

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANTIOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI POTENCIJAL VITAMINA E U**  
**SPRJEČAVANJU CITOTOKSIČNIH UČINAKA**  
**POLIKLORIRANIH BIFENILA**

Ivana Jagarčec, Ana Peroš

Zagreb, 2012. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Ivane Kmetič, docentice i dr. sc. Ksenije Durgo, izvanredne profesorice te uz stručnu pomoć dipl.ing. Teute Murati, asistentice.

Rad je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.

Zahvaljujemo mentorici docentici dr.sc. Ivani Kmetič na stručnoj pomoći te podršci i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujemo i mentorici, profesorici dr.sc. Kseniji Durgo iz Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama na stručnoj pomoći prilikom određivanja lipidne peroksidacije.

Zahvaljujemo profesoru dr. sc. Branimiru Šimiću, pročelniku Laboratorija za toksikologiju na ukazanom povjerenju i dopuštenju za izradu rada u ovom laboratoriju.

Zahvaljujemo asistentici dipl. ing. Teuti Murati na pruženoj podršci te stručnoj pomoći pri radu u Laboratoriju za toksikologiju i izradi ovog rada.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. IZVORI I PRISUTNOST POLIKLORIRANIH BIFENILA U OKOLIŠU .....	1
1.1.1. Potencijalni izvori PCB-a u Hrvatskoj .....	2
1.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA I STRUKTURA POLIKLORIRANIH BIFENILA.....	3
1.3. METABOLIZAM PCB-a.....	4
1.4. TOKSIČNI UČINCI PCB-a I MEHANIZAM DJELOVANJA.....	5
1.4.1. PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil) .....	6
1.4.2. PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil) .....	8
1.5. PCB-i I OKSIDACIJSKI STRES.....	9
1.6. ANTIOKSIDANSI.....	11
1.6.1. Vitamin E .....	12
1.7. TESTOVI TOKSIČNOSTI .....	13
1.7.1. <i>In vitro</i> testovi toksičnosti .....	13
1.8. STANIČNE LINIJE .....	14
1.8.1. CHO ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )- K1 stanična linija.....	15
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	16
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	16
3. 1. MATERIJAL.....	18
3.1.1. Biološki materijal .....	18
3.1.2. Kemikalije .....	18
3.1.3. Otopine i puferi .....	19
3.1.4. Oprema i uređaji.....	22
3.2. METODE RADA .....	23
3.2.1. Kultivacija CHO-K1 stanica u monosloju.....	23
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i> .....	23
3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica <i>MTT</i> metodom .....	24
3.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka PCB 77 i PCB 153 na CHO-K1 staničnoj liniji <i>MTT</i> metodom.....	24
3.2.5. Određivanje učinka vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB 153 na lipidnu peroksidaciju i vijabilnost CHO- K1 stanica.....	25

3.2.5.1. Određivanje učinka vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB 153 na proliferaciju CHO-K1 stanica .....	25
3.2.5.2. Određivanje učinka vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB-153 na peroksidaciju lipida CHO-K1 stanica.....	26
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	29
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>30</b>
4.1. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB 77 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN <i>MTT</i> METODOM .....	30
4.1.1. IC vrijednosti za PCB 77 na CHO-K1 staničnoj liniji.....	33
4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB 153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN <i>MTT</i> METODOM .....	34
4.2.1. IC vrijednosti za PCB 153 na CHO-K1 staničnoj liniji.....	37
4.3. CITOTOKSIČNOST PCB-a 153 U KULTURI CHO-K1 STANICA UZ PRETHODNU INKUBACIJU VITAMINOM E.....	38
4.4. UČINAK VITAMINA E NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU I <i>TRYPAN BLUE</i> METODOM ODREĐENA VIJABILNOST CHO-K1 STANICA TRETIRANIH S PCB 153 .....	41
4.4.1. Učinak vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB 153 određen <i>Trypan Blue</i> metodom .....	41
4.4.2. Učinak vitamina E na lipidnu peroksidaciju CHO-K1 stanica tretiranih s PCB 153 .....	42
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>51</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>53</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>59</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>60</b>
<b>10. PRILOZI.....</b>	<b>61</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. IZVORI I PRISUTNOST POLIKLORIRANIH BIFENILA U OKOLIŠU

Među najrasprostranjenije zagađivače okoliša ubrajaju se perzistentni organoklorirani spojevi („POP's – *Persistent Organic Pollutants*“) koji uključuju organoklorirane pesticide, poliklorirane bifenile (PCB) te poliklorirane dibenzo-p-dioksine (PCDD) i poliklorirane dibenzofurane (PCDF) (IMI, 2003). Prema Stockholmskoj konvenciji usvojenoj 23. svibnja 2001. godine teži se smanjenju i gdje je prikladno sprečavanju ispuštanja 12 POPs spojeva (aldrin, klordan, DDT- diklor-difenil-trikloretan, dieldrin, eldrin, heptaklor, heksaklorbenzen, mirex i toksafen, PCB-i, HCB - heksaklorbenzen, PCDD/PCDF) u okoliš obzirom na njihovo štetno djelovanje na svim razinama ekosustava.

PCB-i su skupina sintetskih aromatskih spojeva niske električne i relativno visoke toplinske provodljivosti, otpornih na toplinsku razgradnju i kemijski izrazito postojanih. Obzirom na broj i položaj atoma klora moguće je oko 209 različitih izomera i homologa PCB-a koji se nazivaju kongenerima. Komercijalno su se počeli proizvoditi 1929. godine i nikad se nisu upotrebljavali kao pojedinačni spojevi već uvijek u komercijalnim smjesama koje se međusobno razlikuju po sadržaju udjela pojedinih kongenera. Na tržište su smjese dolazile pod raznim imenima, npr. Aroclor (SAD), Phenoclor (Francuska), Clophen (Njemačka), Sovol (Rusija) i Kanechlor (Japan). PCB-i su se proizvodili industrijski više od 50 godina i primjenjivali su se u gotovo svakoj zemlji svijeta (Herceg Romanić, 2002). Zbog svoje niske topljivosti u vodi, ali visoke topljivosti u mastima kumuliraju se u masnim tkivima živih organizama. Nalaze se u okolišu u niskim razinama, ali se prenose na velike udaljenosti putem vode i zraka, pa su tako široko rasprostranjeni uključujući i područja gdje se nikada nisu koristili (IMI, 2003). Raspodjela i sudbina organskih mikrozagađivača u okolišu određeni su njihovim fizičko-kemijskim svojstvima i brojnim procesima u okolišu. Hlapljivost spojeva, topljivost u vodi, lipofilnost, postojanost i sklonost biokoncentriranju određuju razinu zagađivala u zraku, vodi, tlu/sedimentu i živim organizmima. Apsorbiraju se u tlo, dok se u vodenim sustavima vezuju za sedimente. Zračnim strujanjima, taloženjem čestica na kojima su sorbirani i ispiranjem iz zraka oborinama prenose se na velike udaljenosti od primarnog izvora zagađenja. Stoga se tragovi ovih spojeva redovito detektiraju u različitim dijelovima okoliša, ne samo kao posljedica lokalnih izvora zagađenja, već i kao rezultat globalnog zagađenja okoliša (IMI, 2003; Bureau i sur., 2006).

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstva PCB-i su našli široku primjenu. Upotrebljavali su se posebice u elektroindustriji i kemijskoj industriji kao dielektrične tekućine u transformatorima i impregnatori u kondenzatorima. Osim u zatvorenim sustavima

primjenjivali su se i u otvorenim hidrauličkim sustavima, kao dodaci mazivima i voskovima, kao plastifikatori u bojama, dodaci papiru za kopiranje te kao usporivači gorenja (Drevenkar i Fingler, 2000).

Visoka postojanost, biokumulacija i biomagnifikacija unutar hranidbenih lanaca, te toksičnost i potvrđena kancerogena i teratogena svojstva PCB-a bila su povod ograničenju ili zabrani njihove proizvodnje i primjene u mnogim, u prvome redu razvijenim zemljama. U Republici Hrvatskoj zakonski su određene maksimalno dopuštene koncentracije organoklorovih pesticida i PCB-a u hrani, atmosferi, kopnenim vodama i moru te poljoprivrednom zemljištu (IMI, 2003).

### **1.1.1. Potencijalni izvori PCB-a u Hrvatskoj**

Izvori PCB-a u našoj zemlji još uvijek postoje. To je prvenstveno oprema koja sadrži PCB-e (kondenzatori, transformatori), kao i zalihe ulja koja sadrže PCB-e iz kojih curenjem, hlapljenjem i neprimjerenim skladištenjem te odlaganjem iskorištenih uređaja mogu dospjeti u okoliš i ljude. Kako uvoz PCB-a još nije zabranjen postoji mogućnost unosa u zemlju dodatnih količina kako opreme tako i ulja koja sadrže PCB-e (MZOPU, 2008).

Također, u Republici Hrvatskoj rizik je još naglašeniji zbog vojnih razaranja tijekom Domovinskog rata (1991.-1995.) u kojem su oštećeni ili uništeni mnogi elektroenergetski, industrijski i drugi objekti iz kojih je došlo do istjecanja PCB-a. Istraživanja utjecaja rata i ratnog otpada na ugroženost vodenih ekosustava u području krške Hrvatske započela su u Institutu "Ruđer Bošković" tijekom 1993. godine, a zatim su kasnije proširena uključivanjem i drugih institucija kao i Hrvatske vojske što je rezultiralo opsežnim elaboratom. Uzorkovanja tla provedena 1996. godine na područjima trafostanica koje su oštećene tijekom rata pokazala su da su lokacije transformatorskih stanica Zadra i Šibenika značajno zagađene polikloriranim bifenilima. Provedenim analizama ovih spojeva u zraku, zemljištu, sedimentima i organizmima zadarskog i dubrovačkog područja utvrđeno je da su u pojedinim uzorcima riba razine PCB-a vrlo visoke, kakve su se inače rijetko nalazile u ranijim istraživanjima Jadrana, pa i Mediterana (Picer i sur., 2006).

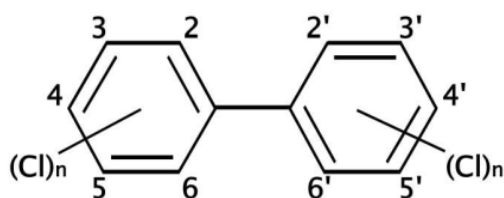
Potencijalni izvor PCB-a su također i odlagališta otpada, koja su uglavnom bila nekontrolirana, pa se PCB-i nalaze u deponiranom otpadu u nepoznatim količinama (IMI, 2003).



## 1.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA I STRUKTURA POLIKLORIRANIH BIFENILA

Poliklorirani bifenili (PCB-i) su grupa aromatskih, sintetskih, organskih spojeva kemijske formule  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$  gdje je  $n$  broj klorovih atoma (Herceg Romanić, 2002). Dva fenilna prstena povezana su jednostrukom ugljik-ugljik vezom (Carpenter, 2006). Klor se veže na ugljikov atom supstitucijom s vodikom, a s obzirom na broj i položaj klorovih atoma postoji oko 209 kongenera. Ballschmiter i Zell su predložili sistem numeriranja PCB kongenera brojevima od 1 do 209 koji je prihvaćen od strane Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC- *International Union for Pure and Applied Chemistry*) (Mills i sur., 2007).

Broj i položaj atoma klora određuje i fizikalna i biološka svojstva svakog kongenera. Tako su na primjer kongeneri koji sadrže nekoliko atoma klora u pravilu topljiviji u vodi, lakše isparavaju i lakše se metaboliziraju od kongenera s velikim brojem klorovih atoma. Prema tome, kongeneri s visokim udjelom klora su otporni na biorazgradnju i zbog toga se akumuliraju u okolišu. Kongeneri koji imaju klor samo u *meta* (3, 3', 5, 5') ili *para* (4, 4') položaju su planarni i pokazuju aktivnost "sličnu dioksinima" (Carpenter, 2006). Supstitucija atoma vodika s većim atomom klora u *orto* položaju uzrokuje rotaciju benzenskih prstenova oko veze koja ih spaja i gubitak planarne konfiguracije (ATSDR, 2000). Osnovna molekularna struktura PCB-a je prikazana na Slici 1.

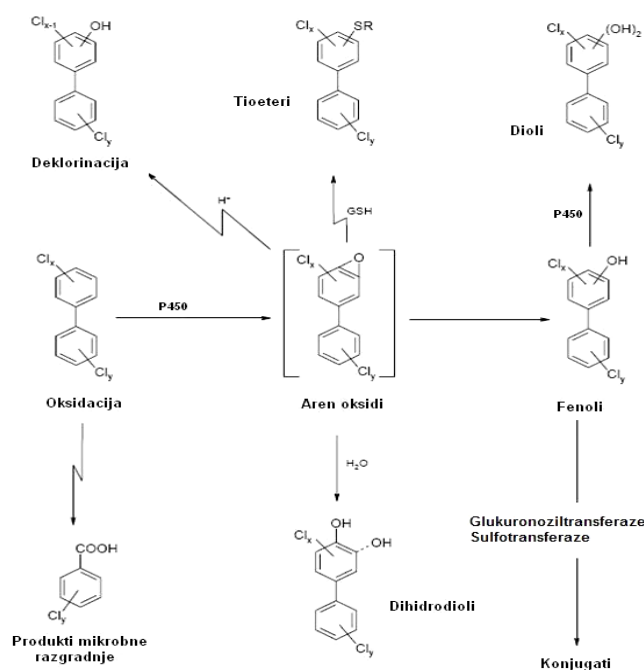


**Slika 1.** Osnovna molekularna struktura PCB-a (prema ATSDR, 2000)

PCB su čvrste tvari na sobnoj temperaturi (25 °C), a točka taljenja se kreće od 54 °C za 2-klorbifenil do 310 °C za 2,3,4,5,6,2',3',4',5',6' deklorobifenil. Dakle, temperatura taljenja raste zajedno s kompleksnošću spoja. Kemijske smjese PCB-a koje se upotrebljavaju u industriji su najčešće bezbojna ili lagano zatamnjena ulja. Gustoća takvih smjesa se kreće od 1,2 do 1,5  $g\text{cm}^{-3}$  (George i sur., 1988).

### 1.3. METABOLIZAM PCB-a

Vrijeme poluživota PCB-a u ljudskom organizmu je dugo (10 – 15 godina) i ovisi o svakom pojedinom kongeneru. Kongeneri s manjim brojem klorovih atoma se brže metaboliziraju, dok se oni s više klorovih atoma zadržavaju i do nekoliko godina (Carpenter, 2006). Omjer stvaranja metabolita PCB-a ovisi i o metaboličkom kapacitetu vrste (Carpenter, 2006; Klinčić i Herceg Romanić, 2011). Primarno mjesto biotransformacije PCB-a je jetra, a početni korak u eliminaciji PCB-a predstavlja jetreni citokrom P450 monooksigenazni sustav (Slika 2). PCB-i se u prvoj fazi biotransformacije metaboliziraju u polarnije spojeve koji se lakše izlučuju iz organizma, ali pojedini se mogu zadržati u organizmu i proći kroz drugu fazu biotransformacije (SPH, 2003).



**Slika 2.** Biotransformacijski putevi PCB-a (prema LUBW, 1995)

Oksidacija PCB-a može ići preko PCB-epoksida ili direktnim umetanjem kisika u  $C_{Ar}-H$  vezu. PCB-epoksid može reagirati i s glutationom, a nastali se adukt prevodi u metilsulfonyl derivate ( $MeSO_2-PCB$ ). OH-PCB lako prelaze u konjugate i izlučuju se, iako su neki od njih nađeni u krvi i jetri ljudi i životinja. Većina identificiranih PCB-a ima OH skupinu u *para*- ili *meta*-položaju, s dva klorova atoma na susjednim ugljikovim atomima (Klinčić i Herceg Romanić, 2011). Metilsulfonyl i hidroksilirani PCB-i se mogu akumulirati u tkivima pluća i fetusa, a metaboliti svih PCB kongenera se eliminiraju primarno putem žuči i fecesa (SPH, 2003).

#### 1.4. TOKSIČNI UČINCI PCB-a I MEHANIZAM DJELOVANJA

PCB-i se povezuju s negativnim učincima na ljudsko zdravlje koji uključuju promjene u neurološkom razvoju, neuroendokrinnoj funkciji, ponašanju te narušenoj imunskoj i reproduktivnoj funkciji (Klinčić i Herceg Romanić, 2011). Izloženost PCB-ima povećava rizik od raka, infekcija, hipotireoze, neplodnosti, ishemijske bolesti srca, artritisa, dijabetesa, astme, kao i rađanja djece s nižim kvocjentom inteligencije te niže tjelesne mase od normalne (Carpenter, 2006). PCB-i se također smatraju rizičnim faktorom za razvoj kardiovaskularnih bolesti te je uočen značajan porast mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti kod radnika u proizvodnji kondenzatora koji su bili izloženi PCB-ima dulje od 5 godina (Gustavsson i Hogstedt, 1997) kao i učestalija hospitalizacija ljudi zbog koronarnih bolesti u mjestima koja se nalaze blizu izvora perzistentnih organskih spojeva (Sergeev i Carpenter, 2005).

Prisutna je razlika između toksičnog djelovanja *orto* i planarnih PCB-a. *Orto* PCB-i koji sadrže atome klora u *orto* položaju se smatraju manje toksičnima od "dioksinu sličnih"-planarnih PCB-a koji sadrže atome klora u oba *para* položaja i barem dva *meta* položaja. Naziv "dioksinu sličnih" PCB-a je nastao zbog toga što im planarna struktura omogućuje vezanje na Ah receptor (AhR – *aryl hydrocarbon receptor* ili receptor aromatskih ugljikovodika), slično kao i kod dioksina. Većina toksičnih učinaka induciranih kongenerima vidljiva je upravo kroz aktivaciju Ah receptora (Lyche i sur., 2004). AhR je transkripcijski faktor koji kontrolira ekspresiju citokrom P450 (npr. CYP1A1, CYP1A2) i drugih gena te tako mijenja (povećava ili snižava) razinu velikog broja genskih produkata (Nebert i sur., 2000). AhR nema poznatih fizioloških liganada, međutim kao ligandi za AhR se mogu vezati planarne aromatske strukture kao što su policiklički aromatski spojevi te halogenirane aromatske molekule, npr. dioksini i PCB-i (Carpenter, 2006). Abnormalna aktivacija Ah receptora može narušiti funkciju stanice i promijeniti transkripciju gena (Bonefeld-Jørgensen i sur., 2001).

Nakon izlaganja stanice aromatskim ugljikovodicima (PAH - policiklički aromatski ugljikovodici, dibenzo-dioksini, dibenzo-furani, PCB) dolazi do ulaska spojeva u stanicu i vezanja za citosolni AhR koji je vezan za Hsp90 (Hsp - *heat shock protein*). Nakon vezanja liganda za AhR nastaje kompleks s visokim afinitetom za DNA, pri čemu dolazi do otpuštanja Hsp90 i translokacije kompleksa u jezgru. Kompleks Ah-AhR se veže za Ah-receptorski nuklearni translokator (Arnt protein ili AhR *nuclear translocator protein*), a novonastali

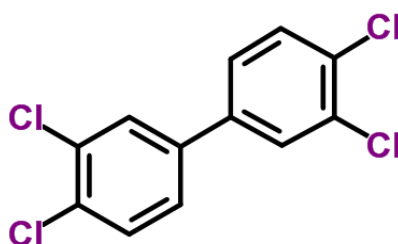
kompleks se tada veže na promotorsku regiju XRE (*xenobiotic responsive element*) na DNA te dolazi do indukcije gena odnosno ekspresije CYP gena (Janošek i sur., 2006).

S ozirom da je topljivost u membranama malo veća kod planarnih PCB-a, smatra se da *orto*, neplanarni više narušavaju lipidni dvosloj te posljedično uzrokuju promjene u fiziološkim funkcijama poput propusnosti membrane za transport iona i aktivnosti membranskih enzima. Kada neplanarni PCB prijeđe u staničnu membranu, njegova veća i nezgrapna struktura rezultira jačim poremećajem membranske funkcije od one kod planarnih, "dioksinu sličnih" kongenera (Yilmaz i sur., 2006). Zhou i Zhang (2005) su pokazali da izlaganje CEH stanica (CEH - *chicken embryo hepatocytes*; hepatociti pilećeg embrija) Arochlor-u 1254 u koncentraciji 0,1–10 µg/mL uzrokuje ireverzibilna oštećenja membrane, te da stanična smrt ovisi od dozi kojoj su stanice izložene. Istraživanje na primarnoj kulturi neuralnih stanica Wistar štakora pokazalo je da tretman s PCB 153 u koncentraciji 50-100 µM, odnosno s 30 µM PCB 77 značajno utječe na staničnu vijabilnost i proliferaciju (Sánchez-Alonso i sur., 2004).

#### 1.4.1. PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil)

PCB 77 se smatra jednim od najtoksičnijih PCB kongenera, a toksični potencijal se povezuje s planarnom "dioksinu sličnom" strukturom koja mu omogućava vezanje na Ah receptor.

Sadrži atome klora u oba *para* položaja i dva *meta* položaja. Strukturna formula planarnog PCB-a 77 (C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>4</sub>) prikazana je na Slici 3.



**Slika 3.** Strukturna formula planarnog PCB-a 77 (RCS, 2012a)

PCB-i pripadaju skupini endokrino aktivnih tvari ("endocrine disruptors"-ED) koje ometaju homeostazu i fiziologiju endokrinog sustava. Tako, kongener PCB 77 ima i estrogeno

i anti-estrogeno djelovanje (Simmons i sur., 2005). Izloženost PCB-u 77 tijekom gestacije poslijedično rezultira negativnim učincima na razvoj moždanih funkcija (Simmons i sur., 2005) te je primijećena modulacija seksualnog ponašanja u ženskom potomstvu (Wang i sur., 2002). Također je pokazano da aplikacija PCB 77 tijekom gestacije utječe na preživljavanje te smanjenje tjelesne mase mladunčadi kao i na ponašanje majki (Simmons i sur., 2005).

Pojedina istraživanja ukazala su na inflamatorno djelovanje PCB 77. PCB 77 (3,4  $\mu$ M) je izazvao diferencijaciju i inflamatorni učinak (izlučivanje adipocitokina) 3T3-L1 adipocita *in vitro* te je pridonio nastanku pretilosti i ateroskleroze *in vivo*, dok PCB 153 nije imao značajnijeg efekta (Arsenescu i sur., 2008). Istraživanja su pokazala da planarni 3,3',4,4'- tetraklorbifenil (PCB-77) izaziva upalu i u endotelnim stanicama (Henning i sur., 1999; Lim i sur., 2007).

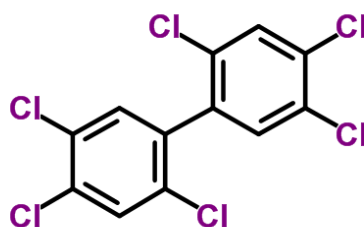
PCB 77 i PCB 126 ugrožavaju normalne funkcije vaskularnih endotelnih stanica povećanjem ekspresije gena CYP1A1, oksidativnog stresa i vezujuće aktivnosti NF- $\kappa$ B na DNA (Henning i sur., 2002). Tharappel i suradnici (2002) su pokazali značajno povećanje vezujuće aktivnosti transkripcijskih faktora induciranih oksidacijskim stresom poput NF- $\kappa$ B, AP-1 kao i smanjenje STAT3 te STAT5 neovisnih o oksidacijskom stresu, kod životinja tretiranih i niskim i visokim dozama PCB-a 77, PCB-a 153 kao i kombinacijom oba kongenera.

Morfometrička analiza promjena na jetri nakon tretmana s PCB 77 je pokazala, na razini hepatocita, povećanje volumena endoplazmatskog retikuluma (SER-*smooth endoplasmic reticulum*), poremećaj u funkciji mitohondrija i promjene u indukciji različitih enzima (Gilroy i sur., 1998).

Izloženost stanične kulture ljudske jetre (HepG2) i bubrega (HK2) PCB-u 77 i PCB-u 153 u dozama koje odgovaraju IC<sub>50</sub> rezultirala je vremenski ovisnom akumulacijom PCB-a iz medija za uzgoj u stanice pri čemu je maksimalna koncentracija unutar stanica zabilježena nakon 3 do 6 sati. Studija je pokazala da stanice jetre puno brže započinju apsorpciju PCB-a nego stanice bubrega, iako se maksimum koncentracije puno brže postiže u stanicama bubrega te da oba kongenera, i PCB 77 i PCB 153, induciraju apoptozu. Testovi apoptoze i stanične vijabilnosti su pokazali da su stanice bubrega znatno osjetljivije na izloženost PCB-u (Ghosh i sur., 2010). Pad vijabilnost stanica bubrega štakora tretiranih s 100  $\mu$ M PCB 77 je određen i u istraživanju Santiago i sur. (2006).

#### 1.4.2. PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil)

PCB 153, neplanarni kongener, je prisutan u okolišu u značajnim količinama zbog velike rezistencije na degradaciju. Jedan je od tri dominantna kongenera u adipoznom tkivu čovjeka i *orto* kongener s najvećom koncentracijom u majčinom mlijeku (Herceg Romanić i Krauthacker, 2006). Sadrži atome klora u dva *orto*, dva *meta* i oba *para* položaja. Zbog slabe aktivacije Ah receptora općenito se smatra manje opasnim od ostalih kongenera (Hussain i sur., 2000). Međutim, visoke koncentracije kongenera poput PCB-a 153 u okolišu i ljudima, zahtijevaju daljnje studije kojima bi se odredili mogući toksični efekti. Strukturna formula neplanarnog PCB-a 153 (C<sub>12</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>6</sub>) prikazana je na Slici 4.



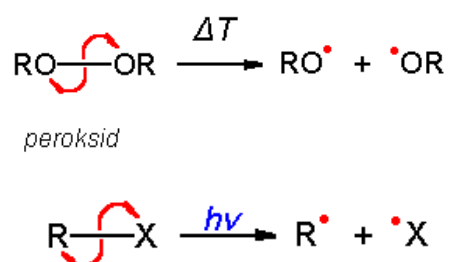
**Slika 4.** Strukturna formula neplanarnog PCB-a 153 (RCS, 2012b)

Endokrino modulirajuća aktivnost potvrđena je i za PCB 153. Wójtowicz i sur. (2001) su proučavali utjecaj različitih koncentracija PCB 153 na stanice ovarija svinje i pratili promijene estrus ciklusa. Rezultati su pokazali da dvodnevna izloženost folikularnih stanica svim ispitivanim dozama PCB-a (5, 10, 50, i 100 ng/mL) uzrokuje statistički značajan pad izlučivanja progesterona, dok su doze 50 i 100 ng/mL smanjile i razinu izlučivanja testosterona. Također je zabilježeno je da izlaganje 2,2',4,4',5,5' – heksaklorobifenilu izaziva poremećaje i u sintezi spolnih hormona, te da toksično djeluje na reproduktivni, neurološki i imunološki sustav (Venkatesha i sur., 2010).

Dodatna opasnost PCB 153 je činjenica da se taj kemijski kontaminant vrlo teško metabolizira, a najčešće ga se detektira u masnom tkivu izloženih individua zbog njegovih liposolubilnih svojstva. Tijekom laktacije zabilježene su visoke koncentracije PCB 153 i u mlijeku ispitivanih eksperimentalnih životinja (Lyche i sur., 2004). Vrijeme poluživota u organizmu procjenjuje se na 12,4 godine (Orloff i sur., 2003). Vrijeme poluraspada u okolišu je 110 godina, što ga čini dugo živućim kontaminantom s potencijalno opasnim djelovanjem na ekosustave (Venkatesha i sur., 2010).

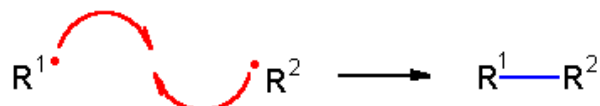
## 1.5. PCB-i I OKSIDACIJSKI STRES

Slobodni radikali su kemijske čestice koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci te imaju izrazito visok stupanj reaktivnosti (Puljak i sur., 2004; Montgomery, 2006). Nastaju svakodnevno tijekom normalnog aerobnog metabolizma (Puljak i sur., 2004). Manji dio ih nastaje djelovanjem imunološkog sustava ili faktora okoliša, npr. izlaganjem ultraljubičastom zračenju, dimu cigareta, gorenjem organskih spojeva, raznim zagađivačima iz okoliša (Montgomery, 2006). Slika 5 prikazuje primjere procesa nastajanja slobodnih radikala.



**Slika 5.** Proces nastajanja slobodnih radikala (Montgomery, 2006)

Slobodni radikali mogu reagirati međusobno ili s okolnim stabilnim molekulama (masnim kiselinama, proteinima, DNA). Posljedica međusobne reakcije može biti sinteza stabilnog spoja koji više nije kemijski reaktivan (Montgomery, 2006) (Slika 6).

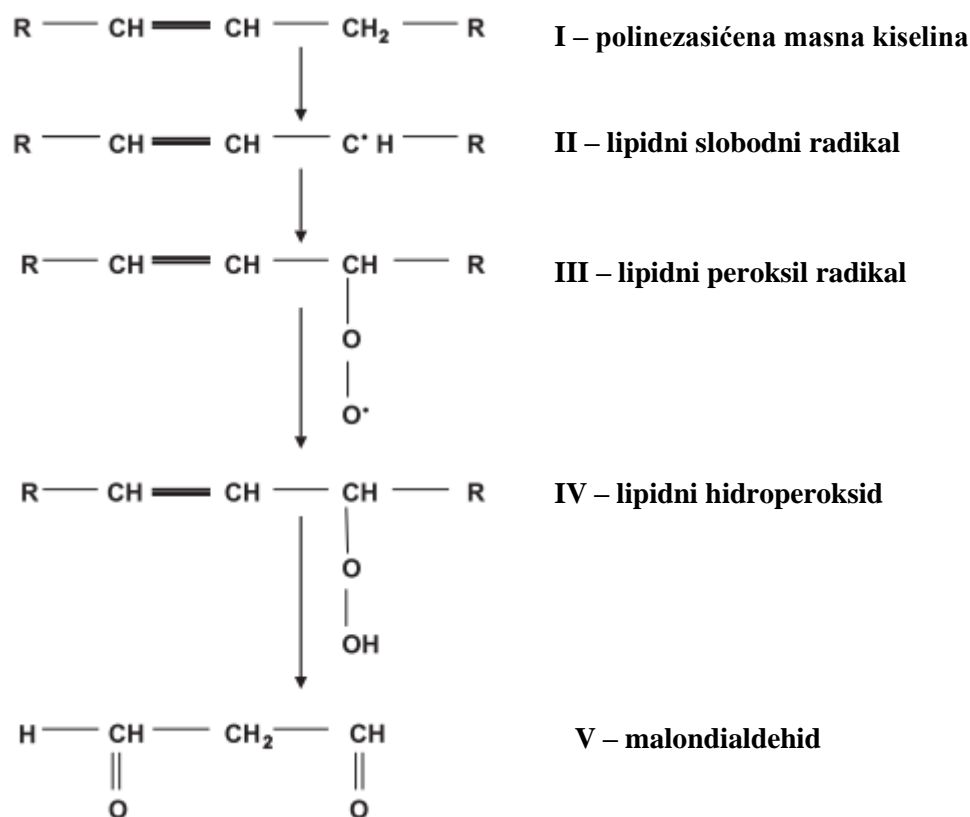


**Slika 6.** Reakcija nastajanja stabilnog spoja (Montgomery, 2006)

U reakcijama s masnim kiselinama, ugljikohidratima, proteinima i DNA, slobodni radikali oduzimaju stabilnim molekulama elektron i čine ih nestabilnima te time uzrokuju lančanu reakciju koja stvara nove slobodne radikale (Montgomery, 2006).

Oksidacijski stres posljedica je prekomjerne produkcije reaktivnih spojeva kisika (oksidansi, radikali) uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. Oksidansi u biokemijskim sustavima imaju sposobnost predaje elektrona, dok antioksidansi (reducensi) imaju sposobnost primanja elektrona. Zbog prekomjernog stvaranja slobodnih radikala nastaje oksidacijski stres koji je uzrok i karakteristika brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja (Puljak i sur., 2004).

Slobodni radikali uzrokuju oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina koje izgrađuju staničnu membranu i time narušavaju stabilnost i funkciju membrane što ima za posljedicu povećanu propusnost stanične membrane, promjenu permeabilnosti i poremećenu homeostazu stanice.



**Slika 7.** Proces nastajanja malondialdehida iz polinezasićenih masnih kiselina  
(Grotto i sur., 2009)

Proces lipidne peroksidacije (Slika 7) je jedan oblik oksidativne promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom produkata poput alkohola, aldehida ili manjih fragmenata, a jedan od njih je malondialdehid (MDA) (Petlevski i sur., 2006).

Brojna istraživanja ukazuju na to da oksidacijski stres utječe na razvoj neurodegenerativnih bolesti, npr. Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, shizofrenije. Moždane stanice su vrlo osjetljive na oksidacijski stres zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina i visoke razine oksidacijskih reakcija (Sridevi i sur., 2007). Istraživanja provedena *in vivo* pokazuju da izloženost čistom PCB-u, kao i smjesi različitih kongenera PCB-a, uzrokuje rak jetre u glodavaca (Katynski i sur., 2004). Jedan od mogućih mehanizama



kojima PCB inducira tumore jetre je povećanje oksidacijskog stresa što rezultira povećanom peroksidacijom lipida i oštećenjem membrane, DNA, staničnom apoptozom ili nekrozom i nastankom tumora. PCB-i se mogu metabolizirati do katehola ili hidrokinona. Daljnje oksidacije/redukcije ovih spojeva mogu dovesti do nastajanja semikinona i kinona uz proizvodnju reaktivnih spojeva kisika što rezultira oštećenjem stanice. Fadhel i suradnici (2002) su pokazali da i PCB 77 i PCB 153 dovode do indukcije citokroma P450 i povećanja lipidne peroksidacije u hepatocitima štakora. Indukcija citokroma P450 s PCB-ima može dovesti do povećanog formiranja slobodnih radikala. Reakcije slobodnih radikala sa staničnim molekulama mogu dovesti do inicijacije lipidne peroksidacije. Ispitivanje na štakorima je pokazalo da doza od 150  $\mu\text{mol}$  PCB 77/kg kukuruznog ulja u kojem je PCB 77 otopljen te ista koncentracija PCB-a 153 uzrokuje značajno povećanje koncentracije supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*) (Fadhel i sur., 2002).

Važnu ulogu u sprječavanju štetnog utjecaja slobodnih radikala imaju antioksidansi koji inaktiviraju slobodne radikale (Sridevi i sur., 2007).

## 1.6. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala (ODS, 2011). To su tvari koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidabilnim supstratima, dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata (Štefan i sur., 2007).

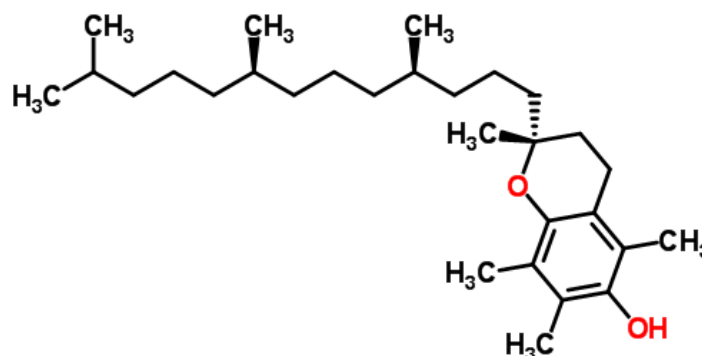
Ljudski organizam posjeduje endogene antioksidativne sustave koji ga štite od štetnog utjecaja slobodnih radikala. Pritom su posebno važni antioksidativni sustavi poput enzima superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze, katalaze, te antioksidansi topljivi u mastima i vodi poput glutaciona, vitamina E i C, karotenoida i vitamina A te koenzima Q10.

Antioksidansi se mogu podijeliti u tri osnovne skupine. Primarni antioksidansi onemogućuju samo nastajanje slobodnih radikala. Sekundarni antioksidansi su oni koji uništavaju već stvorene slobodne radikale, dok tercijarni ispravljaju već nastala oštećenja stanica (Puljak i sur., 2004).

### 1.6.1. Vitamin E

Naziv vitamin E ( $C_{29}H_{50}O_2$ ) (RCS, 2012c) se odnosi na grupu u masti topljivih spojeva sa snažnim antioksidativnim svojstvima. Postoji u osam različitih izomera (vitamera), četiri tokoferola ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) i četiri tokotrienola ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ). Najčešći oblik u prirodi je  $\alpha$ -tokoferol (Slika 8). Vitamin E su 1922. otkrili Evans i Bishop (Brigelius- Flohe i Traber, 1999).

Svi oblici vitamina E se apsorbiraju u probavnom sustavu i transportiraju u jetru. U jetri  $\alpha$ -tokoferol transportni protein ( $\alpha$ -TTP) selektivno prepoznaje i veže  $\alpha$ -tokoferol čime ga čini aktivnim te potiče njegovo izlučivanje iz jetre u krvotok. Osim u jetri  $\alpha$ -TTP nalazi se još u rožnici i u srcu. Za razliku od ostalih liposolubilnih vitamina, vitamin E se ne nakuplja u jetri do toksičnih koncentracija, jer postoji mehanizam izlučivanja viška vitamina E (Traber i sur., 2005). Vitamin E je liposolubilna pa ga se može naći u svim namirnicama bogatim mastima (posebno nezasićenim masnim kiselinama) kao što su biljna ulja, orašasti plodovi, žumanjak jajeta i margarin (Puljak i sur., 2004).



**Slika 8.** Strukturna formula vitamina E (RCS, 2012c)

Glavni mehanizam njegovog antioksidativnog učinka je antiaterogeno djelovanje, zaštitom lipoproteina male gustoće od oksidacije, ali i smanjivanjem adhezivnosti i agregabilnosti trombocita (Puljak i sur., 2004). Vitamin E smanjuje količinu slobodnih radikala i povećava razinu endogenih antioksidansa te je u mogućnosti inaktivirati štetan učinak PCB-a (Sridevi i sur., 2007).

Istraživanja potvrđuju značajnu ulogu vitamina E. Jedna studija je pokazala da izloženost stanica pilećeg embrija Arocloru 1254 u koncentraciji od  $10 \text{ mgmL}^{-1}$  izaziva staničnu smrt. Dodatak vitamina A, C i E pojedinačno ili u kombinaciji je značajno povećao

preživljenje stanica (Zhou i Zhang, 2005). Pojedina istraživanja govore i o njegovoj učinkovitosti kod usporavanja progresije Alzheimerove bolesti, čija je incidencija u starijoj populaciji u sve većem porastu, a javlja se sve više i u mlađim dobnim skupinama. Pretpostavlja se i njegova važna uloga u prevenciji karcinoma prostate, koji je sve učestaliji u muškaraca starije životne dobi, te uloga u smanjivanju učestalosti karcinoma kolona i karcinoma dojke (Puljak i sur., 2004).

## 1.7. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Testovi toksičnosti postaju sve značajniji u ispitivanju toksičnosti novosintetiziranih spojeva. U razvijenim zemljama obavezno je testiranje lijekova, aditiva, kemikalija, kozmetike i pesticida kojima mogu biti izloženi ljudi i životinje u okolišu. Testovi toksičnosti se dijele na klasične animalne testove (*in vivo*) i na alternativne testove toksičnosti (*in vitro*).

Testovima toksičnosti na životinjama istražuje se akutna (jedna doza), 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 reprodukcijski sustav i plodnost te testovi teratogenosti, mutagenosti, očne i kožne iritacije, imunotoksičnosti i neurotoksičnosti. Također se ispituju toksikokinetički i toksikodinamički parametri ksenobiotika. Međutim, klasični testovi toksičnosti su vrlo dugotrajni i zahtijevaju velik broj pokusnih životinja.

### 1.7.1. *In vitro* testovi toksičnosti

Korištenjem *in vitro* testova smanjuje se broj testiranja na životinjama koja su značajno skuplja, olakšano je definiranje djelovanja ispitivanog spoja na ciljne organe i smanjen broj testiranja koja se provode na višim sisavcima i primatima.

Alternativni testovi toksičnosti se većinom koriste kao predtestovi klasičnim animalnim testovima za utvrđivanje raspona aktivnosti tvari ili određivanja raspona toksične koncentracije. Koriste se i za određivanje odnosa koncentracije prema vremenu izlaganja te mehanizma djelovanja određene tvari (Atterwill, 1995).

Kod *in vitro* ispitivanja koriste se mikroorganizmi (npr. Amesov test) i animalne ili humane stanice jetre, bubrega, testisa, ovarija, hipofize, štitnjače, limfnih čvorova, embrionalne animalne stanične linije itd.. Također se mogu koristiti stanične frakcije, fragmenti tkiva ili primarne kulture stanica. Moguće je upotrebom kemikalija, virusa i

radijacije inducirati procese kancerogeneze u normalnim stanicama i istraživati mehanizme koji su doveli do te promjene. Stanice se mogu iskoristiti za ispitivanja u virologiji, genetičkom inženjerstvu i genskoj terapiji.

Kao metode određivanja citotoksičnosti koriste se *Kenacid Blue* metoda, *MTT*, *Trypan Blue* i *Neutral Red* (Atterwill, 1995). Za praćenje i razlikovanje apoptotičkih i nekrotičnih stanica koriste se fluorescentna mikroskopija, elektronska mikroskopija te protočna citometrija.

## 1.8. STANIČNE LINIJE

Uzgoj stanične linije zahtjeva strogo kontrolirane i sterilne uvjete. Bakterije, mikoplazme, kvasci i gljivice su glavni izvori kontaminacija, a prenose se atmosferom, preko radne površine, osobljem koje radi u laboratoriju, instrumentima i kemikalijama koje se koriste te biološkim materijalom. Zbog toga je potrebno osigurati sterilne uvjete radom u laminaru, a kultivacija stanica se odvija u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>), 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. Za optimalan rast stanica nužan je dodatak seruma koji sadrži proteine, hormone, minerale, lipide, faktore rasta, adhezijske faktore, inhibitore enzima, metabolite i hranjive sastojke. Najčešće se upotrebljavaju fetalni goveđi, teleći i konjski serum, a dodaju se u količini 5-20 % (najčešće 10 %) kao važne nadopune za hormonalni, hranidbeni i stromalni sustav *in vivo* organizma.

Potrebe na kisiku su različite za različite kulture. Za većinu stanica je prihvatljiv atmosferski kisik odnosno niske koncentracije kisika (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>). Također većina staničnih kultura imaju veliku toleranciju prema osmotskom tlaku.

pH podloga je izrazito važan faktor budući da većina stanica počne gubiti vijabilnost pri padu pH vrijednosti (između 6,0 i 6,5). Promjena pH se jednostavno uočava zbog promijene boje medija iz crvene u žutu. Zbog toga je za optimalan rast stanica potrebno periodično mijenjati medij (Freshney, 2005).

### **1.8.1. CHO (*Chinese Hamster Ovary*)- K1 stanična linija**

CHO-K1 stanična linija je adherentna, epitelna stanična linija izolirana biopsijom ovarija kineskog hrčka. Izolaciju roditeljske linije proveo je 1957. godine T.T. Puck. Današnja stanična linija uzgaja se u Hamovom/F-12 mediju uz dodatak 5-20 % fetalnog goveđeg seruma. Budući da CHO-K1 stanice nemaju aktivni gen koji kodira za aminokiselinu prolin, medij za uzgoj mora sadržavati tu aminokiselinu. CHO-K1 stanična linija raste u monosloju pa je tijekom subkultivacije potrebno provoditi tripsinizaciju (ATCC, 2012).

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Poliklorirani bifenili su isključivo sintetski spojevi koji uz ostale klorirane ili bromirane arome te organoklorirane pesticide pripadaju grupi spojeva poznatoj kao perzistentni organski zagađivači (*Persistent Organic Pollutants*, POPs) s dugoročnim negativnim učincima na zdravlje ljudi i svih članova ekosustava.

Iako je u svijetu ograničeno korištenje PCB-a mnogobrojnim zakonskim aktima i njihova se koncentracija u okolišu postupno smanjuje, rizik je u Republici Hrvatskoj još uvijek prisutan zbog vojnih razaranja tijekom Domovinskog rata (1991.-1995.) u kojem su oštećeni ili uništeni mnogi elektroenergetski, industrijski i drugi objekti iz kojih je došlo do istjecanja PCB-a. Također, postoji rizik i zbog neadekvatno zbrinutog PCB otpada poput odlagališta transformatora, kondenzatora i sl. PCB-i iz okoliša se zatim progresivno nagomilavaju, posebice u masnim tkivima pojedinih članova lanaca prehrane te je opća populacija najviše izložena PCB-ima putem hrane, osobito masne hrane životinjskog podrijetla poput mesa, određenih vrsta ribe i mliječnih proizvoda.

Izloženost PCB-ima povećava rizik od raka, infekcija, hipotireoze, neplodnosti, ishemijske bolesti srca, artritisa, dijabetesa, astme, kao i rađanja djece s nižim koeficijentom inteligencije te niže tjelesne mase od normalne (Carpenter, 2006).

Cilj ovog rada je ispitati i usporediti moguće citotoksične učinke dvaju odabranih, strukturno i prema aktivnosti, različitih kongenera: planarnog, "dioksinu sličnog" PCB-a 77 i neplanarnog, *orto*-supstituiranog PCB-a 153 na *in vitro* modelu stanica ovarija kineskog hrčka (CHO-K1 - *Chinese Hamster Ovary* staničnoj liniji).

Također, cilj je ispitati mogući protektivni učinak vitamina E kao jakog antioksidansa na PCB-em inducirani oksidacijski stres i vijabilnost stanica. Pretpostavka je da će predinkubacija stanica vitaminom E imati pozitivne učinke na proliferaciju i vijabilnost stanica izloženih PCB-u te da će biti reducirana peroksidacija lipida i negativno djelovanje slobodnih radikala na stanice. Obzirom da su istraživanja provedena u svijetu i Hrvatskoj pokazala da je PCB 153 jedan od tri dominantna kongenera u adipoznom tkivu čovjeka i *orto*-kongener s najvećom koncentracijom u majčinom mlijeku te se rutinski određuje kao jedan od šest indikatorskih PCB-a, upravo je on odabran kako bi se na njemu pokušao postići protektivan efekt i umanjiti citotoksične učinke.

Pojedinačni ciljevi za ostvarenje krajnjeg cilja istraživanja jesu:

- kultivacija CHO-K1 stanične linije
- praćenje citotoksičnog učinka PCB-a 77 te PCB-a 153 *MTT* metodom
- određivanje IC vrijednosti te usporedba toksičnosti odabrana dva kongenera PCB-a
- ispitivanje mogućeg protektivnog učinka vitamina E na vijabilnost i proliferaciju stanica tretiranih s PCB 153 *MTT* i *Trypan Blue* metodom
- utjecaj vitamina E na sprječavanje PCB-em 153 inducirane peroksidacije lipida u CHO-K1 stanicama



### **3. MATERIЈAL I METODE**

### **3. 1. MATERIJAL**

#### **3.1.1. Biološki materijal**

U radu je korištena stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese hamster ovary*)-K1 koja raste u monosloju. Stanice su subklonovi roditeljske stanične linije CHO izolirane iz ovarija odraslog kineskog hrčka (ATCC, 2012).

#### **3.1.2. Kemikalije**

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

- Dulbecco's MEM/F-12, GIBCO, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS- fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD
- tripsin – EDTA, GIBCO, SAD
- PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil), Sigma, St. Louis, SAD
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil), Sigma, St. Louis, SAD
- $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), Supelco, SAD
- apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb
- boja *Trypan Blue*, SIGMA, SAD
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid), Sigma, St.Louis, SAD
- natrijev klorid, Kemika, Zagreb
- kalijev klorid, Kemika, Zagreb
- dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- trikloroetena kiselina, Kemika, Zagreb
- fosforna kiselina, Kemika, Zagreb
- tiobarbiturna kiselina, Sigma, Aldrich
- malondialdehid, Sigma, Aldrich
- *Bovine Serum Albumin* (BSA – albumin goveđeg seruma), Sigma, Aldrich
- Coomassie Blue G250, Bio-rad Laboratories, UK

### 3.1.3. Otopine i puferi

#### **Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO) – medij za kultivaciju stanica**

<b><u>sastojci</u></b>	<b><u>koncentracija (mg/L)</u></b>
<b>aminokiseline</b>	
Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin × H <sub>2</sub> O	7,5
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid × H <sub>2</sub> O	17,56
L-Cistein 2HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid × H <sub>2</sub> O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,35
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
<b><u>vitamini</u></b>	
Biotin	0,0035
Kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
Folna kiselina	2,65
Niacinamid (nikotinamid)	2,02
Piridoksin hidroklorid	2,0

Riboflavin	0,219
Tiamin hidroklorid	2,17
Vitamin B <sub>12</sub>	0,68
I-inozitol	12,61

**anorganske soli**

CaCl <sub>2</sub>	116,6
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,417
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	61
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	100
KCl	311,8
NaHCO <sub>3</sub>	1200
NaCl	6995,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	62,5
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> 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	55,0
Timidin	0,365

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

NaCl	8 g
------	-----

KCl	0,2 g
NaHPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
destilirana H <sub>2</sub> O	do 1000 mL

**0,4 %-tna otopina Trypan Blue**

Trypan Blue	25 mg
PBS pufer	5 mL
profiltrirati	

**Ishodna otopina MTT**

MTT	25 mg
PBS	5 mL
sterilno profiltrirati	

**Trikloroctena kiselina (600 mM)**

trikloroctena kiselina	10,0 g
demineralizirana voda	100,0 mL

**Tiobarbituratna kiselina (55 mM)**

tiobarbiturna kiselina	0,8 g
demineralizirana voda	100,0 mL

**Malondialdehid (61 mM)**

malondialdehid	1,0 µL
demineralizirana voda	100,0 µL

**Albumin govedeg seruma (BSA, 10x)**

BSA	10,0 mg
demineralizirana voda	10,0 mL

**Bradfordov reagens**

Coomasie blue	10,0 mg
etanol	5,0 mL

fosforna kiselina 10,0 mL

**Ishodna otopina PCB 77**

PCB 77 10 mg

DMSO 3,425 mL

-koncentracije PCB 77 u mediju za uzgoj iznosile su 10, 25, 50, 75 i 100  $\mu$ M

**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  $\mu$ M

**Ishodna otopina vitamina E**

$\alpha$ -tokoferol 100 mg

apsolutni etanol 1 mL

-koncentracije vitamina E u mediju za uzgoj iznosile su 50, 75, 100 i 150  $\mu$ M

**3.1.4. Oprema i uređaji**

U radu je korištena sljedeća oprema:

- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub>, 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
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- spektrofotometar; Helios-  $\gamma$ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- analitička vaga; Mettler, Zürich, Švicarska
- precizna vaga; Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- centrifuga; Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- vibracijska mješalica; Tehnica Železniki, Slovenija

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Kultivacija CHO-K1 stanica u monosloju**

Uzgoj i održavanje CHO-K1 stanica započinje odmrzavanjem stanica. Zamrznute stanice čuvaju se na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80 % Dulbecco MEM/F12, 10 % FBS-a i 10 % DMSO-a. Stanice se naglo odmrzavaju na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , u atmosferi od 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$  te centrifugiraju pri 1000 okretaja/min tijekom 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, započinje se s kultivacijom stanica u T-bocama uz dodatak medija za uzgoj (90 % Dulbecco MEM/F12 i 10 % FBS-a) u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uz 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ ). Rad s kulturama životinjskih stanica mora se odvijati u aseptičkim uvjetima koji se osiguravaju radom u komori za sterilan rad (laminaru).

Optimalni uvjeti za rast i razvoj stanica osiguravaju se redovitim mijenjanjem medija za uzgoj. CHO-K1 stanična linija raste u monosloju, pa je stanice prije prebacivanja u veće mjerilo potrebno prvo isprati od ostatka iskorištenog seruma i medija (PBS-om ili tripsinom), a zatim odvojiti od površine T-boce dodavanjem 1-2 mL tripsina. Tripsinizirane stanice se resuspendiraju u novom mediju za uzgoj te se uzima uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*. Stanice se razrijeđuju na koncentraciju  $2 \times 10^5$  stanica/mL medija za uzgoj dodatkom svježeg medija.

Kako bi se stanice mogle upotrebljavati kroz duži period pohranjuju se zamrzavanjem. Stanice se zamrzavaju u eksponencijalnoj fazi rasta na način da se odcentrifugiraju i resuspendiraju u mediju za zamrzavanje u koncentraciji  $5 \times 10^6$  stanica/mL. Po 1 mL takve suspenzije stanica stavlja se u ampule za zamrzavanje i postepenim snižavanjem temperature od  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  zamrzava na temperaturu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

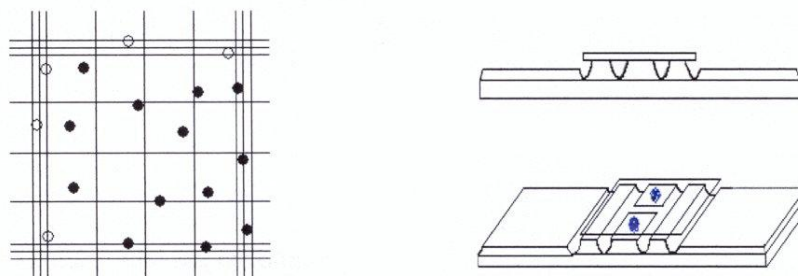
### **3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue***

Uzorak od 20  $\mu\text{L}$  suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica resuspendira se s 20  $\mu\text{L}$  0,4 %-tne otopine boje *Trypan Blue* te se 20  $\mu\text{L}$  te smjese nanese na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica i pod svjetlosnim mikroskopom izbroje žive (nebojane) i mrtve (plavo obojane) stanice. Mrtve se stanice oboje budući da boja lako prolazi kroz membranu narušenog integriteta.

Fuchs-Rosenthalova komorica podijeljena je na 16 kvadrata, a broje se stanice unutar četiri središnja kvadrata. Kako se iste stanice ne bi brojale više puta, u svakom se kvadratu uz

stanice unutar samog kvadrata broje i stanice na donjem i desnom rubu. Dubina komorice je 0,2 mm, a površina iznosi 0,0625 mm<sup>2</sup> (Slika 9). Ukupan broj živih stanica u uzorku odredi se prema formuli:

$$\text{srednja vrijednost broja izbrojenih stanica} \times 2 \times 5 \times 10^3 \text{ [stanica/mL]}$$



- stanice koje se ne broje
- stanice koje se broje

**Slika 9.** Fuchs-Rosenthalova komorica

### 3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica *MTT* metodom

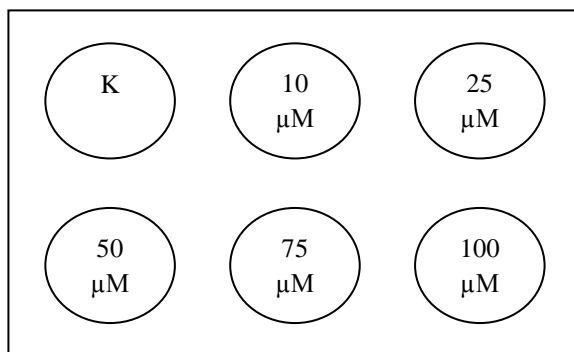
Tetrazolijeva sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je sol žute boje koja se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama prevodi u ljubičasto obojene kristale formazana pa je njezinom primjenom moguće odrediti aktivnost tih enzima (Supino, 1995). Postupak započinje sterilnim dodavanjem u svaku jažicu po 200 μL radne otopine MTT, koju čine tetrazolijeva sol MTT otopljena u PBS-u. Slijedi inkubacija tijekom 4 h pri 37 °C. Nakon završene inkubacije medij se uklanja iz jažica pazeći da se ne uklone i kristali formazana te se u svaku jažicu doda 2 mL DMSO koji otapa nastale kristale. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrom pri valnoj duljini od 570 nm u odnosu na slijepu probu.

### 3.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka PCB 77 i PCB 153 na CHO-K1 staničnoj liniji *MTT* metodom

U svaku od jažica na multiwell ploči sa 6 jažica otpipetira se po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  st/mL medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije dio jažica se tretira s 20 μL otopine PCB 77 odnosno PCB 153 tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 10, 25, 50, 75 i 100 μM (Slika 10). Jedna jažica na multiwell ploči prati se kao kontrola uz dodatak 20 μL DMSO-a kako bi se isključio mogući toksični učinak



samog otapala na preživljenje stanica. Inkubacija naci jepljenih ploča traje 72 sata. Svaka 24 sata metodom *MTT* se odredi citotoksični učinak pojedinog kongenera uspoređivanjem vijabilnosti stanica s i bez dodatka PCB-a. Iz dobivenih rezultata grafički je prikazan odnos inhibicije stanične proliferacije i koncentracije PCB-a na osnovu čega su određene  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  i  $IC_{80}$  vrijednosti, koje predstavljaju koncentracije PCB-a koje inhibiraju rast 20%, 50% i 80% biomase CHO-K1 stanica.



**Slika 10.** Multiwell ploča sa 6 jažica. K- kontrola s dodatkom DMSO (10  $\mu$ L/mL medija); 10, 25, 50, 75 i 100  $\mu$ M - koncentracije PCB-a u mediju za uzgoj.

### **3.2.5. Određivanje učinka vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB 153 na lipidnu peroksidaciju i vijabilnost CHO- K1 stanica**

#### **3.2.5.1. Određivanje učinka vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB 153 na proliferaciju CHO-K1 stanica**

U svaku od jažica na multiwell ploči otpipetira se po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  st/mL medija za uzgoj. Sat vremena po naci jepljivanju, dio stanica se tretira vitaminom E prema Shemi 1. Otopine vitamina E u apsolutnom etanolu pripremljene su tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 50, 75, 100 i 150  $\mu$ M. Nakon 24 sata predinkubacije stanica vitaminom E, stanice su tretirane s PCB 153 (Shema 1) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija bila 75  $\mu$ M. Istovremeno s praćenjem dinamike rasta stanica tretiranih vitaminom E i PCB 153, praćena je i dinamika rasta stanica kontrolnih uzoraka tretiranih s istim volumenom apsolutnog etanola u kojem je dodavan vitamin E i istim volumenom DMSO-a u kojem je dodavan PCB s ciljem određivanja mogućeg toksičnog djelovanja samih otapala. Odabranim kongenerom također su tretirane stanice koje nisu bile predinkubirane vitaminom E. Inkubacija tretiranih stanica traje 72 sata, a svakih 24 sata provjerava se učinak vitamina E na proliferaciju stanica tretiranih s PCB 153 metodom *MTT*.

	apsolutni etanol*	DMSO**	PCB 153 <sup>#</sup>	vitamin E <sup>##</sup>
kontrolni uzorci	+	+		
praćenje proliferacije stanica uz PCB 153	+		+	
praćenje proliferacije stanica prethodno inkubiranih vitaminom E, a potom tretiranih s PCB 153			+	+

**Shema 1.** Plan pokusa praćenja učinka vitamina E pri tretmanu stanica s PCB 153

- \* volumen dodanog apsolutnog etanola po jažici iznosi 10  $\mu\text{L}$
- \*\* volumen dodanog DMSO-a po jažici iznosi 20  $\mu\text{L}$
- # otopine PCB 153 pripravljene u DMSO; 20  $\mu\text{L}$  otopine PCB 153 dodano po jažici pri čemu je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 75  $\mu\text{M}$  PCB 153
- ## otopine vitamina E pripravljene u apsolutnom etanolu; 10  $\mu\text{L}$  otopine vitamina E dodano po jažici pri čemu su u mediju za uzgoj postignute koncentracije 50, 75, 100 i 150  $\mu\text{M}$  vitamina E

Dodatno je ispitan učinak vitamina E na proliferaciju stanica tretiranih s PCB 153 metodom *Trypan Blue*, 24 sata nakon tretmana ksenobiotikom.

**3.2.5.2. Određivanje učinka vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB-153 na peroksidaciju lipida CHO-K1 stanica**

Slobodni radikali, čije porijeklo može biti molekularni kisik koji je primio elektron iz različitih izvora ili aktivirane forme nekog spoja koji je ušao u stanicu, mogu napasti nezasićene lipide u stanicama, što rezultira lančanom reakcijom stvaranja slobodnih radikala. Takva reakcija završava stvaranjem produktata razgradnje lipida: lipidnih alkohola, aldehida i malondialdehida (Durgo i sur, 2007). Vrlo često korištena metoda za određivanje lipidne peroksidacije u *in vitro* kulturama, kojom se dobivaju dovoljno precizni rezultati, je mjerenje količine nastalog kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kiselina (MDA-TBA).

Određivanje TBA-MDA kompleksa u uzorcima

13 mL stanične suspenzije ( $1 \times 10^5$  st/mL medija za uzgoj) nacjepljeno je u Petrijeve zdjelice promjera 10 mm. Nakon sat vremena, dio stanica je tretiran vitaminom E (prema

Shemi 1) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 50, 100 i 150  $\mu\text{M}$ . Predinkubacija vitaminom E trajala je 24 sata, nakon čega su stanice tretirane s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153. Istovremeno s praćenjem učinka vitamina E i PCB 153 na stanice, praćeni su i kontrolni uzorci stanica tretirani s istim volumenom apsolutnog etanola u kojem je dodavan vitamin E i istim volumenom DMSO-a u kojem je dodavan PCB s ciljem određivanja mogućeg toksičnog djelovanja samih otapala. 24 sata nakon tretmana ksenobiotikom, stanice su sastrugane s dna Petrijevih zdjelica plastičnim štapićem, a na talog stanica stavljeno 100  $\mu\text{L}$  vode te se stanice liziraju (30 minuta). Na stanice se stavlja 500  $\mu\text{L}$  trikloroctene kiseline (15 minuta na 90°C). Slijedi centrifugiranje stanica na 5000 okretaja/minuti tijekom 5 minuta. Na sveukupni supernatant dodaje se tiobarbiturna kiselina do volumena od 1,5 mL. Smjesa se inkubira 15 minuta na 100 °C, nakon čega se uzorci hlade u mlakoj vodi. Intenzitet ružičasto obojenog kompleksa TBA-MDA mjeri se spektrofotometrijski na 532 nm i 600 nm. Valna dužina od 600 nm predstavlja vrijednost nespecifične absorpcije te se oduzima od vrijednosti absorpcije izmjerene na 532 nm.

Iz baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost absorpcije o koncentraciji TBA-MDA kompleksa određuje se pripadajuća vrijednost koncentracije malondialdehida u ispitivanim uzorcima, te se izražava u mmol/g proteina, a vrijednost koncentracije se korigira za faktor razrjeđenja (Cereser i sur., 2001; McCarthy i sur., 2004):

$$c(MDA)_{uzorak} = \frac{(A_{532-600} - b) \times V}{a \times TV \times c_{proteina}}$$

$c(MDA)$  – koncentracija malondialdehida u uzorku izražena u mmol/g proteina

$A_{532-600}$  – razlika absorpcija na 532 i 600 nm

$b$  – odsječak na osi y baždarnog dijagrama

$V = 1 \text{ mL}$

$a$  – koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama

$TV$  – ukupni volumen u kiveti

$c$  – koncentracija proteina određena metodom po Bradfordu

#### Baždarni pravac za određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

1  $\mu\text{L}$  malondialdehida otopi se u 100  $\mu\text{L}$  demineralizirane vode. Iz ishodne otopine malondialdehida pripremi se niz razrjeđenja u rasponu koncentracija 0,5-3  $\mu\text{M}$ . Otopini malondialdehida dodaje se trikloroctena kiselina kako bi se malondialdehid koji se nalazi u

acetalnom obliku preveo u aldehidni oblik. Nakon reakcije s tiobarbiturnom kiselinom nastaje crveno obojeni kompleks TBA-MDA. Intenzitet crveno obojenog kompleksa mjeri se spektrofotometrijski na 532 nm i 600 nm. Valna dužina od 600 nm predstavlja vrijednost nespecifične absorpcije, te se oduzima od vrijednosti izmjerene na 532 nm. Iz dobivenih podataka crta se baždarni dijagram tako da se na os apscisu nanose vrijednosti koncentracija malondialdehida, a na os ordinatu vrijednosti specifične absorpcije za TBA-MDA kompleks. Iz jednadžbe pravca izračuna se, pomoću poznate vrijednosti specifične absorpcije za TBA-MDA kompleks pojedinog uzorka, pripadajuća vrijednost koncentracije malondialdehida.

#### Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Princip određivanja koncentracije ukupnih staničnih proteina u staničnom lizatu metodom po Bradfordu temelji se na činjenici da se spoj Coomassie blue G 250 veže za arginilne i lizinske ostatke proteina, ali ne i za slobodne aminokiseline. Iz baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost absorpcije o koncentraciji proteina, a pomoću izmjerene absorpcije pojedinog uzorka, određuje se pripadajuća vrijednost koncentracije proteina u tim uzorcima.

Koncentracija proteina u ispitivanim uzorcima određuje se tako da se u kivetu stavlja 5  $\mu\text{L}$  uzorka (staničnog lizata), 95  $\mu\text{L}$  demineralizirane vode i 1 mL Bradfordovog reagensa. Pripremljene otopine moraju odstajati 2 minute prije mjerenja absorpcije na 595 nm. Koncentracija proteina u uzorcima određuje se prema formuli:

$$\gamma(\text{proteina})_{\text{uzorak}} = \frac{A_{595} - b}{a}$$

$\gamma(\text{proteina})$  – koncentracija proteina u uzorku izražena u mg/mL

$A_{595}$  – absorpcija izmjerena na 595 nm

$b$  – odsječak na osi y baždarnog dijagrama

$a$  – koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama

#### Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

U kivetama se pripremi raspon koncentracija albumina goveđeg seruma (BSA) od 0 mg/mL do 1 mg/mL u ukupnom volumenu od 100  $\mu\text{L}$ . Na otopinu proteina određene

koncentracije dodaje se 1 mL Bradfordovog reagensa. Absorbancija se određuje na 595 nm, a pripremljeni uzorci moraju stajati barem dvije minute prije početka mjerenja. Mjerenje se mora izvršiti unutar 60 minuta. Na osnovi dobivenih rezultata, konstruira se baždarni dijagram tako da se na os apcisu nanose vrijednosti koncentracije proteina, a na os ordinatu odgovarajuće vrijednosti absorbancije (Bradford, 1976).

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) uzoraka u skupini:

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

s pripadajućim standardnim greškama  $S_{\bar{x}}$

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

izračunate iz pojedinačne vrijednosti uzoraka  $x_i$  i ukupnog broja uzoraka N.

Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom, a t vrijednost dobivena je iz izraza:

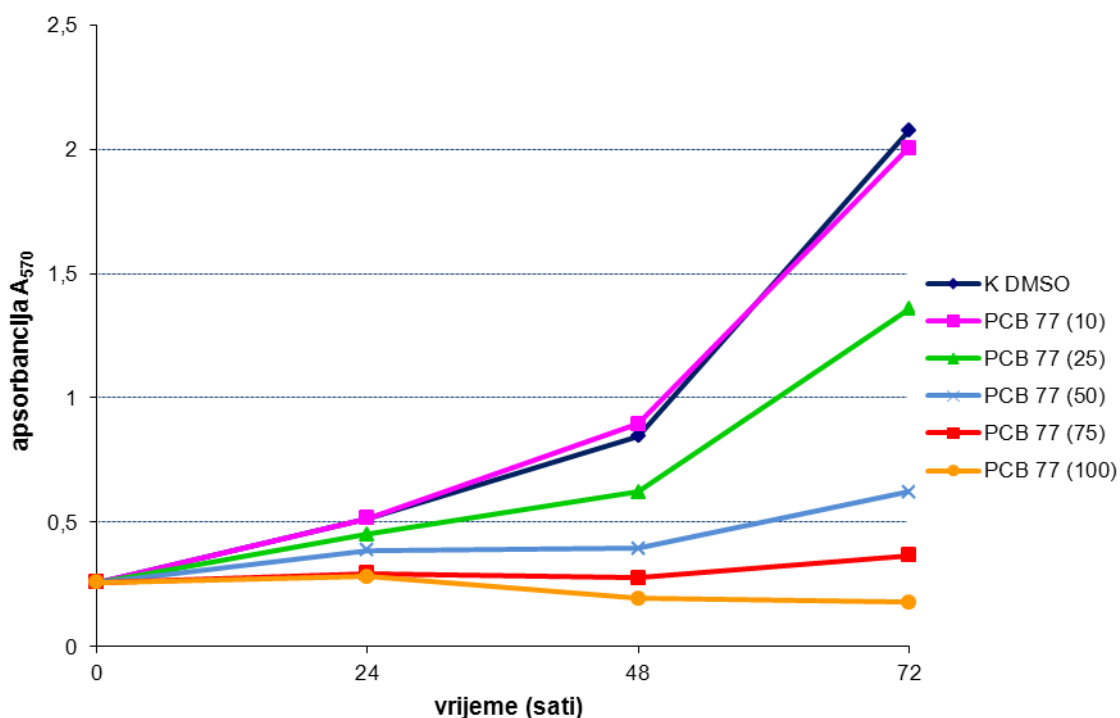
$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S^2_{\bar{x}_1} + S^2_{\bar{x}_2}}}$$

Statistički značajnim su smatrane razlike između skupina za koje je stupanj vrijednosti (p) bio manji od 0,05.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB 77 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN *MTT* METODOM

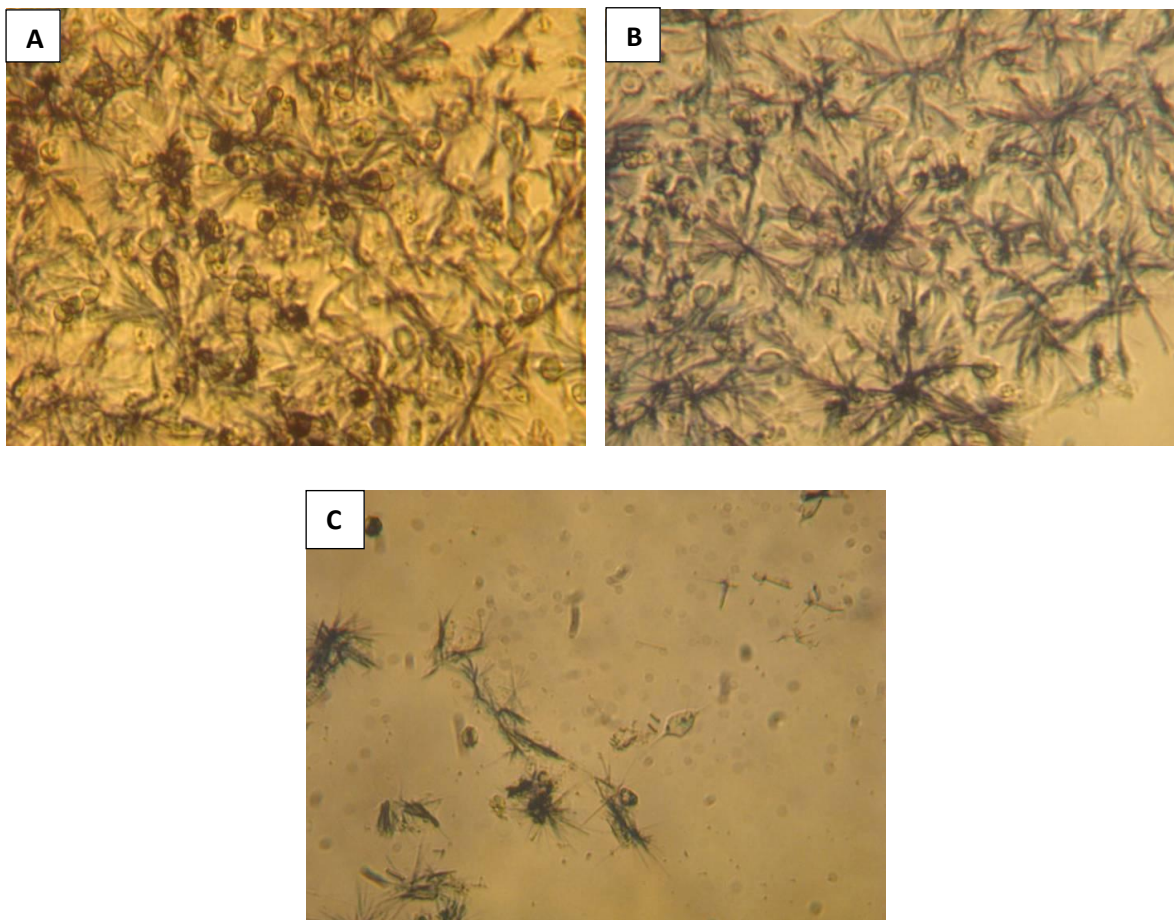
U svrhu praćenja citotoksičnog učinka PCB 77 na CHO-K1 staničnoj liniji stanice se najepljuju u jažice multiwell ploča u koncentraciji  $2 \times 10^4$  st/mL ( $V=2$  mL) i nakon 24 sata tretiraju s 20  $\mu$ L otopine PCB-a u DMSO-u tako da koncentracija PCB-a 77 u mediju za uzgoj iznosi 10, 25, 50, 75 i 100  $\mu$ M. Također, prati se rast kontrolnih stanica kojima se dodaje 10  $\mu$ L DMSO/mL. Citotoksični učinak 10-100  $\mu$ M PCB 77 na proliferaciju stanica praćen je tijekom 72 sata *MTT* metodom i prikazan na Slici 11.



**Slika 11.** Citotoksični učinak PCB 77 na dinamiku rasta CHO-K1 stanica praćen *MTT* metodom. K DMSO- kontrola uz dodatak 10  $\mu$ L DMSO/mL medija za uzgoj; koncentracija PCB-a u mediju za uzgoj: PCB 77 (10) - 10  $\mu$ M; PCB 77 (25) - 25  $\mu$ M; PCB 77 (50) - 50  $\mu$ M; PCB 77 (75) - 75  $\mu$ M; PCB 77 (100) - 100  $\mu$ M

Slika 11 prikazuje inhibitorni učinak i toksično djelovanje primijenjenih koncentracija PCB 77 na CHO-K1 stanice. Uočeno je proporcionalno smanjenje vijabilnosti stanica povećanjem koncentracije PCB-a 77. Pri najvišoj koncentraciji PCB-a 77 (100  $\mu$ M) gotovo je u potpunosti inhibirana stanična aktivnost.

Provedena je i svjetlosna mikroskopija kontrolnih uzoraka stanica i stanica nakon tretmana s 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  PCB 77 uz prethodno primijenjenu *MTT* metodu. Stanice su inkubirane tetrazolijevom soli *MTT* (ili 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) pri čemu su u živim stanicama formirani ljubičasti kristali formazana pod djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza. Smanjeni broj stanica i manje formiranih kristala nakon tretmana s PCB 77 (Slika 12, B i C) u odnosu na kontrolu (Slika 12, A) ukazuje na citotoksično djelovanje i visok inhibitorni učinak PCB 77 na staničnu proliferaciju.



**Slika 12.** Svjetlosna mikroskopija CHO-K1 stanica nakon 72 sata uz provedenu *MTT* metodu (povećanje 400 x): A kontrolni uzorak stanica uz dodatak 10  $\mu\text{L}$  DMSO-a/mL medija za uzgoj; B CHO-K1 stanice tretirane s 10  $\mu\text{M}$  PCB 77; C CHO-K1 stanice tretirane s 100  $\mu\text{M}$  PCB 77.

Citotoksičnost PCB 77 ispitana je postavljanjem pokusa u kojem su napravljena najmanje tri paralelna uzorka za svaku koncentraciju. Rezultati toksičnog učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica su statistički obrađeni i prikazani u Tablici 1.

**Tablica 1.** Citotoksični učinak PCB-a 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica tijekom 72 sata praćen *MTT* metodom



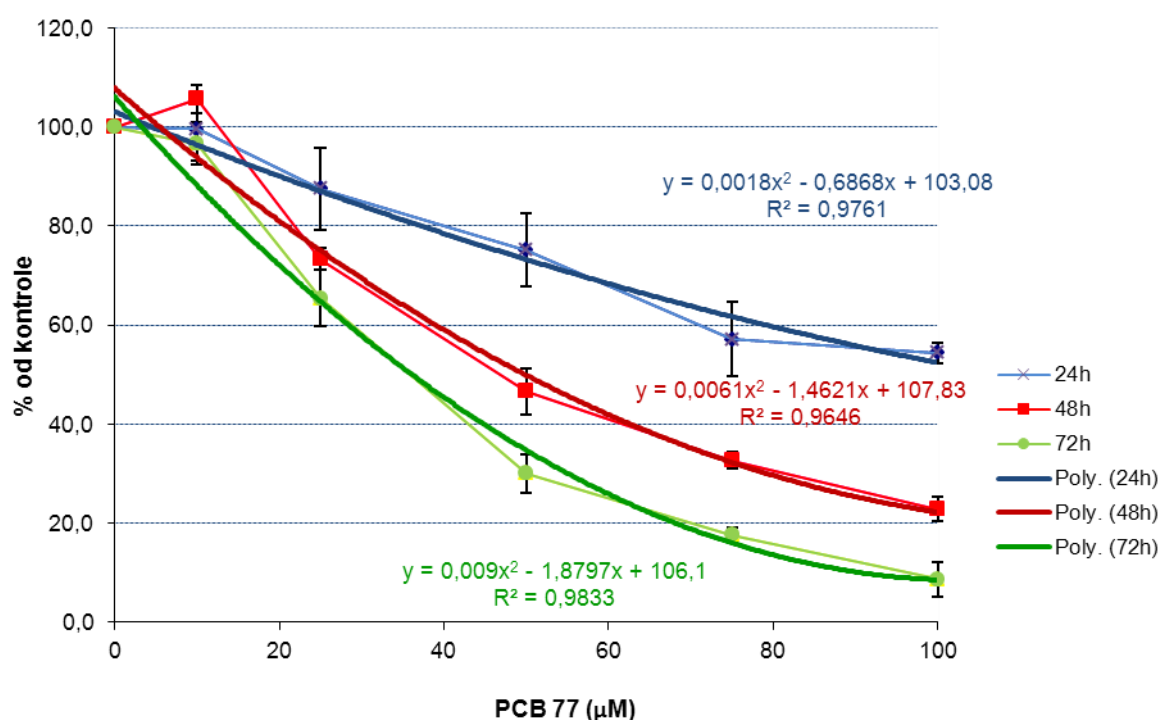
	Apsorbancija (570 nm)		
	24 h	48 h	72 h
K DMSO*	<b>0,517 ±</b> 0,0284**	<b>0,848 ±</b> 0,0472	<b>2,075 ±</b> 0,2139
PCB 77 (10 µM)	<b>0,515 ±</b> 0,0334	<b>0,896 ±</b> 0,0238	<b>2,006 ±</b> 0,0887
PCB 77 (25 µM)	<b>0,453 ±</b> 0,0428	<b>0,622 ±</b> 0,0182 <sup>b</sup>	<b>1,356 ±</b> 0,1181 <sup>a</sup>
PCB 77 (50 µM)	<b>0,388 ±</b> 0,0381	<b>0,395 ±</b> 0,0397 <sup>c</sup>	<b>0,622 ±</b> 0,0802 <sup>c</sup>
PCB 77 (75 µM)	<b>0,295 ±</b> 0,0390 <sup>b</sup>	<b>0,277 ±</b> 0,0143 <sup>d</sup>	<b>0,365 ±</b> 0,0327 <sup>c</sup>
PCB 77 (100 µM)	<b>0,281 ±</b> 0,0108 <sup>c</sup>	<b>0,193 ±</b> 0,0211 <sup>d</sup>	<b>0,179 ±</b> 0,0741 <sup>c</sup>

\* kontrola uz dodatak 10 µL DMSO/mL medija za uzgoj; \*\* srednja vrijednost ± standardna pogreška; statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,025; <sup>c</sup> p<0,005; <sup>d</sup> p<0,001

Pri ispitivanju utjecaja PCB 77 na proliferaciju stanica određeno je statistički značajno smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolu. Nakon 24 sata statistički značajna inhibicija stanične proliferacije utvrđena je pri 75 µM PCB 77 (p<0,025) i 100 µM PCB 77 (p<0,005). Niže koncentracije PCB 77 (10, 25, 50 µM) uzrokuju smanjenje vijabilnosti stanica, međutim proliferacija i stanična aktivnost nije bila inhibirana značajno u odnosu na kontrolu. Tijekom dužeg vremena inkubacije (48 i 72 sata) kontinuirano je izražen inhibitorski učinak na staničnu proliferaciju. Nakon 48 sati statistički značajno manje vijabilnih stanica određeno je pri 25 µM PCB 77 (p<0,025), 50 µM PCB 77 (p<0,005) te pri 75 i 100 µM PCB 77 (p<0,001). Statistički značajna inhibicija nakon 72 sata zabilježena je pri 25 µM PCB 77 (p<0,05) i pri svim primijenjenim višim koncentracijama: 50-100 µM PCB 77 (p<0,005).

#### 4.1.1. IC vrijednosti za PCB 77 na CHO-K1 staničnoj liniji

Citotoksični učinak različitih koncentracija PCB 77 prikazan je kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolu. Ovisnost preživljenja CHO-K1 stanica o koncentraciji PCB 77 tijekom 72 sata inkubacije prikazana je na Slici 13. Raspon ispitanih doza PCB 77 je od 10 do 100  $\mu\text{M}$  pri čemu je učinak pojedine doze određen iz najmanje 3 mjerenja.



**Slika 13.** Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 24, 48 i 72 sata uz tretman s 10 do 100  $\mu\text{M}$  PCB 77 u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane s 10  $\mu\text{L}$  DMSO/mL) praćeno *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje, a određeni su iz najmanje 3 mjerenja. Jednadžbe se odnose na interpolirane polinomne krivulje s pripadajućim  $R^2$  vrijednostima nakon određenog perioda inkubacije (24, 48 ili 72 h).

IC vrijednosti su izračunate iz pripadajućih jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (*trend line*) koje najmanje odstupaju od izmjerenih podataka pri čemu se kod odabira interpoliranje krivulje težilo da njoj pripadajući koeficijent determinacije ( $R^2$ ) bude što bliži 1. Vrijednost koeficijenta determinacije kreće se u intervalu  $0 \leq R^2 \leq 1$ . Regresijski model je reprezentativniji ukoliko je ovaj pokazatelj bliži 1.

IC vrijednosti za PCB 77 u CHO-K1 staničnoj liniji izračunate iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja nakon 24, 48 i 72 sata prikazane su u Tablici 2. IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> i IC<sub>80</sub> su vrijednosti koje predstavljaju one koncentracije PCB 77 kod kojih dolazi do 20, 50 i 80 %-tne inhibicije staničnog rasta. IC<sub>50</sub> vrijednosti za PCB 77 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije iznose 107,668  $\mu\text{M}$ , 49,971  $\mu\text{M}$  i 36,077  $\mu\text{M}$ .

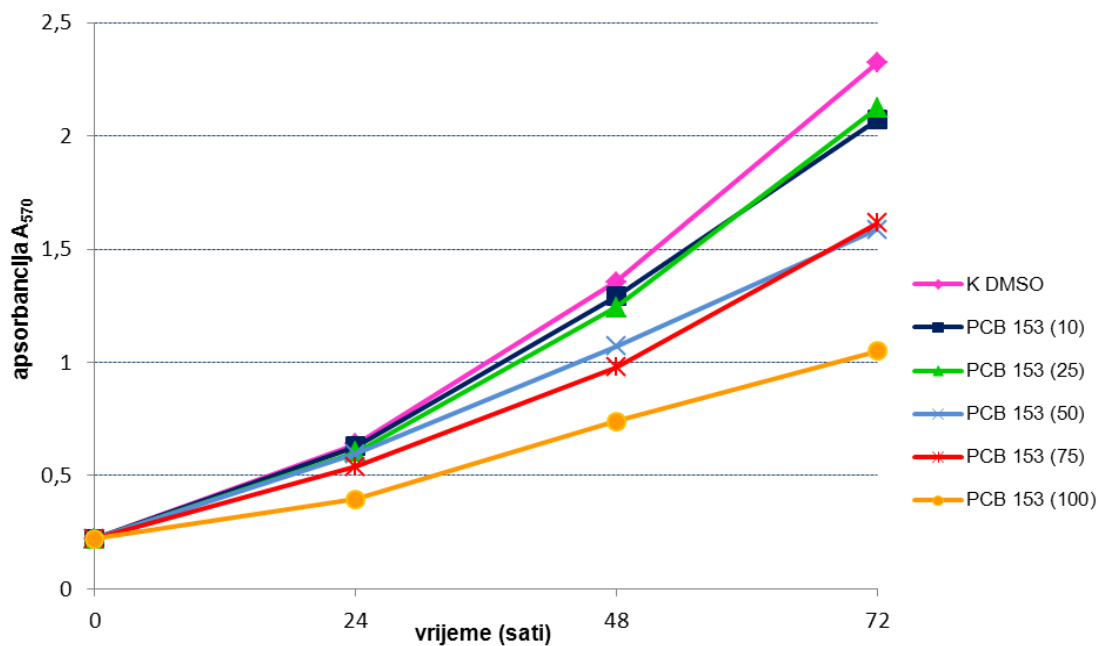
**Tablica 2.** Koncentracije PCB 77 ( $\mu\text{M}$ ) koje inhibiraju proliferaciju CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene MTT metodom nakon 24, 48 i 72 sata

IC vrijednosti za PCB 77 na CHO-K1 stanicama ( $\mu\text{M}$ )	vrijeme (sati)		
	24	48	72
IC <sub>20</sub>	37,240	20,848	14,956
IC <sub>50</sub>	107,668	49,971	36,077
IC <sub>80</sub>	/	/	67,842

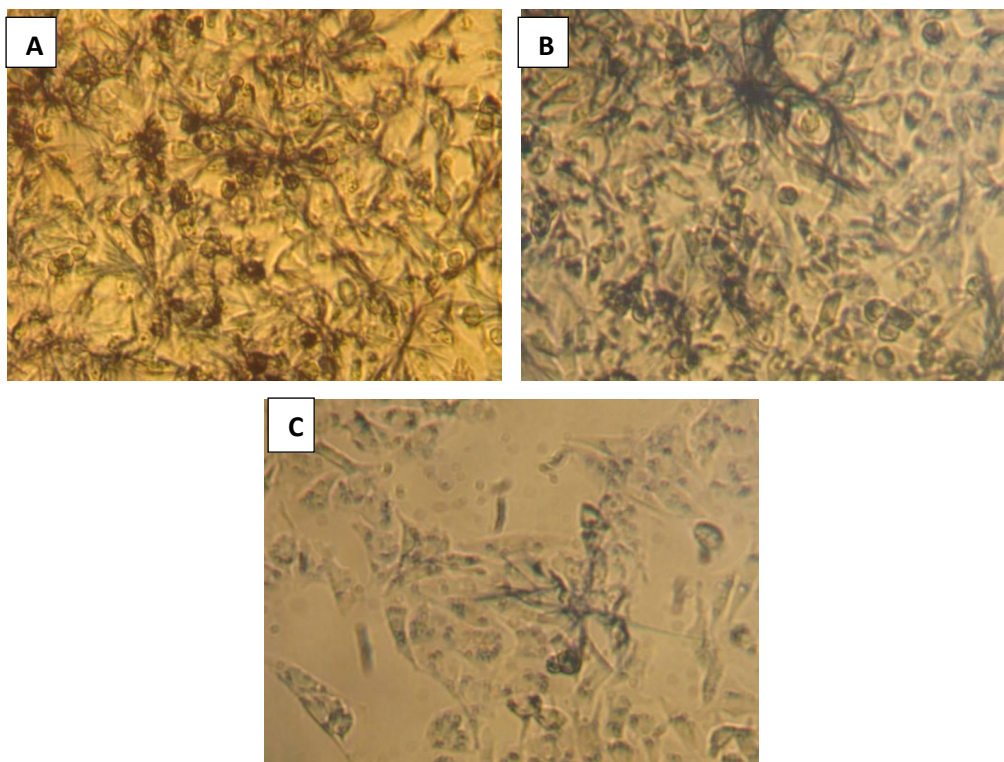
#### 4. 2. CITOTOKSIČNI UČINAK PCB 153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN MTT METODOM

Vijabilnost stanica tretiranih s PCB 153 i kontrolnih uzoraka stanica praćena je MTT metodom, a pokusi su postavljeni na identičan način kao pri praćenju citotoksičnosti PCB 77. Rezultati su prikazani na Slici 14. Povećanjem koncentracije PCB 153 uočeno je smanjenje proliferacije stanica. Inhibitorski učinak i toksično djelovanje PCB 153 na CHO-K1 stanice vidljivo je kod svih koncentracija (Slika 14), iako znatno slabije izraženo nego nakon tretmana stanica s PCB 77 (Slika 11). Pri koncentracijama PCB 153 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  i s produljenim vremenom inkubacije taj je učinak znatno više izražen.

Svjetlosna mikroskopija kontrolnih uzoraka stanica i stanica tretiranih s 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  PCB 153 uz prethodno provedenu MTT metodu (Slika 15) potvrdila je inhibiciju proliferacije stanica kao i toksičnost PCB 153.



**Slika 14.** Citotoksični učinak PCB 153 na dinamiku rasta CHO-K1 stanica praćen *MTT* metodom. K DMSO- kontrola uz dodatak 10  $\mu\text{L}$  DMSO-a/mL medija za uzgoj; koncentracija PCB-a u mediju za uzgoj: PCB 153 (10) - 10  $\mu\text{M}$ ; PCB 153 (25) - 25  $\mu\text{M}$ ; PCB 153 (50) - 50  $\mu\text{M}$ ; PCB 153 (75) - 75  $\mu\text{M}$ ; PCB 153 (100) - 100  $\mu\text{M}$



**Slika 15.** Svjetlosna mikroskopija CHO-K1 stanica nakon 72 sata uz provedenu *MTT* metodu (povećanje 400 x); A kontrolni uzorak stanica uz dodatak 10  $\mu\text{L}$  DMSO/mL medija za uzgoj; B CHO-K1 stanice tretirane s 10  $\mu\text{M}$  PCB 153; C CHO-K1 stanice tretirane s 100  $\mu\text{M}$  PCB 153.

U Tablici 3 prikazani su statistički obrađeni rezultati citotoksičnog učinka PCB 153 na proliferaciju CHO-K1 stanica. Rezultati su dobiveni iz dva pokusa pri čemu su u svakom pokusu provedena najmanje 2 do 3 paralelna mjerenja za svaki pojedini uzorak.

**Tablica 3.** Citotoksični učinak PCB-a 153 na proliferaciju CHO-K1 stanica tijekom 72 sata praćen *MTT* metodom

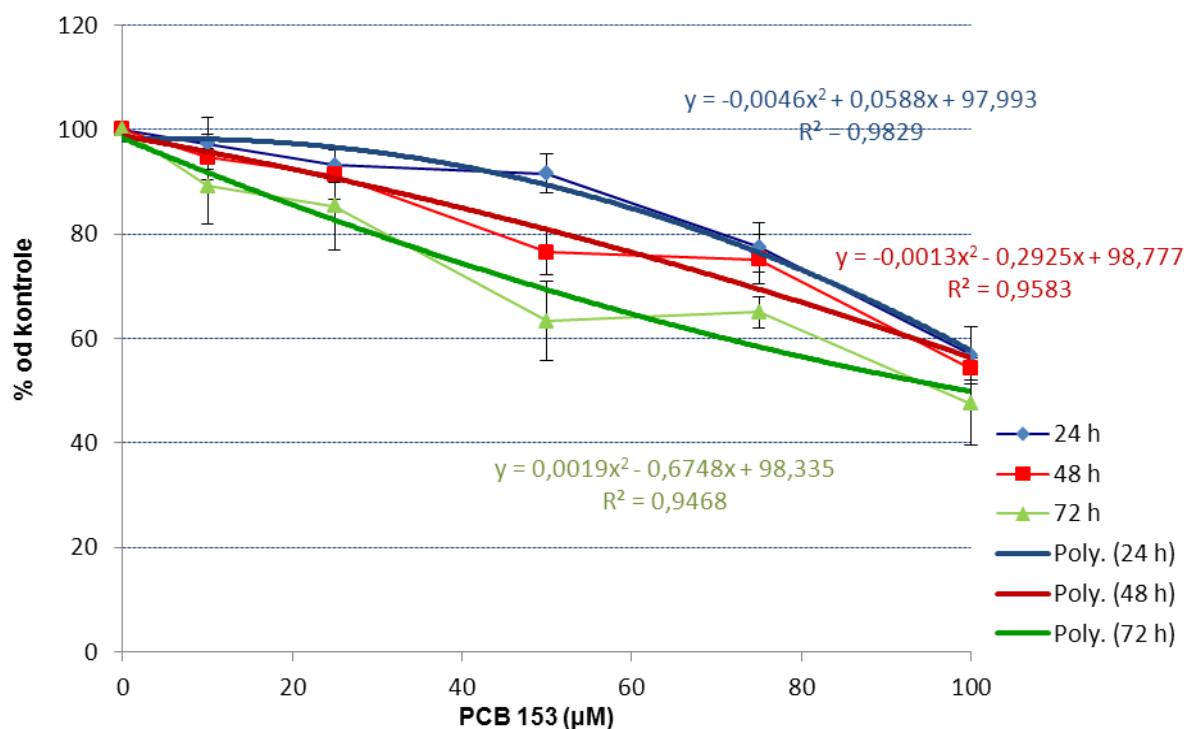
	Apsorbancija (570 nm)		
	24 h	48 h	72 h
K DMSO*	<b>0,640</b> ± 0,0323**	<b>1,356</b> ± 0,0733	<b>2,322</b> ± 0,3039
PCB 153 (10 µM)	<b>0,630</b> ± 0,0217	<b>1,291</b> ± 0,1011	<b>2,072</b> ± 0,3009
PCB 153 (25 µM)	<b>0,604</b> ± 0,0131	<b>1,243</b> ± 0,1025	<b>2,121</b> ± 0,3541
PCB 153 (50 µM)	<b>0,596</b> ± 0,0326	<b>1,070</b> ± 0,0962 <sup>c</sup>	<b>1,586</b> ± 0,3157
PCB 153 (75 µM)	<b>0,538</b> ± 0,0330	<b>0,979</b> ± 0,1170 <sup>c</sup>	<b>1,614</b> ± 0,2160
PCB 153 (100 µM)	<b>0,395</b> ± 0,0377 <sup>c</sup>	<b>0,740</b> ± 0,0138 <sup>d</sup>	<b>1,050</b> ± 0,0975 <sup>e</sup>

\* kontrola uz dodatak 10 µL DMSO/ mL medija za uzgoj; \*\* srednja vrijednost ± standardna pogreška; statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>c</sup> p<0,005; <sup>d</sup> p<0,001; <sup>e</sup> p<0,01

Statistički značajna inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica tretiranih s PCB 153 nakon 24 sata određena je samo pri najvećoj koncentraciji PCB 153, 100 µM (p<0,005). Pri ostalim koncentracijama (10- 75 µM) došlo je do smanjenja vijabilnosti stanica, međutim proliferacija nije bila inhibirana značajno u odnosu na kontrolu. Nakon 48 sati inkubacije statistički značajna inhibicija određena je kod 50 µM i 75 µM PCB 153 (p<0,005) te kod 100 µM PCB 153 (p<0,001). Nakon 72 sata proliferacija stanica nije bila inhibirana značajno u odnosu na kontrolu iako je došlo do smanjenja vijabilnosti stanica, osim pri najvišoj, 100 µM dozi PCB 153 (p<0,01).

#### 4.2.1. IC vrijednosti za PCB 153 na CHO-K1 staničnoj liniji

Ovisnost preživljavanja CHO-K1 stanica o koncentraciji PCB 153 tijekom 72 sata prikazana je na Slici 16. Raspon ispitanih doza PCB 153 je od 10 do 100  $\mu\text{M}$  pri čemu je učinak pojedine doze određen iz najmanje tri do šest mjerenja.



**Slika 16.** Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 24, 48 i 72 sata uz tretman s 10 do 100  $\mu\text{M}$  PCB 153 u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane s 10  $\mu\text{L}$  DMSO/mL) praćeno *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje, a određeni su iz najmanje 3 mjerenja. Jednadžbe se odnose na interpolirane polinomne krivulje s pripadajućim  $R^2$  vrijednostima nakon određenog vremena inkubacije (24, 48 ili 72 h).

Iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja izračunate su  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  i  $IC_{80}$  vrijednosti nakon 24, 48 i 72 sata i prikazane u Tablici 4.  $IC_{50}$  vrijednosti za PCB 153 nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije iznose 108,734  $\mu\text{M}$ , 111,502  $\mu\text{M}$  i 99,510  $\mu\text{M}$ .

**Tablica 4.** Koncentracije PCB 153 ( $\mu\text{M}$ ) koje inhibiraju proliferaciju CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene MTT metodom nakon 24, 48 i 72 sata

IC vrijednosti za PCB 153 na CHO-K1 stanicama ( $\mu\text{M}$ )	vrijeme (sati)		
	24	48	72
IC <sub>20</sub>	69,259	52,121	29,646
IC <sub>50</sub>	108,734	111,502	99,510
IC <sub>80</sub>	136,759	158,155	/

IC vrijednosti za PCB 153 (Tablica 4) i PCB 77 (Tablica 2) indiciraju izraženiju citotoksičnost planarnog kongenera, "dioksinu sličnog" PCB-a 77.

#### 4.3. CITOTOKSIČNOST PCB-a 153 U KULTURI CHO-K1 STANICA UZ PRETHODNU INKUBACIJU VITAMINOM E

U svrhu određivanja mogućeg protektivnog učinka vitamina E pri tretmanu s PCB 153, CHO-K1 stanice se naciepljuju u jažice multiwell ploča u koncentraciji  $2 \times 10^4$  st/mL ( $V=2$  mL) i dodaje se 10  $\mu\text{L}$  otopine vitamina E u etanolu tako da koncentracija vitamina E u mediju za uzgoj iznosi 50, 75, 100 i 150  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 sata inkubacije s vitaminom E stanice se tretiraju s 20  $\mu\text{L}$  otopine PCB-a u DMSO-u tako da koncentracija PCB 153 u mediju iznosi 75  $\mu\text{M}$ . Također, istovremeno se prati rast stanica samo uz 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 bez predinkubacije vitaminom E i kontrolnog uzorka (uz dodatak 20  $\mu\text{L}$  DMSO i 10  $\mu\text{L}$  etanola po jažici). Rezultati su prikazani u Tablici 5.

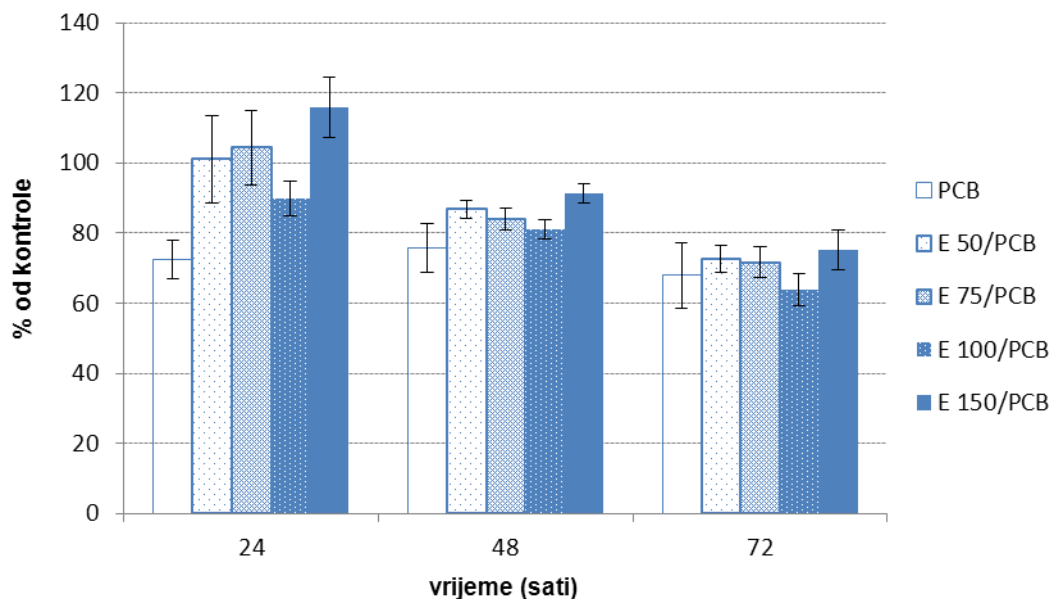
**Tablica 5.** Citotoksični učinak 75  $\mu$ M PCB-a 153 na proliferaciju CHO-K1 stanica predinkubiranih vitaminom E tijekom 72 sata praćen *MTT* metodom

	Apsorbancija (570 nm)		
	24 h	48 h	72 h
K DMSO/EtOH*	<b>0,810</b> $\pm$ 0,1175** (9)	<b>1,400</b> $\pm$ 0,1360 (11)	<b>2,588</b> $\pm$ 0,2094 (12)
PCB 153 (75 $\mu$ M)	<b>0,533</b> $\pm$ 0,0276 (8)	<b>1,150</b> $\pm$ 0,1213 (9)	<b>1,791</b> $\pm$ 0,2430 (10)
PCB 153 (75 $\mu$ M) + vitamin E (50 $\mu$ M)	<b>0,725</b> $\pm$ 0,1754 (6)	<b>1,270</b> $\pm$ 0,1468 (9)	<b>1,952</b> $\pm$ 0,1857 (11)
PCB 153 (75 $\mu$ M) + vitamin E (75 $\mu$ M)	<b>0,897</b> $\pm$ 0,1989 (9)	<b>1,236</b> $\pm$ 0,1395 (12)	<b>1,850</b> $\pm$ 0,1716 (12)
PCB 153 (75 $\mu$ M) + vitamin E (100 $\mu$ M)	<b>0,751</b> $\pm$ 0,1277 (9)	<b>1,244</b> $\pm$ 0,1430 (10)	<b>1,653</b> $\pm$ 0,1864 (9)
PCB 153 (75 $\mu$ M) + vitamin E (150 $\mu$ M)	<b>0,805</b> $\pm$ 0,1196 <sup>a</sup> (7)	<b>1,391</b> $\pm$ 0,1570 (10)	<b>2,014</b> $\pm$ 0,2741 (10)

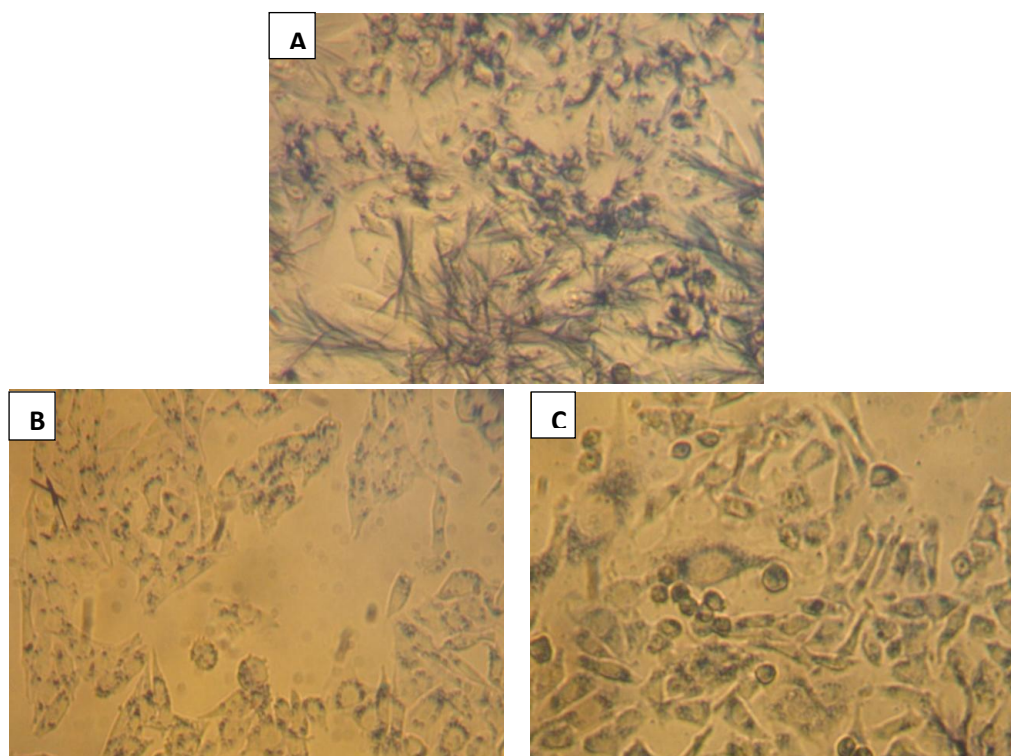
\* kontrola uz dodatak 10  $\mu$ L DMSO/ mL medija za uzgoj i 5  $\mu$ L etanola/mL medija za uzgoj;  
 \*\* srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška; ( ) broj uzoraka; statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> p<0,05

Učinak različitih koncentracija vitamina E prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih s 75  $\mu$ M PCB 153, a prethodno inkubiranih s vitaminom E u odnosu na stanice tretirane s 75  $\mu$ M PCB 153, ali bez prethodne inkubacije s vitaminom E. Raspon ispitanih doza vitamina E je od 50 do 150  $\mu$ M pri čemu je učinak pojedine doze određen iz najmanje 3 mjerenja, a rezultati dobiveni tijekom 72 sata kultivacije prikazani su na Slici 17.





**Slika 17.** Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 24, 48 i 72 sata uz tretman s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 i predtretman vitaminom E (50, 75, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane s PCB-om, bez prethodnog tretmana vitaminom E) praćeno *MTT* metodom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje, a određeni su iz četiri pokusa od kojih svaki ima najmanje dva do tri paralelna mjerenja.



**Slika 18.** Svjetlosna mikroskopija CHO-K1 stanica nakon 72 sata uz provedenu *MTT* metodu (povećanje 400 x); A kontrolni uzorak stanica uz dodatak 10  $\mu\text{L}$  DMSO-a/mL medija za uzgoj i 5  $\mu\text{L}$  etanola/mL medija za uzgoj; B CHO-K1 stanice tretirane s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153; C CHO-K1 stanice tretirane s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 i prethodno inkubirane s 150  $\mu\text{M}$  vitaminom E.

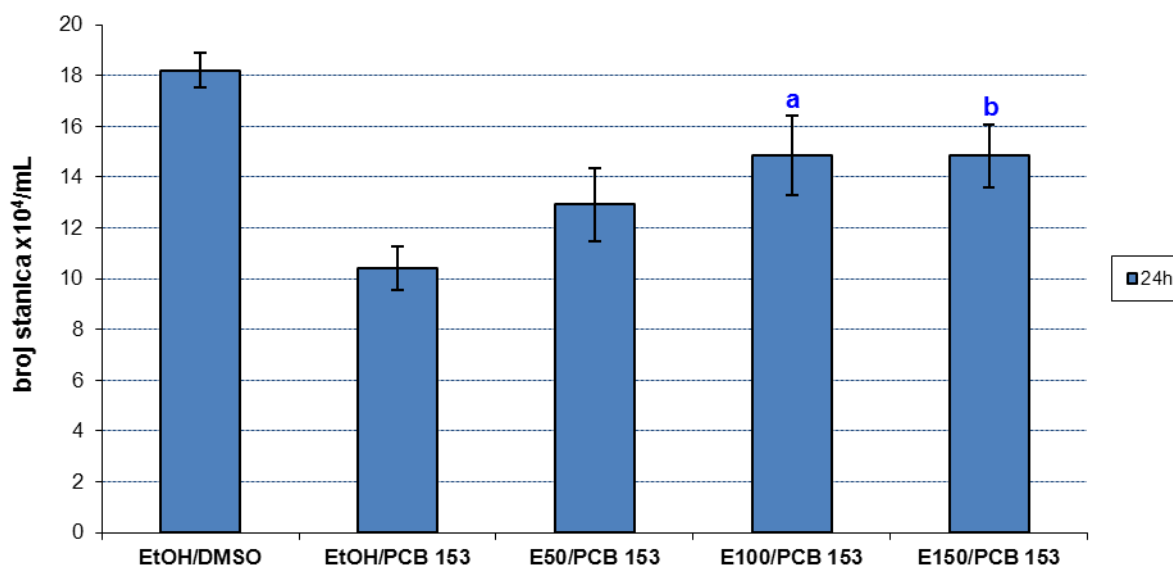
Provedena je i svjetlosna mikroskopija kontrolnih uzoraka stanica, stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 te stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 i prethodno inkubiranih s 150  $\mu\text{M}$  vitaminom E uz prethodno primijenjenu *MTT* metodu. Smanjeni broj obojenih stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 (Slika 18, B) u odnosu na kontrolni uzorak stanica (Slika 18, A) dokaz je inhibicije proliferacije stanica pod djelovanjem PCB 153. Povećan broj stanica prethodno inkubiranih s vitaminom E (Slika 18, C) u odnosu na uzorak stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 bez dodanog vitamina E (Slika 18, B) indikacija je protektivnog učinka vitamina E.

Protektivno djelovanje vitamina E na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 najizraženije je 24 h nakon tretmana.

#### **4.4. UČINAK VITAMINA E NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU I *TRYPAN BLUE* METODOM ODREĐENA VIJABILNOST CHO-K1 STANICA TRETIRANIH S PCB 153**

##### **4.4.1. Učinak vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB 153 određen *Trypan Blue* metodom**

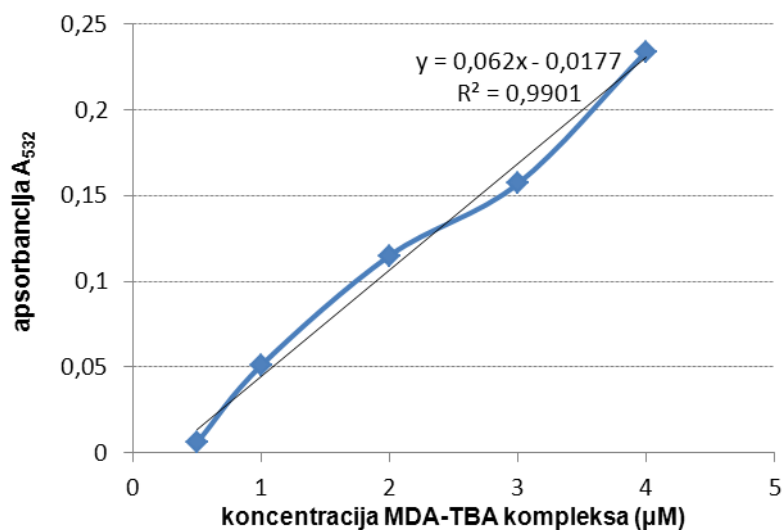
Vijabilnost stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153, a prethodno inkubiranih s vitaminom E (50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) određena je *Trypan blue* metodom 24 sata nakon tretmana. Pokus je postavljen na identičan način kao kod praćenja učinka vitamina E *MTT* metodom (Poglavlje 4.3). Učinak pojedine doze određen je iz tri pokusa, a za svaki uzorak provedena su najmanje dva paralelna mjerenja. Također, praćen je rast kontrolnih uzoraka stanica (uz dodatak 10  $\mu\text{L}$  DMSO/mL medija za uzgoj i 5  $\mu\text{L}$  etanola/mL medija za uzgoj) te stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 (bez dodanog vitamina E). Statistički značajno povećanje vijabilnosti stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153, a predinkubiranih vitaminom E u odnosu na stanice kojima nije dodan vitamin E određeno je kod koncentracije vitamina E 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Kod 50  $\mu\text{M}$  koncentracije vitamina E zabilježeno je povećanje broja živih stanica, međutim proliferacija nije povećana značajno u odnosu na stanice kojima nije dodan vitamin E (Slika 19).



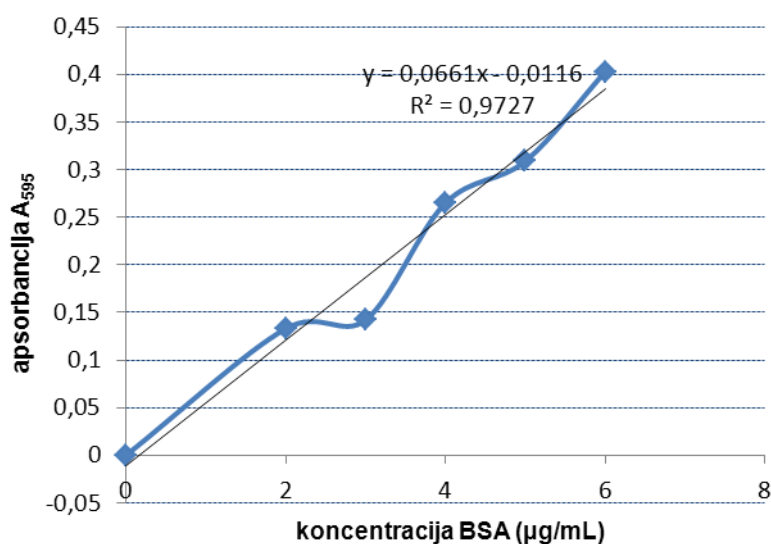
**Slika 19.** Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 24 sata uz tretman s 75 µM PCB 153 i predtretman vitaminom E u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice uz dodatak 10 µL DMSO/ mL medija i stanice tretirane s PCB-om) praćeno *Trypan blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost i standardno odstupanje; statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,025$ ;

#### 4.4.2. Učinak vitamina E na lipidnu peroksidaciju CHO-K1 stanica tretiranih s PCB 153

U svrhu praćenja peroksidacije lipida, stanice se nacjepljuju u Petrijeve zdjelice u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/mL ( $V=13$  mL) i dodaje se otopina vitamina E u etanolu u koncentracijama 50, 100 i 150 µM. Nakon 24 sata stanice se tretiraju sa otopinom PCB-a u DMSO-u koncentracije 75 µM. Određivanje lipidne peroksidacije je provedeno mjerenjem količine nastalog kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kiselina (MDA-TBA) spektrofotometrijski pri 532 nm i 600 nm. Valna dužina od 600 nm predstavlja vrijednost nespecifične absorbancije, te se oduzima od vrijednosti absorbancije izmjerene na 532 nm. Iz baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost absorbancije o koncentraciji TBA-MDA kompleksa (Slika 20) određena je pripadajuća vrijednost koncentracije malondialdehida u ispitivanim uzorcima. Određena je i količina proteina metodom po Bradford. Iz baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost absorbancije o koncentraciji proteina (Slika 21), a pomoću izmjerene apsorbancije pojedinog uzorka, određena je pripadajuća vrijednost koncentracije proteina u tim uzorcima.

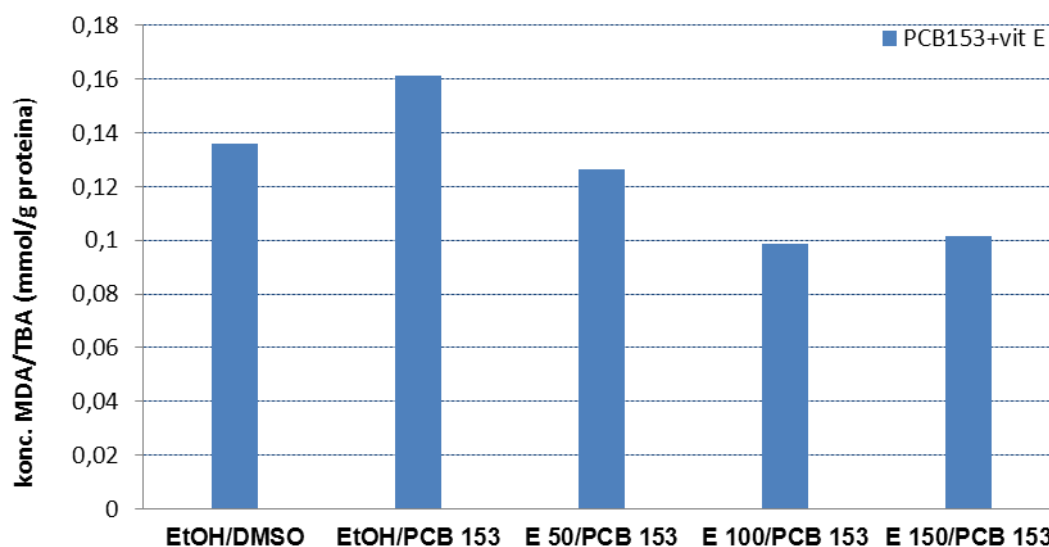


Slika 20. Baždarni pravac za određivanje koncentracije TBA-MDA kompleksa



Slika 21. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Peroksidacija lipida kontrolnih netretiranih CHO-K1 stanica, stanica tretiranih s PCB-em te stanica tretiranih s PCB-em i prethodno inkubiranih vitaminom E izražena je kao količina kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kiselina (mmol TBA/MDA) po gramu proteina i prikazana na Slici 22.



**Slika 22.** Peroksidacija lipida CHO-K1 stanica tretiranih s PCB 153, CHO-K1 stanica tretiranih s PCB 153 i prethodno inkubiranih s vitaminom E te kontrolnih netretiranih stanica 24 h nakon tretmana

PCB 153 u koncentraciji 75  $\mu\text{M}$  uzrokuje povećanje peroksidacije lipida CHO-K1 stanica. Nadalje, kod stanica predinkubiranih vitaminom E u koncentraciji 50, 100 i 150  $\mu\text{M}$  zamijećeno je smanjenje peroksidacije lipida CHO-K1 stanica u odnosu na one koje nisu predinkubirane vitaminom E.

## **5. RASPRAVA**

Poliklorirani bifenili (PCB-i) pripadaju grupi spojeva poznatoj kao perzistentni organski zagađivači (*Persistent Organic Pollutants*, POPs). Karakterizira ih otpornost na fotolitičku, kemijsku i biološku razgradnju, niska topljivost u vodi, ali visoka topljivost u mastima, što rezultira bioakumulacijom u masnim tkivima životinja (Krauthacker, 2000). Nalaze se u okolišu u niskim razinama, ali se prenose na velike udaljenosti putem vode i zraka pa su zbog toga široko rasprostranjeni po cijelom svijetu uključujući i područja gdje se nikada nisu koristili (IMI, 2003). Poliklorirani bifenili su se komercijalno počeli proizvoditi 1929. godine, a prva analiza i identifikacija PCB-a u tkivima ljudi i životinja provedena je 1966. godine (WHO, 2003).

Poliklorirani bifenili ( $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ ) su aromatske molekule s dva povezana benzenska prstena u kojima su neki ili svi vodikovi atomi supstituirani atomima klora. Postoji 209 različitih izomera i homologa PCB-a (tzv. kongenera) ovisno o broju i položaju klorovih atoma u molekuli koji se međusobno razlikuju i po toksičnosti. PCB-i se povezuju s negativnim učincima na ljudsko zdravlje koji uključuju promjene u neurološkom razvoju, neuroendokrinnoj funkciji, ponašanju te narušenoj imunosnoj i reproduktivnoj funkciji (Klinčić i Herceg Romanić, 2011). Izloženost PCB-ima povećava rizik od raka, infekcija, hipotireoze, neplodnosti, ishemijske bolesti srca, artritisa, dijabetesa, astme, kao i rađanja djece s nižim koeficijentom inteligencije te niže tjelesne mase od normalne (Carpenter, 2006). PCB kongeneri se obzirom na konfiguraciju dijele na planarne ("dioksinu slične") i neplanarne ("*orto*-supstituirane"). Djelovanje planarnih PCB-a povezano je s njihovim visokim afinitetom za vezanje na Ah receptor (AhR), dok su neplanarni PCB-i slabi antagonisti AhR-a. Treba napomenuti da svi toksični efekti ne ovise o Ah receptoru te PCB-i koji nemaju planarnu strukturu i koji su *orto*-supstituirani mogu djelovati na drugačiji način (McFarland i Clarke, 1989).

Visoka postojanost, toksičnost i potvrđena kancerogena i teratogena svojstva PCB-a bila su povod ograničenju ili zabrani njihove proizvodnje i primjene u mnogim zemljama. Izvori PCB-a u našoj zemlji još uvijek postoje. To je prvenstveno oprema koja sadrži PCB-e (kondenzatori, transformatori), kao i zalihe ulja koja sadrže PCB-e iz kojih curenjem, hlapljenjem i neprimjerenim skladištenjem te odlaganjem iskorištenih uređaja mogu dospjeti u okoliš i ljude (MZOPU, 2008). Istraživanja su pokazala da su neka tla kontaminirana PCB-ima kao rezultat ratnih razaranja tijekom Domovinskog rata, npr. industrijskih postrojenja koja su sadržavala PCB-e. Potencijalni izvor PCB-a su također i odlagališta otpada, koja su

uglavnom bila nekontrolirana, pa se PCB-i nalaze u deponiranom otpadu u nepoznatim količinama (IMI, 2003).

Prva istraživanja toksičnosti ograničavala su se (zbog toksikološkog pristupa i instrumentalnih ograničenja analitičkih tehnika) na određivanje ukupnih polikloriranih bifenila u analiziranim uzorcima. Zahvaljujući kongener-specifičnim istraživanjima toksičnosti i napretku analitičkih tehnika, posebno plinske kromatografije, uvedene su danas i kongener specifične analize PCB-a kako u uzorcima iz okoliša tako i u uzorcima iz ljudi. Većina današnjih istraživanja ograničava se na analizu šest indikatorskih PCB-a označenih prema IUPAC-u kao PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180 za koje se smatra da su toksikološki važni kako zbog toksičnog potencijala tako i zbog razina u kojima su prisutni (Krauthacker, 2000).

PCB 77 se smatra jednim od najtoksičnijih PCB kongenera, a toksični potencijal se povezuje s planarnom "dioksinu sličnom" strukturom koja mu omogućava vezanje na Ah receptor. Studije su pokazale da izloženost PCB-u 77 tijekom gestacije posljedično rezultira negativnim učincima na razvoj moždanih funkcija (Simmons i sur., 2005) te je primijećena modulacija seksualnog ponašanja u ženskom potomstvu (Wang i sur., 2002). Također je utvrđeno da aplikacija PCB 77 tijekom gestacije utječe na preživljavanje te smanjenje tjelesne mase mladunčadi kao i na ponašanje majki (Simmons i sur., 2005). Pojedina istraživanja ukazala su na inflamatorno djelovanje PCB 77 (Henning i sur., 1999; Lim i sur., 2007). Također, PCB 77 ugrožava normalne funkcije vaskularnih endotelnih stanica povećanjem ekspresije gena CYP1A1, oksidativnog stresa i vezujuće aktivnosti NF- $\kappa$ B na DNA (Henning i sur., 2002). Analize promjena na jatri nakon tretmana s PCB 77 su pokazale, na razini hepatocita, povećanje volumena endoplazmatskog retikuluma, poremećaj u funkciji mitohondrija i promjene u indukciji različitih enzima (Gilroy i sur., 1998).

PCB 153 je neplanarni kongener koji je prisutan u okolišu u značajnim količinama zbog velike rezistencije na degradaciju. Jedan je od tri dominantna kongenera u adipoznom tkivu čovjeka i *orto*-kongener s najvećom koncentracijom u majčinom mlijeku. Wójtowicz i sur. (2001) su proučavali utjecaj različitih koncentracija PCB 153 na stanice ovarija svinje i pratili promijene estrus ciklusa. Rezultati su pokazali da dolazi do statistički značajnog pada izlučivanja progesterona i smanjenja razine izlučivanja testosterona. Također je zabilježeno da izlaganje PCB-u 153 izaziva poremećaje u sintezi spolnih hormona, te da toksično djeluje na reproduktivni, neurološki i imunološki i sustav (Venkatesha i sur., 2010).



Primjenom odgovarajućeg *in vitro* testa toksičnosti na odabranoj staničnoj liniji moguće je utvrditi specifične intracelularne promjene i mehanizme kojima ispitivani ksenobiotik inducira toksični učinak. *In vitro* testovi toksičnosti upotrebljavaju se u ispitivanjima mutagenosti, iritacije, reproduktivne toksičnosti, toksičnosti na ciljne organe, imunotoksičnosti, endokrine toksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti, citotoksičnosti, kancerogenosti te se njima određuju potencijalno aktivne tvari kao i odnosi aktivnosti prema strukturi ksenobiotika (Atterwill, 1995; Kniewald i sur., 2005).

U ovom radu kao test sustav odabrana je stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-K1 s ciljem praćenja i usporedbe citotoksičnosti dvaju kongenera PCB-a: planarnog, "dioksinu sličnog" – PCB 77 i neplanarnog, *orto*-supstituiranog – PCB 153.

Proliferacija PCB-em tretiranih i kontrolnih netretiranih stanica praćena je tijekom 72 sata inkubacije *MTT* metodom kojom se prati aktivnost mitohondrijskih dehidrogenaza i formiranje ljubičastih kristala formazana, te se posljedično zaključuje o vijabilnosti stanica.

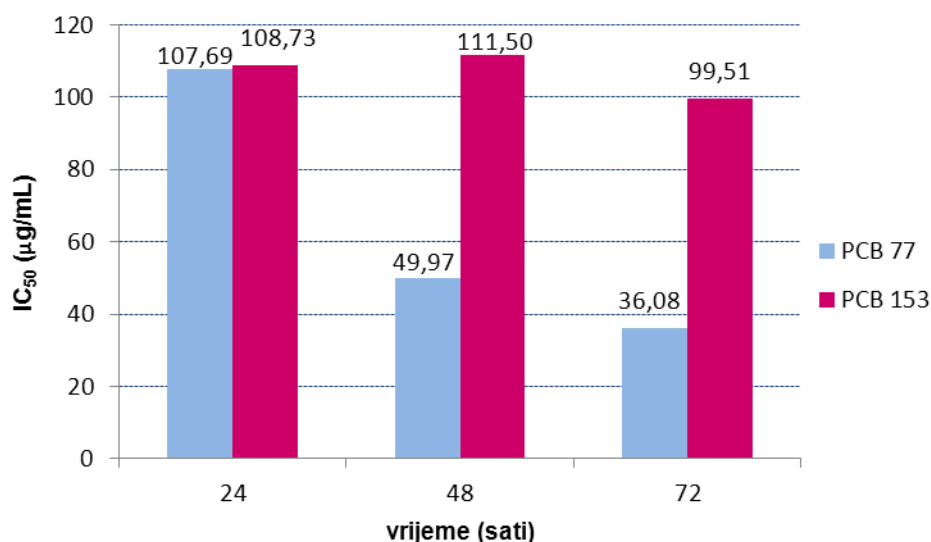
Kao otapalo za PCB 77 i PCB 153 korišten je DMSO u koncentraciji 10  $\mu$ L DMSO/mL medija za uzgoj jer pri toj koncentraciji DMSO ne djeluje značajno na proliferaciju stanica i ne ometa ispitivanje samih ksenobiotika (PCB 77 i PCB 153).

Citotoksični učinak PCB 77 ispitan je u koncentracijama 10, 25, 50, 75 i 100  $\mu$ M. Nakon 24 sata statistički značajna inhibicija stanične proliferacije utvrđena je pri 75  $\mu$ M PCB 77 ( $p < 0,025$ ) i 100  $\mu$ M PCB 77 ( $p < 0,005$ ). Pri nižim koncentracijama PCB-a 77 (10, 25, 50  $\mu$ M) također je zabilježen inhibicijski učinak, ali taj učinak nije bio statistički signifikantan u odnosu na kontrolu (Tablica 1). Tijekom dužeg vremena inkubacije i dalje je izražen inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju (Slika 11). Nakon 48 i 72 sata statistički značajno manje vijabilnih stanica određeno je već pri 25  $\mu$ M PCB 77 te pri svim primijenjenim višim koncentracijama: 50-100  $\mu$ M PCB 77 (Tablica 1).

PCB 153 ispitan je u istom rasponu koncentracija kao i PCB 77 (10-100  $\mu$ M), no statistički značajna inhibicija proliferacije stanica određena je samo pri najvišoj (100  $\mu$ M) dozi PCB-a 153 nakon 24 i nakon 72 sata inkubacije. Citotoksični učinak bio je izraženiji nakon 48 sati inkubacije s PCB 153 pri čemu su sve doze iznad 50  $\mu$ M (uključujući i 50  $\mu$ M) djelovale statistički signifikantno smanjujući vijabilnost CHO-K1 stanica (Tablica 3).

Iz rezultata dobivenih *MTT* metodom može se zaljučiti na znatno izraženiji toksični učinak "dioksinu sličnog", planarnog kongenera – PCB-a 77. Također, određene su IC vrijednosti za PCB 153 i PCB 77 na CHO-K1 stanicama (Tablica 2 i 4). Unutar grafičkih prikaza ovisnosti vijabilnosti stanica o primjenjenoj dozi interpolirane su polinomne krivulje (*trend line*) iz čijih jednadžbi su izračunate IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> i IC<sub>80</sub> vrijednosti. Kod odabira interpolirane krivulje težilo se da njoj pripadajući koeficijent determinacije ( $R^2$ ) bude što bliži 1. Vrijednost koeficijenta determinacije kreće se u intervalu  $0 \leq R^2 \leq 1$ . Regresijski model je reprezentativniji ukoliko je ovaj pokazatelj bliži 1 (Slika 13 i 16).

Usporedbom IC<sub>50</sub> vrijednosti (doza pri kojoj je određena 50 %-tna inhibicija vijabilnosti stanica) za odabrana dva kongenera (Slika 23) jasno je dodatno potvrđena izrazita citotoksičnost PCB 77 koja je u odnosu na PCB 153 nakon 48 i 72 sata bila najmanje dvostruko jača, a i morfološka analiza stanica nakon provedene *MTT* metode jasno ukazuje na manji broj vijabilnih stanica s posljedično manje formiranih kristala formazana nakon tretmana s PCB-ima, a pogotovo nakon tretmana s PCB 77 (Slika 12 i 15). Najniže IC vrijednosti za oba kongenera zabilježene su nakon 72 sata što ukazuje da je u tom periodu inkubacije citotoksično djelovanje bilo najizraženije.



**Slika 23.** Usporedba *in vitro* određenih IC<sub>50</sub> vrijednosti za PCB 77 i PCB 153 na CHO-K1 staničnoj liniji dobivenih *MTT* metodom tijekom 72 sata inkubacije.

Zbog široke rasprostranjenosti i količina u kojima se nalazi u okolišu, PCB 153 je jedan od šest indikatorskih PCB-a koji se analiziraju kod ispitivanja toksičnosti, odnosno određivanja polikloriranih bifenila u uzorcima iz okoliša ili iz ljudi. Upravo zbog toga je za daljnja ispitivanja provedena u ovom radu odabran PCB 153 kojem je opća populacija znatno

izloženija, iako se PCB 77 pokazao toksičnijim. Toksično djelovanje PCB-a 153 – induktora oksidacijskog stresa, pokušalo se umanjiti dodatkom snažnog antioksidansa poput vitamina E. Postoji osam različitih izomera (vitamera) vitamina E, četiri tokoferola ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) i četiri tokotrienola ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ). Najčešći oblik u prirodi je  $\alpha$ - tokoferol. Vitamin E je liposolubilna pa ga se može naći u svim namirnicama bogatim mastima (posebno nezasićenim masnim kiselinama) kao što su biljna ulja, orašasti plodovi, žumanjak jajeta i margarin (Puljak i sur., 2004). Vitamin E smanjuje količinu slobodnih radikala i povećava razinu endogenih antioksidansa te postoji mogućnost inaktivacije štetnih učinaka PCB-a (Sridevi i sur., 2007). Stoga su stanice najprije inkubirane s vitaminom E (50, 75, 100 i 150  $\mu\text{M}$ ), a 24 sata nakon inkubacije s vitaminom E tretirane su s PCB-em 153. Citotoksični učinak 75  $\mu\text{M}$  PCB-a 153 na proliferaciju CHO-K1 stanica predinkubiranih vitaminom E tijekom 72 sata praćen je *MTT* metodom (Tablica 5). Statistički značajan protektivan učinak vitamina E određen je nakon 24 sata pri najvišoj koncentraciji vitamina E, 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) gdje su stanice, iako tretirane s PCB 153, dosegle vijabilnost gotovu identičnu onoj u kontrolnim uzorcima. Pri nižim koncentracijama vitamina E (50, 75, 100  $\mu\text{M}$ ) također je zabilježeno poboljšanje proliferacije PCB-em tretiranih stanica, ali taj učinak nije bio statistički signifikantan u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153, ali bez prethodne inkubacije s vitaminom E). Tijekom dužeg vremena inkubacije (48 i 72 sata) i dalje je vidljiv protektivni učinak vitamina E na staničnu proliferaciju, ali je on slabije izražen. Učinak različitih koncentracija vitamina E prikazan je i kao postotak preživljenja stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153, a prethodno inkubiranih s vitaminom E tretiranih stanica u odnosu na one bez prethodne inkubacije s vitaminom E (Slika 17). Nakon 24 sata vijabilnost tretiranih stanica uz prethodnu inkubaciju s vitaminom E (50, 75, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) poboljšana je (u odnosu na one bez dodatka vitamina E) redom za: 36,02 %, 68,29 %, 40,90 %, 51,03 %. Nakon 48 i 72 sata protektivni učinak vitamina E puno je slabije izražen i povećanjem koncentracije vitamina E ne dolazi do značajnijeg poboljšanja vijabilnosti stanica (Slika 17).

Kako je najbolji učinak vitamina E zabilježen nakon 24 sata, upravo je taj period inkubacije odabran za detaljniju analizu njegova antioksidacijskog kapaciteta pri indukciji oksidacijskog stresa s PCB 153. Praćena je lipidna peroksidacija u stanicama tretiranim s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153, sa ili bez prethodne inkubacije vitaminom E. Dodatno je, paralelno, provedena *Trypan Blue* metoda kojom je određen broj živih stanica. Pokus je postavljen na identičan način kao kod praćenja učinka vitamina E *MTT* metodom. Statistički značajno povećanje vijabilnosti stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153, a predinkubiranih vitaminom E u

odnosu na stanice kojima nije dodan vitamin E određeno je kod koncentracije vitamina E 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Kod 50  $\mu\text{M}$  koncentracije vitamina E zamijećeno je povećanje broja živih stanica, međutim, proliferacija nije povećanja značajno u odnosu na stanice kojima nije dodan vitamin E (Slika 19).

Određen je i učinak vitamina E na s PCB-em 153 induciranu lipidnu peroksidaciju CHO-K1 stanica 24 sata nakon tretmana. Uočeno je povećanje peroksidacije lipida kod stanica tretiranih s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 u odnosu na kontrolne stanice, ali i znatno smanjena peroksidacija lipida kod stanica kojima je dodan vitamin E (50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) i to redom za: 27,67 %, 63,63 % i 59,43 % (Slika 22) u odnosu na stanice tretirane bez prethodnog tretmana s vitaminom E.

Vitamin E je pokazao značajan utjecaj na poboljšanje proliferacije stanica i smanjenje peroksidacije lipida, pri čemu su stanice pri najvišim dozama vitamina gotovo dosegle vijabilnost kontrolnih uzoraka nakon 24 sata.

Dosadašnje spoznaje vezane uz *in vitro* praćenje toksičnih učinaka PCB-a i mogućih mehanizama "zaštite stanica" pojedinim antioksidansima ograničene su, stoga su ovi pozitivni rezultati protektivnog učinka vitamina E važni za procjenu i smjer daljnjih istraživanja na ovom području.

## **6. ZAKLJUČCI**

- Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO-K1) uz primijenjenu *MTT* metodu pokazala se kao zadovoljavajući alternativni test sustav u praćenju toksičnosti odabranih PCB kongenera, PCB 77 i PCB 153.
- Statistički značajan citotoksični učinak PCB 77 na staničnu proliferaciju određen *MTT* metodom uočen je kod koncentracija 75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ) i 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ) nakon 24 sata, te kod svih ispitanih koncentracija iznad 10  $\mu\text{M}$  tijekom daljnjeg perioda inkubacije ( $p < 0,05$  -  $p < 0,001$ ).
- Statistički značajna inhibicija proliferacije stanica tretiranih s PCB 153 određena *MTT* metodom utvrđena je samo pri najvišoj ispitanoj dozi nakon 24 sata ( $p < 0,005$ ) i 72 sata ( $p < 0,01$ ). Citotoksični učinak ovog PCB kongenera izraženiji je nakon 48 sati inkubacije, pri čemu su sve doze iznad 50  $\mu\text{M}$  (uključujući i 50  $\mu\text{M}$ ) djelovale statistički signifikantno smanjujući vijabilnost CHO stanica ( $p < 0,005$  –  $p < 0,001$ ).
- $\text{IC}_{50}$  vrijednosti koje predstavljaju koncentracije toksikanta kod kojih dolazi do 50 %-tne inhibicije staničnog rasta, nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije, određene *MTT* metodom, iznose redom: za PCB 77 107,668  $\mu\text{M}$ , 49,971  $\mu\text{M}$  i 36,077  $\mu\text{M}$ , a za PCB 153 108,734  $\mu\text{M}$ , 111,502  $\mu\text{M}$  i 99,510  $\mu\text{M}$ . Iz usporedbe citotoksičnog učinka odabranih kongenera na dinamiku rasta CHO-K1 stanica, utvrđen je značajniji toksični učinak planarnog, "dioksinu sličnog" PCB 77 u odnosu na neplanarni, *ortho*-supstituirani PCB 153.
- Budući da su PCB kongeneri poznati induktori oksidacijskog stresa, dodatkom vitamina E, kao snažnog antioksidansa, pokušao se postići protektivan učinak. *MTT* metodom utvrđeno je da je protektivan učinak vitamina E na s PCB 153 tretirane CHO-K1 stanice najviše izražen nakon 24 sata. Vijabilnost tim ksenobiotikom tretiranih stanica uz predinkubaciju vitaminom E (50, 75, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) poboljšana je u odnosu na one bez dodatka vitamina E i to redom za: 36,02 %, 68,29 %, 40,90 %, 51,03 %. Nakon 48 i 72 sati protektivan učinak vitamina E puno je slabije izražen i povećanjem koncentracije vitamina E ne dolazi do statistički značajnijeg poboljšanja vijabilnosti stanica.
- Značajan utjecaj na poboljšanje proliferacije stanica predinkubiranih vitaminom E, a potom tretiranih s PCB 153 dodatno je potvrđeno *Trypan blue* metodom nakon 24 sata inkubacije, pri čemu su se doze vitamina E od 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ) pokazale statistički značajnima.

- Lipidna peroksidacija nastala kao rezultat tretmana CHO-K1 stanica s PCB 153 smanjena je uz predinkubaciju stanica vitaminom E u dozama 50, 100 i 150  $\mu\text{M}$  i to redom za 27,67 %, 63,63 % i 59,43 %.

## **7. LITERATURA**



- Arsenescu, V., Arsenescu, R.I., King, V., Swanson, H., Cassis, L.A. (2008) Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* **116**, 761-768.
- ATCC (2012) Cell Biology, <<http://www.lgcstandards-atcc.org/ATCCulturesandProducts/CellBiology/tabid/980/Default.aspx>>. Pristupljeno travanj, 2012.
- ATSDR (2000) Toxicological profile for polychlorinated byphenyls (PCBs). ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry, <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17-c4.pdf>>. Pristupljeno ožujak, 2012.
- Atterwill, C.K. (1995) Alternative Method of Assessing Toxicity. U: *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (O'Hare, S., Atterwill, C.K., ured.), Humana Press, Totowa/New Jersey, str. 1-9.
- Bonefeld-Jørgensen, E.C., Andersen, H.R., Rasmussen, T.H., Vinggaard, A.M. (2001) Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* **158**, 141–153.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brigelius-Flohé, R., Traber, M. G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13**, 1145- 1155.
- Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D., Ishaq, R. (2006) Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Sci. Total. Environ.* **366**, 659-672.
- Carpenter, D. O. (2006) Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Rev. Environ. Health* **21**, 1-23.
- Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P., Revol, A. (2001) Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology* **163**, 153–162.
- Drevenkar, V., Fingler, S. (2000) Persistent organochlorine compounds in Croatia. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **51**, 59–73.
- Durgo, K., Vuković, L., Rusak, G., Osmak, M., Franekić Čolić, J. (2007) Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 69-79.

- Fadhel, Z., Lu, Z., Robertson, L. W., Glauert, H. P. (2002) Effect of 3,3',4,4' tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the induction of hepatic lipid peroxidation and cytochrome P-450 associated enzyme activities in rats. *Toxicology* **175**, 15-25.
- Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- George, C. J., Bennett, G. F., Simoneaux, D., George, W. J. (1988) Polychlorinated biphenyls - a toxicological review. *J. Hazard. Mater.* **18**, 113-144.
- Ghosh, S., De, S., Chen, Y., Sutton, D.C., Ayorinde, F.O., 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.
- Gilroy, C., Connell, B.J., Singh, A., Suidgeest, P., Chu, I. (1998) PCB congener 77-induced ultrastructural alterations in the rat liver: a quantitative study. *Toxicology* **127**, 179-185.
- Grotto, D., Santa Maria, L., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C, Pomblum, V. J., Rocha, J. B., Farina, M. (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova* **1**, 169-174.
- Gustavsson, P., Hogstedt, C. (1997) A cohort study of swedish capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Am. J. Ind. Med.* **32**, 234-239.
- Hennig, B., Slim, R., Toborek, M., Robertson, L.W. (1999) Linoleic acid amplifies polychlorinated biphenyl-mediated dysfunction of endothelial cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **13**, 83-91.
- Hennig, B., Meerarani, P., Slim, R., Toborek, M., Daugherty, A., Silverstone, A.E., Robertson, L.W. (2002) Proinflammatory properties of coplanar PCBs: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **181**, 174-183.
- Herceg Romanić, S. (2002) Poliklorirani bifenili i organoklorovi pesticidi s posebnim osvrtom na njihovu prisutnost u iglicama crnogoričnog drveća. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **53**, 21-30.
- Herceg Romanić, S., Krauthacker, B. (2006) Organochlorine pesticides and PCB congeners in human milk from two population groups in Croatia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **76**, 705-711

- Hussain, R.J., Gyori, J., DeCaprio, A.P., Carpenter, D.O. (2000) *In vivo* and *in vitro* exposure to PCB 153 reduces long-term potentiation. *Environ. Health Perspect.* **108**, 827–831.
- IMI (2003) Izvještaj o izvorima, raspodjeli i učincima POPs spojeva na okoliš i zdravlje ljudi. Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, <[http://www.jelena-suran.com/joomla/images/stories/izvjetaj\\_IMI.pdf](http://www.jelena-suran.com/joomla/images/stories/izvjetaj_IMI.pdf)>. Pristupljeno ožujak, 2012.
- Janošek, J. Hilscherová, K. Bláha L., Holoubek, I. (2006) Environmental xenobiotics and nuclear receptors—interactions, effects and *in vitro* assessment. *Toxicol. In Vitro* **20**, 18–37.
- Katynski, A. L., Vijayan, M. M., Kennedy, S. W., Moon, T. W. (2004) 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) impacts hepatic lipid eroxidation, membrane fluidity and  $\beta$ -adrenoceptor kinetics in chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol., C*, **137**, 81-93.
- Klinčić, D., Herceg Romanić, S. (2011) Kemijske metode određivanja hidroksiliranih metabolita policikličkih aromatskih ugljikovodika i poliklorbifenila u biološkome materijalu. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62**, 77-89.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.
- Krauthacker, B. (2000) Koncentracije organoklorovih spojeva u biološkom materijalu u skupinama ispitanika u Hrvatskoj i procjena unosa tih spojeva u organizam. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **51**, 75-87.
- Lim, E.J., Smart, E.J., Toborek, M., Hennig, B. (2007) The role of caveolin-1 in PCB77-induced eNOS phosphorylation in human-derived endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, 3340–3347.
- Lyche, J.L., Skaare, J.U., Larsen, H.J., Ropstad, E. (2004) Levels of PCB 126 and PCB 153 in plasma and tissues in goats exposed during gestation and lactation. *Chemosphere* **55**, 621- 629.
- LUBW (1995) Stoffbericht Polychlorierte Biphenyle (PCB). LUBW - Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, <[http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/16796/stoffbericht\\_pcb.pdf?command=downloadContent&file\\_name=stoffbericht\\_pcb.pdf](http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/16796/stoffbericht_pcb.pdf?command=downloadContent&file_name=stoffbericht_pcb.pdf)>. Pristupljeno travanj, 2012.
- McCarthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S. (2004) Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water soluble Coenzyme Q-10. *Toxicol. Appl. Pharm.* **201**, 21–31.

- McFarland, V.A., Clarke, J.U. (1989) Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ. Health Perspect* **81**, 225-239.
- Mills III, S.A., Thal, D.I., Barney, J. (2007) A summary of the 209 PCB congener nomenclature. *Chemosphere* **68**, 1603-1612.
- Montgomery, I. (2006) The influence of free radicals in industry and biology, The University of York, <[http://www-users.york.ac.uk/~chem77/pages/Tale\\_of\\_2\\_Radicals.htm](http://www-users.york.ac.uk/~chem77/pages/Tale_of_2_Radicals.htm)>. Pristupljeno travanj, 2012.
- MZOPU (2008) Prijedlog nacionalnog plana za provedbu Stockholmske konvencije o postojećim organskim onečišćujućim tvarima. MZOPU - Ministarstvo zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva, Zagreb, <[http://www.mzopu.hr/doc/PPSK\\_10102008.pdf](http://www.mzopu.hr/doc/PPSK_10102008.pdf)>. Pristupljeno ožujak, 2012.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P. (2000) Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65-85.
- ODS (2011) Vitamin E. ODS – Office of Dietary Supplements, <<http://ods.od.nih.gov/factsheets/Vitamine-HealthProfessional/>>. Pristupljeno travanj, 2012.
- Orloff, K. G., Deartwent, S., Metcalf, S., Kathman, S., Turner, W. (2003) Human exposure to polychlorinated biphenyls in residential community. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44**, 125-131.
- Petlevski, R., Juretić, D., Hadžija, M., Slijepčević, M., Lukač-Bajalo, J. (2006) Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom. *Biochemia Medica* **16**, 43-49.
- Picer, M., Picer, N., Čalić, V., Hodak Kobasić, V., Cenić Kodba, Z. (2006) Posljedice rata kao potencijalna opasnost za ekosustav krškog dijela Hrvatske. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57**, 275-288.
- Puljak, A., Perko, G., Mihok, D., Radašević, H. (2004) Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix* **52**, 98-102.
- RCS (2012a) ChemSpider: 3,3',4,4'-PCB, RCS - Royal Society of Chemistry, Cambridge, <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33281.html?rid=404ea35e-5e53-4bf8-810c-ec8304b682c8>>. Pristupljeno ožujak, 2012.

- RCS (2012b) ChemSpider: 2,2',4,4',5,5'-PCB, RCS - Royal Society of Chemistry, Cambridge, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33983.html?rid=c914515d-7c00-43e6-965c-e938870e135b>> . Pristupljeno ožujak, 2012.
- RCS (2012c) ChemSpider: Tocopherol, RCS - Royal Society of Chemistry, Cambridge, <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14265.html?rid=9eb03f9e-d029-45e5-bbbd-84b91c5b782f>>. Pristupljeno ožujak, 2012.
- Sánchez-Alonso, J.A., López-Aparicio, P., Recio, M.N., Pérez-Albarsanz, M.A. (2004) 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.
- Santiago, M. F., Pérez-Reyes, P.L., López-Aparicio, P., Recio, M.N., Pérez-Albarsanz, M.A. (2006) Differential effects of PCBs on the induction of apoptosis machinery and PKC $\alpha$  translocation in rat renal tubular cell cultures. *Toxicol. Lett.* **163**, 91-100.
- Sergeev, A.V., Carpenter, D.O. (2005) Hospitalization rates for coronary heart disease in relation to residence near areas contaminated with persistent organic pollutants and other pollutants. *Environ. Health Perspect.* **113**, 756–761.
- Simmons, S. L., Cummings, J. A., Clemens, L. G., Nunez, A. A. (2005) Exposure to PCB 77 affects the maternal behavior of rats. *Physiol. Behav.* **84**, 81–86.
- SPH (2003) Endocrine disruptors: Toxicokinetics. SPH - School of Public Health, University of Minnesota, <<http://ehns.umn.edu/current/5103/endocrine/toxicokinetics.html>>. Pristupljeno ožujak, 2012.
- Sridevi, N., Venkataraman, P., Senthilkumar, K., Krishnamoorthy, G., Arunakaran, J. (2007) Oxidative stress modulates membrane bound ATPases in brain regions of PCB (Aroclor 1254) exposed rats: protective role of  $\alpha$ -tocopherol. *Biomed. Pharmacother.* **61**, 435-440.
- Supino, R. (1995) MTT Assays. U: In Vitro Toxicity Testing Protocols, Vol 43 (O'Hare, S., Atterwill, C.K., ured.), Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 137-149.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* **43**, 84-93.
- Tharappel, J.C., Lee, E.Y., Robertson, L.W., Spear, B.T., Glauert, H.P. (2002) Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179**, 172-184.

- Traber, M. G., Siddens, L. K., Leonard, S. W., Schock, B. (2005)  $\alpha$ -Tocopherol modulates Cyp3a expression, increases  $\gamma$ -CEHC production, and limits tissue  $\gamma$ -tocopherol accumulation in mice fed high  $\gamma$ -tocopherol diets. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 773-785.
- Venkatesha, A. V., Kalen, L. A., Sarsour, H. E., Goswami, C. P. (2010) PCB-153 exposure coordinates cell cycle progression and cellular metabolism in human mammary epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **196**, 110-116.
- Wang, X.Q., Fang, J., Nunez, A.A., Clemens, L.G. (2002) Developmental exposure to polychlorinated biphenyls affects sexual behavior of rats. *Physiol. Behav.* **75**, 689-696.
- WHO (2003) Health risks of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, <[www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0009/78660/e78963.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0009/78660/e78963.pdf)>. Pristupljeno ožujak, 2012.
- Wójtowicz, A., Ropstad, E., Gregoraszcuk, E. (2001) Estrous cycle dependent changes in steroid secretion by pig ovarian cells *in vitro* to polychlorinated biphenyl (PCB 153). *Endocr. Regul.* **35**, 223-228.
- Yilmaz, B., Sandal, S., Chen, C.H., Carpenter, D.O. (2006) Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability,  $[Ca^{2+}]_i$  levels and membrane fluidity in mouse thymocytes. *Toxicology* **217**, 184–193.
- Zhou, C., Zhang, C. (2005) Protective effects of antioxidant vitamins on Aroclor 1254-induced toxicity in cultured chicken embryo hepatocytes. *Toxicol. in Vitro* **19**, 665-673.

## **8. SAŽETAK**

---

## Antioksidacijski i protektivni potencijal vitamina E u sprječavanju citotoksičnih učinaka polikloriranih bifenila

Ivana Jagarčec

Ana Peroš

U ovom radu ispitan je učinak planarnog PCB 77 i neplanarnog PCB 153 na CHO (Chinese Hamster Ovary)-K1 staničnoj liniji. Ispitan je i protektivan učinak vitamina E pri citotoksičnom djelovanju PCB-a na proliferaciju i peroksidaciju lipida CHO- K1 stanica. Stanice su tretirane različitim koncentracijama PCB 77 i PCB 153 (10- 100  $\mu$ M), a učinak je određen *MTT* metodom. Inhibitorni učinak i toksično djelovanje oba PCB-a na CHO-K1 stanice vidljiv je uz sve primjenjene koncentracije. Nakon predinkubacije vitaminom E u koncentracijama 100 i 150  $\mu$ M utvrđeno je statistički značajno povećanje vijabilnosti stanica tretiranih sa 75  $\mu$ M PCB 153 *Trypan Blue* metodom. Uz 50  $\mu$ M koncentraciju vitamina E zamijećeno je povećanje broja živih stanica, međutim, proliferacija nije statistički značajno povećana u odnosu na stanice kojima nije dodan vitamin E. Malondialdehid (MDA) je jedan od toksičnih produkata lipidne peroksidacije, a koristi se u evaluaciji oksidacijskog stresa. Rezultati praćenja lipidne peroksidacije potvrđuju pozitivan antioksidacijski učinak vitamina E u stanicama tretiranim 75  $\mu$ M PCB 153, međutim učinak vitamina nije dovoljan da bi se dostigla vijabilnost stanica kao u kontrolnim uzorcima.

**Ključne riječi:** PCB 77, PCB 153, CHO-K1 stanična linija, vitamin E, citotoksičnost



## **9. SUMMARY**

**Antioxidant and protective potential of vitamin E in preventing the cytotoxic effects of polychlorinated biphenyls**

Ivana Jagarčec

Ana Peroš

In this paper effects of planar PCB 77 and nonplanar PCB 153 on CHO (Chinese Hamster Ovary)-K1 cell line were examined. Protective effect of vitamin E against cytotoxic activity of PCBs on CHO-K1 cell line proliferation and lipid peroxidation was also examined. Cells were exposed to different concentrations of PCB 77 and PCB 153 (10- 100  $\mu\text{M}$ ), and effect was determined by *MTT* method. Inhibitory effects and toxic activity on CHO-K1 cells were observed at all concentrations of both PCBs. After preincubation with 100  $\mu\text{M}$  i 150  $\mu\text{M}$  vitamin E, statistically significant increase of viability in 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 treated cells was determined by *Trypan Blue* method. Increased number of living cells was noticed during treatment with 50  $\mu\text{M}$  vitamin E, but the increase of proliferation was not statistically significant in relation to cells without the addition of vitamin E. Malondialdehyde (MDA) is one of toxic products of lipid peroxidation, and it is used as a marker in oxidative stress evaluation. Results concerning lipid peroxidation confirm the antioxidative capacity of vitamin E on 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 treated cells, but insufficient to achieve the level of viability in controls.

**Key words:** PCB 77, PCB 153, CHO-K1 cell line, vitamin E, cytotoxicity

## **10. PRILOZI**

Ivana Jagarčec rođena je 05. 11. 1988. godine u Zaboku. Nakon završene opće gimnazije *Antun Gustav Matoš* u Zaboku, 2007. godine upisuje Prehrambeno - biotehnološki fakultet, smjer Biotehnologija. 2010. godine postala je sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) inženjerka biotehnologije. Svoju titulu opravdala je radom izrađenim na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura pod naslovom "Bakterijska interferencija – probiotički koncept" voditeljice dr.sc. Blaženke Kos, izv.prof. Za ostvarene rezultate u svojoj generaciji na 3. godini preddiplomskog studija Biotehnologija dobila je povelju dekana. Na prvoj godini diplomskog studija opredijelila se za smjer Bioproceno inženjerstvo. U veljači ove godine sudjelovala je na IX. susretu mladih kemijskih inženjera s predavanjem na temu "Analiza profila strujanja tijekom aeracije u mikroreaktoru". Od 5. ožujka ove godine izrađuje diplomski rad na odjelu *Unapređenje tehnološkog procesa i podrška proizvodnji* u Plivi Hrvatska, d.o.o., Zagreb.

Ana Peroš rođena je 25. 10. 1986. godine u Zadru. Nakon završene opće gimnazije *Franje Petrić* u Zadru, upisuje Prehrambeno - biotehnološki fakultet, smjer Biotehnologija. 2010. godine postala je sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) inženjerka biotehnologije. Svoju titulu opravdala je radom izrađenim na Prehrambeno–biotehnološkom fakultetu, u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca pod naslovom "Priprema škrobnih sirovina za proizvodnju jakih alkoholnih pića" voditeljice dr.sc. Jasne Mrvčić, docent. Na prvoj godini diplomskog studija opredijelila se za smjer Bioproceno inženjerstvo. Od 1. ožujka ove godine sudjeluje u CEEPUS programu akademske razmjene studenata, u sklopu koje izrađuje diplomski rad na *Institutu za kemijsku tehnologiju* u Pragu.