

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko - biokemijski fakultet

Zlatko Ficović i Maja Hanić

Plijesni *Aspergillus ochraceus* i *Eurotium herbariorum*: aerogena izloženost u zatvorenim prostorima i toksični učinci ekstrakata spora na stanice ljudskog adenokarcinoma pluća A549

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012/2013.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Zdravstveni značaj plijesni.....	1
1.2. Plijesni u zraku stambenog i radnog okoliša i njihov utjecaj na zdravlje	2
1.2.1. Alergeni plijesni.....	4
1.2.2. Glukani.....	5
1.2.3. Hlapljive organske tvari.....	5
1.2.4. Mikotoksini	5
1.3. <i>Aspergillus ochraceus</i> : aerogena izloženost i utjecaj na zdravlje ljudi.....	7
1.4. <i>Eurotium spp.</i> : aerogena izloženost i utjecaj na zdravlje ljudi.....	8
2. HIPOTEZA.....	9
3. METODE I MATERIJALI	11
3.1. Uzimanje uzoraka, izolacija i identifikacija pojedine vrste plijesni.....	11
3.2. Ispitivanje tvorbe okratoksina A kod <i>A. ochraceus</i> i <i>E. herbariorum</i>	12
3.2.1. Utvrđivanje producenata okratoksina A tankoslojnom kromatografijom	12
3.2.2. Ekstrakcija spora.....	13
3.2.3. Dokazivanje okratoksina A tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	13
3.3. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja okratoksina A i ekstrakata spora <i>A.</i> <i>ochraceus</i> i <i>E. herbariorum</i>	14
3.3.1. Kultura stanica	14
3.3.2. MTT test.....	14
3.4. Statistika.....	16
4. REZULTATI	17
4.1. Plijesni u zraku mlina žitarica, stanova i podruma	17
4.2. Okratoksin A u ekstraktima <i>A. ochraceus</i> i <i>E. herbariorum</i>	20
4.3. Citotoksičnost okratoksina A za A549 stanice	22

4.4. Citotoksičnost ekstrakata spora <i>A. ochraceus</i> i <i>E. herbariorum</i> za A549 stanice.....	22
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČCI	30
7. LITERATURA.....	31
8. SAŽETAK.....	38
9. SUMMARY.....	41
10. ZAHVALE	42

1. UVOD

1.1. Zdravstveni značaj plijesni

Plijesni su sveprisutni organizmi. Imaju važnu ulogu u razgradnji organskih tvari u prirodi, koriste se u proizvodnji hrane te u biotehnologiji. S druge strane, neke plijesni su producenti mikotoksina – produkata sekundarnog metabolizma koji imaju štetan utjecaj na zdravlje ljudi i životinja jer izazivaju mikotoksikoze. Mikotoksini nisu važni za vegetativni rast mikroorganizama i njihova uloga za plijesni još nije razjašnjena. Nastaju u idiofazi (stacionarna faza rasta), koja nastupa nakon trofofaze (eksponencijalna faza rasta) pa sekundarne metabolite često nazivamo i idiolitima. Uglavnom nastaju u relativno malim koncentracijama. Važno je naglasiti da ih ne proizvode svi sojevi iste vrste, već samo oni koji sadrže gene za biosintetski put mikotoksina. Također, njihov nastanak ovisi i o čimbenicima okoliša uključujući sastav supstrata, temperaturu, aktivitet vode (a_w) te relativnu vlažnost zraka (Sikyta, 1995). Mikotoksini se klinički klasificiraju prema ciljnim organima na koje ti spojevi primarno djeluju. Tako razlikujemo hepatotoksine, nefrotoksine, neurotoksine, imunotoksine i dr. Mikotoksikoze, kao i svi toksikološki sindromi, mogu biti akutne i kronične. Dulja izloženost niskim koncentracijama toksina je češći slučaj, ali je uglavnom teško razlikovati akutne i kronične učinke (Bennett i Klich, 2003). Unos mikotoksina kontaminiranom hranom najznačajniji je put izloženosti te je većina epidemioloških i toksikoloških studija posvećena upravo mikotoksikozama uzrokovanim ingestijom mikotoksina. S javno-zdravstvenog aspekta, najznačajniji su aflatoksin (AF), okratoksin A (OTA), patulin (PAT), fumonizini (FB), zearalenon (ZEA) i trihoteceni (DON, DAS i T-2, HT-2). Većina zemalja u svijetu ima zakonsku regulativu koja propisuje maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) navedenih mikotoksina u pojedinim vrstama hrane, no pri tom postoje značajna odstupanja među propisima pojedinih zemalja. Hrvatska je uskladila zakonske propise o MDK mikotoksina u hrani s legislativom Europske unije (EC, 2006).

Međutim, ljudi su izloženi mikotoksinima i preko dišnog sustava posebice u prostorima gdje je koncentracija lebdećih čestica plijesni koje mogu tvoriti mikotoksine (konidije, spore i dijelovi micelija) vrlo visoka. Takvi su prostori primjerice silosi žitarica, mlinovi, životinjske farme, vlažni zatvoreni prostori i sl. (Eduard, 2009; Šegvić Klarić i sur., 2012a). Iako su inhalacijske mikotoksikoze dokumentirane

upravo kod profesionalne izloženosti visokim koncentracijama aerogenih čestica mikotoksinogenih plijesni, nedostaje monitoring kao i temeljite epidemiološke studije te uspostavljanje korelacije doza-učinak (Hardin i sur., 2003). Visoke koncentracije aerogenih čestica plijesni, bez obzira sadrže li mikotoksine ili ne, predstavljaju opasnost za zdravlje jer kod preosjetljivih osoba izazivaju iritacije, alergijske reakcije tipa I, hipersenzibilne pneumonije i astmu. Iako je proveden veliki broj epidemioloških studija o utjecaju boravka ljudi u plijesnima opterećenim prostorima, u većini zemalja u svijetu ne postoji zakonska regulativa o maksimalno dopuštenim koncentracijama plijesni u zraku radnog okoliša (Madsen, 2006). Međutim, neke studije pokazuju da koncentracija od 10000 CFU/m^3 (CFU=jedinice formiranja kolonija) predstavlja zdravstveni rizik kod profesionalne izloženosti zbog mogućeg razvoja različitih bolesti i alergija dišnog sustava (Mandryk i sur., 2000). Stoga postoji preporuka da koncentracije aerogenih plijesni u radnom okolišu i stambenim prostorima ne bi smjele biti veće od $5 \times 10^4 \text{ CFU/m}^3$, odnosno $5 \times 10^3 \text{ CFU/m}^3$ (Gorny i Dutkiewicz, 2002). Osim kvantitativnog aspekta vrlo je važan i sastav mikoflore zraka. Primjerice, vrste iz rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* i *Penicillium* značajni su alergeni, aspergili i penicilije odgovorni su za oportunističke infekcije dišnog sustava imunokompromitiranih pacijenata, a nekoliko vrsta tih rodova značajni su proizvođači mikotoksina, uključujući aflatoksine i okratoksin A.

1.2. Plijesni u zraku stambenog i radnog okoliša i njihov utjecaj na zdravlje

Plijesni kao ubikvitarni eukariotski organizmi, u unutrašnjost objekta mogu se unijeti na površini novih materijala ili odjećom, ali i preko aktivne ili pasivne ventilacije. Nalaze se u prašini i na površinama u svakoj kući, uključujući i one koje nemaju problema s vlagom. Jednom kada se nađu u unutrašnjem prostoru, plijesni mogu rasti jedino u prisutnosti vlage, pa stoga mnoge plijesni rastu na bilo kojim površinama koje postaju mokre ili vlažne. Najčešće su to mokri prozorski okviri, zidovi u spavaćim sobama, dnevni boravci i kuhinje (WHO, 2009). Koja će vrsta rasti na danoj podlozi, uvelike ovisi i aktivitetu vode (a_w) podloge, pa ih s obzirom na njihove potrebe za vodom možemo podijeliti u primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore (Grant i sur., 1989).

- a) Primarni kolonizatori – plijesni koje rastu pri $a_w < 0,8$ (*Penicillium chrysogenum* te *Aspergillus versicolor*, a slijede ih druge *Aspergillus* vrste, *Eurotium* spp., *Wallemia sebi* te *Paecilomyces variotii*);
- b) Sekundarni kolonizatori – plijesni koje rastu pri vrijednosti a_w između 0,8 i 0,9 (različite vrste rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* i *Ulocladium*);
- c) Tercijarni kolonizatori – plijesni koje rastu pri $a_w > 0,9$ (*Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma* spp.) (Nielsen, 2003).

Procjenjuje se da je u Europi i Americi 20-40% vlažnih stambenih prostora kolonizirano plijesnima. U Danskoj čak do 50% škola i vrtića zabilježilo je rast plijesni u zgradama (Gravesen i sur., 1999). Površina prekrivena plijesnima može se kretati od nekoliko cm^2 pa sve do vrlo velikih površina gdje je proliferacija plijesni veoma raširena. Iz ovih razloga vrlo je bitno prepoznati povezanost između plijesni i zdravstvenih problema ljudi koji su im izloženi, identificirati toksične metabolite prisutne u zgradama te odrediti rizične razine izlaganja (Nielsen, 2003). Aerogena izloženost plijesnima dovodi se u vezu s tzv. Sindromom bolesne zgrade (SBS) kojeg karakteriziraju nespecifični simptomi kao što su iritacija gornjih dišnih putova, glavobolja, umor, svrbež, suha koža, a koji su povezani s određenim zatvorenim prostorom koji je građen ili održavan na napravan način (Redlich i sur. 1997). Etiologija SBS nije razjašnjena i smatra se multifaktorijalnom pojavom. Neki od rizičnih čimbenika su: prašina i vlakna, bioaerosoli (bakterije, plijesni, virusi, pelud, životinjski produkti), hlapljive organske tvari (npr. otapala), dim cigareta, fizikalni čimbenici (vibracije, buka, svjetlo) i dr. (Bobić i Gomzi, 2009). U radnom okolišu kao što su silosi i mlinovi žitarica, životinjske farme i drvna industrija, sastav mikoflore zraka ovisi o supstratu i stupnju njegove mikološke kontaminacije. Primjerice, aspergile i penicilije, kao skladišne plijesni, dominirat će u zraku silosa i mlinova žitarica jer su upravo ove vrste najzastupljeniji kontaminanti takvih supstrata. Koncentracija spora plijesni u takvim prostorima može biti veća od 10^4 CFU/m³, kao što je izmjereno u tvornici biogoriva (1.3×10^6 CFU/m³), farmi peradi (2.59×10^4 CFU/m³), kompostani (4.9×10^5 - 9.3×10^7 CFU/m³) i mlinu žitarica ($2,5 \times 10^4$ CFU/m³) (Madsen, 2006; Lugauskas i sur., 2004; Rimac i sur., 2010; Jakšić i Šegvić Klarić, 2012).

Spore plijesni mogu dugo vremena ostati u zraku te se mogu nakupljati u respiratornom traktu, a manje spore dolaze i do alveola (Eduard, 2006).

Plijesni mogu otpuštati i manje fragmente (Gorny, 2004) nastale lomom hifa ili spora, koji se također mogu nakupljati u respiratornom sustavu. Produkti plijesni koji mogu uzrokovati zdravstvene tegobe u ljudi su:

- alergeni koji uzrokuju reakcije preosjetljivosti tipa I unutar nekoliko minuta od izloženosti alergenu ili u rijetkim slučajevima reakcije preosjetljivosti tipa III (Gravesen i sur., 1999; Nielsen, 2002);
- β -1,3-glukani koji potiču upalne reakcije slične simptomima uočenim tijekom izloženosti endotoksinima (Rylander, 1997);
- mikrobne lakohlapljive organske komponente koje plijesni otpuštaju tijekom rasta (Pasanen i sur., 1998);
- mikotoksini koji su otpušteni iz spora ili fragmenata nakon inhalacije (Nielsen, 2003).

1.2.1. Alergeni plijesni

Lebdeće čestice plijesni (spore, konidije i fragmenti hifa) odgovorne su pojavu alergijskog rinitisa, bronhijalne astme i hipersenzibilnog pneumonitisa kod preosjetljivih osoba. Alergeni koji dovode do takvih reakcija su glikoproteini i ugljikohidrati velike molekulske mase (Achaz i sur., 1995). S obzirom na to da su spore većine plijesni vrlo male (manje od 10 μ m), mogu dosegnuti donje dišne puteve pluća i posredovati u alergijskim reakcijama. Mjesto u dišnom sustavu na kojem će se spora zadržati, također ovisi o tome da li ona ulazi u organizam kao pojedinačna ili u obliku agregata. Agregati malih konidija *Aspergillus fumigatus*, uzročnika alergijske bronhopulmonalne aspergiloze, obično se odlažu u gornjim dišnim putevima, dok manje individualne spore dosežu niže dišne puteve (Pepeljnjak i Šegvić, 2002).

Na testovima bronhijalne provokacije, spore i ekstrakti plijesni kod pacijenata uzrokuju reakcije preosjetljivosti rane i kasne faze (tip I i tip III). Više od 80 vrsta plijesni povezuje se sa simptomima alergija respiratornog trakta, a među njima su najznačajnije vrste iz rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Culvularia*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Stemphylium* (Kurup i sur., 2000).

1.2.2. Glukani

Glukani su polisaharidi glukoze koji predstavljaju glavnu strukturalnu komponentu staničnih stijenki gljivica. Fungalni glukani, osobito β -(1 \rightarrow 3)-D-glukani, kao induktori kroničnih plućnih bolesti, povezuju se sa pojavom znakova nespecifične upale. Njihova u vodi netopiva forma uzrokuje zakašnjeli odgovor koji se očituje smanjenjem broja makrofaga i limfocita u stijenci pluća, 1-7 dana od izlaganja. Glukani u koncentracijama višim od 1 ng/m³ uzrokuju simptome kroničnog bronhitisa, bolove u zglobovima, svrbež nosa, pritisak u prsima i osjećaj težine u glavi. Zbog toga glukani mogu služiti i kao markeri rizika upale dišnih puteva (Piecková i Jesenská, 1999).

1.2.3. Hlapljive organske tvari

Hlapljive organske tvari (alkoholi, aldehidi, esteri, hidrokarboni, terpeni, ketoni, kiseline i druge supstance male molekularne mase) mogu biti uzrok neugodnog mirisa u vlažnim stambenim prostorima (Piecková i Jesenská, 1999). Istraživanja su pokazala da plijesni tvore veliki broj hlapljivih organskih spojeva. Količina i vrsta hlapljivih organskih spojeva ovisi o okolišnim uvjetima i biološkim svojstvima producenta. Neki od tih spojeva pripadaju skupini poznatih kancerogena, kao što su etilheksanol i benzen, a produkti su vrsta *Aspergillus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium* i *Penicillium* (Pieckova, 2012).

1.2.4. Mikotoksini

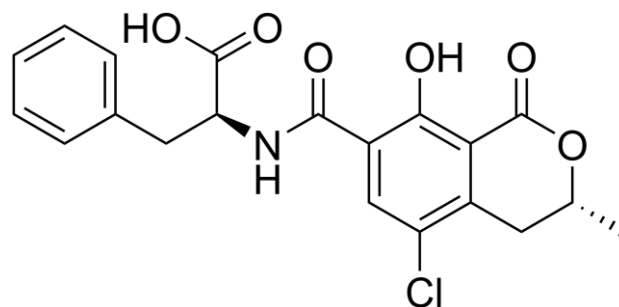
Toksični učinci mikotoksina (najčešćih kontaminanata hrane) nakon gastrointestinalne apsorpcije su poznati, no malo se zna o koncentraciji u plazmi i tkivima nakon inhalacije mikotoksina te o zdravstvenim posljedicama povezanim s ovim načinom unošenja u organizam (Bennett i Klich, 2003; Nielsen, 2003). Toksični učinci hranom unesenih mikotoksina (žitarice, sjemenke, orašasti plodovi, sušeno voće i povrće, grah, itd.), vrlo su različiti, te mogu uzrokovati akutno ili kronično oštećenje jetre, bubrega, gastrointestinalnog trakta, srca, centralnog živčanog sustava i imunološkog sustava. Sojevi *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* mogu proizvoditi aflatoksine koji imaju hepatotoksično i kancerogeno djelovanje.

Okratoksin A - nefrotoksični mikotoksin kojeg proizvode vrste *A. ochraceus* i *Penicillium verrucosum*, pronađen je u skladištenim usjevima. Vrste *Fusarium* i *Stachybotrys* proizvode makrocikličke trihotecene s potencijalnim učinkom na imunološki sustav i sintezu proteina. Sojevi *S. chartarum* proizvode dermatotoksične i citotoksične trihotecene stahibotritoksin i satratoksin. Trihoteceni koje proizvode plijesni, kao što su T-2 toksin, deoksinivalenol, diacetoksiskirpenol itd., mogu izazvati hemoragične sindrome. Neke plijesni mogu proizvoditi i zearalenon – mikotoksin s estrogenim djelovanjem. Vrste *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans* i *F. proliferatum* koji uzrokuju kvarenje kukuruza, proizvode fumonizine, koji izazivaju leukoencefalomalaciju kod konja i pulmonarni edem kod svinja te se dovode u vezu s razvojem raka jednjaka kod ljudi (Šegvić Klarić, 2012).

Kod unosa inhalacijom toksični učinci mikotoksina također mogu biti kronični i akutni. Akutni zdravstveni problemi uključuju pulmonarne mikotoksikoze, sindrom istovarivača silosa, sindrom toksičnih plijesni ili toksični sindrom organske prašine. U odnosu na podatke o akutnim stanjima izazvanim mikotoksinima, manje je podataka o učincima kronične aerogene izloženosti mikotoksinima. Primjerice, aerogena izloženost aflatoksinima dovodi se u vezu s pojavom raka pluća. Naime, utvrđena je korelacija između izloženosti aflatoksinima i incidenciji raka pluća kod radnika koji su bili izloženi sjemenkama lana i kikirikija kontaminiranim s *Aspergillus flavus*. Povišena incidencija raka jetre zamijećena je kod radnika koji su bili izloženi dnevnoj dozi od 170 ng aflatoksina B₁, inhalacijom kontaminirane organske prašine. Eksperimentalno je pokazano je da *Aspergillus versicolor* na vlažnoj žbuci proizvodi kancerogeni sterigmatocistin, a *Penicillium expansum* na zidnim tapetama tvori citrinin i patulin koji moduliraju aktivnost fagocitoze (Gravesen i sur., 1994). Vrsta *S. chartarum* poznati je proizvođač izrazito citotoksičnih makrocikličkih trihotecena koji inhibiraju sintezu proteina. Proizvodi satratoksine (H, G, F), verukarine (J, B) i roridine (roridin E epimer, hidroksiororidin E). Toksični metaboliti trihoteceni kao što je stahibotritoksin proizvode se u sporama, a toksin se ispušta i u medij na kojem plijesan raste (Nielsen, 2003; Pasanen i sur., 1993; Pieckova, 2012).

1.3. *Aspergillus ochraceus*: aerogena izloženost i utjecaj na zdravlje ljudi

Vrsta *Aspergillus ochraceus* pripada skladišnim plijesnima koje su vrlo česti kontaminanti kukuruza i drugih žitarica. Ova vrsta je najznačajniji proizvođač OTA. Osim nje proizvode je i vrste *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum* i neke vrste iz rodova *Petromyces* i *Neopetromyces*. OTA je pronađen u namirnicama biljnog i životinjskog podrijetla kao što su: žitarice, grašak, kava, vino, pivo, svinjsko meso, sir te jaja (Peraica i sur., 2008). OTA je po kemijskoj strukturi 7-karboksi-5-klor-3,4-dihidro-3R-metilizokumarin, amidno vezan s L-fenilalaninom preko karboksilne skupine na položaju 7 kumarinske jezgre (Slika 1). Bezbojna je kristalična tvar ($M_r = 403,82$) koja pod UV svjetlom (366 nm) fluorescira plavo. Prema IARC (International Agency for Research on Cancer) OTA je svrstan u skupinu 2B (moguće karcinogeno djelovanje na ljude) (IARC, 1993). Nefrotoksičan je za sve ispitane monogastrične sisavce. Smatra se jednim od glavnih čimbenika odgovornih za endemsku nefropatiju i tumore urinarnog trakta (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007). Okratoksin A inhibira biosintezu makromolekula (proteini, RNA, DNA) i ATP-a. Povećava lipidnu peroksidaciju te negativno utječe na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija u biološkom sustavu. Do inhibicije sinteze proteina dolazi zbog kompeticije s fenilalaninom u reakciji aminoacilacije fenilalanin-tRNAPhe (Creppy i sur., 1984). Specifične izoforme citokroma P450 (CYP450 1A1, 3A4, 2D6, 2C9, 2A6 i 2E1) uzrokuju nastajanje OTA-DNA adukta i genotoksičnost OTA (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007; Pfohl-Leszkowicz i sur., 2007).



Slika 1. Kemijska struktura okratoksina A

Vrsta *A. ochraceus* se relativno rijetko pojavljuje u većim koncentracijama u zraku stambenih prostora, ali je česta na farmama životinja te u silosima žitarica. S obzirom da je OTA u nekoliko navrata detektiran u prašini radnog i stambenog

okoliša, prisustvo *A. ochraceus* u zraku takvih prostora ne smije se zanemariti. Skaug i sur. (2001) su uzorkovali prašinu i aerosole iz triju različitih staja. OTA je pronađen u 6 od 14 uzoraka s rasponom koncentracija 0,2-70 µg/kg. Sakupljene spore gljivica su također sadržavala ovaj toksin te je zaključeno da spore u zraku mogu biti značajan izvor OTA koji se može apsorbirati i preko pluća. Zabilježene su i koncentracije veće od 1500 ppb (Richard i sur., 1999). Daljnja istraživanja su pokazala da se OTA može naći i u filterima za hladnjak, zračnim filterima, odzračnicima i ostalim predmetima u zatvorenim vlažnim prostorima. Zato je sanacija vlažnih zidova važna u zaštiti od negativnog utjecaja plijesni (Thrasher, 2012). Apsorpcija preko pluća nakon inhalacijske izloženosti je brza, s bioraspoloživošću od čak 98% (Breitholtz-Emanuelsson i sur., 1995). Zabilježen je i slučaj akutnog otkazivanja bubrega zbog inhaliranog OTA nakon osmosatne izloženosti u silosu za žitarice iz kojeg je izoliran *A. ochraceus* (Dipaolo, 1994). Iako se često smatra da su spore plijesni glavni izvor OTA u zraku, neka istraživanja pokazuju da veću ulogu imaju čestice puno sitnije od spora (promjera 0.3 µm). Njihova koncentracija može biti i do 300 puta veća u odnosu na spore (Gorny i sur., 2002).

1.4. *Eurotium* spp.: aerogena izloženost i utjecaj na zdravlje ljudi

Eurotium vrste pripadaju teleomorfima (spolna faza) nekih aspergila, te kao i aspergile pripadaju primarnim kolonizatorima. *Eurotium herbariorum*, *E. rubrum*, *E. repens* i *E. amstelodami* su često izolirani u stambenim prostorima na zidnim tapetama i žbuci. Osim toga, nađeni su na različitim žitaricama, hrani za životinje, pekarskim proizvodima, sušenom voću, začinima i soli (Flanning i Miller 2001; Miller i sur., 2008; Butinar i sur., 2005). Mnogi eurociji mogu rasti na 37°C i uzrokuju infekcije dišnog sustava kod imunokompromitiranih bolesnika. Uz *Chaetomium globosum* i *A. fumigatus*, dominirali su u uzorcima prašine sakupljene u stanovima astmatične djece (Vesper i sur., 2007). Ove vrste nisu prepoznate kao proizvođači mikotoksina zbog čega njihova toksičnost za dišni sustav nije istraživana. Međutim, Nielsen (2002) je pokazao da *Eurotium* spp. proizvode znatno veći broj metabolita nego primjerice *A. versicolor*. Među metabolitima su dokazani neokinulin A i B, epihevedrid, flavoglaucin, auroglaucin, izotetrahidroauroglaucin, ehinulin, i kladosporin (Slack i sur., 2009). Za sada se o toksičnosti tih metabolita vrlo malo zna.

2. HIPOTEZA

U animalnoj i poljoprivrednoj proizvodnji (životinjske farme, silosi žitarica, mlinovi) kao i drvnoj industriji te u vlažnim stambenim prostorima ljudi su dugotrajno izloženi visokim koncentracijama aerogenih čestica različitih vrsta plijesni (>10000 CFU/m³, smatra se rizikom za zdravlje) među kojima često dominiraju *Aspergillus* vrste. Ove su vrste od posebnog značaja za zdravlje ljudi, ne samo zbog svojeg alergijskog i/ili invazivnog potencijala, nego i zbog tvorbe mikotoksina i to aflatoksina, okratoksina, sterigmatocistina, fumonizina te različitih alkaloida.

Tijekom 2012 (od siječnja do rujna) godine provedeno je istraživanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava mikoflore zraka u mlinu žitarica (Jasterbarsko) te stanovima i podrumima na području Zagreba s posebnim naglaskom na udio *Aspergillus* vrsta (*A. flavus*, *A. niger sensu lato* i *A. versicolor*) (neobjavljeni podaci). Pri tom je zabilježeno da se uz navedene vrste s visokom učestalošću pojavljuju *Aspergillus ochraceus* (do 60%) i teleomorfi nekih aspergilla - *Eurotium* spp. (do 100%), poglavito *E. herbariorum*. Vrsta *A. ochraceus* najznačajniji je proizvođač nefrotoksičnog mikotoksina, okratoksina A (OTA), čiji je mehanizam djelovanja najviše izučavan *in vitro* na bubrežnim stanicama, odnosno eksperimentalnim životinjama nakon oralne ili intraperitonealne aplikacije. Do sada je mali broj istraživanja posvećen djelovanju OTA u dišnom sustavu. Tako je OTA dokazan u uzorcima prašine iz radnog okoliša u širokom rasponu koncentracija, od 0,2-1500 µg/kg te su opisani slučajevi akutne toksikoze nakon inhalacije prašine s OTA (Richard i sur., 1999; Skaug i sur., 2001). S druge strane, *Eurotium* vrste proizvode čitav niz metabolita čiji toksični potencijal nije poznat. S obzirom da se eurocije i *A. ochraceus* u visokim koncentracijama istovremeno pojavljuju kao kontaminanti u mlinu postavlja se pitanje kako se ta izloženost odražava na zdravlje ljudi i koji su mehanizmi i interakcije njihovih metabolita. Hipoteza ovog rada je da lebdeće čestice *A. ochraceus* i *Eurotium herbariorum* sadrže metabolite koji toksično djeluju na epitelne stanice dišnog sustava te u kombinaciji mogu imati potencirajuće toksično djelovanje.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Utvrditi pojavnost i koncentracije lebdećih čestica plijesni s posebnim naglaskom na vrste *A. ochraceus* i *E. herbariorum* u zraku mlina žitarica,

stanovima i podrumima jednokratnim uzorkovanjem u studenom 2012. godine.

- Ispitati sposobnost tvorbe OTA kod *A. ochraceus* i *E. herbariorum* u sporama te procijeniti inhaliranu koncentraciju OTA tijekom 24 sata.
- Ispitati citotoksičnost čistog OTA, ekstrakata spora *A. ochraceus* (ne-producenta i producenta OTA) i *E. herbariorum* na kulturi stanica ljudskog adenokarcinoma pluća A549.
- Procijeniti djeluju li ekstrakti spora *A. ochraceus* ne-producenta i producenta OTA u kombinaciji s *E. herbariorum* sinergistički, aditivno ili antagonistički.

3. METODE I MATERIJALI

3.1. Uzimanje uzoraka, izolacija i identifikacija pojedine vrste plijesni

Uzorci za daljni rad, prikupljeni su na tri različite lokacije (podrum, stan, elektromlin) te iz vanjskog zraka, u mjesecu studenom 2012. godine. Uzeto je po 20 uzoraka iz podruma, stana i mlina te 10 uzoraka iz vanjskog zraka. Pritom je korišten uređaj za uzorkovanje zraka (Airsampler MAS 100 Eco), pomoću kojeg je omogućena izravna depozicija spora iz zraka na podlogu DG-18 (dikloran - 18% glicerol). U mlinu je zbog velike zaprašenosti uzorkovano 10 L, a za stan, podrum i vanjski prostor uzorkovano je 50 L zraka. Na svim lokacijama bilježena je temperatura i vlažnost zraka. Nakon uzorkovanja, podloge s plijesnima inkubiraju se 5 dana na 25°C, nakon čega se broje i izraze kao jedinice koje tvore kolonije u kubičnom metru zraka (CFU/m³).

Prije identifikacije, plijesni je potrebno izolirati na CYA (Czapek Yeast Autolysate) agar i inkubirati 7 dana na 25°C. Zrele askospore produciraju se unutar 14 dana. Potom se makroskopski promatraju kolonije te napravi preparat za mikroskopiranje bojan plavim laktofenolom. Identifikacija je obavljena prema Pitt and Hocking (2009).

- ***Aspergillus ochraceus*** – kolonije na CYA promjera su 40-55 mm, ravne ili izdignute. Micelij je bijel s gusto pakiranim konidijalnim glavicama, svijetložute do zlatnožute boje. Moguća je produkcija sklerocija. Stvara žutosmeđe (oker) konidije, a metule i filijade prekrivaju čitavu površinu vezikla.
- ***Eurotium amstelodami*** – kolonije na CYA promjera su 14-18 mm, guste i ravne. Micelij je neupadljiv, bijele ili žute boje. Centralno smješten kleistotecij, okružen je dobro formiranim konidijalnim glavicama, svijetlo do tamnozeleno boje. Revers je svijetlozelen, ponekad tamnozelen. Askospore su vidljivo ukrašene nepravilnim brazdama i hrapave stijenke.
- ***Eurotium repens*** – kolonije na CYA promjera su 10-20 mm. Micelij je bijel, žut ili narančast, a konidijalne glavice bezizražajne zelene do plave boje. Revers je blijede žute, zelene ili narančaste boje, gotovo bezbojan, a rjeđe žut ili narančast. Askospore imaju glatke stijenke, bez brazda.

- ***Eurotium rubrum*** – kolonije na CYA promjera su 10-20 mm, guste i ponekad pahuljaste. Micelij je žut do svijetlo narančast. Konidiofori i kleistotecij u razvoju obično su prisutni, ali loše razvijeni. Revers je svijetlo žut do narančastosmeđ. Pod mikroskopom moguće je naići na zreli kleistotecij koji puca i oslobađa askospore. Askospore imaju definiranu uzdužnu brazdu. Starenjem, kolonija poprima karakterističnu crvenu boju.
- ***Eurotium herbariorum*** – po mnogim osobinama nalikuje plijesni *E. rubrum*. Kolonije na CYA, su promjera do 10 mm, a askospore nešto veće od onih *E. rubrum*.

3.2. Ispitivanje tvorbe okratoksina A kod *A. ochraceus* i *E. herbariorum*

3.2.1. Utvrđivanje producenata okratoksina A tankoslojnom kromatografijom

Radi utvrđivanja producenata OTA, izolirani sojevi vrsta *A. ochraceus* i *E. herbariorum* te standardni soj (producent) *A. ochraceus* NRRL 3174 inokuliraju se u mediju koji sadrži 2% kvašćevog ekstrakta i 10% saharoze (YES – medij) i inkubiraju 10 dana na 25°C. Nakon inkubacije, medij i porasla biomasa ekstrahiraju se s diklormetanom (50 mL) na tresilici preko noći. Biomasa se filtrira, a diklormetanska faza odijeli se od vodene preko bezvodnog Na₂SO₄ te upari do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača na temperaturi 70°C i atmosferskom tlaku. Suhi ostatak otopi se dodatkom 5 ml CH₂Cl₂ te ponovno upari do suha.

Suhi ostaci dobiveni ekstrakcijom iz biosinteze, otope se u određenom volumenu CH₂Cl₂ (0,5 do 2 mL) te se nanese na prethodno pripremljenu ploču silikagela (G-25, UV₂₅₄) u volumenu od 10 μL, uz 2 μL poredbene otopine OTA (0,2 mg/mL). Kao mobilna faza koristi se toluen-etilacetat-mravljja kiselina, volumnih udjela 5:4:1. Nakon razvijanja, kromatogram se promatra pod UV lampom (366 nm).

3.2.2. Ekstrakcija spora

OTA-pozitivni sojevi *A. ochraceus*, standardni soj *A. ochraceus* NRRL 3174 te jedan soj *E. herbariorum* uzgojeni su tijekom 10 dana na DG-18 podlozi nakon čega su spore iz zračnog micelija ekstrahirane 5 mL metanola. Potom se što je moguće više metanola sa sporama pokupi s ploče te prenese u prethodno izvagane plastične epruvete (Falcon). Spore se broje pomoću hemocitometra (20 μ L) pod mikroskopom te se njihov broj izrazi kao broj spora/mL. Suspenzija se potom podvrgava sonikaciji pri frekvenciji od 15 kHz, u vremenu od 90 s kako bi se razbile ovojnice spora i oslobodio njihov sadržaj. Radi dobivanja suhog ostatka, sadržaj se uparava u struji dušika, a iz razlike odvaga dobije masa suhog ekstrakta koji se za HPLC analizu razrjeđuju metanolom HPLC čistoće.

3.2.3. Dokazivanje okratoksina A tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Za kvantitavno određivanje koncentracije OTA u uzorcima ekstrakata spora *A. ochraceus* i standardnog soja *A. ochraceus* NRRL 3174, korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). S obzirom da ovi uzorci sadržavaju i mnoge druge tvari, nečistoće i primjese koji uzrokuju šum i tako onemogućavaju detektiranje OTA, uzorke je potrebno prvo propustiti kroz imunoafinitetnu kolonu. Imununoafinitetna kolona obložena je protutijelima koja specifično vežu OTA, a koji se u kasnijem koraku lako eluira s kolone. Kolona se najprije kondicionira s 5 mL metanola, te priključi na vakuum sisaljku tako da metanol curi kroz kolonu brzinom od 1-2 kapi u sekundi. Potom se na kolonu stavlja 1 mL uzorka, 10 mL mikotoksinske tekućine za ispiranje i 10 mL deionizirane vode. Ovim postupkom vrši se tzv „pranje uzroka“ te samo OTA ostaje vezan za kolonu. OTA se eluira s kolone dodatkom 1,5 mL metanola i upari u struji dušika. Suhi ostatak otapa se u 500 μ L mobilne faze te stavlja u uređaj za HPLC. Uređaj za HPLC sastoji se od izokratne pumpe, injektora i fluorescentnog detektora (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Odjeljivanje se vrši na analitičkoj koloni (125.0x4.0 mm) spojenoj s predkolonom (4.0x4.0 mm) (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Germany), koje se ispunjene su česticama veličine 5 μ m. Rezultati kromatografija prikupljeni su i obrađeni s LC Solution softverom (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Na kromatogramu se prema standardnoj otopini OTA odredi

vrijeme u kojem se OTA pojavljuje na izlazu iz kolone, a to je otprilike u osmoj minuti. Površina ispod pika odgovara koncentraciji OTA u uzorku. Za detekciju OTA, koristi se mobilna faza koja sadrži metanol, vodu i octenu kiselinu (70:30:2 V/V/V), a brzina protoka podesi se na 0,5 mL/min. Na detektoru fluorescence, valna duljina ekscitacije podesi se na 336 nm, a valna duljina emisije na 464 nm. Donja granica za detekciju OTA ovom metodom iznosi 0,05 ng/mL.

3.3. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja okratoksina A i ekstrakata spora *A. ochraceus* i *E. herbariorum*

3.3.1. Kultura stanica

Za potrebe testiranja citotoksičnosti *in vitro*, korištene su stanice ljudskog adenokarcinomatnog tkiva pluća soja A549, uzete iz Europske zbirke staničnih kultura (ECACC – European Collection of Cell Cultures, Velika Britanija). Stanice se uzgajaju u RPMI 1640 mediju (GIBCO, Invitrogen) uz dodatak 2 mM glutamina i toplinski inaktiviranog 10% (V/V) telećeg fetalnog seruma (GIBCO, Invitrogen) te antibiotika penicilina (100 IU/mL) i streptomicina (100 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.

3.3.2. MTT test

MTT test je jednostavna, ekonomična i brza metoda ispitivanja citotoksičnog učinka određenih tvari i proliferacije stanica u *in vitro* uvjetima. Temelji se na redukciji tetrazolijeve soli MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid] mitohondrijskom sukcinat-dehidrogenazom metabolički aktivnih stanica. Tada iz svijetložutog supstrata odnosno MTT nastaju tamnoljubičasto obojeni kristali formazana koji se nakupljaju u stanicama. Dodatkom kiselog izopropanola, kristali formazana oslobađaju se u medij i otapaju. Intezitet nastalog obojenja možemo odrediti spektrofotometrijski korištenjem automatskog čitača mikrotitarskih pločica, na valnoj duljini od 540 nm. Predloženo je da je količina nastalog formazana

proporcionalna broju vijabilnih stanica. Postotak vijabilnih stanica izražava se kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole.

Ispituje se citoksičnost:

- Čistog OTA u rasponu koncentracija od 0,2 $\mu\text{g/mL}$ do 80 $\mu\text{g/mL}$ otopljenog u apsolutnom etanolu
- Ekstrakata *A. ochraceus* koji su producenti okratoksina A (OTA +) i onih koji nisu (OTA -) otopljenih u dimetilsulfoksidu (DMSO)
- Ekstrakta *E. herbariorum* (nije producent OTA) otopljenog u DMSO
- Kombinacija *A. ochraceus*-OTA(+) i *E. herbariorum*
- Kombinacija *A. ochraceus*-OTA(-) i *E. herbariorum*

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. Stanične kulture A549 uzgaja se do eksponencijalne faze rasta (24-satna inkubacija pri 37° C, 95% vlažnosti i 5% CO₂)
2. Stanica se razrijeđuju RPMI 1690 hranjivim medijem s 10% telećeg fetalnog seruma do gustoće od 100 000 stanica/mL
3. Dodaje se 100 μL suspenzije stanica u određeni broj jažica mikrotitarske pločice s 96 jažica, slijedi inkubacija 24 sata
4. Medij se odsiše vakuum sisaljkom te se ponovno dodaje RPMI 1690 hranjivog medija, ali bez seruma te inkubira 18 sati
5. Stanicama se dodaju priređene radne otopine čistog OTA, ekstrakata spora te otapala (3% etanol i 1% DMSO) kao kontrola, inkubira se 24 h.
6. Medij se odsiše i doda se 100 μL MTT reagensa, prethodno razrijeđenog hranjivim medijem do koncentracije 0,5 mg MTT/mL medija, inkubira se 3,5 sati pri temperaturi 37° C, 95% vlažnosti, 5% CO₂
7. Medij se pažljivo ukloni vakuum-sisaljkom
8. Kristali formazana se otapaju dodatkom 150 μL 0,04 M HCl u apsolutnom izopropanolu. Boja se razvija na tresilici 10 minuta na 25°C.

9. Absorbancija se mjeri na 540 nm pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Labsystem iEMS, tip 1404)

3.4. Statistika

Rezultati koncentracija spora plijesni u svim lokacijama uzorkovanja prikazane su kao srednje vrijednosti CFU/m³ i standardna devijacija (SD) te minimalnim i maksimalnim vrijednostima. Vijabilnost A549 stanica (%) također je prikazana je kao srednja vrijednost i SD. Citotoksična koncentracija OTA (IC₅₀), odnosno ekstrakata spora dobivena je linearnom regresijom. Statistička značajnost razlike između koncentracija spora plijesni u lokacijama uzorkovanja kao i značajnost razlike između vijabilnosti kontrolnih i tretiranih A549 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 vijabilnosti stanica i njihovih standardnih pogrešaka aritmetičke sredine (SEM) za kombinacije ekstrakata spora *A. ochraceus* (AO-OTA(+)) i *A. ochraceus* (AO-OTA(-)) i *E. herbariorum* (EH) testiran je t-testom za nezavisne uzorke kako bi se utvrdilo djeluju li kombinacije ekstrakata aditivno, sinergistički ili antagonistički na sljedeći način:

$$\bar{X}_{\text{(očekivana za AO-OTA(+) + EH)}} = \bar{X}_{\text{(izmjerena za AO-OTA(+) + EH)}} + \bar{X}_{\text{(izmjerena za EH)}} - \bar{X}_{\text{(kontrola)}}$$

$$\text{SEM}_{\text{(očekivana za AO-OTA(+) + EH)}} = [\text{SEM}^2_{\text{(AO-OTA(+) + EH)}} + \text{SEM}^2_{\text{(EH)}}]^{1/2}$$

$$t = \frac{\bar{X}_{\text{(očekivana za AO-OTA(+) + EH)}} - \bar{X}_{\text{(izmjerena za AO-OTA(+) + EH)}}}{[\text{SEM}^2_{\text{(očekivana za AO-OTA(+) + EH)}} + \text{SEM}^2_{\text{(izmjerena za AO-OTA(+) + EH)}}]^{1/2}}$$

Vrijednost t se uspoređuje s graničnom vrijednosti t uz zadani broj stupnjeva slobode (Petz, 1997).

Rezultati se interpretiraju 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. Plijesni u zraku mlina žitarica, stanova i podruma

U tablici 1. prikazana je učestalost pojavljivanja različitih rodova i vrsta plijesni u uzorcima zraka uzetih iz podruma, stanova, mlina i vanjskog zraka. Detektirane su plijesni iz 9 različitih rodova, među kojima dominiraju vrste iz rodova *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.* i *Wallemia spp.* U mlinu dominiraju plijesni iz roda *Eurotium* (100%), *Penicillium* (95%), *Aspergillus* (85%) i *Wallemia* (85%). Pritom najveću pojavnost pokazuju *E. herbariorum* (100%) i *E. rubrum* (95%). Najmanje je onih iz rodova *Fusarium* (10%) i *Mucor* (10%) te *A. terreus* (5%). U stanu dominiraju plijesni koje pripadaju aspergilima (75%) i penicilijama (100%), a najmanje su zastupljene plijesni iz roda *Ulocladium* (5%). U podrumu dominiraju penicilije (90%) i kladosporije (80%). Najmanje je onih i roda *Alternaria* (10%) te vrste *E. repens* (5%). U vanjskom zraku dominiraju penicilije (100%) i kladosporije (90%), a najmanje ima eurocija.

U tablici 2. prikazane su ukupne koncentracije plijesni u zraku izražene kao jedinice koje tvore kolonije po kubičnom metru zraka (CFU/m³). Pritom je vrijednost CFU/m³ izražena kao srednja vrijednost (sv) ± standardna devijacija (SD). Također su prikazani i rasponi (Min-max) u kojima se kreću koncentracije plijesni u zraku. U prvom dijelu tablice prikazane su apsolutne vrijednosti dobivene uzorkovanjem na različitim lokacijama, a u drugom dijelu procijenjene vrijednosti tih koncentracija koje su iščitane iz tablice dobivene od proizvođača uređaja za uzorkovanje. Procijenjene vrijednosti iz tablice izračunate su prema Fellerovoj formuli ($Pr = N \frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \frac{1}{N-r+1}$) (Feller, 1950). Apsolutna i procijenjena ukupna koncentracija spora (6270 ± 2661 i 6940 ± 3241) veća je u mlinu u odnosu na stanove, podrum i vanjski zrak ($P < 0,05$).

U tablici 3. prikazane su koncentracije navedenih plijesni kao CFU/m³ (srednja vrijednost ± standardna devijacija) te raspon u kojima se kreću (Min–max). Apsolutna koncentracija spora plijesni *A. ochraceus* (60 ± 110) značajno je veća od one izmjerene u stanu ($P < 0,05$), dok se između ostalih lokacija koncentracije statistički značajno ne razlikuju. Apsolutne koncentracije eurocija u mlinu, statistički značajno su veće od onih izmjerenih u stanovima, podrumu i vanjskom zraku ($P < 0,05$), dok se koncentracije izmjerene na lokacije međusobno statistički značajno ne razlikuju.

U zraku mlina, najviša zabilježena koncentracija spora pripada vrsti *E. herbariorum* (1155 ± 1620) i veća je od onih na ostalim lokacijama (P<0,05) te od koncentracije spora ostalih eurocija.

Tablica 1. Učestalost plijesni u zraku mlina, stanova, podruma i vanjskog okoliša

Vrste plijesni	Učestalost (%)			
	MLIN	STAN	PODRUM	VANJSKI
<i>Alternaria spp.</i>	5	0	10	0
<i>Aspergillus spp.</i>	85	75	50	30
<i>Sekcija Flavi</i>	55	0	15	30
<i>Sekcija Nigri</i>	15	5	15	0
<i>Sekcija Versicolores</i>	40	65	45	10
<i>Aspergillus terreus</i>	5	0	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	30	0	25	0
<i>Cladosporium spp.</i>	65	65	80	90
<i>Eurotium spp.</i>	100	25	70	30
<i>E. herbariorum</i>	100	15	60	5
<i>E. rubrum</i>	95	15	45	10
<i>E. amstelodami</i>	65	0	30	10
<i>E. repens</i>	40	0	5	0
<i>Fusarium spp.</i>	10	0	0	0
<i>Mucor spp.</i>	10	0	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	95	100	90	100
<i>Ulocladium spp.</i>	25	5	35	0
<i>Wallemia spp.</i>	85	15	55	50

Tablica 2. Apsolutne i procijenjene* koncentracije plijesni u zraku mlina, stanova, podruma i vanjskog okoliša

LOKACIJE UZORKOVANJA				Temperatura (°C)	Relativna vlažnost zraka (%)
MLIN (CFU/m³)				10,2	66
(sv ± SD)	Min-max	(sv ±SD)*	Min-max*		
6270 ± 2661 ^a	1700 – 12600 ^a	6940 ± 3241 ^a	1700 – 15100 ^a		
STAN (CFU/m³)				18,6	49
(sv ± SD)	Min-max	(sv ±SD)*	Min-max*		
223 ± 107.1	40 - 420	224 ± 109.1	40 - 420		
PODRUM (CFU/m³)				13,9	40
(sv ± SD)	Min-max	(sv ±SD)*	Min-max*		
1203 ± 1444	180 - 5060	1539 ± 2205	180- 8000		
VANJSKI (CFU/m³)				2,8	46
(sv ± SD)	Min-max	(sv ±SD)*	Min-max*		
240 ± 62.54	120 - 340	240 ± 62.54	120 - 340		

Legenda: sv – srednja vrijednost

SD – standardna devijacija

^a - P<0,05 – CFU/m³ u mlinu vs stanovi, podrumi, vanjski okoliš

Tablica 3. Koncentracija *A. ochraceus* i *Eurotium spp.* u zraku mlina, stanova, podruma i vanjskog okoliša

Vrste plijesni	MLIN		STAN		PODRUM		VANJSKI ZRAK	
	CFU/m ³							
	sv ± SD	Min-max	sv ± SD	Min-max	sv ± SD	Min-max	sv ± SD	Min-max
<i>A. ochraceus</i>	60 ± 110 ^b	0-400	0 ± 0	0-0	13 ± 33	0-140	0 ± 0	0-0
<i>E. herbariorum</i>	1155 ± 1620 ^a	100-5500	16 ± 49	0-200	57 ± 79	0-240	3 ± 8	0-20
<i>E. rubrum</i>	625 ± 724 ^a	0-2700	3 ± 7	0-20	41 ± 62	0-200	10 ± 22	0-60
<i>E. amstelodami</i>	210 ± 48 ^a	0-700	2 ± 6	0-20	9 ± 17	0-60	6 ± 14	0-40
<i>E. repens</i>	105 ± 143 ^a	0-400	0 ± 0	0-0	1 ± 4	0-20	0 ± 0	0-0

Legenda : ^a - P<0,05 - CFU/m³ u mlinu vs stanovi, podrumi, vanjski okoliš

^b - P<0,05 - CFU/m³ u mlinu vs stanovi

4.2. Okratoksin A u ekstraktima *A. ochraceus* i *E. herbariorum*

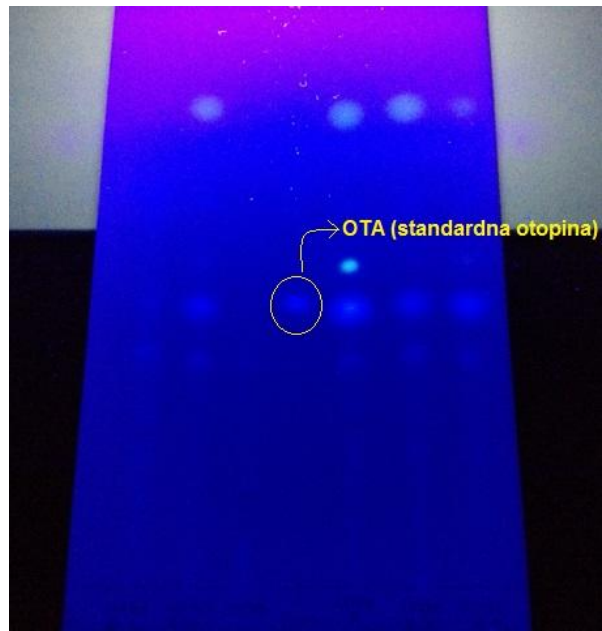
Tankoslojnom kromatografijom utvrđena je prisutnost OTA u 5 od 6 ispitanih ekstrakata *A. ochraceus* (slika 2.), a nije pronađen niti u jednom ekstraktu *E. herbariorum*.

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti potvrđena je prisutnost okratoksina A te su određene njegove masene koncentracije u analiziranim uzorcima ekstrakata spora *A. ochraceus* i ekstraktu standardnog soja *A. ochraceus* NRRL 3174 nakon biosinteze. Na slici 3A. prikazan je kromatogram standardne otopine OTA, a na slici 3B. kromatogram jednog uzorka s jasno vidljivim pikom OTA koji se pojavljuje u približno isto vrijeme kada i pik standarda. Masena koncentracija OTA u standardnom soju *A. ochraceus* NRRL 3174 iznosi 0,366 mg/mL, a u tri uzorka ekstrakata spora *A. ochraceus* iznosi 0,38 µg/mL, 6,5 µg/mL i 28 µg/mL.

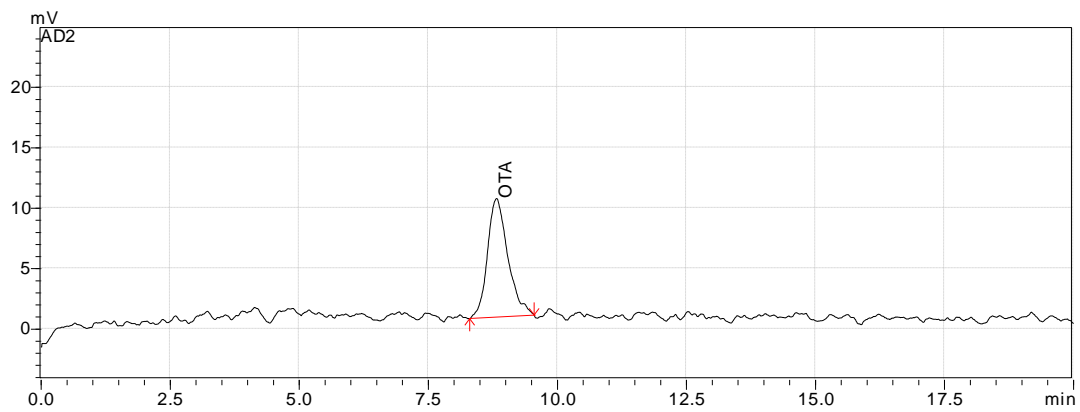
Moguće je izračunati približnu dozu OTA koju osoba inhalira prema izrazu:

$$D = \frac{C_{\text{mikotoksina}} \cdot N \cdot BR \cdot FR \cdot BA}{WT}$$

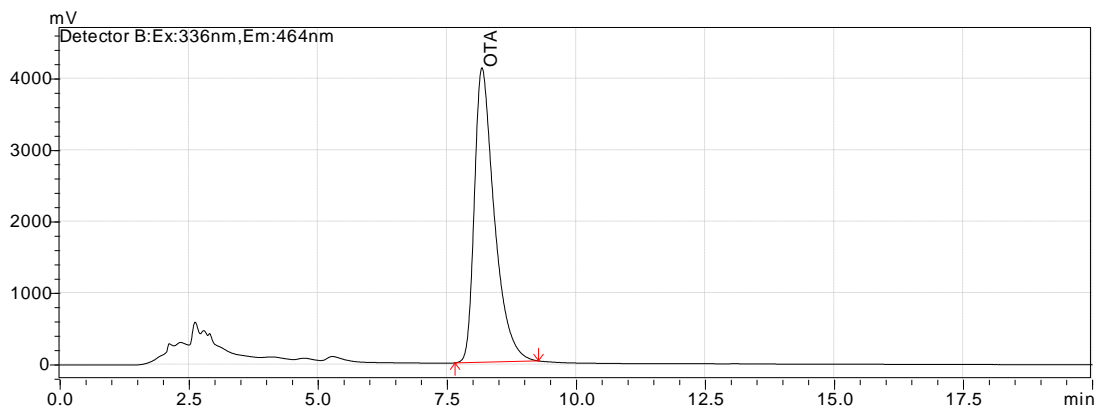
gdje je D doza mikotoksina (µg/kg dnevno), $C_{\text{mikotoksina}}$ je koncentracija mikotoksina po spori (µg/spori), N je broj spora u 1 m³ zraka, BR je inhalirani volumen zraka (m³/24 sata), FR je frakcija inhaliranih spora koje su zadržane u plućima, BA je frakcija mikotoksina koja je otpuštena i biološki raspoloživa, WT je masa ljudskog tijela u kg (Kelman i sur., 2004). Preporučeno se uzimaju vrijednosti: BR = 15,2 m³/24 sata, FR = 1, BA = 1, WT = 78,1 kg. Za izračunavanje $C_{\text{mikotoksina}}$ uzeta je najveća koncentracija OTA (28 µg/mL) određena HPLC-om i broj spora izbrojen hemocitometrom (28 000 000 spora/mL), pri čemu se dobije vrijednost od 10⁻⁶ µg(OTA)/spori. Ako se u obzir uzmemo maksimalnu koncentraciju spora *A. ochraceus* (N = 400 CFU/m³) u mlinu, doza mikotoksina koja se dnevno inhalira tada iznosi 8 x 10⁻² ng/kg. Ako uvrstimo maksimalnu ukupnu koncentraciju spora (15100 CFU/m³) u mlinu, dobijemo vrijednost od 3 ng/kg. Obje vrijednosti su 200, donosno 5 puta manje od vrijednosti tolerirajućeg dnevnog unosa OTA koja iznosi 17 ng/kg (EFSA, 2006).



Slika 2. Kromatogram – ekstrakti *A. ochraceus* pozitivni na OTA pod UV (366 nm)



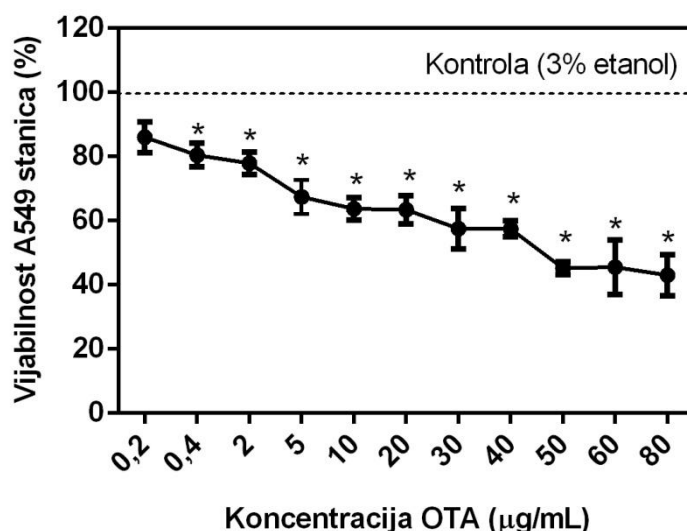
Slika 3A. Diferencijalni kromatogram standardne otopine OTA



Slika 3B. Diferencijalni kromatogram uzorka

4.3. Citotoksičnost okratoksina A za A549 stanice

Za određivanje vijabilnosti A549 stanica nakon 24-satnog izlaganja okratoksinu A različitim koncentracija (od 0,2 do 80 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 0,5 do 200 μM) korišten je MTT test. Na slici 4. prikazan je citotoksični potencijal OTA. Već koncentracija OTA od 0,4 $\mu\text{g/mL}$ (1 μM) statistički značajno smanjuje vijabilnost stanica za 20% ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (3% etanol). Najveća primijenjena koncentracija OTA od 80 $\mu\text{g/mL}$ (200 μM) smanjuje vijabilnost stanica za 57% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Linearnom regresijom je izračunato da inhibitorna koncentracija OTA za 50% stanica (IC_{50}) iznosi 53 $\mu\text{g/mL}$ (132 μM).



Slika 4. Vijabilnost A549 stanica nakon 24-satnog tretiranja s OTA u rasponu koncentracija od 0,2 do 80 $\mu\text{g/mL}$ (0,5 do 200 μM)

* $P < 0,05$ – vijabilnost tretiranih stanica u odnosu na kontrolu

4.4. Citotoksičnost ekstrakata spora *A. ochraceus* i *E. herbariorum* za A549 stanice

Na slici 5. prikazan je citotoksični potencijal ekstrakta spora *A. ochraceus* koji sadrži OTA (AO-OTA(+)), *A. ochraceus* koji ne sadrži OTA (AO-OTA(-)) i *E. herbariorum*.

Koncentracije ekstrakta spora AO-OTA(+) (manje i veće) su priređene prema najvećoj utvrđenoj koncentraciji OTA u ekstraktu spora (HPLC, 28 µg/mL).

Koncentracija ekstrakta spora AO-OTA(+) od 280 µg/mL smanjuje vijabilnost stanica za 20% u odnosu na kontrolu (1% DMSO) ($P < 0,05$). Koncentracije od 640 µg/mL do 2470 µg/mL statistički značajno smanjuju vijabilnost (68-86%) u odnosu na kontrolu (1% DMSO) te pokazuju veći citotoksični učinak na A549 stanice u odnosu na AO-OTA(-) i EH ($P < 0,05$). Najveća primijenjena koncentracija od 4940 µg/mL smanjuje vijabilnost stanica za 90% u odnosu na kontrolu (1% DMSO) i AO-OTA(-), ($P < 0,05$). Stoga, IC_{50} OTA u AO-OTA(+) ekstraktu spora je 10,5 µg/mL (26 µM), a to odgovara masenoj koncentraciji ekstrakta spora 934 µg/mL.

Najmanja primijenjena koncentracija ekstrakta spora AO-OTA(-) (92 µg/mL) djeluje proliferativno na A549 stanice (120%) u odnosu na kontrolu (1% DMSO), ($P < 0,05$). Koncentracije od 640 µg/mL do 4940 µg/mL smanjuju vijabilnost stanica za otprilike 20-30% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). IC_{50} AO-OTA(-) ekstrakta nije bilo moguće procijeniti jer najveća primijenjena koncentracija ekstrakta spora smanjuje vijabilnost za oko 30% u odnosu na kontrolu.

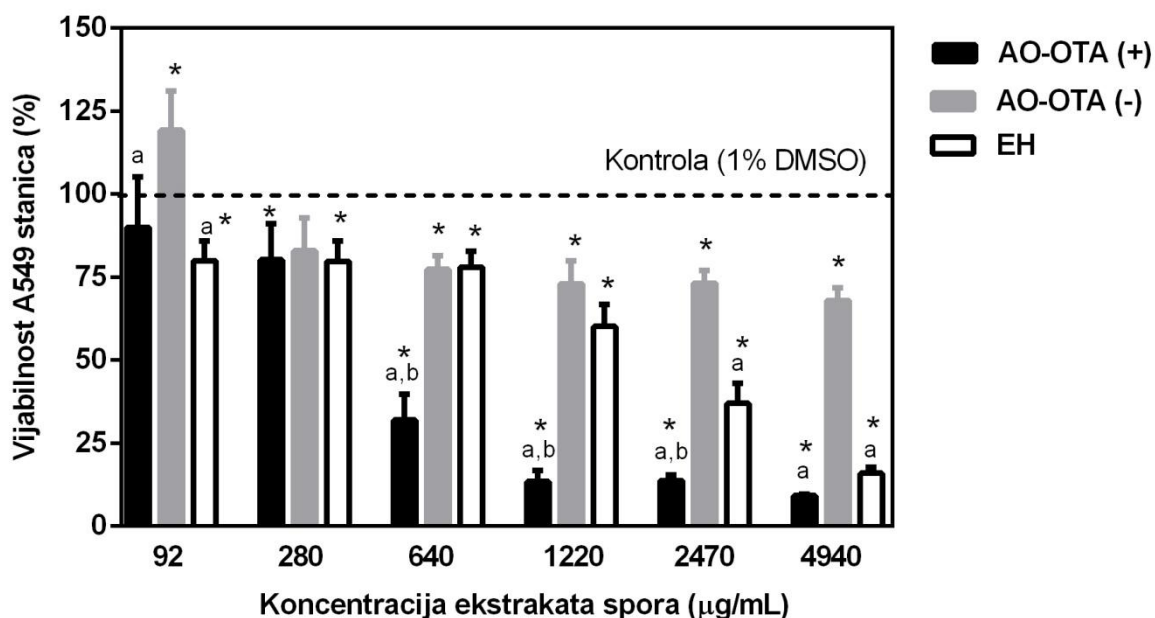
Najmanja koncentracija ekstrakta spora EH (92 µg/mL) smanjuje vijabilnost za 20% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te ima jači citotoksični učinak od AO-OTA(-) koji pri toj koncentraciji djeluje proliferativno. Najveća koncentracija (4940 µg/mL) statistički značajno smanjuju vijabilnost za otprilike 85% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) te pokazuje veći citotoksični učinak u odnosu na AO-OTA(-), ($P < 0,05$). Izračunato je da IC_{50} EH ekstrakta spora iznosi 2126 µg/mL.

Kako bi se ispitale moguće citotoksične interakcije ekstrakata spora *A. ochraceus*-OTA(+) i *E. herbariorum* (slika 6A.) te *A. ochraceus*-OTA(-) i *E. herbariorum* (slika 6B.), A549 stanice su 24 sata tretirane kombinacijama koncentracija 92, 280 i 640 µg/mL (EH + AO-OTA(+)) 280+92, 280+280, 280+640 i EH + AO-OTA(-) 280+92, 280+280, 280+640).

Kombinacija ekstrakta spora EH + AO-OTA(+) 280+92 smanjuje vijabilnost stanica za 30 %, EH + AO-OTA(+) 280+280 smanjuje vijabilnost za otprilike 75%, a EH + AO-OTA(+) 280+640 za 90% u odnosu na kontrolu (1% DMSO) ($P < 0,05$).

Kombinacija ekstrakta spora EH + AO-OTA(-) 280+92 smanjuje vijabilnost stanica za 10 %, no to smanjenje nije statistički značajno. EH + AO-OTA(-) 280+280 smanjuje vijabilnost za otprilike 30%, a EH + AO-OTA(-) 280+640 za 40% ($P < 0,05$).

Sve kombinacije ekstrakata spora osim EH + AO-OTA(+) 280+280, pokazale su aditivni učinak jer su izmjerene vrijednosti približno jednake očekivanim vrijednostima vijabilnosti stanica. Navedena kombinacija pokazuje sinergistički učinak jer je izmjerena vijabilnost statistički značajno manja od očekivane ($P < 0,05$) (Šegvić Klarić i sur., 2012b).

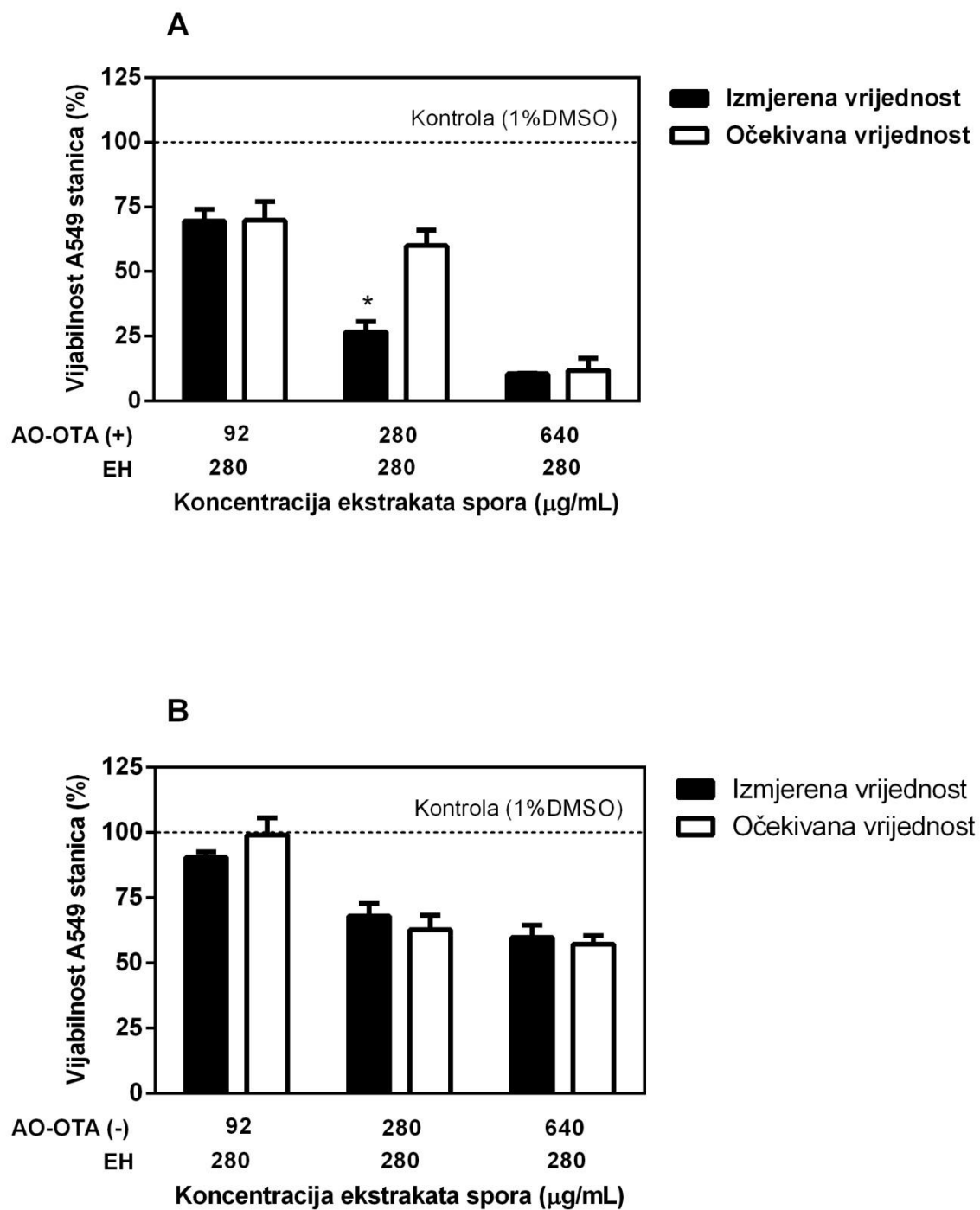


Slika 5. Vijabilnost A549 stanica nakon 24-satnog tretiranja s ekstraktima spora *A. ochraceus*-OTA(+), *A. ochraceus*-OTA(-) i *E. herbariorum* te u rasponu koncentracija od 92 do 4940 µg/mL. Priređene otopine ekstrakta *A. ochraceus*-OTA (+) sadrže OTA u koncentracijama 1, 3, 7, 14, 28, i 56 µg/mL

* $P < 0,05$ – vijabilnost tretiranih stanica u odnosu na kontrolu

a - ekstrakti AO-OTA(+) i EH u odnosu na AO-OTA(-)

b - ekstrakti AO-OTA(+) u odnosu na EH



Slika 6. Vijabilnost A549 stanica nakon 24-satnog izlaganja kombinacijama ekstrakata spora *A. ochraceus*-OTA (+) i *E. herbariorum* (A) te kombinacijama *A. ochraceus*-OTA (-) i *E. herbariorum* (B)

* $P < 0,05$ - sinergizam: očekivana vijabilnost vs izmjerena vijabilnost

5. RASPRAVA

Inhalacijska izloženost sporama i fragmentima plijesni uzrokuje niz respiratornih problema. Najvažniji fungalni alergeni su glikoproteini i ugljikohidrati velike molekulske mase, dok β -1,3-glukani potiču upalne reakcije (Achaz i sur., 1995; Rylander, 1997). Međutim, najštetniji su ipak mikotoksini koji djeluju preko brojnih mehanizama. Vrsta *Aspergillus ochraceus* je najznačajniji proizvođač OTA te se njegovo prisustvo u zraku, posebno stambenih i radnih prostora, ne smije zanemariti. Osim toga, ta vrsta je dobro zastupljena u lebdećim česticama u zraku (Korpi i sur., 1997). Eurociji su, kao teleomorfi nekih aspergila, također često prisutni u zatvorenim prostorima. Iako nisu prepoznati kao proizvođači mikotoksina, pokazali su veliku metaboličku aktivnost. No, još uvijek se malo zna o toksičnosti tih metabolita (Nielsen, 2002). U ovom radu je zbog toga ispitana pojavnost lebdećih čestica *A. ochraceus* i nekih eurocija, s naglaskom na *E. herbariorum*, kao i njihova citotoksičnost na A549 stanice. Područja uzorkovanja bila su mlin, stan, podrum te vanjski prostor u studenom 2012. Aspergili su, kao i eurociji, pronađeni na sve četiri lokacije, a najviše u mlinu (85%, odnosno 100%). Najveća pojavnost plijesni u mlinu posljedica je kontaminiranosti žitarica plijesnima koje se zajedno sa česticama prašine raspršuju zrakom. Tijekom studenog 2012. koncentracija lebdećih čestica plijesni u mlinu znatno je manja u odnosu na koncentracije izmjerne tijekom prijašnjih mjeseci (maksimum 262 800 CFU/m³) (neobjavljeni podaci). Stoga je i manja koncentracija ispitivanih vrsta plijesni. *A. ochraceus* je u manjem postotku pronađen u mlinu i podrumu, dok u stanu i vanjskom zraku nije bio prisutan. Vrste roda *Eurotium* su se pojavile u svim uzorcima iz mlina te nešto manje (70%) u uzorcima iz podruma. Od toga su *E. herbariorum* i *E. rubrum* najzastupljeniji. S obzirom na koncentracije spora plijesni u zraku, najveće su zabilježene u mlinu, sa značajnom razlikom naspram ostalih lokacija. Koncentracija spora u mlinu je iznosila i do 15100 CFU/m³. Zatim slijede podrum, stan te vanjski zrak. Kao što je navedeno u uvodnom dijelu, koncentracija spora veća od 10000 CFU/m³ predstavlja zdravstveni rizik kod profesionalne izloženosti zbog mogućeg razvoja različitih bolesti i alergija dišnog sustava. Obzirom na vrste, u svim područjima osim vanjskog zraka je najveću koncentraciju spora imala vrsta *E. herbariorum* (do 5500 CFU/m³), a zatim slijede *E. rubrum*, *E. amstelodami*, *E. repens* i *A. ochraceus*. U stanu i vanjskom zraku nisu

pronađene vrste *A. ochraceus* i *E. repens*, te su koncentracije spora u tim područjima znatno manje nego u mlinu.

Sposobnost tvorbe OTA je ispitana tankoslojnom kromatografijom te je 5 od 6 ekstrakata *A. ochraceus* bilo pozitivno na OTA. Ekstrakti *E. herbariorum* nisu pokazali sposobnost tvorbe OTA. Okratoksinogenost *E. herbariorum* je upitna. Naime, postoji nekoliko radova koji opisuju eurocije kao proizvođače OTA. Al-Julaifi (2003) navodi kako je na ječmu iz Saudijske Arabije vrsta *E. herbariorum* proizvodila OTA u koncentraciji od 214,77 mg/kg. U Poljskoj je opisana toksinogenost *E. herbariorum* na žitaricama i stočnoj hrani od max. 2,5 mg/kg OTA (Chelkowski i sur., 1987). Također, Bukelskiené i sur. (2006) zaključuju da *Eurotium amstelodami* može proizvoditi OTA na pšenici. Međutim, neka istraživanja genoma aspergila i eurocija dovode u pitanje postojanje gena koji kodiraju enzime za sintezu OTA (Frisvad i sur., 2004). HPLC analizom su naši rezultati potvrđeni i kvantificirani. Jedan uzorak je sadržavao čak 28 µg/mL ovog toksina. Izračunali smo dnevnu inhaliranu dozu mikotoksina koja za koncentraciju od 400 CFU/m³ spora i koncentraciju OTA od 10⁻⁶ µg/spori iznosi 8 x 10⁻² ng/kg. Za maksimalnu vrijednost koncentracije spora u mlinu od 15100 CFU/m³ te koncentraciju OTA od 10⁻⁶ µg/spori, dobivena vrijednost doze iznosi 3 ng/kg tjelesne mase. Obje vrijednosti su manje od vrijednosti tolerirajućeg dnevnog unosa OTA od 17 ng/kg (EFSA, 2006) što znači da ne bi trebalo biti štetnog utjecaja na stanice dišnog sustava čovjeka. S druge strane, u uzorcima koji su sakupljeni od siječnja do rujna 2012. koncentracija spora plijesni u mlinu bila je i do 262 800 CFU/m³ (neobjavljeni podaci) što znači da bi se dnevni unos (kad bi se radilo u potpunosti o OTA-toksinogenim plijesnima) mogao procijeniti na 50 ng/kg tj. t., odnosno 3 puta veći od tolerirajućeg.

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti okratoksina A za A549 stanice pokazali su da već koncentracija OTA od 0,4 µg/mL (1 µM) statistički značajno smanjuje vijabilnost stanica za 20% (P<0,05) u odnosu na kontrolu (3% etanol). IC₅₀ iznosi 53 µg/mL (132 µM). U usporedbi s tim, IC₅₀ za svinjske epitelne stanice bubrega (LLC-PK1) iznosi 20 µg/mL, a za bubrežne stanice afričkog zelenog majmuna (CV-1) iznosi 1 µg/mL (Schaaf i sur., 2002; Kamp i sur., 2005). Također, Šegvić Klarić i sur. (2012b) su odredili IC₅₀ za svinjske stanice bubrega (PK15) i ona iznosi 0,57 µg/mL (14 µM). Iz priloženog se može zaključiti da su bubrežne stanice mnogo osjetljivije na OTA od plućnih stanica. To je očekivan rezultat obzirom da su bubrežni tubuli njegovo ciljno mjesto djelovanja. O citotoksičnom djelovanju OTA na plućne stanice

ima vrlo malo podataka. Schulz i sur. (2004) su ispitivali citotoksičnost OTA za A549 stanice MTT testom te su dobili rezultat da IC_{50} vrijednost iznosi 14,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Razlika u rezultatu MTT testa ove i navedene studije može se objasniti razlikama u metodologiji. Naime, Schulz i sur. (2004) koristili su koncentraciju A549 stanica od 4000 stanica po jažici mikrotitarske pločice, dok je u ovom radu korištena koncentracija od 10000 stanica po jažici. Gušće raspoređene stanice međusobno lakše komuniciraju i uspostavljaju međustanične veze pa se na taj način učinkovitije odupiru djelovanju štetnih tvari iz okoline, a i vjernije prikazuju stvarno stanje u organizmu.

Ispitana je i citotoksičnost ekstrakata *A. ochraceus* (AO) i *E. herbariorum* (EH) na A549 stanice. Prema dobivenim citotoksičnim koncentracijama (IC_{50}), OTA u ekstraktu spora AO-OTA(+) je pet puta toksičniji od čistog OTA. AO-OTA(+) ekstrakt spora je oko 2 puta više toksičan za stanice od EH ekstrakta. Citotoksičnost EH može se pripisati moguće prisutnim metabolitima kao što su ehinulin A i B, epihevedrid, kladosporin, flavoglaucin, auroglaucin, izotetrahidroauroglaucin (Slack i sur., 2009). O toksičnosti ovih metabolita ima vrlo malo podataka starijeg datuma. Ali i sur. (1989) su ispitali toksičnost ehinulina na ženkama zečeva intraperitonealnom injekcijom od 10 mg/kg tjelesne težine pročišćenog ehinulina. Patološke studije organa su pokazale teška oštećenja alveola i odebljanje alveolarnih stijenki, kao i oštećenje jetre. Ehinulin je se pokazao toksičnim i za HeLa stanice u koncentraciji od 100 mg/mL (Umeda i sur., 1974). Novija istraživanja pokazuju da *E. herbariorum* proizvodi endometabolite koji djeluju izrazito ciliostatski (Piecková i sur., 2002), a inhibicija respiratornih cilija, među ostalim, čini osobu sklonijom infekcijama dišnog sustava. Spore zbog svog malog promjera (2,5-3,5 μm za AO te 6-7 μm kod *E. herbariorum*) mogu stvarati stabilnije bioaerosole te inhalacijom dospjeti dublje u pluća (Pitt i Hocking, 2009). Aerosoli promjera čestica < 5 μm se mogu apsorbirati preko alveola.

IC_{50} AO-OTA(-) ekstrakta nije bilo moguće procijeniti jer najveća primijenjena koncentracija ekstrakta smanjuje vijabilnost za oko 30% u odnosu na kontrolu. Kod koncentracije ekstrakta spora AO-OTA(-) od 92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je zabilježena proliferacija od oko 20% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Povećanjem koncentracija tog ekstrakta vijabilnost stanica se smanjuje.

Nakon 24-satnog izlaganja A549 stanica kombinaciji ekstrakata spora *E. herbariorum* i *A. ochraceus*-OTA (+) u koncentracijama ($\mu\text{g/mL}$) 280+92 i 640+280, zapažen je aditivni učinak ta dva ekstrakta na stanice, pri čemu je vijabilnost smanjena za 30%, odnosno 90%. Primjenom kombinacije AO-OTA(+) i EH jednakih koncentracija ekstrakata spora (280 $\mu\text{g/mL}$) je došlo do sinergističkog učinka u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Sve ispitivane kombinacije ekstrakata AO-OTA(-) i EH pokazale su aditivan učinak. Dakle, sekundarni metaboliti EH jesu bioaktivni te mogu povećati toksično djelovanje OTA. Radni okoliš kao što je mlin žitarica višestruko je opterećen lebdećim česticama plijesni u odnosu na stambeni prostor te predstavlja sredinu u kojoj su ljudi dugotrajno izloženi ovim plijesnima. S obzirom na pokazane interakcije ekstrakata metabolita u sporama ovih vrsta plijesni, može se pretpostaviti njihovo potencirajuće toksično djelovanje na dišni sustav ljudi pri dugotrajnoj izloženosti kod specifičnih zanimanja. U ovom radu je prvi put opisana citotoksičnost metabolita *E. herbariorum* samostalno te u kombinacijama s OTA(+) i OTA(-) ekstraktima *A. ochraceus* na plućne stanice.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja, o aerogenoj izloženosti ljudi plijesnima *A. ochraceus* i *E. herbariorum* u radnom i stambenom okolišu, te njihovom citotoksičnom učinku može se zaključiti sljedeće:

- U mlinu je zabilježena visoka pojavnost *Aspergillus* vrsta (85%) odnosno *A. ochraceus* (30%) te *Eurotium* vrsta (100%) odnosno *E. herbariorum* (100%) u odnosu na ostale lokacije. U visokom postotku pojavljuju se još i rodovi *Penicillium* i *Wallemia*.
- U mlinu su zabilježene najviše apsolutne i procijenjene ukupne koncentracije spora u odnosu na ostale lokacije.
- Koncentracija spora *A. ochraceus* u mlinu značajno je veća od one izmjerene u stanovima, a koncentracija spora *E. herbariorum* u mlinu značajno je veća od onih na ostalim lokacijama.
- Na temelju rezultata jednokratnog uzorkovanja u studenom 2012. i sposobnosti tvorbe OTA u sporama *A. ochraceus* izračunat je dnevni unos OTA inhalacijom (0,08 i 3 ng/kg tj.t.) što je 200, odnosno 5 puta manje od tolerirajućeg dnevnog unosa (17 ng/kg tj.t.).
- Citotoksična koncentracija IC₅₀ iznosi 53 µg/mL (132 µM) za čisti OTA, 10,5 µg/mL (26 µM) za OTA u ekstraktu spora AO-OTA(+), a što odgovara masenoj koncentraciji spora 934 µg/mL. IC₅₀ ekstrakta EH je 2126 µg/mL, dok IC₅₀ za AO-OTA(-) nije bilo moguće procijeniti.
- OTA u ekstraktu spora AO-OTA(+) je pet puta više toksičan od čistog OTA, dok je ekstrakt spora EH 2 puta manje toksičan od ekstrakta spora AO-OTA(+) za A549 stanice.
- Kombinacije ekstrakata spora EH+AO-OTA(+) i EH+AO-OTA(-) pokazuju aditivni citotoksični učinak, a jedna kombinacija čak i sinergistički učinak na A549 stanice.
- S obzirom na pokazane interakcije ekstrakata metabolita u sporama ovih vrsta plijesni može se pretpostaviti njihovo potencirajuće toksično djelovanje na dišni sustav ljudi pri dugotrajnoj izloženosti kod specifičnih zanimanja.

7. LITERATURA

- Achaz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., Ebner C., Prilinger H., Kraft D., Breitenbach M. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium berbarum*. *Mol Immunol*, 1995, 32, 213-227.
- Al-Julaifi M. Z. Ochratoxin A production by *Eurotium amstelodami* and *Eurotium* spp. isolated from locally grown barley in Saudi Arabia. *Kuwait Journal of Science*, 2003, 30, 2.
- Ali M., Mohammed N., Alnaqeeb M., Hassan R., Ahmad H. Toxicity of echinulin from *Aspergillus chevalieri* in rabbits. *Toxicology Letters* 48, 1989, 235–241.
- Bennett J., Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, srpanj 2003, 497-516.
- Bobić J., Gomzi M., Sick Building Syndrome: Do we live and work in unhealthy environment?. *Periodicum Biologorum*, 2009, 111, 79-84.
- Breitholtz-Emanuelsson A., Fuchs R., Hult K. Toxicokinetics of ochratoxin A in rat following intratracheal administration. *Natural toxins*, 1995, 3:2, 101-103.
- Bukelskienė V., Baltriukienė D., Repečkienė J. Study of health risks associated with *Aspergillus amstelodami* and its mycotoxic effects. *Ekologija*, 2006, 3, 42-47.
- Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 244(2), 229-234.
- Chelkowski J., Samson R. A., Wiewiórowska M., Goliński P. Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Grey (= *Eurotium herbariorum* Wiggers Link ex Gray) from cereal grains. *Die Nahrung*, 1987, 4, 267-269.

- Creppy, E. E., Roschenthaler, R., Dirheimer, G. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food Chem. Toxicol.*, 1984, 22, 883– 886.
- Dipaolo N., Guarnieri A., Garosi G., Sacchi G., Mangiarotti A. M. Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1994, 9, dodatak 4, 116-120.
- Eduard W. Fungal spores. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risk from Chemicals. *Arbete och Hälsa*, 2006 , 21, 1–145.
- Eduard W. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit Rev Toxicol*, 2009, 39(10), 799-864.
- EFSA Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food, EFSA-Q-2005-154. *EFSA J.* 365, 2006, 1-56.
- Feller W. An Introduction to the probability theory and its application, 175. John Wiley and Sons Inc, New York, 1950.
- Flannigan B., Miller J. D., 2001. Microbial growth in indoor environments. In: Flannigan B., Samson R. A., Miller J.D. (eds), *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control.*, London, Taylor & Francis, 2001, 35–67.
- Frisvad J. C., Frank J. M., Houbraken J. A. M. P., Kuijpers A. F. A., Samson R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 50, 2004, 23-43.
- Gorny R. L. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air – a review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* , 11, 2004, 185–197.

- Gorny R. L., Dutkiewicz J. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2002, 9, 17–23.
- Grant C., Hunter, C. A., Flannigan, B., Bravery, A. F. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1989, 25, 259–284.
- Gravesen S, Nielsen P. A., Iversen R., Nielsen K. F. Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Prospect*, 1999, 107, 505-508.
- Gravesen S., Frisvad J. C., Samson R. A. *Microfungi*. Copenhagen, Munksgaard, 1994.
- Hardin B. D., Kelman B. J., Saxon A. Adverse human health effects associated with molds in the indoor environment. *J. Occup. Environ. Med.* 2003, 45, 470-478.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Ochratoxin A. In: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon: IARC Press, 1993, 56, 489-521.
- Jakšić D., Šegvić Klarić M. Airborne moulds in grain mill and dwellings with special attention to *Aspergilli*: a pilot study. 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, September 26-30, Primošten, Croatia, P36.
- Kamp H. GH., Eisenbrand G., Schlatter J., Wurth K., Janzowski C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology* 206, 2005, 413-425.
- Kelman B., Robbins C., Swenson L., Hardin B. Risk from Inhaled Mycotoxins in Indoor Office and Residential Environments. *International Journal of Toxicology*, 2004, 23, 3-10.

- Korpi A., Pasanen A.-L., Pasanen P., Kalliokoski P. Microbial Growth and Metabolism in House Dust. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1997, 40, 19-27.
- Kurup V.P., Shen H.D., Banerjee B. Respiratory fungal allergy. *Microbes and Infection*, 2000, 2, 1101-1110.
- Lugauskas A., Prosychevas I., Levinskaitė L., Jaskėlevičius B. Physical and chemical aspects of long-term biodeterioration of some polymers and composites. *Environmental Toxicology*, 2004, 19, 318–328.
- Madsen A. M. Exposure to airborne microbial components in autumn and spring during work at Danish biofuel plants. *Ann Occup Hyg*, 2006, 50(8), 821-831.
- Miller J.D., Rand T.G., McGregor H., Solomon J., Yang C. Mold ecology: recovery of fungi from certain moldy building materials. In: Prezant B., Weekes D., Miller J.D. (eds). *Recognition, Evaluation and Control of Indoor Mold*. American Industrial Hygiene Association, Fairfax, 2008, 43–51.
- Nielsen K. F. Mould growth on building materials: Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Ph.D. Thesis, 2002.
- Nielsen, K. F., Review: mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 39, 103–117.
- Pasanen A. L., Korpi A., Kasanen J.P., Pasanen P. Critical aspects on the significance of microbial volatile metabolites as indoor air pollutants. *Environ*, 1998, 24, 703-712.
- Pasanen A. L., Nikulin M., Toumainen M., Berg S. Y., Parikka P., Hintikka E. L. Laboratory experiments on membrane filter sampling of airborne mycotoxins produced by *Stachybotrys atra* Corda. *Atmospheric Environ*, 1993, 27A, 9-13.
- Pepeljnjak S., Šegvić, M. Plijesni kao aeroalergeni. *Medix*, 2002, 40, 125-133.

- Peraica M., Domijan A. M., Sarić M. Mycotoxic and aristolochic acid theories of the development of endemic nephropathy. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2008, 59(1), 59-65.
- Petz B. *Osnovne statističke metode za nematematičare*, Naklada Slap, Zagreb, 1997.
- Pfohl-Leszkowicz A., Chakor K., Creppy E., Dirheimer G. DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Scientific Publications, 1991, 115, 245-253.
- Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R. A. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007, 51:1, 61-99.
- Pfohl-Leszkowicz A., Tozlovanu M., Manderville R., Peraica M., Castegnaro M., Stefanovic V. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51, 1131-46.
- Piecková E. Health effects of indoor moulds. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2012, 63:545-549.
- Piecková E., Jesenska Z. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann Agric Environ Med*, 1999, 6, 1-11.
- Piecková E., Kunová Z. Indoor fungi and their ciliostatic metabolites. *Ann Agric Environ Med*, 2002, 9, 59–63.
- Pitt J. I., Hocking A. D. *Fungi and Food Spoilage*, Third edition, Springer, 2009, 275-292.

- Redlich C. A., Sparer J., Cullen M. R. Sick-building syndrome. *Lancet* 349, 1997, 1013-1016.
- Richard J. L., Plattner R. D., May J., Liska S. L. The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*, 1999, 146:2, 99-103.
- Rimac D., Macan J., Varnai V. M., Vucemilo M., Matković K., Prester L., Orct T., Trošić I., Pavčić I. Exposure to poultry dust and health effects in poultry workers: impact of mould and mite allergens. *Int Arch Occup Environ Health*, 2010, 83(1), 9-19.
- Rylander R. Airborne (1→3)- β -D-glucan and airway disease in a day-care center before and after renovation. *Arch Environ Health*, 1997, 52, 281-285.
- Schaaf G. J., Nijmeijer S. M., Maas R. F. M., Roestenberg P., Groene de E. M., Fink-Gremmels J. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1588: 149-158.
- Sikyta B. *Techniques In Applied Microbiology*. Prag, Elsevier, 1995, 338.
- Skaug M. A., Eduard W., Stormer F. C. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. *Mycopathologia*, 2001, 151:2, 93-98.
- Slack G. J., Puniani E., Frisvad J. C., Samson R. A., Miller J. D. Secondary metabolites from Eurotium species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol Res.*, 2009, 113(4):480-90.
- Šegvić Klarić M. Adverse effects of combined mycotoxins. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2012, 63, 519-530.

Šegvić Klarić M., Varnai V. M., Ljubičić Ćaluši A., Macan J. Occupational exposure to airborne fungi in two Croatian sawmills and atopy in exposed workers. *Annals Of Agricultural and Environmental Medicine*, 2012a, 19:2; 213-219.

Šegvić Klarić M., Želježić D., Rumora L., Peraica M., Pepeljnjak S., Domijan A. M. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. *Arch Toxicol*, 2012b, 86, 97-107.

Thrasher J. A water damaged home and health occupants: a case study. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012.

Umeda M., Yamashita T., Saito M., Skeita S., Takahashi C., Yoshihira K., Natori S., Kurata H., Udagawa S. Chemical and cytotoxicity survey on the metabolites of toxic fungi. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 1974, 44, 83–96.

Vesper S.J., McKinstry C., Haugland R. A., Iossifova Y., LeMasters G., Levin L, Hershey G. K. K., Villareal M., Bernstein D. I., Reponen T. Relative mouldiness index as predictor of childhood respiratory illness. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2007, 17, 88-94.

WHO (World Health Organisation), WHO Guidelines for indoor air quality: dampness and mould, Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2009.

8. SAŽETAK

Zlatko Ficović i Maja Hanić

Plijesni *Aspergillus ochraceus* i *Eurotium herbariorum*: aerogena izloženost u zatvorenim prostorima i toksični učinci ekstrakata spora na stanice ljudskog adenokarcinoma pluća A549

U vlažnim stambenim i poslovnim prostorima, te mjestima poput mlinova žitarica, ljudi mogu biti izloženi većoj koncentraciji aerogenih čestica različitih plijesni koje mogu imati nepovoljan učinak na ljudsko zdravlje. Kao kontaminant u takvim prostorima može se naći plijesan *Aspergillus ochraceus* (AO), poznati producent okratoksina A (OTA), te u većoj mjeri *Eurotium herbariorum* (EH) koja proizvodi čitav niz različitih metabolita čija toksičnost nije dovoljno istražena.

Stoga je u ovom radu ispitan sastav mikoflore zraka kao i koncentracija lebdećih čestica plijesni (CFU/m³) s naglaskom na *A. ochraceus* i *E. herbariorum* u mlinu žitarica, stanovima i podrumima u studenom 2012 godine. Uzorkovanje je provedeno na DG-18 podlozi pomoću uređaja Airsampler Mas-100 Eco. Sposobnost tvorbe OTA u sporama izoliranih sojeva *A. ochraceus* i *E. herbariorum* ispitana je HPLC-om. Također, procijenjena je dnevna inhalirana doza OTA. Citotoksičnost čistog OTA te ekstrakata spora OTA-pozitivnog (AO-OTA(+)), OTA-negativnog soja *A. ochraceus* (AO-OTA(-)) i *E. herbariorum*, pojedinačno i u kombinaciji, na kulturi stanica ljudskog adenokarcinoma pluća A549 ispitana je pomoću kolorimetrijskog MTT testa na čitaču mikrotitarskih pločica (540 nm).

U mlinu je zabilježena visoka pojavnost *Aspergillus* vrsta (85%) odnosno *A. ochraceus* (30%), te *Eurotium* vrsta (100%) među kojima dominira *E. herbariorum* (100%). U mlinu su zabilježene znatno veće koncentracije spora (do 15100 CFU/m³), u odnosu na podrum (do 8000 CFU/m³) i stanove (420 CFU/m³) (P<0,05). U sporama *A. ochraceus* dokazan je OTA u koncentracijama od 0,3 do 28 µg/mL (HPLC), a izračunati dnevni unosi OTA inhalacijom iznose 0,08 i 3 ng/kg tj.t., te su ispod granice tolerirajućeg dnevnog unosa OTA (17 ng/kg tj.t.).

Koncentracije koje smanjuju vijabilnost stanica za 50% (IC₅₀) su 53 µg/mL (132 µM) za čisti OTA, 10,5 µg/mL (26 µM) za OTA u ekstraktu spora AO-OTA(+),

2126 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt spora EH, dok IC_{50} za AO-OTA(-) nije bilo moguće procijeniti. Kombinacije ekstrakata spora EH + AO-OTA(+) i EH + AO-OTA(-) pokazale su aditivni citotoksični učinak, a jedna kombinacija čak i sinergistički učinak na A549 stanice. Stoga se može pretpostaviti potencirajuće toksično djelovanje ovih vrsta plijesni na dišni sustav pri duljoj izloženosti. Ovaj rad je ujedno i prvo izvješće o toksičnim učincima metabolita plijesni *E. herbariorum* na A549 stanice te njihovim interakcijama s metabolitima *A. ochraceus*.

Ključne riječi: *A. ochraceus*, *E. herbariorum*, okratoksin A, citotoksičnost, stanična linija A549

9. SUMMARY

Zlatko Ficović and Maja Hanić

Exposure to airborne moulds *Aspergillus ochraceus* and *Eurotium herbariorum* in indoor environments and toxic effects of their spore extracts on human lung adenocarcinoma A549 cells

In high humidity residential and working environments, including places such as grain mills, people may be exposed to high concentration of fungal aerogenic particles which can have negative health effects. *Aspergillus ochraceus* (AO), well-known producer of ochratoxin A (OTA), and *Eurotium herbariorum* (EH), which produces a wide range of metabolites with poorly investigated activity, are often found in those environments.

Therefore, occurrence and spore concentration (CFU/m³) of airborne fungi, with special attention to *A. ochraceus* and *E. herbariorum*, were determined in grain mill, apartments and basements in November, 2012, using DG-18 agar plates and Airsampler Mass-100 Eco. Furthermore, OTA producing ability of isolated *A. ochraceus* and *E. herbariorum* in spores was determined by HPLC. Additional aim was to estimate inhaled daily dose of OTA in grain mill. Cytotoxicity of pure OTA and spore extracts of OTA-positive (AO-OTA(+)) and OTA-negative (AO-OTA(-)) *A. ochraceus* as well as spore extract of EH, was tested on human lung adenocarcinoma cells A549, individually and in combination, using colorimetric MTT test and plate reader (540 nm).

High frequency of *Aspergillus* species (85%) was found in the grain mill, and *A. ochraceus* occurred in 30% of samples while *Eurotium* species were recovered from 100%. *E. herbariorum* dominated among *Eurotium* spp. Significantly higher assessed spore concentrations was found in the grain mill (up to 15100 CFU/m³), in comparison to basements (up to 8000 CFU/m³) and apartments (up to 420 CFU/m³) (P<0,05).

OTA (0,3-28 µg/mL, HPLC) was determined in the spores of *A. ochraceus* isolated from grain mill and daily intakes of OTA via inhalatory pathway were calculated to be 0,08 and 3 ng/kg body weight, which is below the limit of tolerable daily intake of OTA (17 ng/kg body weight).

Concentrations that decreased the cell viability of A549 cells by 50% (IC₅₀) were 53 µg/mL (132 µM) for pure OTA, 10,5 µg/mL (26 µM) for OTA in spore extract of AO-OTA(+) and 2126 µg/mL for EH. IC₅₀ for AO-OTA(-) extract could not be determined. Spore extract combinations EH + AO-OTA(+) and EH + AO-OTA(-) showed dominant additive cytotoxic effect. Also, synergistic effect on A549 cells was found in one combination. Accordingly, it can be assumed that these molds have potentiating toxic effect on human respiratory system during prolonged exposure. This study is also the first report on the toxic effects of *E. herbariorum* mold metabolites on A549 cells and their interactions with the metabolites of *A. ochraceus*.

Key words: *A. ochraceus*, *E. herbariorum*, ochratoxin A, cytotoxicity, A549 cell line

10. ZAHVALE

Zahvaljujemo se mentorici prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju te znanju i vještinama koje smo stekli prilikom izrade ovog rada. Također, zahvaljujemo se asistentici Danieli Jakšić, mag. pharm. na svesrdnoj pomoći u mikološkoj analizi te Dubravki Flajs, prof. biol. s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada za pomoć pri HPLC analizi.