

“Mladi za napredek Maribora 2023”

40. srečanje

Vpliv heksabromociklododekana (HBCD) na človeške hepatocite

Raziskovalno področje: ZDRAVSTVO

Raziskovalna naloga

Avtor: Zarja Gumilar Papotnik
Mentor: Katja Holnthaner Zorec, Eneko Jose Madorran Esteiro

Šola: II. gimnazija Maribor
Število točk: 170 / 170

Maribor, februar 2023

POVZETEK	I
ABSTRACT	III
ZAHVALA	V
1 UVOD V NALOGO	1
2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE IN HIPOTEZE	2
3 TEORETIČNI DEL	3
3.1 Heksabromociklododekan	3
3.1.1 Izpostavljenost in spremljanje izpostavljenosti	4
3.1.2 Toksičnost heksabromociklododekana (HBCD)	5
3.1.3 Bioakumulativnost heksabromociklododekana (HBCD)	7
3.2 Jetra	8
3.2.1 Hepatociti	11
3.2.2 Jetrne sinusoidalne endotelne celice	13
3.2.3 Kupfferjeve celice	14
3.3 Celične kulture	15
3.4 Spektrofluorimetrija (fluorescenčna spektrometrija)	18
3.5 Reaktivne kisikove spojine (ROS)	19
3.6 MPCVA (The Membrane Potential Cell Viability Assay)	20
3.6.1 Potenciometrične optične sonde	21
4 LABORATORIJSKO DELO	22
4.1 Potek dela	22
4.2 Seznam opreme in materialov	23
4.2.1 Kemikalije	23
4.2.2 Celična kultura	23
4.2.3 Laboratorijski pribor in oprema	23
4.3 Priprava celic	24
4.4 Priprava koncentracij	24
4.5 ROS protokol	26
4.6 MPCVA protokol	26
4.7 Obdelava podatkov	26
5 REZULTATI	27

6 DISKUSIJA	32
6.1 Hipoteza 1	32
6.2 Hipoteza 2	32
6.3 Vrednotenje metode	34
7 ZAKLJUČEK	35
8 DRUŽBENA ODGOVORNOST	36
9 BIBLIOGRAFIJA	37
10 VIRI SLIK	42

POVZETEK

Heksabromociklododekan (HBCD) je spojina, ki se uporablja kot zaviralec gorenja, in jo najdemo v številnih produktih. Ker vedno več študij kaže na toksičnost in bioakumulativnost te spojine, njena prisotnost v okolju pa se še vedno veča, smo se odločili preveriti njen potencialno škodljiv vpliv na človeške jetrne celice. Toksičnost HBCD na hepatocite smo določali z merjenjem ROS (reaktivnih kisikovih spojin) in MPCVA (The Membrane Potential Cell Viability Assay), metodo za določanje viabilnosti celic. Naš cilj je bil dokazati citotoksičen učinek heksabromociklododekana na izbrane jetrne celice, kar so delno potrdili tudi naši rezultati. Iz njih je bilo razvidno, da prisotnost HBCD poveča prisotnost prostih kisikovih radikalov; večje koncentracije so povzročile dvig prisotnosti ROS ter zmanjšanje viabilnosti celic. Dobljeni rezultati nakazujejo citotoksičnost obravnavane spojine, zaradi česar priporočamo omejitev uporabe HBCD ter izvedbo nadaljnjih raziskav na tem področju.

ABSTRACT

Hexabromocyclododecane (HBCD) is a compound used as a flame retardant and is found in various stereoisomeric forms in many products harmful effect on human liver cells. The toxicity of HBCD on hepatocytes was determined by measuring ROS (reactive oxygen species) and MPCVA (The Membrane Potential Cell Viability Assay), a method for determining cell viability. We used a spectrofluorimeter in our work. Our goal is to demonstrate the cytotoxic effect of hexabromocyclododecane on selected liver cells, which was partially confirmed by our results. They showed that the presence of HBCD increases the presence of reactive oxygen species; higher concentrations mean an increased presence of ROS and lower cell viability. The obtained results show the cytotoxicity of the investigated compound and its danger to organisms, which is why we recommend limiting the use of HBCD and conducting further research aimed at its impact on humans and the environment.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri izdelavi raziskovalne naloge. Posebej se zahvaljujem mentorjema, ki sta me usmerjala ter spodbujala v mojem raziskovanju ter mi pomagala pri spoznavanju novih metod ter veščin. Zahvaljujem se tudi Medicinski fakulteti Maribor, na kateri sem izvajala praktični del naloge. Brez opreme, ki sem jo imela na voljo v njihovih laboratorijih, raziskovalne naloge ne bi mogla uspešno opraviti.

1 UVOD V NALOGO

Živimo v času, ko veliko potencialno nevarnih spojin, s katerimi smo v stiku vsakodnevno, ni reguliranih zaradi pomanjkanja ustreznih dokazov in raziskav, ki kažejo na njihovo škodljivost. Takšne spojine na primer bromirani zaviralci gorenja, med katere spada tudi heksabromociklododekan (HBCD), s katerim smo se ukvarjali v tej raziskovalni nalogi.

Potreba po zaviralcih gorenja je postala očitna, ko so zakonodajalci opazili veliko število smrtnih žrtev v gospodinjskih požarih, ki so jih sprožile cigarete in drugi viri vžiga. Leta 1975 so v Kaliforniji sprejeli zakone, ki so se nanašali na vnetljivost pohištva in številni proizvajalci so se odzvali na ta pravila z dodajanjem zaviralcev gorenja penam, pohištvu in drugim potrošniškim izdelkom. Tako so se zaviralci gorenja znašli v številnih predmetih okoli nas, in čeprav so preprečili že marsikatero nesrečo ter veljali za človeku neškodljive, so znanstveniki kmalu začeli raziskovati njihov potencialno škodljivi vpliv na zdravje. Spojine kot TBBPA (tetrabromobisfenol A), PCB-ji (poliklorirani bifenili), PBDE (polibromirani difenil etri), so po opravljenih preiskavah o njihovem vplivu na človeka in okolje obveljale kot škodljive. Skrb za zdravje zaradi zaviralcev gorenja se je kmalu zatem povečala in sledile so globalne omejitve njihove uporabe. Glede na to, da ima HBCD podobno okoljsko in biološko obstojnost, bioakumulacijo in strupenost kot drugi regulirani zaviralci gorenja, je več nacionalnih in mednarodnih zdravstvenih agencij ocenilo, da HBCD predstavlja tveganje za zdravje ljudi in onesnaževanje okolja. Kljub temu pa njegova uporaba še vedno ni povsem prepovedana, je zgolj omejena. Tako se heksabromociklododekan še danes proizvaja in uporablja. V okoljih, kjer ga proizvajajo, pa biologi in ekologi ugotavljajo njegovo vedno večjo prisotnost v ekosistemih ter organizmih (Betts, 2008) (Szabo, 2014).

Problem regulacije HBCD v zvezi z njegovo proizvodnjo in uporabo v izdelkih je sistemska težava modernega, industrializiranega sveta, ki ni omejena samo na zaviralce gorenja, temveč na mnoge človeku in okolju škodljive spojine.

Namen naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti njegov vpliv na človeške hepatocite in tako oceniti nevarnost, ki jo predstavlja za človeška jetra ter posledično ugotoviti njegov vpliv na zdravje.

2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE IN HIPOTEZE

Raziskovalno vprašanje:

R1: Kakšen je vpliv heksabromociklododekana (HBCD) na sproščanje prostih kisikovih radikalov (ROS) v človeških primarnih hepatocitih in na viabilnost človeških primarnih hepatocitov?

Hipoteze:

H1: Dodatek heksabromociklododekana (HBCD) v gojišču bo povišal vrednost reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) v človeških hepatocitih.

Predvidevamo, da se bodo v prisotnosti HBCD izmerjene vrednosti ROS v hepatocitih povešale. Naraščale bodo z večanjem koncentracije HBCD, saj je HBCD dokazano citotoksična spojina, ki v celicah vzbuja oksidativni stres (Huang idr., 2016).

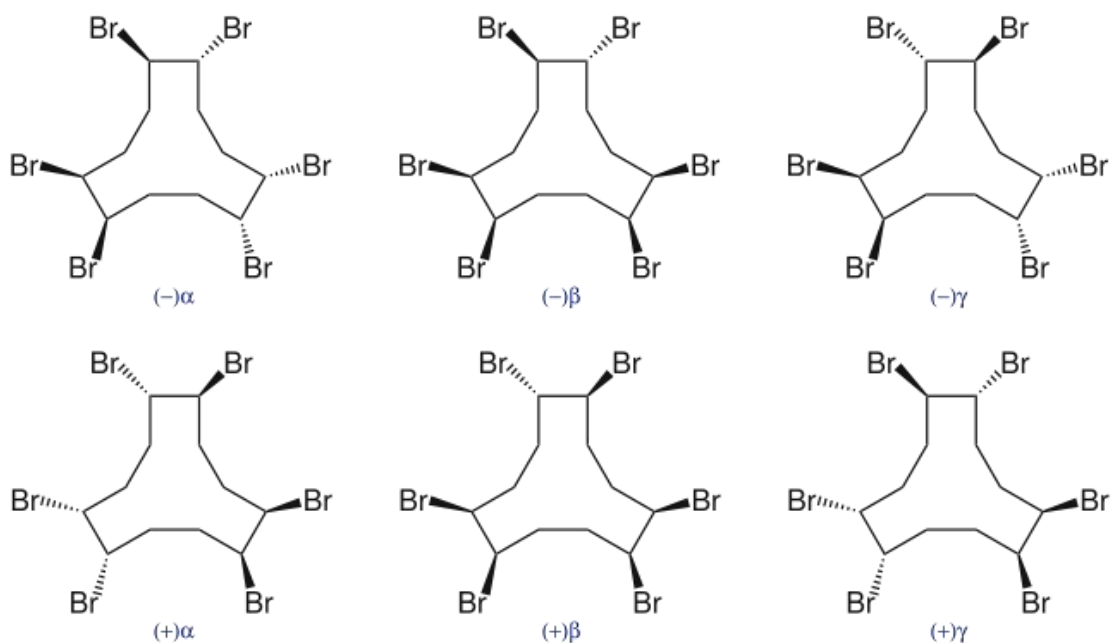
H2: Dodajanje heksabromociklododekana (HBCD) v gojišče bo povzročilo zmanjšanje viabilnosti človeških hepatocitov.

Prisotnost HBCD v gojišču bo zaradi njegove citotoksičnosti povzročila zmanjšanje števila viabilnih celic, kar bomo zaznali s spremembo vrednosti pri spektrofluorometriji, ob uporabi metode MPCVA (Membrane potential cell viability assay) (Madorran indr., 2022).

3 TEORETIČNI DEL

3.1 Heksabromociklododekan

Heksabromociklododekan (HBCD) je bel, nevnetljiv in trden pri sobni temperaturi. IUPAC ime je 1,2,5,6,9,10-heksabromociklododekan. Spojina nastane z bromiranjem molekule ciklododekana. Možnih je šestnajst različnih HBCD stereoizomerov, nastanek katerih je odvisen od začetne čistosti in reakcijskih pogojev. Najpogostejši stereoizomeri so identificirani kot α -, β - in γ -HBCD. V sledovih so prisotne količine drugih diastereoizomerov (δ in ϵ). Tipična sestava komercialne mešanice vsebuje γ -HBCD (75–89 %), α -HBCD (10–13 %) in β -HBCD (0,5–12 %). Uporaba stereoizomerov vključuje gradbeno industrijo, oblazinjeno pohištvo, tekstil za notranjost avtomobilov, avtomobilske blazine ter elektronsko opremo. HBCD proizvajajo v ZDA, Evropi in Aziji. Povpraševanje po HBCD pa iz leta v leto narašča (Law, 2005).



Slika 1: Stereoizomeri heksabromociklododekana
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Hexabromocyclododecane>)

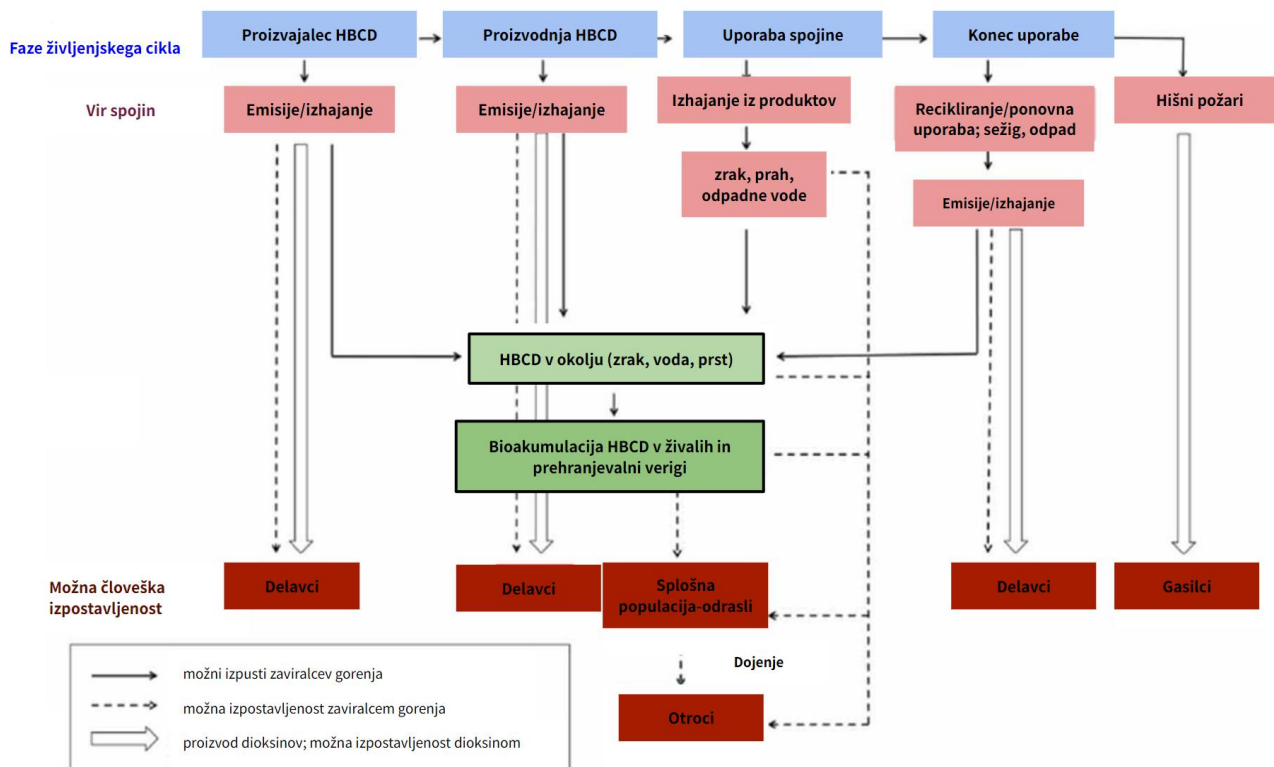
3.1.1 Izpostavljenost in spremljanje izpostavljenosti

Poročila o izpostavljenosti HBCD pri delavcih v proizvodnih in procesnih obratih navajajo oralni in dermalni vnos ter inhalacijo HBCD. HBCD so izpostavljeni tudi tisti, ki z njim niso v zavednem kontaktu. Tak vnos se pojavi predvsem zaradi oralne izpostavljenosti prahu, prehrani in zraku v zaprtih prostorih ter celo pri uživanju materinega mleka pri dojenčkih. Študije trendov kažejo, da so se ravni HBCD sčasoma povečale. Višje ravni so opazne pri plenilcih ter v človeški krvi in tkivih, kar kaže na bioakumulativnost¹ spojine, kar je omenjeno v poglavju 3. 1. 3.

HBCD v vzorcih prahu je bil odkrit v pisarnah, industrijskih okoljih in zasebnih domovih v Združenih državah in Evropi. Tak vnos je lahko bolj povezan s serumskimi ravni HBCD kot z vnosom s prehrano. α -HBCD je bil najbolj razširjen izomer, odkrit v polovici testiranih živil. Kuhanje pri temperaturah nad 160°C lahko poveča izpostavljenost ljudi α -HBCD iz hrane, ki ga vsebuje. Več študij je obravnavalo koncentracijo HBCD v materinem mleku, krvnem serumu in popkovini (Szabo, 2014) (Hussain et al., 2019).

Koncentracije v materinem mleku vzbujajo zaskrbljenost glede možne laktacijske in predporodne izpostavljenosti v kritičnih razvojnih obdobjih (Szabo, 2014).

¹“Kopičenje onesnaževal v živih organizmih z neposrednim vnosom ali preko prehranjevalne verige.” GEMET (2021) bioakumulacija, Bioakumulacija. GEMET General Multilingual Environmental Thesaurus. Dostopno na: <https://www.eionet.europa.eu/gemet/sl/concept/798> (Citirano: 8. februar 2023).



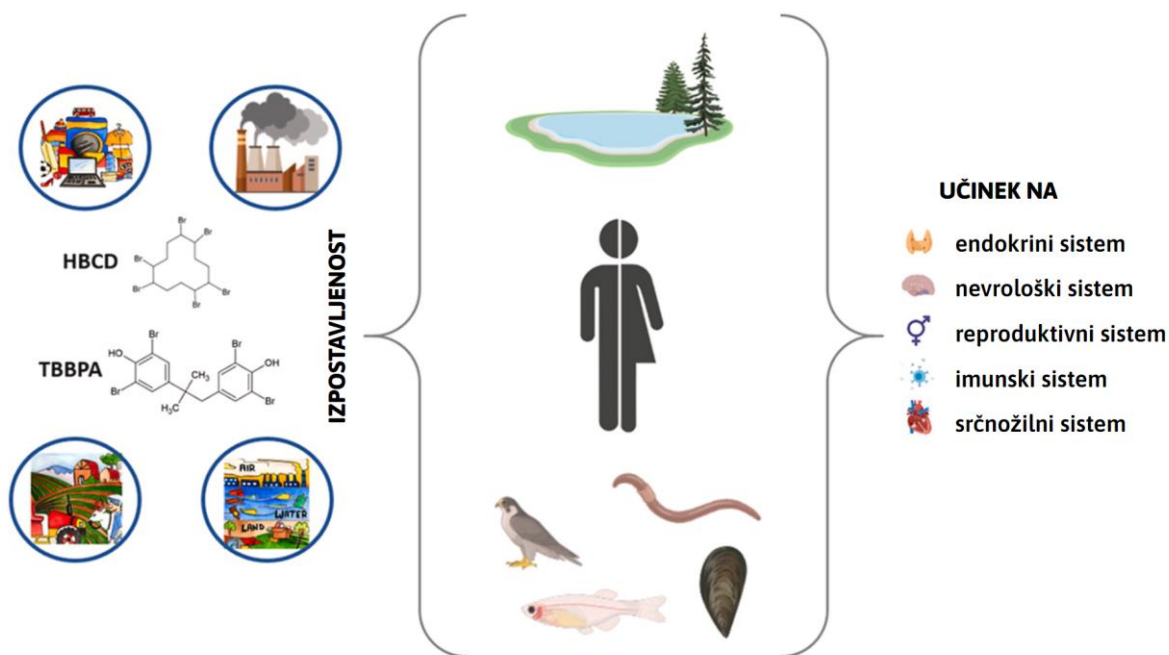
Slika 2: Shematski prikaz življenjskega cikla heksabromociklododekana

(https://www.researchgate.net/figure/Sources-of-hexabromocyclododecane-HBCD-tris-1-chloro-2-propyl-phosphate-TCPP-and_fig4_263377890)

3.1.2 Toksičnost heksabromociklododekana (HBCD)

Škodljivi učinki HBCD so bili opaženi in preučevani v nekaterih raziskavah. Raziskava (Zhang idr. 2008) je bila izvedena s celicami raka človeških jeter (Hep G2) in opazili so, da je HBCD v teh celicah deloval citotoksično ter da je bil ta učinek močnejši pri γ -HBCD kot pri α - in β -HBCD. Poleg tega lahko HBCD inducira encime, kot je UGT (Glukuronoziltransferaza), ki motijo presnovo tiroksina (T4), kar lahko močno vpliva na normalno delovanje ščitnice. Kar zadeva imunski sistem, je bil raziskan učinek HBCD na litično funkcijo in ravni ATP človeških naravnih celic ubijalk (NK). Prostovoljci in NK celice so bili v več časovnih intervalih izpostavljeni različnim koncentracijam HBCD. Rezultati kažejo, da je izpostavljenost HBCD zmanjšala litično funkcijo in ravni ATP. Tako je bilo ugotovljeno, da lahko HBCD poveča tveganje za razvoj raka pri izpostavljenih posameznikih. Akutno nevrotoksičnost HBCD so ocenili v celicah človeškega nevroblastoma SH-SY5Y (človeške nevrnske celice) s 24-urnimi

testi viabilnosti v dveh različnih študijah (Al-Mousa in Michelangeli, 2012) in (Al-Mousa in Michelangeli, 2014). Pokazalo se je, da je HBCD močna citotoksična spojina. Z uporabo celic raka na dojkah je bilo dokazano, da ima HBCD podoben učinek kot estrogen. Druga študija, izvedena z namenom ovrednotenja endokrinih motenj hišnega prahu, ki vsebuje HBCD, je pokazala, da obstaja povezava med povečano koncentracijo HBCD in povečano ravnjo prostih androgenov (kar povzroči znižano raven globulina, ki veže spolne hormone pri moških). Na splošno rezultati teh študij človeških celic kažejo, da je HBCD močna citotoksična spojina, in hormonski motilec, ki je lahko povezan z oslabljenim metabolizmom T4, ravnmi SHBG (spolne hormone vezočega globulina) in razvojem raka (Feiteiro *indr.*, 2021) (Law *indr.*, 2005).



Slika 3: Prikaz izpostavljenosti heksabromociklododekanu in tetrabromobisfenolu A ter organskih sistemov, na katere imata učinek

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749121010575>)

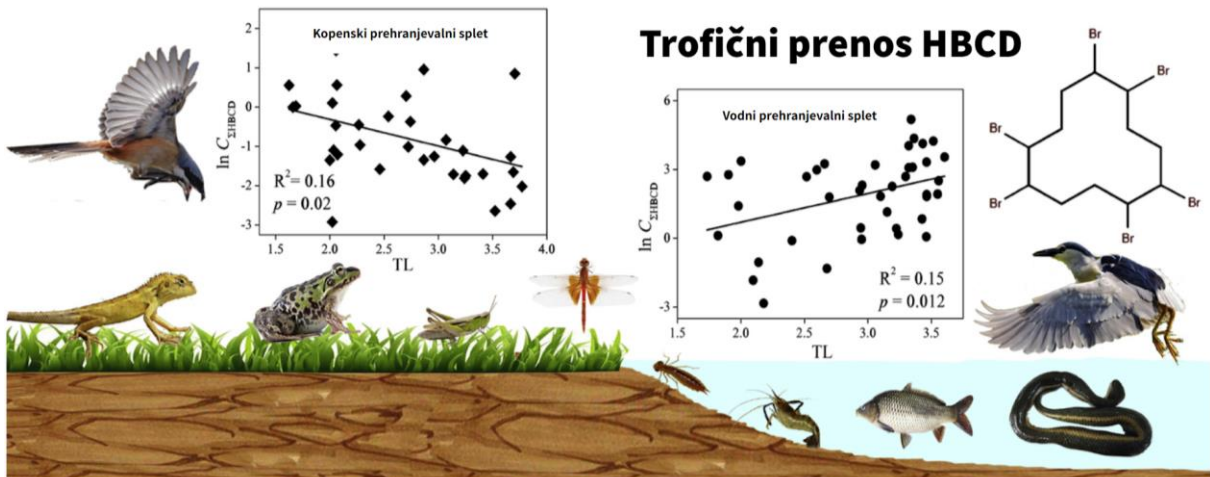
3.1.3 Bioakumulativnost heksabromociklododekana (HBCD)

Zaradi globalne uporabe so HBCD v večji meri odkrili v različnih divjih živalih, vključno z nevretenčarji, ribami, pticami in morskimi sesalci po vsem svetu, zato so ga na Stockholmski konvenciji 2013, uvrstili na seznam obstojnih organskih onesnaževalcev (POP). Kljub temu se HBCD še vedno proizvaja v nekaterih državah na podlagi "posebne izjeme", ki jo odobrava konvencija. Potencial bioakumulacije in biomagnifikacije² HBCD za divje živali in ljudi tako še vedno zahteva našo pozornost (Liu in dr., 2019).

Študija (Liu in dr., 2019) poroča, da se HBCD, katerega ravni so bile opazovane pri treh vrstah žuželk (kobilica, metulj in kačji pastir), prenaša z žuželkami v kopenskem prehranjevalnem spletu iz regije elektronskih odpadkov (e-odpadki) v Taizhouju. Zaradi povečane izpostavljenosti v vodnem okolju je bila biomagnifikacija HBCD v vodnem prehranjevalnem spletu raziskana v številnih študijah. (Sun in dr., 2012) so opazili trofično povečanje α - in γ -HBCD pri treh kopenskih pticah na podeželju.

E-odpadki so kritično svetovno okoljsko zdravstveno vprašanje, zlasti v državah v razvoju. HBCD je bil pogosto najden v vzorcih živih organizmov (npr. rib in ptic), zbranih v regijah, kjer reciklirajo e-odpadke. Študija je pokazala, da je bila pojavnost diastereoizomerov HBCD ugotovljena v kopenskih in vodnih prehranjevalnih mrežah, v katerih prevladujejo žuželke, iz nekdanje regije e-odpadkov na južnem Kitajskem. Koncentracija Σ HBCDD pri vodnih plenilcih je bila za en red velikosti višja kot pri kopenskih plenilcih in dvoživkah. α -HBCD je bil prevladujoč diastereoizomer v vseh biotskih vzorcih; organizmi na nižji trofični ravni pa so imeli relativno višje vsebnosti γ -HBCD (Liu in dr., 2019).

² "Biomagnifikacija je proces, pri katerem se strupene kemikalije kopičijo v plenilcih. Ta običajno poteka v celotni prehranski verigi in prizadete vse organizme, vendar so bolj prizadete živali višje v verigi." Mackay, D. and Fraser, A. (2000) *Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models*, *Biomagnification - Energy Education*. Environmental Pollution. Dostopno na: <https://energyeducation.ca/encyclopedia/Biomagnification#:~:text=Biomagnification%20is%20the%20process%20by,the%20chain%20are%20more%20impacted> (Citrano: 8. februar 2023).

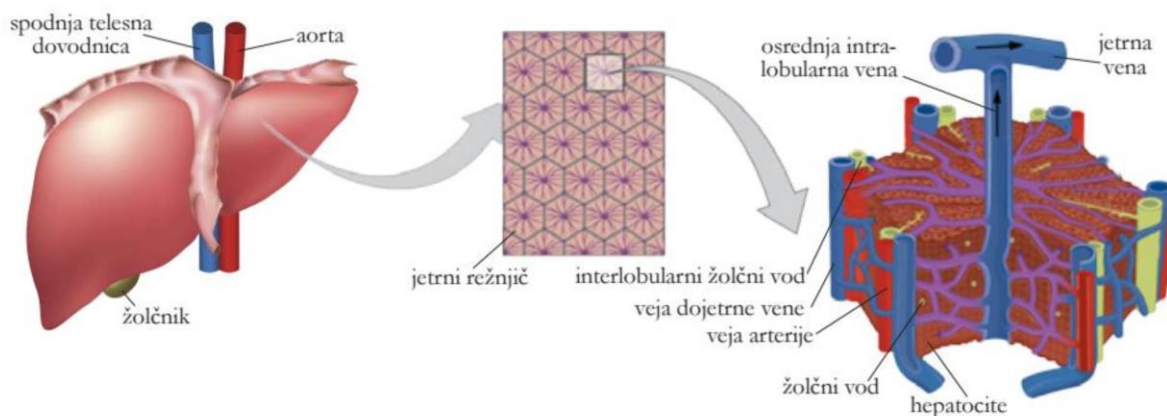


Slika 4: Prikaz trofičnega prenosa HBCD v kopenskem in vodnem prehranjevalnem spletu (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519320521>)

3.2 Jetra

Jetra se nahajajo v zgornjem desnem delu trebušne votline, pod diafragmo. Jetra, ki so v obliki stožca, so temno rdečerjav organ, ki tehta med 1 in 1.5 kg. Obstajata dva različna vira, ki kri dovajata v jetra:

- kri, bogata s kisikom teče iz jetrne arterije,
- s hranili bogata kri teče iz jetrne portalne vene.



Slika 5: Shematski prikaz zgradbe jeter

(https://issuu.com/pipinovaknjiga/docs/demo_anatomija/55)

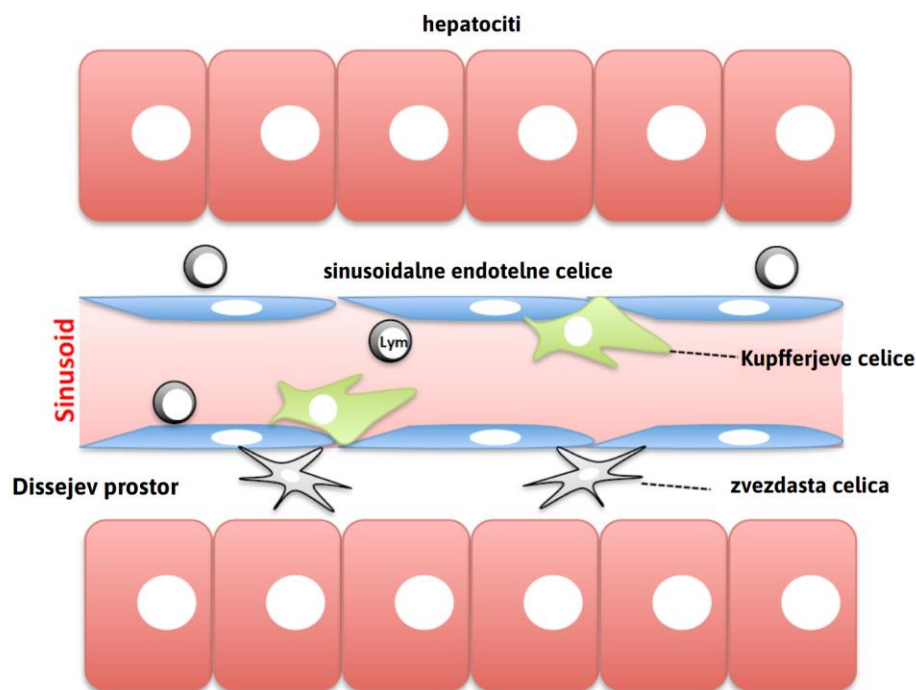
Jetra zadržujejo približno pol litra (13 %) telesne oskrbe s krvjo v danem trenutku. Jetra so sestavljena iz dveh glavnih režnjev. Oba sestavlja osem segmentov, razdeljenih na približno 1000 majhnih režnjev. Ti so povezani z majhnimi kanali (cevkami), ki se povezujejo z večjimi kanali in tvorijo skupni jetrni kanal. Skupni jetrni kanal dovaja žolč, ki ga proizvajajo jetrne celice, v žolčnik in dvanajstnik (prvi del tankega črevesa) preko skupnega žolčnega voda (Johns Hopkins University, 2019).

Jetra uravnavajo večino kemičnih ravni v krvi in izločajo produkt, imenovan žolč. Ta pomaga pri odstranjevanju odpadnih snovi iz jeter. Vsa kri, ki zapusti želodec in črevesje, gre skozi jetra. Ta predelajo to kri in jo razgradijo, uravnovesijo in ustvarijo hranila ter tudi presnavljajo zdravila v oblike, ki jih preostali del telesa lažje uporablja ali ki niso strupene. Jetrom pripisujemo opravljanje/upravljanje več kot 500 vitalnih funkcij. Nekatere bolj znane funkcije vključujejo naslednje:

- proizvodnja žolča, ki pomaga pri odnašanju odpadkov in razgrajevanju maščob v tankem črevesu med prebavo;
- proizvodnja določenih beljakovin za krvno plazmo;

- proizvodnja holesterola in posebnih beljakovin za pomoč pri prenašanju maščob po telesu;
- pretvarjanje odvečne glukoze v glikogen za shranjevanje (glikogen se lahko pozneje pretvori nazaj v glukozo za energijo) ter za uravnoteževanje in proizvodnjo glukoze po potrebi;
- uravnavanje ravni aminokislin (gradnikov beljakovin) v krvi;
- predelava hemoglobina (jetra tudi shranjujejo železo):
- pretvorba strupenega amoniaka v sečnino (sečnina je končni produkt presnove beljakovin in se izloči z urinom);
- filtriranje zdravil in drugih strupenih snovi iz krvi;
- uravnavanje strjevanja krvi;
- odstranjevanje bakterij iz krvnega obtoka;
- očistek bilirubina, tudi iz rdečih krvnih celic (če pride do kopičenja bilirubina, koža in oči porumenijo).

Ko jetra razgradijo škodljive snovi, se njihovi stranski produkti izločijo v žolč ali kri. Žolčni stranski produkti vstopijo v črevesje in zapustijo telo v obliki blata. Stranske produkte krvi filtrirajo ledvice, ti pa na to zapustijo telo v obliki urina (Johns Hopkins University, 2019).

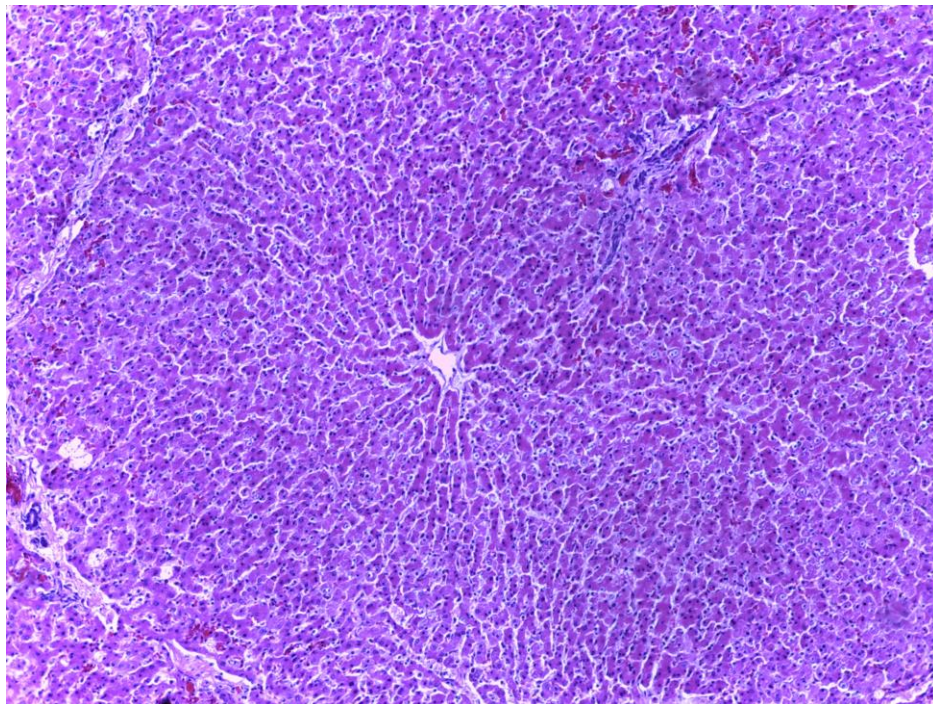


Slika 6: Celice v jetrih (<https://www.mdpi.com/1422-0067/15/5/7711>)

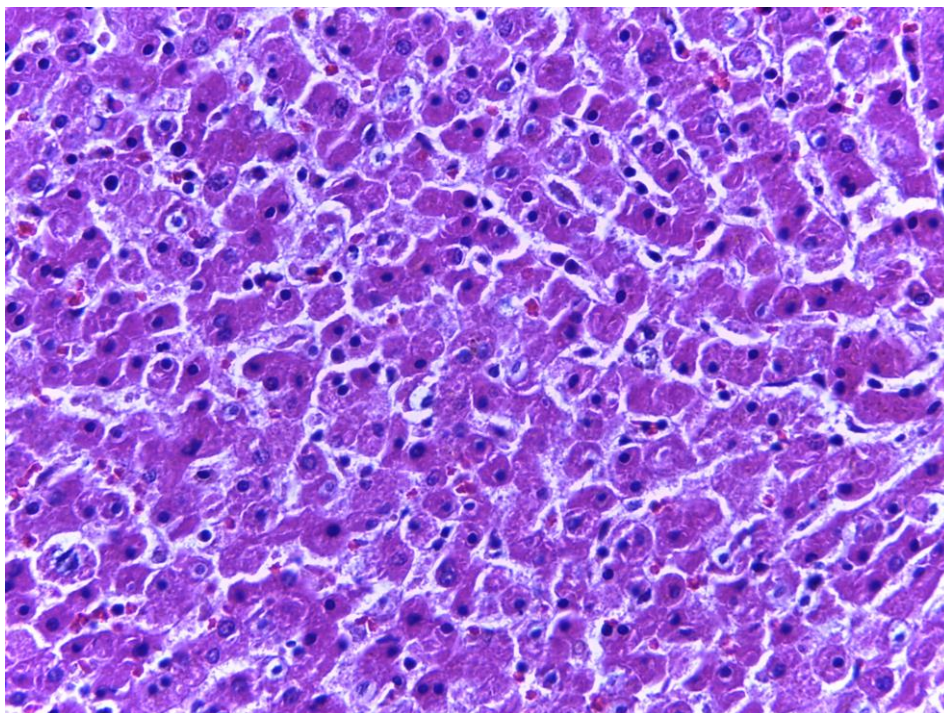
3.2.1 Hepatociti

Jetra so sestavljena iz različnih vrst celic, ki medsebojno delujejo in opravljajo določene funkcije. Hepatociti ali jetrne parenhimske celice predstavljajo približno 60 % vseh celic v jetrih. Hepatociti zajemajo 80 % celotne prostornine organa. Celice so razporejene v lamine tako, da se povezujejo med seboj in tvorijo tridimenzionalno mrežo. Prostor v mreži zapolnjuje jetrni sinusoid, ki opravlja funkcijo zagotavljanja hrane parenhimskim celicam tridimenzionalne mreže. Hepatociti so poliedrične oblike. Površinsko so povezani med saboj ali v nekaterih primerih s sinusoidi. Te jetrne celice imajo na splošno premer okoli 20 do 30 µm. Imajo okroglo jedro v središču citoplazme. Približno 25 % hepatocitov pri odraslem človeku vsebuje dve jedri namesto enega. Večina teh jeder vsebuje dvakrat več kromosomov kot običajna celica, zato veljajo za tetraploidne. V jedrih je heterokromatin razpršen. Število hepatocitov se poveča v stanjih, kot sta poškodba jeter in proces regeneracije. V hepatocitu lahko vidimo do 100 mitohondrijev. Poleg tega je število Golgijevih aparatov, ki jih najdemo v celicah, približno 50, vsak Golgijev aparat pa je razporejen v 3 – 5 cistern. Nadpovprečno visoko število peroksisomov v hepatocitih je povezano z jetrno funkcijo presnove lipidov in pretvorbe reaktivnih kisikovih spojin.

Sinusoidalne in neparenhimske celice tvorijo preostali volumen organa. Najdene različne vrste neparenhimskih celic so Kupfferjeve celice, sinusoidalne endotelne celice in perisinusoidne zvezdaste celice (prikazano na sliki 6.) (Dutta *indr.*, 2021).



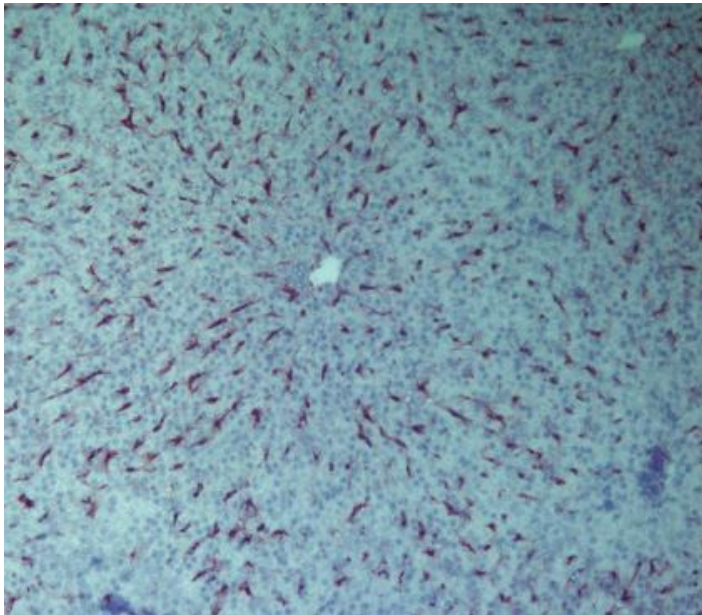
Slika 7: Jetrni lobulus (svetlobni mikroskop, povečava 100 X) (lastni vir)



Slika 8: Jetrne celice (svetlobni mikroskop, povečava 400 X) (lastni vir)

3.2.2 Jetrne sinusoidalne endotelne celice

Jetrne sinusoidalne endotelne celice (LSEC) so visoko specializirane celice endotelija, ki predstavljajo pregrado med krvnimi celicami na eni strani ter hepatociti in jetrnimi zvezdastimi celicami (HSC) na drugi strani. LSEC predstavljajo prepustno oviro. So najbolj prepustne endotelne celice v telesu sesalcev. Imajo tudi največjo sposobnost endocitoze od vseh človeških celic. V fizioloških pogojih LSEC uravnavajo jetrni žilni tonus in prispevajo k vzdrževanju nizkega portalnega tlaka kljub večjim spremembam jetrnega krvnega pretoka, ki nastane med prebavo. V patoloških stanjih imajo LSEC ključno vlogo pri začetku in napredovanju kroničnih bolezni jeter. LSEC so vpletene v regeneracijo jeter po akutni poškodbi jeter ali delni hepatektomiji, saj se obnavljajo iz LSEC (in/ali matičnih celic LSEC), zaznavajo spremembe v stresu, ki je posledica operacije, in medsebojno delujejo s trombociti in drugimi celicami imunskega sistema (Poisson *indr.*, 2016).

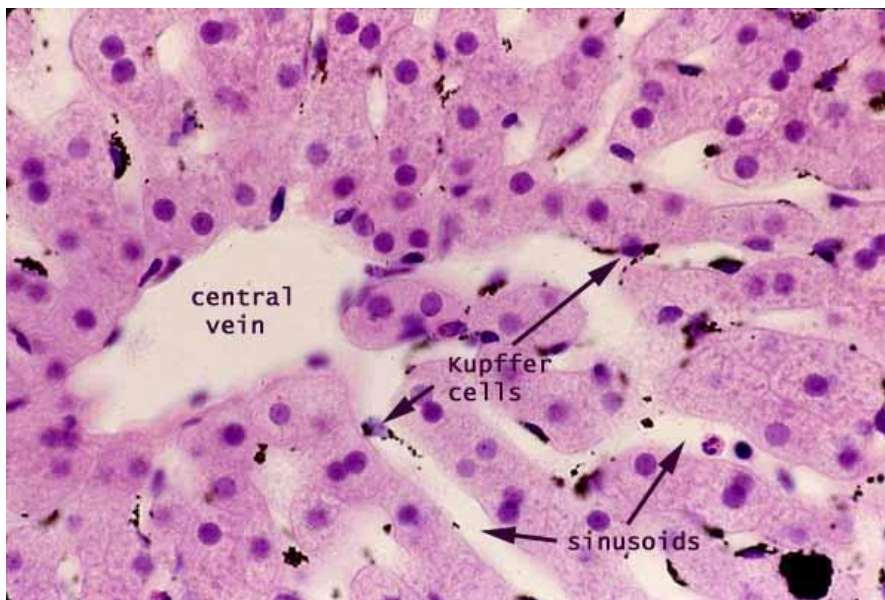


Slika 9: Fotografija jetrnih sinusoidalnih endotelnih celic (LSEC)

(<https://www.nature.com/articles/s41575-018-0020-y>)

3.2.3 Kupfferjeve celice

Kupfferjeve celice, rezidenčni makrofag v jetrih, obsegajo največjo populacijo rezidenčnih tkivnih makrofagov v telesu. Karl Wilhelm von Kupffer jih je leta 1876 prvič opisal kot "sternzellen" (zvezdaste celice), za katere so najprej mislili, da so del endotelija jetrnih krvnih žil. Šele leta 1898 jih je Tadeusz Browicz pravilno identificiral kot makrofage. Hepatociti igrajo ključno vlogo pri prirojenem imunskem odzivu; njihova lokalizacija v jetrnem sinusoidu jim omogoča učinkovito fagocitiranje patogenov, ki vstopajo iz portalnega ali arterijskega obtoka. Te celice služijo tudi kot prva obrambna linija pred delci in imunoreaktivnim materialom, ki prehaja iz gastrointestinalnega trakta preko portalnega krvnega obtoka. Kupfferjeve celice imajo pomembno protivnetno vlogo, saj preprečujejo črevesnim imunoreaktivnim snovem, da bi potovale mimo jetrnega sinusoida. Sprememba funkcionalne aktivnosti Kupfferjevih celic je povezana z različnimi boleznimi (Dixon *indr.*, 2013).



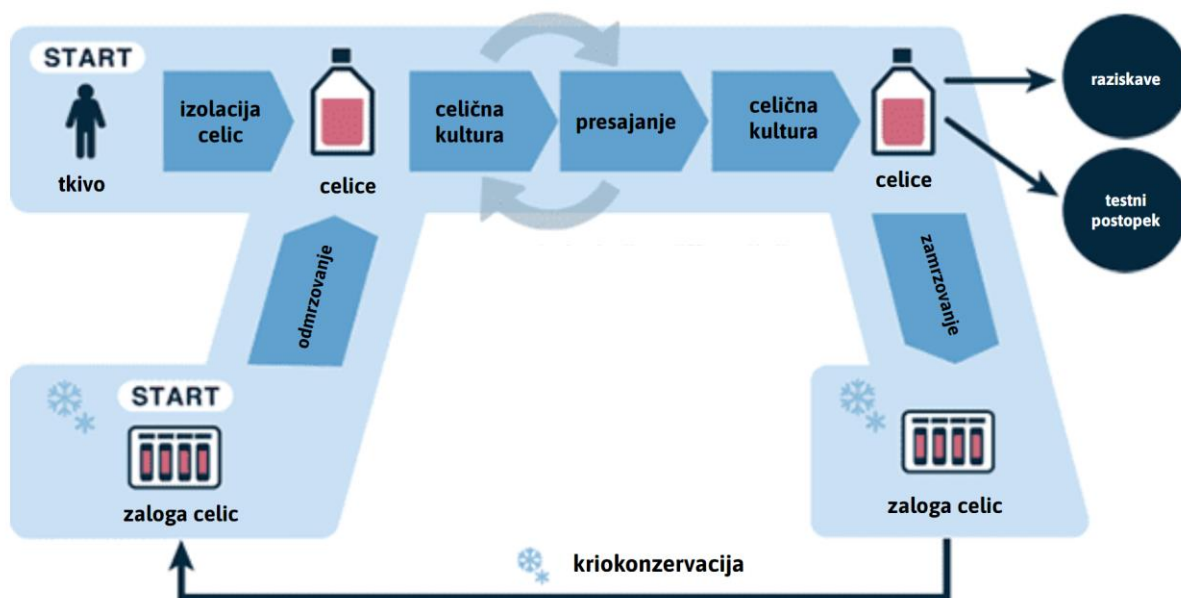
Slika 10: Celice jeter z označenimi Kupfferjevimi celicami (Kupffer cells)
(<https://histology.siu.edu/erg/GI166b.htm>)

Veliko število bakterij iz zaužite hrane nenehno prehaja skozi sluznico prebavil v portalno kri. Če so delci prebavljivi, jih lahko prebavijo tudi makrofagi, ki sproščajo prebavne produkte v limfo. Če delec ni prebavljiv, makrofagi pogosto tvorijo "velikansko celično" kapsulo okoli delca, dokler se le-ta počasi ne raztopi, če sploh kdaj. Takšne kapsule se pogosto tvorijo okoli

bacilov tuberkuloze, prašnih delcev kremenca in celo ogljikovih delcev. Te jetrne celice tvorijo tako učinkovit sistem filtracije delcev, da skoraj nobena bakterija iz prebavil ne preide iz portalne krvi v splošni sistemski obtok. Če tujemu organizmu uspe vstopiti v splošni krvni obtok, obstajajo druge obrambne linije tkivnega makrofagnega sistema, kot so makrofagi vranice in kostnega mozga (Hall, 2016).

3.3 Celične kulture

Postopki in celične kulture se razlikujejo glede na vrsto celice in uporabo. Obstajata dva načina pridobivanja celic: iz celične banke ali z izolacijo celic iz donorskega tkiva. Pred uporabo kulture iz celic, pridobljenih iz celične banke, je treba opraviti postopke "odmrzovanja", "sejanja celic" in "opazovanja celic". Pri uporabi tkiva, odvzetega od darovalca, se običajno odstrani nepotrebno tkivo, če je pritrjeno. Obstajata dve glavni metodi za izolacijo celic iz tkiva, in sicer kultura eksplantatov in encimska metoda. Pri encimskih metodah izolacije celic iz tkiva, ki nas zanima, uporabimo raztopino proteolitičnega encima (Nikon, 2023).



Slika 11: Postopek pridobivanja, uporabe in shranjevanja celičnih kultur (<https://www.healthcare.nikon.com/en/ss/cell-image-lab/knowledge/process.html>)

Odtaljevanje zamrznjenih kriokonzerviranih celic za začetek celične kulture lahko razumemo kot "prebujanje celic". Zamrznjene celice, pridobljene iz celične banke, se prenesejo iz posode s tekočim dušikom ali kriogenega globokega zamrzovalnika (-150 °C) v ustrezno posodo za hlajenje, kot je posoda s tekočim dušikom. Celice se odmrznejo v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C ali v talilni napravi (Nikon, 2023).

Celice se oborijo s centrifugiranjem in po odstranitvi supernatanta se doda svež medij, predhodno segret na 37 °C. Celice se nato resuspendirajo s pipetiranjem. Z mikroskopom ali celičnim števcom se izmeri število celic oz. celična koncentracija. Celično suspenzijo, lahko glede na želeno koncentracijo ustrezno razredčimo. Po sejanju celic v novo posodo za kulturo celice opazujemo v posodi z optičnim mikroskopom ali drugo opazovalno napravo, da preverimo stanje, razporejenost in morfologijo celic ter morebitno prisotnost tujih predmetov (Nikon, 2023).



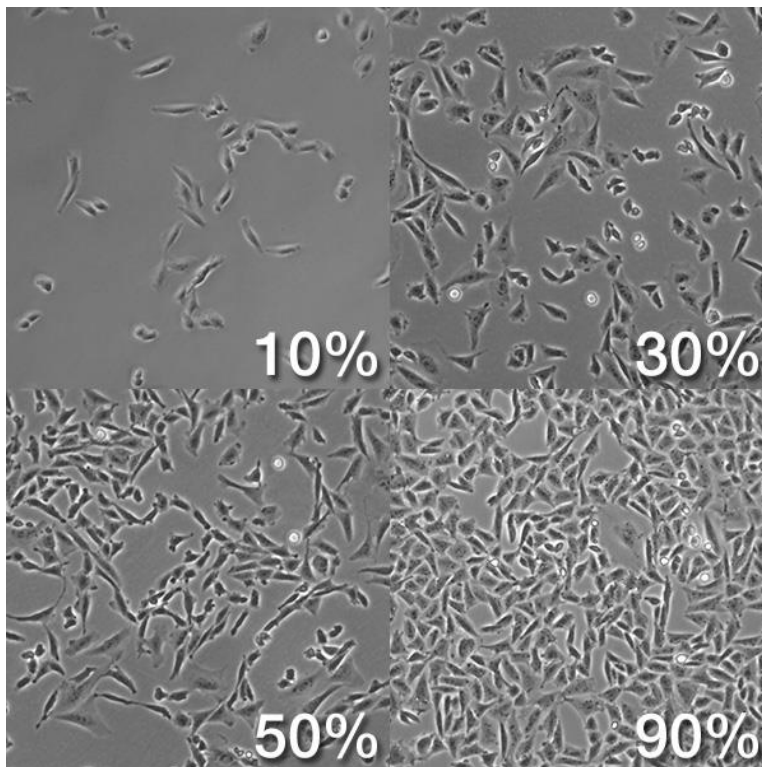
Slika 12: Posoda za inkubacijo celic

[\(https://harrickplasma.com/tissue-culture-plastic-polystyrene/\)](https://harrickplasma.com/tissue-culture-plastic-polystyrene/)

Posodo s celično kulturo nato postavimo v vlažen CO₂ inkubator pri 37 °C in začnemo s kultivacijo. Celice presnavljajo hranila v gojišču, zato je treba gojišče, ki je osiromašeno s hranili in obogateno z metaboliti, nadomestiti s svežim gojiščem. Ta proces se imenuje "sprememba ali menjava medija". Pred zamenjavo medija se celice opazujejo, da se preveri stanje kulture. Po odstranitvi starega medija je hitro dodano novo gojišče, da se prepreči izsušitev celic. Poleg tega je treba svež medij predhodno segreti na 37 °C, da celice niso

izpostavljene nenadnim spremembam temperature. Po zamenjavi medija se preveri, ali so celice poškodovane (Nikon, 2023).

Ko se celice začnejo razmnoževati, jih je potrebno razdeliti v nove posode za kulturo, preden se trenutna posoda napolni. Stanje, v katerem so, ko napolnijo posodo s kulturo, se imenuje "konfluentno". Na splošno je priporočljivo, da se celice presajajo, ko površina, ki jo zasedajo celice, doseže približno 70 do 80 %. Ko postanejo konfluentne, pridejo celice v stik druga z drugo in čutijo, da jim ni treba več rasti, kar je znano kot "inhibicija stika". Metoda prehoda se med suspenzijskimi in adherentnimi celicami razlikuje. Celice so nato pripravljene za uporabo v eksperimentu (Nikon, 2023).



Slika 13: Konfluenca celične kulture

(<https://biology.stackexchange.com/questions/29857/origin-of-term-confluency-in-cell-culture>)

3.4 Spektrofluorimetrija (fluorescenčna spektrometrija)

Fluorescenca je pojav, pri katerem pride do absorpcije vzbujalne svetlobe dane valovne dolžine s fluorescenčno molekulo. Sledi oddajanje svetlobe na daljših valovnih dolžinah. Intenzivnost fluorescence (FI) od oddane svetlobe (RFU) pri izbranih vzbujevalnih in emisijskih valovnih dolžinah je sorazmeren s koncentracijo preiskovane fluorescenčne molekule. Fluorescenčne molekule imajo dva značilna spektra: vzbujevalni spekter, ki prikazuje količino svetlobe, odvisno od absorbirane valovne dolžine, in emisijski spekter, ki prikazuje količino oddane svetlobe, odvisno od valovne dolžine. Vsaka spojina ima drugačen spekter fluorescence, zaradi česar je fluorimetrija visoko specializirana analitska tehnika. Ena glavnih prednosti detekcije fluorescence je visoka občutljivost. To je pomembno, saj imajo lahko relativno majhne spremembe (npr. koncentracija ionov v živih celicah) pomembne fiziološke učinke. Poleg tega, da je fluorescenca vsestransko orodje v celični biologiji, biokemiji in molekularni biologiji, je tudi pomembna tehnika za preučevanje molekularnih interakcij. Fluorescenčni resonančni prenos energije (FRET) je tehnika merjenja na podlagi intenzivnosti (Thermo Fisher Scientific, 2006).

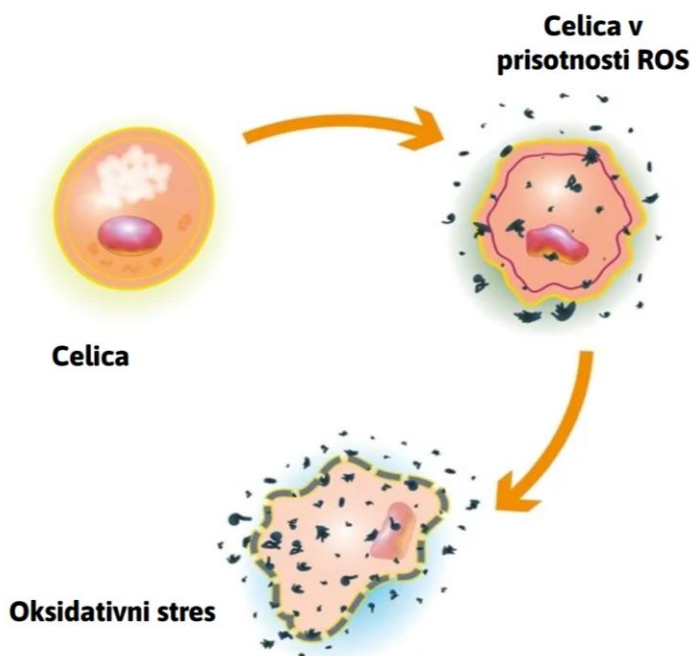


Slika 14: Spektrofluorometer na Medicinski Fakulteti Maribor (lastni vir)

V eksperimentu, kjer uporabljamo spektrofluorometer, izmerjene vrednosti običajno predstavljajo intenziteto fluorescence vzorca. Intenzivnost fluorescence je pogosto izražena v relativnih fluorescenčnih enotah (RFU-relative fluorescence units) ali v poljubnih fluorescenčnih enotah (AFU-arbitrary fluorescence units). Tako RFU kot AFU so vrednosti brez enote, ki predstavljajo relativno intenzivnost fluorescence vzorca v primerjavi z referenčnim vzorcem ali umerjenim standardom. V poskusu fluorescence se intenzivnost fluorescence pogosto zabeleži v RFU ali AFU, saj oboje zagotavljajo priročno in enostavno primerljivo meritev fluorescenčnega signala, ne glede na dejavnike, ki lahko vplivajo na fluorescenčni signal (GC biotech, 2021).

3.5 Reaktivne kisikove spojine (ROS)

Reaktivne kisikove spojine (ROS) nastajajo med mitohondrijskim oksidativnim metabolizmom in pri celičnem odzivu na ksenobiotike, citokine in bakterijsko invazijo. Oksidativni stres se nanaša na neravnovesje zaradi presežka ROS ali oksidantov nad zmožnostjo celice, ki ne more več ustvariti učinkovit antioksidativni odziv. Oksidativni stres povzroča makromolekularne poškodbe in je vpleten v različna bolezenska stanja, kot so ateroskleroza, sladkorna bolezen, rak (ROS spodbujajo tumorske metastaze z aktivacijo genov), nevrodegeneracija in staranje. ROS služijo tudi kot kritične signalne molekule pri celični proliferaciji in preživetju. Celično zaznavanje in metabolizem ROS strogo uravnava različne beljakovine, vključene v redoks (redukcija/oksidacija) mehanizem (Ray indr., 2012).



Slika 15: Celice v prisotnosti ROS

(<https://www.news-medical.net/whitepaper/20190603/A-double-edged-sword-reactive-oxygen-species-and-how-they-are-detected.aspx>)

Reaktivne kisikove vrste (ROS) uravnavajo več signalnih poti na podlagi interakcije s kritičnimi signalnimi molekulami, ki vplivajo na različne celične procese, kot so proliferacija, presnova, diferenciacija in preživetje, antioksidativni in protivnetni odziv, homeostaza železa in odziv na poškodbe DNA (Ray in dr., 2012).

3.6 MPCVA (The Membrane Potential Cell Viability Assay)

MPCVA je nov merilni pristop, ki se osredotoča na trajno izgubo membranske pregradne funkcije celic, ki je nujna za vse žive celice. Trajna izguba celovitosti membrane povzroči nepopravljivo povečanje potenciala membrane v mirovanju, tj. depolarizacija, zaradi izgube selektivne prepustnosti, gradientov ionske koncentracije in masne elektronevtralnosti. Določene celice lahko za kratek čas povečajo svoj membranski potencial in ga nato zmanjšajo nazaj na potencial mirujoče membrane. Kljub temu ima celica, ki poveča svoj membranski potencial za določen čas (in ga ne zmanjša nazaj) največjo verjetno izgubo celovitosti membrane in se lahko šteje za mrtvo. Posledično lahko z merjenjem membranskega potenciala določimo sposobnost preživetja celice. Pri merjenju membranskega potenciala se uporabljajo

potenciometrične sonde, katerih fluorescenčne lastnosti se merijo spektrofotometrom (Madorran *indr.*, 2022).

3.6.1 Potenciometrične optične sonde

Spremembe membranskega potenciala (depolarizacija in hiperpolarizacija) imajo pri mnogih fizioloških procesih osrednjo vlogo, vključno s širjenjem živčnih impulzov, krčenjem mišic in celično signalizacijo. Potenciometrične sonde so pomembna orodja za preučevanje teh procesov in so na splošno označene kot sonde s počasnim ali hitrim odzivom (Thermo Fisher Scientific, 2023).

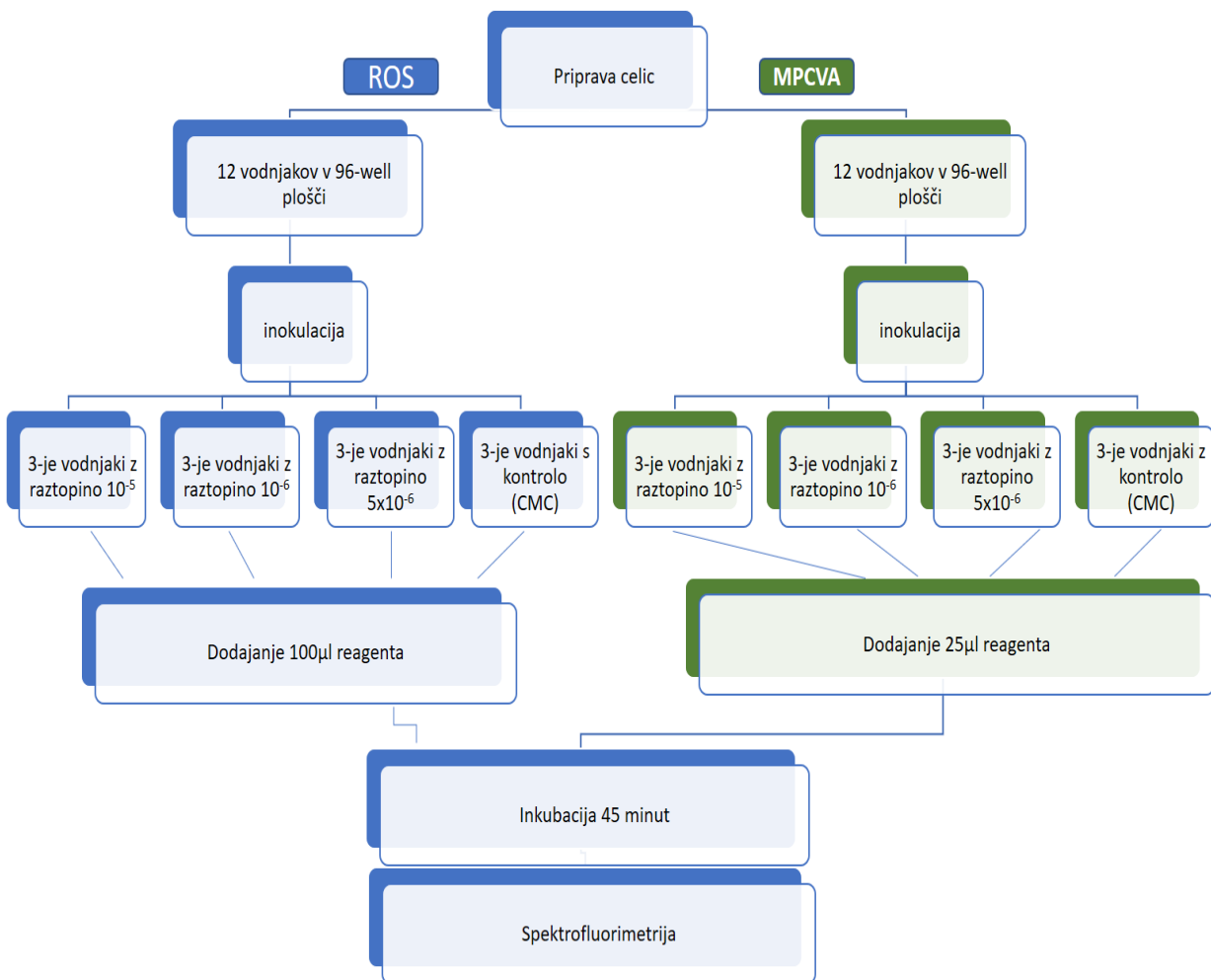
Potenciometrične optične sonde omogočajo raziskovalcem izvajanje meritev membranskega potenciala v organelih in celicah, ki so premajhne za mikroelektrode. Plazemska membrana celice ima običajno transmembranski potencial približno -70 mV (negativna notranja stran) kot posledico koncentracijskih gradientov K^+ , Na^+ in Cl^- , ki jih vzdržujejo aktivni transportni procesi. Potenciometrične sonde ponujajo posredno metodo zaznavanja translokacije teh ionov, medtem ko se fluorescentni ionski indikatorji lahko uporabljajo za neposredno merjenje sprememb specifičnih koncentracij ionov. Povečanje in zmanjšanje membranskega potenciala (imenovana membranska hiperpolarizacija oziroma depolarizacija) imata osrednjo vlogo v številnih fizioloških procesih, vključno s širjenjem živčnih impulzov, krčenjem mišic, celičnim signaliziranjem in prehodom ionskih kanalov. Potenciometrične sonde so pomembna orodja za preučevanje teh procesov in za ocenjevanje viabilnosti celic (Thermo Fisher Scientific, 2023).

Sonde s počasnim odzivom delujejo tako, da vstopajo v depolarizirane celice, se vežejo na beljakovine ali membrane in kažejo okrepljeno fluorescenco. FluoVolt™ membransko potencialno barvilo združuje lastnosti hitre in počasne odzivne membranske potencialne sonde: odziva se na spremembe membranskega potenciala v manj kot milisekundah in prikaže visoko stopnjo odziva, zato je primeren za uporabo pri metodi MPCVA (Thermo Fisher Scientific, 2021).

4 LABORATORIJSKO DELO

Večino laboratorijskega dela smo opravili v tednu od 28. 11. do 2. 12. Delo je potekalo na Medicinski Fakulteti v Mariboru. Potek dela je prikazan na organigramu.

4.1 Potek dela



Slika 16: Potek dela prikazan na organigramu (lastni vir)

4.2 Seznam opreme in materialov

4.2.1 Kemikalije

- Heksabromociklododekan (Sigma-Aldrich)
- Karboksimetilceluloza (Sigma-Aldrich)
- Tripsin (Sigma-Aldrich)
- FluoVolt™ Membrane Potential Kit (Thermo Fisher Scientific)

4.2.2 Celična kultura

- primarne hepatocite (ZEN-BIO, USA)
- celični medij (Gibco)
- serum³ (Gibco)

4.2.3 Laboratorijski pribor in oprema

- celični inkubator CO₂ MCO-19AC (SANYO, Japan)
- spektrofluorimeter (VarioskanFlash, Thermo Fisher Scientific)
- zamrzovalnik (Thermo Fisher Scientific)
- hladilnik (Thermo Fisher Scientific)
- svetlobni mikroskop Axiovert 40CFL (Zeiss, Germany)
- vodna kopel (Thermo Fisher Scientific)
- centrifuga Eppendorf 58108 R (Eppendorf, Germany)
- tehtnica PCB (Kern, Germany)
- pipete z nastavki (Thermo Fisher Scientific)
- vibracijski mešalnik za epruvete - vortex (Phoenix Instrument)
- zaščitne rokavice
- posoda za gojenje celičnih kultur

³ “Serum je ključnega pomena kot vir rastnih in adhezijskih faktorjev, hormonov, lipidov in mineralov za kulturo celic. Poleg tega serum uravnava tudi prepustnost celične membrane in služi kot nosilec lipidov, encimov in mikrohranil v celico.” (2) Thermo Fisher Scientific (2023) Culture Media & Sera, Thermo Fisher Scientific - US. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media.html#:~:text=Culture%20serum,trace%20elements%20into%20the%20cell>. (Citirano: februar 9, 2023).

- digestorij
- epruvete (različnih velikosti)
- centrifugirke
- mikrotitrna plošča za 96 vzorcev

4.3 Priprava celic

Iz zamrzovalnika ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) smo vzeli hepatocite in jih odtalili v vodni kopeli pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, kjer smo prav tako segreti celični medij. 9 ml celičnega medija smo dodali 1 ml celic ter zmes vorteksirali in nato centrifugirali. Tekočino smo odlili, celicam, ki so se nabrale na dnu pa dodali 1 ml celičnega seruma in 9 ml celičnega medija. Zmes smo prenesli v posodo namenjeno za gojenje celičnih kultur in inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 . Celicam smo nato menjavali celični medij, dokler se niso prijele dna posode. Da smo celice prenesli v novo posodo, smo kulturo tripsinizirali (dodali tripsin, da so se celice "odlepile").

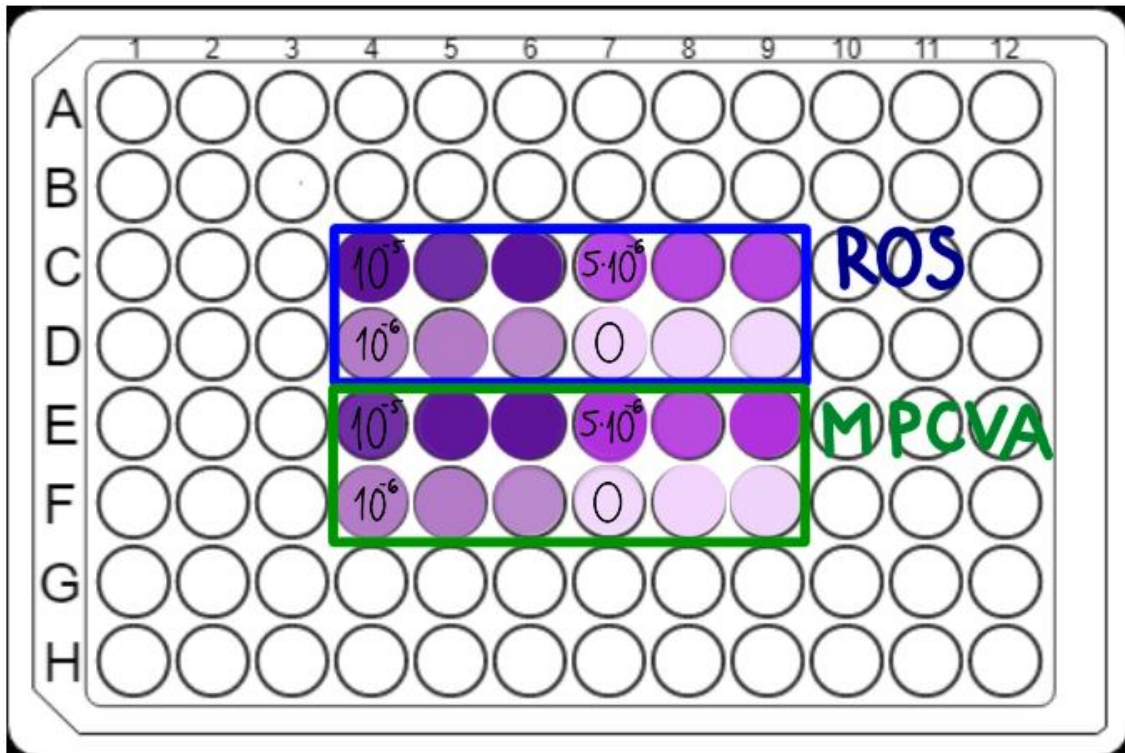
4.4 Priprava koncentracij

Za potrebe poskusa smo pripravili tri različne koncentracije HBCD in kontrolo. Najprej smo pripravili t.i. "stock solution", ki je imel koncentracijo 10^{-4} M (ali 0.1 mM) HBCD raztopljenega v celičnem mediju. To mešanico smo nato redčili dalje, da smo dobili naslednje koncentracije:

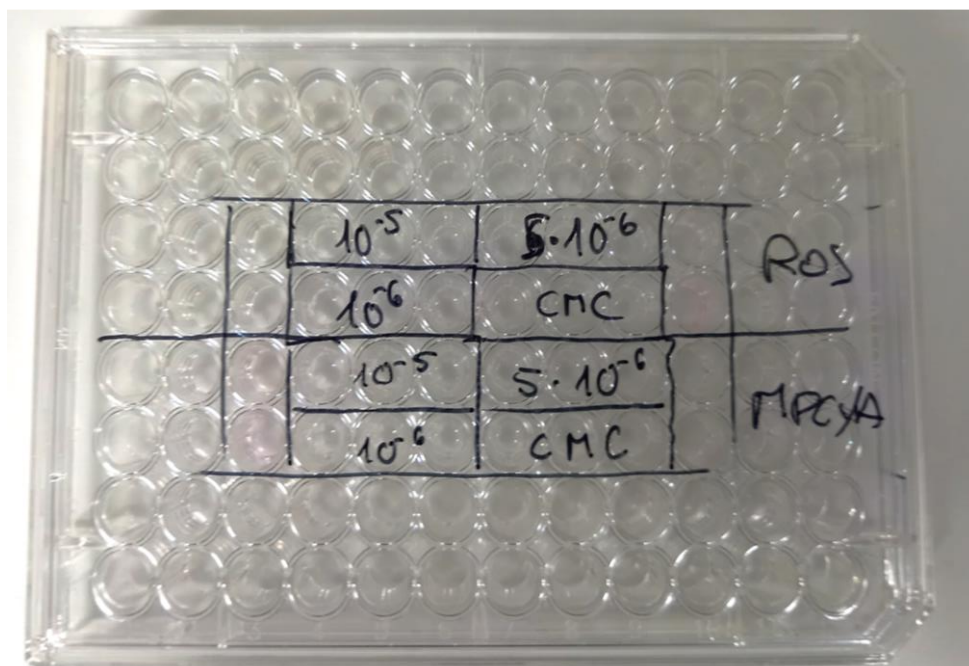
- 10^{-5} M HBCD,
- $5 \times 10^{-6}\text{ M}$ HBCD,
- 10^{-6} M HBCD.

Ker je HBCD hidrofobna spojina in se slabo raztaplja v vodi smo mešanici dodali še CMC (karboksimetilcelulozo), ki je delovala kot emulgator, in sicer v koncentraciji 250 M .

Ko smo koncentracije dodajali celicam v mikrotitrski plošči za 96 vzorcev, smo jih razporedili tako kot prikazujeta slika 17 in slika 18. Z vsako koncentracijo smo napolnili po 6 vodnjakov, od tega so bili trije uporabljeni v ROS protokolu, trije pa v MPCVA.



Slika 17: Shematski prikaz razporeditve koncentracij HBCD (na mikrotitrski plošči) za spektrofotometrijo (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:96-Well_plate.svg)



Slika 18: Razporeditev koncentracij HBCD (na mikrotitrski plošči) za spektrofotometrijo (lastni vir)

4.5 ROS protokol

1. Pro- in antioksidativne aktivnosti so bile ocenjene z uporabo sond DCFH-DA.
2. Celice so bile nanese na mikroplošče s prozornim ravnim dnom s 96 vodnjaki po 10.000 celic na vodnjak in inkubirane 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂.
3. Celice smo sprali s 150 µl fiziološke raztopine s fosfatnim pufrom pH 7,4 (HBSS) in 30 minut inkubirali s 100 µl HBSS, ki vsebuje 50 µM DCFH-DA.
4. Celice smo nato ponovno sprali s 150 µl HBSS.
5. Za oceno antioksidativne aktivnosti so bile celice inkubirane 45 minut z naraščajočimi koncentracijami HBCD-ja (10^{-5} , 10^{-6} , 5×10^{-6}).
6. Fluorescenca je bila izmerjena na avtomatiziranem bralniku plošč z uporabo valovne dolžine vzbujanja 504 nm in valovne dolžine emisije 529 nm.

4.6 MPCVA protokol

1. Celice so bile nanese na mikroplošče s prozornim ravnim dnom s 96 vodnjaki po 10.000 celic na vodnjak in inkubirane 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂.
2. Dodali smo 50 µL raztopine FluoVolt™.
3. Celice so bile inkubirane 45 minut.
4. Celice smo dvakrat sprali s PBS.
5. Dodali smo medije z različnimi koncentracijami HBCD (10^{-5} , 10^{-6} , 5×10^{-6}).
6. Fluorescenca je bila izmerjena na avtomatiziranem bralniku plošč z uporabo valovne dolžine vzbujanja 522 nm in valovne dolžine emisije 535 nm.

4.7 Obdelava podatkov

Podatke smo obdelali s t-testom in jim tako določili p-vrednost. Grafično smo jih prikazali v Excelu (2016). Grafom smo vrisali standardno deviacijo.

5 REZULTATI

Med raziskovanjem smo s spektrofotrometrom spremljali količino reaktivnih kisikovih spojin (ROS) pri različnih koncentracijah HBCD, in sicer pri 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M in 0 M (kar je služilo kot kontrola; vsebovala je 250 M CMC-karboksimetilceluloze). Izmerjene vrednosti spektrofotrometrije pri merjenju ROS prikazuje Tabela 1.

Prav tako smo opravili MPCVA (The Membrane Potential Cell Viability Assay oz. test viabilnosti celic na podlagi membranskega potenciala). Opravljen je bil pri enakih koncentracijah HBCD (10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M in 0 M, z 250 M CMC). Zabeležene vrednosti spektrofotrometrije pri uporabi MPCVA metode prikazuje Tabela 2.

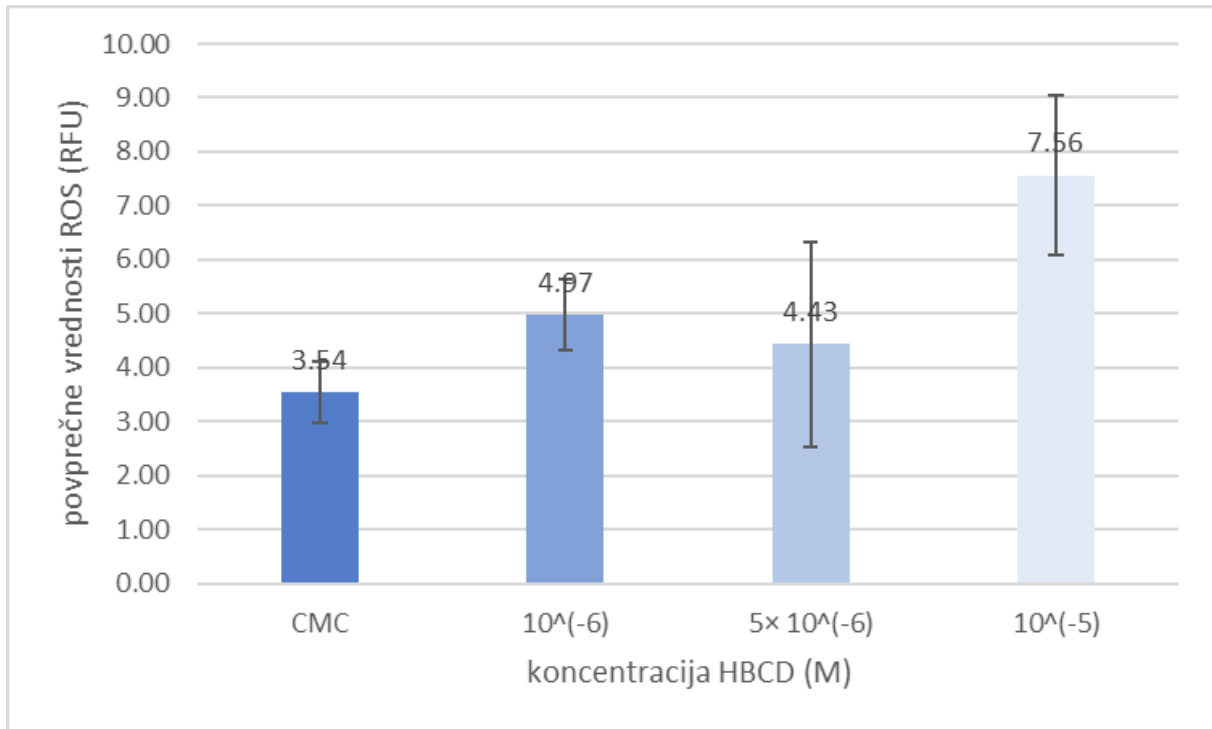
Tabela 1: Rezultati merjenja reaktivnih kisikovih spojin (ROS) s spektrofotrometrom pri različnih koncentracijah heksabromociklododekana (HBCD)

koncentracija HBCD (M)				
	10^{-5}	5×10^{-6}	10^{-6}	0
vrednosti ROS (RFU)	9.63842	3.44031	4.49841	3.86707
	6.66979	2.75557	5.90797	3.99986
	6.37844	7.09803	4.51728	2.75616

Tabela 2: Rezultati merjenja viabilnosti celic (MPCVA metoda) pri različnih koncentracijah heksabromociklododekana (HBCD)

koncentracija HBCD (M)				
	10^{-5} M	5×10^{-6} M	10^{-6} M	0
vrednosti merjenja viabilnosti celic (RFU)	28682.8	27200.8	30578.7	31127.5
	26327.4	27901.3	27803.8	0
	29995.4	28932.8	38973.1	36317.4

Graf 1 prikazuje rezultate meritev prostih kisikovih radikalov pri različnih koncentracijah HBCD. Razvidno je, da vrednosti ROS naraščajo z naraščanjem koncentracije in padajo z manjšanjem koncentracije HBCD. Najvišje vrednosti ROS so pri največji koncentraciji (10^{-5}) najmanjše pa pri kontroli (CMC).

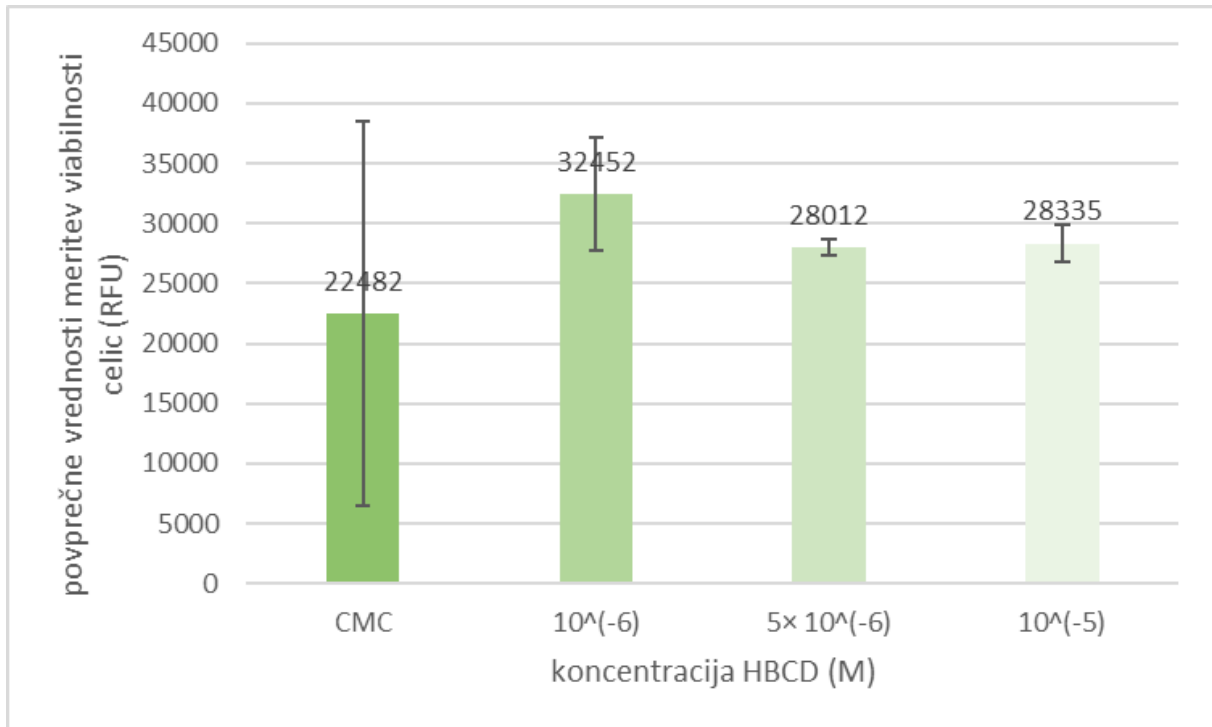


Graf 1: Povprečne vrednosti merjenja reaktivnih kisikovih spojin (ROS) pri različnih koncentracijah heksabromociklododekana (HBCD) ± 1 SD

Na zgornjem grafu so prikazane povprečne vrednosti ROS pri določenih koncentracijah z vrisanim intervalom napake (standardna deviacija, ± 1 SD).

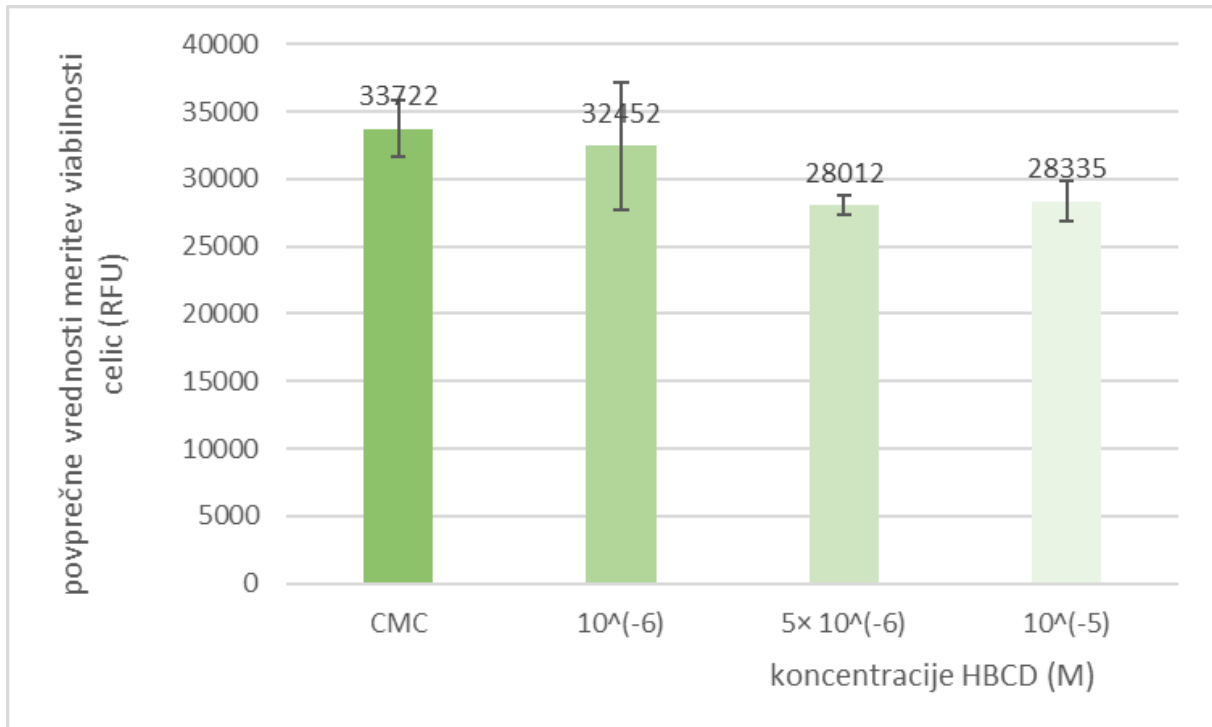
Opravili smo t-test med dvema setoma podatkov, in sicer med vrednostmi pri kontroli, kjer so bile vrednosti najmanjše, in pri največji koncentraciji (10^{-5}), kjer so bile vrednosti največje. P-vrednost je bila manjša od 0,05.

Na spodnjem grafu (graf 2) so prikazane izmerjene vrednosti, ki prikazujejo viabilnost celic (uporaba MPCVA metode). Razvidno je zmerno naraščanje vrednosti, te so namreč nižje pri koncentracijah 10^{-5} in 5×10^{-6} in višje pri koncentraciji 10^{-6} .



Graf 2: Povprečne vrednosti merjenja fluorescence vzorcev celic pri različnih koncentracijah heksabromociklododekana HBCD ± 1 SD

Graf prikazuje povprečne dobljene vrednosti meritev MPCVA. Opazna je razlika med najnižjo in najvišjo koncentracijo, kjer so vrednosti pri višji koncentraciji nižje (kar pomeni manj viabilnih celic), medtem ko so vrednosti pri nižji koncentraciji višje (več viabilnih celic). Pri kontroli opazimo nižje povprečje, zaradi vrednosti 0.0, ki se je pojavila pri drugi meritvi, zaradi verjetne napake v postopku.



Graf 3: Vrednosti merjenja fluorescence vzorcev celic pri različnih koncentracijah heksabromociklododekana HBCD s spremenjeno drugo izmerjeno vrednostjo pri kontroli ± 1 SD

Opravili smo t-test med dvema setoma podatkov, in sicer med vrednostmi pri kontroli, kjer so bile vrednosti največje, in pri koncentraciji (5×10^{-6}), kjer so bile vrednosti najmanjše. P-vrednost je bila manjša od 0,05.

6 DISKUSIJA

6.1 Hipoteza 1

Na podlagi predstavljenih rezultatov (graf 1) lahko našo prvo hipotezo potrdimo. Dodatek heksabromociklododekana (HBCD) v gojišču bo povišal vrednost reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) v človeških hepatocitih ($p < 0,05$). Viden je trend: z večanjem koncentracije HBCD se veča tudi njegov učinek; višajo se vrednosti ROS.

Rezultati se skladajo z že opravljenimi rezultati nekaterih študij. (Huang *indr.*, 2016) so opravili merjenje ROS pri nesmrtnih človeških jetrnih celicah L02 in celicah človeškega hepatoma HepG2. Merili so količino ROS v primerjavi s kontrolo pri α -, β - in \square -HBCD, in sicer pri koncentracijah: 10^{-5} , 10^{-6} in 10^{-7} M. Ugotovili so, da vrednosti ROS padajo s koncentracijo HBCD; razlike med koncentracijami so bile najbolj opazne pri β -HBCD.

HBCD na celice deluje citotoksično in posledično HBCD povzroča povečanje reaktivnih kisikovih vrst (ROS) v jetrnih celicah (človeške hepatocite). To se dogaja zaradi njegove sposobnosti induciranja oksidativnega stresa, do česar lahko pride kot posledica interakcije HBCD z različnimi organskimi molekulami v celici (lipidi, beljakovinami in DNK), kar povzroči nastajanje ROS. Kopičenje teh spojin lahko nato povzroči poškodbe celičnih struktur in sproži celični odziv, ki dodatno poveča ravni ROS. HBCD prav tako moti celične antioksidativne sisteme, kar vodi do kopičenja ROS in še dodatno poslabša oksidativni stres (Wang *indr.*, 2018).

6.2 Hipoteza 2

Pričakovali smo, da se bo viabilnost celic z večjo koncentracijo HBCD manjšala, kar pomeni, da smo pričakovali manjše vrednosti pri višjih koncentracijah. Omenjeno padanje je vidno iz grafa 3. P-vrednost je $p > 0,05$, kar pomeni da lahko drugo hipotezo potrdimo.

Čeprav smo prvi, ki smo uporabili MPCVA metodo za ocenjevanje celične viabilnosti po dodajanju HBCD, je več študij (navedenih v nadaljevanju), ugotovilo, da ima HBCD negativen

učinek na viabilnost celic. Zhang in dr., (2008) so v študiji pokazali vpliv HBCD na viabilnost celic. Raziskovali so citotoksičnost treh parov enantiomerov heksabromociklododekana (HBCD) na celice Hep G2. V vzorcih s HBCD so opazili znatno nižjo viabilnost celic in večje sproščanje LDH (laktat dehidrogenaze)⁴ (Zhang in dr., 2008).

(Shi in dr., 2021) so v njihovi raziskavi raziskovali toksičnost HBCD in drugih zaviralcev gorenja v človeških vaskularnih endotelijskih celicah (EC). Podatki so pokazali, da je HBCD povzročil citotoksičnost; in sicer od odmerka odvisno zmanjšanje viabilnosti celic, povečanje prepustnosti celične membrane in apoptoze (programirana celična smrt), migracijo in inhibicijo tvorbe lumna. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da je HBCD najbolj toksičen izmed preiskovanih zaviralcev gorenja. Izpostavljenost HBCD je povzročila nastajanje reaktivnih kisikovih radikalov, nastajanje mitohondrijskih superoksidov in propad potenciala mitohondrijske membrane, kar pomeni, da je reaktivni stres povzročil citotoksičnost (Shi in dr., 2021).

Al-Mousa in Michelangeli (2014) sta v njihovi raziskavi, opravljeni na celicah človeškega nevroblastoma SH-SY5Y prav tako opazila zmanjšanje viabilnosti celic ob dodajanju HBCD (Al-Mousa in Michelangeli, 2014).

Heksabromociklododekan (HBCD) je toksičen za celice in lahko povzroči zmanjšano sposobnost preživetja oz. viabilnost celic. To se lahko zgodi kot posledica več mehanizmov, na primer:

- Povzročanje oksidativnega stresa: kot je že omenjeno zgoraj, je dokazano, da HBCD poveča ravni reaktivnih kisikovih vrst (ROS) v celicah, kar vodi do oksidativnega stresa in poškodb celic (Wang in dr., 2018).
- Motnje v celičnih signalnih poteh: HBCD moti normalne celične signalne poti, kar vodi do sprememb v vedenju celic in zmanjšane sposobnosti preživetja (Wang in dr., 2018).
- Sprožitev apoptoze: HBCD sproži apoptozo ali programirano celično smrt v celicah, kar vodi do zmanjšane viabilnosti celic (Wang in dr., 2018).

⁴ LDH (laktat dehidrogenaza) se sprošča v celične kulture, ko je plazemska membrana poškodovana, kar je ključna značilnost celic, ki so podvržene apoptozi, nekrozi in drugim oblikam celične poškodbe. Kumar, P., Nagarajan, A. and Uchil, P.D. (2018) *Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay*, *Cold Spring Harbor protocols*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29858337/> (Citirano: februar 9, 2023).

- Motnje delovanja celične membrane: HBCD moti delovanje celične membrane, kar vodi do sprememb v prepustnosti membrane in zmanjšane sposobnosti preživetja celic (Shi *indr.*, 2021).

Pomembno je omeniti, da se lahko specifični mehanizmi, s katerimi HBCD zmanjša viabilnost celic, razlikujejo glede na vrsto celice ter koncentracijo in trajanje izpostavljenosti HBCD. Za popolno razumevanje osnovnih mehanizmov toksičnosti, ki jo povzroča HBCD, je potrebno nadaljnje raziskovanje.

6.3 Vrednotenje metode

Do napake je prišlo pri odmerjanju mešanice z FluoVoltom v mikrotitrski plošče. Pri enem od vzorcev pri spektrofluorometriji smo namreč dobili vrednost 0.0, kar pomeni, da v vzorcu ni bilo prisotne potenciometrične sonde. Zaradi zahtevnosti metode postopka nismo uspeli ponoviti.

Do možnih napak je lahko prišlo pri tehtanju HBCD za uporabo v poskusu. Odmeriti smo namreč morali zelo majhne mase HBCD, na dokaj neobčutljivi tehtnici (edina, ki nam je bila na voljo), kar pomeni, da težko zagotovimo natančnosti koncentracij HBCD.

Zaradi netopnosti spojine smo morali delati z nizkimi koncentracijami, kar pomeni, da so si izmerjeni rezultati med seboj precej podobni (sploh pri MPCVA metodi). V prihodnosti bi želeli opraviti poskus z višjimi koncentracijami HBCD, da bi bile razlike med njimi bolj opazne.

7 ZAKLJUČEK

V raziskavi smo se ukvarjali s potencialnim vplivom hekbromociklododekana na človeške primarne hepatocite, predvsem na povečanje prisotnosti prostih kisikovih radikalov (ROS) ter na zmanjšanje celične viabilnosti, kar smo ocenjevali z metodo MPCVA. Potrdili smo obe zastavljeni hipotezi.

Čeprav je citotoksičnost HBCD na celice jeter dobro raziskan pojav, se študije večinoma osredotočajo na živalske celice, na primer celice tolstoglavega pisanca (*Pimephales promelas* (Bertucci indr., 2020) in celice podgan (Miller indr., 2016). Zato se je naša naloga osredotočila na človeške celice, specifično jetrne celice. Večina opravljenih raziskav na področju vključuje merjenje prostih kisikovih radikalov kot metodo za določanje citotoksičnosti, vendar še nobena objavljena študija ni uporabila metode MPCVA pri ocenjevanju toksičnosti HBCD, čeprav nekatere objavljene študije vključujejo opazovanje membranskega potenciala, za zaznavo in prepoznavanje citotoksičnosti spojine (Shi indr., 2021).

V raziskovalni nalogi smo dokazali, da prisotnost HBCD dvigne raven prostih kisikovih radikalov, kar lahko pripelje do oksidativnega stresa in povzroča dolgoročne zdravstvene težave. Prav tako smo ugotovili, da ima HBCD vpliv na zmanjšanje števila viabilnih hepatocitov v preiskovanih vzorcih.

Z raziskovalno nalogo smo pripomogli k širjenju znanja tega področja, ter opozorili, da je HBCD nevarna in za človeške hepatocite citotoksična spojina, ki dviguje raven prostih kisikovih radikalov in zmanjšuje število viabilnih celic. Zaradi omenjenega bi veljalo razmisliti o omejitvi uporabe bromiranih zaviralcev gorenja ter o izvedbi nadaljnjih raziskav o njihovem učinku na zdravje ljudi.

8 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z našo raziskavo smo pripomogli k zbiranju podatkov na področju obravnave citotoksičnosti heksabromociklododekana. Dokazali smo, da je nevarna spojina za človeške jetrne makrofage (Kupfferjeve celice), ter da ima nasploh toksične lastnosti, ki povzročajo mnoge zdravstvene probleme. Regulacija spojin, kot je HBCD, bi morala biti bolj obširna, prav tako bi morali bolj strogo omejiti proizvodnjo ter uporabo človeku in okolju nevarnih spojin. Čeprav so zaviralci gorenja v vsakdanjem življenju nepogrešljivi, si ne moremo privoščiti ignoriranja njihovih nevarnih lastnosti. Kemično onesnaževanje je vedno večji problem, ki mu velikokrat ne posvečamo dovolj pozornosti. Upamo, da so izsledki naše raziskave opozorili na nevarnost spojin okoli nas, za katere mnogokrat niti ne vemo, da so tam. Pereče vprašanje globalnega onesnaževanja ostaja nerešeno, mi pa še vedno živimo v svetu, ki zaradi dobička dostikrat zanemari zdravje ljudi ter ekosistema.

9 BIBLIOGRAFIJA

Al-Mousa, F. and Michelangeli, F. (2012) *Some commonly used brominated flame retardants cause ca^{2+} -atpase inhibition, beta-amyloid peptide release and apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells*, *PLOS ONE*. Public Library of Science. Dostopno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0033059> (Citirano: februar 8, 2023).

Al-Mousa, F. and Michelangeli, F. (2014) The sarcoplasmic-endoplasmic reticulum ca^{2+} -atpase (SERCA) is the likely molecular target for the acute toxicity of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD), *Chemico-biological interactions*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24189551/> (Citirano: februar 8, 2023).

Bertucci, J.I., Malala Irugal Bandaralage, S. and Hecker, M. (2020) *Assessing the cytotoxic effect of hexabromocyclododecane (HBCD) on liver tissue cultures from fathead minnow (*Pimephales promelas*)*, *Aquatic Toxicology*. Elsevier. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X20302733> (Citirano: februar 9, 2023).

Betts, K.S. (2008) *New thinking on flame retardants*, *Environmental health perspectives*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2367656/> (Citirano: 8. Februar 2023).

Dixon, L.J. *indr.*(2013) *Kupffer Cells in the Liver*, *Comprehensive Physiology*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4748178/> (Citirano: februar 9, 2023).

Dutta, S. *indr.*(2021) *Hepatocytes and their role in metabolism*, *IntechOpen*. Drug Metabolism. Dostopno na: <https://www.intechopen.com/chapters/78184> (Citirano: februar 9, 2023).

Feiteiro, J., Mariana, M. and Cairrao, E. (2021) *Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure*, *Environmental Pollution*. Dostopno na:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749121010575> (Citirano: februar 8, 2023).

GEMET (2021) bioakumulacija, Bioakumulacija. GEMET General Multilingual Environmental Thesaurus. Dostopno na:

<https://www.eionet.europa.eu/gemet/sl/concept/798> (Citirano: 8. februar 2023).

GC biotech (2021) *Absorbance and fluorescence quantification*, *GC Biotech*. Dostopno na: <https://gcbiotech.com/absorbance-and-fluorescence-quantification/> (Citirano: februar 12, 2023).

Hall, J.E. (2016) *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 13th edn. Philadelphia, PA, Pennsylvania: Elsevier.

Huang, X. et al. (2016) In vitro study on the biotransformation and cytotoxicity of three hexabromocyclododecane diastereoisomers in liver cells, *Chemosphere*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27434255/> (Citirano: februar 9, 2023).

Hussain, M.S., Yaseen, M. and Hussain, S.M. (2019) *Effects of flame retardants on vital organs of body*, *SSRN*. Dostopno na:

https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3375231 (Citirano: februar 8, 2023).

Johns Hopkins University (2019) *Liver: Anatomy and functions*, *Liver: Anatomy and Functions*. hopkinsmedicine. Dostopno na:

<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions> (Citirano: februar 9, 2023).

Kumar, P., Nagarajan, A. and Uchil, P.D. (2018) *Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay*, *Cold Spring Harbor protocols*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29858337/> (Citirano: februar 9, 2023).

Law, R.J. *indr.*(2005) *Hexabromocyclododecane CHALLENGES Scientists and Regulators*. American Chemical Society. Dostopno na: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es053302f?cookieSet=1> (Citirano: februar 8, 2023).

Liu , Y. *indr.*(2019) *Bioaccumulation and biomagnification of Hexabromocyclododecane (HBCDD) in insect-dominated food webs from a former E-waste recycling site in South China*, *Chemosphere*. Pergamon. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519320521> (Citirano: februar 9, 2023).

Nikon (2023) Basic process in cell culture in general: Basic knowledge: Cell X image lab, healthcare.nikon. Nikon. Dostopno na: <https://www.healthcare.nikon.com/en/ss/cell-image-lab/knowledge/process.html> (Citirano: februar 9, 2023).

Mackay , D. and Fraser, A. (2000) Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models, Biomagnification - Energy Education. Environmental Pollution. Dostopno na: <https://energyeducation.ca/encyclopedia/Biomagnification#:~:text=Biomagnification%20is%20the%20process%20by,the%20chain%20are%20more%20impacted> (Citirano: 8. februar 2023).

Madorran, E. *indr.*(2022) *A promising method for the determination of cell viability: The membrane potential cell viability assay*, *MDPI*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Dostopno na: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/15/2314> (Citirano: februar 8, 2023).

Miller, I. *indr.*(2016) *Dataset of liver proteins of EU- and hypothyroid rats affected in abundance by any of three factors: In vivo exposure to hexabromocyclododecane (HBCD), thyroid status, gender differences*, *pubmed.gov*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27579339/> (Citirano: februar 9, 2023).

Poisson, J. *indr.*(2016) *Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases*, *Journal of hepatology*. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27423426/#:~:text=Liver%20sinusoidal%20endothelia%20cells%20> (Citirano: februar 9, 2023).

Ray, P.D., Huang, B.-W. and Tsuji, Y. (2012) *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*, Cellular signalling. U.S. National Library of Medicine. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454471/> (Citirano: februar 9, 2023).

Shi, J. *indr.*(2021) *HBCD, TBECH, and BTBPE exhibit cytotoxic effects in human vascular endothelial cells by regulating mitochondria function and ROS production*, Wiley Online Library. Environmental Toxicology. Dostopno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tox.23163> (Citirano: februar 9, 2023).

Sun, Y.X. *et al.* (2012) *Hexabromocyclododecane in terrestrial passerine birds from e-waste, urban and rural locations in the Pearl River Delta, South China: Levels, biomagnification, diastereoisomer- and enantiomer-specific accumulation*, Environmental Pollution. Elsevier. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749112003545> (Citirano: februar 9, 2023).

Szabo, D.T. (2014) *Hexabromocyclododecane*, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Edited by P. Wexler. Academic Press. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543011283> (Citirano: februar 8, 2023).

Thermo Fisher Scientific (2006) Thermo Scientific Varioskan® Flash User Manual, thermofisher. Thermo Fisher Scientific. Dostopno na: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LCD/manuals/D01523~.pdf> (Citirano: februar 9, 2023).

Thermo Fisher Scientific (2021) *FluoVolt membrane potential kit B - Fisher Sci*, FluoVolt™ Membrane Potential Kit. invitrogen. Dostopno na: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009668_FluoVolt_Membrane_Potential_Kit_UG.pdf (Citirano: februar 9, 2023).

- (1) Thermo Fisher Scientific (2023) *Introduction to potentiometric probes-section 22.1*, Thermo Fisher Scientific - US. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-membrane-potential/introduction-to-potentiometric-probes.html> (Citirano: februar 9, 2023).
- (2) Thermo Fisher Scientific (2023) *Culture Media & Sera*, Thermo Fisher Scientific - US. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media.html#:~:text=Culture%20serum,trace%20elements%20into%20the%20cell.> (Citirano: februar 9, 2023).

Zhang , X. *indr.*(2008) *Cytotoxicity evaluation of three pairs of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers on HEP G2 cell*, *Toxicology in Vitro* . Pergamon. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233308001495> (Citirano: februar 8, 2023).

Wang, X. *indr.*(2018) *Chronic toxicity of hexabromocyclododecane(HBCD) induced by oxidative stress and cell apoptosis on nematode Caenorhabditis Elegans*, *Chemosphere*. Pergamon. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653518309974> (Citirano: februar 9, 2023).

10 VIRI SLIK

Slika 1: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hexabromocyclododecane> (10. 2. 2023)

Slika 2: https://www.researchgate.net/figure/Sources-of-hexabromocyclododecane-HBCD-tris-1-chloro-2-propyl-phosphate-TCPP-and_fig4_263377890 (10. 2. 2023)

Slika 3: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749121010575> (10. 2. 2023)

Slika 4: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519320521> (10. 2. 2023)

Slika 5: https://issuu.com/pipinovaknjiga/docs/demo_anatomija/55 (10. 2. 2023)

Slika 6: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/5/7711> (10. 2. 2023)

Slika 7: lastni vir

Slika 8: lastni vir

Slika 9: <https://www.nature.com/articles/s41575-018-0020-y> (10. 2. 2023)

Slika 10: <https://histology.siu.edu/erg/GI166b.htm> (10. 2. 2023)

Slika 11: <https://www.healthcare.nikon.com/en/ss/cell-image-lab/knowledge/process.html> (10. 2. 2023)

Slika 12: <https://harrickplasma.com/tissue-culture-plastic-polystyrene/> (10. 2. 2023)

Slika 13: <https://biology.stackexchange.com/questions/29857/origin-of-term-confluency-in-cell-culture> (10. 2. 2023)

Slika 14: lastni vir

Slika 15: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20190603/A-double-edged-sword-reactive-oxygen-species-and-how-they-are-detected.aspx> (10. 2. 2023)

Slika 16: lastni vir

Slika 17: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:96-Well_plate.svg (10. 2. 2023)

Slika 18: lastni vir