

Usporedba citotoksičnih učinaka PCB-153 određenih različitim in vitro metodama

Zubić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:496113>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017

Jelena Zubić

731/N

**USPOREDBA CITOTOKSIČNIH
UČINAKA PCB-153 ODREĐENIH
RAZLIČITIM *IN VITRO*
METODAMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Kmetič te uz pomoć dr. sc. Teute Murati i Marine Miletić, mag. ing..

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc Ivani Kmetič te asistenticama dr. sc. Teuti Murati i mag. ing. Marini Miletić na stručnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima Stjepanu i Đurđi te sestrama Marini, Kristini, i Valentini na pružanju podrške, ljubavi i usmjeravanju u kriznim trenucima.

Posebno hvala mojim prijateljima i Carlu što su bili uz mene cijelo ovo vrijeme.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

USPOREDBA CITOTOKSIČNIH UČINAKA PCB-153 ODREĐENIH RAZLIČITIM *IN VITRO* METODAMA

Jelena Zubić, 731/N

Sažetak: U ovom radu ispitan je učinak neplanarnog PCB-153 (10-100 μM) na proliferaciju CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-K1 stanica metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue* nakon 6 i 48 h tretmana. Metodom protočne citometrije određen je postotak živih i mrtvih stanica, kao i postotak stanica u apoptozi. Nakon 6 h tretmana značajan inhibicijski učinak CHO-K1 stanica određen je kod tri provedene metode pri koncentracijama PCB-153 od 75 i 100 μM , izuzev kod metode *Kenacid Blue*. Nakon 48 h PCB-153 je značajno inhibirao staničnu proliferaciju pri najvišim koncentracijama (75 i 100 μM) kod sve četiri provedene metode. Metodom protočne citometrije utvrđeno je da se proporcionalno koncentraciji PCB-153 povećava broj stanica u apoptozi nakon 6 h tretmana (12,18 % - 28,15 %), a nakon 48 h broj mrtvih stanica (5,75 % - 33,43 %).

Ključne riječi: PCB-153, CHO-K1 stanična linija, citotoksičnost, protočna citometrija

Rad sadrži: 58 stranica, 17 slika, 4 tablice, 55 literaturnih navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Pomoć pri izradi: dr. sc. Teuta Murati, asistent

Marina Miletić, mag. ing., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević
2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
3. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac
4. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Datum obrane: 20. srpanj 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

COMPARISON OF PCB-153 CYTOTOXIC EFFECTS DETERMINED BY DIFFERENT *IN VITRO* METHODS

Jelena Zubić, 731/N

Abstract: The aim of this study was to examine the cytotoxic effects of the *non-planar* PCB-153 (10-100 μ M) by monitoring CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-K1 cell proliferation using *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* and *Trypan Blue* methods after 6 and 48 hours of treatment. Flow cytometry was used to distinguish live, dead and apoptotic cells. Statistically significant inhibition was determined with 75 and 100 μ M PCB after 6 hours with three methods used, except *Kenacid Blue*. Also, statistically significant decrease of cell proliferation was detected with the highest PCB-153 concentrations (75 and 100 μ M) after 48 hours with all four applied methods. The flow cytometry analysis revealed that increase in PCB-153 concentration proportionally increased the number of apoptotic cells after 6 hours (12,18 % - 28,15 %) and number of dead cells (5,75 % - 33,43 %) after 48 hours of treatment.

Keywords: PCB-153, CHO-K1 cell line, cytotoxicity, flow cytometry

Thesis contains: 58 pages, 17 figures, 4 tables, 55 references, 3 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor

Technical support and assistance: PhD. Teuta Murati, Scientific Assistant

Marina Miletić, MSc., Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD Irena Landeka Jurčević
2. PhD Irena Kmetič
3. PhD Igor Slivac
4. PhD Ksenija Marković

Thesis defended: 20 July 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. POLIKLORIRANI BIFENILI	2
2.1.1. Klasifikacija PCB-a	3
2.1.2. Izloženost PCB-ima	4
2.1.3. Metabolizam PCB-a	6
2.2. TOKSIČNI UČINCI PCB-A I MEHANIZAM DJELOVANJA	7
2.2.1. Djelovanje PCB-a na endokrini sustav	8
2.2.1.1. PCB i pretilost	8
2.2.1.2. PCB i endometriozu	8
2.2.1.3. PCB i miomi	9
2.2.1.4. PCB i bolest štitne žlijezde	9
2.2.2. Djelovanje PCB-a na reprodukcijski sustav	9
2.2.2.1. PCB i pokretljivost spermija	9
2.2.2.2. PCB i rak prostate	10
2.2.2.3. PCB i rak dojke	10
2.2.2.4. PCB i trudnoća	11
2.2.3. Neurotoksičnost PCB-a	11
2.2.3.1. PCB i anksioznost i depresija	11
2.3. TOKSIČNOST PCB-153	12
2.3.1. PCB-153 i endokrini sustav	12
2.3.2. PCB-153, trudnoća i niska porođajna težina	13
2.3.3. PCB-153 i mozak	13
2.3.4. PCB-153 i rak prostate	13
2.3.5. PCB-153 i pokretljivost spermija	14
2.4. TESTOVI TOKSIČNOSTI	14
2.4.1. <i>In vitro</i> testovi toksičnosti	14
2.4.2. Stanične linije	15
2.4.2.1. CHO-K1 stanična linija	15
2.5. APOPTOZA I NEKROZA	16
2.5.1. Protočna citometrija	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJAL	19
3.1.1. Biološki materijal	19
3.1.2. Kemikalije	19
3.1.3. Otopine i puferi	20
3.1.4. Oprema i uređaji	24
3.2. METODE RADA	25
3.2.1. Uzgoj i održavanje CHO-K1 stanica u kulturi	25
3.2.2. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji	25
3.2.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom Trypan Blue	25
3.2.2.2. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom Neutral Red	26
3.2.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom Kenacid Blue	27
3.2.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom MTT	27
3.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom protočne citometrije	27
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30

4.1. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM NEUTRAL RED	30
4.1.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom <i>Neutral Red</i>	31
4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM KENACID BLUE	34
4.2.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom <i>Kenacid Blue</i>	35
4.3. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM MTT	37
4.3.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom <i>MTT</i>	38
4.4. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM TRYPAN BLUE	40
4.4.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom <i>Trypan Blue</i>	41
4.5. UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI PRAĆEN METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE	44
4.6. USPOREDBA CITOTOKSIČNIH UČINAKA PCB-153 ODREĐENIH RAZLIČITIM METODAMA	49
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURA	53
7. PRILOZI	

1. UVOD

Poliklorirani bifenili (PCB) su aromatski, sintetski proizvedeni spojevi koji su se od 1929. godine do zabrane njihove proizvodnje 1979. godine koristili u industriji zbog svojih dobrih dielektričnih i termoizolacijskih svojstava, otpornosti na oksidaciju te djelovanje kiselina i bazičnih kemikalija. Postoji 209 mogućih PCB kongenera, a proizvodili su se izlaganjem bifenila kloridnom plinu. Danas svi ljudi i živi organizmi imaju mjerljive količine PCB-a jer su ti spojevi slabo razgradivi u okolišu i raširili su se na udaljena mjesta od početne kontaminacije. Osim što se teško metaboliziraju i izlučuju iz organizma, PCB se zbog svoje lipofilnosti akumuliraju u masnom tkivu ljudi i životinja (Annamalai i Namasivayam, 2015). Nepravilnim odlaganjem otpada, isparavanjem iz materijala te oslobađanjem tijekom procesa sagorijevanja PCB se bioakumuliraju u prehrambenom lancu (Toft i sur., 2004).

Poliklorirani bifenili pokazuju toksični učinak na reproduktivni, imunosni, neurološki i naročito endokrini sustav (Gore i sur., 2015). Također, nekoliko je istraživanja utvrdilo povećan rizik od nekih tipova raka (rak jetre, mjerhura i urinarnog trakta, melanom) kod radnika izloženih PCB kongenerima dugi niz godina. Karcinogeni učinak potvrđen je i kod istraživanja na životinjama. Istraživanja na životinjama, kao i neka istraživanja na ljudima, pokazuju da je na PCB-e najosjetljiviji organizam koji je još u razvoju *in utero* (Safe, 1994). S obzirom na strukturu PCB se dijele na planarne i neplanarne. Predstavnici obje skupine kongenera su mjerljivi u tkivima ljudi, međutim neplanarni PCB su, zbog svoje slabije razgradivosti i veće podložnosti akumulaciji u masnom tkivu, prisutni u puno većim količinama od planarnih. PCB-153 je jedan od dva dominantno prisutna neplanarna PCB-a u ljudi. Zbog toga PCB-153, iako nije jedan od najtoksičnijih PCB kongenera, predstavlja opasnost za zdravlje ljudi (Dutta i sur., 2012).

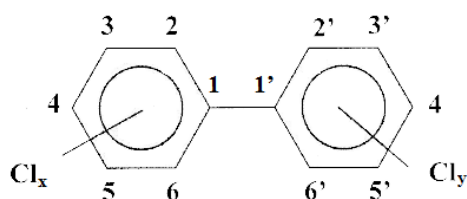
Toksično djelovanje pojedinih ksenobiotika ispituje se *in vivo* i *in vitro* testovima toksičnosti. *In vitro* testovi imaju sve značajniju ulogu jer se njihovim korištenjem smanjuje broj testiranja na životinjama, jeftiniji su i olakšava se definiranje djelovanja ispitivanog spoja na staničnoj razini (Tice i sur., 2000).

Cilj ovog rada je ispitati učinak PCB-153 na vijabilnost i proliferaciju stanica ovarija kineskog hrčka (CHO-K1) i pri tome usporediti različite *in vitro* metode - *Trypan Blue*, *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *MTT* te utvrditi tip stanične smrti upotrebom protočne citometrije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIKLORIRANI BIFENILI

Poliklorirani bifenili (PCB) su sintetski proizvedeni spojevi koji su se prije nekoliko desetljeća koristili u industriji. To su aromatski spojevi koji se sastoje od dva međusobno povezana benzenska prstena te su im neki ili svi vodikovi atomi zamijenjeni klorovim atomima (Annamalai i Namasivayam, 2015). Proizvedeni su izlaganjem bifenila kloridnom plinu, uz prisutnost katalizatora, pri čemu je nastala mješavina 209 mogućih kongenera. Osnovna strukturna formula PCB-a je prikazana na Slici 1.



Slika 1. Osnovna molekularna struktura PCB-a (Bonfeld-Jørgensen i sur., 2001)

Poliklorirani bifenili su korišteni kao plastifikatori u gumama i smolama, u proizvodnji ljepila i papira za kopiranje koji ne sadrži ugljik te boja i tinta (Gore i sur., 2015). Izgled im varira od bijelih kristala i čvrstih smola do tekućih ulja. Zbog svojih termoizolacijskih svojstava, otpornosti na oksidaciju, djelovanje kiselina i bazičnih kemikalija, kao i odličnih dielektričnih svojstava koristili su se od 1929. godine kao izolacijske tekućine u transformatorima i kondenzatorima te materijalima koji se koriste u izgradnji (silikon i drugi adhezivi, boje, pločice) (Annamalai i Namasivayam, 2015). Iako je njihova upotreba i proizvodnja zabranjena 1979. godine, zadnja tvornica smještena u Rusiji u kojoj su se PCB proizvodili ugašena je tek 1994. godine. Materijali koji su korišteni u zgradama obično sadrže preko 1% PCB-a i izvor su izloženosti. Također nepravilnim odlaganjem otpada u kojem se PCB nalaze, dospjeli su u zemlju, vodu i zrak te se bioakumuliraju u prehrambenom lancu (Gillette i sur., 2017). Kako su PCB slabo razgradivi u okolišu i većina je slabo topljiva u vodi, raširili su se na udaljena mjesta od početne kontaminacije. Većina njih je topljiva u mastima, teško se metaboliziraju i izlučuju iz organizma te se akumuliraju u masnom tkivu (Annamalai i Namasivayam, 2015). Iz tog

razloga se PCB ubrajaju u perzistentne organske zagađivače (eng. *Persistent organic pollutants*, POPs), visoko lipofilne spojeve koji se bioakumuliraju u prehrambenom lancu jer se skladište u masnom tkivu ljudi i životinja. Tim obrambenim mehanizmom se organizam štiti od prevelike količine štetnih tvari u krvi i tkivima (Gore i sur., 2015). Najveće mjerljive koncentracije PCB-a u tkivima pronađene su kod životinja na vrhu hranidbenog lanca i kod ljudi jer su dugog životnog vijeka, a njihova se koncentracija povećava s godinama. Shodno tome ne postoji potpuno referentna grupa ljudi koja nije izložena PCB-ima (Toft i sur., 2004).

2.1.1. Klasifikacija PCB-a

Najpoznatiji sustav numeriranja polikloriranih bifenila predložili su Ballschmiter i Zell krećući od mono- do dekaklorobifenila. Nomenklatura kemijskih spojeva prati pravila prihvaćena od strane Međunarodne unije za čistu i primjenjenu kemiju (eng. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), izuzev nekih slučajeva gdje nisu primjenjiva IUPAC pravila prema Ballschmiteru i Zellu (Mills i sur., 2007).

Poliklorirani bifenili se zbog svoje razlike u strukturi dijele na planarne ili „dioksinu slične“ i neplanarne. Većina istraživanja provedenih na molekularnoj i staničnoj razini fokusirala se na planarne PCB-e koji imaju jedan ili nijedan atom vodika supstituiran atomom klora u *ortho* položaju, tj. kongenere koji se nazivaju i „dioksinima sličnim“ zbog toga što su strukturom slični dioksinu te zbog toga što poput dioksina induciraju ekspresiju gena putem transkripcijskog faktora (Ah-receptora) za čije vezno mjesto konkuriraju s drugim ligandima (Dutta i sur., 2012). S obzirom na toksičnost, akumulaciju u masnom tkivu, razgradivost u okolišu i mehanizam vezanja na Ah-receptor (eng. *Aryl hydrocarbon receptor*, Ahr) 12 PCB kongenera klasificira se kao „dioksinu slični“ – 4 *non-ortho* (PCB-77, 81, 126, 169) i 8 *mono-ortho* (PCB-105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189). Vjeruje se da aktivirani Ahr, prema kojem *non-ortho* i *mono-ortho* planarni PCB kongeneri imaju afinitet za vezanje, potiče imunotoksičnost, toksičnost na reproduktivni, živčani i endokrini sustav, bolesti kože i jetre te karcinogenezu (Bonefeld-Jørgensen i sur., 2001; Dutta i sur., 2012). Toksičnost PCB-a ovisi o broju i položaju atoma klora na bifenilnom prstenu. Poznato je i da su PCB, koji imaju atome klora u *ortho* položaju na oba prstena, manje toksični od *non-ortho* i *mono-ortho* PCB-a (Bruner-Tran i Osteen, 2010). Neplanarni PCB imaju atome vodika supstituirane atomom klora u *ortho* položaju i zbog toga imaju smanjeni afinitet prema Ah-receptoru u odnosu na planarne PCB-e te vjerojatno djeluju kao inhibitori reakcija posredovanih putem Ah-receptora. Pretpostavlja se da se neplanarni PCB ponašaju kao ligandi i natječu se za

vezna mjesta na nuklearnim receptorima koji imaju ulogu u transkripciji. Metaboliti PCB-a su slabi antagonisti estrogenih receptora, kao i inhibitori estrogen sulfotransferaze. Prema tome neplanarni PCB ispoljavaju toksični učinak na endokrini i reproduktivni sustav (Al-Salman i Plant, 2012).

2.1.2. Izloženost PCB-ima

Iako se više ne proizvode, PCB još uvijek zagađuju okoliš korištenjem i nepravilnim odlaganjem materijala koji ih sadrže, isparavanjem iz materijala te oslobađanjem tokom procesa sagorijevanja (Toft i sur., 2004). Zbog velike uporabe u industriji i distribucije tih proizvoda po svijetu, PCB su rašireni posvuda u zraku, tlu i vodi kao i u živim organizmima. Zapanjujuće je da u nekim jako zagađenim djelovima okoliša koncentracija PCB-a doseže približno 2000 ng g⁻¹. PCB-a ima u ljudskom mlijeku, a kod populacije u Italiji koja nije bila izložena PCB-ima na radnom mjestu razina 6 neplanarnih PCB-a izmjerena u serumu iznosila je 240-300 ng g⁻¹ (Zhang i sur., 2014). Također kolika se je količina PCB-a tokom godina života akumulirala u čovjekovom tijelu ovisi o unosu masti u prehrani kao i koliko su iste zagađene PCB-ima (Dutta i sur., 2012). Tako je ljudska populacija najčešće izložena PCB-ima putem hrane (meso, mliječni proizvodi, masna riba), no moguća je i izloženost putem kože kao i udisanjem zagađenog zraka i prašine. Kako su PCB u 1960-ima i 1970-ima bili korišteni kao sastavni dio građevnih materijala, visoke razine pronađene su u javnim zgradama i predstavljaju opasnost zagađenja okolnog tla i zraka (Meeker i Hauser, 2010). Koncentracija PCB-a izmjerenih 2002. godine u SAD-u u prostorima obrazovnih ustanova iznosila je 111-393 ng m⁻³ u zraku te od <1 do 81 ppm u prašini unutar ventilacijskih sustava. Time je razina PCB-a prešla dozvoljeni limit od 50 ppm (koliko je dozvoljeno u SAD-u) (Herrick i sur., 2004). Od brtvenih sustava, ploča za izoliranje i silikona upravo silikoni predstavljaju najveći izvor kontaminacije s izmjerenih 33 000 ppm. U 13 od 24 javnih zgrada u koje su ubrojene i škole potvrđene su mjerljive količine PCB-a u SAD-u 2004. godine, iako je Agencija za zaštitu okoliša (eng. *United States Environmental Protection Agency*, EPA) 1998. godine naredila da se materijali koji sadrže PCB-e u javnim zgradama izgrađenim u razdoblju 1960-ih i 1970-ih moraju sanirati (Herrick i sur., 2004).

Rezultati ispitivanja kronične i akutne izloženosti PCB-ima veoma se razlikuju u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima na životinjama. Problem je što je mjerenje stvarnih količina tih spojeva u ljudima i životinjama mjerenjem iz seruma i urina nepouzđano zbog zadržavanja POPs-a u masnom tkivu. Pouzdaniji način mjerenja PCB-a je određivanje ekvivalenata

toksičnosti (eng. *toxic equivalentt*, TEQ) kojim se određuje količina ukupnih PCB-a te količine PCB-a i drugih organokloriranih spojeva u organizmu (Meeker i Hauser, 2010). Korištenje TEQ se bazira na pretpostavci da poloklorirani dibenzodioxini (eng. *polychlorinated dibenzodioxins*, PCDD)/ poliklorirani dibezofurani (eng. *polychlorinated dibenzofurans*, PCDF) i planarni PCB kongeneri dijele zajednički mehanizam djelovanja u stanici, iako s različitim potencijalima. Te razlike u toksičnosti izražene su preko faktora ekvivalenata toksičnosti (eng. *toxic equivalency factors*, TEF), koji su određeni za svaki kongener u odnosu na najtoksičniji kongener 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*para*-dioksin) kome je dodijeljen TEF 1. Sumom analitički određenih količina svakog kongenera koje su pomnožene s njemu odgovarajućim TEF dobiva se ukupni TEQ kako je prikazano sljedećom formulom (La Rocca i Mantovani, 2006):

$$\text{TEQ} = (\text{PCDD}_i \times \text{TEF}_i) + (\text{PCDF}_i \times \text{TEF}_i) + (\text{PCB}_i \times \text{TEF}_i)$$

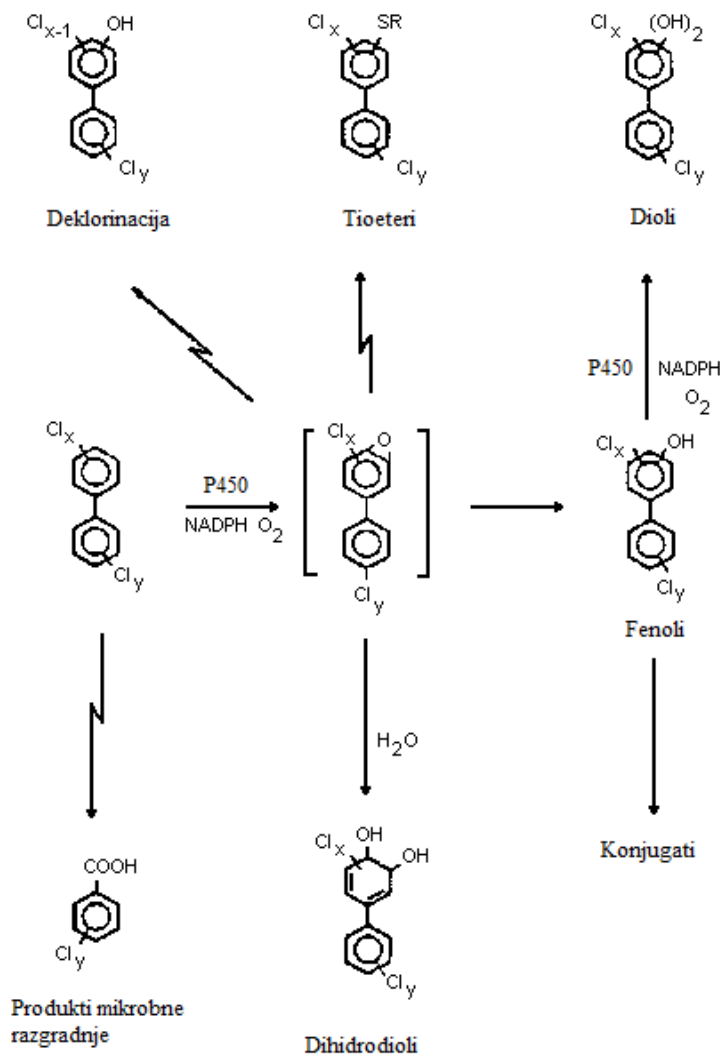
I-TEQ (eng. *International toxic equivalent*) prvotno je osmislio NATO 1989. godine, a kasnije je nadopunjen i proširen. Sustav WHO-TEQ predložila je Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World health organization*, WHO) nešto kasnije. U prosjeku su vrijednosti I-TEQ više za 10% u odnosu na WHO-TEQ. Iako se I-TEQ i WHO-TEQ, izračunati u različitim istraživanjima mogu uspoređivati, problem je što su različiti autori pretpostavili da su koncentracije PCDD/PCDF-a i PCB-a koje se nisu mogle odrediti jednake graničnim koncentracijama detekcije ili jednake nuli ili jednake polovici graničnih koncentracija detekcije (Domingo i Bocio, 2007).

U jednom istraživanju u Kini određene su koncentracije planarnih PCB kongenera u različitim vrstama namirnica (Prilog 1). Podaci su izraženi na masu masnog tkiva (eng. *lipid weight*, lw) ispitivane životinje ili na svježu masu (eng. *wet weight*, ww). Najniže koncentracije izmjerene su u povrću (0,0004 pg WHO-TEQ g⁻¹; 1,21 ng g⁻¹ ww) i žitaricama (0,002 pg WHO-TEQ g⁻¹; 3,85 ng g⁻¹ ww). Nasuprot tome najviše koncentracije pronađene su u ribi (5,38 pg WHO-TEQ g⁻¹; 4158,1 ng g⁻¹ lw) i jajima (1,14 pg WHO-TEQ g⁻¹; 1960,0 ng g⁻¹ lw) (Zhang i sur., 2008). U Prilogu 2 prikazana je koncentracija PCB-a izmjerenih u ribi i plodovima mora. Najviša koncentracija određena je u lososu (15.6 pg WHO-TEQ g⁻¹ ww) iz Baltičkog mora i srdeli iz područja Katalonije (2,45 pg WHO-TEQ g⁻¹ ww). Najniže koncentracije zabilježene su u Koreji gdje je u istraživanje bilo uključeno 40 različitih morskih vrsta (0,008-0.6 pg WHO-TEQ g⁻¹ ww) ((La Rocca i Mantovani, 2006).

Ukupan dnevni unos planarnih PCB-a za populaciju u gradu Schenzen u Kini iznosio je 81,8 pg WHO-TEQ na dan (Prilog 3). Međutim kada se ti podaci preračunaju na kg tjelesne mase ispada da je ukupni tjedni unos planarnih PCB kongenera 9,54 pg WHO-TEQ kg⁻¹ tjelesne mase na tjedan te 40,9 pg WHO-TEQ kg⁻¹ tjelesne mase na mjesec (Zhang i sur., 2008). Znanstveni odbor za prehrambene proizvode (eng. *Scientific Committee on food*) procijenio je da prosječni dnevni unos planarnih PCB-a, PCDD-a i PCDF-a zajedno iznosi od 1,2 do 3,0 pg WHO-TEQ kg⁻¹ tjelesne mase na dan u Europi, a taj isti odbor je 2001. godine odredio da je za te spojeve prihvatljiv tjedni unos od 14 pg WHO-TEQ kg⁻¹ tjelesne mase što je pet puta više od trenutnog unosa u Europi. S druge strane EFSA (eng. *European food safety authority*) je procijenila da dnevni unos neplanarnih PCB kongenera iznosi 15 ng kg⁻¹ tjelesne mase na dan za „prosječne” potrošače, 20 ng kg⁻¹ tjelesne mase na dan za potrošače koji imaju visoki unos mesa i mesnih prerađevina te 35 ng kg⁻¹ tjelesne mase na dan za potrošače koji imaju visoki unos ribe i ribljih proizvoda, iako nije utvrđena maksimalno dozvoljena količina neplanarnih PCB kongenera u hrani (La Rocca i Mantovani, 2006).

2.1.3. Metabolizam PCB-a

Vremenski period poluživota PCB-a u ljudskom organizmu različit je za svaki kongener i prosječno iznosi 10 – 15 godina. Što je veći broj atoma klora na bifenilnom prstenu to su kongeneri PCB-a otporniji i zadržavaju se i do nekoliko godina, dok su oni s manjim brojem klorovih atoma topljivi u vodi te se lakše i brže metaboliziraju (Annamalai i Namasivayam, 2015). Primarno mjesto biotransformacije PCB-a je jetra u kojoj dolazi do hidroksilacije i konjugacije s glukuronskom kiselinom i sulfatima (Slika 3). Početni korak u eliminaciji PCB-a predstavlja jetreni citokrom P450 monooksigenazni sustav. PCB se najprije u prvoj fazi biotransformacije metaboliziraju u polarnije spojeve da bi se isti mogli lakše izlučiti iz organizma. Međutim neki se PCB zadržavaju u organizmu i moraju proći kroz drugu fazu biotransformacije. Oksidacija PCB-a može ići preko PCB-epoksida ili direktnim umetanjem kisika u C_{Ar}-H vezu. PCB-epoksid može reagirati i s glutationom i prevoditi se dalje u metilsulfonil derivate, koji se akumuliraju u masnom tkivu. Iako se hidroksilirani metaboliti lako izlučuju, nakon reakcija konjugacija s glukuronskom kiselinom i sulfatima, neki od njih su pronađeni u krvi i jetri kod ljudi i životinja. Metilsulfonil derivati i hidroksilirani PCB se mogu akumulirati u tkivu pluća i fetusu, a metaboliti svih PCB kongenera se eliminiraju primarno putem žuči i fecesa (SPH, 2003).



Slika 3. Metabolizam PCB-a (Safe, 1984)

2.2. TOKSIČNI UČINCI PCB-a I MEHANIZAM DJELOVANJA

Prema dosadašnjim istraživanjima ljudi su bili izloženi PCB-ima na tri različita načina: radnici koji su radili u tvornicama u kojima su se PCB koristili u proizvodnji različitih materijala, slučajna izloženost ljudi konataminacijom hrane industrijskim uljima te izloženost ljudi u okolišu putem vode, zraka i hrane. Neki od toksičnih učinaka koje su PCB kongeneri imali na ljudsko zdravlje, izloženošću istima na radnom mjestu, su: akne i kožne lezije, različiti toksični učinci na jetru, smanjena porođajna težina novorođenčadi, smanjena funkcija pluća, očne iritacije, a povećan je i rizik od nekih tipova raka. Toksični učinci PCB-a na žrtvama izloženosti slučajnim kontaminacijma PCB kongenerima u jestivom ulju u Japanu i Tajvanu, bili su: akne, tamnosmeđa pigmentacija noktiju, promjene na folikulima kose, zadebljanje kože, utrnulost ekstremiteta, očne bolesti, neurološke smetnje. Djeca, čije su

majke bile izložene PCB-ima, su bila manje porođajne težine i imala kognitivne probleme. (Safe, 1994).

2.2.1. Djelovanje PCB-a na endokrini sustav

Kemikalije koje utječu na endokrini sustav (eng. *Endocrine disrupting chemicals*, EDCs) su tvari koje izazivaju promjene u reproduktivnom i endokrinom sustavu, kao i poremećaje metabolizma. Neplodnost kod muškaraca i žena, pretilost, diabetes, rak i sve raniji ulazak u pubertet razlozi su zabrinutosti koja je porasla u zadnjem desetljeću, a razina EDC-a u okolišu dosegla je razinu mjerljivosti u ng (Annamalai i Namasivayam, 2015). Neki PCB kongeneri se svrstavaju u EDC-e jer pokazuju estrogeno i antiandrogeno djelovanje te uzrokuju poremećaje rada štitne žlijezde natječući se za vezno mjesto TBP-a (eng. *Thyroid binding protein*) (Gore i sur., 2015). Poliklorirani bifenili različito reagiraju s estrogen receptorom α (eng. *Estrogen receptor alpha*, ER α) – stoga neki od njih s manjim brojem klorovih atoma imaju estrogeno, dok više klorirani PCB imaju antiestrogeno djelovanje (Zhang i sur., 2014). Također, PCB utječu na biosintezu steroidnih hormona inhibicijom aromataza i sulfotransferaza što uzokuje disbalans hormonske ravnoteže (Gore i sur., 2015).

2.2.1.1. PCB i pretilost

Kao i druge kemikalije koje su kategorizirane kao EDC, PCB potiču stvaranje novih adipocita *in vitro* kod energetskeg disbalansa (naročito PCB-77 i PCB-126). Potvrđeno je da su poremećaje povezane s inzulinom uzrokovali i *non-ortho* i *mono-ortho* substituirani PCB kongeneri (Gore i sur., 2015). Također, istraživanja pokazuju da previše aktivan Ahr (potakut ksenobioticima i prehranom) ima ulogu u razvoju pretilosti i drugih metaboličkih bolesti kao što su inzulinska rezistencija i dijabetes te masna jetra. Na miševima koji nisu imali Ah receptor dokazano je da taj receptor, kod prehrane bogate mastima, ima ulogu u razvoju pretilosti (Xu i sur., 2015).

2.2.1.2. PCB i endometrijoza

Iako je dosta podijeljenih istraživanja o utjecaju PCB-a na endometriozu, dva istraživanja iz 2006. i 2009. godine u koje je bio uključen veći broj pacijenata uspjela su dokazati povezanost između povišene razine PCB-a u serumu i pojave endometrioze. Međutim, iako je razina PCB-a bila povišena, ukupni TEQ se nije značajno promijenio što bi moglo značiti da su dobiveni neskladni zaključci u drugim istraživanjima rezultat odabranog kongenera za analizu. S druge strane povišena razina TEQ-a ne mora nužno korelirati s

bolešću zbog sinergističkih i antagonističkih efekata kod visokih koncentracija toksikanata. Također, moguće je da se endometriozna razvija kod neplodnih žena kao komorbidni faktor te bi u istraživanjima trebalo uzeti kao kontrolu žene koje imaju endometriozu, a nisu neplodne. Poznato je i da PCB imaju toksični učinak i na imunološki sustav, a kod žena s endometriozom on je narušen (Bruner-Tran i Osteen, 2010).

2.2.1.3. PCB i miomi

U kohortnom istraživanju unutar 14 bolnica u kojima su žene bile podvrgnute laparoskopiji ili laparatomiji ustanovljena je korelacija između razine PCB-a u krvi i prisutnosti fibroida (mioma) gdje druge ginekološke bolesti nisu bile prisutne (Gore i sur., 2015).

2.2.1.4. PCB i bolest štitne žlijezde

PCB kongeneri imaju veliki afinitet prema transportnom proteinu hormona štitnjače transtiretinu, a neki posjeduju i afinitet prema globulinu koji veže hormone štitnjače koji cirkuliraju krvotokom. Nadalje PCB potiču izlučivanje tiroidnih hormona iz organizma preko jetre (Toft i sur., 2004). Zahvaljujući sličnosti s hormonima štitnjače PCB smanjuju dostupnost receptora za hormone štitnjače (Dutta i sur., 2012). Istraživanje provedeno na glodavcima ukazalo je na povezanost koncentracije PCB-a i smanjene razine ukupnog i slobodnog T₄ u serumu. Također je sve veći broj istraživanja koja ukazuju na povezanost izloženosti EDC-ima, među kojima se ističu i PCB, s poremećajem rada štitne žlijezde kod ljudi (Gillette i sur., 2017).

2.2.2. Djelovanje PCB-a na reproduktivni sustav

2.2.2.1. PCB i pokretljivost spermija

Nekoliko istraživanja pronašlo je inverznu poveznicu između cirkulirajuće razine testosterona u muškaraca i razine PCB-a (Dutta i sur., 2012). Također, utvrđena je i poveznica između smanjene kvalitete sjemena i hidroksiliranih metabolita PCB-a (Meeker i Hauser, 2010). Istraživači se uglavnom slažu da PCB nemaju učinak na morfologiju spermija. Cjelovitost DNA spermija narušena je izloženosti PCB-ima, potvrđuju četiri istraživanja, dok jedno istraživanje nije pronašlo poveznicu između ove dvije varijable (Gore i sur., 2015). U većini istraživanja pokretljivost spermija pokazala se u negativnoj korelaciji s PCB-ima. Stoga se može zaključiti da bez obzira što se čini da PCB ne utječu na ukupan broj spermija i

njihovu morfologiju, oni ipak smanjuju pokretljivost spermija i oštećuju njihovu DNA, no mehanizam nije poznat (Gore i sur., 2015). Istraživanje provedeno 1998. godine na 12 muškaraca prosječne starosti 17 godina, koji su prenatalno bili izloženi PCB-ima na Tajvanu 1979. godine uslijed slučajne kontaminacije rižinog ulja PCB-ima, pokazalo je abnormalnosti u morfologiji spermija, smanjenu mogućnost penetracije u oocite hrčka i smanjenu pokretljivost. Ove rezultate potvrdilo je slično istraživanje koje je provedeno 2003. godine na Tajvanu u koje su bili uključeni muškarci stari prosječno 40 godina, a bili su izloženi PCB kontaminaciji rižinog ulja 20 godina ranije (Meeker i Hauser, 2010). Ova istraživanja ukazuju da akutna izloženost velikoj količini PCB-a prenatalno i u odrasloj dobi imaju dugoročno teže posljedice od male i kronične izloženosti kod koje dolazi do akumulacije PCB-a tokom godina.

2.2.2.2. PCB i rak prostate

Kohortno istraživanje provedeno diljem SAD-a u koje je bilo uključeno 24 865 radnika koji su radili kod proizvođača kondenzatora i bili su izloženi PCB-ima tijekom 35 godina potvrdilo je porast smrti od raka prostate te je ukazalo na to da je do porasta oboljelih došlo zbog akumuliranja PCB-a u organizmu i njihovih dugoročnih štetnih učinaka. Nasuprot tome, drugo istraživanje u kojem je sudjelovalo 14 203 Japanca nije pronašlo poveznicu između raka prostate i PCB-a. U obzir treba uzeti i to da muškarci azijskog podrijetla imaju nižu stopu obolijevanja od raka prostate i moguće je da su na rezultate istraživanja utjecali faktori povezani s rasom. Međutim i istraživanje provedeno u Kanadi nije dokazalo nikakvu poveznicu između PCB-a i učestalosti pojave raka prostate. Iako su rezultati istraživanja oprečni sva istraživanja se slažu da muškarci koji su dugi niz godina bili izloženi većim razinama PCB-a, imaju povećan rizik od razvoja raka prostate u kasnijoj dobi (Gore i sur., 2015).

2.2.2.3. PCB i rak dojke

PCB povećavaju sklonost stanica raka dojke da metastaziraju preko ROCK (eng. *The Rho associated kinases*) signalnog puta. ROCK signalni put je ovisan o ROS (eng. *Reactive oxygen species*) čija je proizvodnja inducirana PCB-ima. Na taj način PCB pogoršavaju stanje bolesti povećavajući šansu za metastaze na koštanom tkivu, plućima i jetri, što je potvrđeno *in vivo* istraživanjima na životinjama (Liu i sur., 2010).

2.2.2.4. PCB i trudnoća

Istraživanje, u kojem je sudjelovala 3421 trudnica ustanovljeno je da je bilo potrebno više vremena da zatrudne one žene koje su imale izmjerene više razine PCB-a u serumu. U drugom kohortnom istraživanju u kojem je sudjelovalo 514 trudnica utvrđena je značajna povezanost PCB-a sa smanjenom porođajnom težinom muške ali ne i ženske novorođenčadi (Gore i sur., 2015).

2.2.3. Neurotoksičnost PCB-a

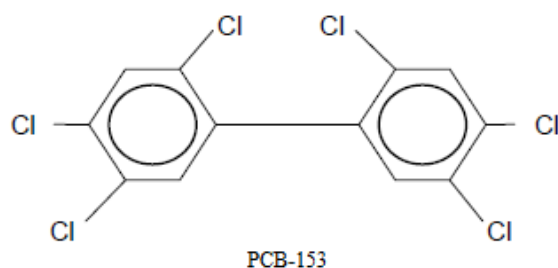
Veliki broj istraživanja pokazao je da je izloženost PCB-ima tijekom razvoja (prije i nakon rođenja) povezana s brojnim kognitivnim problemima kod djece. Istraživanje u koje su bile uključene trudnice koje su živjele u blizini jezera Michigan, u kojem su u to vrijeme bile zabilježene visoke koncentracije PCB-a, pokazalo je da su djeca izložena višim dozama imala niži IQ i teškoće sa čitanjem i sa čitanjem s razumijevanjem (Gore i sur., 2015). Kod djece Eskima povišena koncentracija PCB-a u plazmi pokazala se u negativnoj korelaciji s pamćenjem (Gore i sur., 2015). Djeca čije su majke bile izložene trovanju visokim koncentracijama PCB-a koji su slučajno dospjeli u rižino ulje u Japanu (Kuratsune i sur., 1972) i na Tajvanu (Chen i sur., 1994) imala su brojne zdravstvene probleme koji se nisu poboljšavali s godinama. Djeca rođena godinama nakon izloženosti njihovih majki PCB-ima imala su iste abnormalnosti. Te abnormalnosti bile su dermatološke i dentološke prirode kod rođenja, slabiji razvoj, promjene u ponašanju, učestali problemi s govorom, slabije psihomotoričke sposobnosti i nizak IQ (Chen i sur., 1994).

2.2.3.1. PCB i anksioznost i depresija

PCB prolaze kroz placentu i kod *in utero* izloženih štakora u odrasloj dobi uočena je promjena kod seksualnog i socijalnog ponašanja. Dokazano je da dolazi do promjene količine neurotransmitera i njihovih receptora u mozgu, uključujući i neurotransmitere (serotonin, dopamin) koji utječu na anksioznost i emocionalna stanja. Samo štakori muškog spola izloženi PCB-ima tijekom fetalnog razvoja, u razdoblju adolescencije u većoj su mjeri bili anksiozni i imali su jače izražene reakcije na stres, dok su u odrasloj dobi bili manje anksiozni u odnosu na kontrolnu skupinu. Također vrlo je vjerojatno da se ti rezultati mogu primjeniti i na ljudima uzimajući u obzir da postoje epidemiološke studije koje povezuju povišenu razinu PCB-a u krvi kod starijih ljudi s teškoćom kod učenja, slabijim pamćenjem i depresijom (Gillette i sur., 2017).

2.3. TOKSIČNOST PCB-153

I planarni i neplanarni PCB mjerljivi su u tkivima ljudi, međutim neplanarni PCB su, zbog svoje slabije razgradivosti i veće podložnosti akumulaciji u masnom tkivu, prisutni u puno većim količinama. Od četiri dominantno prisutna neplanarna PCB kongenera u ljudi (PCB-138, 153, 170 i 180), najviše ipak ima PCB-138 i PCB-153 (Dutta i sur., 2012). Prema tome, neplanarni PCB-153 (Slika 4), iako nije jedan od najtoksičnijih PCB kongenera, predstavlja opasnost za zdravlje ljudi zbog akumuliranja u masnom tkivu i mogućih negativnih učinaka kada je prisutan u velikoj količini kao i zbog mogućih sinergističkih i antagonističkih učinaka s drugim polikloriranim spojevima (Toft i sur., 2004).



Slika 4. Strukturna formula PCB-153 (Toft i sur., 2004)

2.3.1. PCB-153 i endokrini sustav

Unatoč tome što se PCB-153 može natjecati s prirodnim ligandom za vezna mjesta dva nuklearna receptora, postoji mogućnost da ometa rad endokrinog sustava i putem drugih mehanizama poput ometanja rada enzima odgovornih za sintezu hormona kao i samog metabolizma (Gregoraszcuk i Wójtowicz, 2002). Na staničnoj liniji ovarija izoliranoj iz svinja PCB-153 nije imao učinak na vijabilnost stanica, međutim uzrokovao je ometanje endokrine funkcije tih stanica. Ovi rezultati ukazuju na to da se toksičnost PCB-153 ne ispoljava jednako na svim stanicama u organizmu, već je njegov glavni negativan učinak usmjeren na endokrini sustav (Gregoraszcuk i Wójtowicz, 2002). U jednom istraživanju miševi su bili izloženi *in utero* i tijekom perioda laktacije prehrani koja je sadržavala velik udio masti i EDC-e (mješavina DEHP (dietilheksil ftalat), BPA (bisfenol A), PCB-153 i TCDD). Kod muških miševa su bili jače izraženi geni koji kodiraju za biosintezu kolesterola, ukupan kolesterol u jetri je bio smanjen te istraživanje nije pokazalo utjecaj takve ishrane na razinu glukoze u krvi. Metabolizam kolesterola je kod ženskih miševa ostao nepromijenjen,

ali je intolerancija na glukozu bila izraženija smanjenjem ekspresije ER α i gena čija funkcija je povezana s metabolizmom estrogena (Naville i sur., 2013). U drugom istraživanju u kojem su sudjelovale 33 djevojčice dokazano je da je visoka koncentracija PCB-153 u korelaciji sa sniženom razinom estradiola što upućuje na to da toksični učinak koji PCB-153 ima na endokrini sustav kod životinja, postoji i u ljudi (Gore i sur., 2015).

2.3.2. PCB-153, trudnoća i niska porođajna težina

Kohortno istraživanje provedeno u Europi izvjestilo je da povećanjem koncentracije PCB-153 izmjenog u serumu pupkovine, dolazi do smanjenja porođajne mase novorođenčadi (Gore i sur., 2015). Međutim, smatra se da postoje neke poveznice između koncentracije PCB-153 i niske porođajne težine, iako za sada još ne postoji adekvatan način da se to izmjeri (Verner i sur., 2014). U jednom istraživanju, koje je uključivalo 248 Eskimkinje, pokazalo se da je koncentracija PCB-153 određena u krvi pupkovine u korelaciji s kraćim vremenom trudnoće (Gore i sur., 2015).

2.3.3. PCB-153 i mozak

U istraživanju u kojem su štakori bili izloženi PCB-153 pokazalo se da je tim štakorima trebalo više vremena za naučiti određenu radnju u odnosu na kontrolnu skupinu neovisno o spolu. Ovo istraživanje ukazuje na to da PCB-153 ima negativan učinak na kognitivne sposobnosti (Gillette i sur., 2017). U drugom istraživanju zapažena je povezanost koncentracije PCB-153, izmjerene u krvnoj plazmi i smanjene sposobnosti rješavanja memorijskog testa kod djece Eskima prosječne dobi od 11 godina (Gore i sur., 2015). Također, izloženost djece Eskima PCB-153 je u korelaciji s povećanom anksioznošću (Gillette i sur., 2017).

2.3.4. PCB-153 i rak prostate

Istraživanjem provedenim u Švedskoj, u kojem su sudjelovali pripadnici muškog spola s i bez dijagnosticiranog raka prostate, utvrđena je značajna poveznica između PCB-a, čija je koncentracija određena iz masnog tkiva, i učestalosti raka prostate. Koncentracija PCB-153 je bila najveća zbog njegove akumulacije u masnom tkivu, stoga on predstavlja najveću opasnost za ovu bolest. Ovi rezultati potvrdili su već od prije poznatu korelaciju između PCB-153 i PCB-180 i raka prostate, evidentiranu kod radnika koji su dugi niz godina bili izloženi PCB-153 i drugim PCB kongenerima u tvornici kondenzatora (Diamanti-Kandarakis i sur., 2009).

2.3.5. PCB-153 i pokretljivost spermija

U istraživanjima nije pronađena poveznica između koncentracije PCB-153 i koncentracije spermija, kao ni broja spermija, međutim utvrđena je negativna korelacija s razinom slobodnog testosterona (Meeker i Hauser, 2010). Također u nekoliko studija potvrđena je mala, ali značajna negativna korelacija između PCB-153 i pokretljivosti spermija (Hauser i sur., 2005).

2.4. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Uzimajući u obzir da je u razvijenim zemljama obavezno testiranje lijekova, aditiva, kemikalija, kozmetike i pesticida kojima mogu biti izloženi ljudi i životinje u okolišu, testovi toksičnosti imaju veoma široku primjenu. Razlikujemo klasične animalne testove (*in vivo*) i alternativne testove toksičnosti (*in vitro*). Testovima toksičnosti na životinjama istražuje se akutna (aplikacija jedne doze), subakutna (ponavljanje doze do 1 mjesec), subkronična (ponavljanje doze od 1 do 3 mjeseca) i kronična toksičnost (ponavljanje doze od 3 mjeseca do 2 godine). Mogu se vršiti hematološka ispitivanja, testovi toksičnosti na reproduksijski sustav i plodnost te testovi teratogenosti, mutagenosti, očne i kožne iritacije, imunotoksičnosti i neurotoksičnosti. Također se ispituju toksikokinetički i toksikodinamički parametri ksenobiotika (Tice i sur., 2000).

2.4.1. *In vitro* testovi toksičnosti

In vitro testovima toksičnosti pridaje se sve više važnosti jer se njihovim korištenjem smanjuje broj testiranja na životinjama i olakšano je definiranje djelovanja ispitivanog spoja na ciljne organe. Alternativni testovi toksičnosti se većinom koriste kao pretestovi klasičnim testovima za utvrđivanje raspona aktivnosti tvari. Osim toga služe za određivanje raspona toksične koncentracije, a korisni su i za određivanje odnosa koncentracije prema vremenu izlaganja te mehanizma djelovanja određene tvari. U tu svrhu koriste se mikroorganizmi (npr. Amesov test) i animalne ili humane stanice jetre, bubrega, testisa, ovarija, hipofize, štitnjače, limfnih čvorova, embrionalne animalne stanične linije. Također, mogu se koristiti i stanične frakcije, fragmenti tkiva ili primarne kulture stanica. Upotrebom kemikalija, virusa i radijacije moguće je inducirati procese kancerogeneze u normalnim stanicama i istraživati mehanizme koji su doveli do te promjene (Tice i sur., 2000). Stanice se mogu koristiti za ispitivanja u virologiji, genetičkom inženjerstvu i genskoj terapiji. Za određivanje citotoksičnosti koriste se metode: *Kenacid Blue MTT*, *Trypan Blue* i *Neutral Red*. Za praćenje

i razlikovanje apoptotičkih i nekrotičnih stanica koriste se fluorescentna mikroskopija, elektronska mikroskopija te protočna citometrija (Freshney, 2005).

2.4.2. Stanične linije

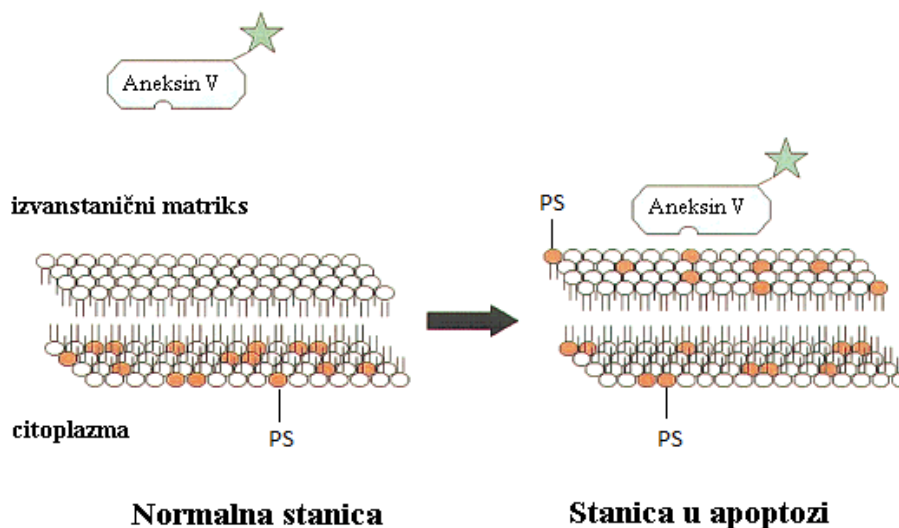
Strogo kontrolirani, sterilni uvjeti potrebni su za uzgoj staničnih linija. Bakterije, mikoplazme, kvasci i gljivice predstavljaju izvor kontaminacije, a prenose se atmosferom, preko radne površine, osobljem koje radi u laboratoriju, instrumentima i kemikalijama koje se koriste te biološkim materijalom. Potrebno je osigurati sterilne uvjete radom u laminaru, a kultivacija stanica se odvija u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO₂), na temperaturi 34-37 °C i pri pH vrijednosti 7,4. Radne površine i preparati se održavaju čistima pomoću 70 %-tnog etanola. Rad s kulturama stanica zahtjeva dobro definiran medij. Kompletan medij sadrži sve potrebne komponente i suplemente poput vitamina, aminokiselina, soli, glukoze, masnih kiselina i organskih suplemenata. Da bi rast stanica u mediju bio optimalan potrebno je dodati serum koji sadrži proteine, hormone, minerale, lipide, faktore rasta, adhezijske faktore, inhibitore enzima, metabolite i hranjive sastojke (Freshney, 2005). Najčešće se upotrebljavaju fetalni goveđi, teleći i konjski serum, a dodaju se u količini 5-20 % (najčešće 10 %) . Različite kulture nemaju iste potrebe za kisikom. Većini stanica odgovara atmosferski kisik odnosno niske koncentracije kisika (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂). Prema osmotskom tlaku većina staničnih kultura ima veliku toleranciju. Izrazito bitan faktor je i pH podloge. Većina stanica počne gubiti vijabilnost kod pada pH vrijednosti (između 6,0 i 6,5), a ta promjena lako je uočljiva jer dolazi do promijene boje medija iz crvene u žutu. Stoga je potrebno za optimalan rast stanica periodično mijenjati medij (Freshney, 2005).

2.4.2.1. CHO-K1 stanična linija

CHO-K1 stanična linija je adherentna, epitelna stanična linija dobivena biopsijom ovarija kineskog hrčka, a proveo ju je 1957. godine T. T. Puck. Medij za uzgoj mora sadržavati aminokiselinu prolin, jer CHO-K1 stanice nemaju aktivni gen koji kodira za tu aminokiselinu te 10 % dodanog fetalnog goveđeg seruma. Kako CHO-K1 stanična linija raste u monosloju, tijekom subkultivacije potrebno je provoditi tripsinizaciju (ATCC, 2016).

2.5. APOPTOZA I NEKROZA

Stanična smrt može se generalno podijeliti na 2 različita mehanizma: apoptozu i nekrozu. Apoptoza je programirana stanična smrt koja ima važnu ulogu u homeostazi tkiva. Tijekom apoptotične smrti dijelovi stanice se pakiraju u tzv. apoptotična tjelešca te je tim mehanizmom uz utrošak energije izbjegnuta aktivacija imunskog sustava (Edinger i Thompson, 2004). Stanice pokreću apoptozu kada postanu opasne ili nekorisne za organizam što je uzrokovano vanjskim ili unutrašnjim čimbenicima (Žlender, 2003). Razumijevanje samog procesa apoptoze moglo bi omogućiti nove načine liječenja bolesti koje su povezane s disbalansom proliferacije i smrti stanica (Demchenko, 2013). Označeni aneksin V koristi se u svjetlosnoj mikroskopiji i protočnoj citometriji za otkrivanje stanica u ranoj i kasnoj apoptozi, budući da se specifično veže na protein fosfatidil serin (engl. *phosphatidylserine*, PS) koji se nalazi izložen na vanjskoj strani membrane stanice od početka apoptoze (Slika 5) kada u stanici još nije došlo do karakterističnih morfoloških promjena i kondenzacije DNA do konačne faze raspada stanice (Van Engeland i sur., 1998). Nasuprot apoptozi, nekroza se smatra pasivnim oblikom stanične smrti zbog bioenergetskog disbalansa (nedovoljan broj ATP-a u stanici) potaknut znatnijim oštećenjima fizikalno-kemijskim agensima. Karakterizira je vakuolizacija citoplazme, gubitak stanične membrane i upala okolnog tkiva zbog ispuštanja staničnog sadržaja i biomedijatora upale (Edinger i Thompson, 2004).



Slika 5. Shematski prikaz gubitka asimetričnosti membrane kod apoptoze. Tijekom apoptoze molekule PS (fosfatidil serin) premještaju se iz fosfolipidnog sloja okrenutog prema citosolu u lipidni sloj okrenut izvanstaničnom matriksu. Aneksin V veže se na PS u vanjskom dijelu stanične membrane u prisustvu milimolarne količine Ca^{2+} (prema Van Engeland i sur., 1998).

2.5.1. Protočna citometrija

Protočna citometrija je metoda koja se zasniva na laserskoj tehnologiji, a koristi se za analizu stanice ili njezinih dijelova. Njome se mogu utvrditi proteini na površini stanice, kao i molekule unutar stanice, veličina i volumen stanice, različite stanice u heterogenoj staničnoj populaciji te čistoća izoliranih subpopulacija. Također istovremeno se može određivati više parametara na pojedinačnoj stanici. Često se koristi za određivanje proteina na koje se vežu fluorescentno označeni ligandi ili antitijela mjerenjem fluorescencije (npr. određivanje broja stanica u apoptozi preko proteina PS izraženog na membrani stanice) (Abcam, 2017).

Prije markiranja staničnih proteina fluorokromima potrebno je napraviti (od stanične linije ili uzorka tkiva) staničnu suspenziju koja se pomiješa s bojom (fluorokromima) i tada se uzorak stavlja u uređaj. Kada se suspenzija stanica stavi u protočni citometar pokretačka tekućina (eng. *sheath fluid*) služi za hidrodinamičko fokusiranje stanične suspenzije u mali mlaz. Sitnim protokom tekućine stanice prolaze jedna po jedna kroz svjetlo lasera. Svjetlost se prolaskom kroz svaku stanicu, imala ona fluorescentnu boju vezanu za neki protein ili ne, raspršuje prema naprijed odnosno pod malim kutem (eng. *forward scatter*, FS) i pod pravim kutem tj. bočno (eng. *side scatter*, SS). Fluorokromi, vezani za specifične stanične djelove, fluoresciraju, tj. emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti. Različiti specifični detektori postavljeni su za hvatanje ove tri vrste svjetlosti (Brown i Wittwer, 2000). Svjetlost raspršena prema naprijed u korelaciji je s veličinom stanice, dok je svjetlost raspršena bočno u korelaciji s granulacijom stanice (Abcam, 2017).

Stanice se mogu, osim uz pomoć FS i SS, razlučivati i prema proteinima koji su izraženi na njihovoj membrani. U tom slučaju taj protein markira se jednim od fluorokroma. Neki od fluorokroma koji se koriste su: fikoeritrin (eng. *phycoerythrin*, PE), propij jodid (eng. *propidium iodide*, PI), fluorescein izotiocijanat (eng. *fluorescein isothiocyanate*, FITC). Kod odgovarajuće valne duljine svjetlosti lasera fluorokromi emitiraju svjetlost u pobuđenom stanju. Fluorescentno označene stanice i stanični djelovi mogu se zasebno detektirati. Fluorescencija, prema naprijed i bočno raspršena svjetlost raspoređuju se setom filtera i ogledala ovisno o valnoj duljini u protočnom citometru. Zahvaljujući filtriranju fluorescencije svaki fluorescentni detektor očitava samo svjetlost kod specifične valne duljine (Brown i Wittwer, 2000). Intenzitet izmjerene fluorescencije ovisi o instrumentu odnosno o tipu lasera i kombinaciji filtera. Protein koji je veoma izražen vjerojatno će se moći izmjeriti bilo kojim fluorokromom, dok slabije izraženi protein zahtjeva fluorokrom koji jače fluorescira kao što

je PE. Nakon što stanica koja fluorescira prođe kroz snop laserske svjetlosti nastaje puls emisije fotona kroz vrijeme. Emisiju fotona detektiraju specifični detektori i pretvaraju ih u električni signal. Što je više istih električnih signala, to je veći broj stanica koje fluoresciraju kod iste valne duljine (Abcam, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-K1. Stanice su izolirane iz ovarija odraslog kineskog hrčka i rastu u monosloju (ATCC, 2016).

3.1.2. Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Dulbecco's DMEM/F-12, GIBCO, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS – fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD
- 0.25 % tripsin – EDTA, GIBCO, SAD
- PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil), Sigma-Aldrich, St. Louis, S.A.D.
- boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St. Louis, S.A.D.
- Coomassie brilliant blue R-250, LKB, Bromma, Švedska
- Neutralrot, E. Merck Ag – Darmstadt, Njemačka
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), Sigma-Aldrich, St. Louis, S.A.D.
- Muse annexin V & dead cell assay kit, kat. broj MCH 100105, Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- apsolutni etanol, Kemika, Zagreb
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb
- Guava ICF (*Instrument cleaning fluid*), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb
- Kalijev dihidrofosfat, Kemika, Zagreb
- ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb
- Dinatrijev hidrogenfosfat, bezvodni, Kemika, Zagreb
- Kalijev acetat, Kemika, Zagreb
- destilirana voda (dH₂O)

3.1.3. Otopine i puferi

Sastav medija (Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO)):

Sastojci	Koncentracija (mg L⁻¹)
aminokiseline	
L-Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin x H ₂ O	7,5
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid x H ₂ O	17,56
L-Cistin 2HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid x H ₂ O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,25
L-Metionin	17,24
L-Fenilalanin	35,48
L-Prolin	17,25
L-Serin	26,25
L-Treonin	53,45
L-Triptofan	9,02
L-Tirozin	55,79
L-Valin	25,85

vitamini

Biotin	0,0035
Kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
Folna kiselina	2,65
Niacinamid (nikotinamid)	2,02
Piridoksin hidroklorid	2
Riboflavin	0,219
Tiamin hidroklorid	2,17
Vitamin B ₁₂	0,68
I-inozitol	12,6

anorganske soli

CaCl ₂	116,6
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0013
Fe(NO ₃) ₃ x 9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,417
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	61
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	100
KCl	311,8
NaHCO ₃	1200
NaCl	6995,5
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	134
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	62,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,432

ostali sastojci

D-Glukoza	3151
HEPES	3075,4
Hipoksantin Na	2,39
Linolna kiselina	0,042
Lipoična kiselina	0,105
fenol crvenilo	8,1
Putrescin 2HCl	0,081
Na piruvat	55
Timidin	0,365

Ishodna otopina PCB 153

PCB 153	10 mg
DMSO	2,77 mL

Koncentracije PCB 153 u mediju za uzgoj iznosile su 10, 25, 50, 75 i 100 μ M.

PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pufer pH=7,4

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	do 1000 mL

pH pufera se podesi sa 5 M HCl

0,4 %-tna otopina *Trypan Blue*

<i>Trypan Blue</i>	0,08 g
PBS pufer	20 mL
Profiltrirati	

4 %-tna otopina *Neutral Red*

<i>Neutral Red</i>	4,00 g
dH ₂ O	100 mL
Sterilno profiltrirati.	

Radna otopina *Neutral Red*

Stock otopina <i>Neutral Red</i>	125 µL
Medij za uzgoj	100 mL

Ishodna otopina *MTT*

<i>MTT</i>	25 g
PBS	5 mL
Sterilno profiltrirati.	

***Kenacid Blue R* stock otopina**

Coomassie brilliant blue R-250	0,4 g
apsolutni etanol	250 mL
dH ₂ O	630 mL

Radna otopina *Kenacid Blue*

<i>Kenacid Blue</i> stock otopina	88 mL
ledena octena kiselina	12 mL

Otopina za fiksiranje *Kenacid Blue* boje = Otopina za odbojavanje (*Neutral Red*)

apsolutni etanol	50%
ledena octena kiselina	1%
dH ₂ O	49%

Otopina za ispiranje

apsolutni etanol	10%
ledena octena kiselina	5%
dH ₂ O	85%

Otopina za desorpciju

kalijev acetat	98,15 g
apsolutni etanol	700 mL
dH ₂ O	300 mL

3.1.4. Oprema i uređaji

Tijekom rada u laboratoriju korištena je sljedeća oprema:

- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO₂, Flow Laboratories, Velika Britanija
- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop; Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- MUSE (*Muse Cell Analyzer*), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- spektrofotometar, Helios- γ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj i održavanje CHO-K1 stanica u kulturi

CHO-K1 stanice se čuvaju na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80% medija za uzgoj (DMEM/F-12), 10% FBS-a i 10% DMSO-a. Odmrzavanjem stanica na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru, u atmosferi od 95% zraka i 5% CO_2 započinje njihov uzgoj i održavanje. Otprilike 24 h nakon odmrzavanja uklanja se medij za uzgoj, s ostacima medija za smrzavanje te dodaje novi svježi medij (90% Dulbecco MEM/F-12 i 10% FBS-a) da bi se nastavila kultivacija stanica.

Za optimalni rast i razvoj stanica potrebni su uvjeti kontrolirane atmosfere ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% zraka i 5% CO_2) u inkubatoru i redovito mijenjanje medija za uzgoj. CHO-K1 monoslojne stanice je potrebno isprati od iskorištenog medija i seruma i odvojiti ih od površine T-boce dodavanjem 1 mL tripsina. Nakon što se pod mikroskopom uoči odvajanje stanica od površine T-boce, stanice se resuspendiraju u svježem mediju za uzgoj te se razrijeđuju na koncentraciju 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj.

3.2.2. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji

U svaku od jažica na *multiwell* ploči sa 6 jažica se nacijepi po 2 mL prethodno dobro resuspendiranih CHO-K1 stanica u koncentraciji 2×10^4 mL^{-1} medija za uzgoj. Stanice se inkubiraju 24 sata te se zatim tretiraju različitim koncentracijama PCB-153. Jednu jažicu *multiwell* ploče tretira se samo s 20 μL DMSO-a (K_D). Ostalih pet jažica tretira se s po 20 μL otopine PCB-153 tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 10, 25, 50, 75 i 100 μM . Kontrolni uzorak tretira se s DMSO-om da bi se isključio potencijalni toksični učinak samog otapala za PCB-153 na stanice.

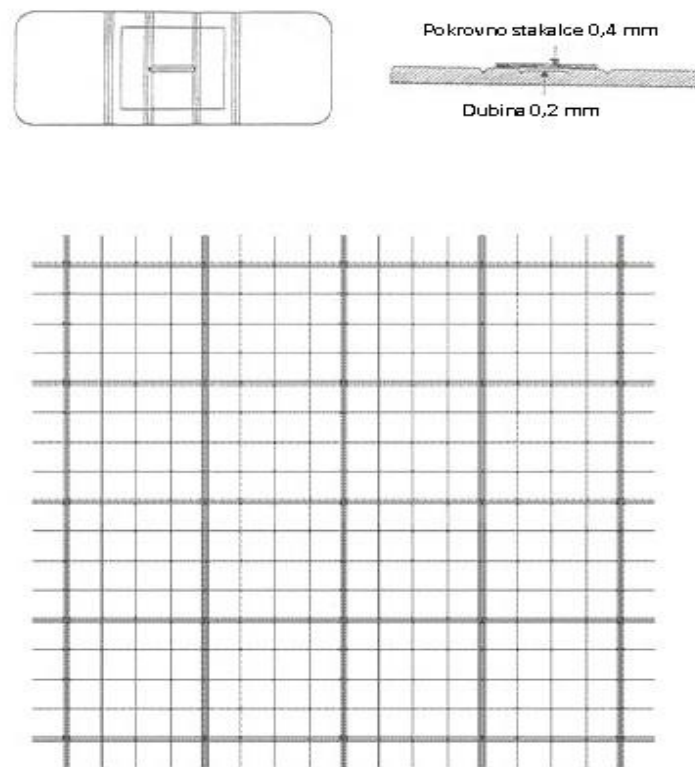
Stanice se potom inkubiraju tijekom 6 i 48 sati. Citotoksični učinak PCB-153 ispituje se uspoređivanjem vijabilnosti stanica s i bez dodatka PCB-a nakon 6 i 48 sati metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*.

3.2.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom Trypan Blue

Iz suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica izdvoji se 20 μL uzorka te se uzorku dodaje 20 μL 0,4%-tne boje *Trypan Blue*. Nakon resuspendiranja 20 μL te smjese nanese se na Fuchs-Rosenthalovu komoricu i slijedi brojanje stanica pod svjetlosnim mikroskopom.

Trypan Blue boja lako prolazi kroz oštećenu membranu mrtvih stanica, dok žive stanice ostaju neobojane.

Fuchs-Rosenthalova komorica je dubine 0,2 mm i površine 0,0625 mm² (Slika 6). Podijeljena je na 16 kvadrata, a stanice se broje u samo unutarnja četiri. Kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta u unutarnja četiri kvadrata, broje se sve stanice u kvadratu kao i one na donjem i desnom rubu.



Slika 6. Fuchs-Rosenthalova komorica (Guillard i Sieracki, 2005).

Ukupan broj živih stanica po mililitru suspenzije jednak je srednjoj vrijednosti broja živih stanica izbrojenih u četiri kvadrata pomnoženoj s 10⁴.

3.2.2.2. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom *Neutral Red*

Nakon 6 ili 48 sati inkubacije na *multiwell* pločama sa 6 jažica iz jažica se uklanja medij i dodaje po 1 mL sterilnog PBS-a za ispiranje. Nakon PBS-a dodaje se radna otopina

Neutral Red koja se veže u lizozomima živih stanica. Stanice se inkubiraju 3 sata na 37 °C u inkubatoru nakon čega ponovno slijedi ispiranje s po 1 mL PBS-a. Zatim se dodaje po 2 mL otopine za odbojavanje i *multiwell* ploče se stavljaju 20 minuta na tresilicu. Intenzitet crvenog obojenja određuje se sprektofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom *Kenacid Blue*

Na istim stanicama je nakon metode *Neutral Red* napravljena metoda *Kenacid Blue*. Počinje se izbacivanjem otopine za odbojavanje i dodavanjem po 1 mL radne otopine *Kenacid Blue* koja se veže za ukupne stanične proteine te se ploče ostavljaju 20 minuta na tresilici da se ujednači boja. Nakon 20 minuta u jažice se dodaje po 1 mL otopine za ispiranje i ponovno se *multiwell* ploče stavljaju 20 minuta na tresilicu. Zatim se dodaje po 2 mL otopine za desorpciju uz još 20 minuta na tresilici. Intenzitet plavog obojenja određuje se sprektofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 577 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom *MTT*

Tetrazolijeva sol, žute boje i topljiva u vodi – *MTT* se djelovanjem sukcinat dehidrogenaze u mitohondrijima u živim stanicama prevodi u ljubičaste kristale formazana netopljive u vodi, koji se mogu otopiti u organskom otapalu i spektrofotometrijski odrediti intezitet obojenja (Lim i sur., 2015).

Nakon 6 ili 48 sati inkubacije na stanice se doda 200 µL ishodne otopine *MTT*-a. Stanice se zatim inkubiraju 3 sata na 37 °C. Nakon 3 sata medij se vadi iz jažica i dodaje se 2 mL DMSO-a u kojem se otapaju kristali formazana pri čemu se razvija ljubičasto obojenje. Intenzitet obojenja određuje se sprektofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka PCB-153 metodom protočne citometrije

Muse (*Muse Cell Analyzer*) je kompaktni instrument koji čini protočnu citometriju pristupačnijom za rad. U ovom radu korišten je jedan od dostupnih kitova za određivanje apoptoze *Muse annexin V & dead cell assay kit* tvrtke Merck koji se skladišti zaštićen od svjetla na temperaturi od 2 do 8 °C, a sadrži dvije boje: 7-amino aktinomicin D i fikoeritrin (eng. *phycoerythrin*, PE). Fluorescentna boja 7-amino aktinomicin D (engl. *7-amino actinomycin D*, 7-AAD) izlučuje se iz živih i zdravih stanica dok se zadržava u mrtvim stanicama kao i u stanicama u kasnoj apoptozi (Merck Millipore, 2017). Uz argon-ion laser 7-

AAD može biti u pobuđenom stanju kod 488 nm i emitira kod maksimalne valne duljine 647 nm. Stoga je pogodan za korištenje s drugim fluorokromima koji emitiraju kod 488 nm kao što su FITC (eng. *Fluorescein isothiocyanate*) i PE (R&D Systems, 2017). U fazi rane apoptoze fosfatidil serin translocira na vanjsku površinu stanične membrane. Aneksin V-PE (aneksin V označen fluorescentnim fikoeritriinom) se veže za fosfatidil serin na površini stanične membrane. Uz pomoć ovog kita može se odrediti broj živih i mrtvih stanica te broj stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (Merck Millipore, 2017).

Na *multiwell* ploči sa 6 jažica nacijepi se 4 mL CHO-K1 stanica u koncentraciji 2×10^4 st mL⁻¹ medija za uzgoj. Nakon inkubacije od 24 sata, stanice se tretiraju s PCB-em 153 te slijedi inkubacija od 6 i 48 sati. Postupak započinje vađenjem i sakupljanjem medija. Na stanice se dodaje 500 µL tripsina i kada se sve stanice odvoje od podloge u jažice se vraća 500 µL prethodno izvađenog medija. Dobiva se suspenzija stanica u mediju te se uzima po 100 µL. Test se provodi tako da se pomiješa sa 100 µL *Muse annexin V & dead cell* reagensa kit-a tvrtke Merck kat. br. MCH100105. Slijedi inkubacija 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a nakon što se uzorak stavi u uređaj na ekranu se očitaju podaci koji govore udjelu stanica koje su žive, mrtve, u ranoj i kasnoj apoptozi.

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

S pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

N = ukupni broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom izračunavajući t vrijednost prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 - S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,5$.

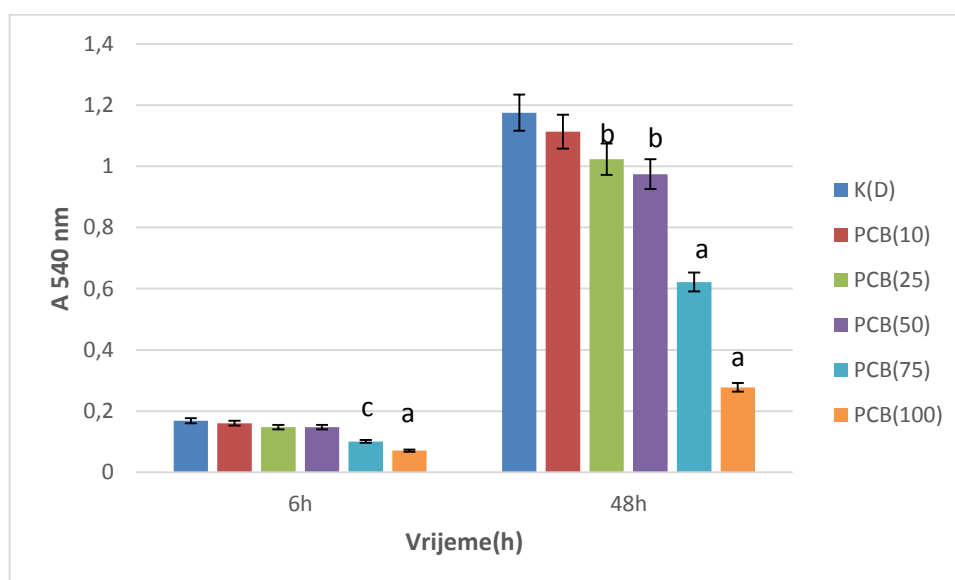
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu korištena je stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese hamster ovary*)-K1 s ciljem ispitivanja toksičnog djelovanja PCB-153. Citotoksični učinak PCB-153 ispitan je u koncentracijama 10, 25, 50, 75 i 100 μM . Proliferacija i vijabilnost stanica tretiranih s PCB-153 i netretiranih stanica praćena je tijekom 6 i 48 h inkubacije metodama: *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*. Pomoću spektrofotometra odredio se intenzitet nastalog obojenja i izmjerila apsorbancija pri određenim valnim duljinama ovisno o upotrijebljenoj metodi: 540 nm (*Neutral Red*), 577 nm (*Kenacid Blue*) i 570 nm (*MTT*) u odnosu na pripadajuću slijepu probu. Boja *Neutral Red* prolazi kroz staničnu membranu i zadržava se u lizosomima živih stanica, količina boje koja se zadržala u stanicama proporcionalna je broju živih stanica. Metodom *Kenacid Blue* mjere se ukupni stanični proteini te je intenzitet obojenja proporcionalan broju živih stanica. Metodom *MTT* se žuta boja, tetrazolijeva sol reducira u formazan ljubičaste boje. Metoda se temelji na mjerenju metaboličke aktivnosti stanice odnosno na produkciji NADH s obzirom da je on potreban za redukciju *MTT*-a, a broj živih stanica korelira s intenzitetom obojenja. Boja *Trypan Blue* je velike molekulske mase i prodire u stanicu kod koje je narušen integritet stanične membrane, a pod svjetlosnim mikroskopom broje se žive stanice kao i plavo obojene mrtve – stanice. Da bi se odredio broj stanica kod kojih je došlo do smrti apoptozom ili nekrozom korištena je protočna citometrija.

4.1. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM NEUTRAL RED

Za praćenje citotoksičnog učinka PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji naciepljeno je po 2 mL stanica u jažice na *multiwell* pločama u koncentraciji od 2×10^4 st mL^{-1} . Nakon 24 h inkubacije stanice su tretirane različitim koncentracijama PCB-153. S obzirom da je PCB-153 slabo topljiv u vodi, a dobro topljiv u mastima i organskim otapalima, prije ispitivanja njegovog učinka na stanice potrebno ga je otopiti u DMSO-u. U prvu od 6 jažica na *multiwell* ploči se dodaje 20 μL DMSO-a i ona služi kao kontrola kako bi se isključio potencijalni toksični učinak otapala na proliferaciju stanica čime koncentracija otapala u mediju za uzgoj iznosi 1% (10 μL mL^{-1} medija). U ostalih 5 jažica otpipetirano je po 20 μL otopine PCB-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 10, 25, 50, 75 i 100 μM PCB-153.

Učinak 10-100 μM PCB-153 na proliferaciju stanica praćen je nakon 6 i 48 h metodom *Neutral Red* i prikazan je na Slici 7. Nakon 6 i 48 h uočena je inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica tretiranih s PCB-153 kod svih primjenjenih koncentracija (iako je samo kod nekih doza PCB-153 ta inhibicija bila statistički značajna) - odnosno inhibicija stanične proliferacije pokazala se proporcionalna upotrijebljenoj koncentraciji PCB-153 (*dose-response*). Statistički značajna ($p < 0,001$ – $p < 0,005$) inhibicija stanične proliferacije određena je pri koncentracijama PCB-153 od 25-100 μM nakon 48 h tretmana. Nakon 6 h tretmana, značajan inhibicijski učinak određen je pri 75 μM ($p < 0,025$) i 100 μM PCB-153 ($p < 0,001$).



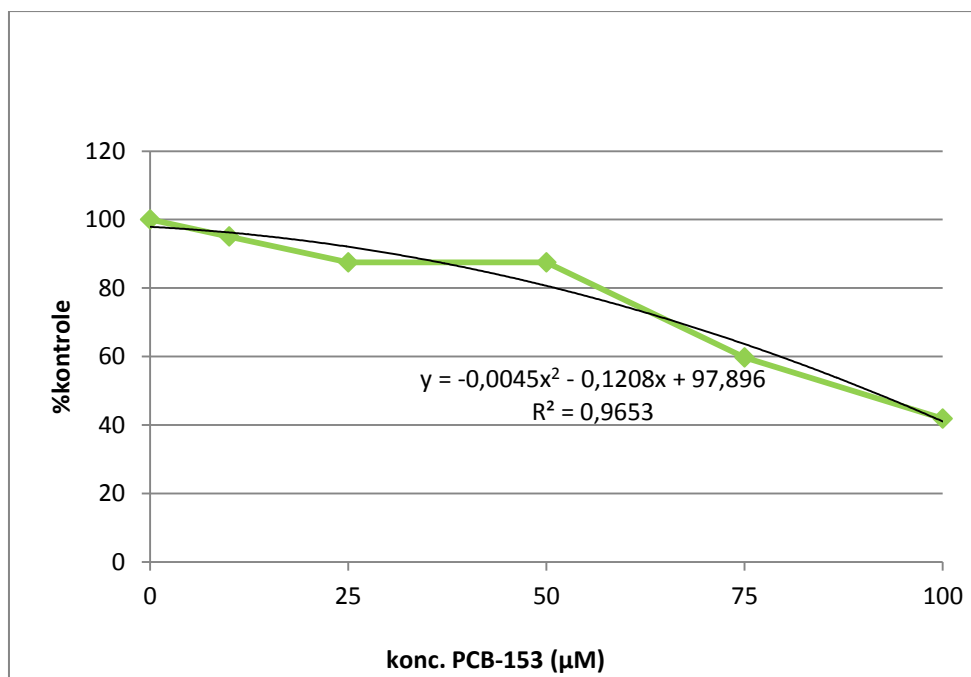
Slika 7. Citotoksični učinak PCB-153 na vijabilnost CHO-K1 stanica praćen metodom *Neutral Red* nakon 6 i 48 h inkubacije. K (D) – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj; koncentracija PCB-153 u mediju za uzgoj: PCB (10) – 10 μM , PCB (25) – 25 μM , PCB (50) – 50 μM , PCB (75) – 75 μM , PCB (100) – 100 μM . Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,025$.

4.1.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom *Neutral Red*

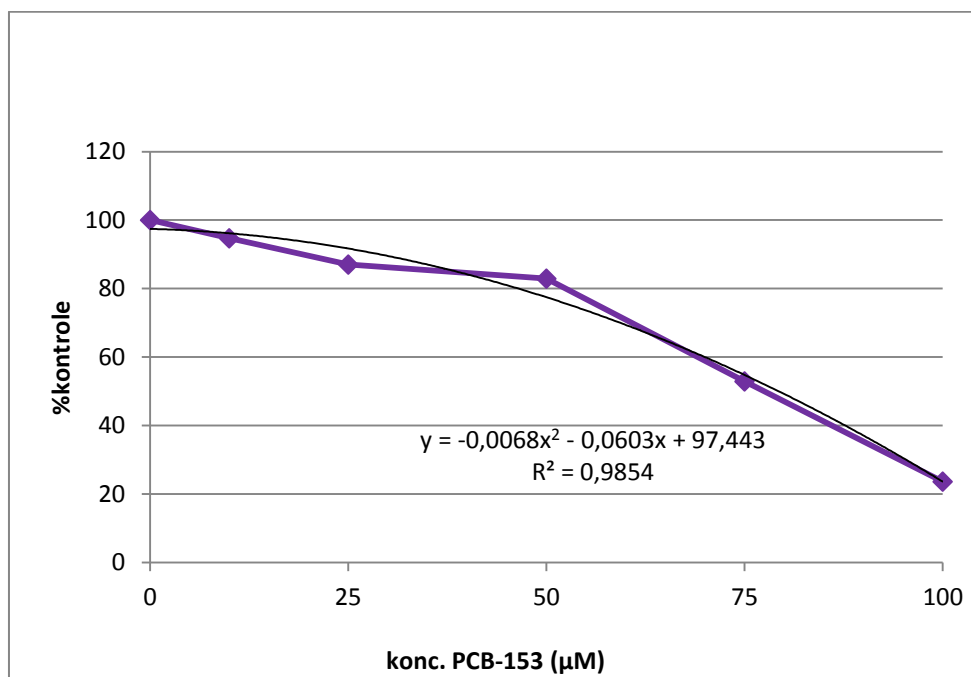
Ovisnost preživljavanja stanica o različitim koncentracijama PCB-153 nakon 6 i 48 h tretmana prikazana je na Slici 8. Učinak pojedine doze (10-100 μM) PCB-a određen je iz

najmanje 3, a najviše 8 mjerenja. Iz jednadžbe interpoliranih polinomnih krivulja određene su IC_{20} , IC_{50} , IC_{80} vrijednosti i prikazane u Tablici 1. IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} su vrijednosti koje predstavljaju one koncentracije PCB-153 kod kojih dolazi do 20, 50 i 80 %-tne inhibicije staničnog rasta. IC_{50} vrijednosti za PCB-153 nakon 6 i 48 h iznose 90,61 μ M i 79,21 μ M. Koeficijent determinacije R^2 govori o reprezentativnosti regresijskog modela. Njegove vrijednosti su unutar intervala $0 \leq R^2 \leq 1$ te je model reprezentativniji što je vrijednost koeficijenta determinacije bliža 1.

A



B



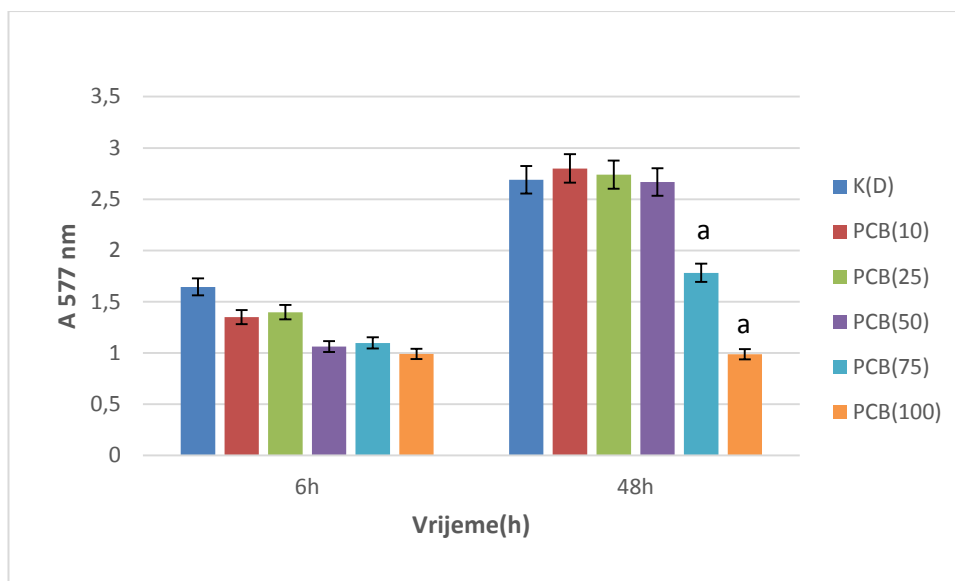
Slika 8. Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 6 (A) i 48 (B) sati uz tretman s 10-100 µM PCB-153 u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane DMSO-om) praćeno *Neutral Red* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost određenu iz 3 do 8 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

Tablica 1. Koncentracije PCB-153 (μM) koje inhibiraju proliferaciju CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Neutral Red* nakon 6 i 48 h

IC vrijednosti za PCB 153 na CHO-K1 stanicama / μM (metoda <i>Neutral Red</i>)	Vrijeme	
	6 h	48 h
IC ₂₀	51,05	46,41
IC ₅₀	90,61	79,21
IC ₈₀	118,83	102,38

4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM KENACID BLUE

Nakon provedene metode *Neutral Red* na istim CHO-K1 stanicama ispitan je učinak PCB-153 provođenjem *Kencid Blue* metode. Na Slici 9 prikazan je učinak PCB-153 na proliferaciju stanica praćen tijekom 6 i 48 h metodom *Kenacid Blue*. Nakon 6 h uočena je inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica tretiranih PCB-153 kod svih primjenjenih koncentracija PCB-153, međutim inhibicija nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolu. Nakon 48 h statistički značajna ($p < 0,001$) inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica određena je samo pri najvišim koncentracijama PCB-153 (75 μM i 100 μM).

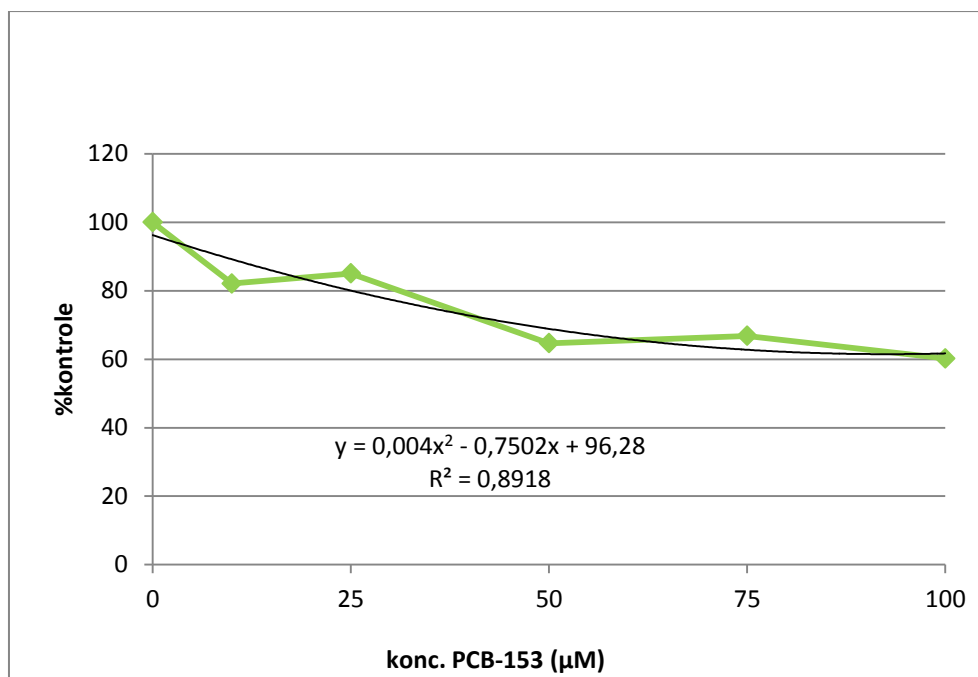


Slika 9. Citotoksični učinak PCB-153 na vijabilnost CHO-K1 stanica praćen metodom *Kenacid Blue* nakon 6 i 48 h inkubacije. K (D) – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj; koncentracija PCB-153 u mediju za uzgoj: PCB (10) – $10 \mu\text{M}$, PCB (25) – $25 \mu\text{M}$, PCB (50) – $50 \mu\text{M}$, PCB (75) – $75 \mu\text{M}$, PCB (100) – $100 \mu\text{M}$. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

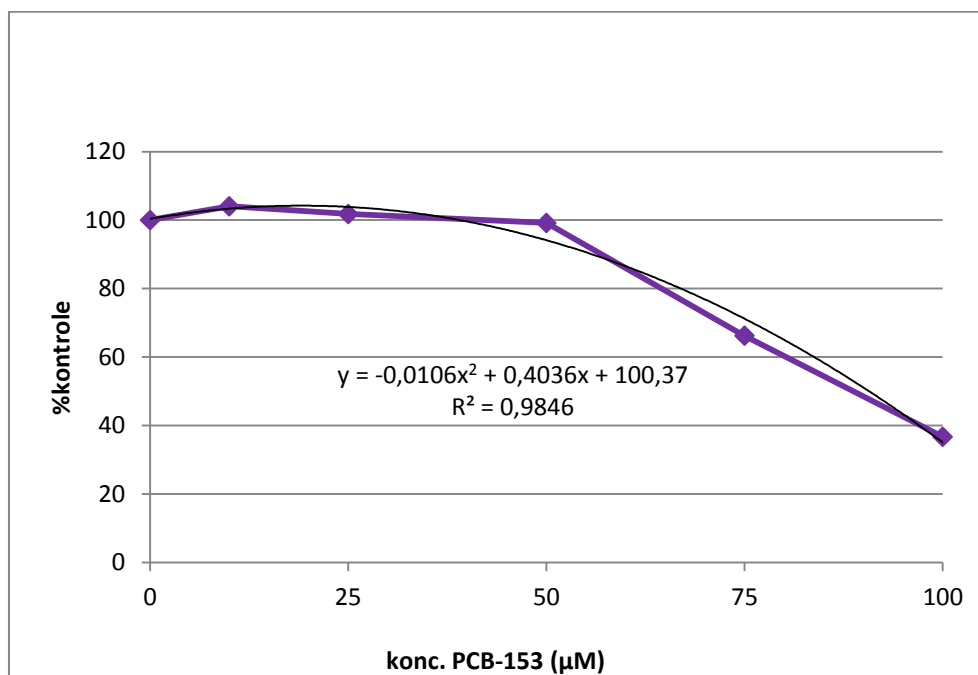
4.2.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom *Kenacid Blue*

Ovisnost preživljavanja CHO-K1 stanica o koncentraciji PCB-153 nakon 6 i 48 h tretmana određena metodom *Kenacid Blue* prikazana je na Slici 10. Raspon ispitanih doza PCB-153 je od 10 do 100 μM , a učinak pojedine doze određen je iz 3-8 mjerenja. Iz interpoliranih polinomnih krivulja izračunate su IC vrijednosti i prikazane u Tablici 2. IC₅₀ vrijednost za PCB-153 nakon 6 h veća je od najviše ispitane koncentracije PCB-153 te se ne može odrediti, a nakon 48 h iznosi 90,55 μM .

A



B



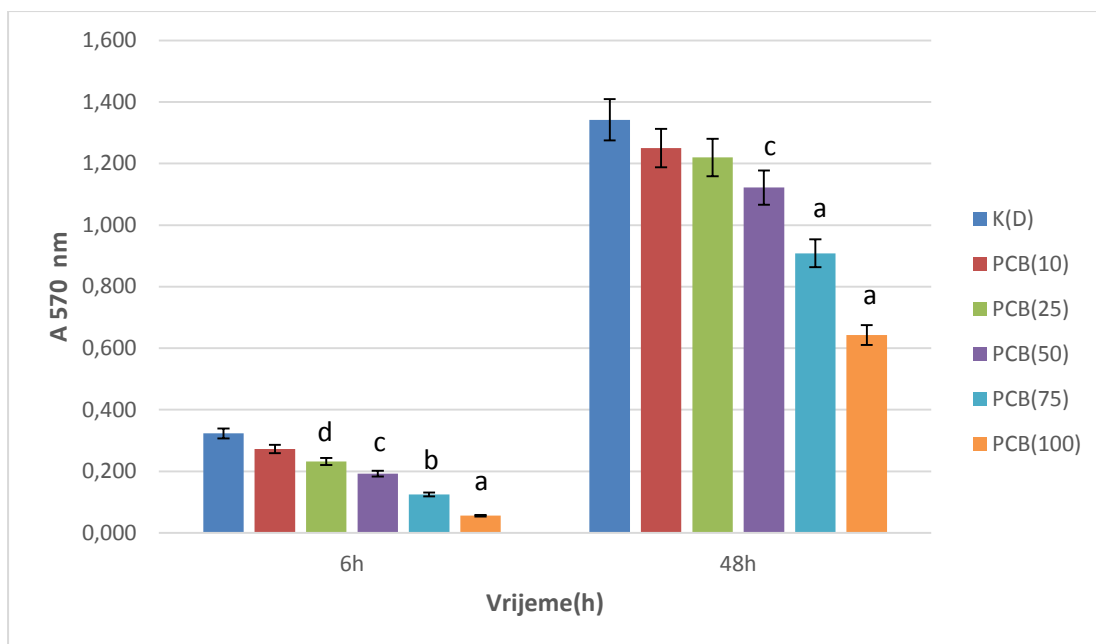
Slika 10. Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 6 (A) i 48 (B) sati uz tretman s 10-100 μM PCB-153 u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane DMSO-om) praćeno *Kenacid Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost određenu iz 3 do 8 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

Tablica 2. Koncentracije PCB-153 (μM) koje inhibiraju proliferaciju CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Kenacid Blue* nakon 6 i 48 h

IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 stanicama / μM (metoda <i>Kenacid Blue</i>)	Vrijeme	
	6 h	48 h
IC ₂₀	25,05	66,83
IC ₅₀	/	90,55
IC ₈₀	/	108,17

4.3. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM MTT

Pokusi za ispitivanje citotoksičnog učinka PCB-153 na dinamiku rasta stanica nakon 6 i 48 h metodom *MTT*, postavljeni su na identičan način kao pri praćenju citotoksičnosti PCB-153 metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue*. Inhibicija stanične proliferacije određena metodom *MTT* uočena je pri svim upotrijebljenim koncentracijama PCB-153 i nakon 6 h i nakon 48 h (iako nisu sve doze PCB-153 imale statistički značajan efekt) (Slika 11). Statistički značajna ($p < 0,001$ – $p < 0,05$) inhibicija PCB-153 na vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 6 h određena je kod koncentracija $\geq 25 \mu\text{M}$. Statistički značajan ($p < 0,001$ – $p < 0,025$) inhibicijski učinak nakon 48 h određen je pri koncentracijama PCB-153 $\geq 50 \mu\text{M}$.

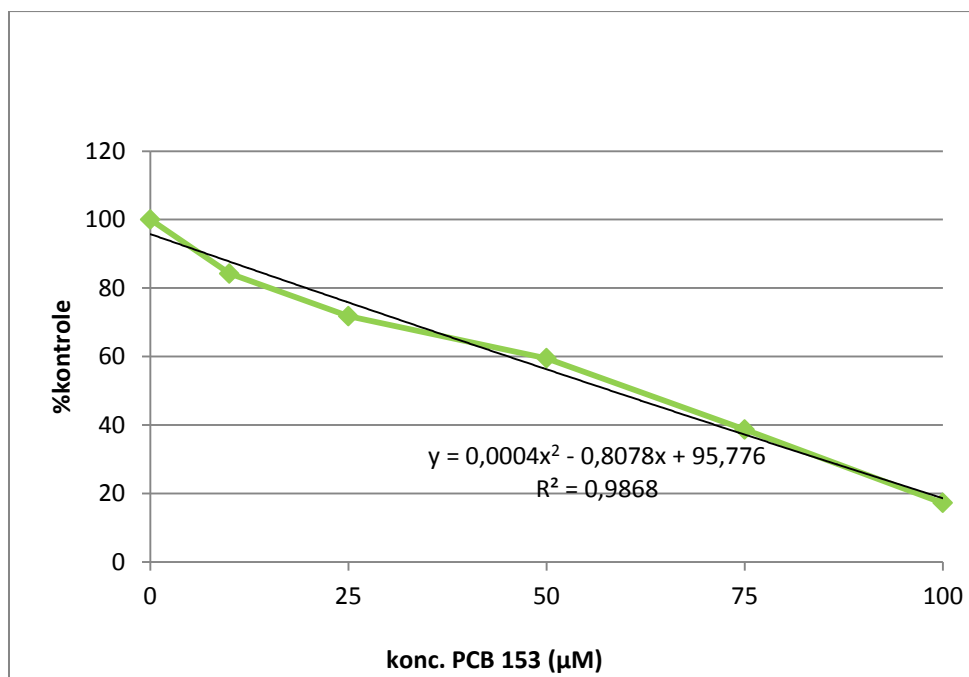


Slika 11. Citotoksični učinak PCB-153 na vijabilnost CHO-K1 stanica praćen metodom *MTT* nakon 6 i 48 h inkubacije. K (D) – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj; koncentracija PCB-153 u mediju za uzgoj: PCB (10) – $10 \mu\text{M}$, PCB (25) – $25 \mu\text{M}$, PCB (50) – $50 \mu\text{M}$, PCB (75) – $75 \mu\text{M}$, PCB (100) – $100 \mu\text{M}$. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,025$, ^d $p < 0,05$.

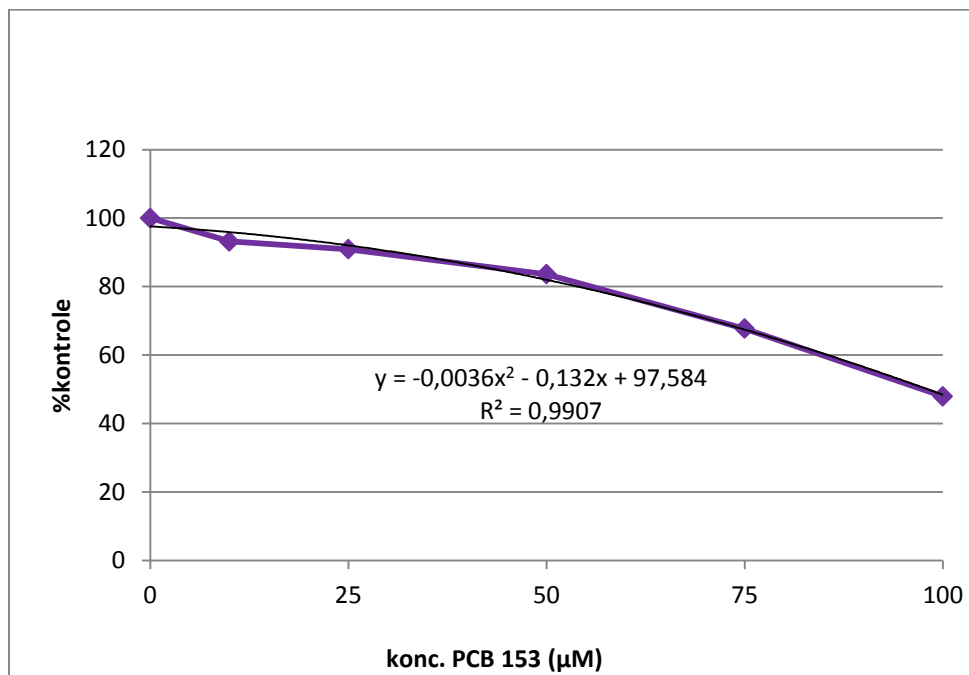
4.3.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom *MTT*

Ovisnost preživljavanja CHO-K1 stanica o koncentraciji PCB-153 nakon 6 i 48 h tretmana određena metodom *MTT* prikazana je na Slici 12. Učinak pojedine doze je određen iz 3-7 mjerenja. Iz interpoliranih polinomnih krivulja izračunate su IC_{20} , IC_{50} , IC_{80} vrijednosti i prikazane u Tablici 3. IC_{50} vrijednosti nakon 6 i 48 sati tretmana s PCB-153 određene metodom *MTT* iznose $58,35$ i $98,09 \mu\text{M}$.

A



B



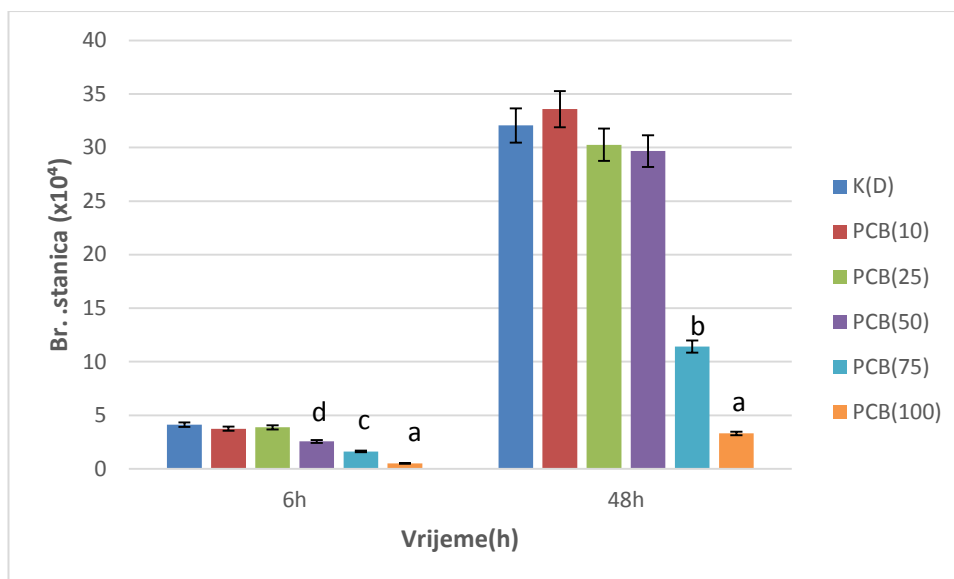
Slika 12. Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 6 (A) i 48 (B) sati uz tretman s 10-100 µM PCB-153 u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane DMSO-om) praćeno *MTT* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost određenu iz 3 do 7 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti

Tablica 3. Koncentracije PCB-153 (μM) koje inhibiraju proliferaciju CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *MTT* nakon 6 i 48 h

IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 stanicama / μM (metoda <i>MTT</i>)	Vrijeme	
	6 h	48 h
IC ₂₀	19,72	53,92
IC ₅₀	58,35	98,09
IC ₈₀	98,62	129,61

4.4. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODOM TRYPAN BLUE

Vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih s PCB-153 praćena je i metodom *Trypan Blue* (Slika 13). Pokusi su postavljeni identično kao i pri praćenju PCB-153 metodom *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *MTT*. Nakon 6 h primjećena je inhibicija stanične proliferacije kod svih primjenjenih koncentracija PCB-153 (10-100 μM), iako je samo kod nekih bila statistički značajna. Nakon 48 h uočen je citotoksični učinak PCB-153 pri koncentracijama $\geq 25 \mu\text{M}$ osim kod 10 μM gdje je broj stanica neznatno povišen u odnosu na kontrolne stanice tretirane s DMSO-om. Statistički značajna ($p < 0,001$ – $p < 0,025$) inhibicija PCB-153 na proliferaciju CHO-K1 stanica određena je kod koncentracija $\geq 50 \mu\text{M}$ nakon 6 h tretmana te koncentracija $\geq 75 \mu\text{M}$ nakon 48 h.

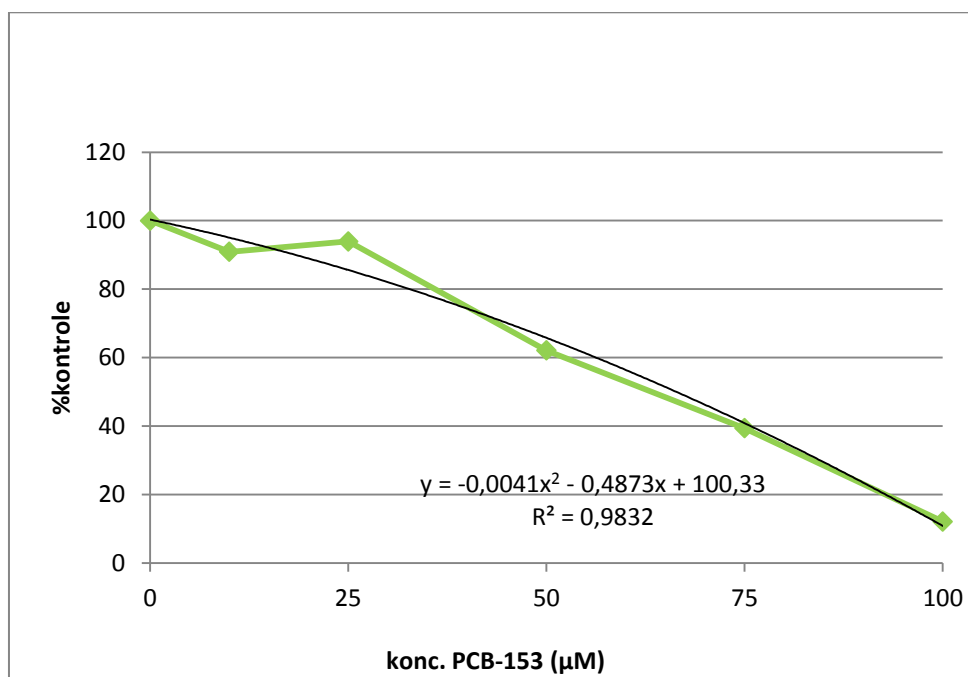


Slika 13. Citotoksični učinak PCB-153 na vijabilnost CHO-K1 stanica praćen metodom *Trypan Blue* nakon 6 i 48 h inkubacije. K (D) – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj; koncentracija PCB-153 u mediju za uzgoj: PCB (10) – $10 \mu\text{M}$, PCB (25) – $25 \mu\text{M}$, PCB (50) – $50 \mu\text{M}$, PCB (75) – $75 \mu\text{M}$, PCB (100) – $100 \mu\text{M}$. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,01$, ^d $p < 0,025$.

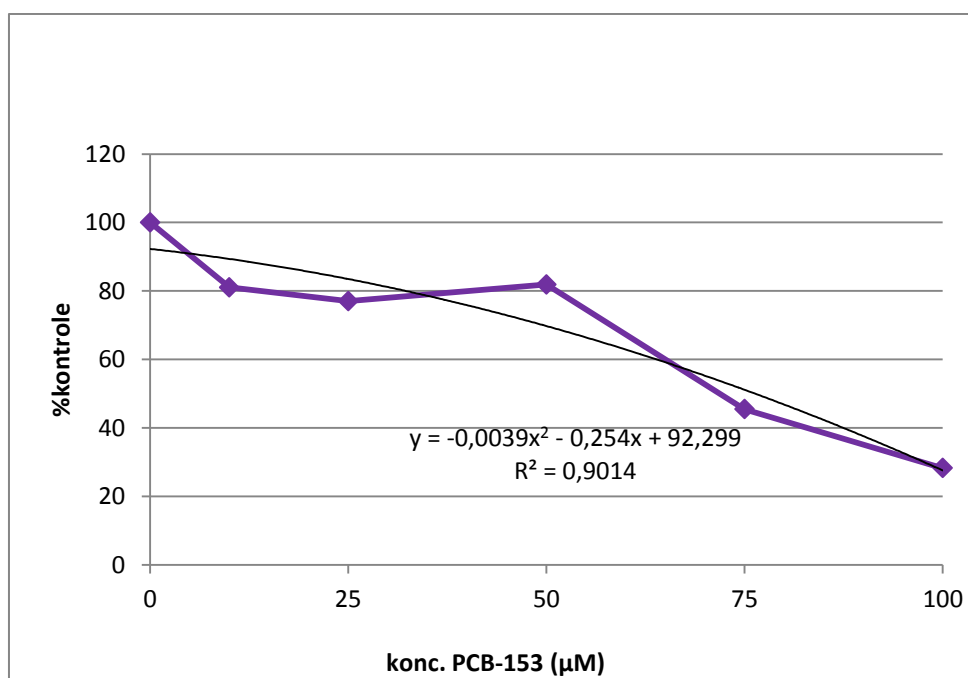
4.4.1. IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodom *Trypan Blue*

Na Slici 14 prikazana je ovisnost preživljavanja CHO-K1 stanica o koncentraciji PCB-153 nakon 6 i 48 h tretmana određena metodom *Trypan Blue*. Učinak pojedine doze (10-100 μM) PCB-153 je određen iz 3-4 mjerenja. U Tablici 4 prikazane su izračunate IC_{20} , IC_{50} , IC_{80} vrijednosti. IC_{50} vrijednosti nakon 6 i 48 sati tretmana s PCB-153 određene metodom *Trypan Blue* iznose 66,30 i 76,55 μM .

A



B



Slika 14. Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 6 (A) i 48 (B) sati uz tretman s 10-100 µM PCB-153 u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane DMSO-om) praćeno *Trypan Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost određenu iz 3 do 4 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

Tablica 4. Koncentracije PCB-153 (μM) koje inhibiraju proliferaciju CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Trypan Blue* nakon 6 i 48 h

IC vrijednosti za PCB-153 na CHO-K1 stanicama / μM (metoda <i>Trypan Blue</i>)	Vrijeme	
	6 h	48 h
IC ₂₀	32,71	32,35
IC ₅₀	66,30	76,55
IC ₈₀	92,64	107,43

4.5. UČINAK PCB-153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI PRAĆEN METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE

Stanice u kulturi mogu odumirati na različite načine a neki od njih su – apoptoza i nekroza. Apoptoza je primarni mehanizam kojim stanice bivaju eliminirane u organizmu, a naziva se još i „programirana stanična smrt“. Nasuprot tome nekroza se smatra pasivnim oblikom stanične smrti, a nastaje velikim oštećenjima u stanici uzrokovanim fizikalno-kemijskim agensima (Edinger i Thompson, 2004). Isti uzrok može dovesti i do apoptoze i nekroze. Ako integritet stanice nije ozbiljnije narušen stanica će ući u proces apoptoze odnosno program samouništenja, dok kod velikih oštećenja dolazi do nekroze. Koji će se od ova dva mehanizma pokrenuti ovisi o dugotrajnosti i jačini djelovanja uzroka oštećenja stanice. (Žlender, 2003). Za detekciju tipa stanične smrti uzrokovane tretmanom CHO-K1 stanica s PCB-153 u ovom radu korištena je protočna citometrija koja je provedena upotrebom *Muse Cell Analyzer*-a. Korišten je *Muse annexin V & dead cell assay kit* koji omogućava uočavanje stanica u različitim fazama apoptoze. Protein fosfatidil serin translocira se na površinu membrane stanice pri samom početku apoptoze i zato je pogodan za detekciju apoptoze u ranoj fazi. Na fosfatidil serin se veže aneksin V koji je označen fluorescentnom bojom fikoeritriinom (PE). Druga fluorescentna boja koju sadrži kit je 7-amino aktinomicin D (7-AAD), a zadržava se u mrtvim stanicama (Merck Millipore, 2017).

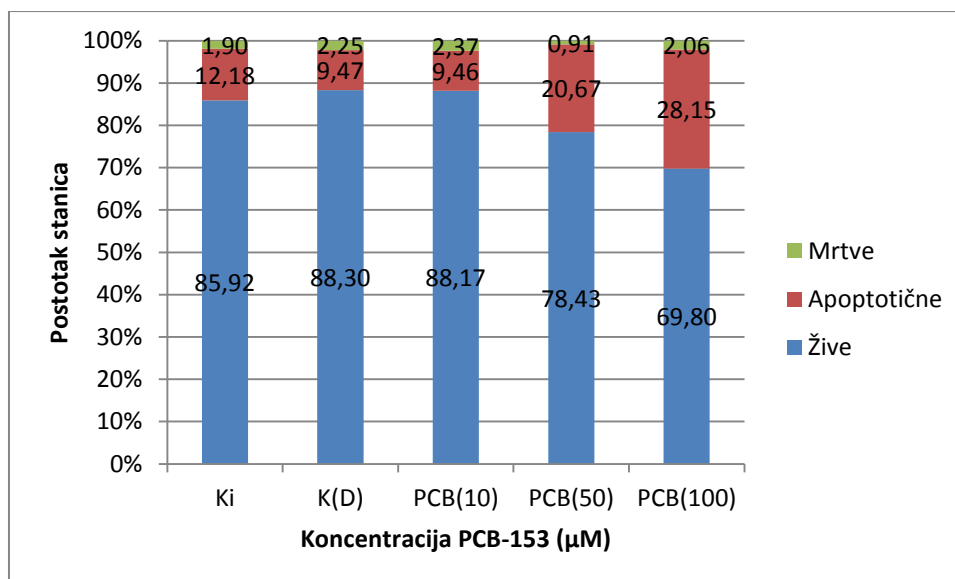
Na Slici 15 prikazane su srednje vrijednosti za udio stanica u kulturi koje su žive, u apoptozi (sumarno i stanice u ranoj i kasnoj fazi apoptoze) i mrtve nakon 6 (A) i 48 (B) h sa ili bez tretmana s PCB-153 - izračunato iz paralelnih mjerenja za svaku upotrijebljenu koncentraciju PCB-a odnosno kontrolnih uzoraka. Nakon 6 h tretmana sa 10 μM PCB-153 postotak živih stanica (88,17 %) i ukupnih stanica u apoptozi (9,46 %) je otprilike isti kao i kod intaktne kontrole (85,92 % živih i 12,18 % apoptotičnih) te kontrole s DMSO-om (88,30 % živih i 9,47% apoptotičnih), dok je kod koncentracije 50 i 100 μM PCB-153 vidljiv pad broja živih stanica (sa 78,43 % živih stanica nakon tretmana s 50 μM PCB-153 na 69,80 % pri tretmanu sa 100 μM PCB-153) te rast broja stanica u apoptozi proporcionalno koncentraciji (sa 20,67 % na 28,15 %). Broj mrtvih stanica je mali kod svih ispitanih koncentracija (0,91 %– 2,37 %). U istraživanju u kojem su neuralne stanice tretirane sa PCB-153, metodom određivanja DNA fragmentacije utvrđeno je da su također samo najviše koncentracije PCB-153 (50 i 100 μM) nakon 4 h tretmana povećale broj stanica u apoptozi u odnosu na kontrolu DMSO-om (Sánchez-Alonso i sur., 2003). Nakon 48 h pad broja živih

stanica (84,93 % – 57,15 %), rast broja ukupno apoptotičnih stanica (4,43 % – 9,43 %) i rast broja mrtvih stanica (10,65 % – 33,43 %) proporcionalni su porastu koncentracije PCB-153 (10-100 μM). Broj mrtvih stanica je znatno veći nakon 48 h tretmana (5,75 % – 33,43 %) u odnosu na 6 h (1,90 % – 2,37 %), dok je udio stanica u apoptozi veći nakon 6 h (9,46 % – 28,15 %) u odnosu na tretman s PCB-153 nakon 48 h (4,43 % – 9,43 %). Ovi rezultati su potvrdili hipotezu da se kod dužeg djelovanja PCB-153 induciraju veća oštećenja u stanici te do stanične smrti dolazi procesom nekroze, dok se kod kraćeg vremena izloženosti aktivira proces apoptoze.

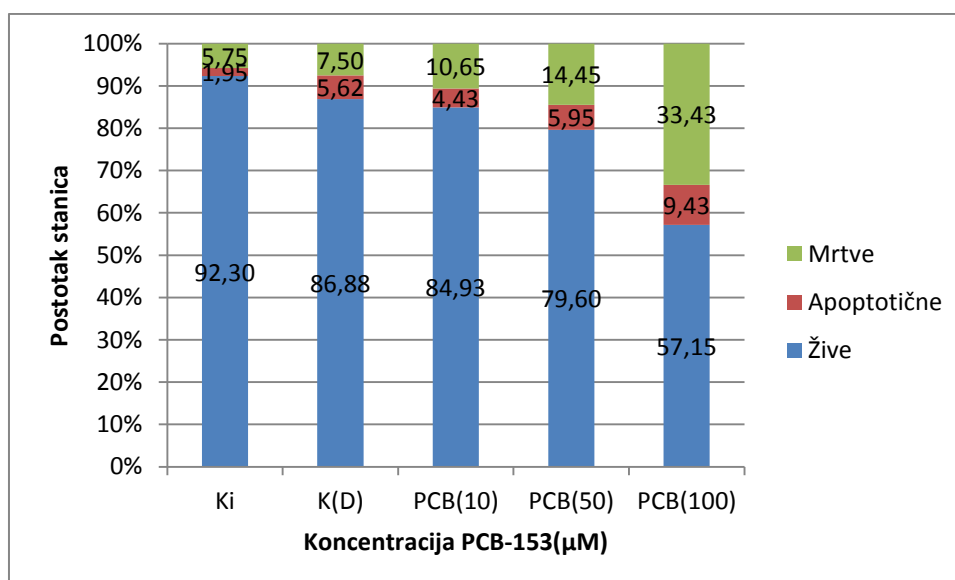
Na Slici 16 prikazani su reprezentativni uzorci *dot plot*-ova dobivenih primjenom protočne citometrije i *Muse annexin V & dead cell assay kit*-a na kojima su vidljive subpopulacije živih, apoptotičnih (u ranoj i kasnoj fazi apoptoze) i mrtvih CHO-K1 stanica (kontrolnih uzoraka i uzoraka stanica nakon 6 h tretmana s PCB-153). U donjem lijevom kvadrantu na *plot*-ovima nalazi se subpopulacija živih stanica koje su negativne na PE i 7-AAD. Dolje desno locirane su stanice koje su u ranoj fazi apoptoze, a pozitivne su na PE (imaju vezani aneksin V-PE na membranski protein fosfatidil serin), dok su 7-AAD negativne. Gore desno su stanice pozitivne i na PE i 7-AAD, a nalaze se u kasnoj apoptozi ili su mrtve (kao posljedica apoptoze ili nekroze). U gornjem lijevom kvadrantu nalazi se subpopulacija mrtvih stanica koje nisu umrle procesom apoptoze (pozitivne su na 7-AAD i negativne na PE). Postotak živih stanica nakon 6 h tretmana s 100 μM PCB-153 je značajno smanjen (65,51 %), a broj stanica koje su u ranoj i kasnoj apoptozi (17,84 % i 15,66 %,) je povećan u odnosu na kontrolne uzorke (netretirane stanice te stanice tretirane s DMSO-om). Također, udio stanica u fazi rane apoptoze je nešto veći i kod 50 μM PCB-153 u odnosu na kontrolne stanice. Frakcija mrtvih stanica nakon 6 h inkubacije je niska kod svih ispitanih koncentracija PCB-153 (0,99 % – 2,63 %) kao i u kontrolnim uzorcima.

Na Slici 17 prikazane su CHO-K1 stanice raspoređene u frakcije živih stanica, rano i kasno apoptotičnih te mrtvih stanica (u obliku reprezentativnih uzoraka *dot plot*-ova) nakon 48 h inkubacije s ili bez PCB-153. Udio živih stanica u kulturi se smanjuje povećanjem koncentracije PCB-153 (86,45 % živih stanica nakon tretmana s 10 μM PCB-153; 48,6 % živih stanica nakon tretmana s 100 μM PCB-153). U fazi rane apoptoze općenito – nalazi se mali postotak stanica (0,10 % – 2,35 %). Proporcionalno povećanju doze PCB-153 povećavaju se frakcije stanica u fazi kasne apoptoze i mrtvih stanica (nekroza).

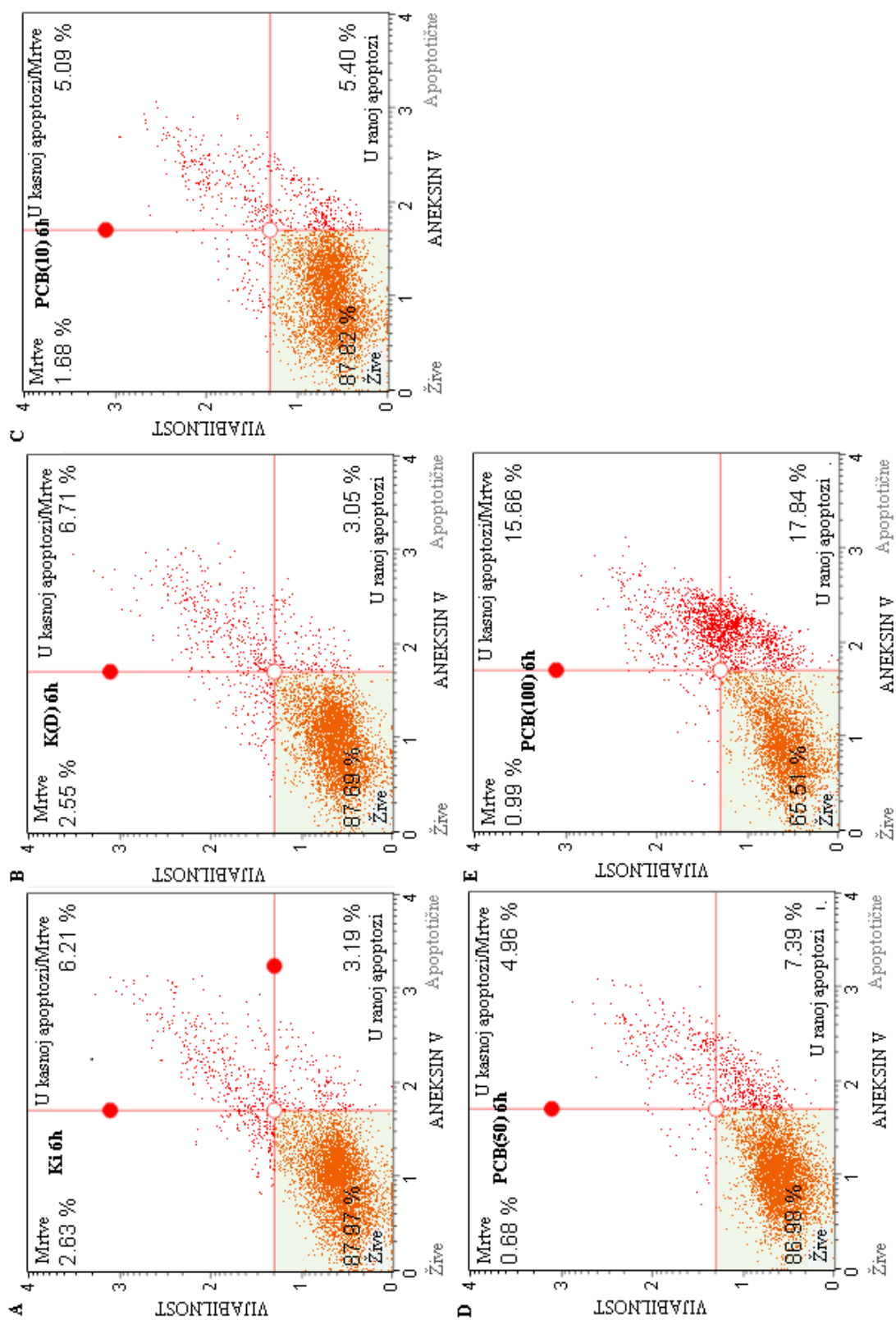
A



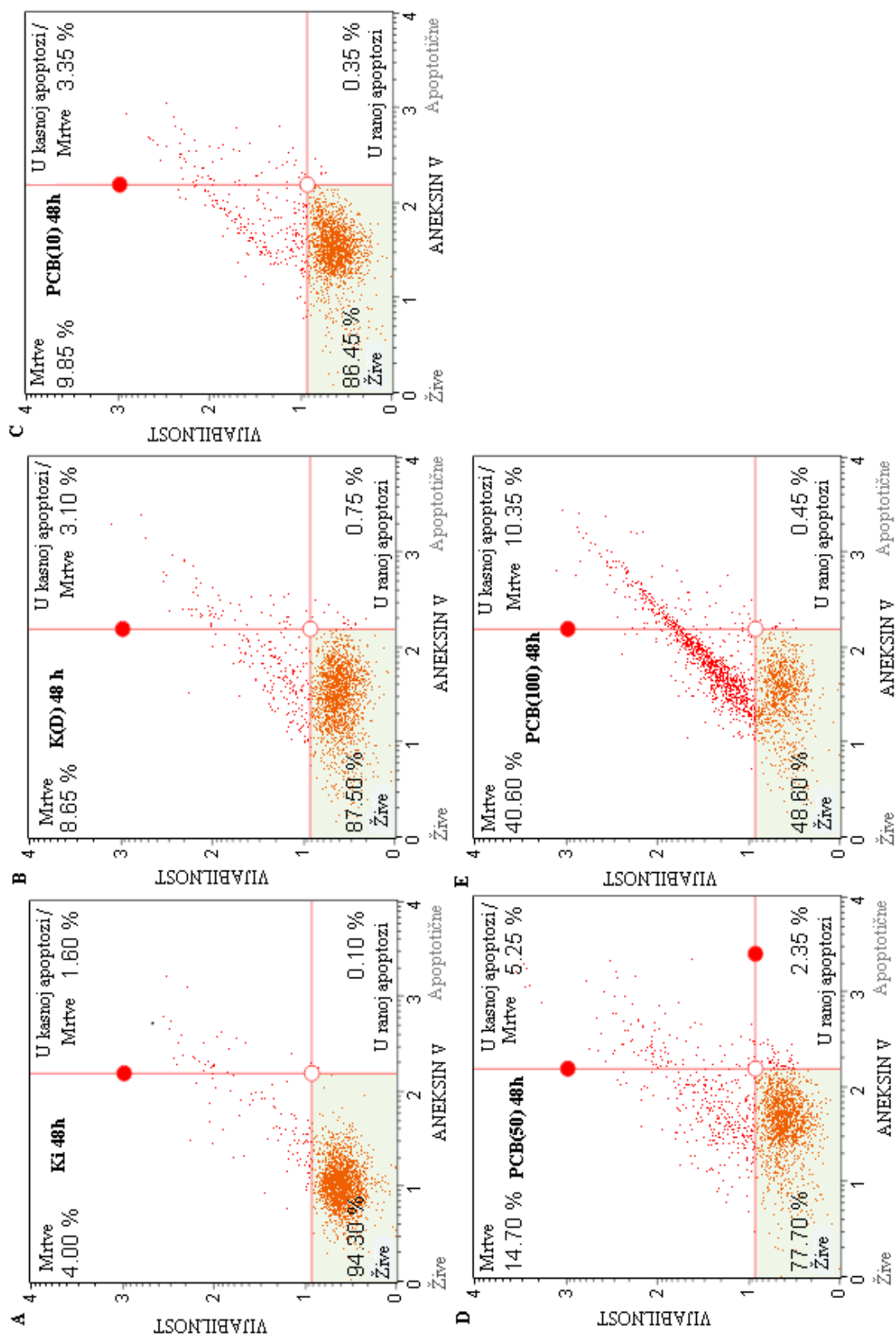
B



Slika 15. Postotak živih, apoptotičnih i mrtvih CHO-K1 stanica određenih protočnom citometrijom nakon 6 h (A) i 48h (B) tretmana s PCB-153. Ki – intaktna kontrola, K(D) – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji 10 µL mL⁻¹ medija za uzgoj, koncentracije PCB-153 u mediju za uzgoj: PCB (10) – 10 µM, PCB (50) – 50 µM, PCB (100) – 100 µM.



Slika 16. Dot plotovi dobiveni metodom protodne citometrije nakon 6 h inkubacije stanica s ili bez PCB-153, na kojima su vidljive subpopulacije živih, rano apoptotičnih, kasno apoptotičnih i mrtvih stanica (kontrolnih uzoraka: intaktna kontrola (A) i stanice tretirane s 10 μM DMSO mL^{-1} medija za uzgoj (B); te uzoraka stanica tretiranih s različitim koncentracijama PCB-153: 10 μM (C), 50 μM (D) i 100 μM (E)).



Slika 17. Dot plotovi dobiveni metodom protočne citometrije nakon 48 h inkubacije stanica s ili bez PCB-153, na kojima su vidljive subpopulacije živih, rano apoptotičnih, kasno apoptotičnih i mrtvih stanica (kontrolnih uzoraka: intaktna kontrola (A) i stanice tretirane s 10 μM DMSO mL^{-1} medija za uzgoj (B)) te uzoraka stanica tretiranih s različitim koncentracijama PCB-153: 10 μM (C), 50 μM (D) i 100 μM (E).

4.6. USPOREDBA CITOTOKSIČNIH UČINAKA PCB-153 ODREĐENIH RAZLIČITIM METODAMA

Rezultati istraživanja potvrđuju da su metode *Neutral Red* i *Kenacid Blue* u korelaciji kod mjerenja vijabilnosti stanica za većinu kemikalija, a male razlike u rezultatima mogu se pripisati učincima toksikanata na povećanje količine ukupnih staničnih proteina izmjerenih metodom *Kenacid Blue* i/ili povećanju broja ili veličine lizosoma u kojima se nakuplja boja *Neutral Red* (Riddell i sur., 1986). Boje velike molekulske mase kao što je *Trypan Blue* prodiru u stanicu čiji je integritet stanične membrane narušen (Strober, 2015) i stoga su mrtve stanice obojane plavo. S obzirom da je princip metode *Trypan Blue* drugačiji u usporedbi s do sada spomenutim metodama, očekivano su i IC vrijednosti nešto drugačije. Kod određivanja toksičnog učinka nekih kemikalija uočene su razlike u rezultatima uspoređujući ove i druge metode što je rezultat utjecaja kemikalije na različite specifične mehanizme u stanici (Chiba i sur., 1998). Neki znanstvenici tvrde da se pojedine metode (npr. *Neutral Red* i *MTT*) mogu uspoređivati bez obzira što se tim metodama vijabilnost stanica određuje putem drugog mehanizma u stanici i što ispitivan spoj može interferirati sa tim mehanizmom (Borenfreund i sur., 1988). Vijabilnost stanica određenih *MTT* metodom u standardnim uvjetima rasta poklapa se s količinom reducirane tetrazolijeve soli u formazan, no i tu može doći do „greške“ jer *MTT* metoda zapravo daje informaciju o generalnoj metaboličkoj aktivnosti odnosno o produkciji NADH, a ne o broju stanica, s obzirom da je NADH potreban za redukciju *MTT*-a do ljubičastog formazana (Berridge i sur., 2005). Vrijednosti za IC_{50} u ovom radu određene metodom *MTT* ne koreliraju s rezultatima dobivenim metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue* - IC_{50} određena metodom *MTT* nakon 6 h je znatno manja od IC_{50} za 48 h, a rezultati dobiveni metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue* su pokazali suprotno (*Neutral Red*: IC_{50} za 6 h 90,61 μ M, a za 48 h 79,21 μ M; *Kenacid Blue*: IC_{50} za 6 h nije moguće odrediti – viša je od najviše doze PCB-153, a za 48 h 90,55 μ M). Moguće je da su razlike u rezultatima kod *MTT* metode u odnosu na druge metode rezultat utjecaja PCB-153 na metaboličke procese u CHO-K1 stanicama, čime se interferira s mehanizmom određivanja vijabilnosti ovom metodom. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nakon 6 h tretmana nije došlo do statistički značajnog utjecaja 25 μ M PCB-153 na vijabilnost CHO-K1 stanica određeno metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue* (Slike 7, 9, 13), dok i nakon dulje inkubacije – 48 h kod te koncentracije PCB-153 nije određen toksični učinak na vijabilnost stanica (Slike 9, 11, 13) osim s metodom *Neutral Red* (Slika 7). Druga istraživanja također su pokazala da pojedini kongeneri PCB-a u

koncentracijama nižim od 20 μM ne pokazuju značajan inhibitorni učinak na vijabilnost stanica. Tako u istraživanju Bonfeld-Jørgensen i sur. (2001) je utvrđeno da PCB-153 nije imao toksični učinak na vijabilnost CHO-K1 stanica nakon tretmana 24 h kod primjenjene doze 1-18 μM utvrđeno *Amar Blue* metodom. Citotoksični učinak viših doza PCB-153 u ovom radu je dokazan svim metodama. Nakon 6 i 48 h tretmana PCB-153 je statistički značajno inhibirao staničnu proliferaciju što je utvrđeno sa sve četiri metode pri koncentracijama 75 i 100 μM (a kod nekih slučajeva i u manjim koncentracijama), izuzev kod metode *Kenacid Blue* nakon 6h. U istraživanju na CHO-K1 stanicama koje su tretirane sa 75 μM PCB-153 tijekom 24 h utvrđena je toksičnost na vijabilnost stanica metodom *Trypan Blue*, *Neutral Red* i *Kenacid Blue* (Murati i sur., 2017), što je potvrđeno i u ovom radu. Metodom protočne citometrije utvrđeno je da PCB-153 nakon tretmana 6 h primarno inducira apoptozu, dok nakon produženog tretmana – 48 h do stanične smrti većinom dolazi nekrozom. Literaturni podaci također donose moguće mehanizme citotoksičnih učinaka PCB-a. U istraživanju na stanicama ovarija kineskog hrčka utvrđeno je da se 3 neplanarna *di-ortho* PCB-a koji su supstituirani s više atoma klora među kojima je i PCB-153 mogu natjecati za vezna mjesta dva nuklearna receptora (estrogeni i androgeni receptor) s prirodnim ligandom, što bi mogao biti dominantni mehanizam toksičnog učinka PCB-153 na endokrini sustav (Dutta i sur., 2012). Endokrino modulirajući učinci (npr. smanjena/povećana sekrecija progesterona i povećano lučenje testosterona nakon tretmana s PCB-ima) potvrđeni su i drugim znanstvenim istraživanjima (Agustowska i sur., 2001; Gregoraszczyk i Wójtowicz, 2002). Toksični učinak na vijabilnost lutealnih stanica, utvrđen *LDH* metodom, zapažen je već kod niskih doza PCB-153: 50 i 100 ng ml^{-1} (Agustowska i sur., 2001). U drugim istraživanjima dokazani su toksični učinci PCB-153 na vijabilnost neuralnih stanica utvrđeno *LDH* metodom (Sánchez-Alonso i sur., 2003); na vijabilnost Vero stanica (izoliranih iz kore bubrega afričkog zelenog majmuna) utvrđeno *MTT* metodom gdje je metoda protočne citometrije dodatno pokazala da je do stanične smrti došlo apoptozom (Shen i sur., 2010); na vijabilnost stanica bubrega i jetre utvrđeno *Trypan Blue* metodom dok je metodom protočne citometrije dokazano da je stanična smrt uzrokovana apoptotičnim putem (Gosh i sur., 2010); na vijabilnost mišjih i ljudskih hondrocita (stanica hrskavičnog tkiva) utvrđeno metodom *MTT* dok je u ovom slučaju nekroza utvrđena kao dominantni tip odumiranja stanica (Abella i sur., 2015). PCB-153 inducira nekrozu i nakon 24 h izloženosti stanica štitine žlijezde u koncentraciji 75 μM utvrđeno protočnom citometrijom, a toksični učinak na vijabilnost tih stanica je potvrđen i *Trypan Blue* metodom (Johansson i sur., 2006). 3 neplanarna PCB-a (među kojima je bio i PCB-153) imala su utjecaj na smanjenje vijabilnosti mišjih stanica -

makrofaga u ovisnosti o koncentracij (1-10 μ M) nakon tretmana 24 h određeno metodom MTT te je uz to utvrđena stanična smrt apoptozom metodom DNA fragmentacije. Osim toga u ovom radu primjećeno je da kod nižih koncentracija kod kojih svaki od 3 pojedinačno testirana PCB-a nije iducirao apoptozu njihova je kombinacija ipak rezultirala staničnim odumiranjem putem apoptoze (Ferrante i sur., 2010). Uzimajući u obzir rezultate svih navedenih istraživanja može se zaključiti da PCB-153 ima toksični učinak na endokrini sustav, kod različitih stanica remeti lučenje hormona i ima toksični učinak na vijabilnost stanica u ovisnosti o primjenjenoj dozi, inducira staničnu smrt – apoptozu i/ili nekrozu što je većim dijelom potvrđeno i kod CHO-K1 stanica ovarija kineskog hrčka u ovom istraživanju.

5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO-K1), uz primjenu metoda *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*, pokazala se kao zadovoljavajući alternativni test sustav u praćenja toksičnosti PCB-153.
2. Statistički značajna inhibicija stanične proliferacije PCB-153 određena metodom *Neutral Red* nakon 6 h tretmana određena je pri 75 μM ($p < 0,025$) i 100 μM ($p < 0,001$), a nakon 48 h tretmana pri 25 i 50 μM ($p < 0,005$) te 75 i 100 μM ($p < 0,001$).
3. Metodom *Kenacid Blue* nakon 6 h inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica tretiranih PCB-153 nije statistički značajna u odnosu na kontrolu, dok je nakon 48 h određena samo pri najvišim koncentracijama PCB-153 (75 μM i 100 μM ($p < 0,001$)).
4. Statistički značajna inhibicija PCB-153 na proliferaciju stanica određena metodom *MTT* nakon 6 h određena je kod koncentracija 25 μM ($p < 0,05$), 50 μM ($p < 0,025$), 75 μM ($p < 0,005$) i 100 μM PCB-153 ($p < 0,001$), a nakon 48 h određena je pri koncentracijama 50 μM ($p < 0,025$), 75 μM ($p < 0,001$) i 100 μM ($p < 0,001$).
5. Statistički značajna inhibicija PCB-153 metodom *Trypan Blue* na proliferaciju CHO-K1 stanica određena je kod koncentracija 50 μM ($p < 0,025$), 75 μM ($p < 0,01$) i 100 μM ($p < 0,001$) nakon 6 h te koncentracija 75 μM ($p < 0,005$) i 100 μM ($p < 0,001$) nakon 48 h tretmana.
6. IC_{50} vrijednosti za PCB-153 određene metodom *Neutral Red* nakon 6 i 48 h iznose 90,61 μM i 79,21 μM , dok se IC_{50} vrijednosti metodom *Kenacid Blue* nakon 6 h ne može odrediti (viša je od najviše primjenjene koncentracije PCB-153), a nakon 48 h iznosi 90,55 μM . IC_{50} vrijednosti određene metodom *MTT* iznose 58,35 i 98,09 μM za 6 h i 48 h, a metodom *Trypan Blue* IC_{50} vrijednosti za 6 h i 48 h su 66,30 i 76,55 μM . IC_{50} vrijednosti određene različitim *in vitro* metodama međusobno se razlikuju ovisno o principu na kojem se određena metoda temelji.
7. Metodom protočne citometrije utvrđeno je da se nakon 6 h tretmana s PCB-153 povećava udio apoptotičnih stanica u kulturi (12,18 % – 28,15 %) proporcionalno koncentraciji PCB-a, a nakon 48 h udio nekrotičnih stanica (5,75 % – 33,43 %).

6. LITERATURA

Abcam (2017) Introduction to flow cytometry, <<http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>>. Pristupljeno 26. veljače 2017.

Abella, V., Santoro, A., Scotece, M., Conde, J., López-López, V., Lazzaro, V., Gómez-Reino, J. J., Meli, R., Gualillo, O. (2015) Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153, PCB 180) induce chondrocyte cell death through multiple pathways. *Toxicol. Lett.* **234**, 13-19.

Agustowska, K., Wójtowicz, A., Kajta, M., Ropstad, E., Gregoraszczyk, E. L. (2001) Polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) action on proliferation and progesterone secretion by cultured in vitro porcine luteal cells. *Exp. Clin. Endocr. Diab.* **109**, 416-415.

Al-Salman, F., Plant, N. (2012) Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct antagonist for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner. *Toxicol. Appl. Pharm.* **263**, 7-13.

Annamalai, J., Namasivayam, V. (2015) Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ. Int.* **76**, 78-97.

ATCC (2016) Cell biology, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx>>. Pristupljeno 8. veljače 2017.

Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 127-152.

Bonefeld-Jørgensen, E. C., Andersen, H. R., Rasmussen, T. H., Vinqgaard, A. M. (2001) Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* **158**, 141-153.

Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alquacil, N. (1988) Comparison of two in vitro cytotoxicity assays – The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro.* **2**, 1-6.

Brown, M., Wittwer, C. (2000) Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* **46**, 1221-1229.

Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G. (2010) Dioxin like PCB-s and endometriosis. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 132-146.

Cell signaling (2017) Flow cytometry. Cell signaling technology, <<https://www.cellsignal.com/contents/resources-applications/flow-cytometry/apps-flow-cytometry>> Pristupljeno 15. svibnja 2017.

Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. (1998) Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. In Vitro.* **12**, 251-258.

Chen, Y. C., Yu, M. L., Rogan, W. J., Gladen, B. C., Hsu, C. C. (1994) A 6 year follow-up of behavior and activity disorder in the Tajvan Yu-cheng children. *Am. J. Public Health* **84**, 415-421.

Demchenko A., P. (2013) Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* **65**, 157-172.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourquignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* **30**, 293-342.

Domingo, J. L., Bocio, A. (2007) Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environ. Int.* **33**, 397-405.

Dutta, S. K., Mitra, P. S., Ghosh, S., Zang, S., Sonneborn, D., Hertz-Picciotto, I., Trnovec, T., Palkovicova, L., Sovcikova, E., Ghimbovschi, S., Hoffman, E. P. (2012) Differential gene expression and a functional analysis of PCB-exposed children: Understanding disease and disorder development. *Environ. Int.* **40**, 143-154.

Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663-669.

Ferrante, M. C., Raso, G. M., Esposito, E., Bianco, G., Iacono, A., Clausi, M. T., Amero, P., Santoro, A., Simeoli, R., Autore, G., Meli, R. (2011) Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153, PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. *Toxicol. Lett.* **202**, 61-68.

Freshney, R. I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Gillette, R., Reilly, M. P., Tropper, V. Y., Tompson, L. M., Crews, D., Gore, A. C. (2017) Anxiety-like behaviors in adulthood are altered in male but not female rats exposed to low dosages of polychlorinated biphenyls in utero. *Horm. Behav.* **87**, 8-15.

Gosh, S., De, S., Chen, Y., Sutton, D. C., Ayorinde, F., Dutta, S. K. (2010) Polychlorinated biphenyls (PCB 153) and (PCB 77) absorption in human liver (HepG2) and kidney (HK2) cells in vitro: PCB levels and cell death. *Environ. Int.* **36**, 893-900.

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari J., Zoeller, R. T. (2015) EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* [online] **36**, 1-150. PubMed, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26544531>>. Pristupljeno 19. ožujka 2017.

Gregoraszczyk, E. L., Wójtowicz, A. K. (2002) In vitro exposure of porcine ovarian follicular cells to PCB 153 alters steroid secretion but not their viability – preliminary study. *Sci. World J.* **29**, 261-167.

Guillard, R. R. L., Sieracki, M. S. (2005) *Counting cells in cultures with the light microscope*. U: *Algal culturing techniques* (Andersen, R. A., ured.), Elsevier academic press, SAD, str. 246.

Hauser, R., Williams, P., Altshul, L., Calafat, A. M. (2005) Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalates in relation tu human sperm molility. *Environ. Health Persp.* **113**, 425-430.

Herrick, R. F., McClean, M. D., Meeker, J. D., Baxter, L. K., Weymouth, G. A. (2004) An unrecognized source of PCB contamination is schools and other buildings. *Environ. Health Persp.* **112**, 1051-1053.

Johansson, C., Tofighi, R., Tamm, C., Goldoni, M., Mutti, A., Ceccatelli, S. (2006) Cell death mechanisms in AtT20 pituitary cells exposed to polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) and methylmercury. *Toxicol. Lett.* **167**, 183-190.

Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J., Yamaguchi, A. (1972) Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Persp.* **1**, 119-128.

La Rocca, C., Mantovani, A. (2006) From environment to food: the case of PCB. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **42**, 410-416.

Lim S. W., Loh H. S., Ting K. N., Bradshaw T. D., Allaudin Z. N. (2015) Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Trop. Life Sci. Res.* **26**, 111-120.

Liu, S., Li, S., Du, Y. (2010) Polychlorinated biphenyls (PCBs) enhance metastatic properties of breast cancer cells by activating Rho-associated kinase (ROCK). *Plos One* [online] **5**, 11272. PubMed, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585605>>. Pristupljeno 20. ožujka 2017.

Meeker, J. D., Hauser, R. (2010) Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 122-131.

Merck Millipore (2017) Muse Cell Analyzer, <<http://www.merckmillipore.com/muse>>. Pristupljeno 19. veljače 2017.

Mills, S. A., Thal, D. I., Barney, J. (2007) A summary of the 209 PCB congener nomenclature. *Chemosphere* **68**, 1603-1612.

Murati, T., Šimić, B., Pleadin, J., Vukmirović, M., Miletić, M., Durgo, K., Kniewald, J., Kmetič, I. (2017) Reduced cytotoxicity in PCB-exposed chinese hamster ovary (CHO) cells pretreated with vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* **99**, 17-23.

Naville, D., Pinteur, C., Vega, N., Menade, Y., Vigier, M., Le Bourdais, A., Labaronne, E., Debard, C., Luquain-Costaz, C., Begeot, M., Vidal, H., Le Maqueresse-Battistoni, B. (2013) Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *Faseb. J.* **27**, 3860-3870.

Riddell, R. L., Clothier, R. H., Balls, M. (1986) An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 469-471.

R&D Systems (2017) Analysis of cell viability using 7-amino actinomycin D. <<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/analysis-cell-viability-using-7-amino-actinomycin-d-7-aad>>. Pristupljeno 22. veljače 2017.

Safe, S. H. (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 87-149.

Safe, S. H. (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanism of action. *Crit. Rev. Toxicol.* **13**, 319-395.

Sánchez-Alonso, J. A., López-Aparicio, P., Recio, M. N., Pérez-Albarsanz, M. A. (2003) Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. *Toxicol. Lett.* **144**, 337-349.

Shen, K., Shen, C., Chen, L., Chen, X., Chen, Y. (2010) Morphological alternations of vero cells exposed to coplanar PCB 126 and noncoplanar PCB 153. *Environ. Toxicol.* **27**, 26-31.

SPH (2003) Endocrine disruptors: Toxicokinetics. SPH - School of Public Health, University of Minnesota, <<http://enhs.umn.edu/current/5103/endocrine/toxicokinetics.html>>. Pristupljeno 23. ožujaka, 2017.

Strober, W. (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, 1-3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111

Tice, R. R., Aquarell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.

Toft, G., Hagmar, L., Giwercman, A., Bonde, J. P. (2004) Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reprod. Toxicol.* **19**, 5-26.

van Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. M. (1998) Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**, 1-9.

Verner, M. A., Andersen, M. E., Clewell H. J., Longnecker, M. P. (2014) Prenatal PCB-153 exposure and decreased birth weight: Verner et al. Respond. *Environ. Health Persp.* [online]

122, 89-90. PubMed, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691074>> Pristupljeno 21. ožujka 2017.

Xu, C. X., Wang, C., Zhang, Z. M., Jaeger, C. D., Krager, S. L., Bottum, K. M., Liu, J., Liao, D. F., Tischkau, S.A. (2015) Aryl hydrocarbon receptor deficiency protects mice from diet-induced adiposity and metabolic disorders through increased energy expenditure. *Int. J. Obesity* **39**, 1300-1309.

Zhang, J., Jiang, Y., Zhou, J., Fang, D., Jiang, J., Liu, G., Zhang, H., Xie, J., Huang, W., Zhang, J., Li, H., Wang, Z., Pan, L. (2008) Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China. *Environ. Int.* **34**, 799-803.

Zhang, Q., Lu, M., Wang, C., Du, J., Zhou, P., Zhao, M. (2014) Characterization of estrogen receptor α activities in polychlorinated biphenyls by in vitro dual-luciferase reporter gene assay. *Environ. Pollut.* **189**, 169-175.

Žlender V. (2003) Apoptosis – programmed cell death. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **54**, 267-274.

7. PRILOZI

Prilog 1. Koncentracija planarnih PCB kongenera u hrani, u Kini u gradu Schenzen-u (Zhang i sur., 2008).

Grupa namirnica	Planarni PCB (pg WHO-TEQ g ⁻¹ ¹) (srednja vrijednost) ^a	Planarni PCB (ng g ⁻¹ ^a)
Riba	5,38	4158,1
Svinjetina	0,18	42,4
Govedina	0,32	284,3
Ovčetina	0,06	79,6
Piletina	0,36	431,4
Pačetina	0,17	88,0
Povrće	0,0004	1,21
Jaja	1,14	1960,0
Mlijeko u prahu	0,16	178,4
Biljno ulje	0,012	3,1
Žitarice	0,002	3,85

^a izraženo na masu masnog tkiva ili svježju masu za povrće

Prilog 2. Sumarni prikaz literature za zabrinjavajuće razine PCB kongenera u ribi i plodovima mora koji su dio ljudske prehrane (prema Domingo i Bocio, 2007).

Područje ulova/ tržište	Analizirane morske vrste	Koncentracija PCB-a
Jadransko more	lignje, dagnje, jastog, školjke	0,07-0,25 pg I-TEQ g ⁻¹ ww
Jadransko more	Skuša>crveni cipal>srđela	0,23-1,07 pg I-TEQ g ⁻¹ ww ^a
Finska	Losos, pastrva, tuna, bakalar,	1,5 pg WHO-TEQ g ⁻¹ ww
Baltiĉko more	Razliĉita riba	0,8 (manić)-15.6 (losos) pg WHO-TEQ g ⁻¹ ww
Katalonija, Španjolska	Oslić, srđela, dagnje,	0,25 (oslić), 2,45 (srđela), 0,35 (dagnje) pg WHO-TEQ g ⁻¹ ww
Koreanske priobalne vode	40 vrsta (riba, rakovi, glavonošci, školjkaši, puževi)	Planarni PCB: 0,008-0.6 pg WHO TEQ g ⁻¹ ww
Ismailia, Egipat	Cipal, nilska tilapija, školjkaši i rakovi	Planarni PCB: 0,14-0,76 pg WHO-TEQ g ⁻¹ ww
Jadransko i Jonsko more	Razliĉita riba, glavonošci, školjkaši i rakovi	Srednje vrijednosti (17 PCB-a): 4,54; 0,33; 4,31 i 4.69 ng g ⁻¹ ww
Razliĉito europsko tržište	Školjke iz uzgoja	Srednja vrijednost: 4,8 (1,6-15,4) ng g ⁻¹ ww
Talijanska obala Jadranskog mora	Dagnje, jastog, crveni cipal, sipa, lignje, sardela, skuša	7 PCB-a: 0,73 (sipa)-20,8 (skuša) ng g ⁻¹ ww
Kina	Riba i drugi plodovi mora	0,20 (jastog i dagnje)-2,5 (skuša) ng g ⁻¹ ww
Kina (iz 3 supermarketa)	Riba i školjke	Prosjeĉno 3,60 ng g ⁻¹ ww (8,04 (list)-0,83 (sipa) ng g ⁻¹ ww)
Obala Kalifornije, SAD	Razliĉite vrste	3 planarna PCB-a: srednja vrijednost 109 pg I-TEQ g ⁻¹ lw ^b
Mramorno more	Razliĉite vrste	63,30-508,71 ng g ⁻¹ lw
Napuljski zaljev, Italija	10 razliĉitih vrsta	20 PCB-a: 407 (hobotnica)-22287 (grgeĉ) ng g ⁻¹ lw

^aww – masa svježe namirnice (*wet weight*)

^blw – masa masnog tkiva (*lipid weight*) ispitivane namirnice

Prilog 3. Procijenjeni unos planarnih PCB kongenera u Kini za populaciju u gradu Schenzen-
u (Zhang i sur., 2008).

Grupa namirnica	Konzumacija hrane (g/dan) ^a	Dnevni unos (pg WHO-TEQ/ dan)	Tjedni unos (pg WHO-TEQ/kg TM/ tjedan) ^b	Mjesečni unos (pg WHO-TEQ/ kg TM/ mjesec
Riba	109,1	37,1	4,33	18,5
Stoka	155,2	15,8	1,84	7,89
Perad	48,1	9,66	1,13	4,83
Povrće	228,8	2,12	0,25	1,06
Jaja	22,4	6,28	0,73	3,14
Mlijeko u prahu	14,7	0,42	0,049	0,21
Biljno ulje	45,3	3,44	0,4	1,71
Žitarice	315,8	6,94	0,81	3,47
Ukupno		81,8	9,54	40,9

^aKonzumacija svježe mase namirnica (g/dan)

^bTM – tjelesna masa