

Genotoksični učinak bis - (2-etilheksil) ftalata

Dević, Doroteja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:515573>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Doroteja Dević

707/N

**GENOTOKSIČNI UČINAK
BIS - (2 - ETILHEKSIL) FTALATA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Durgo.

Zahvaljujem mami, tati, bratu i Karlu, široj obitelji i prijateljima što su mi uvijek tijekom studija bili podrška na sve načine i moje krijesnice u tamnijim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

GENOTOKSIČNI UČINAK BIS - (2 - ETILHEKSIL) FTALATA

Doroteja Dević, 707/N

Sažetak: Ftalati su esteri ftalne kiseline i alifatskih alkohola koji se dodaju u plastiku da bi ona omekšala te postala savitljiva i trajnija. Primijenjuju se u raznovrsnim proizvodima pa su široko rasprostranjeni u okolišu, a jedan od najznačajnijih izvora je hrana. U posljednje vrijeme sve se više ispituje njihov učinak na ljudski organizam te genotoksično djelovanje okolišno značajnih koncentracija. Jedan od najčešće korištenih ftalata je bis - (2 - etilheksil) ftalat (DEHP). U ovom radu istraženo je citotoksično, prooksidativno i mutageno djelovanje DEHP-a na stanične linije HEP2, CaCo2 i HepG2 te TA98 i TA100 sojeve *Salmonella typhimurium*. Nije dokazano citotoksično djelovanje DEHP-a na stanične linije, dok je na bakterijskom test sustavu detektirano smanjeno preživljenje stanica ovisno o primijenjenoj koncentraciji. Utvrđena je povećana indukcija slobodnih radikala u stanicama HEP2 i CaCo2 nakon 24 i 48 sati inkubacije s DEHP-om, dok njegov učinak na stanice HepG2 nije utvrđen. Dokazan je mutageni potencijal DEHP-a zbog njegove sposobnosti indukcije točkastih mutacija u bakterijama te lomova DNA u staničnim linijama.

Glavne riječi: bakterijski test sustav *Salmonella typhimurium*, DEHP, genotoksičnost, humane stanične linije karcinoma

Rad sadrži: 86 stranica, 19 slika, 7 tablica, 147 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina (predsjednik)
2. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. Izv. prof. dr. sc. Višnja Gaurina-Srček (član)
4. Doc. dr. sc. Kristina Radošević (zamjena)

Datum obrane: lipanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics
Scientific area: Biotechnical Sciences
Science field: Nutrition

GENOTOXIC EFFECT OF BIS - (2 - ETYLHEXYL) PHTHALATE

Doroteja Dević, 707/N

Abstract: Phthalates are esters of phthalic acid and aliphatic alcohols which are added to the plastic to soften it and make it more durable and flexible. They are used in a variety of items, which makes them widespread in the environment. One of the most important source is food. Lately, their effect on the human body and genotoxic effects of environmentally relevant concentrations are often examined. One of the most commonly used phthalate is bis - (2 - ethylhexyl) phthalate (DEHP). This thesis investigated the cytotoxic, prooxidant and mutagenic effects of DEHP on cell lines HEp2, CaCo2 and HepG2 and TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium*. Cytotoxic activity of DEHP on the cell lines was not established, but it was established on the bacterial cells (depending on the tested concentration). The increased induction of free radicals in cells HEp2 and CaCo2 after 24 and 48 hours incubation with a DEHP was detected, while its effect on HepG2 cells was not determined. DEHP has ability to induce point mutations and DNA breaks, so its mutagenic potential is established.

Keywords: bacterial test system *Salmonella typhimurium*, DEHP, genotoxicity, human carcinoma cell lines

Thesis contains: 86 pages, 19 pictures, 7 tables, 147 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronical (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Ksenija Durgo, Associate Professor

Reviewers:

1. PhD Višnja Bačun-Družina, Associate Professor (chairman)
2. PhD Ksenija Durgo, Associate Professor (mentor)
3. PhD Višnja Gaurina-Srček, Associate Professor (member)
4. PhD Kristina Radošević, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July, 2016

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MUTACIJE I GENOTOKSIČNO DJELOVANJE KEMIKALIJA.....	3
2.1.1. Uloga oksidacijskog stresa u nastanku mutacija	4
2.1.2. Popravak oštećenja DNA	6
2.1.3. Detekcija mutacija.....	7
2.2. ESTERI FTALNE KISELINE	7
2.2.1. Vrste i upotreba ftalata	8
2.2.2. Hrana i kozmetički proizvodi kao glavni izvori ftalata	9
2.2.3. Toksikokinetika ftalata	11
2.2.4. Toksičnost ftalata.....	12
2.2.5. Zakonska regulativa o ftalatima	15
2.3. DEHP	15
2.3.1. Toksikokinetika DEHP-a.....	16
2.3.2. Toksičnost DEHP-a.....	18
2.3.2.1. Genotoksičnost DEHP-a.....	19
2.3.3. Mehanizam toksičnosti DEHP-a	23
3. MATERIJALI I METODE	25
3.1. MATERIJAL.....	25
3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnih učinaka	25
3.1.2. Kemikalije	27
3.1.3. Laboratorijska oprema.....	34
3.2. METODE RADA.....	36
3.2.1. Nasađivanje staničnih linija HEp2, CaCo2 i HepG2 u monosloju.....	36
3.2.2. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja	36
3.2.3. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra	37
3.2.4. Priprema stanica i otopina DEHP-a za eksperiment.....	37
3.2.5. Određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija DEHP-a na staničnim linijama HEp2, CaCo2 i HepG2 NR testom.....	38
3.2.6. Određivanje prooksidativnog učinka različitih koncentracija DEHP-a na staničnim linijama HEp2, CaCo2 i HepG2 DCF - DA testom	39
3.2.7. Određivanje genetičkih mutacija različitih koncentracija DEHP-a na HEp2,CaCo2 i HepG2 staničnim linijama Komet testom	41
3.2.8. Uzgoj bakterija <i>Salmonella typhimurium</i> iz pohranjene bakterijske kulture.....	42

3. 2. 9. Određivanje mutagenog potencijala DEHP-a pomoću bakterijskog test sustava <i>Salmonella typhimurium</i>	43
3. 2. 10. Statistička obrada podataka	45
4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4. 1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA DEHP-a RAZLIČITIH KONCENTRACIJA	48
4. 2. ODREĐIVANJE PROOKSIDATIVNOG DJELOVANJA DEHP-a RAZLIČITIH KONCENTRACIJA	53
4. 3. ODREĐIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA IZAVANIH RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA DEHP-a.....	59
4. 4. ODREĐIVANJE TOČKASTIH GENETIČIH MUTACIJA IZAVANIH RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA DEHP-a	62
5. ZAKLJUČCI	70
6. POPIS LITERATURE	71

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

- ADME - (engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*) - apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija nekog spoja (toksikokinetika)
- AGD - anogenitalna udaljenost
- BBP - butil - benzil ftalat
- BPA - bisfenol A
- BSA - (engl. *bovine serum albumin*) - albumin goveđeg seruma
- CaCo2 - kontinuirana stanična linija adenokarcinoma epitela debelog crijeva
- CAR 2 - konstitutivni receptor androstana (CAR) u ljudi
- CAT - katalaza
- CERHR - (engl. *Evaluation of Risks to Human Reproduction*) Centar za procjenu rizika za humanu reprodukciju
- CHO (K1) - stanična linija ovarija kineskog hrčka
- CPSC - (engl. *U. S. Consumer Product Safety Commission*) - Američka komisija za sigurnost potrošačkih proizvoda
- DBEP - bis - (2 - n - butoksietil) ftalat
- DBP - dibutil ftalat
- DCF - diklorofluorescein
- DCF- DA - 2', 7' - diklorofluorescein diacetat
- DCFH - 2', 7'- diklorofluorescein
- DCHP - dicikloheksil ftalat
- DEHP - bis - (2 - etilheksil) ftalat
- DEP - dietil ftalat
- DiBP - di - izo - butil ftalat
- DiDP - di - izo - decil ftalat
- DiNP - di - izo - nonil ftalat
- DMP - dimetil ftalat
- DMSO - dimetil sulfoksid
- DnBP - di - n - butil ftalat
- DNHP - diheksi ftalat
- DnOP - di - n - oktil ftalat
- DPP - diamil ftalat

- EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
- EFSA - (engl. *European Food Safety Authority*) - Europska agencija za sigurnost hrane
- EPA - (engl. *United States Environmental Protection Agency*) - Američka agencija za zaštitu okoliša
- FBS - (engl. *fetal bovine serum*) - fetalni goveđi serum
- GPX - glutation peroksidaza
- GSH - glutation
- HEK293 - humana embrionska stanična linija bubrega
- HeLa - humana stanična linija epitela karcinoma vrata maternice
- HEp2 - kontinuirana stanična linija karcinoma larinksa čovjeka
- HepG2 - kontinuirana stanična linija hepatocelularnog karcinoma jetre u čovjeka
- HO - hem oksigenaza
- IARC - (engl. *International Agency for Research on Cancer*) - Međunarodna agencija za istraživanje raka
- KGN - (engl. *human ovarian granulosa-like tumor cell line*) - ljudska stanična linija granulosa tumora jajnika
- LNCaP - stanična linija humanog adenokarcinoma prostate
- MA-10 - (engl. *mouse Leydig tumor cells*) - stanice tumora Leydigovih stanica miša
- MEHP - mono - (2 - etilheksil) ftalat
- MEP - monoetil ftalat
- MiBP - mono - izo - butil ftalat
- MMP - monometil ftalat
- NB - *Nutrient broth* kompletna tekuća podloga
- NIEHS - (engl. *National Institute of Environmental Health Sciences*) - Nacionalni institut za znanosti zaštite okoliša
- NR - (engl. *neutral red*) - neutralno crvena boja
- NTP - (engl. *The National Toxicology Program*) - Nacionalni toksikološki program
- PBS - fosfatni pufer
- PE - esteri ftalne kiseline
- PET - poli (etilen - tereftalat)
- PPAR α - alfa izoforma peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor

- PVC - polivinil klorid
- ROS - (engl. *reactive oxygen species*) - reaktivne kisikove vrste
- S9 - metabolički aktivator, mikrosomalni homogenat jetre štakora
- SOD - superoksid dismutaza
- TA - površinski (top) agar
- TDI vrijednosti - (engl. *tolerable daily intake*) - prihvatljivi dnevni unos
- TSA - (engl. *Tryptone soya agar*) - sojin tripton agar
- VB - *Vogel - Boner* minimalna podloga

1. UVOD

Ftalati su po kemijskom sastavu esteri ftalne kiseline i alifatskih alkohola. Dodaju se u plastiku (često uz bisfenol A (BPA)) da bi se omogućila njihova savitljivost, rastezljivost, trajnost te da bi ona omekšala. Esteri ftalata su široko rasprostranjeni u okolišu (u kućanstvima i u prirodi), što je rezultat njihove primjene u raznovrsnim proizvodima. Primjerice, nalaze se u kozmetičkim proizvodima za osobnu njegu, ponekim dodacima prehrani, lijekovima, tiskarskim bojama, lakovima, ljepilima (Aurela i sur., 1999), u igračkama koje sadrže vinil (Peters, 2003), fleksibilnim PVC materijalima koji se koriste u potrošačkim proizvodima kao što su pakiranje hrane, podovi, kućni namještaj, ostali građevinski materijal i medicinska oprema (Cao, 2010; Wormuth i sur., 2006). Zbog svojih fizikalno - kemijskih svojstava ftalati su vrlo mobilni i lako migriraju iz plastičnih proizvoda u prostor koji ih okružuje pa tako dopijevaju u okoliš (Jurica i sur., 2013). Hrana u plastičnom pakiranju jedan je od značajnijih prehrambenih izvora ftalata (Cirillo i sur., 2011), a budući da oni nisu kovalentno vezani unutar molekule PVC-a, po principu slično otapa slično, male količine masne hrane ili ulja, dovoljne su za ekstrakciju tih lipofilnih omekšavala u hranu (HAH, 2014). Ftalati su (kao i BPA) endokrini disruptori (utječu na funkcije hormona) te su kategorizirani kao kemikalije koje uzrokuju zabrinutost, od strane Američke agencije za zaštitu okoliša. Epidemiološke studije, kao i studije na životinjama, pokazale su da izloženost tim kemikalijama može uzrokovati poremećaje u razvoju i reprodukciji (Meeker, 2012) te brojne druge. Ftalati su se uglavnom pokazali kao negenotoksični spojevi, a prema CPSC (engl. *U. S. Consumer Product Safety Commission* - Komisija za sigurnost potrošačkih proizvoda, U. S.) bilo koji tumor izazvan ftalatima vjerojatno nastaje putem negenotoksičnih mehanizama (CPSC, 2010).

Jedan je od najopasnijih ftalata bis - (2 - etilheksil) ftalat (DEHP), kojemu su ljudi svakodnevno izloženi (Silva i sur., 2006), a u organizam dopijeva gastrointestinalnom apsorpcijom, apsorpcijom kroz kožu i parenteralno.

Baze podataka o genotoksičnosti DEHP-a i srodnih učinaka su vrlo široke i složene, sadrže studije koje obuhvaćaju više godina istraživanja, odražavaju promjene u stanju znanosti, a sadrže i veliki broj različitih tipova modela i paradigmi (Caldwell, 2012). Poseban problem predstavljaju okolišno značajne koncentracije DEHP-a za čije potencijalno genotoksično djelovanje ili ne postoje podaci ili su vrlo šturi.

U ovom radu istražit će se citotoksično, prooksidativno i genotoksično djelovanje okolišno značajnih koncentracija DEHP-a korištenjem humanih staničnih linija karcinoma larinksa, adenokarcinoma epitela debelog crijeva, hepatocelularnog karcinoma te bakterijskih sojeva TA98 i TA100 *Salmonella typhimurium*. Dobiveni rezultati ovog istraživanja doprinjet će boljem razumijevanju učinaka niskih koncentracija DEHP-a, a ujedno će se dobiti bolji uvid u moguće posljedice izloženosti DEHP-u u okolišu.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1. MUTACIJE I GENOTOKSIČNO DJELOVANJE KEMIČALIJA

Genetička toksikologija (genotoksikologija) je primijenjena disciplina kojoj je cilj detektirati agense koji oštećuju nasljedni materijal, DNA, te objasniti mehanizme nastanka mutacija (mutagenezu) (Timbrell, 2000).

Mutacija je nasljedna promjena vezana uz genotip stanice, dakle, njezina pojava podrazumijeva da je dvostruka uzvojnica DNA u većoj ili manjoj mjeri promijenjena. Genetske mutacije nastaju u somatskim i generativnim stanicama. Somatske mutacije mogu uzrokovati bolesti (npr. tumore), a germinativne (spolne) mutacije nastaju u gametama te se prenose na potomstvo.

Mutacije nastaju spontano ili su inducirane. Spontane mutacije najčešće nastaju zbog grešaka u replikaciji DNA, a inducirane mutacije nastaju djelovanjem fizikalnih i kemijskih mutagena (Lodish i sur., 2000).

Bilo koja promjena u redosljedu dušičnih baza u molekuli DNA uzrokuje mutaciju koja se može ili ne mora ispoljiti u obliku fenotipa, pri čemu se jedinka sa ispoljenim novim fenotipom označava kao mutant.

Genetske mutacije mogu biti štetne i letalne (uslijed čega stanica s promijenjenim genetičkim kodom odumire te s njom nestaje izmijenjena DNA), zato što geni utječu na ekspresiju različitih svojstava preko biokemijskih procesa. Ukoliko mutacija nije letalna, promijenjena DNA će se dalje nasljeđivati, a mutacija će biti fiksirana. Sve sljedeće stanice će sadržavati izmijenjenu informaciju za redosljed aminokiselina u nekom proteinu. Ipak, mutacije su najčešće recesivne jer je u heterozigota prisutan i normalni alel gena, zbog čega je mutirani alel sakriven iza funkcije normalnoga. S druge strane, dominantne mutacije mogu biti povezane s gubitkom funkcije nekog proteina što može imati brojne posljedice.

Neke od mutacija su supstitucija parova baza i mutacije pomaka okvira čitanja (tzv. *frameshift* mutacije), koje se zajedno nazivaju **točkastim mutacijama**.

Do supstitucije parova baza može doći zbog kemijske modifikacije dušične baze ili ugradnje nekog kemijskog spoja u molekulu DNA tijekom procesa replikacije. Do kemijske modifikacije baze može doći u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa djelovanjem nekog ksenobiotika, primjerice, adenin se može deaminirati i prijeći u hipoksantin koji strukturno nalikuje gvaninu pa afinitet prema njemu ima citozin, koji se može s njim vezati u molekuli DNA. Ugradnja nekog kemijskog spoja u lanac DNA može se dogoditi samo tijekom

replikacije, i to zbog kemijske sličnosti tog spoja nekoj od baza zbog čega se ona ugradi u jedan lanac molekule DNA umjesto odgovarajuće dušične baze, primjerice, 5 - bromouracil je analog timina pa se može inkorporirati nasuprot adeninu u novonastalom lancu DNA (Lodish i sur., 2000).

Mutacije pomaka okvira čitanja javljaju se uslijed insercije ili delecije jedne ili više baza u DNA. Nakon toga, genetički kod više nije isti jer se pomiče tzv. okvir čitanja (redosljed dušičnih baza na DNA je pomaknut za jednu ili više umetnutih ili izgubljenih baza). Primjerice, etidij bromid je molekula koja može interkalirati u molekulu DNA i tako uzrokovati *frameshift* mutaciju (Lodish i sur., 2000).

Aneuploidija je mutacija koja podrazumijeva gubitak ili povećanje broja kromosoma za jedan ($2n \pm 1$), a uzrokovana je neravnomjernom distribucijom kromosoma prilikom mejoze ili mitoze. Do aneuploidije dolazi zbog nefunkcioniranja diobenog vretena prilikom mejotičke ili mitotičke diobe, promijenjene strukture kinetohora, tubulina ili centromera, inhibicije proteina na centromeri ili iz drugih razloga (Lodish i sur., 2000).

Kromosomske aberacije su strukturne promjene kromosoma koje nastaju kao posljedica neuspješnog *crossing overa* (rekombinacije homolognih kromosoma) ili loma kromosoma uzrokovanog nekim sredstvom. Nakon loma, moguće je spajanje prelomljenih krajeva bez posljedica (za što postoji mala vjerojatnost). U slučaju kada ne dođe do povezivanja, nastaju acentrični (bez centromera) ili centrični fragmenti (s centromerom). Acentrični se fragment tijekom mitoze gubi, a s njime i genetičke informacije (slijed baza) koje sadrži. Dva centrična fragmenta se mogu povezati u novu strukturu - dicentrik. Dicentrični kromosom tijekom anafaze puca i u novonastalim stanicama kćerima jedna ima duplicirane gene, a druga deletirane gene. Osim delecije i duplikacije, može doći i do inverzije koja uključuje dva loma, rotaciju za 180° i ponovno vezanje u strukturu kromosoma. Klastogeneza podrazumijeva gubitak, dodatak ili rearanžman dijelova kromosoma, a spojevi koji izazivaju lomove nazivaju se klastogeni (Lodish i sur., 2000).

2. 1. 1. Uloga oksidacijskog stresa u nastanku mutacija

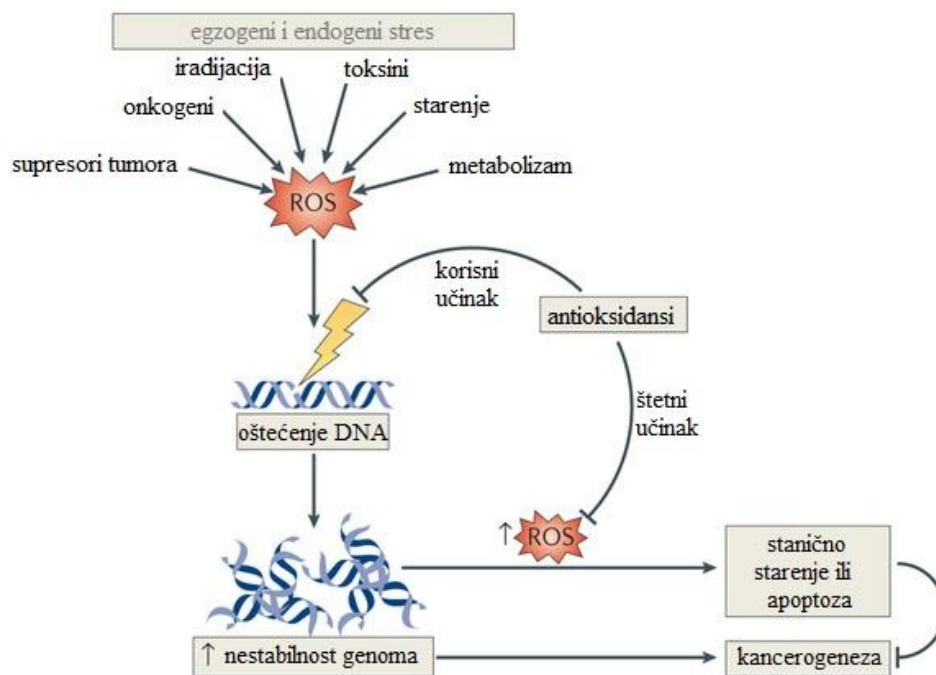
Oksidacijski stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidativno - redukcijским reakcijama u smjeru oksidacije, pri čemu se prekomjerno stvaraju slobodni radikali kisika. Pritom stanica gubi mogućnost da ih razgradi i narušena je ravnoteža nastajanja slobodnih radikala. Rezultat takvih događaja su promjene vezane uz oštećenje stanica. Oksidacijsko oštećenje često utječe na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida,

ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti normalne fiziološke procese u organizmu, narušavajući homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju te dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti, primjerice, kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize, ali i u procesu starenja (Sies, 1985).

Slobodni radikali su vrlo reaktivne molekule koje nastoje spariti svoj nespareni elektron reakcijom s drugim elektronom neke molekule, pri čemu nastaje kemijska veza pa se oni tako stabiliziraju. Slobodni radikali, dakle, oksidiraju stanične strukture primajući njihov elektron. Oni se u tijelu stvaraju kao posljedica loših životnih navika: nekvalitetne prehrane (prekomjerna konzumacija masnoća životinjskog porijekla, suhomesnatih proizvoda, pečene hrane, alkoholnih pića itd.), izloženosti pesticidima, smogu, ultravioletnim zrakama sunca, zraku zagađenom ispušnim plinovima i olovom u benzinu, pušenja, sjedilačkog načina života, debljine, psihičkih stresova, kao i svskodnevnosti izloženosti kemikalijama koje induciraju nastanak slobodnih radikala (Slika 1). Slobodni radikali nastali zbog svega navedenog nadmašuju količinu radikala potrebnih za normalne fiziološke procese, a prekobrojni slobodni radikali štetno djeluju na stanične strukture čovječjeg tijela. U našem tijelu to su najčešće superoksidni radikal (O_2^{2-}), hidroksilni radikal ($OH\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2) i još poneke druge molekule kisika koje se zajednički nazivaju reaktivnim kisikovim vrstama (engl. *reactive oxygen species* - ROS). Nastajanje navedenih oksidansa pospješuju nabrojene loše navike, koje induciraju izbacivanje jednog negativnog elektrona iz ljuske atoma, zbog čega takav atom postaje slobodni radikal. Takve molekule kisika procesom oksidacije mogu razorno djelovati i na DNA u staničnoj jezgri, pri čemu mogu narušiti funkciju DNA ili mijenjati njezina svojstva (uzrokovati mutaciju), ili ju mogu razoriti (Ružička, 2001). Ako slobodni radikali oštete DNA i dovedu do mutacija gena, dolazi do stvaranja tumorskih stanica, a ako se tumorske stanice počnu razvijati neograničeno, nastaju tumori. Posljednjih godina došlo je do epidemije malignih oboljenja, a pretpostavlja se da je to velikim dijelom zbog mnogo učestalije izloženosti stanovništva zagađenoj vodi, zraku, hrani, života pod stalnim stresom te zbog brojnih sveprisutnih kemikalija. Slobodni radikali također dovode do ubrzanog propadanja stanica, stoga ubrzavaju starenje organizma (Sies, 1985).

Oksidacijski stres, dakle, uzrokuje oštećenja tkiva zbog nastalog poremećaja ravnoteže pro - i anti - oksidativnoga sustava.

Endogeni antioksidansi igraju ključnu ulogu u održavanju optimalne stanične funkcije i na taj način sistemsko zdravlje čovjeka. Najučinkovitiji enzimski antioksidansi su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPX), hem oksigenaza (HO) i katalaza (CAT) (Mates i sur., 1999). Međutim, pod uvjetima koji promiču oksidacijski stres, endogeni antioksidansi možda neće biti dovoljni za održavanje ili povratak ravnoteže u stanici pa prehrambeni antioksidansi mogu biti potrebni za održavanje optimalne stanične funkcije. Neenzimatski antioksidansi uključuju vitamin E i C, sulfonil antioksidanse (glutation, tioredoksin i lipoična kiselina), melatonin, karotenoide, polifenole te brojne druge spojeve (McCall i Frei, 1999).



Slika 1. Mogućnost nastanka ROS-a i njihove posljedice (Holmström i Finkel, 2014)

Dakle, slobodni radikali svakodnevno nastaju u stanicama, a organizam posjeduje mehanizme da ih neutralizira i spriječi njihovo razorno djelovanje. Antioksidansi iz hrane su prije svega fitokemikalije voća i povrća (Sies, 1985).

2. 1. 2. Popravak oštećenja DNA

Molekulu DNA svakodnevno oštećuju zračenje, kemijski mutageni, temperatura i drugo (enzimske greške, spontani gubitak baza - dnevno do nekoliko tisuća baza u svakoj stanici sisavaca). Evolucija nastoji maksimalno reducirati štetne učinke mutacija, stoga su

stanice razvile različite mehanizme za popravak oštećene ili krivo replicirane DNA. Tri su glavna mehanizma popravka: vraćanje na staro (engl. „*damage reversal*”), ekscizijski popravak i postreplikacijski popravak (Timbrell, 2000).

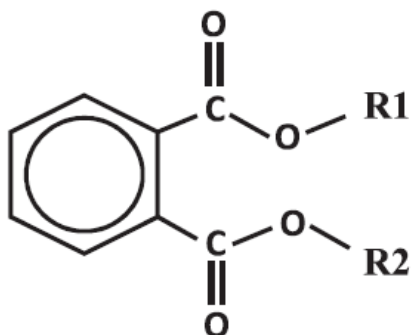
2. 1. 3. Detekcija mutacija

Mutacije u haploidnom organizmu (koji sadrži n kromosoma) lako se otkrivaju jer su sve - i dominantne i recesivne - izražene u fenotipu. Za detekciju mutacija u bakterija vrlo je djelotvorna tehnika otiska ili “*replica plating*” tehnika. U diploida (koji sadrže $2n$ kromosoma) će se dominantna mutacija u gameti pojaviti u fenotipu potomstva, dok recesivna mutacija neće biti vidljiva u prvoj generaciji (ukoliko nije spolno - vezana).

Bakterijskim testovima može se detektirati mutageni potencijal neke kemikalije. Najpoznatiji i najčešće upotrebljavani test je Amesov test (Ames, 1973). Bakterijski testovi razlikuju karcinogene od nekarcinogena s vrlo velikom točnošću (oko 90%), ekonomičniji su od testova na životinjama, daju rezultate u kratkom periodu (2 dana) te mogu otkriti i slabe karcinogene. Kada se supstanca okarakterizira kao potencijalni mutagen pomoću Amesova testa, njezin mutageni (karcinogeni) potencijal istražuje se dalje na sisavcima (Adler, 1984).

2. 2. ESTERI FTALNE KISELINE

Plastifikatori su kemijski aditivi koji daju trajnost, elastičnost i fleksibilnost polimernim proizvodima (Wilkes i sur., 2005). Ftalati su dominantni u skupini plastifikatora te se (uz BPA) uvelike koriste kao industrijske kemikalije, posebice u raznim plastičnim materijalima i proizvodima, a najčešće korišten (Sampson i de Korte, 2011) je DEHP. Ftalati su esteri ftalne kiseline (PE) (Slika 2) i uglavnom se koriste kao omekšivači u brojnim potrošačkim proizvodima - glavni razlog tomu jest njihovo svojstvo davanja fleksibilnosti i izdržljivosti plastici, primjerice, polivinil kloridu (PVC) (Cao 2010; Wormuth i sur, 2006).



Slika 2. Kemijska struktura ftalata;
R1 i R2 označavaju arilne ili alkilne skupine (Marie i sur., 2015)

2. 2. 1. Vrste i upotreba ftalata

PE su široko rasprostranjeni u okolišu (u kućanstvima i u prirodi), što je rezultat njihove primjene u raznovrsnim proizvodima. Kratkolančani ili ftalati niskomolekularne mase, kao što je dimetil ftalat (DMP), dietil ftalat (DEP), di - izo - butil ftalat (DiBP) i di - n - butil ftalat (DnBP), uglavnom se koriste u kozmetičkim proizvodima za osobnu njegu, određenim dodacima prehrani, lijekovima, tiskarskim bojama, lakovima, ljepilima (Aurela i sur, 1999) te u igračkama koje sadrže vinil (Peters, 2003). Dugolančani ili ftalati visokomolekularne mase, poput DEHP-a, butil - benzil ftalata (BBP), di - izo - nonil ftalata (DiNP) i di - izo - decil ftalata (DiDP) uglavnom se nalaze u fleksibilnim PVC materijalima koji se koriste u potrošačkim proizvodima kao što su pakiranje hrane, podovi, kućni namještaj, ostali građevinski materijal i medicinska oprema (Cao, 2010; Wormuth i sur., 2006).

Komercijalni ftalatni plastifikatori nisu kemijski vezani za proizvode pa se mogu izlučiti iz materijala, migrirati u zatvoreni prostor zraka ili neke mase, u atmosferu ili hranu, mogu se dislocirati iz polimera isparavanjem u zrak, abrazijom polimera, ispiranjem tekućinama i izravnom difuzijom iz polimera prašine na površinu i tako kontaminirati okolinu u kojoj mogu biti potencijalna opasnost za ljudsko zdravlje (Afshari i sur., 2004). Dakle, budući da ftalati nisu kovalentno vezani unutar molekule PVC-a, po principu slično otapa slično, i male količine masne hrane ili ulja dovoljne su za gotovo potpunu ekstrakciju lipofilnih omekšavača u hranu (HAH, 2014). S obzirom da je DEHP lipofilna molekula, otapa se u punoj krvi, plazmi, koncentratu trombocita, infuzijskim otopinama koje sadrže lipide,

parenteralnim otopinama, kao i otopinama koje otapaju intravenske lijekove (Vidić-Štrac, 2008).

Zbog raširene upotrebe tih kemikalija, izloženost ljudi je neizbježna. Biomonitoring studije izvještavaju da su ftalati (kao i BPA) pronađeni u više od 95% uzoraka urina ljudi na svijetu (Koch i Calafat, 2009).

2. 2. 2. Hrana i kozmetički proizvodi kao glavni izvori ftalata

Prehrana je jedan od glavnih izvora izloženosti ljudi određenim ftalatima poput DnBP, DEHP, DiNP i DiDP (Cao, 2010; Wormuth i sur., 2006). Namirnice mogu biti kontaminirane ftalatima za vrijeme obrade, pakiranja, skladištenja ili transporta nekog proizvoda. Sukladno tome, brojni su izvori ftalata u hrani: polimerni filmovi (npr. od PVC-a) koji se koriste kao ambalaža za pakiranje hrane, PVC cijevi i tube (za mužnju i prijenos mlijeka), PVC brtve u metalnim poklopcima za staklenke (dodane radi što boljeg prijanjanja poklopca za grlo staklenke), tinte za ispis (za poboljšanje adhezije na površinama te otpornosti na savijanje i gužvanje), papirnata i kartonska ambalaža (proizvedene od recikliranog materijala, u koje su dospjeli iz tinte ili ljepila koje su sadržavali prethodni materijali), PVC rukavice (prilikom rukovanja s njima kod pripreme ili prerade hrane), aluminijske folije (slojevi aluminijske povezuju se ljepilima koja sadržavaju ftalate), premazi u kuhinjskom posuđu (koji sprječavaju sljepljivanje hrane prilikom termičke obrade) te poli (etilen - tetraftalat) (PET) boce (Cao, 2010). Valja naglasiti kako je hrana u plastičnom pakiranju jedan od značajnijih izvora kontaminacije hrane i pića ftalatima (Cirillo i sur., 2011).

Ipak, podaci o koncentraciji ftalata u hrani su vrlo ograničeni. To može biti povezano s metodološkim izazovima prilikom kemijske analize, primjerice, zbog potrebnog održavanja niske kontaminacije laboratorija tijekom analize, što predstavlja izazov zbog općenite sveprisutnosti tih kemikalija. Primijećene su velike razlike u koncentraciji i prisutnosti ftalata unutar kategorija hrane i među različitim geografskim lokacijama (Sakhi i sur., 2014). Na primjer, DMP je često detektiran u hrani u Kini, ali ne i u europskim zemljama (Guo i sur., 2012). Nadalje, pojava različitih ftalata također se mijenja tijekom vremena, a ftalati čija je upotreba ograničena, kao što je DEHP, postepeno se zamjenjuju drugim, zamjenskim ftalatima kao što su DiNP i DiDP. Za procjenu izloženosti važno je koristiti novije podatke iz pojedinih zemalja za čiju se populaciju izloženost izračunava.

U Republici Hrvatskoj provedeno je istraživanje prisutnosti ftalata, prvenstveno u krutoj hrani (HAH, 2014). Analizirano je 43 uzoraka hrane podijeljene u četiri skupine. U

svim uzorcima utvrđivani su DEP, dibutil ftalat (DBP), DiDP, DiNP, BBP, DEHP te di - n - oktil ftalat (DnOP), a rezultati istraživanja pokazali su prisutnost ftalata u hrani u 32,6% ispitivanih uzoraka. Od svih ispitivanih PE, najčešće primijećeni su DEP - u 27,9% uzoraka, zatim DBP u 25,6% uzoraka te DEHP - u 16,3% uzoraka, pri čemu valja istaknuti činjenicu da više od polovice uzoraka, u kojima je zabilježena prisutnost ftalata, sadrži DEHP. Ftalati su određeni u različitim koncentracijama, a maksimalno određena vrijednost DEP-a od 51,3 mg kg⁻¹, zabilježena je u mramornom kolaču. Iz detektiranih koncentracija ftalata u prehrambenim proizvodima te iz grube procjene konzumacija prehrambenih proizvoda (na temelju ispitivanja prehrambenih navika), s obzirom na uspostavljene TDI vrijednosti (engl. *tolerable daily intake* - prihvatljivi dnevni unos) za pojedine ftalate, u ovoj studiji je zaključeno da ne postoji rizik od utjecaja ftalata na zdravlje ljudi u ispitivanim uzorcima hrane prikupljene u Republici Hrvatskoj.

Rezultati iste studije (HAH, 2014) upućuju da kisela i lipofilna hrana koja se čuva pri temperaturi od 5 °C nema nikakav utjecaj na prisutnost ftalata u hrani. Istraživanje Fierens i sur. (2012) ukazuje da se termičkom obradom hrane smanjuju koncentracije ftalata u hrani, što može umanjiti potencijalni zdravstveni rizik izloženosti ftalatima, posebice ako se uzme u obzir da je većina izmjerenih ftalata određena u sirovoj (HAH, 2014) hrani. S druge strane, ftalati mogu biti prisutni u premazima posuda pribora i opreme za pripremu hrane iz kojih se tijekom toplinske pripreme hrane mogu otpustiti u hranu (Fierens i sur., 2012) i tako ju kontaminirati.

U istraživanju provedenom u Norveškoj (Sakhi i sur., 2014) ftalati su pronađeni u gotovo svojoj hrani i piću koji se svakodnevno konzumiraju u toj zemlji. Udjel ftalata u prehrambenim proizvodima varirao je od 11% za dicikloheksil ftalat (DCHP), do 84% za DiNP - jedan od zamjenskih ftalata za DEHP. Među različitim ftalatima najviše koncentracije su pronađene za DEHP i DiNP u prehrambenim proizvodima. Procijenjena prehrambena izloženost također je bila jednako visoka, pri čemu dominira izloženost DEHP-u i DiNP-u (400 - 500 ng kg⁻¹ tjelesne mase / dan), a zatim DiBP-u, DnBP-u, DnOP-u te DiDP-u (30 - 40 ng kg⁻¹ tjelesne mase / dan). DMP, DEP i DCHP pronađeni su u najnižim koncentracijama, pri čemu se izloženost procijenuje na oko 10 - 20 ng kg⁻¹ tjelesne mase / dan. Izloženosti odrasle populacije tim kemikalijama u Norveškoj najviše doprinose žitarice i mesni proizvodi.

Ipak, procijenjena prehrambena izloženost ljudi ftalatima je znatno niža od odgovarajuće TDI vrijednosti, utvrđuje Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) (Sakhi i sur., 2014).

Osim hrane, jedan od značajnijih izvora ftalata jesu kozmetički proizvodi. U istraživanju Sathyanarayana i sur. (2008) mjereno je 9 metabolita ftalata u djece, koja su (prema izvještaju majki) bila izložena nekom proizvodu za njegu dojenčadi u roku od 24 sata prije analize urina. U većini slučajeva, tj. kod 81% dojenčadi kojima je analiziran urin, detektirano je 7 metabolita ftalata. Zaključeno je da je izloženost novorođenčadi losionu, dječjem puderu i šamponu značajno povezana s povećanom koncentracijom monoetil ftalata (MEP) (koji se nalazi u losionima), monometil ftalata (MMP) (u losionima, šamponima) i mono - izo - butil ftalata (MiBP) (u dječjim puderima) u mokraći, a koncentracija se povećava s količinom kozmetičkih proizvoda koji se koriste. Najviša je koncentracija primijećena u dojenčadi, koja mogu biti osjetljivija na razvojnu i reproduktivnu toksičnost ftalata s obzirom na njihov nezreli metabolički sustav i izloženost visokoj dozi s obzirom na jedinicu površine tijela.

2. 2. 3. Toksikokinetika ftalata

Pod pojmom toksikokinetika podrazumijeva se depozicija nekog kemijskog spoja (ksenobiotika) u organizmu, tj. ona opisuje način njegove apsorpcije, distribucije, metabolizam u organizmu te eliminaciju iz organizma (engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion* - ADME). Podaci studija provedenih na ljudima pokazuju da je moguća gastrointestinalna apsorpcija ftalata, dermalna, inhalatorna i parenteralna (budući da se razni ftalati često nalaze u brojnoj plastičnoj medicinskoj opremi) (Miles-Richardson i sur., 2002).

Ftalati pokazuju toksični potencijal uglavnom zbog metaboličke transformacije u više toksičnih metabolita. Oni se u pravilu vrlo brzo apsorbiraju i eliminiraju nakon oralne konzumacije (HAH, 2014). Ulaskom u ljudsko tijelo, ftalatni diesteri se vrlo brzo metaboliziraju bitransformacijama u probavnom traktu pomoću reakcija faze I (hidroliza i naknadne oksidacijske reakcije) u monoestere (Albro i Thomas, 1973). Dalje se mogu metabolizirati do oksidativnih spojeva njihovog lipofilnog dijela lanca. Monoesteri se općenito smatraju odgovornim za razne toksične učinke, a mogu se dodatno razgraditi u oblik orto - fosfat ftalata s dužim bočnim lancima (4 ugljikova atoma ili duže) i podliježu oksidativnom metabolizmu. Različiti metaboliti mogu biti prisutni kao slobodni i nepromijenjeni ili konjugirani s glukuronskom kiselinom (HAH, 2014). Relativno polarni, kao i ftalati niske molekularne mase uglavnom su metabolizirani u stabilne monoestere, dok su visokomolekularni ftalati, tj. ftalati s ≥ 8 ugljikovih atoma u alkilnom lancu, metabolizirani

do njihovih hidrolitičkih monoestera, koji su pak u velikoj mjeri transformirani ω - , (ω - 1) - i β - oksidacijom u oksidativne produkte (alkohole, ketone i karboksilne kiseline) (Hauser i Calafat, 2005). Ftalati i njihovi metaboliti niskih molekulskih masa izlučuju se urinom, kao monoesteri ili konjugati glukuronida (Wittassek i sur., 2011). Ftalati sa srednjom ili visokom molekulskom masom, poput DEHP-a i DiNP-a izlučuju se također urinom, ali i fecesom (HAH, 2014). Primjerice, manje od 10% početne doze DEHP-a izluči se urinom kao monoester mono - (2 - etilheksil) ftalat (MEHP), a ostalo se izluči kao sekundarni oksidirani metabolit. Primjerice, većina unesene količine DEHP-a te nastalih MEHP-a i 2 - etilheksanola izlučuje se iz tijela u roku od 24 sata urinom i fecesom. Svi metaboliti mogu se detektirati u urinu i serumu u obliku sekundarnih metabolita DEHP-a (Jurica i sur., 2013). Metabolički putevi ftalata i njihovih metabolita koji se izlučuju urinom su dobro poznati za neke ftalate, ali podaci za metaboličku distribuciju u tijelu i ostalim bioloških tekućinama (žuč, krv, slina), uključujući i majčino mlijeko, vrlo su ograničeni. U odnosu na urin, majčino mlijeko može sadržavati više hidrofobnih ftalata, kao što su DnBP i dugolančani DEHP te DiNP, kao i njihove monoesterske metabolite (Frederiksen i sur. 2007).

Smatra se da ftalati monoestera i sekundarni oksidacijski metaboliti imaju biološku aktivnost (Koch i Calafat, 2009).

2. 2. 4. Toksičnost ftalata

Studije na ljudima

U istraživanju Colón i sur. (2000) ispitivana je povezanost koncentracije zagađivača (pesticida i plastifikatora koji se u Puerto Ricu često koriste) u serumu portorikanskih djevojaka s preranom telarhom. Prijevremeni razvoj dojki (telarha) je rast tkiva dojke u djevojčica mlađih od 8 godina bez drugih obilježja puberteta, a njena je pojavnost u Puerto Ricu izuzetno česta. Rezultati navedene studije pokazali su prisutnost više od 80% ispitivanih spojeva u krvotoku testiranih djevojčica. U serumu kontrolnih ispitanica nisu otkriveni ostaci pesticida ili njihovih metabolita, dok su značajno visoke razine ftalata (dimetil, dietil, dibutil, i di- (2 - etilheksil) i njegov glavni metabolit - MEHP) identificirani u 68% uzoraka pacijentica s telarhom. Prosječne izmjerene koncentracije ftalat estera u serumu pacijentica s telarhom iznosile su od $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (MEHP) do $2098 \mu\text{g L}^{-1}$ (DEHP). Ova studija dokazala je da određeni plastifikatori imaju estrogenu i antiandrogenu aktivnost te njihovu moguću

povezanost s prijevremenim razvojem dojki ženske populacije, tj. dokazala je njihovo svojstvo endokrinih disruptora.

Endokrini disruptori su kemijske tvari (prirodne ili sintetizirane) koje imaju svojstvo imitacije prirodnih hormona. Ulaskom u organizam, oni se mogu vezati na receptore hormona i tako remetiti normalnu funkciju hormona. Oni imaju sposobnost oponašanja aktivnosti endogenih hormona i postižu ekvivalentne učinke. Također, mogu blokirati aktivnost endogenih hormona kompetitivnom inhibicijom za receptore hormona. Narušena endokrina ravnoteža se očituje promjenama na sustavima organa te uzrokuje negativne reproduktivne i razvojne učinke u ljudi (Bigsby i sur., 1999).

Istraživanje Huang i sur. (2014) procijenjuje odnos između razine 15 različitih ftalata (DEP-a, diheksil ftalata (DNHP), BBP-a, DiNP-a, DnBP-a, DCHP-a, DEHP-a, diamil ftalata (DPP), bis - (2 - n - butoksietil) ftalata - DBEP i dr.) u krvi pupkovine mladih Kineskinja i prijevremenog poroda te rasta fetusa, pri čemu je dokazano je da je izloženost određenim ftalatima (osim DCHP-u) povezana sa smanjenom gestacijskom dobi i prijevremenim porodom te smanjenim rastom fetusa (niža porođajna težina, smanjeni trbušni opseg i duljina bedrene kosti u ženske djece te manja duljina muške novorođenčadi). Određene koncentracije ftalata u krvi pupkovine majki koje odgovaraju navedenim obilježjima kao i njihova dojenčad, detektirane su u rasponu od $8,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (DNHP) do $187 \mu\text{g L}^{-1}$ (DEHP).

Epidemiološke studije, kao i studije na životinjama pokazale su da izloženost tim kemikalijama može uzrokovati poremećaje u razvoju i reprodukciji (Meeker, 2012), a također povećavaju rizik od alergije / astme (Bertelsen i sur, 2013).

Studije na životinjama

Razvojni učinci ftalata su dobro istraženi na životinjama. Perinatalno izlaganje štakora određenim ftalatima povezano je sa smanjenom anogenitalnom udaljenosti (AGD), zadržavanjem bradavica, nespuštenim testisima, atrofijom testisa, histopatologijom testisa, nerazvijanjem tkiva koje omogućava spuštanje testisa u mošnjku, hipospadijama itd. (Howdeshell i sur., 2008). Učinci ftalata na razvoj mužjaka štakora manifestiraju se uglavnom kao inhibicija sinteze testosterona (Foster i sur., 2001) te indukcija promjene ekspresije brojnih gena uključenih u metabolizam testosterona i estrogena (Corton i Lapinskas, 2005). Učinci ftalata na testise su također bili zabilježeni u zamorčadi, miševa (Gray i sur., 2000), kunića (Higuchi i sur., 2003) i tvorova. Glodavci su najosjetljiviji na antiandrogeni učinak ftalata u maternici, ali izloženost većim dozama ftalata također izaziva učinke na testisima u

mladih i odraslih mužjaka (Higuchi i sur., 2003). Istovremeno izlaganje većem broju različitih ftalata dovodi do dodatnog nepovoljnog učinka na reproduktivni sustav (Howdeshell i sur., 2008).

Nadalje, u studijama sa štakorima i miševima, dokazano je da je nakon 103 tjedna unosa hrane s određenim količinama DEHP-a (6000 ili 12 000 mg kg⁻¹ hrane; 3000 ili 6000 mg kg⁻¹ hrane, redom) povećana incidencija hepatocelularnih tumora (David i sur., 2000a). Postoji opća korelacija između peroksisomne proliferacije (povećanje broja peroksisoma u jetri štakora i induciranje rasta jetrenih tumora) i hepatocelularne karcinogenosti u štakora i miševa.

PPAR α receptor je povezan s mnogim toksičnim učincima ftalata (Peraza i sur., 2006), budući da je aktivacija alfa izoforme peroksisomnim proliferatorom - aktiviranog receptora (PPAR α) i indukcija peroksisomne proliferacije u štakora i miševa karakteristika mnogih ftalata. PPAR α je nuklearni receptor (protein) koji uzrokuje pleiotropske odgovore u glodavaca, uključujući i povećani metabolizam lipida, povećanu hepatocelularnu proliferaciju i smanjenu hepatocelularnu apoptozu, zbog čega se vjeruje da igra središnju ulogu u hepatokarcinogenezi ftalata i drugim toksičnim učincima. Dakle, aktivacija PPAR α dovodi do peroksisomne proliferacije i indukcije hepatokarcinoma u jetri glodavaca, ali aktivacija humanog PPAR α ne dovodi do hepatocelularne proliferacije i tumorske geneze (Morimura i sur., 2006) - što svakako treba uzeti u obzir prilikom procjene toksičnosti ftalata posredovane PPAR α receptorom za ljude (Klaunig i sur., 2003).

Mali broj dokaza ukazuje na povezanost ftalata s tumorima testisa i gušterače. Učestalost adenoma gušterače i adenoma ili karcinoma bila je povišena u štakora izloženih BBP-u (NTP, 1997). Benigni tumori Leydigovih stanica (neintersticijske stanice tumora) pronađeni su u štakora izloženih DEHP-u (Carlson, 2010). Nedavno je sugerirano da ftalati mogu doprinijeti pojavi sindroma disgeneze testisa u ljudi, tj. raka testisa zametnih stanica, kriptorhizmu, hipospadiji i smanjenom broju spermija (Mahood i sur., 2007). Marsee i sur. (2006) izvijestili su da je smanjeni AGD povezan s prenatalnom izloženošću DBP-u, DiBP-u, DEP-u i BBP-u, mjerenjem urinarne razine metabolita.

Ftalati su se uglavnom pokazali kao negativni u standardnim testovima genotoksičnosti. Bilo koji tumor izazvan ftalatima vjerojatno nastaje putem negenotoksičnih mehanizama (CPSC, 2010).

2. 2. 5. Zakonska regulativa o ftalatima

Ftalati su (kao i BPA) endokrini disruptori te su, od strane Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency* - EPA), kategorizirani kao kemikalije koje uzrokuju zabrinutost.

Europska agencija za sigurnost hrane - EFSA (engl. *European Food Safety Authority*) navodi TDI vrijednost za ove kemikalije. TDI vrijednosti za DnBP, BBP i DEHP iznose 10, 500 i 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase / dan, redom (EFSA, 2005a). Za DiNP i DiDP, TDI iznosi 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase / dan (EFSA, 2005b). Uporaba i primjena ftalata kao omekšavala ili kao agenasa tehničke potpore u materijalima i predmetima koji dolaze u neposredan dodir s hranom, u Republici Hrvatskoj je regulirana Zakonom o materijalima i predmetima koji dolaze u neposredan dodir s hranom (2014), odnosno Uredbom Komisije (EU) br. 10/2011 od 14. siječnja 2011. o plastičnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom, koja je izravno preuzeta citiranim Zakonom (2014).

Zbog njihove reproduktivne i razvojne toksičnosti utvrđene ispitivanjima na životinjama, ftalati kao DnBP, BBP i DEHP zabranjeni su u igračkama u Europskoj Uniji od 2007. godine. U EU, DEHP je zbranjen i u proizvodima za njegu djece, kozmetici i medicinskim proizvodima (EC, 2007; 2008; 2009).

Zbog njihove dokazane toksičnosti i istovremene široke primjene, opsežno istraživanje je provedeno u vezi pronalazjenja alternativnih plastifikatora umjesto PE. Trenutno, razmatra se mogućnost uporabe različitih alternativnih plastifikatora poput adipata, benzoata, citrata, cikloheksan dikarboksilne kiseline, epoksidiranih biljnih ulja, glicerol acetiliranih estera, fosfatnih estera, sebakata, tereftalata i trimelitata (Bui i sur., 2016), ali, globalno gledano, njihova upotreba još uvijek nije ni približna upotrebi ftalata i BPA kao plastifikatora.

2. 3. DEHP

Jedan od najzastupljenijih i najopasnijih ftalata jest DEHP, kojemu ljudi mogu biti izloženi dermalno, inhalacijom, oralno i intravenozno, a u slučaju da DEHP disocira iz medicinske opreme za pacijente u neonatalnoj jedinici intenzivnog liječenja, razina može biti vrlo visoka (Silva i sur., 2006). Studija provedena u Kanadi (Meek i Chan, 1994) procijenjuje da čovjek (20 - 70 godina), prosječne tjelesne mase 70 kg, dnevno unese 0,03 - 0,3 ng DEHP-a kg^{-1} tjelesne mase / dan samim udisanjem zraka na otvorenom prostoru, 850 ng DEHP-a / kg^{-1} tjelesne mase / dan udisanjem zraka u zatvorenim prostorima, 20 – 60 ng DEHP-a kg^{-1}

tjelesne mase / dan putem vode za piće, 4900 ng DEHP-a kg^{-1} tjelesne mase / dan hranom, oko 0,03 ng DEHP-a kg^{-1} tjelesne mase / dan dodiranjem sa zemljanim površinama. Dakle, procijenjena ukupna izloženost ljudi DEHP-u dnevno iznosi 5800 ng kg^{-1} tjelesne mase, stoga je izuzetno važno smanjiti, ili barem bolje kontrolirati izvore te kemikalije.

2. 3. 1. Toksikokinetika DEHP-a

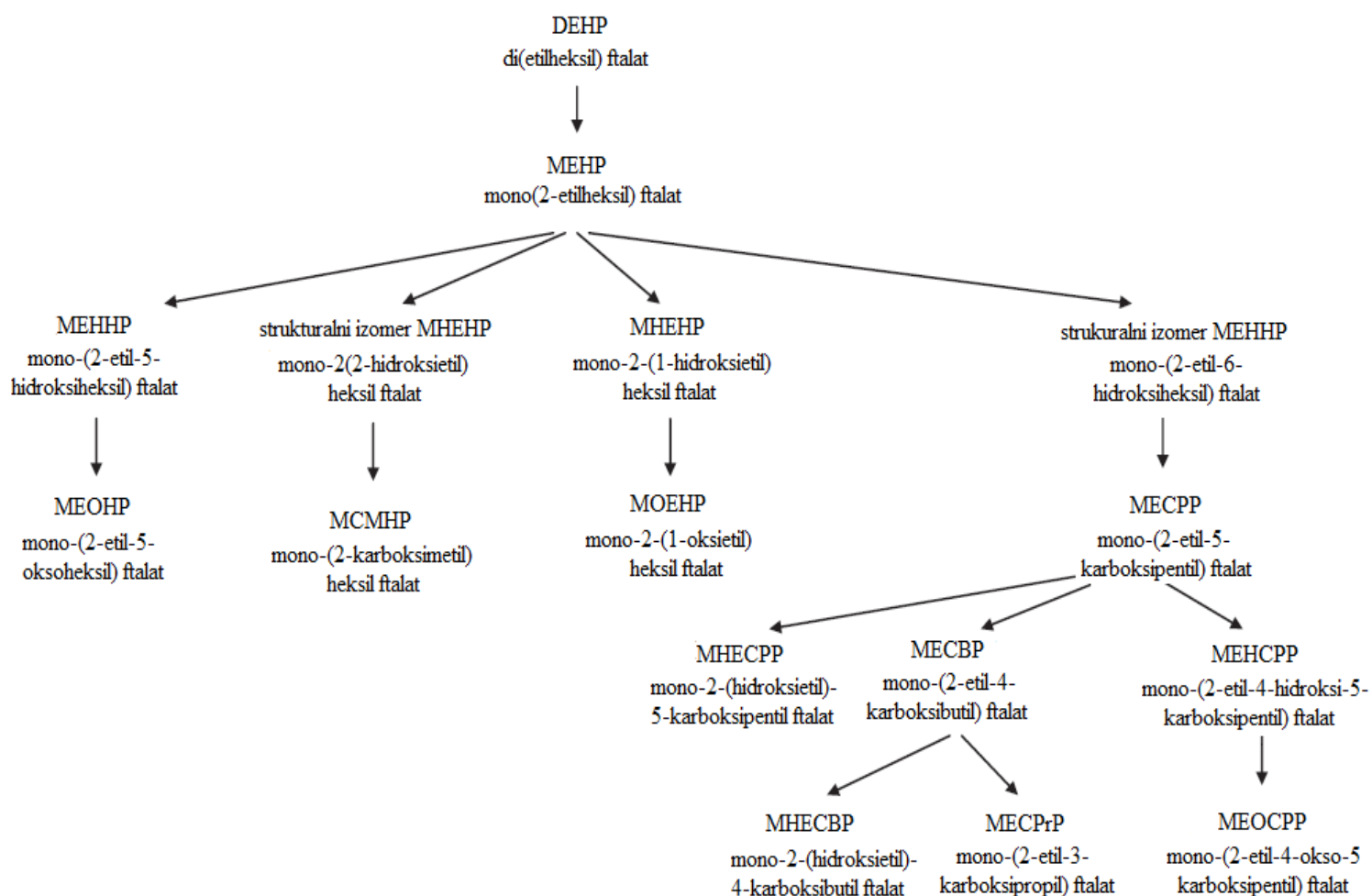
Toksikokinetika (ADME) DEHP-a u ljudi, eksperimentalnih životinja i sustavima stanica, ima važnu ulogu u predviđanju potencijalnih štetnih učinaka DEHP-a (Caldwell, 2012). Podaci studija provedenih na ljudima pokazuju da gastrointestinalna apsorpcija DEHP-a i njegovih metabolita iznosi oko 20 - 25% oralno unesene količine. Također, tragovi DEHP-a mogu se apsorbirati kroz kožu, a parenteralna izloženost je također moguća jer se on nalazi u plastičnim proizvodima koji se koriste u brojnim medicinskim uređajima. Za sada nisu dostupni podaci o toksikokinetici inhaliranog DEHP-a, iako se pretpostavlja da se određeni stupanj također apsorbira i putem respiratornih tkiva.

Nakon ingestije DEHP-a, većina unesene količine se brzo razlaže u crijevima esterskim ili hidrolitičkim cijepanjem, pri čemu nastaju MEHP i 2 - etilheksanol. Pankreatičke lipaze (esteraze) koje su odgovorne za hidrolitička cijepanja DEHP-a nalaze se u brojnim tkivima, a najviše u lumenu crijeva i gušterači. Reakcije hidrolize provode se brže i lakše nakon oralnog izlaganja zbog visokog sadržaja esterske aktivnosti u probavnom traktu. S druge strane, razlaganje je puno sporije ako DEHP uđe u krv direktno, primjerice putem transfuzije. MEHP se dalje metabolizira brojnim oksidativnim reakcijama, što rezultira formiranjem 30 ili više metabolita, od kojih neki mogu konjugirati s glukuronskom kiselinom te se u tom obliku izlučiti u urin ili feces (Albro i Lavenhar, 1989; Silva i sur., 2006). Oksidacijom 2 - etilheksanola primarno nastaje 2 - etilheksanska kiselina i nekoliko derivata keto kiselina, koje se izlučuju urinom. Iako se dio MEHP-a apsorbira u krvotok iz crijeva, MEHP se općenito slabo apsorbira pa se velik dio unesenog DEHP-a ubrzo izlučuje iz tijela fecesom. Metaboliti koji se apsorbiraju u krvotok, putuju njime do jetre, bubrega, testisa i drugih tkiva, a male količine se mogu pohraniti u tjelesnom masnom tkivu i bubrezima. Kod trudnica se pak mogu izlučiti u mlijeko. Većina unesene količine DEHP-a te nastalih MEHP-a i 2 - etilheksanola izlučuje se iz tijela u roku od 24 sata urinom i fecesom. U oralno izloženih ljudi, oko 65% DEHP metabolita se izlučuje u urinu kao konjugat glukuronida. Aglikonski dio tih konjugata kao i nekonjugirani metaboliti DEHP-a izlučuju se fecesom, a u nekim

slučajevima su povezani s izlučivanjem zajedno s proizvodima žuči (Miles-Richardson i sur., 2002).

Dakle, metabolizam DEHP-a u ljudi je vrlo složen i uključuje nekoliko oksidativnih metabolita. Brojni su metabolički putevi i metaboliti DEHP-a (prikazani na Slici 3). MEHP je među najispitivanijim te se upravo njemu pripisuju mnogi toksični učinci DEHP-a. Ispitivanje ADME od DEHP, bilo u ljudi ili eksperimentalnih životinja, otežano je zbog njegove sveprisutnosti u okolišu, laboratorijskoj opremi te zbog njegove hidrolize u abiotičkim uvjetima (Fromme i sur., 2007).

Na farmakokinetički profil DEHP-a i njegovih metabolita ovisi primjenjena doza, dob te mjerni podaci o dozi i tkivu koje se ispituje. Postoji razlika u ADME i u fiziološkim reakcijama između vrsta nakon izlaganja DEHP-u (Caldwell, 2012).



Slika 3. Metaboliti DEHP-a (prilagođeno iz Silva i sur., 2006)

2. 3. 2. Toksičnost DEHP-a

Velik broj istraživanja pruža dokaze o ozbiljnim posljedicama DEHP-a na zdravlje eksperimentalnih životinja, kao što su akutne toksičnosti u jetri i bubregu (Miura i sur., 2007; Takashima i sur., 2008), poremećaj endokrinog sustava i indukcija tumora (Lenie i Smitz, 2009). Nekim studijama je utvrđeno da DEHP ima citotoksični, imunotoksični, genotoksični učinak te je toksičan za reproduktivni sustav (Yokoyama i sur., 2003; Seo i sur., 2004; Svechnikova i sur., 2007; Kleinsasser i sur., 2004). Dugoročne toksikološke studije o učinku DEHP-a pokazale su da ima kancerogeno djelovanje u miševa i štakora (Cattley i sur., 1987). Osim toga, DEHP, kao i njegov glavni metabolit - MEHP, uzrokuje oksidativni stres i naknadno oštećenje DNA u mnogim vrstama stanica (Seo i sur., 2004; Yang i sur., 2010).

Toksičnost DEHP za razne organe potvrđena je novim, kao i starijim istraživanjima u brojnim test sustavima (Tablica 1).

Tablica 1. Toksičnost DEHP za razne organe (ovarije, testise, pluća, srce, bubrege, jetru te sam embrij)

Organ	Učinak	Vrsta i broj životinja (n)	Primijenjena doza	Vrijeme izloženosti	Referenca
Ovariji	Smanjena razina progesterona i estradiola u serumu, inhibicija <i>ex vivo</i> steroidogeneze u granulosa stanicama	Štakorice, 2 grupe n = 10 u grupi	500 mg kg ⁻¹	10 dana	Svechnikova i sur. (2007)
Testisi	Testikularna i epididimalna atrofija i testikularna ageneza, hemoragični testisi, hipospadija	Štakori, n = 69	750 mg kg ⁻¹ / dan, ishranom	14. dan od gestacije do 3. dana dojenja	Gray i sur. (2000)
Testisi	Smanjena AGD, zadržavanje areola i bradavica, nespušteni testisi, smanjena masa testisa, epididimisa, mošnja, smanjena produkcija sperme	Štakori, promjenjiv broj	DEHP (0, 375, 750, ili 1500 mg kg ⁻¹ / dan, <i>per os</i>)	1. dan gestacije do 21. dana nakon poroda	Moore i sur. (2001)
Pluća	Edematozno oticanje alveolarnog zida, infiltracija polimorfonuklearnih leukocita	Štakori, n = 80	200-300 mg kg ⁻¹ , intravenozno	akutna aplikacija	Schulz i sur. (1975)
Mokraćni mjehur	Tumor mokraćnog mjehura	Štakori, (n nepoznat)	3000 ppm, oralno	16 tjedana	Hagiwara i sur. (1990)
Bubrezi	Cistična renalna tubularna bolest, lezije na bubrežima	Miševi, n = 129	12000 mg kg ⁻¹ u hrani	4,8 i 24 tjedana	Ward i sur. (1998)
Jetra	Hepatomegalija, hepatocelularni tumori	Štakori, np*	0, 100, 500, 2500 ili 12500 mg kg ⁻¹	104 tjedana	David i sur. (1999)

*np - nije pronađeno

2. 3. 2. 1. Genotoksičnost DEHP-a

Studije na staničnim linijama

Razne su ljudske stanične linije upotrijebljene za *in vitro* testove za proučavanje učinaka DEHP-a, često pomoću Komet testa. Komet test procijenjuje oštećenja stanične DNA, tj. detektira lomove lanaca DNA (kromosomske aberacije) koji se očituju povećanjem

duljine repa, repnog momenta i intenziteta repa. U istraživanju Choi i sur. (2010) dokazano je genotoksično djelovanje DEHP-a ($9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) na HepG2 stanice nakon 24 sata i 48 sati inkubacije. HepG2 stanična linija je hepatocitna linija humanog karcinoma koja se koristi kao model ljudskih hepatocita zbog njegove prikladnosti za ispitivanje genotoksičnosti i mogućnosti prikazivanja stanične morfologije slične parenhimskim stanicama jetre (Yang i sur., 2010).

Wang i sur. (2015) utvrdili su oksidativno oštećenje DNA inducirano DEHP-om, na humanu embrionsku staničnu liniju bubrega (HEK293). U istraživanju su stanice inkubirane s različitim koncentracijama DEHP-a (0, 100, 200, 400, 800, 1000 i 1600 μM) kroz 24 sata te je prividno smanjenja stanična vijabilnost. Dobivena krivulja rasta pokazala je da je inhibicija rasta ovisna o dozi, a Komet testom je utvrđeno povećanje lomova lanaca DNA u HEK293 staničnoj liniji pri višim primijenjenim koncentracijama. Također je utvrđeno povećanje unutarnjih ROS-a kod stanica tretiranih DEHP-om. Stanična razina glutationa (GSH) je smanjena s povećanjem koncentracije DEHP-a (0 - 400 μM), a dokazan je i utjecaj DEHP na (ne)stabilnost membrane lizosoma te na mitohondrijski membranski potencijal. Dakle, DEHP u navedenom istraživanju nije imao učinak na lizosomalno ili mitohondrijsko oštećenje pri niskim dozama, međutim, lizosomska stabilnost membrana je uništena i potencijal mitohondrijske membrane je smanjen nakon izlaganja DEHP-u visokih doza. Istraživanjem (Wang i sur., 2015) je dokazan učinak DEHP-a na oštećenje DNA u HEK293 stanicama, vjerojatno preko indukcije oksidativnog stresa. Lizosomi i mitohondriji vjerojatno su primarne mete u toksičnosti induciranoj djelovanjem DEHP-a, a GSH, kao glavni intracelularni antioksidans, ima nezamjenjivu ulogu u obrani stanice protiv DEHP - induciranih oštećenja DNA.

Istraživanje Erkekoğlu i sur. (2010a) pokazalo je povećana oštećenja DNA primjenom citotoksičnih koncentracija DEHP-a i MEHP-a u LNCaP stanica (stanična linija humanog adenokarcinoma prostate). Tretman stanica s DEHP-om (3 mM) i MEHP (3 μM) uzrokovao je značajno smanjenje stanične vijabilnosti, promjenu antioksidativnog statusa te indukciju oštećenja DNA koja je detektirana Komet testom, pri čemu su povećan intenzitet repa i repni moment inducirani nakon 24 h inkubacije s DEHP u LNCaP staničnoj liniji.

Povećanje u repnim momentima, ovisno o dozi, dokazano je i u ljudskim stanicama humane stanične linije epitela karcinoma vrata maternice (HeLa) inkubiranim sa DEHP-om (nepoznatih koncentracija) tijekom 24 h (Okai i Okai, 2000).

DEHP je opsežno testiran u *in vitro* testovima genotoksičnosti, ali u većini mikrobnih i testnih sustava sisavaca ne čini se da je djelovao kao mutagen.

Tablica 2. Ispitivanja genotoksičnosti DEHP-a u *in vitro* sustavima

Vrsta (test sustav)	Krajnji učinak	Rezultat		Referenca
		S metaboličkim aktivatorom	Bez metaboličkog aktivatora	
<i>S. typhimurium</i> (TA98)	Mutacija gena	-	-	Sato i sur., 1994
<i>S. typhimurium</i> (TA100)	Mutacija gena	-	-	Seed, 1982
<i>S. typhimurium</i> (TA100)	Mutacija gena	+	np*	Tomita i sur., 1982
<i>S. typhimurium</i> (TA100)	Mutacija gena	-	+	Kozumbo i sur., 1982
<i>Escherichia coli</i> PQ37	Mutacija gena	-	-	Sato i sur., 1994
Stanična linija ljudskih hepatocita	Popravak DNA	-	NP**	Butterworth i sur., 1984
CHO stanična linija	Izmjena sestrinskih kromatida	-	NP	Tennant i sur., 1987
CHO stanična linija	Kromosomska aberacija	-	Np	Phillips i sur., 1982

**np = nije poznato

**NP = nije primijenjivo na staničnu kulturu sisavaca

In vitro studije genotoksičnosti na staničnim kulturama sisavaca prikazane su u Tablici 2. Većina njih utvrdila je da DEHP nije genotoksičan, a neke da jest. O vezivanju DEHP-a na DNA u jetri štakora izvjestili su Albro i sur. (1982), no taj efekt nije uočen u drugim istraživanjima (Gupta i sur., 1985; Lutz, 1986). 8 - hidroksideoksigvanozin je otkriven u DNA iz jetre štakora izloženih 1200 mg DEHP-a kg⁻¹ / dan tijekom 2 tjedna (Takagi i sur., 1990). Proizvodnja 8- hidroksideoksigvanozina je potencijalni marker genotoksičnosti.

Studije na životinjama

DEHP nije pokazao toksičan učinak na mikronukleus mišje koštane srži i na mehanizme popravka DNA u jetri štakora u testovima *in vivo* (Cattley i sur., 1988; Putman i sur., 1983). Stanična dioba povećana je u štakora neposredno nakon izloženosti DEHP-u zbog povećane sinteze DNA (Smith-Oliver i Butterworth, 1987). Štakori koji su bili izloženi 1,0 mg DEHP-a kg⁻¹ / dan tijekom razdoblja od 3 do 7 dana (zajedno sa 7 - dnevnim razdobljem neizloženosti), imali su povećan broj dioba i povećan broj tetraploidnih jezgri stanica jetre

tijekom razdoblja izlaganja DEHP-u (Ahmed i sur., 1989). Pokazalo se da su stanice više osjetljive na nepovratne mutagene promjene tijekom razdoblja intenzivne stanične diobe (Marx, 1990).

Dominantne letalne mutacije povećane su kod miševa koji su bili izloženi DEHP-u injekcijom pri dozi koja također rezultira smanjenom plodnosti, ali ne nakon oralnog unosa (Autian, 1982; Rushbrook i sur., 1982). Rezultati tih istraživanja nisu nužno dokazi genotoksičnosti DEHP-a jer u većini studija nije dokazano da on potiče lezije DNA, a pozitivni rezultati mogu se tumačiti na različite načine. Na primjer, dominantni letalni testovi mogu se tumačiti kao pokazatelj da je testna keiikalija utjecala na ekspresiju gena, a ne da je inducirala mutacije. Genotoksičnost DEHP-a je ispitivana u brojnim studijama (Tablica 3).

Tablica 3. Rezultati ispitivanja genotoksičnosti DEHP-a u *in vivo* sustavima

Vrsta (test sustav)	Krajnji učinak	Rezultat	Referenca
Jetra štakora	Vežanje DNA	-	Gupta i sur., 1985
Jetra štakora	Vežanje DNA	-	Lutz, 1986
Jetra štakora	DNA modifikacija baze	+	Takagi i sur., 1990
Jetra miševa	Popravak DNA	-	Smith-Oliver i Butterworth, 1987
Jetra štakora	Vežanje DNA	+	Albro i sur., 1982
Jetra štakora	Popravak DNA	-	Cattley i sur., 1988
Koštana srž štakora	Mitotički indeks	-	Putman i sur., 1983
Jetra štakora	Tetraploidna jezgra	+	Ahmed i sur., 1989
Miševi	Dominantni letalni test	-	Rushbrook i sur., 1982
Miševi	Dominantni letalni test	+	Autian, 1982
Humani leukociti	Oštećenje DNA	+	Anderson i sur., 1999
Embrij hrčka	Kromosomalne aberacije	+	Tomita i sur., 1982b
Jetra štakora	Lomovi lanaca	-	Tamura i sur., 1991

Studije na ljudima

Genotoksični učinak DEHP-a na ljudski genom nije u potpunosti potvrđen.

Opasnost od DEHP-a kao potencijalnog kancerogena za ljude, utvrđena je od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer* - IARC) (IARC, 2011; Grosse i sur., 2011). DEHP je dva puta ocijenjen kao opasan za reproduktivni sustav od povjerenstava NTP-a Centra za procjenu rizika za humanu reprodukciju (engl. *Evaluation of Risks to Human Reproduction* - CERHR), zajedničkim

pothvatom Nacionalnog toksikološkog programa (engl. *The National Toxicology Program* - NTP) i Nacionalnog instituta za znanosti zaštite okoliša (engl. *National Institute of Environmental Health Sciences* - NIEHS) (Kavlock i sur., 2006).

Međutim, brojne se objavljene studije (Koch i sur., 2005; Koch i sur., 2006; DeKeyser i sur., 2009) kritički osvrću na tumačenje relevantnosti glodavaca i Marmoset majmuna kao modela za procjenu toksičnog učinka DEHP-a za ljude, što upravo i jest najčešći slučaj (Caldwell, 2012).

2. 3. 3. Mehanizam toksičnosti DEHP-a

Dokazi o toksičnosti DEHP-a povezana je s njegovim učincima na metabolizam endogenih i ksenobiotičkih spojeva i ilustrirana je promjenama u tim aktivnostima i ekspresiji gena. U sklopu povezanih učinaka DEHP-a na genom su njegovi učinci na niz nuklearnih receptora koji mogu specifično utjecati na ljudski metabolizam i gene pod njihovom kontrolom. DEHP aktivira novi konstitutivni receptor androstana - CAR 2 u ljudi (tj. CAR) koji je (za razliku od konstitutivnog, aktivnog referentnog oblika receptora) ligand aktivirani receptor koji sadrži približno 30% referentne razine transkripta u humanim hepatocitima (DeKeyser i sur., 2009). Stoga, usporedba genomske analize tipičnog miša, štakora i Marmoset majmuna (prilikom procjene toksičnosti DEHP-a) ne može potuno točno prikazati njegovu potencijalnu toksičnost za ljude, upravo zato što navedene vrste ne mogu sintetizirati transkript za CAR 2.

Velika razlika u toksičnosti DEHP-a je utvrđena razlikama u vremenu inkubacije i primijenjenim dozama u nizu studija (Pereira, 1996; Takeshita i sur., 2006). Studije o promjenama u ekspresiji gena i apoptoze, učinku na proliferaciju i transformaciju općenito su provedene pri nižim koncentracijama od onih koje uzrokuju precipitaciju, a citotoksičnost je pak dokazana tek u nekim slučajevima.

Nekoliko je različitih mehanizama koji mogu biti uzrokom toksičnosti DEHP-a. Primjeri utjecaja na promjenu molekularne strukture (genotoksičnost) uključuju mutacije gena, stvaranje DNA adukata i lomove lanaca DNA, kromosomske aberacije te promjene u metilaciji DNA (IARC, 2006).

Brojna su istraživanja pokazala da oštećenje DNA može biti uzrokovano proizvodnjom ROS-a, a nastala oštećenja DNA mogu dovesti do apoptoze. Ravnoteža unutarnjih staničnih signala za zaštitu od apoptoze i onih koji induciraju apoptozu promijenjena je unutarnjim oštećenjem stanice radikalima (Walczak-Jedrzejowska i sur.,

2013). Prevladavajuća ROS molekula je superoksid radikal, koji se generira jednovalentnom redukcijom molekularnog kisika, uglavnom tijekom mitohondrijalne respiracije. Ovaj višak ROS-a može oštetiti razne stanične komponente i biomolekule kao što su lipidi, proteini, DNA i ugljikohidrati, a time i mijenjati njihove biološke funkcije (Lavie i Lavie, 2009). Mitohondriji su glavna mjesta generacije ROS-a. Uočeno je da disfunkcija mitohondrija promiče proizvodnju ROS-a (Lu i Gong, 2009). Radikali mitohondrijskog podrijetla mogu utjecati na lizosome i uzrokovati permeabilizaciju lizosoma te, s druge strane, oštećenje samih mitohondrija (Guicciardi i sur., 2004).

Baze podataka o genotoksičnosti DEHP-a i srodnih učinaka su vrlo široke i složene, sadrže studije koje obuhvaćaju više godina istraživanja, odražavaju promjene u stanju znanosti, a sadrže i veliki broj različitih tipova modela i paradigmi. Baze podataka o toksičnom djelovanju DEHP-a također ilustriraju razvoj i sve veću složenost alata i primijenjenih metoda u toksikološkim istraživanjima, a također i daju uvid u podatke koji se smatraju najboljima za opise genetičkih odgovora stanice (na primjer, eksperimentalne paradigme i statističke metode) (Caldwell, 2012).

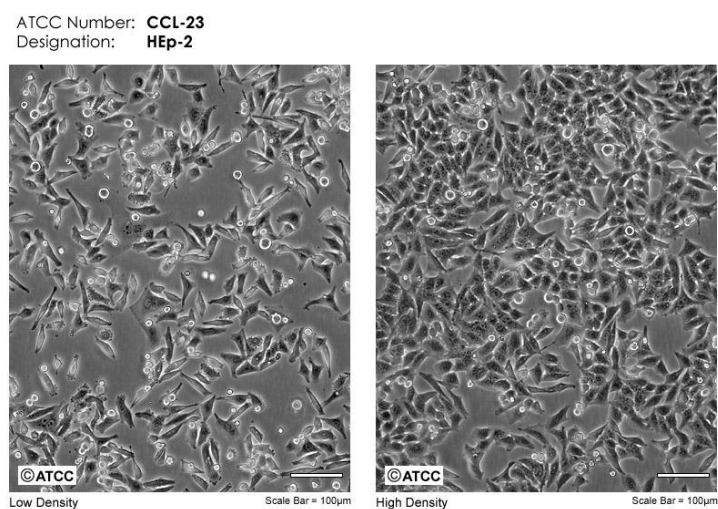
3. MATERIJALI I METODE

3. 1. MATERIJALI

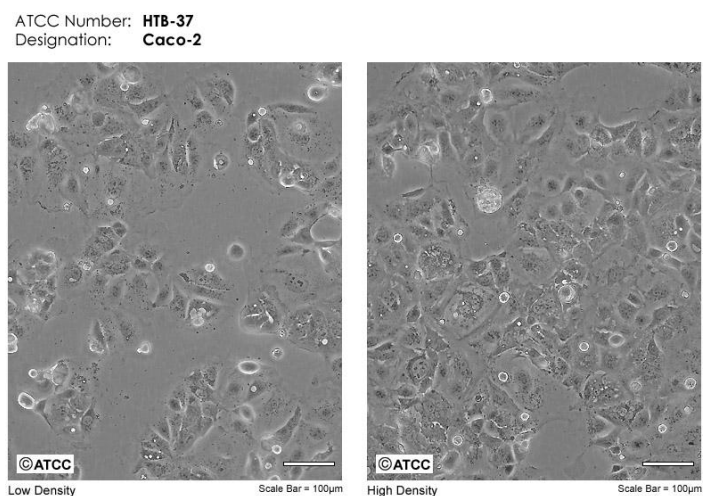
3. 1. 1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnih učinaka

a) Stanične linije HEP2, CaCo2 i HepG2

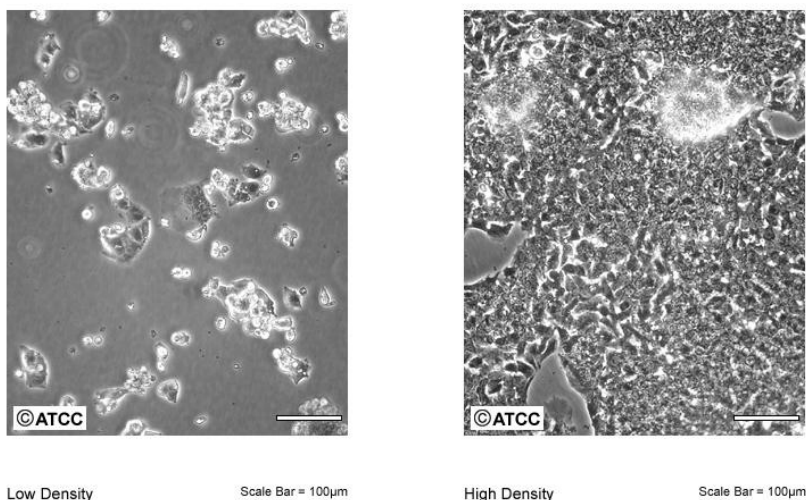
Istraživanja u ovome radu provedena su na kontinuiranoj staničnoj liniji karcinoma larinksa čovjeka (HEP2) (Slika 4), kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma epitela debelog crijeva (CaCo2) (Slika 5) te kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2) (Slika 6).



Slika 4. Komercijalno dostupna HEP2 stanična linija (*Anonymus 1*, 2016)



Slika 5. Komercijalno dostupna CaCo2 stanična linija (*Anonymus 2*, 2016)



Slika 6. Komercijalno dostupna HepG2 stanična linija (*Anonymus 3, 2016*)

Stanične linije HEp2 i HepG2 rasle su kao jednoslojna kultura u kompletiranom mediju *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Lonza) u koji je dodan fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum* (FBS); 15%) i otopina antibiotika streptomycin / penicilin (1%, Invitrogen), pri 37 °C u vlažnoj atmosferi uz 5% CO₂. Prilikom presađivanja stanica korištena je 0,25%-tna otopina tripsina.

Stanična linija CaCo2 uzgojena je u kompletiranom mediju *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM, Lonza) u koji je dodan FBS (10%) i otopina antibiotika streptomycin/penicilin (1%, Invitrogen), pri 37 °C u vlažnoj atmosferi uz 5% CO₂. Prilikom presađivanja stanica korištena je 0,25%-tna otopina tripsina.

b) Sojevi bakterije *Salmonella typhimurium*

Korištena su dva soja bakterije *Salmonella typhimurium*: TA98 i TA100. Karakteristike sojeva nalaze se u Tablici 4. Za provođenje eksperimenta bakterijski sojevi uzgojeni su kao prekonocna kultura u 30 mL kompletne tekuće podloge - *Nutrient broth* (NB) pri 37 °C.

Tablica 4. Karakteristike sojeva TA98 i TA100 *Salmonella typhimurium* (Mortelmans i Zeiger, 2000)

Vrsta promjene	Bakterijski sojevi	
	TA98	TA100
Mutacija na operonu	<i>hisD3052</i>	<i>hisG46</i>
Ciljana sekvenca DNA	-C-G-C-G-C-G-C-G-	-G-G-G-
Vrsta mutacija	Pomak okvira čitanja	Supstitucija parova baza
<i>uvrB</i> - bio	Delecija	Delecija
Oštećenje LPS-a*	<i>rfa</i>	<i>Rfa</i>
Prisutnost plazmida	pKM101	pKM101
Broj spontanih revertanata bez S9	20-50	75-200
Broj spontanih revertanata sa S9	20-50	75-200

*LPS-lipopolisaharid

3. 1. 2. Kemikalije

- 2', 7' - diklorofluorescein diacetat (DCFH - DA), *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- agarozna niske točke tališta (LMP), *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- agarozna normalne točke tališta (NMP), *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- amonij - natrij - hidrogenfosfat tetrahidrat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- ampicilin, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- Bacto Nutrient Broth, *Difco*, Lawrence
- *Bovine serum albumin* (BSA), *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- D - biotin, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- D - glukoza - 6 - fosfat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- dioktil - ftalat ($\geq 99,5\%$ DEHP), *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- dimetil sulfoksid (DMSO), *p.a.*, *Kemika*, Zagreb

- EMEM medij, *Gibco*, Carlsbad
- etanol, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- etidij - bromid, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- FBS, *Gibco*, Carlsbad
- glukoza, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- kalij - dihidrogenfosfat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- kalij - hidrogenfosfat trihidrat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- kalij - klorid, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- kristal violet, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- L - histidin - HCl, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- limunska kiselina monohidrat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- magnezij - sulfat heptahidrat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- Na₂EDTA, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- natrij - dihidrogenfosfat dihidrat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- natrijev - klorid, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- natrij - hidrogenfosfat dodekahidrat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- natrij - hidrogenfosfat, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- natrij - hidroksid, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- natrij - klorid, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- natrij - laurilsarkozinat, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- neutral red, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- Nutrient broth No.2, *Oxoid*, Basingstoke
- octena kiselina, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb

- S9 frakcija homogenata jetre štakora, *Invitrogen*, Carlsbad
- tripsin, *Gibco*, Carlsbad
- tris - HCl, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- triton X - 100, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- β - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani oblik, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim

a) Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti

Fosfatni pufer - PBS (pH = 7,2 - 7,4):

Natrijev klorid	4,0 g
Kalijev klorid	0,1 g
Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat	1,16 g
Kalijev hidrogenfosfat	0,1 g
Destilirana voda	500,0 mL

Sterilizira se 20 minuta pri 120 °C.

Ishodišna otopina *neutral red* (5 mg mL⁻¹):

<i>Neutral red</i>	5,0 g
Destilirana voda	1,0 mL

Radna otopina *neutral red* (0,1 %):

Ishodišna otopina <i>neutral red</i>	250,0 mL
RPMI 1640 medij	24,750 mL

Otopina za odbojavanje:

Octena kiselina	1,0 mL
Etanol	50,0 mL
Destilirana voda	49,0 mL

Ishodišna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF- DA) (2 mL):

DCF- DA	1,0 mg
Dimetil- sufoksid	1,0 mL

Radna otopina 2', 7' - diklorofluorescin diacetat (DCF - DA) (50 µL):

Ishodišna otopina DCF - DA	500,0 µL
PBS pufer (pH = 7,2 - 7,4)	9,3 mL
BSA (1 %)	200 µL

b) Otopine korištene za povodenje Komet testa**Otopina NMP agaroze (1%)**

NMP agarozna	100,0 mg
--------------	----------

Otopina NMP agaroze (6%)

NMP agarozna	60,0 mg
PBS pufer (pH = 7,2 - 7,4)	10,0 mL

Otopina LMP agaroze (0,5%)

LMP agarozna	50,0 mg
PBS pufer (pH = 7,2-7,4)	10,0 mL

Pufer za lizu stanica (pH = 10)

Matična otopina:

NaCl (2,5 M)	65 g
Na ₂ EDTA (100 mM)	61 g
Tris - HCl (10 mM)	0,539 g
Na - laurilsarkozinat (1%)	4,45 g
destilirana voda	0,5 L

Jedan sat prije lize stanica, u hladan pufer za lizu dodano je 0,5 mL Triton - 100 i 5 mL dimetil sulfoksida.

Pufer za denaturaciju stanica (pH = 13)

NaOH (10 M)	30,0 mL
Na ₂ EDTA (200 mM)	5,0 mL
Destilirana voda	965,0 mL

Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5)

Tris - HCl	48,5 g
Destilirana voda	1000,0 mL

Otopina etidij - bromida

Etidij - bromid	2,0 µg
Destilirana voda	1,0 mL

c) Podloge za uzgoj bakterije *Salmonella typhimurium*

Sve navedene podloge se steriliziraju 20 min na 120 °C.

Kompletna tekuća podloga (OX):

Hranjivi bujon br. 2	0,75 g
Destilirana voda	30,0 mL

Kompletna kruta podloga (NB):

Hranjivi bujon	4,0 g
Natrijev - klorid	2,5 g
Agar	7,5 g
Destilirana voda	500,0 mL

Minimalna kruta podloga (VB):

Agar	9,0 g
Destilirana voda	600,0 mL

Nakon sterilizacije (20 min na 120 °C) dodaje se:

VB soli	12,0 mL
Biotin	15,0 mL
40% glukoze	7,5 mL

Površinski (top) agar (TA):

Agar	1,2 g
Destilirana voda	200,0 mL

Prije razlijevanja agar se otopi u mikrovalnoj pećnici te mu se dodaje:

VB soli (50%)	4,0 mL
Histidin - biotin otopina (0,5 mM)	20,0 mL
40% glukoza	2,5 mL

d) Otopine korištene za provođenje Amesovog testa**VB soli (50%):**

Destilirana voda	167,5 mL
Magnezijev - sulfat heptahidrat	2,5 g
Limunska kiselina x H ₂ O	25,0 g
Kalijev - hidrogenfostat trihidrat	163,7 g
Natrij amonijev - hidrogenfosfat tetrahidrat	43,47 g

Sterilizira se 20 minuta na 120°C.

Otopina glukoze (40 %):

Glukoza	40,0 g
Destilirana voda	100,0 mL

Otopina biotina (0,5 mM):

D - biotin	61 mg
Destilirana voda	500,0 mL

Sterilizira se 30 minuta na 110°C.

Otopina histidin- biotin (0,5 mM):

L - histidin - HCL	52,4 mg
D- biotin	61,0 mg
Destilirana voda	500,0 mL

Sterilizira se 30 minuta na 110°C.

Otopina MgCl₂ x 6H₂O (0,254 M):

Magnezijev klorid heksahidrat	2,5 g
Destilirana voda	50,0 mL

Otopina KCl (1 M):

Kalijev klorid	3,8 g
Destilirana voda	50,0 mL

PO₄⁻ puffer:

Natrijev hidrogenfosfat dihidrat	31,2 g
Destilirana voda	750,0 mL

Sterilizira se filtracijom (0,22 μm).

Otopina NADP (0,4 M):

NADP	0,3 g
Destilirana voda	10,0 ml

Sterilizira se filtracijom (0,22 μm).

Otopina glukoza - 6 - fosfata (0,2 M):

Glukoza - 6 - fosfat	0,6 g
Destilirana voda	10,0 ml

Sterilizira se filtracijom (0,22 μm).

Smjesa S9 (10%):

NADP (0,04 M)	1,0 mL
Glukoza - 6 - fosfat (0,2 M)	0,3 mL
Magnezijev klorid heksahidrat (0,25 M)	0,3 mL
Kalijev klorid (1 M)	0,3 mL
Fosfatni pufer	5,0 mL
S9	1,0 mL
Destilirana voda	2,1 mL

3. 1. 3. Laboratorijska oprema

a) Laboratorijski uređaji

- analitička vaga, MC1 Laboratory LC 62OP, *Sartorius*, Goetingen
- autoklav, IPIM, Hrvatska
- CO₂ inkubator Brouwer CH, Luzern
- epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH*, Wetzlar
- fluorimetar, FLUOstar OPTIMA, *BMG Labtech*, Offenburg
- invertni mikroskop, *Optika Microscopes*, Ponteranica
- klasična centrifuga, *Megafuge, 1.0 Heraeus*, *Sepatech*, Gottlieb
- laminar, IBK 1 V2, *Iskra*, Šentjernej

- miješalica, MS1 minishaker, *IKA®Works*, Inc. Wilmington, Staufen
- spektrofotometar - microreader, *Tecam*, Männedorf
- termoblok, ISKRA, Slovenija
- termostat, ISKRA, Slovenija
- tresilica, ISKRA, Slovenija

b) Laboratorijski pribor

- brušena predmetna stakalca
- kiveta
- menzura, 50 - 1000 mL
- mikrofilteri
- mikropipete, 10 - 1000 μ L, *Eppendorf*, Hamburg
- mikrotitracijske ploče, *Falcon, BD Company*, Franklin Lakes
- Pasteurove pipete, 5 - 25 mL
- plastične epruvete
- plastične Petrijeve zdjelice, *Aptaca, Canelli*
- propipeta
- staklene epruvete, 3 - 10 mL
- staklene Petrijeve zdjelice
- T - boca, *Falcon, BD Company*, Franklin Lakes
- tikvice ravnog dna, 100 - 1000 mL
- Türken - Bürkova komora

3. 2. METODE RADA

3. 2. 1. Nasađivanje staničnih linija HEp2, CaCo2 i HepG2 u monosloju

Zamrznuta stanična kultura (s 10% glicerola) je s -80 °C odmrznuta u vodenoj kupelji na 37 °C, potom je centrifugirana (100 rpm / 5 min) i uklonjen je supernatant koji sadrži ostatke medija i krioprotektivnog sredstva (glicerol). Na dobiveni talog dodan je 1 mL svježeg medija zagrijanog na 37 °C. Stanice su resuspendirane i ponovno centrifugirane (1000 rpm / 1,5 min), a zatim nasađene u Petrijevu zdjelicu promjera 5 cm (na taj način je izvršena propagacija stanica). Nakon 24 sata stanice su nasađene u T - boce većeg volumena i uzgajane u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (na 37 °C, uz 95% zraka i 5% CO₂) do subkonfluentnog stanja, kada se mogu koristiti za eksperiment. Rad s kulturama humanih stanica odvija se u aseptičkim uvjetima koji se osiguravaju radom u komori za sterilan rad (laminaru) (Freshney, 2010).

3. 2. 2. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Priprema je započeta uklanjanjem medija (pipetom) sa stanica u T - bocama (od 25 cm² ili 75 cm²). Potom su stanice isprane s 0,25% - tnom tripsinom kako bi se uklonile tvari iz medija koje bi mogle inhibirati tripsin. Na stanice je dodana minimalna količina (2 mL) otopine 0,25% - tne tripsina, potrebna da prekrije dno T - boce. Djelovanje tripsina očitovano je odvajanjem stanica od podloge. Vrijeme izloženosti tripsinu ovisi o vrsti i starosti tripsina zbog čega je potrebna stalna kontrola pod mikroskopom u cilju utvrđivanja trenutka kada dolazi do odljepljivanja stanica s dna T - boce te njihovog poprimanja okruglog oblika i pokretanja u mjeru kretanja otopine tripsina. Proteolitički učinak tripsina (tripsinizacija) zaustavljen je tako da je na stanice dodan medij (5 ili 10 mL) obogaćen serumom (Freshney, 2010).

Stanice su izbrojane i nasađen je točno određeni broj stanica kako bi se vrijednosti dobivene eksperimentom mogle uspoređivati te da podjednaki broj stanica bude izložen djelovanju ispitivanog spoja.

3. 2. 3. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra

Mikropipetom je uzeto 20 μL uzorka iz stanične suspenzije dobivene nakon tripsinizacije. Uzorak je ponovno resuspendiran te nanesen u Bürker - Türkovu komoricu ispod pokrovnog stakalca koje je prethodno postavljeno. Stanice su izbrojane u četiri velika kvadrata (prvi slijeva gore, drugi desno gore, prvi lijevo dolje, drugi desno dolje), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost. Svaki veliki kvadrat sastoji se od 16 malih kvadrata. Prostor između ispravno postavljene predmetnice i pokrovnog stakalca (pri čemu su vidljivi Newtonovi kolobari) iznosi 0,1 mm, a dužina i širina svakog kvadrata iznosi 1 mm. Iz toga prozlaži da se iznad svakog velikog kvadrata nalazi volumen tekućine od 10^{-4} mL. Konačni broj stanica izražen je po 1 mL stanične suspenzije.

3. 2. 4. Priprema stanica i otopina DEHP-a za eksperiment

Za sve 3 stanične linije nacrtana je krivulja rasta brojanjem stanica nakon 24, 48, 72 i 96 sati. Iz krivulja rasta određen je broj stanica (za daljnje eksperimente) koji je potrebno nacijepiti da stanice budu u eksponencijalnoj fazi rasta. Također, određeno je i potrebno vrijeme uzgoja (Tablica 5).

Tablica 5. Broj stanica i vrijeme uzgoja određeni iz krivulje rasta

Stanična linija i vrijeme uzgoja	24h	48h	72h
HEp2	10^5	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$
CaCo2	10^5	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$
HepG2	10^5	10^5	10^5

Za pripremu otopina DEHP-a različitih koncentracija korištena je ishodišna 99,5% - tna otopina DEHP-a, molarne mase $390,56 \text{ g mol}^{-1}$ i gustoće (pri 25°C) $0,985 \text{ g mL}^{-1}$.

Pripremljene su otopine sljedećih masenih koncentracija DEHP-a: $1,87 \text{ ng mL}^{-1}$, $18,7 \text{ ng mL}^{-1}$, $93,5 \text{ ng mL}^{-1}$, 187 ng mL^{-1} , 1049 ng mL^{-1} te 2098 ng mL^{-1} . Ispitivane koncentracije određene su po uzoru na istraživanja Huang i sur. (2014) te Colón i sur. (2000), koji su kao

najviše koncentracije u krvi pupkovine, odnosno serumu utvrdili $8,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (DNHP) do $187 \mu\text{g L}^{-1}$ (DEHP) te $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (MEHP) do $2098 \mu\text{g L}^{-1}$ (DEHP), redom.

3. 2. 5. Određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija DEHP-a na staničnim linijama HEp2, CaCo2 i HepG2 Neutral red testom

Neutral red metoda se koristi za određivanje citotoksičnosti kemikalija. Temelji se na svojstvu živih stanica da, nakon inkubacije s ispitivanim ksenobiotičima, neutralno crvenu boju (NR - engl. *neutral red*) (3 - amino - 7 - dimetilamino - 2 - metilfenazin hidroklorid, 5 mg mL^{-1}) unesu aktivnim transportom i vežu je u lizosomima (Repetto i sur., 2008). NR je slabo kationska boja koja prolazi kroz staničnu membranu neionskom difuzijom i unutar stanice se veže na anionske dijelove lizosomskog matriksa (unutar lizosoma pH je manji u odnosu na citoplazmatski pH). Ksenobiotici koji oštećuju plazmu ili lizosomalnu membranu smanjuju unos i zadržavanje boje. Stanice koje je ispitivani ksenobiotik ošteti, ili pak uzrokovao nekrozu, ne zadržavaju boju nakon ispiranja i procesa fiksiranja (u mrtve stanice boja ne ulazi). Dakle, ukoliko ne dođe do nakupljanja boje unutar lizosoma pretpostavlja se da je došlo do oštećenja stanica. Nakupljena boja u stanici zatim se ekstrahira te se mjeri apsorbancija ekstrahirane boje koja je u direktnoj ovisnosti o broju živih stanica (Babich i Borenfreund, 1991).

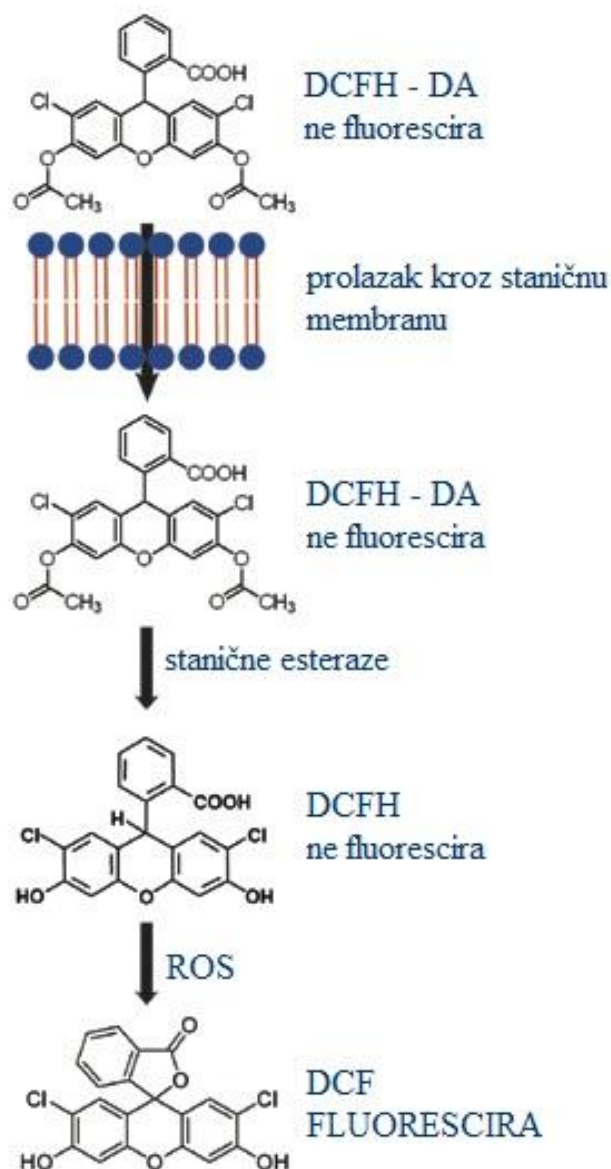
Ishodna otopina NR boje pripravljena je otapanjem boje u etanolu do konačne koncentracije od 5 mg mL^{-1} te je inkubirana 24 sata na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije pripravljena je 10%-tna otopina razrjeđivanjem ishodne otopine u mediju za uzgoj stanica te je filtrirana kako bi se uklonili neotopljeni kristalići i osigurala sterilnost (Babich i Borenfreund, 1991). Na mikrotitracijske pločice nasadene su suspenzije stanica (po $100 \mu\text{L}$) HEp2, CaCo2 i HepG2, prema koncentracijama prikazanim u Tablici 5. Nakon nasadivanja stanica, one su inkubirane 24 sata na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, do ekspanzijske faze rasta. Zatim su tretirane različitim koncentracijama DEHP-a (6 otopina DEHP različitih koncentracija + negativna kontrola) u trajanju od 24, 48 i 72 sata. Po završetku tretmana, sadržaj bunarića uklonjen je iz njih. Zatim je u bunariće dodana radna otopina NR ($100 \mu\text{L}$) te je inkubirana 1 sat pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije, uklonjena je NR otopina te su stanice 3 puta ispirane sa $100 \mu\text{L}$ pufera PBS. Na stanice je zatim dodano $100 \mu\text{L}$ otopine za odbojavanje koja sadrži 50% EtOH, 49% H_2O i 1% HAc (Repetto i sur., 2008; Durgo i sur., 2009). Intenzitet obojenja određen je spektrofotometrijski pri 540 nm i proporcionalan je broju preživjelih stanica. Postotak preživljenja određen je u odnosu na negativnu kontrolu prema niže navedenoj formuli.

Usporedbom intenziteta obojenja u stanicama tretiranih s različitim otopinama DEHP-a i kontrolnih stanica, određen je postotak preživljenja i određena je subtoksična koncentracija otopine DEHP-a koja će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Eksperiment je ponovljen 3 puta.

$$\% \text{ preživljenja} = (A_{540} \text{ nm istraživanog spoja} / A_{540} \text{ nm kontrole}) \times 100$$

3. 2. 6. Određivanje prooksidativnog učinka različitih koncentracija DEHP-a na staničnim linijama HEp2, CaCo2 i HepG2 DCF - DA testom

Određivanje slobodnih radikala (ROS-a) nastalih bazalnim metabolizmom ili metabolizmom ksenobiotika kojima su stanice izložene vrši se 2', 7' - diklorofluorescein - diacetat fluorimetrijskim testom. 2', 7' - diklorofluorescein diacetat (DCF - DA) je neionski, nepolarni spoj koji ne fluorescira. Kemijska građa omogućuje mu laku difuziju kroz staničnu membranu gdje se u citosolu stanica djelovanjem intracelularnih enzima prevodi u 2', 7' - diklorofluorescein (DCFH) koji također nije fluorescentan. U prisutnosti ROS-a, DCFH se oksidira u diklorofluorescein (DCF) koji je izrazito fluorescentan (Li i sur., 2000) (Slika 7).



Slika 7. Shema principa DCFH - DA testa (Cell Biolabs, Inc., 2016)

Intenzitet fluorescencije mjeri prisutnosti slobodnih radikala u stanici. Fluorescencija je mjerena u fluorimetru pri valnim duljinama od 485 ± 10 nm za ekscitaciju i $530 \pm 12,5$ nm za emisiju. Metoda je osjetljiva na fotooksidaciju (Wang i Joseph, 1999), stoga je otopina DCFH - DA svježe pripravljena. Ishodišna otopina DCFH - DA (2 mM) dobivena je otapanjem 1,5 mg DCFH - DA u 1,5 mL DMSO-a. Za tretman stanica, iz ishodišne otopine pripravljena je u PBS-u 50 μ M otopina DCFH - DA, koja sadrži i BSA (1% ukupnog volumena) (Silveira i sur., 2003).

Za određivanje prooksidativnog djelovanja različitih otopina DEHP-a, stanice su nasadene na crne mikrotitarske pločice s 96 bunarića u koncentracijama prema shemi iz Tablice 5. U svaki bunarić uneseno je 100 μ L stanične suspenzije. Nakon 24 sata, nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i nakon što je počela dioba stanica, uklonjen je medij sa stanica. Stanice su tretirane s odabranim koncentracijama otopina DEHP-a (6 različitih koncentracija + negativna kontrola). Kao negativna kontrola korišten je medij za uzgoj stanica. Nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije, sadržaj bunarića uklonjen je iz njih, a stanice su isprane sa 100 μ L PBS-a. Na stanice je dodano 100 μ L 50 μ M otopine DCFH - DA.

Nakon inkubacije od 30 minuta na 37 °C, izmjeren je intenzitet fluorescencije fluorimetrom pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije od 520 nm. Nakon mjerenja fluorescencije ponovno se provodi NR metoda kako bi se utvrdio postotak preživljenja i kako bi se vrijednosti fluorescencije mogle normalizirati s obzirom na postotak preživjelih stanica u kojima su izmjerene reaktivne kisikove vrste. Rezultati su izraženi kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljenja koji se računa u odnosu na negativnu kontrolu (Bradford, 1976).

3. 2. 7. Određivanje genetičkih mutacija različitih koncentracija DEHP-a na HEp2, CaCo2 i HepG2 staničnim linijama Komet testom

Oštećenja DNA su osjetljivi markeri koji ukazuju na genotoksičnu štetu. Najčešća tehnika u prepoznavanju lomova DNA je upravo Komet test. Tehnika omogućuje vizualizaciju oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama, a za provođenje testa mogu se koristiti sve stanice s jezgrom. Princip metode je horizontalna elektroforeza individualnih stanica u gelu agaroze. Pomoću otopine visoke koncentracije etilen - diamin - tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata lizirana je citoplazma i membranske strukture u stanici te je oslobođena ukupna količina DNA. Ona je zatim denaturirana u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgnuta elektroforezi tijekom koje mali fragmenti DNA, nastali lomovima (kromosomskim aberacijama), putuju kroz pore gela prema anodi, dok glavnina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel, pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. DNA i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao "kometi". Za njihovu analizu i mjerenje najčešće se koristi epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike. Na mjerenim se kometima utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa

predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA, a obično se mjeri od sredine ili ruba glave kometa i izražava u μm . Intenzitet repa označava postotak DNA koji je migrirao u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu (Collins i sur., 2008; IMI, 2010).

U Petrijeve zdjelice promjera 10 mm nacijepljeno je 5,0 mL stanične suspenzije (10^5 stanica mL^{-1}). Nakon 24 sata od tretiranja otopinama različitih koncentracija DEHP-a, sa satnica je uklonjen medij te su stanice ispirane PBS-om. Plastičnim štapićem stanice su pažljivo uklonjene s dna Petrijevih zdjelica. Stanice su prebačene u mikroeprovete, dodano je 200 μL PBS-a te su centrifugirane 5 minuta ($5000 \text{ okretaja min}^{-1}$). Postupak je ponovljen dva puta. Na brušeno predmetno stakalce nakapano je 100,0 μL otopine agaroze normalne točke tališta (NMP - engl. *normal melting point*) (1%) i prekriveno pokrovnicom da polimerizira na sobnoj temperaturi. Nakon polimerizacije, na prethodno nanесenu agarozu, nanесeno je 10 μL stanica resuspenriranih u 100,0 μL agaroze s niskom točkom taljenja (LMP - engl. *low melting point*). Nakon 10 minuta polimerizacije, već postojeći gel presvučen je s još jednim slojem agaroze te je nakon polimerizacije provedena liza uzoraka u ohlađenom puferu za lizu stanica ($4 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 1 sata). Po završetku liziranja stanica, stanice su tretirane puferom za denaturaciju te je provedena elektroforeza u istom puferu pri jakosti struje od 300 mA, naponu od 25 V i trajanju od 20 minuta. Nakon elektroforeze provedena je neutralizacija puferom za neutralizaciju (0,4 M Tris). Sam preparat obojen je sa 100,0 μL etidij - bromida u trajanju od 10 minuta. Nakon isteka 10 minuta, stanice su kratko ispirane u Tris - HCl puferu i na njega je stavljena pokrovnica (Collins i sur., 2008). Mjerenja su provedena pomoću program za analizu slike *Comet Assay II* (Perceptive instruments Ltd., UK), a mikroskopska analiza pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515 - 560 nm. U svrhu analize genotoksičnog učinka otopina DEHP-a različitih koncentracija, u ovom radu korišteni su parametri dužina repa, intenzitet repa te repni moment.

3. 2. 8. Uzgoj bakterija *Salmonella typhimurium* iz pohranjene bakterijske kulture

Bakterijska kultura stanica je pohranjena na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ (u zamrzivaču ili tekućem dušiku) do početka pripreme. Bakterijski soj pripremljen je iz jedne izolirane bakterijske kolonije. Na bakterijskim sojevima provedeni su testovi za provjeru funkcionalnosti i prisutnosti svih željenih genotipskih svojstava (mutacija na *his*-operonu, *rfa* i *uvrB* mutacije) te prisustvo *pKM101* plazmida i broj spontanih revertanata (Mortelmans i Zeiger, 2000).

3. 2. 9. Određivanje mutagenog potencijala DEHP-a pomoću bakterijskog test sustava *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium / mikrosomalni test je široko prihvaćen bakterijski test koji se koristi za identifikaciju tvari koje mogu proizvesti genetska oštećenja. Test koristi niz sojeva bakterije *S. typhimurium* s postojećim mutacijama koje onemogućuju bakteriji da sintetizira potrebne aminokiseline, u slučaju ovdje korištenih bakterija histidin, pa one posljedično nisu u mogućnosti rasti na minimalnoj podlozi i oblikovati kolonije zbog odsustva tvari koje su im potrebne za rast i razvoj. Kada dođe do novih mutacija na mjestu ranije postojećih ili negdje u blizini u genima, one mogu vratiti funkciju gena. Novo mutirane stanice su povratni mutant - prototrofi koje su, zbog vraćene funkcije gena, ponovo sposobne sintetizirati histidin te mogu rasti na podlogama bez prisustva histidina i formirati kolonije. Korišteni sojevi za ovaj test su histidin auksotrofi sa već postojećim mutacijama u histidinskom operonu koje im onemogućuju da rastu na minimalnim podlogama. Sojevi *Salmonella typhimurium* koji se koriste u testu imaju različite mutacije u različitim genima u histidinskom operonu (Tablica 4). Svaka od mutacija uzrokovana je mutagenima koji djeluju drugačijim mehanizmima (Mortelmans i Zeiger, 2000).

Rezultati se mogu prikazati kao frekvencija mutacija te kao broj induciranih reverzanata u ovisnosti o koncentraciji primijenjene kemikalije. Frekvencija mutacija predstavlja omjer broja revertanata po 1 mL i srednjeg ukupnog broja bakterija na ploči. Naknadno se može odrediti kvocijent mutacije (Qm) koji predstavlja broj induciranih revertanata podijeljen s brojem spontanih revertanata (dobivenih na negativnoj kontroli) (Mortelmans i Zeiger, 2000).

Analiza genetičkih karakteristika sojeva

Testiranje sojeva, kako bi se utvrdila prisutnost genetičkih markera, provedeno je prije izvođenja genotoksikoloških eksperimenata. Testovi uključuju provjeru *rfa* markera, provjeru *uvr B* delecije, prisutnost plazmida *pKM101* i broj povratnih mutanata.

Provjera *rfa* markera: Ova mutacija uzrokuje veću poroznost stanične stijenke pa kroz nju mogu prolaziti tvari velike molekulske mase. Na kompletnu, NB podlogu nacijepljeno je 100 µL prekonoćne kulture koja je nakon toga razmazana sa sterilnim štapićem po Drigalskom. Na sredinu ploče je stavljen, sterilnom pincetom, sterilni papirnati disk na koji je nakapano 10 µL otopine *kristal violet*. Tako pripremljena podloga ostavljena je 24 sata na 37

°C. Svi *Salmonella* sojevi pokazali su zonu inhibicije koja okružuje disk (Venitt i Parry, 1984; Timbrell, 2000).

Provjera *uvr B* delecije: Djelovanjem UV zračenja dolazi do nastanka letalnih mutacija te do dimerizacije timidina unutar istog lanca DNA. Između dva timina se uspostavlja kovalentna veza koja je puno jača od vodikove veze između timina i adenina komplementarnog lanca DNA. Divlji sojevi mutaciju popravljaju djelovanjem enzima fotolijaze koji se aktivira svjetlošću valne duljine vidljivog spektra. Aktivirana fotolijaza se veže za dimerizirani par i razgrađuje kovalentnu vezu između dva timina te na taj način popravljaju oštećenje. Drugi mehanizam popravka, za kojeg nije potrebna dnevna svjetlost, je nukleotidni ekscizijski popravak. On je omogućen djelovanjem enzima čiji je nastanak kodiran genima *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* i *uvrD*. Mutacijom bilo kojeg gena uključenog u nukleotidni ekscizijski popravak, popravak je onemogućen. Divlji tip bakterija *S. typhimurium* ima funkcionalan nukleotidni ekscizijski popravak, ali test sustav ima namjerno unesenu mutaciju u *uvrB* genu te je puno osjetljiviji na mutagene.

Na NB podlogu nakapane su 4 kapi prekonocne kulture, na jednakoj udaljenosti. Ploča je nagnuta u suprotnom smjeru te su kapi razlijane po podlozi u istom smjeru. Postepeno su kroz 15 sekundi bakterije ozračene UV svjetlom. Uslijed duže izloženosti UV svjetlu, smanjuje se preživljenje bakterija (Venitt i Parry, 1984; Timbrell, 2000).

Prisutnost plazmida *pKM101* (ampicilin rezistentnost): Plazmid nosi *muc+* gen koji u *RecA+* / *LexA+* bakteriji učestvuje u SOS popravku koji omogućava povećanu otpornost na letalne učinke mnogih mutagena. SOS odgovor je opći odgovor stanice tijekom zastoja replikacije DNA. U tom odgovoru se aktivira *RecA* protein. Njegova aktivacija je uvjetovana nastankom jednolančane DNA u replikacijskoj vilici kada je omogućena aktivnost DNA polimeraze. Aktivirani protein je uključen i u inaktivaciju *LexA* proteina koji djeluje kao protein represor u stanici u kojoj DNA nije oštećena te sprječava ekspresiju gena potrebnih za SOS odgovor. Plazmid nosi gen za rezistenciju na ampicilin pa ovi sojevi mogu rasti na podlozi koja sadrži ampicilin (Venitt i Parry, 1984; Timbrell, 2000).

Na NB podlogu naci jepljeno je 100 µL bakterijskog soja koji je razmazan sa sterilnim štapićem po Drigalskom te je na sredini stavljen papirnati disk na kojeg je nanoseno 10 µL ampicilina. Tako pripremljena podloga ostavljena je 24 sata na 37 °C. (Mortelmans i Zeiger, 2000).

Učestalost povratnih mutanata: Svaki od ispitivanih sojeva ima karakterističnu učestalost spontanih revertanata his⁺. Obično postoje varijacije koje ovise o laboratoriju te o izboru otopine. Neki sojevi su visoko osjetljivi na određene koncentracije S9 i njihove vrijednosti spontanih revertanata rastu sa porastom koncentracije S9 (Mortelmans i Zeiger, 2000).

Test citotoksičnosti s preinkubacijom:

U *Eppendorf* epruveticu dodano je 100 µL bakterijskog soja i 100 µL otopine DEHP-a ispitivanih koncentracija. Smjesa je inkubirana 20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, napravljeno je 10⁻⁶ razrjeđenje mikrorazrjeđivanjem. Po 10 µL svakog razrjeđenja, u dvije replike, nacijepljeno je na NB podlogu. Nakon 24 h određen je broj izraslih kolonija i izračunat je postotak preživljenja u odnosu na negativnu kontrolu.

Test mutageneze s preinkubacijom

Mutageni učinak je određivan pomoću Amesovog testa sa i bez metaboličkog aktivatora. U 2 mL top agara u mikrobiološkoj epruveti zagrijanoj na 47 °C dodano je 100 µL otopine DEHP-a ispitivanih koncentracija, 100 µL preinkubacijske smjese (bakterijskog soja) te 500 µL smjese S9 - koja ima ulogu metaboličkog aktivatora. U slučaju kada nije korišten metabolički aktivator, umjesto S9 smjese dodano je 500 µL PBS-a. Kiveta je protresena na tresilici i izlijana na minimalnu VB podlogu. Uz svaki eksperiment paralelno je izvedena i negativna kontrola. Eksperiment je izveden u dvije replike. Nacijepljene ploče inkubirane su 2 dana na 37 °C, nakon čega su prebrojani izrasli retromutanti i uspoređeni s negativnom kontrolom te je zaključeno da li ispitivane koncentracije DEHP-a djeluju mutageno ili ne. Rezultati su izraženi kao odnos broja izraslih revertanata s brojem revertanata izraslih na negativnoj kontroli te kao frekvencija mutacija. (Mortelmans i Zeiger, 2000).

3. 2. 10. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta. Rezultati su obrađeni One-way ANOVA statističkim programom uz granicu statističke značajnosti od $p < 0,05$.

Rezultati su prikazani u grafičkom obliku ili u tablici, kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Citotoksični, prooksidativni i mutageni učinak otopina različitih koncentracija DEHP-a ispitan je na biološkim test sustavima - staničnim linijama HEP2 (kontinuirana stanična linija karcinoma larinksa čovjeka), CaCo2 (kontinuirana stanična linija adenokarcinoma epitela debelog crijeva) i HepG2 (kontinuirana stanična linija hepatocelularnog karcinoma jetre čovjeka). Citotoksičnost otopina različitih koncentracija DEHP-a određivana je Neutral red testom, prooksidativnost DCFH - DA testom, a učinak na DNA (mutagenost) ispitan je Komet testom koji je izvršen u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Za određivanje mutagenog djelovanja (indukcije točkastih mutacija) korišteni su sojevi bakterije *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100.

U provedenim testovima, po potrebi su paralelno izvedene negativna i pozitivna kontrola. Negativna kontrola ne sadrži testiranu kemikaliju, nego umjesto nje vodu (odnosno otapalo u kojemu je test supstanca otopljena) i stanice biološkog test sustava. Uglavnom koristi tomu da se dobiveni rezultati uspoređuju i izražavaju u odnosu na negativnu kontrolu. Pozitivna kontrola sadrži umjesto test supstance poznati mutagen koji dokazano ima mutageno djelovanje na korištenu staničnu kulturu ili soj. Uloga pozitivne kontrole je dokaz da se cijeli test sustav ponaša na očekivani način.

Ako je neki ispitivani spoj citotoksičan, podrazumijeva se da on uzrokuje određene promjene u stanicama koje utječu na njihovu životnu aktivnost. Razvijeni su brojni testovi za detekciju citotoksičnosti ksenobiotika kojima se može odrediti utjecaj ispitivane tvari na metabolizam i rast stanica nakon izloženosti istomu. Uslijed takve izloženosti, promjene u metabolizmu i rastu stanica mogu biti ireverzibilne te posljedično rezultirati redukcijom životne aktivnosti stanica (Costa i sur., 2005).

Prooksidacijsko djelovanje imaju tvari koje olakšavaju ili ubrzavaju procese oksidacije u stanicama. Neki od njih su reaktivni kisikovi spojevi (ROS) koji igraju važnu ulogu u procesu kancerogeneze jer djeluju kao mutageni i kancerogeni. Stanice raka pokazuju povišene razine ROS-a čime je narušena ravnoteža redoks reakcija. Molekule koje su prooksidansi također mogu djelovati kao selektivna citotoksična sredstva koja, primjerice, djeluju protiv stanica raka kada postignu toksične razine ROS-a (León-González i sur., 2015). Indukcija slobodnih radikala određivana je nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije, a prikazana je kao odnos induciranih radikala u stanicama tretiranim otopinama DEHP-a različitih koncentracija i bazalnih radikala izmjerenih u negativnoj kontroli.

Mutagenost neke kemikalije podrazumijeva da ona ima sposobnost izazvati mutacije u stanicama koje se mogu prenijeti na potomstvo. Mutacija je trajna promjena u količini ili strukturi genetskog materijala u stanici, a pojam mutagen odnosi se na fizički ili kemijski agens koji povećava pojavu mutacija u stanicama iznad prirodne razine, tj. pored normalnih, spontanih mutacija koje se javljaju u stanicama, uzrokuje i inducirane mutacije. Genotoksičnost nekog spoja odnosi se na sredstvo koje mijenja strukturu, sadržaj informacija ili segregaciju DNA, uključujući ona sredstva koja uzrokuju oštećenje DNA ometanjem normalnih procesa replikacije ili koji ih na nefiziološki način privremeno mijenjaju (GSH, 2010).

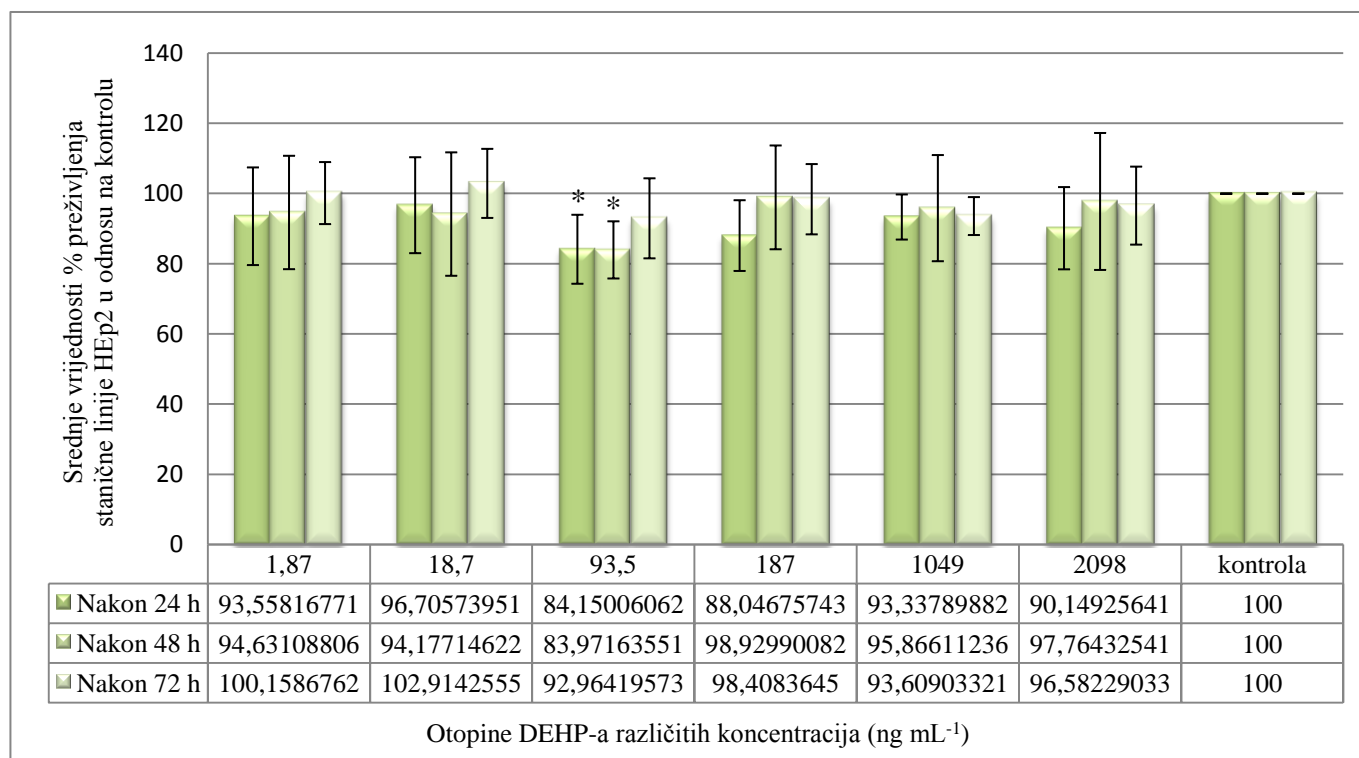
Statistički značajna razlika podrazumijeva da je usporedbom dviju varijabli utvrđen $p < 0,05$ Scheffe-ovim testom.

4. 1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA DEHP-a RAZLIČITIH KONCENTRACIJA

Ispitivanje citotoksičnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija ($1,87 \text{ ng mL}^{-1}$, $18,7 \text{ ng mL}^{-1}$, $93,5 \text{ ng mL}^{-1}$, 187 ng mL^{-1} , 1049 ng mL^{-1} i 2098 ng mL^{-1}) provedeno je Neutral red testom na staničnim linijama HEp2, CaCo2 i HepG2. Stanice su bile izložene 24, 48 i 72 sata, nakon čega je određeno njihovo preživljenje u odnosu na netretirane stanice (kontrolu).

HEp2

Na Slici 8 prikazani su rezultati citotoksičnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju HEp2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (s pripadajućim standardnim devijacijama).



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

Slika 8. Srednje vrijednosti % preživljenja stanične linije HEp2 (u odnosu na kontrolu) 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama DEHP-a

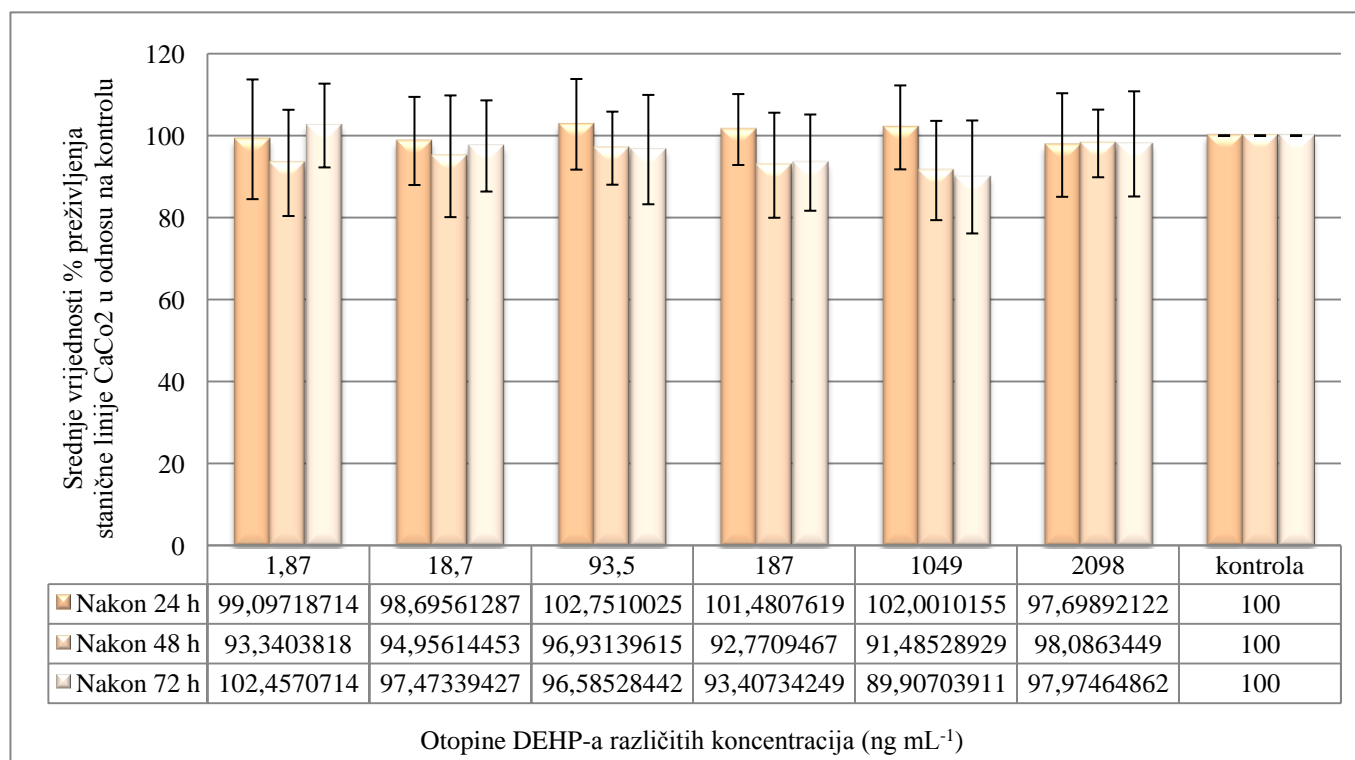
Na grafičkom prikazu iznad (Slika 8) vidljivo je da je do statistički značajnog ($p < 0,05$ Scheffe-ovim testom) smanjenja preživljenja, a time i citotoksičnog učinka, došlo nakon tretmana stanica karcinoma larinksa s DEHP-om koncentracije $93,5 \text{ ng mL}^{-1}$ u prvih 48 sati. Nakon 24 i 48 sati inkubacije navedenom koncentracijom DEHP-a, preživljenje stanica iznosi 84% u odnosu na kontrolne stanice netretirane DEHP-om. Ostale koncentracije nisu pokazale citotoksični učinak.

U istraživanju Choi i sur. (2010) također je dokazano citotoksično djelovanje DEHP-a 24 i 48 sati nakon inkubacije stanica s DEHP-om, ali na staničnoj liniji HepG2 te pri nešto višim koncentracijama ($9,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (radi usporedbe - 9800 ng mL^{-1}) i višim). Također, citotoksično djelovanje DEHP-a (koncentracije $1,95 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) nakon 24 sata inkubacije utvrđeno je u istraživanju Erkekoğlu i sur. (2010a) na humanoj staničnoj liniji LNCaP te u istraživanju Park i Choi (2007) pri koncentraciji DEHP-a od $38 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ na humanoj staničnoj liniji HeLa. Rezultati navedenih istraživanja pokazali su značajno smanjenu staničnu vijabilnost te citotoksični učinak na stanice tretirane s određenim koncentracijama DEHP-a (u usporedbi s kontrolnim, netretiranim stanicama).

Nije utvrđena statistički značajna razlika između srednjih vrijednost % preživljenja stanica tretiranih otopinama različitih koncentracija DEHP-a u usporedbi s preživljenjem kontrolnih, netretiranih stanica nakon 72 sata, stoga niti jedna otopina DEHP-a ne djeluje citotoksično na staničnu liniju HEP2 nakon 72 sata inkubacije.

CaCo2

Na Slici 9 prikazani su rezultati citotoksičnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju CaCo2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (s pripadajućim standardnim devijacijama).



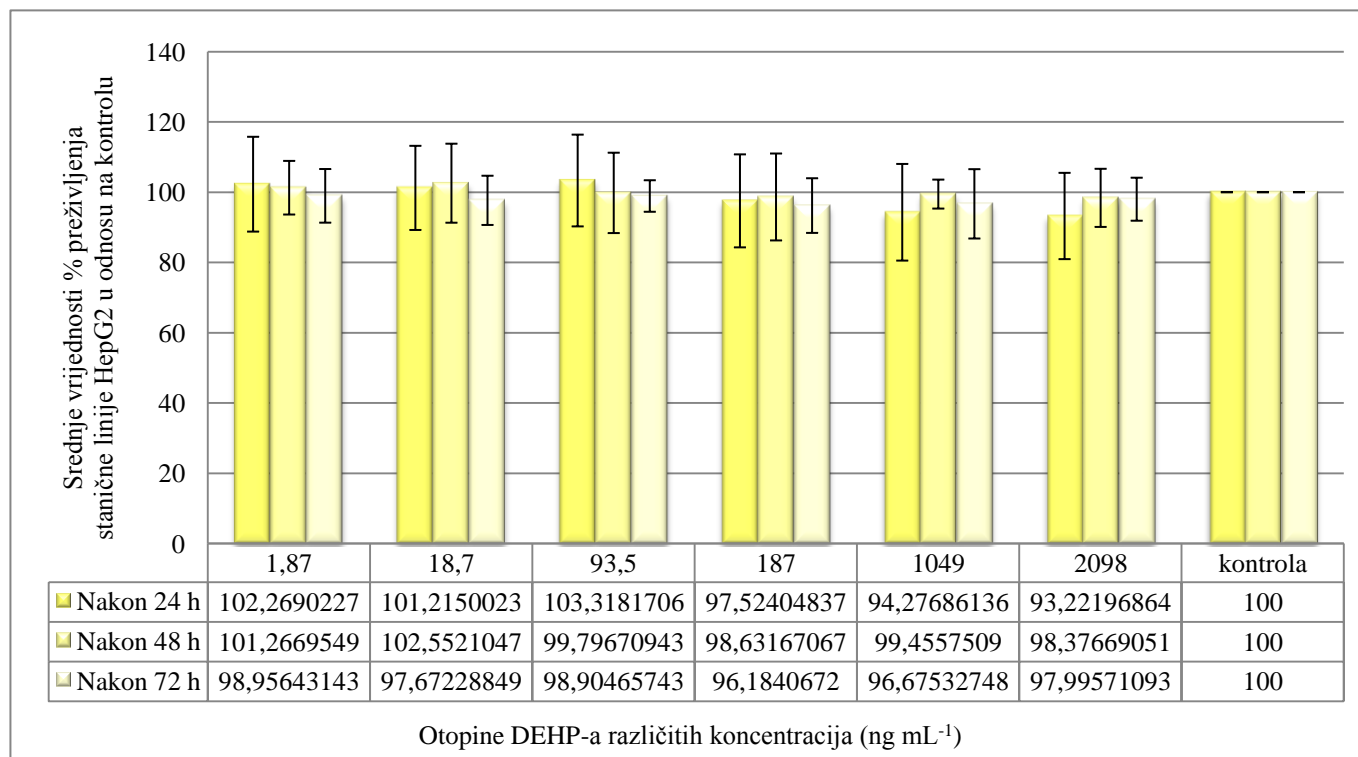
Slika 9. Srednje vrijednosti % preživljenja stanične linije CaCo2 (u odnosu na kontrolu) 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama DEHP-a

Na Slici 9 vidljivo je da je nakon 24, 48 i 72 sata od tretmana, preživljenje i proliferacija stanica tretiranih otopinama DEHP-a, približno jednako preživljenju netretiranih stanica nakon jednakog vremena inkubacije. Nije utvrđena statistički značajna razlika između preživljenja kontrolnih stanica i stanica tretiranih otopinama različitih koncentracija DEHP-a 24, 48 i 72 sata nakon tretmana, stoga niti jedna ispitivana otopina DEHP-a ne djeluje citotoksično na staničnu liniju CaCo2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije.

U istraživanju Ohno i sur. (2009) također nije utvrđena citotoksičnost DEHP-a na staničnoj liniji granulosa tumora jajnika (KGN - engl. *human ovarian granulosa - like tumor cell line*), pri čemu je korištena koncentracija DEHP-a od 0,39 µg mL⁻¹ (tj. 390 ng mL⁻¹), uz kraće vrijeme inkubacije (2 i 22 sata) nego u ovom istraživanju.

HepG2

Na Slici 10 prikazani su rezultati citotoksičnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju HepG2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (s pripadajućim standardnim devijacijama).



Slika 10. Srednje vrijednosti % preživljenja stanične linije HepG2 (u odnosu na kontrolu) 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama DEHP-a

Na Slici 10 može se očitati da je preživljenje i proliferacija stanica tretiranih otopinama DEHP-a približno jednako preživljenju kontrolnih, netretiranih stanica nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije.

Dakle, od svih ispitivanih staničnih linija, prema grafičkim prikazima na Slikama 8, 9 i 10, upravo stanična linija HepG2 pokazala se najmanje osjetljivom. Moguć razlog takvih rezultata jest svojstvo metaboličke aktivnosti stanica jetre. One imaju vrlo važnu ulogu u nizu metaboličkih (kataboličkih i anaboličkih) procesa, stoga je za očekivati da će se ishodišne toksične kemikalije u njima intenzivno metabolizirati te da njihovo toksično djelovanje neće biti potpuno ispoljeno. U jetri se odvija veliki dio metabolizma ugljikohidrata, lipida, proteina i drugih dušikovih tvari, u njoj se stvara dio faktora zgrušavanja krvi, pohranjuje se željezo i

različiti vitamini. Jetra sudjeluje u detoksifikaciji tvari - pomoću jetrenih enzima odvijaju se reakcije konjugacije i esterifikacije, pri čemu se razne toksične i organizmu strane tvari konjugiraju sa glukuronskom ili sumpornom kiselinom ili glicinom i time se prevode u netoksične i bolje topive spojeve koji se zatim izlučuju iz tijela, najčešće urinom (Guyton, 1995). Stoga je moguće da su enzimatske reakcije u hepatocitima rezultirale tvorbom manje toksičnih produkata čime je smanjen citotoksičan učinak DEHP-a.

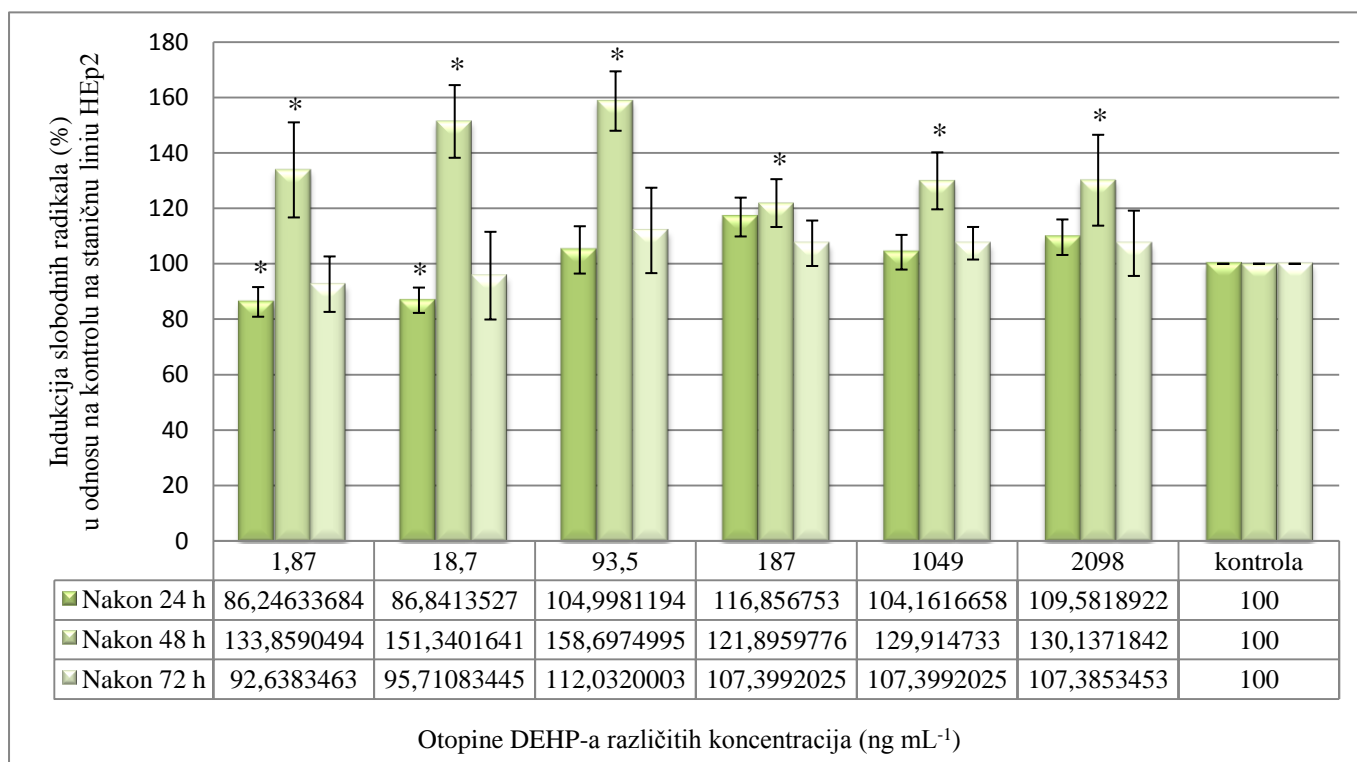
Nije utvrđena statistički značajna razlika između % preživljenja stanica tretiranih otopinama različitih koncentracija DEHP-a u usporedbi s preživljenjem kontrolnih stanicama 24, 48 i 72 sata nakon tretmana, stoga niti jedna otopina ne djeluje citotoksično na staničnu liniju HepG2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije.

4. 2. ODREĐIVANJE PROOKSIDATIVNOG DJELOVANJA DEHP-a RAZLIČITIH KONCENTRACIJA

Hep2

Ispitivanje prooksidativnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija (1,87 ng mL⁻¹, 18,7 ng mL⁻¹, 93,5 ng mL⁻¹, 187 ng mL⁻¹, 1049 ng mL⁻¹ i 2098 ng mL⁻¹) provedeno je DCFH - DA fluorimetrijskim testom na staničnim linijama HEP2, CaCo2 i HepG2. Stanice su bile izložene 24, 48 i 72 sata, nakon čega je određeno preživljenje i izračunata indukcija slobodnih radikala pojedine koncentracije u odnosu na netretirane stanice (kontrolu).

Na Slici 11 prikazani su rezultati prooksidativnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju HEP2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (s pripadajućim standardnim devijacijama).



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

Slika 11. Srednje vrijednosti % prooksidativnog djelovanja (u odnosu na kontrolu) DEHP-a različitih koncentracija na stanične linije HEP2 24, 48 i 72 h nakon tretmana

Nakon inkubacije od 24 sata, utvrđena je statistički značajna razlika između razine ROS-a u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim s otopinama DEHP-a koncentracija 1,87 ng mL⁻¹ i 18,7 ng mL⁻¹ koje su uzrokovale niži stupanj indukcije slobodnih radikala (oko 86% u odnosu na kontrolu) u staničnoj liniji HEP2. Moguće objašnjenje ovoga jest da u prisustvu manjih koncentracija nekog ksenobiotika (u ovom slučaju DEHP-a), u stanicama se nakon 24 sata vrlo malo poveća produkcija ROS-a te se posljedično aktiviraju stanični enzimi za eliminaciju ROS-a, upravo kako se i aktiviraju u normalnim uvjetima kada je stanica izložena blagom oksidacijskom stresu, a ujedno se i inducira ekspresija gena koji kodiraju za obrambene, detoksifikacijske i antioksidacijske enzime (Matés, 2000). Nadalje, statistički značajna razlika utvrđena je između razine ROS-a u stanicama tretiranim otopinama DEHP-a koncentracija 1,87 ng mL⁻¹ i 18,7 ng mL⁻¹ u odnosu na razine u stanicama tretiranim otopinama koncentracija 93,5 ng mL⁻¹, 187 ng mL⁻¹, 1049 ng mL⁻¹ i 2098 ng mL⁻¹, pri čemu je primjena posljednje navedenih uzrokovala viši stupanj indukcije slobodnih radikala. U ovom slučaju, visoke koncentracije DEHP-a inducirale su povećanu proizvodnju ROS-a u stanicama u odnosu na niže koncentracije. Slično, u istraživanju Cho i sur. (2015) dokazano je da su najviše primijenjene koncentracije DEHP-a povećale proizvodnju ROS-a u stanicama (za razliku od nižih testiranih koncentracija) te utjecale na smanjenu ekspresiju gena koji kodiraju za antioksidacijske enzime SOD, GPX, HO i CAT, što ima za posljedicu povećanu razinu slobodnih radikala u stanici. Nije utvrđeno statistički značajno povećanje razine ROS-a u stanicama tretiranim otopinama DEHP-a navedenih koncentracija u odnosu na kontrolu 24 sata nakon tretmana, stoga se ne može zaključiti da one djeluju prooksidativno na staničnu liniju HEP2.

Jednak trend smanjenja i indukcije nastajanja slobodnih radikala vidljiv je u stanicama koje su bile izložene DEHP-u 24 i 72 sata. Nakon tretmana stanica s DEHP-om najnižih dviju koncentracija (1,87 ng mL⁻¹ i 18,7 ng mL⁻¹) detektirana je smanjena razina ROS-a u odnosu na razinu detektiranu u kontroli. Nadalje, razina ROS-a u stanicama raste s povećanjem koncentracije DEHP-a sve do koncentracije od 187 ng mL⁻¹, nakon čega razina ROS-a s povišenjem koncentracije DEHP-a pada. Ovakav trend nije primijećen u slučaju inkubacije stanica s DEHP-om tijekom 48 sati.

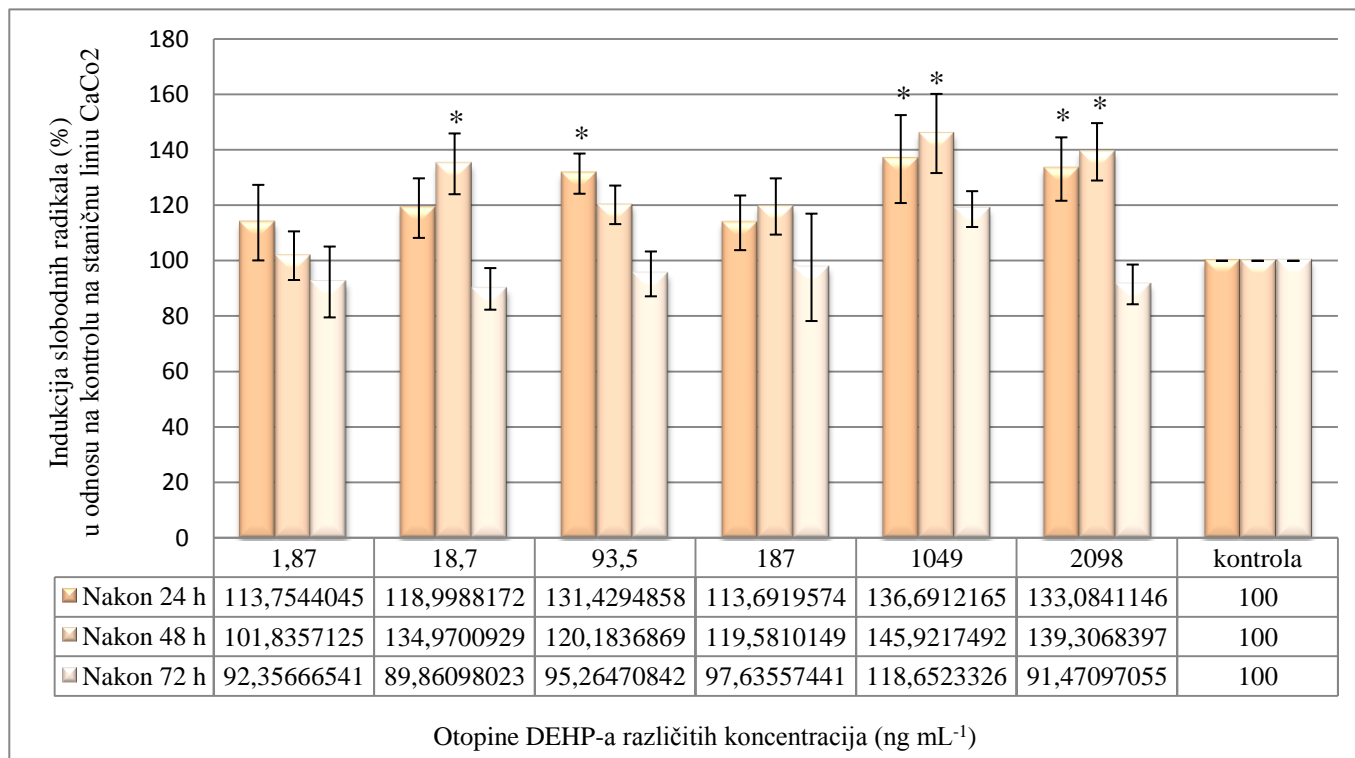
Nakon 48 sati inkubacije, utvrđena je statistički značajna razlika između razine ROS-a detektirane u stanicama koje nisu tretirane DEHP-om (kontrolne stanice) u odnosu na njihovu razinu u stanicama tretiranim bilo kojom koncentracijom DEHP-a (1,87 ng mL⁻¹ i 18,7 ng mL⁻¹, 93,5 ng mL⁻¹, 187 ng mL⁻¹, 1049 ng mL⁻¹, 2098 ng mL⁻¹), pri čemu je razina radikala značajno viša u tretiranim stanicama. Također, statistički značajna razlika utvrđena je između

razine ROS-a detektirane u stanicama tretiranim DEHP-om koncentracije $93,5 \text{ ng mL}^{-1}$ u odnosu na razinu u stanicama tretiranim DEHP-om koncentracijama 187 ng mL^{-1} i 1049 ng mL^{-1} , pri čemu je kod posljednje navedenih izmjerena niža razina ROS-a.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prooksidativnom djelovanju otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju HEP2 72 sati nakon tretmana.

CaCo2

Na Slici 12 prikazani su rezultati prooksidativnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju CaCo2 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (s pripadajućim standardnim devijacijama).



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika dobivenog rezultata u odnosu na kontrolu

Slika 12. Srednje vrijednosti % prooksidativnog djelovanja (u odnosu na kontrolu) DEHP-a različitih koncentracija na stanične linije CaCo2 24, 48 i 72 h nakon tretmana

Nakon inkubacije od 24 sata, utvrđena je statistički značajna razlika u indukciji slobodnih radikala između kontrolnih, netretiranih stanica i stanica tretiranih DEHP-om koncentracija 93,5 ng mL⁻¹, 1049 ng mL⁻¹ i 2098 ng mL⁻¹, pri čemu tretirane stanice pokazuju viši stupanj indukcije slobodnih radikala (131%; 137% i 133% (redom) u odnosu na kontrolu). Slično, u istraživanju Erkekoğlu i sur. (2011) utvrđeno je da je tretman DEHP-om stanične linije LNCaP uzrokovao povećanu produkciju slobodnih radikala 24 sata nakon inkubacije, ali u tom je istraživanju korištena značajno viša koncentracija DEHP-a - 3 mM, tj. 1171800 ng mL⁻¹ (koja je oko 500 puta veća od najveće koncentracije ovdje primijenjene). U istom istraživanju je zaključeno da DEHP povećava proizvodnju intracelularnih ROS-a i aktivira p53 i p21 u LNCaP stanicama, što ukazuje da je indukcija oksidacijskog stresa jedan

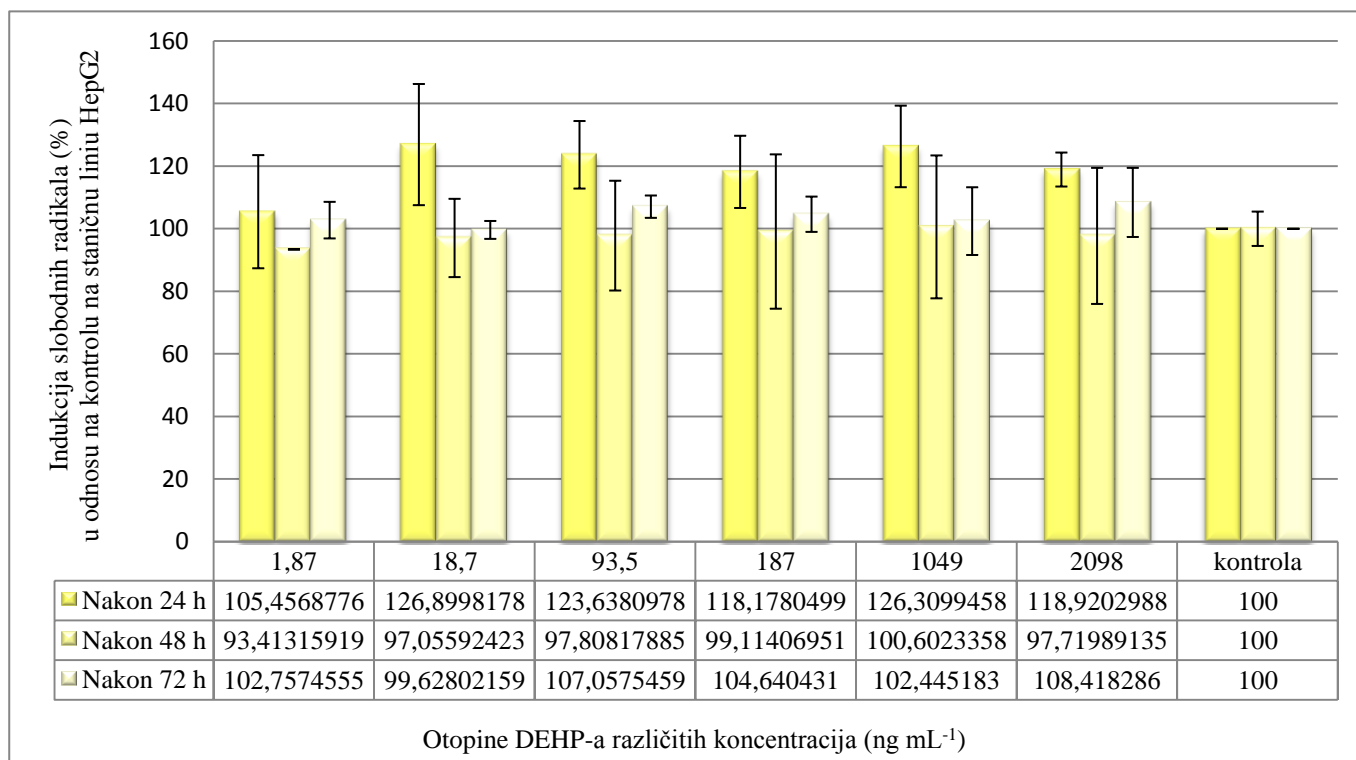
od važnih mehanizama toksičnosti ovog spoja. p53 i p21 su tumor supresor geni koji kodiraju za proteine čija je uloga zaustavljanje stanične diobe (sprečavajući vezanje ciklina za ciklin kinaze - što ih inhibira pa ne počinje stanična dioba). Dakle, navedenim istraživanjem također je dokazano da DEHP može utjecati na progresiju staničnog ciklusa kroz indukciju p53 i nakon toga p21, ali uglavnom djelovanjem njegovog glavnog metabolita, MEHP-a (Erkekoğlu i sur., 2011). Nadalje, statistički značajna razlika utvrđena je između otopine DEHP-a koncentracije $1,87 \text{ ng mL}^{-1}$ u odnosu na otopinu koncentracije 1049 ng mL^{-1} pri čemu posljednja pokazuje viši stupanj indukcije slobodnih radikala, kao što je slučaj u istraživanju Cho i sur. (2015) u kojemu su rezultati pokazali da su više primijenjene koncentracije DEHP-a povećale proizvodnju ROS-a u stanicama.

Nakon 48 sati tretmana, utvrđena je statistički značajna razlika u indukciji slobodnih radikala u stanicama tretiranim otopinama DEHP-a koncentracija $18,7 \text{ ng mL}^{-1}$, 1049 ng mL^{-1} i 2098 ng mL^{-1} , u odnosu na indukciju radikala netretiranih stanica. Tako u tretiranim stanicama dolazi do povišene indukcije slobodnih radikala (135%, 146% i 139% (redom) u odnosu na kontrolu) na staničnu liniju CaCo2 48 sati nakon tretmana. Također je utvrđena statistički značajna razlika u indukciji slobodnih radikala između otopine DEHP-a koncentracije $1,87 \text{ ng mL}^{-1}$ te otopina DEHP-a koncentracija $18,7 \text{ ng mL}^{-1}$, 1049 ng mL^{-1} te 2098 ng mL^{-1} , pri čemu % indukcije slobodnih radikala raste s porastom koncentracije otopine DEHP-a, slično istraživanju Cho i sur. (2015) (u kojemu su primijenjene množine od 10, 100 i 100 pmol DEHP-a).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prooksidativnom djelovanju otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju CaCo2 72 sata nakon tretmana.

HepG2

Na Slici 13 prikazani su rezultati prooksidativnog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju HepG2 nakon 24, 48 i 72 inkubacije (s pripadajućim standardnim devijacijama).



Slika 13. Srednje vrijednosti % prooksidativnog djelovanja (u odnosu na kontrolu) DEHP-a različitih koncentracija na stanične linije HepG2 24, 48 i 72 h nakon tretmana

Ovim istraživanjem nije utvrđena statistički značajna razlika u prooksidativnom djelovanju otopina DEHP-a različitih koncentracija na staničnu liniju HepG2 24, 48 i 72 sata nakon tretmana. Moguć razlog ovoga jest da stanice jetre posjeduju mehanizam koji ih štiti od kratkotrajnog oksidativnog stresa, pri čemu se u takvim uvjetima u njima inducira pojačana ekspresija gena za proizvodnju katalaze i mikrosomalne glutation S - transferaze u CYP2E1 (Marí i Cederbaum, 2001), što rezultira boljim antioksidacijskim sustavom stanične linije jetre (HepG2) (u odnosu na stanice larinksa (HEP2) i kolona (CaCo2)), a time i smanjenom razinom slobodnih radikala u stanicama.

4. 3. ODREĐIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA IZAVANIH RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA DEHP-a

Genotoksično djelovanje otopina DEHP-a različitih koncentracija određeno je Komet testom 24 sata nakon tretmana otopinama različitih koncentracija DEHP-a na staničnim linijama HEP2 (na kojoj je utvrđeno najveće prooksidativno djelovanje DEHP-a) i CaCo2 pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*. Kromosomska oštećenja prikazana su pomoću sljedećih parametara: duljina repa kometa, intenzitet repa te repni moment.

Duljina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA (nastalni kromosomskom aberacijom), a obično se mjeri od sredine glave kometa ili od ruba glave i izražava u μm . Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se kao % u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se obično definira kao umnožak duljine repa i % DNA u repu, a izračunava ga računalni program. Prihvatljivom razinom oštećenja smatraju se vrijednosti do 10% DNA u repu kometa (IMI, 2010). Dulji rep, veći intenzitet repa i veći repni moment ukazuju na veća oštećenja molekule DNA (uzrokovana većom razinom mutacija).

Ispitivanje mutagenog djelovanja (indukcije kromosomskih aberacija) otopina DEHP-a različitih koncentracija ($18,7 \text{ ng mL}^{-1}$, 187 ng mL^{-1} , 1049 ng mL^{-1} i 2098 ng mL^{-1}) provedeno je Komet testom na staničnim linijama HEP2 i CaCo2. Stanice su bile izložene 24 sata, nakon čega su određeni parametri koji ukazuju na eventualno oštećenje DNA nakon tretmana pojedinim otopinama DEHP-a.

HEP2

U Tablici 6 prikazane su srednje vrijednosti izmjerenih parametara DNA stanica HEP2 Komet testom, 24 sata od tretmana otopinama DEHP-a različitih koncentracija.

Tablica 6. Srednje vrijednosti izmjerenih parametara DNA (duljina i intenzitet repa te repni moment) Komet testom 24 sata nakon tretmana stanične linije HEp2 DEHP-om različitim koncentracija te pripadajuće standardne devijacije

Koncentracija (ng mL ⁻¹)	Duljina repa (μ m)	Intenzitet repa (%)	Repni moment
18,7	16,42 ± 0,25	3,38 ± 0,79	0,45 ± 0,28
187	16,98 ± 0,26	4,3 ± 0,88	0,59 ± 0,33
1049	15,49 ± 0,19	2,73 ± 0,74	0,37 ± 0,28
2098	15,62 ± 0,24	3,44 ± 0,81	0,47 ± 0,32
Negativna kontrola	14,5 ± 0,16	1,93 ± 0,64	0,22 ± 0,21
Pozitivna kontrola	11,39 ± 0,63	3,4 ± 0,79	0,51 ± 0,35

U Tablici 6 vidljivo je da je nakon tretmana stanica sa svim otopinama DEHP-a (koncentracija 18,7 ng mL⁻¹, 187 ng mL⁻¹, 1049 ng mL⁻¹ i 2098 ng mL⁻¹) njihova duljina repa veća u odnosu na duljinu repa netretiranih stanica (negativnu kontrolu), ali budući da nije utvrđena statistički značajna razlika između njih, može se zaključiti tek da otopine DEHP-a pokazuju potencijalno mutageno djelovanje na staničnu liniju HEp2.

Također, statistički značajna razlika nije utvrđena niti između intenziteta repa i repnog momenta stanica tretiranih otopinama različitim koncentracija DEHP-a u odnosu na kontrolne stanice, ali je vidljivo povećanje % intenziteta repa i repnog momenta kod tretiranih stanica, stoga se može zaključiti da ispitivane otopine DEHP-a doista pokazuju potencijalno mutageno djelovanje na staničnu liniju HEp2.

Slični su rezultati Komet testa istraživanja Erkekoğlu i sur. (2010b), provedenog na MA-10 stanicama izloženima DEHP-u (3 mM, tj. 1171800 ng mL⁻¹), koji su pokazali visoku razinu DNA oštećenja nakon tretmana DEHP-om, pri čemu je značajno povećan intenzitet repa (3,4 puta) i repni moment (4,2 puta) u odnosu na netretirane MA-10 stanice. Rezultati navedenog istraživanja utvrdili su da je razlika između štetnog djelovanja izvornog spoja (DEHP-a) i njegovog glavnog metabolita (MEHP-a) na DNA bila neznatna. Wang i sur. (2015) utvrdili su oksidativno oštećenje DNA inducirano DEHP-om na staničnu liniju HEK293, pri čemu je također Komet testom utvrđeno povećanje lomova lanaca nakon tretmana. Također, istraživanje Erkekoğlu i sur. (2010a) pokazalo je povećana oštećenja DNA primjenom značajno viših, citotoksičnih koncentracija DEHP-a (3 mM, tj. 1171800 ng mL⁻¹) u LNCaP staničnoj liniji, pri čemu su Komet testom izmjereni povećan intenzitet repa i repni moment nakon inkubacije s DEHP-om od 24 sata.

CaCo2

U Tablici 7 prikazane su srednje vrijednosti izmjerenih parametara DNA stanica CaCo2 Komet testom, 24 sata od tretmana otopinama DEHP-a različitih koncentracija.

Tablica 7. Srednje vrijednosti izmjerenih parametara DNA (duljina i intenzitet repa te repni moment) Komet testom 24 sata nakon tretmana stanične linije CaCo2 DEHP-om različitih koncentracija te pripadajuće standardne devijacije

Koncentracija (ng mL ⁻¹)	Duljina repa (μ m)	Intenzitet repa (%)	Repni moment
18,7	19,85 \pm 0,29	1,14 \pm 0,49	0,27 \pm 0,18
187	23,34 \pm 0,35	2,27 \pm 0,71	0,53 \pm 0,35
1049	20,86 \pm 0,37	2,45 \pm 0,71	0,44 \pm 0,31
2098	- *	-	-
Negativna kontrola	19,69 \pm 0,29	2,65 \pm 0,80	0,27 \pm 0,23
Pozitivna kontrola	83,29 \pm 0,85	69,40 \pm 0,96	34,28 \pm 1,21

* - podrazumijeva da u uzorku nisu detektirane DNA (stanice) kojima bi se izmjerili navedeni parametri

Rezultati Komet testa prikazani u Tablici 7 pokazuju da je nakon tretmana stanica sa svim otopinama DEHP-a, njihova duljina repa veća u odnosu na duljinu repa netretiranih stanica (negativnu kontrolu). Budući da nije utvrđena statistički značajna razlika između duljine repa tretiranih i kontrolnih stanica, može se zaključiti tek da otopine DEHP-a koncentracija 18,7 ng mL⁻¹, 187 ng mL⁻¹ i 1049 ng mL⁻¹ djeluju kao potencijalni mutageni na staničnu liniju HEp2.

Također, statistički značajna razlika nije utvrđena niti između repnog momenta stanica tretiranih otopinama različitih koncentracija DEHP-a u odnosu na kontrolne, ali je vidljivo povećanje % repnog momenta kod tretiranih stanica (u odnosu na kontrolu), stoga se doista može zaključiti da ispitivane otopine DEHP-a pokazuju potencijalno mutageno djelovanje na staničnu liniju HEp2.

U istraživanju Park i Choi (2007) također je Komet testom utvrđeno povećanje repnog momenta HeLa stanica nakon 24 sata inkubacije sa DEHP-om, iako su u njemu primijenjene značajno više koncentracije DEHP-a (9400 ng mL⁻¹, 19000 ng mL⁻¹ i 38000 ng mL⁻¹), nego u ovom istraživanju.

4. 4. ODREĐIVANJE TOČKASTIH GENETIČKIH MUTACIJA IZAZVANIH RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA DEHP-a

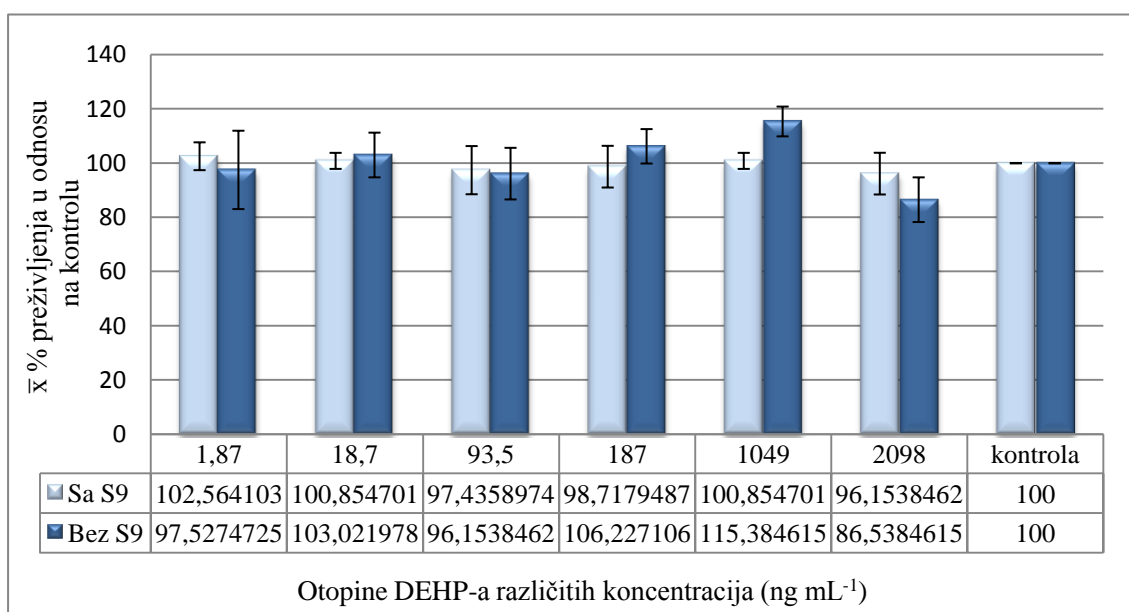
Ispitivanje mutagenog djelovanja otopina DEHP-a različitih koncentracija (1,87 ng mL⁻¹, 18,7 ng mL⁻¹, 93,5 ng mL⁻¹, 187 ng mL⁻¹, 1049 ng mL⁻¹ i 2098 ng mL⁻¹) provedeno je Amesovim testom na bakterijskim sojevima TA98 i TA100 *Salmonella typhimurium*, sa i bez primjene metaboličkog aktivatora - S9, koji je po sastavu mikrosomalni homogenat jetre štakora.

Rezultati su prikazani kao odnos induciranih i spontanih revertanata (Slike 15 i 18) te kao frekvencija mutacija (Slike 16 i 19). Grafički je prikazano preživljenje stanica pojedinog soja u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama DEHP-a (Slike 14 i 17).

Soj TA98 *Salmonella typhimurium*

Preživljenje

Slika 14 prikazuje ovisnost prosječnih vrijednosti (\bar{x}) % preživljenja bakterijskog soja TA98 *Salmonella typhimurium* s pripadajućim standardnim devijacijama (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9) o različitim koncentracijama DEHP-a nakon 20 minuta inkubacije pri 37 °C.

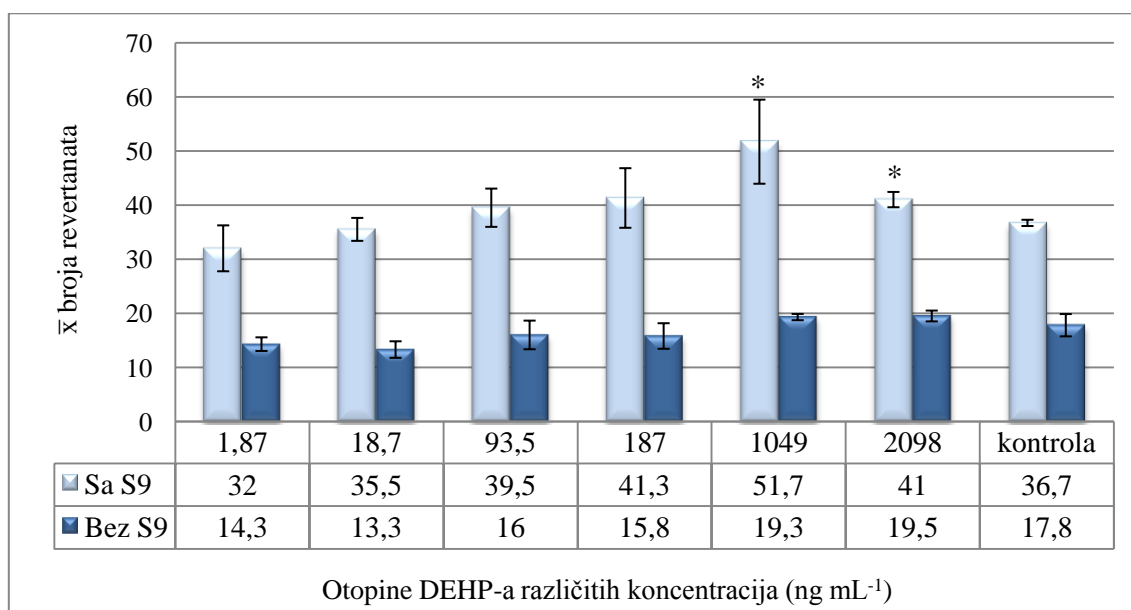


Slika 14. Ovisnost prosječnih vrijednosti % preživljenja bakterija 24 sata nakon tretmana različitim koncentracijama DEHP-a (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9)

Dobiveni rezultati (Slika 14) ukazuju na to da ispitivane otopine DEHP-a nemaju neki utjecaj na preživljenje stanica *Salmonella typhimurium* soja TA98, osim najviše koncentracije DEHP-a (2098 ng mL⁻¹, bez prisustva metaboličkog aktivatora) koja uzrokuje niže preživljenje stanica u odnosu na kontrolu (87%). Potencijalna citotoksičnost DEHP-a također je dokazana u istraživanju Nohmi i sur. (1985) na sojevima *Salmonella typhimurium* TA100, TA102, TA98, TA97 gdje je primijenjeno 0,2 mg DEHP-a po ploči (sa i bez metaboličkog aktivatora) - što odgovara koncentraciji od 10 000 ng mL⁻¹, koja je čak 5 puta veća od najviše koncentracije ovdje primijenjene (2098 ng mL⁻¹).

Inducirani revertanti

Slika 15 prikazuje ovisnost prosječnih vrijednosti (\bar{x}) broja induciranih revertanata (his+) bakterijskog soja TA98 *Salmonella typhimurium* s pripadajućim standardnim devijacijama (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9) o različitim koncentracijama DEHP-a nakon 20 minuta inkubacije pri 37 °C.



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

Slika 15. Ovisnost prosječnih vrijednosti broja induciranih revertanata o različitim koncentracijama DEHP-a (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9)

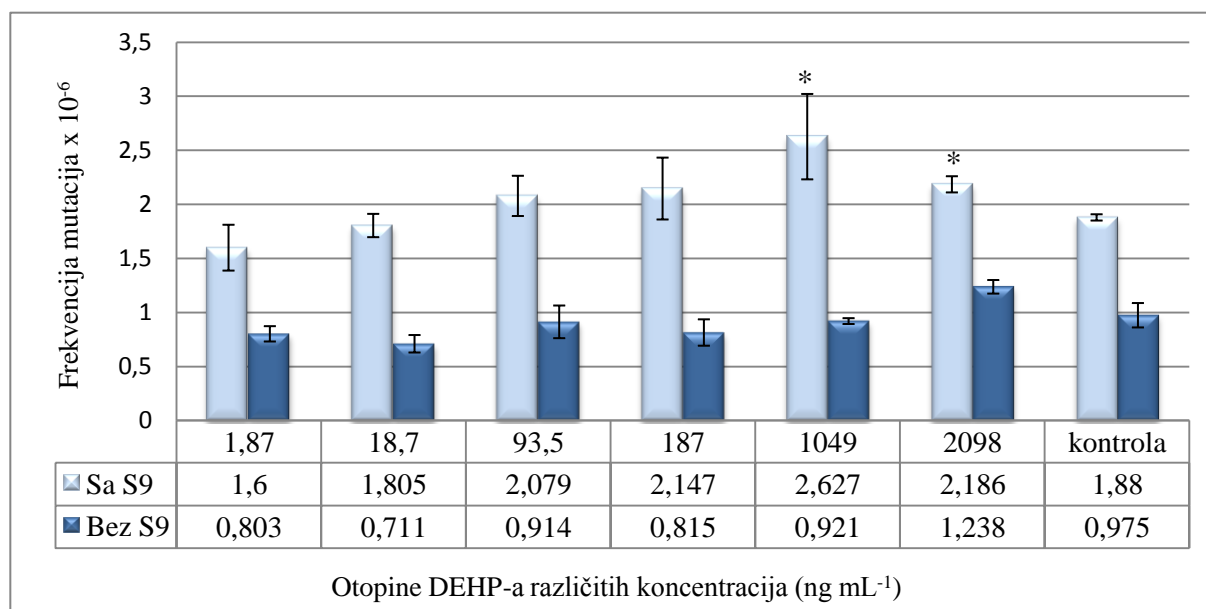
Rezultati prikazani na Slici 15 pokazuju da s povećanjem koncentracije DEHP-a raste i broj induciranih revertanata do koncentracije DEHP-a od 1049 ng mL⁻¹. Međutim, niti nakon

jednog tretmana DEHP-om, kvocijent mutacije ne prelazi 2 (pri koncentraciji DEHP-a od 1049 ng mL⁻¹ iznosi 1,41), što znači da DEHP niti pri jednoj koncentraciji ne djeluje kao sigurni mutagen, već se može zaključiti tek da ima potencijalno mutageno djelovanje. Trend povećanja induciranih revertanata uočljiv je u prisustvu metaboličkog aktivatora zbog čega se zaključuje da jetra, odnosno metabolički procesi u njoj, imaju vrlo važnu ulogu u ispoljavanju genotoksičnosti DEHP-a.

Na soju *Salmonella typhimurium* TA98 bez prisustva metaboličkog aktivatora nije uočeno mutageno djelovanje otopina DEHP-a različitih koncentracija. Također, u istraživanju Rexroat i Probst (1985) nije dokazano genotoksično djelovanje DEHP-a (jer nisu utvrđene reverzne mutacije) na sojevima *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA98 bez prisustva metaboličkog aktivatora, iako su korištene značajno više koncentracije (5000 µg po ploči, tj. 250000 ng mL⁻¹), nego ispitivane koncentracije u ovom istraživanju.

Frekvencije mutacija

Slika 16 prikazuje ovisnost prosječnih vrijednosti (\bar{x}) frekvencija mutacija bakterijskog soja TA98 *Salmonella typhimurium* s pripadajućim standardnim devijacijama (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9) nakon tretmana s različitim koncentracijama DEHP-a nakon 20 minuta inkubacije pri 37 °C.



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

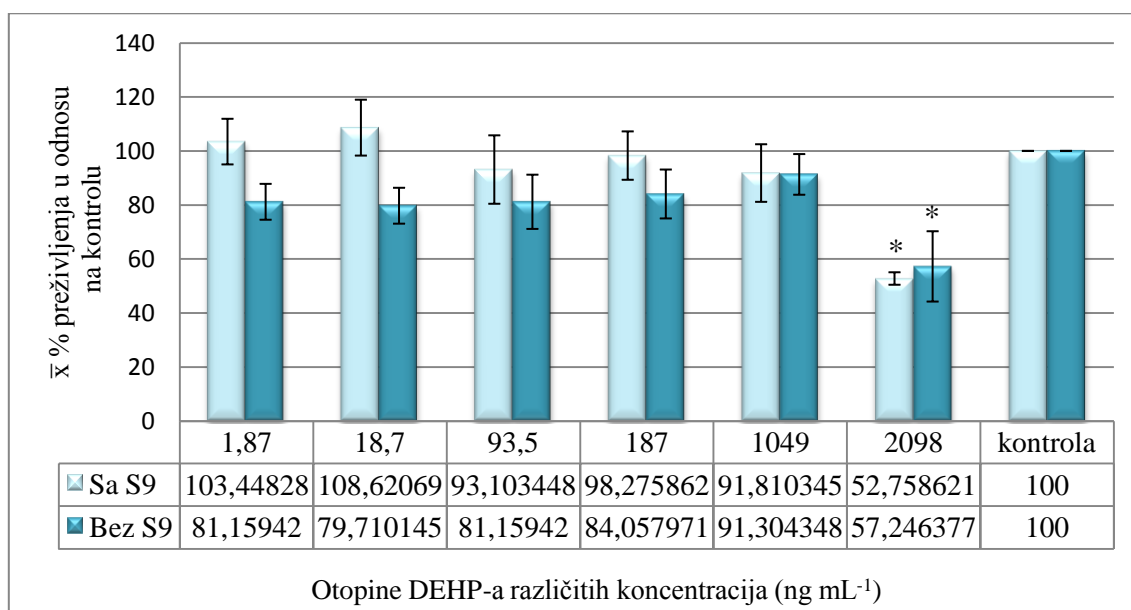
Slika 16. Ovisnost prosječnih vrijednosti frekvencija mutacija o različitim koncentracijama DEHP-a (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9)

Na Slici 16 vidljivo je da porastom koncentracije DEHP-a raste i frekvencija mutacija uz prisustvo metaboličkog aktivatora, premda, kao i u slučaju induciranih revertanata, taj porast nije velik (viši je 1,39 puta pri koncentraciji DEHP-a od 1049 ng mL⁻¹ u odnosu na kontrolu). Ovime je dokazano da ovaj ftalat doista ima određeni mutageni potencijal.

Soj TA100 *Salmonella typhimurium*

Preživljenje

Slika 17 prikazuje ovisnost prosječnih vrijednosti (\bar{x}) % preživljenja bakterijskog soja TA100 *Salmonella typhimurium* s pripadajućim standardnim devijacijama (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9) o različitim koncentracijama otopine DEHP-a nakon 20 minuta inkubacije pri 37 °C.



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

Slika 17. Ovisnost prosječnih vrijednosti % preživljenja o različitim koncentracijama DEHP-a (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9)

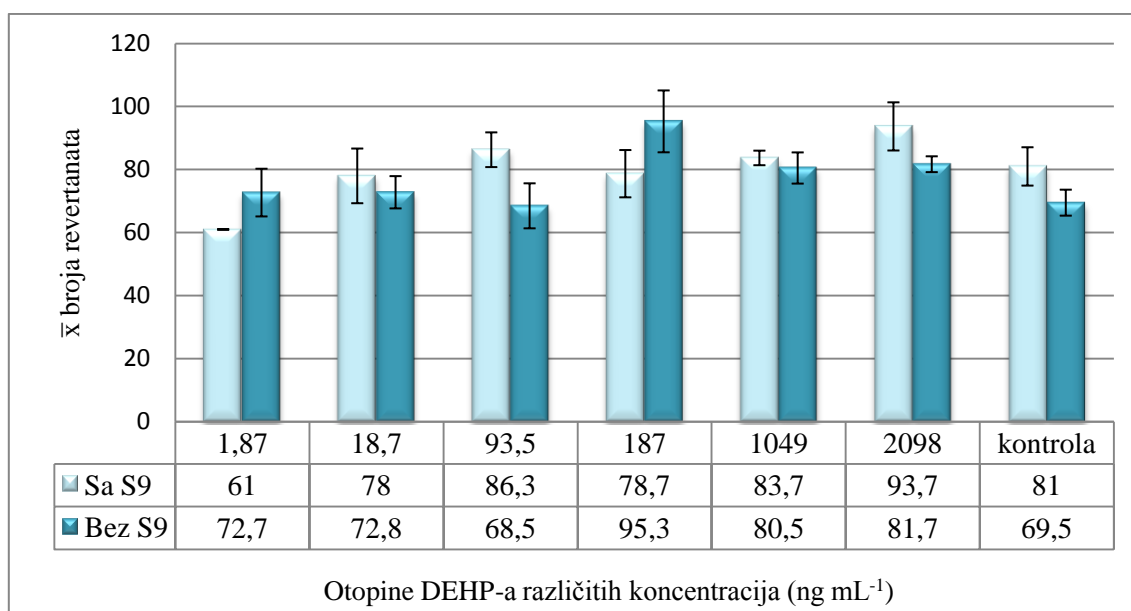
Dobiveni rezultati (Slika 17) pokazuju da su testirane otopine DEHP-a imale utjecaj na preživljenje bakterija, posebno u slučaju kada nije primijenjen metabolički aktivator -

prilikom čega je detektirano preživljenje bakterija nakon primjene prvih pet koncentracija DEHP-a ($1,87 \text{ ng mL}^{-1}$, $18,7 \text{ ng mL}^{-1}$, $93,5 \text{ ng mL}^{-1}$, 187 ng mL^{-1} i 1049 ng mL^{-1}) u rasponu od 80% do 91% u odnosu na kontrolu. Najmanje preživljenje bakterija (citotoksično djelovanje) uzrokovala je najviša koncentracija DEHP-a (2098 ng mL^{-1}), sa i bez prisustva metaboličkog aktivatora, gdje je preživljenje tretiranih stanica u odnosu na kontrolu 53 i 57%, redom.

Potencijalna citotoksičnost DEHP-a također je dokazana u istraživanju Nohmi i sur. (1985) na sojevima *Salmonella typhimurium* TA100, TA102, TA98, TA97 u kojemu su testirane značajno više koncentracije DEHP-a - $10\,000 \text{ ng mL}^{-1}$ ($0,2 \text{ mg DEHP-a po ploči}$) (sa i bez metaboličkog aktivatora).

Inducirani revertanti

Slika 18 prikazuje ovisnost prosječnih vrijednosti (\bar{x}) broja induciranih revertanata (his+) bakterijskog soja TA100 *Salmonella typhimurium* s pripadajućim standardnim devijacijama (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9) o različitim koncentracijama DEHP-a nakon 20 minuta inkubacije pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$.



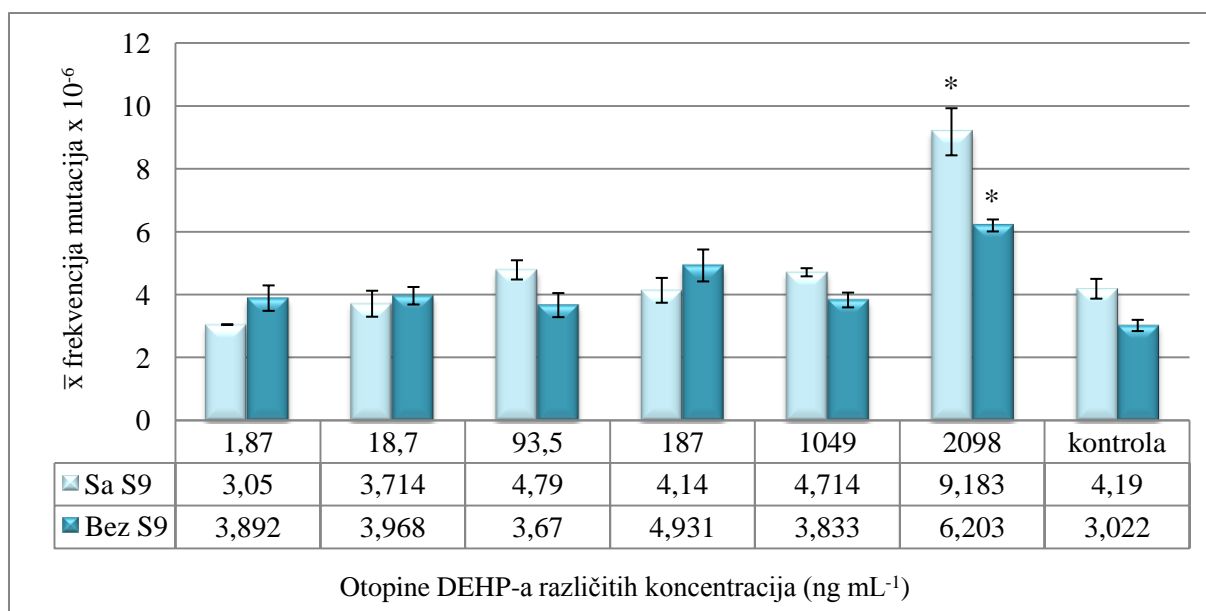
Slika 18. Ovisnost prosječnih vrijednosti broja induciranih revertanata o različitim koncentracijama otopine DEHP-a (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9)

Na Slici 18 je vidljivo da niti jedna otopina DEHP-a različitih koncentracija uz prisustvo metaboličkih aktivatora nije uzrokovala porast broja induciranih revertanata u odnosu na kontrolu, iz čega proizlazi zaključak da niti jedna otopina DEHP-a ne djeluje genotoksično na *Salmonella typhimurium* soj TA100. Genotoksičnost DEHP-a također nije dokazana u brojnim istraživanjima u kojima je primijenjena viša koncentracija DEHP-a, primjerice, u istraživanju Robertson i sur. (1983) na *Salmonella typhimurium* sojevima TA98, TA100 (sa i bez metaboličkog aktivatora) u kojemu je testirana koncentracija DEHP-a od 195000 ng mL⁻¹ (3900 µg po ploči). Nadalje, genotoksičnost DEHP-a nije dokazana niti u istraživanju Matsushima i sur. (1985) na sojevima *Salmonella typhimurium* TA100, TA102, TA98 kada je primijenjeno 250000 ng mL⁻¹ (5000 µg po ploči) - sa i bez metaboličkog aktivatora.

U slučaju bez metaboličkog aktivatora, tretman DEHP-om koncentracije 187 ng mL⁻¹ pokazao je potencijalno genotoksično djelovanje jer je broj induciranih revertanata viši (95) u odnosu na negativnu kontrolu (70), pri čemu kvocijent mutacije iznosi 1,35. Također, u istraživanju Matsushima i sur. (1985) utvrđeno je potencijalno genotoksično djelovanje DEHP-a na soj TA97 bez prisustva metaboličkog aktivatora, zbog dokazanih reverznih mutacija nakon primjene značajno više koncentracije DEHP-a (5,0 mg po ploči, tj. 250000 ng mL⁻¹), nego koncentracije primijenjene u ovome radu.

Frekvencija mutacija

Slika 19 prikazuje ovisnost prosječnih vrijednosti (\bar{x}) frekvencija mutacija bakterijskog soja TA100 *Salmonella typhimurium* s pripadajućim standardnim devijacijama (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9) o različitim koncentracijama otopine DEHP-a nakon 20 minuta inkubacije pri 37 °C.



*označava da je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

Slika 19. Ovisnost prosječnih vrijednosti frekvencija mutacija o različitim koncentracijama DEHP-a (sa i bez metaboličkog aktivatora - S9)

Na slici 19 moguće je očitati da je najveća frekvencija mutacija detektirana nakon tretmana bakterija otopinom DEHP-a koncentracije 2098 ng mL⁻¹ uz prisustvo metaboličkog aktivatora, pri čemu je ona čak 2,19 puta viša nego u kontrolnim stanicama. Ovo je primjer iz kojeg se vidi da je prilikom određivanja mutagenog djelovanja, osim poznavanja broja induciranih revertanata, vrlo važno znati i koliki je ukupni broj stanica koji je bio izložen djelovanju neke kemikalije. Ako se usporede rezultati prikazani na Slici 18 i 19, vidljivo je da usporedbom broja revertanata, odnosno frekvencije mutacija na najvišoj istraživanoj koncentraciji s istim parametrima na negativnoj kontroli, koncentracija DEHP-a od 2098 ng mL⁻¹ ipak djeluje genotoksično na *S. typhimurium* soj TA100.

Također, potencijalna genotoksičnost DEHP-a (gdje je primijenjeno 5000 µg po ploči, što je ekvivalentno 250000 ng mL⁻¹), uz prisustvo metaboličkog aktivatora, dokazana je u istraživanju Tomita i sur. (1982), gdje su utvrđene genetske mutacije na *S. typhimurium* (soj TA100). Ipak, u navedenom istraživanju u kojemu je zaključeno da DEHP ima potencijalno genotoksično djelovanje, korištena je koncentracija značajno viša (oko 120 puta), nego najviša primijenjena koncentracija u ovom istraživanju.

Genotoksičnost DEHP-a nije dokazana u istraživanju Gee i sur. (1998) na *Salmonella typhimurium* sojevima TA1537, TA98, TA7001, TA7002, TA7003, TA7004, TA7005 i TA7006 kada je korištena koncentracija DEHP-a od 1000 µg mL⁻¹ (sa i bez metaboličkog

aktivatora), u kojemu nakon tretmana bakterija DEHP-om nije došlo do pojave reverznih mutanata. Ovakvi, vrlo različiti rezultati ukazuju na kompleksnost istraživanja genotoksičnog učinka kemikalija kao što je DEHP, jer ne postoji jasan dozno - ovisan odgovor različitih organizama izloženih toj kemikaliji, nego izloženost uzrokuje različite efekte na razne organizme duž primijenjenog koncentracijskog raspona.

5. ZAKLJUČCI

1. Nije dokazano citotoksično djelovanje DEHP-a 24 - 72 sata nakon tretmana na staničnim linijama, no na bakterijskom test sustavu smanjeno je preživljenje stanica ovisno o testiranoj koncentraciji DEHP-a.
2. Utvrđeno je da DEHP inducira slobodne radikale u stanicama karcinoma grkljana i debelog crijeva nakon 24 i 48 sati inkubacije. Najveće prooksidativno djelovanje uočeno je pri nižim koncentracijama DEHP-a nakon 48 sati tretmana stanica raka grkljana, dok su stanice raka debelog crijeva najosjetljivije na prooksidativan učinak tijekom 24 i 48 sati tretmana. U stanicama karcinoma jetre nije došlo do indukcije slobodnih radikala nakon tretmana, što ukazuje na značajnost metabolizma i prisutnost antioksidacijskog sustava u njima.
3. Uslijed izloženosti DEHP-u detektirana je povećana frekvencija točkastih mutacija u bakterijama u prisustvu metaboličkog aktivatora te lomovi DNA u stanicama raka grkljana i debelog crijeva.

6. POPIS LITERATURE

Adler, I.-D. (1984) Cytogenetic tests in mammals. U: Mutagenicity Testing: A Practical Approach. (Venitt, S., Parry, J. M., ured.), IRL Press, Oxford, str. 275–306.

Afshari, A., Gunnarsen, L., Clausen, P. A., Hansen, V. (2004) Emission of phthalates from PVC and other materials. *Indoor Air*. **14** (2), 120–128.

Ahmed, R. S., Price, S. C., Grasso, P. (1989) Effects of intermittent feeding of rats with di-2-ethylhexylphthalate. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 1073-1074.

Albro, P. W., Corbett, J. T., Schroeder, J. L., Jordan, S., Matthews, H. B. (1982) Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health Perspect.* **45**, 19-25.

Albro, P. W., Lavenhar, S. R. (1989) Metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate. *Drug Metab. Rev.* **21**, 13–34.

Albro, P. W., Thomas, R. O. (1973) Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by Lipases. *Biochim. Biophys. Acta* **360**, 380–390.

Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 782–786.

Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347–364.

Anderson, S. P., Cattley, R. C., Corton, J. C. (1999) Hepatic expression of acute-phase protein genes during carcinogenesis induced by peroxisome proliferators. *Mol. Carcinog.* **26**, 226-238.

Anonymus 1 <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-23.aspx?geo_country=hr>. Pristupljeno 1. lipnja 2016.

Anonymus 2 <<http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/E/F/1/4/1985.ashx>>. Pristupljeno 1. lipnja 2016.

Pristupljeno 1. lipnja 2016.

Aurela, B., Kulmala, H., Soderhjelm, L. (1999) Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar. *Food Addit. Contam.* **16 (12)**, 571–577.

Autian, J. (1982) Antifertility effects and dominant lethal assays for mutagenic effects of DEHP. *Environ. Health Perspect.* **45**, 115-118.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. *Appl. Environ. Microb.* **57**, 2101-2103.

Bertelsen, R. J., Carlsen, K. C., Calafat, A. M., Hoppin, J. A., Haland, G., Mowinckel, P. (2013) Urinary biomarkers for phthalates associated with asthma in Norwegian children. *Environ. Health Perspect.* **121 (2)**, 251–256.

Bigsby, R., Chapin, R. E., Daston, G. P., Davis, B. J., Gorski, J., Gray, L. E., Howdeshell, K. L., Zoeller, R. T., vom Saal, F. S. (1999) Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ. Health Perspect.* **107**, 613-618.

Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bui, T. T., Giovanoulis, G., Cousins, A. P., Magnér, J., Cousins, I. T., de Wit, C. A. (2016) Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Sci. Total. Environ.* **541**, 451–467.

Butterworth, B. E., Bermudez, E., Smith-Oliver T., Earle, L., Cattley, R., Martin, J., Popp, J. A., Strom, S., Jirtle, R., Michalopoulos, G. (1984) Lack of genotoxic activity of di(2ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis.* **5(10)**, 1329-1335.

Caldwell, J. C. (2012) DEHP: Genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms-A review. *Mutat Res.* **751**, 82–157.

- Cao, X. L. (2010) Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9(1)**, 21–43.
- Carlson, K. R. (2010) Toxicity review of di-n octyl phthalate (DnOP). U.S. Consumer Product Safety Commission, MD 20814, Bethesda.
- Cattley, R. C., Conway, J. C., Popp, J. A. (1987) Association of persistent peroxisome proliferation and oxidative injury with hepatocarcinogenicity in female F344 rats fed di-(2-ethylhexyl)phthalate for 2 years. *Cancer Lett.* **38**, 15–22.
- Cattley, R. C., Smith-Oliver, T., Butterworth, B. E., Popp, J. A. (1988) Failure of the peroxisome proliferator WY-14,643 to induce unscheduled DNA synthesis in rat hepatocytes following in vivo treatment. *Carcinogenesis* **9**, 1179-1183.
- Cell Biolabs, Inc. (2016) Intracellular ROS Assay-Assay principle. Cell biolabs, Inc. Creating solutions for Life Science Research. Dostupno online <<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-342-ROS-assay-kit.pdf>.> Pristupljeno 5. lipnja 2016.
- Cho, Y. J. Park, S. B., Han, M. (2015) Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces oxidative stress in human endometrial stromal cells in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* **407**, 9-17.
- Choi, S., Park, S. Y. , Jeong, J., Cho, E., Phark, S., Lee, M., Kwak, D., Lim, J. Y. Jung, W. W., Sul, D. (2010) Identification of toxicological biomarkers of di(2-ethylhexyl) phthalate in proteins secreted by HepG2 cells using proteomic analysis. *Proteomics* **10**, 1831–1846.
- Cirillo, T., Fasano, E., Castaldi, E. (2011) Children's exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate and dibutylphthalate plasticizers from school meals. *J. Agric. Food Chem.* **59(19)**, 10532–10538.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Gunnar Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**, 143-151.

Colón, I., Caro, D., Bourdony, C. J., Rosario, O. (2000) Identification of Phthalate Esters in the Serum of Young Puerto Rican Girls with Premature Breast Development. *Environ. Health Perspect.* **108** (9), 895-900.

Corton, J. C., Lapinskas, P. J. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol. Sci.* **83**, 4-17.

Costa, L. G. (2005) Current protocols in toxicology, John Wiley and Sons, New York.

CPSC (2010) Overview of Phthalates Toxicity. CPSC - United States Consumer Product Safety Commission, MD 20814, Bethesda.

David, R. M., Moore, M. R., Finney, D. C., Guest, D. (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* **55**, 433-443.

David, R. M., Moore, M. R., Cifone, M. A., D. C., Guest, D. (1999) Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol. Sci.* **50** (2), 195-205.

DeKeyser, J. G., Stagliano, M. C., Auerbach, S. S., Prabhu, K. S., Jones, A. D., Omiecinski, C. J. (2009) Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Mol. Pharmacol.* **75**, 1005–1013.

Durgo, K., Vuković, L., Rusak, G., Osmak, M., Franekić Čolić, J. (2009) Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 66-79.

EC (2007) REACH Annex XVII. Restrictions on the manufacture, placing on the market and use of certain dangerous substances, preparations and articles. EC – European Commission, Bruxelles.

EC (2008) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and

mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/ 2006. EC – European Commission, Bruxelles.

EC (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. EC – European Commission, Bruxelles.

EFSA (2005a). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials 242, str. 1–14.

EFSA (2005b) Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to di-isononylphthalate (DINP) for use in food contact materials 244, str. 1–18.

Erkekoğlu, P., Rachidi, W., De Rosa, V., Giray, B., Favier, A., Hincal, F. (2010a) Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 559–566.

Erkekoğlu, P., Rachidi, W., Yüzügüllü, O. G., Giray, B., Favier, A., Öztürk, M., Hincal, F. (2010b) Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharm.* **248**, 52–62

Erkekoğlu, P., Rachidi, W., Yüzügüllü, O. G., Giray, B., Öztürk, M., Favier, A., Hincal, F. (2011) Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells- protection by selenium compounds. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1565–1571.

Fierens, T., Servaes, K., Holderbeke, M. V., Geerts, L., De Henauw, S., Sioen, I., Vanermen, G. (2012) Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 2575-2583.

Foster, P. M., Mylchreest, E., Gaido, K. W., Sar, M. (2001) Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum. Reprod.* **7**, 231-5.

Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., Andersson, A. M. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **51(7)**, 899-911.

Freshney, R. I. (2010) Culture of animalia cells: a manula of basic tehniqe and specialized applications, 4. izd., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Fromme, H., Bolte, G., Koch, H. M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R., Liebl, B. (2007) Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **210**, 21–33.

Gee, P., Sommers, C. H., Melick, A. S., Gidrol, X. M., Todd, M. D., Burris, R. B., Nelson, M. E., Klemm, R. C., Zeiger, E. (1998) Comparison of responses of base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study. *Mutat. Res.* **412**, 115–130.

Gray L., E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D. N., Parks, L. (2000) Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat. *Toxicol. Sci.* **58 (2)**, 350-365.

Grosse, Y., Baan, R., Secretan-Lauby, B., El Ghossassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Talla, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., Straif, K. (2011) WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, Carcinogenicity of chemicals in industrial and consumer products, food contaminants, and flavourings, and water chlorination byproducts. *Lancet Oncol.* **12** 328–329.

GSH (2010) Germ Cell Mutagenicity. GHS - Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals Produced by SCHC-OSHA Alliance GHS Information Sheet Workgroup. 1-3.

Guicciardi, M. E., Leist, M., Gores, G. J. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**, 2881-2890.

Guo, Y., Zhang Z., Liu L., Li Y., Ren, N., Kannan, K. (2012) Occurrence and profiles of phthalates in foodstuffs from China and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem.* **60 (27)**, 6913–6919.

Gupta, R. C., Goel, S. K., Earley, K. (1985) P-postlabeling analysis of peroxisome proliferator-DNA adduct formation in rat liver in vivo and hepatocytes in vitro. *Carcinogenesis* **6(6)**, 933-936.

Guyton, A. C. (1995) Fiziologija čovjeka (Andreis, I., Andreis, A.,ured.) 5. izd., Medicinska naklada, Zagreb.

Hagiwara, A., Tamano, S., Ogiso, T., Asakawa, E. & Fukushima, S. (1990) Promoting effect of the peroxisome proliferator, clofibrate, but not di(2-ethylhexyl)phthalate, on urinary bladder carcinogenesis in F344 rats initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 1232–1238.

HAH (2014) Znanstveno mišljenje o prisutnosti ftalata u hrani. HAH - Hrvatska agencija za hranu, Osijek.

Hauser, R., Calafat, A. M. (2005) Phthalates and human health. *Occup. Environ.Med.* **62(11)**, 806-818.

Higuchi, T. T., Palmer, J. S., Gray, L. E. Jr., Veeramachaneni, N. R. (2003) Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol. Sci.* **72**, 301-313.

Holmström, K. M., Finkel, T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 411- 421.

Howdeshell, K. L., Wilson, V. S., Furr, J., Lambright, C. R., Rider, C. V., Blystone, C. R., Hotchkiss, A. K, Gray, L. E. (2008) A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol. Sci.* **105**, 153–165.

Huang, Y., Li, J., Garcia, J. M., Lin, H., Wang, Y., , Yan, P., Wang, L., Tan, Y. Luo, J., Qiu, Z., Chen, J. Shu, W. (2014) Phthalate Levels in Cord Blood Are Associated with Preterm Delivery and Fetal Growth parameters in Chinese Women. *PloS One.* **9(2)**. e87430. Dostupno online <www.plosone.org> Pristupljeno 21.6.2016.

IARC (2006) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC - International Agency for Research on Cancer. Dostupno online

<<http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>>. Pristupljeno 4. lipnja 2016.

IARC (2011) Di(2-ethylhexyl)phthalate. International Agency for the Research on Cancer. Dostupno online <<http://193.51.164.11/htdocs/Monographs/Vol77/77-01.html>>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

IMI (2010) Znanstveno istraživačka i stručna djelatnost. IMI - Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb. Dostupno online <<https://www.imi.hr/organizacija.php?id=1&unit=4&lan=HR>>. Pristupljeno 27. lipnja 2016.

Jurica, K., Uršulin-Trstenjak, N., Vukić Lušić, D., Lušić, D., Šmit, Z. (2013) Izloženost ftalatima i njihova pojavnost u alkoholnim pićima. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **64**, 317-325.

Kavlock, R., Barr, D., Boekelheide, K., Breslin, W., Breyse, P., Chapin, R., Gaido, K., Hodgson, E., Marcus, M., Shea, K., Williams, P. (2006) NTP-CERHR expert panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod. Toxicol.* **22**, 291–399.

Klaunig, J. E., Babich, M. A., Baetcke, K. P., Cook, J. C., Corton, J. C., David, R. M., DeLuca, J. G., Lai, D. Y., McKee, R. H., Peters, J. M., Roberts, R. A., Fenner-Crisp, P. A. (2003) PPAR α agonist-induced rodent tumors: Modes of action and human relevance. *Crit. Rev. Toxicol.* **33**, 655-780.

Kleinsasser, N. H., Harréus, U. A., Kastenbauer, E. R., Wallner, B. C., Sassen A. W., Staudenmaier, R., Rettenmeier, A. W. (2004) Mono(2-ethylhexyl)phthalate exhibits genotoxic effects in human lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract in the comet assay. *Toxicol. Lett.* **148**, 83–90.

Koch, H. M., Preuss, R., Angerer, J. (2006) Di(2-ethyl-hexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure- an update and latest results, *Int. J. Androl.* **29**, 155–165.

Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J. (2005) New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* **79**, 367–376.

Koch, H. M., Calafat, A. M. (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* **364** (1526), 2063–78.

Kozumbo, W. J., Kroll, R., Rubin, R. J. (1982) Assessment of the mutagenicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* **45**, 103-109.

Lavie, L., Lavie, P. (2009) Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur. Respir. J.* **33**, 1467-1484.

Lenie, S., Smitz, J. (2009) Steroidogenesis-disrupting compounds can be effectively studied for major fertility-related endpoints using in vitro cultured mouse follicles. *Toxicol. Lett.* **185**, 143–152.

León-González, A. J., Auger, C., Schini-Kerth, V. B. (2015) Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **98**, 371–380.

Li, S., Yan, T., Yang, J-Q., Oberley, T. D., Oberley, L. W. (2000) The Role of Cellular Glutathione Peroxidase Redox Regulation in the Suppression of Tumor Cell Growth by Manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Res* **60**, 3927-3939.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000) Mutations: Types and Causes. U: Molecular Cell Biology, 4. izd., W. H. Freeman, New York. Dostupno online <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21578/>>. Pristupljeno 15. svibnja 2016.

Lu, M., Gong, X. (2009) Upstream reactive oxidative species (ROS) signals in exogenous oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction. *Cell Biol. Int.* **33**, 658–664.

Lutz, W. K. (1986) Investigation of the potential for binding of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) to rat liver DNA in vivo. *Environ. Health. Perspect.* **65**, 267-269.

Mahood, I. K., Scott, H. M., Brown, R., Hallmark, N., Walker, M., Sharpe, R. M. (2007) In utero exposure to di(nbutyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ. Health Perspect.* **115** (1), 55-61.

- Mari, M., Cederbaum, A. I. (2001) Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology* **33** (3), 652–661.
- Marie, C., Vendittelli, F., Sauvant-Rochat, M-P. (2015) Obstetrical outcomes and biomarkers to assess exposure to phthalates: A review. *Environ. Int.* **83**, 116–136.
- Marsee, K., Woodruff, T. J., Axelrad, D. A., Calafat, A. M., Swan, S. H. (2006) Estimated Daily Phthalate Exposures in a Population of Mothers of Male Infants Exhibiting Reduced Anogenital Distance. *Environ. Health Perspect.* **114**, 805–809.
- Marx, J. (1990) Animal carcinogen testing challenged. *Science* **250**, 743-745.
- Matés, J. M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**, 83-104.
- Matés, J. M., Perez-Gomez, C., De Castro, I. N. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**, 595–603.
- Matsushima, T., Muramatsu, M., Haresaku, M. (1985) Mutation tests on *Salmonella typhimurium* by the preincubation method. *Prog. Mutat. Res.* **5**, 181–186.
- McCall M. R., Frei B. (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med.* **26**, 1034–53.
- Meek, M. E., Chan, P. K. L. (1994) Bis(2-ethylhexyl)phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **12**, 179–194.
- Meeker, J. D. (2012) Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **166** (10), 952–958.

Miles-Richardson, S., Stephen Bosch, M. S., Swarts, S., Lladós, F., Gray, A. (Syracuse Research Corporation, Syracuse, NY) (2002) TOXICOLOGICAL PROFILE FOR DI (2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE. U.S. Department of Health and Human Services, Washington D.C.

Miura, Y., Naito, M., Ablake, M., Terayama, H., Yi, S. Q., Qu, N., Cheng, L. X., Suna, S., Jitsunari, F., Itoh, M. (2007) Short-term effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testes, liver, kidneys and pancreas in mice. *Asian J. Androl.* **9**, 199–204.

Moore, R. W., Rudy, T. A., Lin, T.-M., Ko, K., Peterson, R. E. (2001) Abnormalities of Sexual Development in Male Rats with in Utero and Lactational Exposure to the Antiandrogenic Plasticizer Di(2-ethylhexyl) Phthalate. *Environ. Health Perspect.* **109** (3), 229-237.

Morimura, K., Cheung, C., Ward, J. M., Reddy, J. K., Gonzalez, F. J. (2006) Differential susceptibility of mice humanized for peroxisome proliferator-activated receptor α to Wy-14,643-induced liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* **27**, 1074-1080.

Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29–60.

NN 41/14 (2014) Zakon o materijalima i predmetima koji dolaze u neposredan dodir s hranom. Narodne novine 41/14.

Nohmi, T., Miyata, R., Yoshikawa, K. & Ishidate Jr, M. (1985) Mutagenicity tests on organic contaminants in city water and related compounds. I. Bacterial mutagenicity tests. *Eisei Shikenjo Hokoku* **103**, 60–64.

NTP (1997) Benzyl Butyl Phthalate Feed Studies. NTP - National Toxicology Program, U.S.

Ohno, S., Yukinawa, F., Noda, M., Nakajin, S. (2009) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces NR4A subfamily and GIOT-1 gene expression, and suppresses CYP19 expression in human granulosa-like tumor cell line KGN. *Toxicol. Lett.* **191**, 353–359.

- Okai, Y., Okai, K. J. (2000) Enhancing effect of plastic plasticizer, di-2-ethylhexyl phthalate on umu C Gene Expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002). *J. UOEH.* **22**, 305–315.
- Park, S. Y., Choi, J. (2007) Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ. Int.* **33**, 817–822.
- Peraza, M. A., Burdick, A. D., Marin, H. E., Gonzalez, F. J., Peters, J. M. (2006) The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicol. Sci.* **90**, 269-295.
- Pereira, M. A. (1996) Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **31**, 192–199.
- Peters, R. J. B. (2003) Hazardous chemicals in consumer products. TNO Netherlands, Organisation for Applied Scientific Research, Apeldoorn.
- Phillips, B. J., James, T. E., Gangolli, S. D. (1982) Genotoxicity studies of di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolites in CHO cells. *Mutat. Res.* **102**, 297-304.
- Putman, D. L., Moore, W. A., Schechtman, L. M., Hodgson, J. R. (1983) Cytogenetic evaluation of di-(2ethylhexyl)phthalate and its major metabolites in Fischer 344 rats. *Environ. Mutagen.* **5**, 227-231.
- Rapetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat protoc.* **3**, 1125-1131.
- Rexroat, M. A., Probst, G. S. (1985) Mutation tests with *Salmonella* using the plateincorporation assay. *Prog. Mutat. Res.* **5**, 201–212.
- Robertson, I. G. C., Sivarajah, K., Eling, T. E., Zeiger, E. (1983) Activation of some aromatic amines to mutagenic products by prostaglandin endoperoxide synthetase. *Cancer Res.* **43**, 476–48.
- Rushbrook, C. J., Jorgenson, T. A., Hodgson, J. R. (1982) Dominant lethal study of di(2-ethylhexyl)phthalate and its major metabolites in ICR/SIM mice. *Environ Mutagen* **4**, 387.

Ružička, I. (2001) Slobodni radikali i antioksidansi. Zdrava hrana za zdravi život. *Narodni zdravstveni list* **502(203)**, 7-8.

Sakhi, A. K., Lillegaard, I. T. L., Voorspoels, S., Carlsend, M. H., Løken, E. B., Brantsæter, A. L., Haugen, M., Meltzer, H. M., Thomsen, C. (2014) Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environ. Int.* **73**, 259–269.

Sampson, J., de Korte, D. (2011) DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus. Med.* **21 (2)**, 73–83.

Sathyanarayana, S., Karr, C. J., Lozano, P., Brown, E., Calafat, A. M., Liu, F., Swan, S., H. (2008) Baby Care Products: Possible Sources of Infant Phthalate Exposure. *Pediatrics* **121**, 260-268.

Sato, T., Nagase, H., Sato, K., Niikawa, M., Kito, H. (1994) Enhancement of the mutagenicity of amino acid pyrolysates by phthalate esters. *Environ. Mol. Mutagen.* **24**, 325-331.

Schulz, C. O., Rubin, R. J., Hutchins, G. M. (1975) Acute lung toxicity and sudden death in rats following the intravenous administration of the plasticizer, di(2-ethylhexyl)-phthalate, solubilized with tween surfactants. *Toxicol. Appl. Pharm.* **33**, 514-525.

Seed, J. L. (1982) Mutagenic activity of phthalate esters in bacterial liquid suspension assays. *Environ. Health Perspect.* **45**, 111-114.

Seo, K. W., Kim, K. B., Kim, Y. J., Choi, J. Y. (2004) Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 107–114.

Sies, H. (1985) Oxidative stress: Introductory remarks. U: Oxidative stress. (Sies, H., ed.) Academic Press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, str. 1-7.

Silva, M. J., Samandar, E., Preau, J. L., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2006) Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology* **219**, 22– 32.

Silveira, R. L., Pereira-Da-Silva, L., Juel, C., Hellsten, Y. (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free. Radic. Biol. Med.* **35**, 455-464.

Smith-Oliver, T., Butterworth, B. E. (1987) Correlation of the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) with induced hyperplasia rather than with genotoxic activity. *Mutat. Res.* **188**, 21-28.

Svechnikova, I., Svechnikov, K., Söder, O. (2007) The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J. Endocrinol.* **194**, 603–609.

Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y. (1990) Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 213-215.

Takashima, K., Ito, Y., Gonzalesz, F. J., Nakajima, T. (2008) Different Mechanisms of DEHP-induced Hepatocellular Adenoma Tumorigenesis in Wild-type and Ppar α -null mice. *J. Occup. Health.* **50(2)**, 169-80

Takeshita, A., Inagaki, K., Igarashi-Migitaka, J., Ozawa, Y., Koibuchi, N. (2006) The endocrine disruption chemical, diethylhexyl phthalate, activate MDR1 gene expression in human colon cancer LS174 T cells. *J. Endocrinol.* **190**, 897–902.

Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T., Suga, T. (1991) Lack of induction of hepatic DNA damage on long-term administration of peroxisome proliferators in male F-344 rats. *Toxicology* **69**, 55-62.

Tennant, R. W., Margolin, B. H, Shelby, M. D, Zeiger, E., Haseman, J. K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B. (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science.* **236**, 933-941.

Timbrell, J. (2000) Principles of Biochemical toxicology. Taylor and Francis Group, London i New York.

Tomita, I., Nakamura, Y., Aoki, N., Inui, N. (1982) Mutagenic/carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate. *Environ. Health Perspect.* **45**, 119-125.

Uredba Komisije (EU): br. 10/2011 od 14. siječnja 2011. o plastičnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom. Official Journal of the European Union L12/1, 2011.

Venitt, S, J.M. Parry (1984) Mutagenicity testing. (Rickwood, D., B., Hames, D., ured.), IRL Press, Oxford, Washington.

Vidić-Štrac, I. (2008) Nazočnost estera ftalne kiseline (ftalati) u infuzijskim otopinama. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J. K., Slowikowska-Hilczer, J. (2013) The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent. European J. Urol.* **66**, 60-67.

Wang, H., Joseph, J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radical Bio. Med* **27**, 612-616.

Wang, Y.-X., Zeng, Q., Sun, Y., You, L., Wang, P., Li, M., Yang, P., Li, J., Huang, Z., Wang, C., Li, S., Dan, Y., Li, Y.-F., Lu, W.-Q. (2015) Phthalate exposure in association with serum hormone levels, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis: A cross-sectional study in China. *Environ. Sci. Technol.* **49** (6), 3805–3812.

Ward, J. M., Peters, J. M., Perella, C. M., Gonzalez, F. J. (1998) Receptor and Nonreceptor-Mediated Organ-Specific Toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Null Mice. *Toxicol. Pathol.* **26** (2), 240-246.

Wilkes, C. E., Summers, J. W., Daniels, C. A. (2005) PVC Handbook. (Wilkes, C. E., Summers, J. W., Daniels, C. A, ured.), Hanser publishers, Munich.

Wittassek, M., Koch, H. M., Angerer, J., Bruning, T. (2011) Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* **55** (1), 7–31.

Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., Hungerbühler, K. (2006) What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal.* **26** (3), 803–824.

Yang, G., Zhong, L. F., Jiang, L. P., Geng, C. Y., Cao, J., Sun, X. C., Ma, Y. F. (2010) Genotoxic effect of 6-gingerol on human hepatoma G2 cells. *Chem. Biol. Interact.* **185**, 12–17.

Yokoyama, Y., Okubo, T., Kano, I., Sato, S., Kano, K. (2003) Induction of apoptosis by mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) in U937 cells. *Toxicol. Lett.* **144**, 371–381.