

# Ispitivanje citoskičnosti ekstrakata micelija plijesni vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis* u stanicama ljudskog adenokarcinoma pluća A549

---

Ruszkowski, Ida

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:438172>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ida Ruszkowski**

**Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata micelija  
plijesni vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus  
luchuensis* u stanicama ljudskoga  
adenokarcinoma pluća A549**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Daniele Jakšić, više asistentice – poslijedoktorantice.

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

*Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, pomoći i ohrabrujućim riječima u teškim trenucima kao i svim svojim bližnjima koji su bili uz mene tijekom cijelog perioda studiranja i pružali bezuvjetnu potporu.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. PLIJESNI RODA <i>ASPERGILLUS</i> SEKCIJE <i>NIGRI</i> : RASPROSTRANJENOST I ZNAČAJ ZA ČOVJEKA .....	1
1.2. NEPOVOLJNI UČINCI ASPERGILA NA DIŠNI SUSTAV .....	2
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	5
3. MATERIJALI I METODE.....	6
3.1. PORIJEKLO IZOLATA ASPERGILA I PRIPREMA EKSTRAKATA MICELIJA .....	6
3.2. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI.....	8
3.2.1. UZGOJ STANIČNIH KULTURA .....	8
3.2.2. PRIPREMA OTOPINA ZA TRETIRANJE STANICA.....	8
3.2.3. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI .....	9
3.2.4. OBRADA PODATAKA.....	10
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	12
5. ZAKLJUČCI.....	22
6. LITERATURA.....	24
7. SAŽETAK .....	29
8. SUMMARY .....	30
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1. PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS* SEKCIJE *NIGRI*: RASPROSTRANJENOST I ZNAČAJ ZA ČOVJEKA

Plijesni roda *Aspergillus* jedan su od najraznolikijih i najrasprostranjenijih rodova plijesni od osobite važnosti za ljude. Širokoj rasprostranjenosti pridonosi prilagodba na različite okolišne uvjete kao što su promjenjivi aktivitet vode, temperatura, osmotski stres i oksidacijski stres. Neke vrste izrazito su otporne na ionizirajuće i UV zračenje zbog proizvodnje melanina u svojoj staničnoj stijenci (Paulussen i sur., 2017).

Među aspergilima osobito su značajne vrste iz sekcije *Nigri* koje zbog crno-smeđe pigmentiranih konidija još zovemo i crni aspergili. Pojavnost crnih aspergila najviše je istraživana u hrani (voće, povrće, žitarice, mliječni i mesni proizvodi i dr.), međutim crni aspergili mogu se pronaći i na mnogim drugim supstratima u okolišu, primjerice tlu, na raspadajućoj vegetaciji, ali i na građevinskom i tekstilnom materijalu, u uređajima za zagrijavanje i hlađenje zraka, te u zraku i prašini unutarnjih stambenih, radnih ili skladišnih prostora (Unković i sur., 2018; Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014; Varga i sur., 2014; Jurjević i sur., 2012; Samson i sur., 2004). Iako učestaliji u tropskim i subtropskim područjima, crni aspergili izolirani su iz zraka zatvorenih prostora i u nekoliko zemalja umjerenog klimatskog pojasa uključujući Veliku Britaniju, Češku Republiku, Slovačku, Egipat, Saudijsku Arabiju, SAD i Kanadu (Scott, 2001). U novije vrijeme istraživanje je prošireno na Hrvatsku, Mađarsku, Nizozemsku i Tursku (Varga i sur., 2014). Osobiti problemi s pojavnošću plijesni javljaju se u vlažnim unutrašnjim prostorima koji su bili poplavljeni ili koji zbog neodgovarajuće ventilacije i/ili provjetravanja zadržavaju vlagu, primjerice podrumi i kupaonice (Klich, 2009).

Osim što uzrokuju alergijske i infektivne bolesti, štetnosti po zdravlje ljudi pridonosi i leži i u proizvodnji sekundarnih toksičnih nisko-molekularnih metabolita — mikotoksina. Iako su ljudi mikotoksinima najviše izloženi putem kontaminirane hrane, moguć je unos preko kože i inhalacijskim putem (Di Paolo i sur., 1994). Crni aspergili proizvode mikotoksine okratoksin A i neke fumonizine (Frisvad i sur., 2007). Od ostalih sekundarnih metabolita značajni su malformini, nafto- $\gamma$ -pironi, asperazini, bikumarini (kotanini) i drugi (Nielsen i sur., 2009).

Neke vrste crnih aspergila koje se smatraju sigurnima s obzirom na to da ne proizvode sekundarne metabolite dokazane toksičnosti koriste se u prehrambenoj industriji. Jedna od najpoznatijih je A.

*luchuensis* koja se koristi u Japanu u proizvodnji destiliranog alkoholnog pića awamori (Hong i sur., 2013). Specifičan okus piću daje vanilin koji nastaje oksidacijom 4-vinilguaiakola koji nastaje iz ferulične kiseline iz riže pomoću enzima ferulične kisele esteraze proizvedene u *A. luchuensis* (Maeda i sur., 2018). Filogenetički srodna vrsta, *A. piperis*, prvotno je izolirana s crnog papra (*Piper nigrum*) po kojemu je dobila ime, a kao ni *A. luchuensis* ne proizvodi okratoksin A ni fumonizine, a proizvodi aurasperon B, aflavine (14-epi-14-hidroksi-10,23-dihidro-24,25-dehidroaflavinin, 10,23-dihidro-24,25-dehidroaflavinin), piranonigrin i nafto- $\gamma$ -pirone (Samson i sur., 2004). Zanimljiva je po tome što djeluje protiv biljnih patogena *Pythium aphanidermatum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium cepivorum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Naime, izlučuje kompleks metabolita, uključujući derivate glukonske, limunske i itakonske kiseline i proteine koji djeluju antifungalno na spomenute gljivične patogene biljaka. Također, koristi i brojne druge antifungalne mehanizme (El-Debaiky, 2017; Jovičić-Petrović i sur., 2016).

Obje vrste, *A. piperis* i *A. luchuensis*, mogu se izolirati iz zraka stambenih prostora ili iz vanjskog zraka (Varga i sur., 2014) te kontaminirati različite supstrate. S obzirom na morfološku sličnost te izraženu homologiju genskih regija koji se koriste u identifikaciji vrsta roda *Aspergillus* lako može doći do zamjene ove dvije vrste. Precizno razlikovanje ovih dviju vrsta osobito je važno s obzirom na *in vitro* utvrđene razlike u toksičnosti ekstrakata priređenih iz kultura po jednog od izolata ove dvije vrste (Jakšić i sur., 2018).

## 1.2. NEPOVOLJNI UČINCI ASPERGILA NA DIŠNI SUSTAV

Većina nepovoljnih utjecaja na zdravlje crnih aspergila sinonimizirana je vrstom *Aspergillus niger* zbog kasnog uvođenja molekularnih metoda koje su rezultirale izdvajanjem novih vrsta, a time i preciznijim povezivanjem uzročnika i različitih patoloških stanja.

Utjecaj mikroorganizma na zdravlje ljudi proizlazi iz složenog odnosa mikroorganizma i nositelja, odnosno ovisi o interakciji između faktora virulencije mikroorganizma i imunskog odgovora domaćina (Brunke i sur., 2016). Udisanjem konidija ili dijelova micelija aspergila koje se nalaze u česticama zraka (Fröhlich-Nowoisky i sur., 2009) može doći do opasnosti za dišni sustav taloženjem istih te upalnih reakcija, a u određenim okolnostima i infekcije. Naime, kolonija aspergila stvara mnoštvo konidija koje se raznose zrakom, vodom, insektima i slično. Kada čovjek udahne konidije one se internaliziraju s plućnim epitelom te dolazi do germinacije i rasta hifa koje

prelaze alveolarni epitel te nastaje aspergiloza. U obrani domaćina glavnu ulogu imaju mukocilijarni klirens, plućni surfaktant i stanice imunskog sustava - alveolarni makrofagi i neutrofili (Escobar i sur., 2016). Također, novija istraživanja upućuju na važnost mikrobiote respiratornog trakta kao važnog odgovora na infekciju. Mikrobiota pridonosi individualizaciji odgovora svakog pojedinca jer je kod svakoga različita te kada dođe do njezine disbioze stvaraju se pogodni uvjeti za nastanak aspergiloza (Richardson i sur., 2019).

Alergijske reakcije uzrokovane aspergilima ovisno o stupnju preosjetljivosti uzrokuju različite kliničke slike. One mogu varirati od iritacija kao što su rinitis i konjunktivitis, do po život opasnih opstrukcija plućnih putova i anafilaksije (Klich, 2009). Najčešće alergijske reakcije jesu bronhopulmonalni oblik i alergijski sinusitis. Bronhopulmonalni oblik karakteriziraju astma, plućni infiltrati, eozinofilija, povišene razine imunoglobulina E u serumu te pozitivni kožni testovi na *Aspergillus* antigene. Oboljeli imaju teškoće s disanjem i mogu razviti trajne ožiljke pluća. Alergijski sinusitis očituje se, uz laboratorijske dokaze preosjetljivosti, alergijskim simptomima gornjeg respiratornog sustava, glavoboljom i bolovima na području lica.

Infekcije koje uzrokuju aspergili najčešće jesu infekcije paranazalnih sinusa i donjeg respiratornog sustava. Posljedično se može razviti aspergilom i opstruktivna bronhalna aspergiloza. Aspergilom nastaje u paranazalnim sinusima ili u od prije stvorenim plućnim šupljinama nastalim kavernoznom bolešću npr. tuberkulozom ili emfizemom. Bolest može biti asimptomatska ili se može očitovati kašljem, dispnejom, gubitkom težine i iskašljavanjem krvi. U opstruktivnoj bronhalnoj aspergilozi ne dolazi do oštećenja tkiva te obično nastaje kod bolesnika koji već imaju neku kroničnu plućnu bolest.

Invazivna plućna aspergiloza javlja se u imunokompromitiranih (imunodeficientnih) bolesnika npr. s leukemijom, limfomom, AIDS-om, kod primatelja transplantata koštane srži, bolesnika na terapiji kortikosteroidima i dr. Simptomi su vrućica, kašalj, dispneja i iskašljavanje krvi. Zbog angioinvazivnosti bolest se može proširiti u probavni sustav, bubrege, jetru, mozak ili druge organe.

Prevenција aspergiloza najvažnija je kod visokorizičnih bolesnika u sterilnim jedinicama bolnica kao što je odjel za transplantaciju koštane srži. Takve jedinice imaju sobe za izolaciju s pozitivnim tlakom zraka, propisanim brojem izmjena zraka po satu i filtracijom zraka HEPA (*high-efficiency particulate air*) filterom. Također, prati se kontaminacija zraka u bolesničkim sobama.

Aspergiloze se liječe vorikonazolom, amfotericinom B te kirurški. Vorikonazol inhibira sintezu ergosterola u gljivičnoj membrani i tako sprječava rast i razmnožavanje. Amfotericin se veže za ergosterol u staničnoj membrani i čini ju propusnom. Posljedično dolazi do istjecanja sadržaja iz stanice gljivice i na kraju do njezina smrti (Francetić i sur., 2015). U liječenju jednako je važan i oporavak imunskog sustava (Brooks i sur., 2015; Kalenić i sur., 2013).

Među niskomolekularnim sekundarnim metabolitima koje proizvode plijesni roda *Aspergillus* nisu identificirani čimbenici virulencije uz iznimku gliotoksina kojeg proizvodi vrsta *Aspergillus fumigatus*. Gliotoksin je mikotoksin koji uz antibakterijski i virucidni učinak pokazuje toksičan učinak na niz staničnih linija kao što su makrofazi, timociti, splenociti i fibroblasti. Izaziva njihovu apoptozu i nekrozu te inhibira enzime farnezil-transferazu, NF- $\kappa$ B i alkohol-dehidrogenazu. Mehanizam toksičnosti povezan je sa stvaranjem kovalentnih i disulfidnih veza i oksidativnim učincima (Scharf i sur., 2012). Na te načine gliotoksin ometa mehanizme obrane domaćina i djeluje kao čimbenik virulencije (Hof i Kupfahl, 2009).

Ostali mikotoksini i sekundarni metaboliti, iako nisu čimbenici virulencije, mogu imati štetan učinak na zdravlje ljudi. Mikotoksini uzrokuju bolesti koje se nazivaju mikotoksikozama koje mogu biti akutne i kronične. Akutne podrazumijevaju odgovor organizma na visoke doze mikotoksina, a kronične izloženost nižim doza kroz duži vremenski period koje mogu rezultirati pojavom karcinoma (Bennett i Klich, 2003). Ovisno o vrsti mikotoksina oni djeluju nefrotoksično, hepatotoksično, imunosupresivno, estrogeno, karcinogeno, teratogeno i mutageno (Edite Bezerra da Rocha i sur., 2014). Sekundarni metaboliti kao što su malformini, nafto- $\gamma$ -pironi i bikumarini također pokazuju toksične učinke što je opisano u raspravi ovog rada (Frisvad i sur., 2018).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrste roda *Aspergillus* iz sekcije *Nigri* mogu se izolirati iz zraka i prašine u prostorima u kojima ljudi borave. Među izoliranim vrstama posebno je zanimljiva pojavnost morfološki i filogenetički vrlo srodnih vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis*. Pri tome se vrsta *A. luchuensis* dominantno koristi u industriji, a ranija preliminarna istraživanja upućuju na značajno manji toksični potencijal u odnosu na vrstu *A. piperis*.

Kako bi se procijenile sličnosti i razlike među izolatima unutar jedne vrste te razlike između dvije različite vrste, u ovome radu ispitan je citotoksični učinak ekstrakata micelija devet izolata plijesni vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* koje su izolirane iz zraka i prašine na različitim lokacijama u Hrvatskoj. Citotoksičnost je ispitana pomoću MTT testa citotoksičnosti u stanicama ljudskoga adenokarcinoma pluća A549 i određene su citotoksične koncentracije  $IC_{50}$ , odnosno koncentracije koje smanjuju vijabilnost stanica za 50% u odnosu na kontrolu. Odabrana stanična linija predstavlja dobar model pri procjeni štetnosti za dišni sustav ljudi s obzirom na to da po fiziološkim i biokemijskim svojstvima ove stanice odgovaraju alveolarnim stanicama tipa II plućnog epitela. Stanice se lako uzgajaju, reproducibilne su, dugotrajne te etički prikladne.

Rezultati ovoga rada pridonijeli bi boljem razlikovanju vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* s obzirom na citotoksičnost ekstrakata njihovih micelija. Zbog pojavnosti spomenutih vrsta plijesni u zraku i prašini specifični cilj ovoga rada je procijeniti moguće rizike za zdravlje ljudi pri udisanju dijelova micelija plijesni.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. PORIJEKLO IZOLATA ASPERGILA I PRIPREMA EKSTRAKATA MICELIJA

Porijeklo izolata crnih aspergila vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* obuhvaćenih ovim ispitivanjem prikazani su u tablici 1. Izolati su prikupljeni u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA IP-09-2014-5982) kojega financira Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ, a čija je voditeljica prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić označeni su brojevima 1–4, a izolati prikupljeni u sklopu izrade doktorskog rada dr. sc. Daniele Jakšić (Jakšić Despot, 2016) označeni su brojevima 5–9 (tablica 1). Do provođenja ovoga ispitivanja izolati su bili pohranjeni u zbirci mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Svježe kulture izolata aspergila pripravljene su na CYA agaru odakle je vrškom sterilne igle uzorak svakog od poraslih micelija prebačen u 50 ml tekućeg bujona CYA. Tako inokulirane bujonske kulture inkubirane su 7 dana u mraku na temperaturi 25 °C. Po isteku inkubacije odvojen je micelij od medija pažljivim odljevanjem medija te je provedena ekstrakcija micelija otapalom sastava diklormetan : etil acetat : metanol, 1:2:3 v/v/v uz dodatak mravlje kiseline (1 % v/v). Micelij je homogeniziran mljevenjem u otapalu i centrifugiran (4000 g, 15 minuta). Iz nadtaloga su uzeti alikvoti ekstrakata micelija u rasponu od 3 do 6 ml filtrirani su kroz PTFE filter i upareni do suha u rotirajućem vakuum uparivaču (60°C, 1h). Ostatak nakon isparavanja otapala je izvagan, a matične otopine ekstrakata micelija koncentracije 50 mg/ml pripravljene su otapanjem u dimetilsulfoksidu (DMSO).

#### ***Kemikalije***

- Medij : Czapek-agar i bujon sa kvašćevim ekstraktom (CYA): CzaPEK-Dox Broth (BD Difco™, SAD) otopljen je u destiliranoj vodi prema uputi proizvođača te obogaćen sa kvašćevim ekstraktom (5 g/l; BD Difco™, SAD) i vodenom otopinom elemenata u tragovima 1 ml/l. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min).
- Otopina elemenata u tragovima: bakrov sulfat pentahidrat [(CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O), Kemig, Zagreb, Hrvatska] 0,5 g/100 ml destilirane vode i cinkov sulfat heptahidrat [(ZnSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O); Kemig, Zagreb, Hrvatska] 1 g/100 ml destilirane vode).

- Otapala za ekstrakciju: diklormetan (p. a.; T. T. T. d.o.o., Novaki, Sveta Nedelja, Hrvatska), etil acetat (p. a.; Lach-Ner d.o.o. Zagreb, Hrvatska), metanol (HPLC grade; RCI Labscan Limited, Tajland), mravlja kiselina (p. a., Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- DMSO (reagens za stanične kulture; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, SAD)

### Uredaji

- Homogenizator radnog volumena 1-250 ml (Homogenizer „light duty“, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Njemačka)
- Termo-vakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)
- Vaga (KERN & Sohn GmbH, Njemačka)
- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Njemačka)
- Vortex (IKA® VORTEX 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

**Tablica 1.** Oznake izolata aspergila vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis* i njihovo porijeklo (izvor izolata, lokacija i period uzorkovanja).

Broj izolata	Vrsta	Oznaka izolata	Lokacija uzorkovanja	Period uzorkovanja
1	<i>A. piperis</i>	MFBF AN12443	zrak iz nerenoviranih kuća, Gunja	veljača, 2017
2	<i>A. piperis</i>	MFBFAN12183	zrak iz kuća, Gornji Stupnik	veljača, 2016
3	<i>A. piperis</i>	MFBF AN12614	zrak iz renoviranih kuća, Gunja	rujan, 2017
4	<i>A. piperis</i>	MFBF AN12404	prašina iz nerenoviranih kuća, Gunja	rujan, 2016
5	<i>A. piperis</i>	MFBF AN11119B	zrak iz mlina žitarica, Jastrebarsko	studeni, 2012
6	<i>A. luchuensis</i>	MFBF AN11133A	zrak iz urbanog stana, Zagreb	studeni, 2012
7	<i>A. luchuensis</i>	MFBF AN10927A	zrak iz mlina žitarica, Jastrebarsko	svibanj, 2012
8	<i>A. luchuensis</i>	MFBF AN11054A	zrak iz mlina žitarica, Jastrebarsko	rujan, 2012
9	<i>A. luchuensis</i>	MFBF AN11000B	vanjski zrak, Zagreb	srpanj, 2012

## 3.2. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI

### 3.2.1. UZGOJ STANIČNIH KULTURA

Uzgoj i tretiranje staničnih kultura provedeni su u sterilnim uvjetima unutar komore s laminarnim strujanjem zraka (*Laminar flow hood*). Ljudske stanice adenokarcinoma pluća soja A549 uzete su iz Europske zbirke staničnih kultura (ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velika Britanija). Uzgojene su u staničnom mediju s FBS (10 %) u plastičnim flaskovima za adhezivni uzgoj staničnih linija, a inkubirane pod uvjetima konstantne temperature (37 °C), relativne vlažnosti (95 %) i udjela ugljikovog dioksida (5 %). Stanice su uzgajane do približno 80 % konfluentnosti. Prilikom presađivanja stanice su ispirane sterilnim PBS, a za odvajanje od podloge tretirane su otopinom tripsin-EDTA 0,25 %.

### 3.2.2. PRIPREMA OTOPINA ZA TRETIRANJE STANICA

Iz matičnih otopina ekstrakata za tretiranje (50 mg/ml) pripravljeno je sedam ispitivanih otopina koncentracija u rasponu od 0,025 mg/ml do 8 mg/ml. Također su pripravljene i tri kontrolne otopine s otapalom DMSO u staničnom mediju u rasponu koncentracija od 0,1 % do 1,6 % (tablica 2). Ispitivane otopine i kontrolne otopine pripravljene su u staničnom mediju bez FBS prethodno inkubiranom na 37 °C te su priređene da tretman bude dostatan za sedam replikata za svaku radnu/kontrolnu otopinu.

**Tablica 2.** Koncentracije ispitivanih i kontrolnih otopina za tretiranje A549 stanica.

	<b>Koncentracije ispitivanih otopina ekstrakata micelija u staničnom mediju (mg/ml)</b>	<b>Koncentracije kontrolnih otopina otapala DMSO za tretiranje (%)</b>
<b>1</b>	0,025	0,1
<b>2</b>	0,05	
<b>3</b>	0,1	
<b>4</b>	0,2	0,8
<b>5</b>	0,4	
<b>6</b>	0,6	1,6
<b>7</b>	0,8	

### 3.2.3. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Kako bi se odredio broj stanica/ml, suspenzija stanica dobivena dodatkom staničnog medija nakon tripsiniziranja, centrifugirana je (1200 o/min, 2 minute), stanični nadtalog odsisan pa je priređena svježa suspenzija stanica u mililitru staničnog medija. Broj stanica po ml suspenzije određen je hemocitometrom, a potom je stanična suspenzija razrijeđena sa staničnim medijem do koncentracije 100 000 stanica/ml. U svaku jažicu mikrotitarske pločice s 96 jažica nanese se po 100  $\mu$ L tako priređene suspenzije stanica te je pločica inkubirana 24 sata kako bi stanice adherirale. Po isteku inkubacije, odsisan je stanični medij te su stanice tretirane sa po 100  $\mu$ L ispitivane otopine ekstrakata micelija aspergila odnosno kontrolnim otopinama (tablica 1, poglavlje 3.2.2.). Po isteku 24-satne inkubacije, u jažice je dodano po 100  $\mu$ l otopine MTT reagensa u staničnom mediju bez FBS, uz prethodno odsisavanje ispitivanih i kontrolnih otopina. Nakon 3 sata i 30 minuta, medij je odsisan te je ljubičasto obojeni formazan (produkt metaboliziranog MTT reagensa kod vijabilnih stanica) otopljen u 150  $\mu$ L DMSO. Naime, vijabilne stanice zadržale su svoju metaboličku aktivnost te su njihove NAD(P)H ovisne dehidrogenaze metabolizirale žuto obojen MTT reagens u ljubičasti formazan. Nastali formazan topljiv je u DMSO te nakon što je pločica 15 minuta miješana u termomikseru (300 o/min) na sobnoj temperaturi, izmjerena joj je apsorbancija na 540 nm u spektrofotometru za mikrotitarske pločice. Izmjerena apsorbancija formazana proporcionalna je koncentraciji vijabilnih stanica u svakoj jažici.

#### *Pribor i kemikalije*

- RPMI medij 1640 (Gibco®, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD) s puferom (HEPES, 25 mmol/l) i L-glutaminom (2 mM)
- Otopina antibiotika za uzgoj staničnih kultura penicilin (100 IU/ml) i streptomycin (100  $\mu$ g/ml) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, SAD)
- Toplinski inaktivirani fetalni teleći serum, FBS (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, SAD)
- Stanični medij: RPMI uz dodatak FBS (10 % v/v)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Termin stanični medij podrazumijeva RPMI naznačenog sastava u poglavlju 3.2.3. *Kemikalije* kojemu je dodano FBS. U tekstu je posebno naznačeno kada se koristi medij bez FBS kako bi se izbjegle neželjene interakcije ispitivanih, kontrolnih te radnih otopina reagensa sa komponentama seruma.

- Sterilni fosfatni pufer bez kalcijevih i magnezijevih iona, PBS, pH=7,4 (Lonza Bioscience, Fisher Scientific, SAD)
- Tripsin-EDTA 0,25 % sa fenolnim crvenilom (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, SAD)
- MTT reagens, tiazolil plavi tetrazolijev bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Matična otopina MTT reagensa u PBS (5 mg/ml)
- Radna otopina MTT reagensa (0,5 mg/ml) u staničnom mediju bez FBS
- DMSO (reagens za stanične kulture; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, SAD)
- DMSO, *p.a.* (Kemig, Zagreb, Hrvatska)- za otapanje formazana
- Mikrotitarske pločice s 96 jažica (TPP® tissue culture flasks, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Mikropipete radnih volumena 0,5–2,5 µl; 0,5–10 µl; 2–20 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

### ***Uređaji***

- Sisaljka za odsisavanje (Star-Lab, Njemačka)
- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Hemocitometar (Neubauer Hemacytometer By Marien Field, Njemačka)
- Mikroskop (Microscope BX40, Olympus, Japan)
- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Njemačka)
- Vortex (IKA® VORTEX 3, Sigma-Aldrich St. Louis, SAD,)
- Spektrofotometrar za mikrotitarske pločice (PerkinElmer VictorX3, SAD)

### **3.2.4. OBRADA PODATAKA**

Za obradu dobivenih podataka i izračun vijabilnosti tretiranih stanica korišten je računalni program Microsoft Excel, Microsoft Office 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD). Vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu izračunata je prema formuli:

$$\text{vijabilnost stanica (\%)} = A (\text{tretirane stanice}) / A (\text{kontrolne stanice}) \times 100 \%$$

Za izračun je uzeta srednja vrijednost sedam izmjerenih apsorbancija kontrola. Vijabilnost je izračunata za svaki od sedam replikata svakog tretmana. Srednja vrijednost apsorbancije stanica

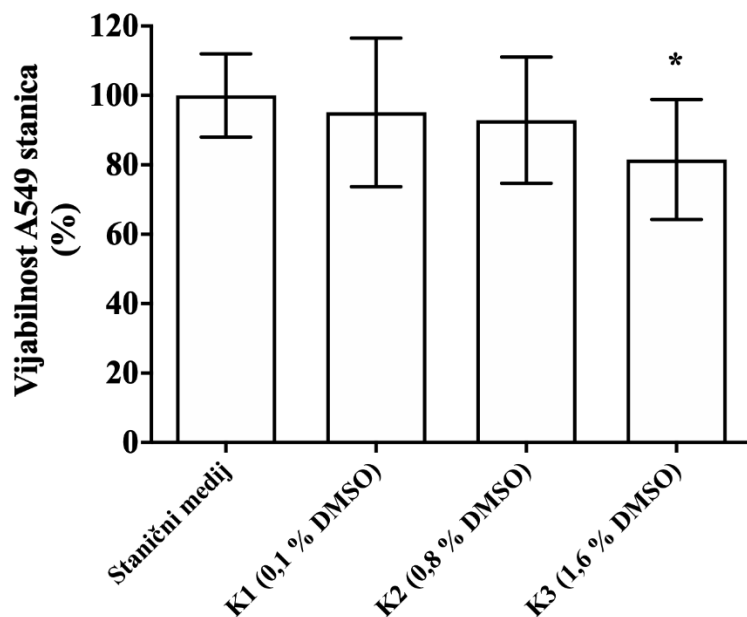
tretiranih kontrolnom otopinom K1 korištena je u izračunu vijabilnosti stanica tretiranih ispitivanim otopinama ekstrakata u koncentracijama od 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml i 0,1 mg/ml. Srednja vrijednost apsorbancije stanica tretiranih kontrolnom otopinom K2 korištena je u izračunu vijabilnosti stanica tretiranih ispitivanim otopinama ekstrakata u koncentracijama od 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml, a srednja vrijednost apsorbancije stanica tretiranih kontrolnom otopinom K3 korištena je u izračunu vijabilnosti stanica za koncentracije od 0,6 mg/ml i 0,8 mg/ml. Podaci su statistički obrađeni u programskom paketu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, SAD) te je za grafički prikaz rezultata vijabilnosti stanica korištena izračunata aritmetička sredina uz standardnu devijaciju. Testiranje značajnosti razlika između pokusnih skupina u odnosu na kontrolu provedeno je jednosmjernom analizom varijance (One-Way ANOVA) uz Dunnettov višestruki usporedni post-test. Za svaki ispitani ekstrakt micelija aspergila na temelju nelinearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka izračunata je koncentracija (mg/ml) koja inhibira rast 50% stanica ( $IC_{50}$ ) uz 95 %-tni interval pouzdanosti.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon 24 h kontrolni tretmani K1 i K2 (0,1 % i 0,8 % DMSO u staničnom mediju bez FBS) nisu statistički značajno utjecali na vijabilnost A549 stanica u odnosu na stanični medij bez FBS (slika 1). Međutim, kod kontrole K3 (1,6 % DMSO u staničnom mediju bez FBS) došlo je do statistički značajne razlike u vijabilnosti stanica ( $81,48 \pm 17,30$  %) u odnosu na stanični medij bez FBS (slika 1). Kontrolna otopina K3 korištena je obzirom da je ista količina otapala bila prisutna u ispitivanoj otopini najveće koncentracije ekstrakta micelija od 0,8 mg/ml.

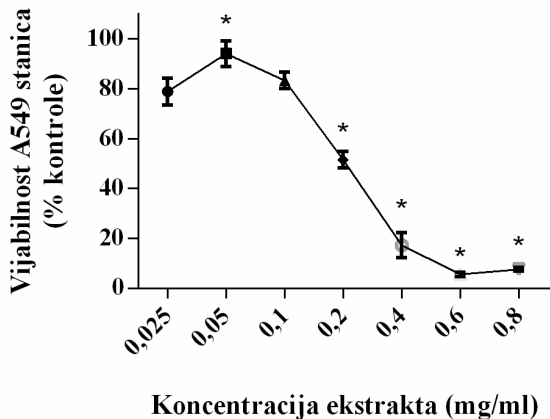
Nakon 24-satnog tretmana ispitani ekstrakti micelija vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* pokazali su se citotoksičnima za A549 stanice. Pri tome je razmjerno porastu koncentracije ekstrakata u ispitivanim otopinama dolazilo do opadanja vijabilnosti stanica (slika 2 A–E, slika 3 A–D) u usporedbi s kontrolama pri 24-satnom izlaganju. Obzirom da je za kontrolnu otopinu K3 pokazano da utječe na smanjenje vijabilnosti stanica za oko 20 %, ne možemo u potpunosti isključiti utjecaj otapala DMSO na smanjenje vijabilnosti stanica pri maksimalnim koncentracijama ekstrakata micelija od 0,8 mg/ml.





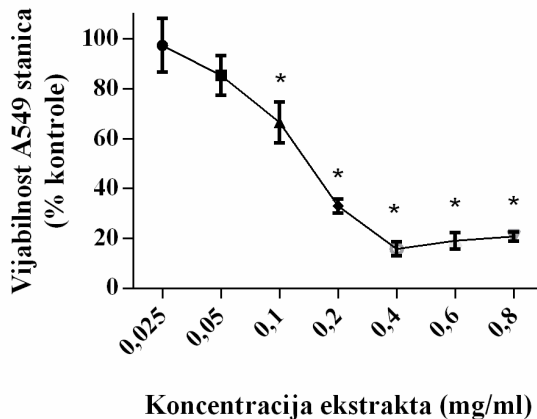
**Slika 1.** Vijabilnost A549 stanica za kontrolne tretmane K1, K2 i K3 (% DMSO u staničnom mediju bez FBS) i stanični medij bez FBS prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Zvezdica „\*“ označava statistički značajna odstupanja u odnosu na stanični medij koji ne sadrži otapalo DMSO ( $P < 0,05$ ).

**A. piperis** MFBF AN12443



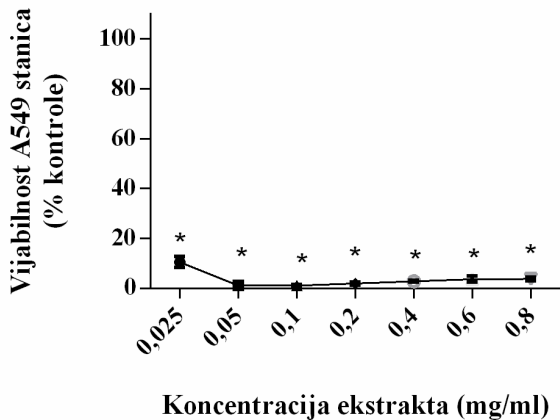
**A**

**A. piperis** MFBF AN12183



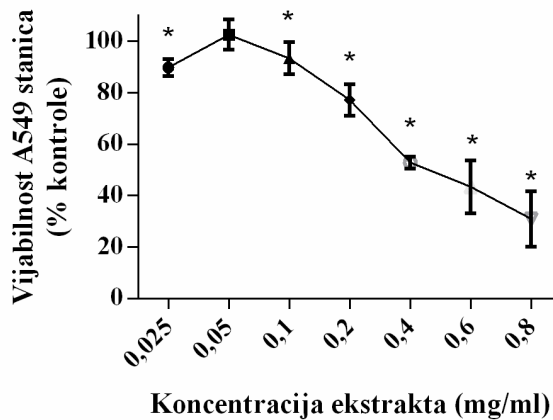
**B**

**A. piperis** MFBF AN12614



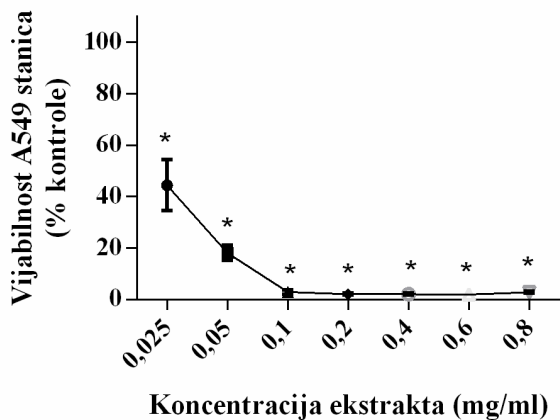
**C**

**A. piperis** MFBF AN12404



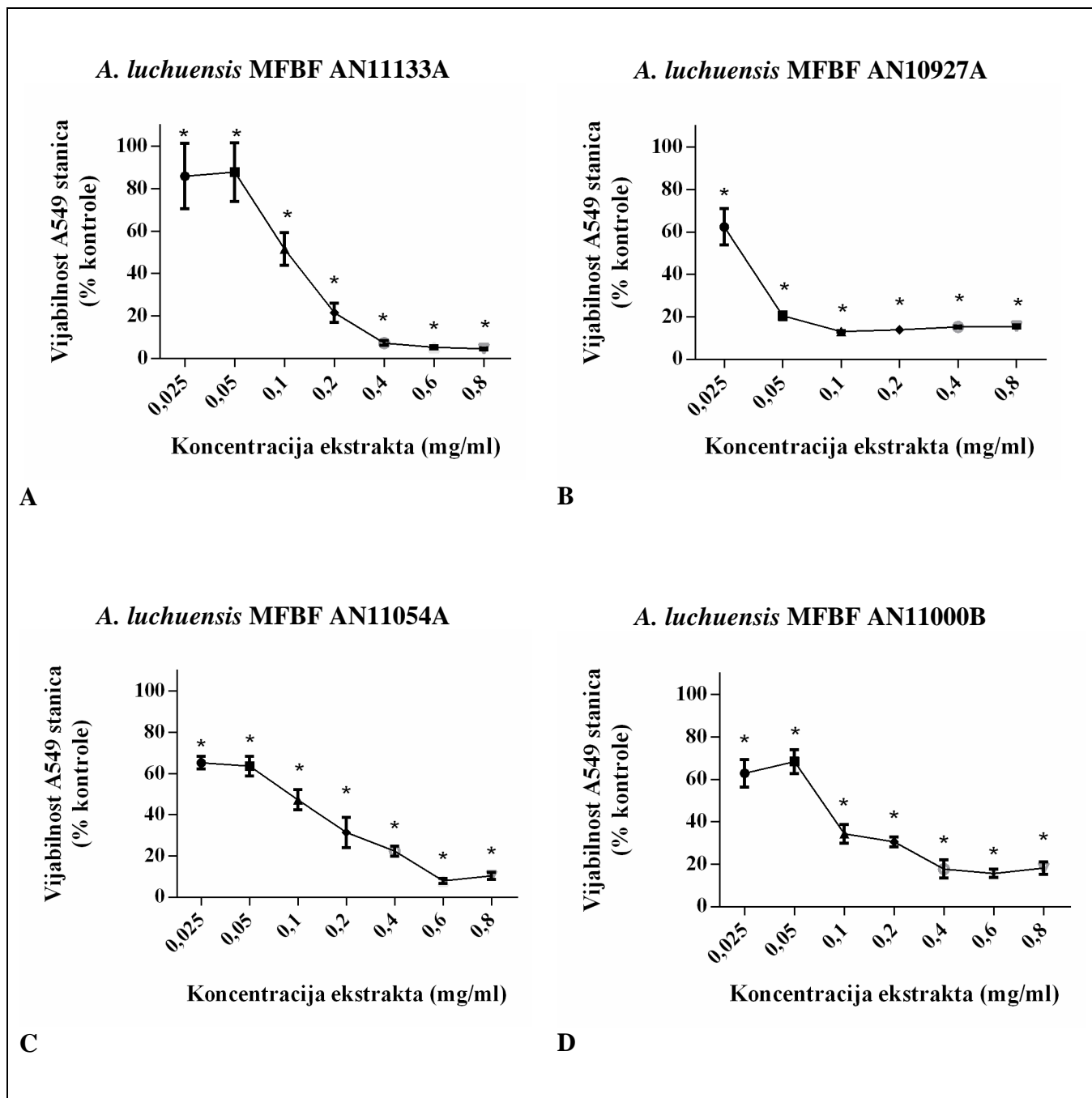
**D**

**A. piperis** MFBF AN11119B



**E**

**Slika 2.** Citotoksičnost ekstrakata micelija naznačenih izolata vrste *A. piperis* u A549 stanicama mjerena MTT testom. Vijabilnost A549 stanica pridružena je različitim koncentracijama ekstrakata micelija (0,025–0,8 mg/ml), izračunata prema kontroli K1 (0,1% DMSO) za tretmane 0,025–0,1 mg/ml, K2 (0,8 % DMSO) za tretmane 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml odnosno K3 (1,6% DMSO) za tretmane 0,6–0,8 mg/ml, a prikazana je kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. \* - statistički značajna odstupanja od kontrole K1, K2 ili K3 ovisno o tretmanu ( $P < 0,05$ ).



**Slika 3.** Citotoksičnost ekstrakata micelija naznačenih izolata vrste *A. luchuensis* u A549 stanicama mjerena MTT testom. Vijabilnost A549 stanica pridružena je različitim koncentracijama ekstrakata micelija (0,025–0,8 mg/ml), izračunata prema kontroli K1 (0,1% DMSO) za tretmane 0,025–0,1 mg/ml, K2 (0,8 % DMSO) za tretmane 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml odnosno K3 (1,6% DMSO) za tretmane 0,6–0,8 mg/ml, a prikazana je kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. \* - statistički značajna odstupanja od kontrole K1, K2 ili K3 ovisno o tretmanu ( $P < 0,05$ ).

**Tablica 3.** Citotoksične koncentracije ( $IC_{50}$ ) izračunate nakon 24-satnog tretmana A549 stanica ekstraktima micelija naznačenih izolata crnih aspergila vrste *A. piperis* u koncentracijama od 0,025–0,8 mg/ml.

<b>vrsta i oznaka izolata</b>	<b><math>IC_{50}</math> (95% intervali pouzdanosti) (mg/ml)</b>
<i>A. piperis</i> MFBF AN12443	0,18 (0,14 – 0,22)
<i>A. piperis</i> MFBF AN12183	0,15 (0,13 – 0,18)
<i>A. piperis</i> MFBF AN12614	< 0,025
<i>A. piperis</i> MFBF AN12404	0,51 (0,43 – 0,59)
<i>A. piperis</i> MFBF AN11119B	< 0,025

**Tablica 4.** Citotoksične koncentracije ( $IC_{50}$ ) izračunate nakon 24-satnog tretmana A549 stanica ekstraktima micelija naznačenih izolata crnih aspergila vrste *A. luchuensis* u koncentracijama od 0,025–0,8 mg/ml.

<b>Oznaka ekstrakta micelija</b>	<b><math>IC_{50}</math> (95% intervali pouzdanosti) (mg/ml)</b>
<i>A. luchuensis</i> MFBF AN11133A	0,09 (0,07 – 0,12)
<i>A. luchuensis</i> MFBF AN10927A	0,03 (0,02 – 0,03)
<i>A. luchuensis</i> MFBF AN11054A	0,08 (0,07 – 0,09)
<i>A. luchuensis</i> MFBF AN11000B	0,07 (0,06 – 0,09)

S obzirom na  $IC_{50}$  citotoksičnu koncentraciju, najmanje toksičan pokazao se ekstrakt micelija *A. piperis* MFBF AN12404 (tablica 3). Izolati MFBF AN12183 i MFBF AN12443 pokazali su se oko 3 puta toksičniji. a ekstrakt micelija izolata MFBF AN11119B oko 35 puta toksičniji. Najtoksičnijima su se pokazali ekstrakti micelija izolata MFBF AN12614, izoliran iz zraka iz renoviranih kuća u Gunji, tijekom rujna 2017. godine, i ekstrakt izolata iz zraka iz mlina žitarica u Jastrebarskom prikupljen u studenome 2012, MFBF AN11119B. Njihove  $IC_{50}$  koncentracije u ispitanom rasponu koncentracija ekstrakata nismo mogli pouzdano izračunati. Međutim, primjenom najniže ispitane koncentracije od 0,025 mg/ml vijabilnost A549 stanica iznosila je  $10,57 \pm 2,225 \%$  (slika 2 C) odnosno  $44,43 \pm 9,947 \%$  (slika 2 E).

Ekstrakti micelija izolata vrste *A. luchuensis* MFBF AN11000B, MFBF AN11054A i MFBF AN11133A pokazali su se podjednako toksičnima, dok je s obzirom na izračunatu  $IC_{50}$  ekstrakt izolata iz zraka iz mlina žitarica u Jastrebarskom u svibnju 2012., MFBF AN10927A, bio 3-4 puta toksičniji od ostalih (tablica 4).

Rezultati ovoga istraživanja upućuju na opasnost od toksičnog učinka po inhalaciji toksinogenih mikočestica micelija bilo da se radi o stambenim ili radnim sredinama, neovisno o problemima s vlagom u prostoru.

U istraživanju koje je prethodilo ovome ispitana je rasprostranjenost crnih aspergila u stambenim i radnim prostorima u Hrvatskoj koji proizvode i koji ne proizvode fumonizin grupe B (FB) te je ispitana toksičnost njihovih ekstrakata u A549 stanicama i THP-1 makrofagima (Jakšić i sur., 2018). S obzirom na izračunate  $IC_{50}$  citotoksične koncentracije nakon MTT testa osobito toksičnim se pokazao izolat *A. piperis* čija je  $IC_{50}$  u A549 stanicama iznosila  $0,460 \pm 0,011$  mg/ml, a u THP-1 makrofagima  $0,323 \pm 0,009$  mg/ml. U ispitanoj rasponu koncentracija (0,1–0,8 mg/ml) ekstrakt izolata *A. luchuensis* pokazao se manje citotoksičnim i u A549 stanicama i u THP-1 makrofagima. Maksimalna ispitana koncentracija ekstrakta od 0,8 mg/ml smanjila je vijabilnost A549 stanica oko 30 %, a THP-1 makrofaga za oko 40 %. (Jakšić i sur., 2018). Uzimajući u obzir da su u spomenutom radu ekstrakti izolata aspergila priređeni mikroekstrakcijskom procedurom (prema Smedsgaard, 1997) možemo zaključiti da na toksičnost ekstrakata pored micelija utječu i metaboliti koji se izlučuju u medij. Tako je ekstrakt micelija izolata vrste *A. piperis* MFBF AN 11119 oko 32 puta toksičniji od mikroekstrakta priređenog od istog izolata, dok je micelij izolata vrste *A. luchuensis* MFBF AN11054A više od 9 puta toksičniji u odnosu na mikroekstrakt priređen od istog izolata. Ovakvi rezultati upućuju na mogućnost antagoniziranja endometabolita prisutnih u miceliju s egzometabolitima iz medija. Preciznije zaključke mogli bismo dobiti usporedbom rezultata toksičnosti ekstrakata medija u kojemu su rasli izolati, identifikacijom metabolita u ekstraktima te ispitivanjem citotoksičnosti pojedinih pročišćenih metabolita.

Na izrazitu brojnost i kompleksnost sekundarnog metabolizma aspergila iz sekcije *Nigri* upućuje novije istraživanje prema kojemu je do identificirano do 2717 skupina gena koji kodiraju u biosintezi sekundarnih metabolita grupiranih u 455 kemijskih skupina (Vesth i sur., 2018). Prema tome, toksični učinci *in vitro*, bilo da se radi o mikroekstraktima ili o ekstraktima micelija, produkt su složenih fizikalno-kemijskih reakcija više tisuća različitih kemijskih spojeva uključujući i interakcije s biomakromolekulama staničnog modela.

Od do sada ispitanih sekundarnih metabolita crnih aspergila bikumarini pokazuju umjerenu citotoksičnost na stanicama ljudskog karcinoma, posebno 3,3'-bikumarin bikumanigrin (Hiort i sur., 2004). Nafto- $\gamma$ -pironi imaju antibakterijska, antifungalna i antitumorska svojstva (Nielsen i sur., 2009). Neki od njih su rubrofusarin B, fonsecinon A, asperpiron B i aurasperon A. Oni pokazuju citotoksičnost na staničnu liniju karcinoma kolona SW1116 te inhibiraju ksantin oksidazu. Rubrofusarin B pokazao je najveću citotoksičnost na stanice karcinoma kolona SW1116 te mu je izračunata  $IC_{50}$  4,5  $\mu\text{g/ml}$ , uz pozitivnu kontrolu s fluorouracilom (5-FU) kojem je izračunata  $IC_{50}$  5  $\mu\text{g/ml}$  (Song i sur., 2004). Od ostalih nafto- $\gamma$ -pirona, citotoksičnu aktivnost na različite stanice ljudskog karcinoma također su pokazali TMC 256 A1 (monomerni nafto- $\gamma$ -piron; derivat nafto[2,3-b]piran-4-ona (Sakurai i sur., 2002)), rubasperone D i flavasperon. TMC 256 A1 je pokazao najveću citotoksičnost s  $IC_{50}$  između 19,92 i 47,98  $\mu\text{M}$ , a ostali blagu (Huang i sur., 2011). Malformini imaju antibakterijska svojstva i inhibitori su IL-1  $\beta$  (Herbert i sur., 1994), a zanimljivost je da ne pokazuju toksične učinke oralnim putem unosa te se ne smatraju mikotoksinima u užem smislu (Nielsen i sur., 2009). Malformin A1 pokazuje citotoksični učinak na stanice ljudskog karcinoma prostate te su mu izračunate  $IC_{50}$  130 i 90 nM. Djeluje tako da inducira apoptozu, nekrozu i autofagiju kod spomenutih stanica (Liu i sur., 2016). Aspernigrin A i B pokazuju umjerenu citotoksičnost, dok piranonigrin ne pokazuje toksičnost u ljudskim stanicama karcinoma (Hiort i sur., 2004).

U studiji koja je ispitala citotoksičnost sojeva 6 vrsta aspergila, između ostalog i *A. niger*, izoliranih iz bolničkog okoliša, tj. bolničkih soba dokazana je njihova toksičnost MTT testom u stanicama bubrega svinje (SK) (Gniadek i sur., 2011). Ispitano je 57 sojeva od kojih je 84% pokazalo toksičnost. 14 sojeva pripadalo je vrsti *A. niger* od kojih je 8 pokazalo toksičnost (57%), iako je od svih vrsta *A. niger* pokazao najmanju toksičnost u SK stanicama – 6 sojeva nije pokazalo toksičnost, 3 soja su pokazala nisku citotoksičnost, 3 umjerenu i 2 visoku, ali ipak nižu u odnosu na vrstu *A. fumigatus* koji pripada aspergilima iz sekcije *Fumigati*.

U sličnoj studiji u kojoj se ispitala citotoksičnost aspergila izoliranih s neonatalne intenzivne njege dokazana je toksičnost MTT testom u stanicama bubrega svinje (SK) (Gniadek i sur., 2010). Ispitalo se 17 izolata različitih vrsta uključujući i *A. niger*, 12 izoliranih iz zraka, 4 s opreme i 1 s ruke medicinske sestre. Svih 17 je pokazalo citotoksičnost. *A. fumigatus* pokazao je najveću toksičnost i najčešće je izolirana vrsta, dok je *A. niger* pokazao najmanju toksičnost te je izoliran samo iz zraka. Citotoksičnost vrste *A. niger* bila je niska s  $IC_{50} = 15,625 \text{ cm}^2/\text{ml}$  za oba ispitana

izolata, dok se treći pokazao umjereno toksičnim ( $IC_{50} = 1,953 \text{ cm}^2/\text{ml}$ ) Procjena citotoksičnosti u ovoj studiji mjerena je u  $\text{cm}^2/\text{ml}$  što znači da je mjerena površina Petrijeve zdjelice u  $\text{cm}^2$  iz koje su ekstrahirane plijesni s medijem te su zatim pripremljena razrjeđenja tih ekstrakata kojima su tretirane SK stanice.

U studiji koja opisuje citotoksičnost 28 sojeva vrste *A. ochraceus*, 22 soja *A. niger* i 11 sojeva *A. flavus* iz bolničkog zraka u stanicama bubrega svinje (SK), najveću toksičnost pokazala je vrsta *A. ochraceus*, a najmanju *A. niger*. Od 22 ispitana soja *A. niger*, 13 su pokazala toksičnost: 8 nisku ( $IC_{50}$  od  $31,251 \text{ cm}^2/\text{ml}$  do  $7,813 \text{ cm}^2/\text{ml}$ ), 2 umjerenu ( $IC_{50}$  od  $3,906 \text{ cm}^2/\text{ml}$  do  $0,977 \text{ cm}^2/\text{ml}$ ) i 3 visoku ( $IC_{50}$  od  $0,488 \text{ cm}^2/\text{ml}$  do  $0,061 \text{ cm}^2/\text{ml}$ ) (Gniadek i sur., 2017).

Studija koja opisuje izloženost radnika, koji rade u postrojenjima za sortiranje otpada, gljivicama iz zraka dokazala je kontaminaciju u filterima klima uređaja u vozilima koji se koriste u takvim postrojenjima (Viegas i sur., 2017). Na njima su pronađene brojne sekcije aspergila, od kojih su najbrojniji aspergili sekcije *Circumdati* i *Nigri*. Proveden je MTT test citotoksičnosti ekstrakata 11 filtera u stanicama bubrega svinje (SK). Izračunate  $IC_{50}$  za sve filtere su u intervalu od  $6,25 \text{ mg/ml}$  i  $150 \text{ mg/ml}$ . Rezultati su pokazali visoki citotoksični učinak za 6 filtera (54,5%), umjereni citotoksični učinak za 4 filtera (36,4%) i niski citotoksični učinak za 1 filter (9,1%). Ključni potez za smanjenje izloženosti radnika češća je zamjena filtera klima uređajima.

Budući da su imunokompromitirane osobe najčešća meta aspergila, postoje brojni literaturni navodi o povezanosti aspergiloza s građevinskim radovima u bolnicama ili blizini istih. Plućne infekcije povezane s udisanjem konidija aspergila u česticama prašine iz zraka koje se otpuštaju prilikom građevinskih radova (Ansorg i sur., 1996) opisuju prisutnost *Aspergillus galaktomanan* antigena u serumu pacijenata u odijelu za transplantaciju koštane srži tijekom radova u samoj bolnici. Antigenemija je detektirana kod 6,7% pacijenata, a 58% tih pacijenata bolovalo je od dokazane invazivne aspergiloze ili sumnje na istu. Godišnja učestalost antigenemičnih pacijenata narasla je s 0% na 20,9% u godinu u kojoj su bili prisutni građevinski radovi.

U drugoj studiji (Nihtinen i sur., 2007) mjerena je efikasnost HEPA filtera na odjelu za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica prilikom građevinskih radova u blizini. Mjerio se broj čestica u zraku, uzorkovao se zrak, analizirala se prašina te gljivične kulture oralnih i nazalnih briseva pacijenata. Broj čestica u zraku soba pacijenata bio je 63 – 420 čestica/l, a broj čestica vanjskog zraka na ulazu u bolnicu iznosio je 173 – 659 čestica/l. Zrak u sobi pacijenata bio je negativan na aspergile dok su svi uzorci vanjskog zraka bili pozitivni. Svi brisevi nosa bili su



negativni, a samo jedan bris usta bio je pozitivan na *A. niger* (kod pacijenta koji je već imao aspergilozu). Tijekom mjerenja ni jedna aspergiloza nije dijagnosticirana. Ova studija ukazuje na učinkovitost HEPA filtera i važnost prevencije izloženosti.

Identifikacija plijesni roda *Aspergillus* temelji se na polifaznom pristupu koji obuhvaća makroskopska svojstva poraslih kolonija, mikromorfologiju konidiogenih struktura, razlike u slijedu nukleotida u visokokonzerviranim genskim regijama kao što je gen za kalmodulin, sekundarni marker u identifikaciji aspergila. U novije vrijeme rastuću važnost u identifikaciji i definiciji vrsta ima profil sekundarnih metabolita (Frisvad i Larsen, 2015).

Stoga rezultati ovog rada indirektno pridonose razumijevanju razlika u metaboličkom profilu različitih izolata pojedine vrste, s obzirom na to da razlika u citotoksičnosti ekstrakata proizlazi iz razlika u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu sekundarnih metabolita. To je osobito važno kod vrste *A. luchuensis* obzirom na primjenu u proizvodnji hrane.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ispitivanja toksičnosti ekstrakata micelija vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis* u različitim koncentracijama u stanicama ljudskoga adenokarcinoma pluća A549 pomoću MTT testa doneseni su sljedeći zaključci:

- Ekstrakti micelija svih ispitanih izolata vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* pokazali su se citotoksičnima u A549 stanicama razmjerno primijenjenoj koncentraciji.
- S obzirom na  $IC_{50}$  citotoksičnu koncentraciju, najmanje toksičan pokazao se ekstrakt micelija *A. piperis* MFBF AN12404 ( $IC_{50} = 0,51$  (0,43 – 0,59) mg/ml). Izolati MFBF AN12183 i MFBF AN12443 pokazali su se oko 3 puta toksičnijima.
- Najizraženiji toksični učinak imali su ekstrakti micelija *A. piperis* MFBF AN12614 koji je izoliran iz zraka iz renoviranih kuća u Gunji, tijekom rujna 2017. godine i *A. piperis* MFBF AN11119B izoliranog iz zraka iz mlina žitarica u Jastrebarskom prikupljen u studenome 2012 koji su pri najnižoj ispitanoj koncentraciji od 0,025 mg/ml doveli do smanjenja vijabilnosti A549 stanica za 90 % (na  $10,57 \pm 2,225$  %), odnosno za 60% (na  $44,43 \pm 9,947$  %).
- Ekstrakti micelija vrste *A. luchuensis* pokazali su izraženi toksični potencijal te su  $IC_{50}$  vrijednosti sva četiri ispitana ekstrakta bile niže od 0,1 mg/ml.
- Ekstrakti micelija izolata vrste *A. luchuensis* MFBF AN11000B, MFBF AN11054A i MFBF AN11133A pokazali su se podjednako toksičnima, dok je s obzirom na izračunatu  $IC_{50}$  ekstrakt izolata MFBF AN10927A iz zraka iz mlina žitarica u Jastrebarskom u svibnju 2012. bio 3-4 puta toksičniji od ostalih ( $IC_{50} = 0,03$  (0,02 – 0,03) mg/ml).
- Obzirom na rezultate citotoksičnosti ekstrakata micelija možemo pretpostaviti da može doći do ispoljavanja toksičnih učinka po inhalaciji toksinogenih mikočestica micelija bilo da se radi o stambenim ili radnim sredinama, neovisno o problemima s vlagom u prostoru.
- Rezultati ovoga rada upućuju na kompleksnost sastava metabolita u ekstraktima pojedinih izolata vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* s obzirom da je toksični potencijal obilježje pojedinoga izolata neovisno o vrsti.
- Dobiveni rezultati citotoksičnosti usklađeni su s visokom filogenetičkom srodnošću vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis*.
- Uspoređujući ove rezultate s ranije dobivenim rezultatima toksičnosti mikroekstrakata koji sadrže metabolite iz micelija i metabolite iz medija, možemo pretpostaviti da dolazi do

antagonizma endometabolita micelija sa egzometabolitima medija obzirom da su se ekstrakti micelija po jednog izolata vrste *A. piperis* i *A. luchuensis* pokazali toksičnijima u odnosu na mikroekstrakte istih izolata analognih masa.

## 6 LITERATURA

- Ansorg R, van den Boom R, von Heinegg EH, Rath PM. Association between incidence of *Aspergillus* antigenemia and exposure to construction works at a hospital site. *Zentralbl Bakteriol*, 1996, 284, 146–152.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497–516.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick & Adelberg Medicinska mikrobiologija. Split, Placebo d.o.o., 2015, str. 699-701.
- Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 32, 89–95.
- Di Paolo N, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M. Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 1994, 9 Suppl 4, 116–120.
- Edite Bezerra da Rocha M, Freire F da CO, Erlan Feitosa Maia F, Izabel Florindo Guedes M, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 2014, 36, 159–165.
- El-Debaiky SA. Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi *in vitro* in comparison with *Trichoderma harzianum*. *Microb Pathog*, 2017, 113, 135–143.
- Escobar N, Ordonez SR, Wösten HAB, Haas PJA, de Cock H, Haagsman HP. Hide, keep quiet, and keep low: Properties that make *Aspergillus fumigatus* a successful lung pathogen. *Front Microbiol*, 2016, 7, 438.
- Francetić I i suradnici. Farmakoterapijski priručnik 7. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 429.
- Frisvad JC, Larsen TO. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99, 7859–7877.
- Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of

- Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102, 9481–9515.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 9727–9732.
- Fröhlich-Nowoisky J, Pickersgill DA, Després VR, Pöschl U. High diversity of fungi in air particulate matter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 12814–12819.
- Gniadek A, Krzyściak P, Twaruzek M, Macura AB. Occurrence of fungi and cytotoxicity of the species: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus Niger* and *Aspergillus flavus* isolated from the air of hospital wards. *Int J Occup Med Environ Health*, 2017, 30, 231–239.
- Gniadek A, Macura A, Twaruzek M, Grajewski J. Cytotoxicity of *Aspergillus* strains isolated from the neonatal intensive care unit environment. *Adv Med Sci*, 2010, 55, 242–249.
- Gniadek A, Macura AB, Górkiewicz M. Cytotoxicity of *Aspergillus* fungi isolated from hospital environment. *Polish J Microbiol*, 2011, 60, 59–63.
- Herbert JM, Savi P, Lalé A, Laplace MC, Baudry N, Pereillo JM, Emonds-Alt X. Malformin-A1 inhibits the binding of interleukin-1 beta (IL1 beta) and suppresses the expression of tissue factor in human endothelial cells and monocytes. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48, 1211–1217.
- Hiort J, Maksimenka K, Reichert M, Perović-Ottstadt S, Lin WH, Wray V, Steube K, Schaumann K, Weber H, Proksch P, Ebel R, Müller WEG, Bringmann G. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*. *J Nat Prod*, 2004, 67, 1532–1543.
- Hof H, Kupfahl C. Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: An example that mycotoxins are potential virulence factors. *Mycotoxin Res*, 2009, 25, 123–131.
- Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One*, 2013, 8, e63769.
- Huang HB, Xiao ZE, Feng XJ, Huang CH, Zhu X, Ju JH, Li MF, Lin YC, Liu L, She ZG. Cytotoxic naphtho- $\gamma$ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* (GX1-5E).

*Helv Chim Acta*, 2011, 94, 732–1740.

Jakšić Despot D. Pojedinačni i kombinirani učinci mikotoksina i ekstrakata nekih *Aspergillus* vrsta plijesni u ljudskim staničnim linijama. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko - biokemijski fakultet; 2016.

Jakšić D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Jelić D, Kopjar N, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Fumonisin production and toxic capacity in airborne black *Aspergilli*. *Toxicol Vitro*, 2018, 53, 160–171.

Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65, 209–218.

Jovičić-Petrović J, Jeremić S, Vucković I, Vojnović S, Bulajić A, Raičević V, Nikodinović-Runić J. *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen *Pythium aphanidermatum*. *Arch Biol Sci*, 2016, 68, 279–289.

Jurjević Ž, Peterson SW, Stea G, Solfrizzo M, Varga J, Hubka V, Perrone G. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. *IMA Fungus*, 2012, 3, 159–173.

Kalenić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 562-563.

Klich MA. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol Ind Health*, 2009, 25, 657–667.

Liu Y, Wang M, Wang D, Li X, Wang W, Lou H, Yuan H. Malformin A1 promotes cell death through induction of apoptosis, necrosis and autophagy in prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77, 63–75.

Maeda M, Tokashiki Masashi, Tokashiki Midori, Uechi K, Ito S, Taira T. Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126, 162–168.

Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395, 1225–1242.

- Nihtinen A, Anttila VJ, Richardson M, Meri T, Volin L, Ruutu T. The utility of intensified environmental surveillance for pathogenic moulds in a stem cell transplantation ward during construction work to monitor the efficacy of HEPA filtration. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 40, 457–460.
- Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, Rediers H, Lievens B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol*, 2017, 10, 296–322.
- Richardson M, Bowyer P, Sabino R. The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Med Mycol*, 2019, 57, S145–S154.
- Sakurai M, Kohno J, Yamamoto K, Okuda T, Nishio M, Kawano K, Ohnuki T. TMC-256A1 and C1, new inhibitors of IL-4 signal transduction produced by *Aspergillus niger var niger* TC 1629. *J Antibiot*, 2002, 55, 685–692.
- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 2004, 50, 45–61.
- Scharf DH, Heinekamp T, Remme N, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93, 467–472.
- Scott JA. Studies on indoor fungi. Ph D Thesis. Toronto: University of Toronto; 2001.
- Smedsgaard J. Micro-scale extraction procedure for standardization screening of fungal metabolite production in cultures. *J Chromatogr A*, 1997, 60, 264–270.
- Song YC, Li H, Ye YH, Shan CY, Yang YM, Tan RX. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 241, 67–72.
- Unković N, Dimkić I, Stanković S, Jelikić A, Stanojević D, Popović S, Stupar M, Vukojević J, Grbić ML. Seasonal diversity of biodeteriogenic, pathogenic, and toxigenic constituents of airborne mycobiota in a sacral environment. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2018, 69, 317–327.

- Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Baranyi N, Vágvölgyi C, Despot DJ, Magyar D, Meijer M, Samson RA, Šegvić Klarić M. Occurrence of black *Aspergilli* in indoor environments of six countries. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65, 219–223.
- Vesth TC, Nybo JL, Theobald S, Frisvad JC, Larsen TO, Nielsen KF, Hoof JB, Brandl J, Salamov A, Riley R, Gladden JM, Phatale P, Nielsen MT, Lyhne EK, Kogle ME, Strasser K, McDonnell E, Barry K, Clum A, Chen C, LaButti K, Haridas S, Nolan M, Sandor L, Kuo A, Lipzen A, Hainaut M, Drula E, Tsang A, Magnuson JK, Henrissat B, Wiebenga A, Simmons BA, Mäkelä MR, de Vries RP, Grigoriev I V., Mortensen UH, Baker SE, Andersen MR. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*. *Nat Genet*, 2018, 50, 1688–1695.
- Viegas C, Faria T, de Oliveira AC, Caetano LA, Carolino E, Quintal-Gomes A, Twarużek M, Kosicki R, Soszczyńska E, Viegas S. A new approach to assess occupational exposure to airborne fungal contamination and mycotoxins of forklift drivers in waste sorting facilities. *Mycotoxin Res*, 2017, 33, 285–295.



## 6. SAŽETAK

Crni aspergili široko su rasprostranjene plijesni prilagođene različitim supstratima. Pored primjene u biotehnologiji i industriji, mogu biti i prijetnja zdravlju s obzirom na alergijski, invazivni i toksični potencijal.

Cilj ovog rada bio je usporediti toksičnost ekstrakata micelija različitih izolata vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis* s obzirom na morfološku i filogenetičku srodnost te zbog pojavnosti spomenutih vrsta u zraku i prašini zatvorenih prostora preko kojih mogu u dišnom sustavu izloženih ljudi djelovati štetno.

U ovome radu ispitan je citotoksični učinak ekstrakata micelija 9 izolata vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* u stanicama ljudskoga adenokarcinoma pluća A549. Ispitivanje se provodilo tretiranjem A549 stanica različitim koncentracijama ekstrakata micelija (0,025–0,8 mg/ml) svakog izolata tijekom 24 sata. Vijabilnost tretiranih stanica određena je MTT testom citotoksičnosti u odnosu na kontrole te su izračunate koncentracije koje inhibiraju rast 50% stanica -  $IC_{50}$ .

Svi ispitanii ekstrakti micelija pokazali su se citotoksičnima u A549 stanicama među kojima se najtoksičniji pokazao onaj priređen od izolata vrste *A. piperis* MFBF AN12614 koji je pri najmanjoj ispitanoj koncentraciji 0,025 mg/ml za 90% smanjio vijabilnost A549 stanica. Najmanje toksičan pokazao se ekstrakt micelija *A. piperis* MFBF AN12404 s  $IC_{50}$  od 0,5068 mg/ml. Ekstrakti micelija vrste *A. luchuensis* pokazali su izraženi toksični potencijal te su  $IC_{50}$  vrijednosti sva četiri ispitana ekstrakta bile niže od 0,1 mg/ml, dok je s obzirom na izračunatu  $IC_{50}$  od 0,03 mg/ml ekstrakt izolata MFBF AN10927A iz zraka iz mlina žitarica bio najtoksičniji među ispitanim ekstraktima micelija vrste *A. luchuensis*.

Rezultati ovoga rada upućuju na kompleksnost sastava metabolita u ekstraktima pojedinih izolata vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* obzirom da je toksični potencijal obilježje pojedinoga izolata neovisno o vrsti. Time su dobiveni rezultati usklađeni s visokim stupnjem filogenetičke srodnosti. Budući da su se svi izolati spomenutih vrsta pokazali citotoksičnima u A549 stanicama neovisno o izvoru izolata, postoji opasnost od toksičnoga učinka pri inhalaciji toksinogenih mikočestica micelija u prostorima gdje ljudi borave.

## 7. SUMMARY

Black Aspergilli are widespread molds inhabiting different substrates. In addition to their many positive roles in biotechnology and food industry, they can also be harmful because of their allergic, invasive and toxic potential.

This paper aimed to compare the cytotoxicity of mycelium extracts of different isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* species because of their morphological and phylogenetic relatedness and because of their incidence in the air and dust in indoor environments in which they can be harmful to the respiratory system of exposed people.

In this paper the cytotoxicity of mycelium extracts of nine isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* species was tested on A549 human lung adenocarcinoma cells. The assay was performed by treating A549 cells with different concentrations (0.025 - 0.8 mg/ml) of mycelium extracts of each isolate for 24 hours. The viability of treated cells was measured by MTT cytotoxicity assay relative to the controls, and the concentrations inhibiting the growth of 50% cells -  $IC_{50}$  were calculated.

All tested mycelium extracts proved to be cytotoxic on A549 cells. The most toxic was the mycelium extract of *A. piperis* isolate MFBF AN12614 which decreased viability of A549 cells by 90% at a concentration of 0.025 mg/ml. The least toxic was mycelium extract of *A. piperis* MFBF AN12404 with  $IC_{50}$  of 0.5068 mg/ml. Mycelium extracts of *A. luchuensis* species showed pronounced toxic potential and  $IC_{50}$  of all four tested mycelium extract were lower than 0.1 mg/ml. Considering  $IC_{50}$  of 0.03 mg/ml, extract of airborne isolate MFBF AN10927A from a grain mill was the most toxic among the examined mycelium extracts of *A. luchuensis* species.

The results of this study indicate the complexity of metabolite composition in extracts of individual isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* species and the toxic potential is characteristic of an individual isolate regardless of species. Thereby, the results are consistent with a high degree of phylogenetic relatedness.

Because all tested isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* proved to be cytotoxic on A549 cells, inhalation of airborne or dustborne toxinogenic mycoparticles may cause damage in respiratory system of exposed people, regardless of the type of indoor environment or water damage.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za mikrobiologiju  
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata micelija plijesni vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis* u stanicama ljudskoga adenokarcinoma pluća A549

Ida Ruszkowski

#### SAŽETAK

Crni aspergili široko su rasprostranjene plijesni prilagođene različitim supstratima. Pored primjene u biotehnologiji i industriji, mogu biti i prijetnja zdravlju s obzirom na alergijski, invazivni i toksični potencijal. Cilj ovog rada bio je usporediti toksičnost ekstrakata micelija različitih izolata vrsta *Aspergillus piperis* i *Aspergillus luchuensis* s obzirom na morfološku i filogenetičku srodnost te zbog pojavnosti spomenutih vrsta u zraku i prašini zatvorenih prostora preko kojih mogu u dišnom sustavu izloženih ljudi djelovati štetno. U ovome radu ispitan je citotoksični učinak ekstrakata micelija 9 izolata vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* u stanicama ljudskoga adenokarcinoma pluća A549. Ispitivanje se provodilo tretiranjem A549 stanica različitim koncentracijama ekstrakata micelija (0,025–0,8 mg/ml) svakog izolata tijekom 24 sata. Vijabilnost tretiranih stanica određena je MTT testom citotoksičnosti u odnosu na kontrole te su izračunate koncentracije koje inhibiraju rast 50% stanica -  $IC_{50}$ . Svi ispitani ekstrakti micelija pokazali su se citotoksičnima u A549 stanicama među kojima se najtoksičniji pokazao onaj priređen od izolata vrste *A. piperis* MFBF AN12614 koji je pri najmanjoj ispitanoj koncentraciji 0,025 mg/ml za 90% smanjio vijabilnost A549 stanica. Najmanje toksičan pokazao se ekstrakt micelija *A. piperis* MFBF AN12404 s  $IC_{50}$  od 0,5068 mg/ml. Ekstrakti micelija vrste *A. luchuensis* pokazali su izraženi toksični potencijal te su  $IC_{50}$  vrijednosti sva četiri ispitana ekstrakta bile niže od 0,1 mg/ml, dok je s obzirom na izračunatu  $IC_{50}$  od 0,03 mg/ml ekstrakt izolata MFBF AN10927A iz zraka iz mlina žitarica bio najtoksičniji među ispitanim ekstraktima micelija vrste *A. luchuensis*. Rezultati ovoga rada upućuju na kompleksnost sastava metabolita u ekstraktima pojedinih izolata vrsta *A. piperis* i *A. luchuensis* obzirom da je toksični potencijal obilježje pojednoga izolata neovisno o vrsti. Time su dobiveni rezultati usklađeni s visokim stupnjem filogenetičke srodnosti. Budući da su se svi izolati spomenutih vrsta pokazali citotoksičnima u A549 stanicama neovisno o izvoru izolata, postoji opasnost od toksičnoga učinka pri inhalaciji toksinogenih mikočestica micelija u prostorima gdje ljudi borave.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 30 stranica, 3 grafičkih prikaza, 4 tablice i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Aspergillus piperis*, *Aspergillus luchuensis*, citotoksičnost, ekstrakt micelija, A549 stanice,  $IC_{50}$   
Mentor: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Maja Friščić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: lipanj, 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of microbiology  
Schrottova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Cytotoxicity of mold mycelium extracts of *Aspergillus piperis* and *Aspergillus luchuensis* species on A549 human lung adenocarcinoma cells

Ida Ruszkowski

#### SUMMARY

Black Aspergilli are widespread molds inhabiting different substrates. In addition to their many positive roles in biotechnology and food industry, they can also be harmful because of their allergic, invasive and toxic potential. This paper aimed to compare the cytotoxicity of mycelium extracts of different isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* species because of their morphological and phylogenetic relatedness and because of their incidence in the air and dust in indoor environments in which they can be harmful to the respiratory system of exposed people. In this paper was tested the cytotoxicity of mycelium extracts of nine isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* species on A549 human lung adenocarcinoma cells. The assay was performed by treating A549 cells with different concentrations (0.025 - 0.8 mg/ml) of mycelium extracts of each isolate for 24 hours. The viability of treated cells was measured by MTT cytotoxicity assay relative to the controls, and the concentrations inhibiting the growth of 50% cells -  $IC_{50}$  were calculated. All tested mycelium extracts proved to be cytotoxic on A549 cells. The most toxic was the mycelium extract of *A. piperis* isolate MFBF AN12614 which decreased viability of A549 cells by 90% at a concentration of 0.025 mg/ml. The least toxic was mycelium extract of *A. piperis* MFBF AN12404 with  $IC_{50}$  of 0.5068 mg/ml. Mycelium extracts of *A. luchuensis* species showed pronounced toxic potential and  $IC_{50}$  of all four tested mycelium extract were lower than 0.1 mg/ml. Considering  $IC_{50}$  of 0.03 mg/ml, extract of airborne isolate MFBF AN10927A from a grain mill was the most toxic among the examined mycelium extracts of *A. luchuensis* species. The results of this study indicate the complexity of metabolite composition in extracts of individual isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* species and the toxic potential is characteristic of an individual isolate regardless of species. Thereby, the results are consistent with a high degree of phylogenetic relatedness. Because all tested isolates of *A. piperis* and *A. luchuensis* proved to be cytotoxic on A549 cells, inhalation of airborne or dustborne toxinogenic mycoparticles may cause damage in respiratory system of exposed people, regardless of the type of indoor environment or water damage.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 30 pages, 3 figures, 4 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Aspergillus piperis*, *Aspergillus luchuensis*, cytotoxicity, mycelium extracts, A549 cells,  $IC_{50}$

Mentor: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Postdoctoral research and teaching associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Postdoctoral research and teaching associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Maja Friščić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2020.