., Shuker D. E. G., Tice R., Waters M. D., Aitio A., IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, *Mutat Res* 463 (2000) 111-72

Andersen B., Nielsen K.F., Jarvis B.B., Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94 (2002) 392 – 403

Benndorf D., Müller A., Bock K., Manuwald O., Herbarth O., von Bergen M., Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*, *Allergy* 63 (2008), 454 – 460

Bondy G. S., Pestka J. J., Immunomodulation by fungal toxins, J. Toxicol. Environ. Health Ser. B 3 (2000) 109 – 143

Bünger J., Westphal G., Mönnich A., Hinnendahl B., Hallier E., Müller M., Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins, Toxicology 202 (2004) 199 - 211

Burge P. S., Sick building syndrome, Occup. Environ. Med. 61 (2004) 185 – 190

Centers for Disease Control and Prevention, Reports of members of the CDC External Expert Panel on acute idiopathic pulmonary hemorrhage/hemosiderosis in infants: a synthesis [Online] (1999)

Centers for Disease Control and Prevention, Update: pulmonary hemorrhage/ hemosiderosis among infants – Cleveland, Ohio, 1993 – 1996., Morb. Mortal. Wkly. Rep. 49 (2000) 180 – 184

Engelhart S., Looock A., Skutlarek D-, Sagunski H., Lommel A., Färber H., Exner M., Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments, App. Environ. Microbio. 68 (2002) 3886 – 3890

Flannigan B., McCabe E. M., McGarry F., Allergenic and toxigenic microorganisms in houses, J. App. Bacteriol. Symp. Suppl. 70 (1991) 61

Flappan S.M., Portnoy J., Jones P., Barnes C., Infant pulmonary hemorrhage in a suburban home with water damage and mold (*Stachybotrys atra*), Environ. Health Perspect. 107 (1999) 927-930

González-Flecha B., Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol. Aspects Med.* 25 (2004)., 169–182

Gravesen S., Nielson P.A., Iversen R., Nielsen K.F., Microfungal contamination of damp buildings – examples of risk constructions and risk materials, *Environ. Health Perspect* 107 (1999) 505 – 508

Jakšić D., Šegvić Klarić M., Puel O., Pepeljnjak S., Kosalec I., Cytotoxicity of some furofuran precursors of aflatoxin biosynthesis, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56 (2009) 173

Jesenská Z., Bernát D., Effect of mycotoxins on in vitro movement of tracheal cilia from one-day-old chicks, *Folia Microbiol.* 39 (1994) 155 -158

Jussila J., Komulainen H., Kosma V. M., Nevalainen A., Pelkonen J., Hirvonen M.R., Spores of *Aspergillus versicolor* isolated from indoor air of a moisture-damaged building provoke acute inflammation in mouse lungs, *Inhal. Toxicol.* 14 (2002) 1261 – 1277

Kopjar N., Želježić D., Kašuba V., Rozgaj R., Antineoplastic drugs associated with occupational risks, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 61 (2010) 121-146

Kuhn, D.M., Ghannoum M.A., Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease prospective, *Clinical Microbiology Reviews* (2003) 144 – 172

Miller J.D., Laflamme A.M., Sobol Y., Lafontaine P., Greenalgh R., Fungi and fungal products in some Canadian houses, *Int. Biodeterior.* 24 (1988) 103 – 120

Moss M. O., Mycotoxin review- 1. *Asperillus* and *Penicillium*, *Mycologist* 16 (2002) 116-119

Nielsen K.F., Mycotoxin production by indoor molds, *Fungal Genet. Biol.* 39 (2003) 103 – 117

Nikulin M., Reijula K., Jarvis B.B., Hintikka E.L., Experimental lung mycotoxicosis in mice induced by *Stachybotrys atra*. *Int. J Exp. Pathol.*, 77 (1996) 213 – 218

Ožegović L., Pavlović R., Milošević B., Toxic dermatitis, conjunctivitis, rhinitis, pharyngitis, and laringitis in fattening cattle and farm workers caused by molds from contaminated straw (stachybotryotoxicosis?), *Veterinaria (Sarajevo)* 20 (1971) 263 – 267

Pasanen A.-L., Korpi A., Kasanen J.P., Pasanen P., Critical aspects on the significance of microbial volatile metabolites as indoor pollutants, *Environ. Int.* 24 (1998) 703 – 712

Pestka J. J., Yike I., Dearborn D. G., Ward M. D., Harkema, J. R., *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicol. Sci.* 104 (2008) 4–26

Pieckova E., Hurbankova M., Černa S., Liškova A., Kovačikova Z., Kollarikova Z., Wimmerova S., Inflammatory and haematotoxic potential of indoor *Stachybotrys chartarum* (ehrenb.) Hughes metabolites, *Arh Hig Rada Toksikol.* 60 (2009) 400 – 409

Piecková E., Hurbánková M., Černá S., Pivovarová Z., Kováčiková Z., Pulmonary cytotoxicity of secondary metabolites of *Stachybotrys chartarum* (ehrenb.) Hughes, *Ann. Agric. Environ. Med.* 13 (2006) 259–262

Piecková E., Hurbánková M., Pivovarová Z., Černá S., Kováčiková Z., Liškova A., Tatrai E., Šegvić M., Toxicity of indoor *Stachybotrys chartarum*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 197 (2004) 443

Piecková E., Jesenska Z., Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans, Ann. Agric. Environ. Med. 6 (1999) 6 – 11

Pieckova E., Kunova Z., Indoor fungi and their ciliostatic metabolites, Ann. Agr. Environ. Med. 9 (2002) 59 – 63

Piecková E., Wilkins K., Airway toxicity of house dust and its fungal composition, Ann. Agric. Environ. Med. 11 (2004) 67 – 73

Pitten, F. A., Bremer J., Kramer A., Air pollution by volatile organic compounds (VOC) and health complaints, Dtsch. Med. Wochenschr. 125 (2000) 545 – 550

Rakkestad K. E., Skaar I., Ansteinsson V. E., Solhaug A., Holme J. A., Pestka J. J., Samuelsen J. T., Dahlman H. J., Hongslo J. K., Becher R., DNA damage and DNA damage responses in THP-1 monocytes after exposure to spores of either *Stachybotrys chartarum* or *Aspergillus versicolor* or to T-2 toxin, Toxicological Sciences 115 (2010) 140 – 155

Rylander R., Airborne (1→3)-β-D-glucan and airway disease in a day-care center before and after renovation, Arch. Environ. Health 52 (1997) 281 – 285

Samet J.M., Utell M.J., Indoor and outdoor air pollution. U: A. P. Fishman (ur.), Fishman's pulmonary diseases and disorders. McGraw Hill; New York, (1998) p. 941 – 936

Schulz T., Senkpiel K., Ohgke H., Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor molds, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 267 – 277

Sudakin D. L., Toxigenic fungi in a water-damaged building: an intervention study, *Am. J. Ind. Med.* 34 (1998) 183 – 190

Šegvić Klarić M., Koslaec I., Mastelić J., Pieckova E., Pepelnjak S., Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings, *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (2007) 36 - 42

Wang H., Yadav J. S., DNA damage, redox changes, and associated stress-inducible signaling events underlying the apoptosis and cytotoxicity in murine alveolar macrophage cell line MH-S by methanol-extracted *Stachybotrys chartarum* toxins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214 (2006) 297–308

8. SAŽETAK

Marica Malenica

Citotoksičnost i genotoksičnost egzo- i endometabolita vrsta *Aspergillus versicolor* i *Stachybotrys chartarum*

Poznato je da plijesni vrsta *A.versicolor* i *S. chartarum* proizvode niz toksina te ih se već dugo povezuje s različitim bolestima, prije svega onima respiratornog trakta, poput infekcija, iritacija i oštećenja dišnih organa. Unatoč tome o mehanizmu njihova djelovanja u dišnim stanicama se malo zna. Smatra se da navedeni poremećaji mogu biti posljedica alergijskih i/ili toksičnih učinaka sastojaka staničnog zida plijesni (1→3-β-D-glukana i membranski vezanih enzima), kao i mikotoksina. Pri tom je učinak vrste *A. versicolor* posebno značajan, budući da je ona čest sastojak zraka unutrašnjih prostora, te je se u velikoj količini može izolirati iz vlagom oštećenih objekata. S njom kao ko-kontaminat često dolazi i vrsta *S. chartarum*, pa je zato u ovom radu ispitan cito- i genotoksični učinak ekstrakata metabolita upravo ove dvije vrste plijesni.

Za ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti u uvjetima *in vitro* odabrana je kultura stanica adenokarcinoma pluća čovjeka (A549).

Citotoksični učinak, tj. preživljavanje stanica nakon tretiranja ekstraktima mjereno je kolorimetrijskim MTT testom na 595 nm. Stanice su bile izložene rastućim koncentracijama (5 - 80 µg/mL) ekstrakata endo- i egzometabolita obaju spomenutih vrsta, kao i njihovim kombinacijama (AV+ST 10+40, 20+20 i 40+10). Pritom je zabilježen značajan pad vijabilnosti stanica za ekstrakte endometabolita obaju vrsta te za ekstrakte egzometabolita *S. chartarum*, dok su ekstrakti egzometabolita vrste *A. versicolor* pokazali blago i statistički neznačajno proliferativno djelovanje. Utvrđeno je i da kombinacije ekstrakata egzometabolita obaju ispitivanih vrsta plijesni djeluju sinergistički citotoksično, dok kombinacije endometabolita djeluju antagonistički.

Genotoksični učinak ispitan je pomoću alkalnog komet-testa, te je utvrđeno da ekstrakti egzo- i edometabolita vrsta *A. versicolor* i *S. charatarum* uzrokuju jednolanačane lomove DNA, što se na rezultatima komet testa očituje

kao povećanje repnog momenta. U kombinacijama su i ekstrakti egzo- i endometabolita pokazali aditivan genotoksični učinak. Kronična aerogena izloženost ljudi većim koncentracijama spora ovih vrsta plijesni u zatvorenim prostorima mogla izazvati ozbiljne poremećaje u dišnom sustavu.

Naposlijetku, ovaj rad predstavlja prvo izvješće o toksičnim interakcijama metabolita plijesni vrsta *A. versicolor* i *S. chartarum* u plućnim stanicama.

Ključne riječi: *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, sterigmatocistin, satratoksini, komet test

9. SUMMARY

Marica Malenica

Cytotoxicity and genotoxicity of exo- and endometabolites of *Aspergillus versicolor* and *Stachybotrys chartarum*

It is known that the mould species *A.versicolor* and *S. chartarum* produce a number of toxins, and they have been associated with various diseases, especially those of the respiratory tract including infections, irritations and respiratory damage. Despite that, the mechanism of their action in respiratory cells is not well known. It is believed that these disorders may be due to allergies and/or toxic effect of the cell wall components ((1→3-β-D- glucan and membrane-bound enzymes), and mycotoxins. Negative effects of *A. versicolor* are particularly significant; since this mould is common component of indoor air and it have been detected in high concentrations in damp dwellings. *S. chartarum* is present in highly water damage buildings and usually co-occurs in samples with *A. versicolor*. Therefore, in this work the cyto-and genotoxic effects of extracts of metabolites of these two mould species were tested *in vitro* on human lung adenocarcinoma (A549) cell line.

Cytotoxicity was measured after 24 h treatment with metabolite extracts using colorimetric MTT assay at 595 nm. Cells were exposed to increasing concentrations (5-80 µg/mL) of exo- and endometabolite extracts of *A. versicolor* and *S. chartarum* as well as with their combinations (AV+ST 10+40, 20+20 and 40+10 µg/mL). A significant decrease of cell viability was detected upon exposure to endometabolite extracts of both species as well as exometabolite extracts of *S. chartaum*. Exometabolite of *A. versicolor* showed slight and statistically insignificant proliferative effect as compared to control. Combinations of exometabolite extracts exert synergistic cytotoxicity while combinations of endometabolite extracts act antagonistically.

Alkaline comet test showed that extracts of exo- and edometabolites of both mould species caused single-strand DNA breaks, and significantly increase all three comet parameters (tail length, tail intensity and tail moment). The

combination of extracts showed additive genotoxic effect. Chronic exposure to higher concentrations of these airborne moulds in indoor environment could induce serious disturbances in the respiratory system. Finally, this paper represents the first report on the toxic interaction of metabolites of *A. versicolor* and *S. chartarum* in lung cells of human origin.

Key words: *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, sterigmatocystin, satratoxins, comet assay