

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA HUMAR

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA HUMAR

**DOLOČANJE UČINKA NOVEJŠIH ZAVIRALCEV GORENJA TBB IN  
TBPH TER NJUNIH METABOLITOV NA ANDROGENSKE IN  
GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE**

**DETERMINATION OF IMPACT OF NEW FLAME RETARDANTS  
TBB AND TBPH AND THEIR METABOLITES ON THE ANDROGEN  
AND GLUCOCORTICOID RECEPTORS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

### **ZAHVALA**

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm., da sem lahko magistrsko nalogo opravila pod njenim mentorstvom.

Hvala mladi raziskovalki Ivani Blagojević, mag. farm. za pomoč in potrpežljivost pri izvajanju laboratorijskega dela.

Prijateljem in farmacevtskim kolegom hvala za številne dogodivščine, zaradi katerih bodo študijska leta ostala nepozabna.

Iz srca hvala mojim domačim, ki so me podpirali in spodbujali med celotnim študijem.

Posebna zahvala gre Gregu, da je moj glavni podporni steber in mi ni pustil obupati v težkih trenutkih.

### **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Polona Humar

Ljubljana, 2014

---

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	i
KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO TABEL.....	v
POVZETEK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
SEZNAM OKRAJŠAV .....	viii
1. UVOD.....	1
1.1 GORENJE IN MEHANIZMI DELOVANJA ZAVIRALCEV GORENJA .....	1
1.2 VRSTE ZAVIRALCEV GORENJA.....	2
1.2.1 ANORGANSKI ZAVIRALCI GORENJA .....	2
1.2.2 ORGANOFOSFORNI ZAVIRALCI GORENJA .....	3
1.2.3 HALOGENIRANI ZAVIRALCI GORENJA .....	3
1.2.4 DUŠIK-VSEBUJOČI ZAVIRALCI GORENJA .....	3
1.3 BROMIRANI ZAVIRALCI GORENJA .....	3
1.3.1 PROBLEMATIČNOST BFR .....	4
1.3.2 NOVEJŠI BFR .....	5
1.4 2-ETILHEKSIL 2,3,4,5-TETRABROMOBENZOAT (TBB) IN BIS(2- ETILHEKSIL) 3,4,5,6-TETRABROMOFTALAT (TBPH).....	5
1.5 POJAVNOST TBB IN TBPH .....	7
1.5.1 NEŽIVA NARAVA .....	7
1.5.1.1 Zrak.....	7
1.5.1.2 Prah.....	7
1.5.1.3 Prst in sediment .....	8
1.5.2 ŽIVA NARAVA .....	9
1.5.2.1 Ribe, mehkužci .....	9

---

1.5.2.2 Ptiči.....	9
1.5.2.3 Sesalci.....	10
1.6 RAZGRADNJA .....	10
1.6.1 FOTOKEMIJSKI RAZPAD .....	10
1.6.2 IN VITRO METABOLIZEM.....	11
1.7 TOKSIČNOST TBB IN TBPH .....	12
1.7.1 IZPOSTAVLJENOST LJUDI.....	13
1.7.2 AKUMULACIJA TBB IN TBPH .....	13
1.7.4 UČINKI NA HORMONSKI SISTEM.....	14
1.7.4.1 Učinki na steroidne hormone.....	14
1.7.4.2 Učinki na ščitnične hormone .....	14
1.7.5 UČINKI NA JETRA .....	15
1.7.6 OSTALI TOKSIČNI UČINKI .....	15
2. NAČRT DELA .....	16
3. MATERIALI IN METODE DELA.....	18
3.1 TESTIRANE SPOJINE.....	18
3.1.1 PRIPRAVA VZORCEV SPOJIN .....	19
3.1.2 DOLOČITEV OBMOČIJ TESTNIH KONCENTRACIJ .....	20
3.2 OSNOVNE METODE DELA S CELIČNO KULTURO .....	20
3.2.1 ODMRZOVANJE CELIČNE LINIJE .....	21
3.2.2 GOJENJE CELIČNE KULTURE .....	21
3.2.3 PRESAJANJE CELIČNE KULTURE.....	22
3.2.4 ŠTETJE CELIC .....	22
3.2.5 NASAJANJE CELIC .....	23
3.3 EKSPERIMENTALNO DELO .....	24
3.3.1 TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	24

3.3.2 LUCIFERAZNI TEST .....	25
3.4 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV .....	28
4. REZULTATI .....	29
4.1 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI .....	29
4.2 UČINKI TBB, TBBA, TBPH IN TBMEHP NA ANDROGENSKE IN GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE .....	32
4.2.1 ANTAGONISTIČNI UČINKI NA ANDROGENSKE RECEPTORJE.....	32
4.2.2 AGONISTIČNI UČINKI NA GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE.....	34
4.2.3 ANTAGONISTIČNI UČINKI NA GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE	36
5. RAZPRAVA.....	38
5.1 UČINKI SPOJIN NA ANDROGENSKIH RECEPTORJIH .....	38
5.2 UČINKI SPOJIN NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH.....	40
5.3 MOREBITNE POSLEDICE DELOVANJA SPOJIN NA HORMONSKE RECEPTORJE.....	41
5.4 POVEZAVA UČINKOV SPOJIN Z NIVOJEM OKOLJSKE IZPOSTAVITVE LJUDI.....	43
5.5 PREDLOGI ZA NADALJNE RAZISKAVE.....	46
6. SKLEP .....	48
7. LITERATURA .....	50

## KAZALO SLIK

Slika 1: In vitro metabolizem TBB in TBPH .....	11
Slika 2: Molekulski strukturi DEHP in MEHP .....	13
Slika 3: Strukturni formuli tetrazolijeve spojine MTS in reduciranega formazanskega produkta.....	24
Slika 4: Bioluminiscentna reakcija, ki jo katalizira kresničkina luciferaza.....	26
Slika 5: Rezultati citotoksičnega testa za TBB.....	29
Slika 6: Rezultati citotoksičnega testa za TBPH .....	30
Slika 7: Rezultati citotoksičnega testa za TBBA.....	31
Slika 8: Rezultati citotoksičnega testa za TBMEHP .....	31
Slika 9: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za antagonizem TBB in TBBA na AR ....	33
Slika 10: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za antagonistične učinke TBPH in TBMEHP na AR.....	34
Slika 11: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za agonistične učinke TBB in TBBA na GR.....	35
Slika 12: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za agonistično delovanje TBPH in TBMEHP na GR.....	36
Slika 13: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za antagonistično delovanje TBB in TBPH na GR.....	37

## KAZALO TABEL

Tabela I: Osnovne kemijske lastnosti TBB in TBPH.....	6
Tabela II: Izmerjene koncentracije TBB in TBPH v prostorih iz glavnih študij.....	8
Tabela III: Tabela struktur preiskovanih spojin .....	18
Tabela IV: Koncentracije raztopin preiskovanih spojin, ki smo jih uporabili v luciferaznem testu .....	27
Tabela V: IC <sub>50</sub> vrednosti preiskovanih spojin na AR .....	32
Tabela VI: Vrednosti EC <sub>50</sub> , EC <sub>25</sub> in EC <sub>10</sub> za TBB, TBBA, TBPH in TBMEHP za agonističen učinek na GR .....	34
Tabela VII: Primerjava količin TBB in TBPH, ki so jim bile izpostavljene celice, in ocenjenega vnosa s prahom .....	45



## POVZETEK

Zaviralce gorenja se dodaja v različne materiale za izboljšanje njihove odpornosti na ogenj. Pogosto uporabljeni so bromirani zaviralci gorenja. Zaradi visoke stabilnosti in obsežne uporabe pa so postali svetovni onesnaževalci. Številni delujejo kot endokrini motilci in jih povezujejo z različnimi obolenji, zato je bila uporaba nekaterih že prepovedana. 2-Etilheksil 2,3,4,5-tetrabromobenzoat (TBB) in bis(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalat (TBPH) sta novejša bromirana zaviralca gorenja. O njuni toksičnosti je malo znanega, kar je zaskrbljujoče predvsem zaradi njune velike uporabe in hitrosti, s katero se kopičita v okolju. Zaznali so ju v zraku, po domovih in v živih bitjih. Študij o vplivih na organizme je malo, vendar kažejo, da se TBB in TBPH oziroma njuni metaboliti lahko akumulirajo in negativno vplivajo na zdravje živih bitij.

V magistrski nalogi smo preučili vpliv TBB in TBPH ter njunih znanih metabolitov 2,3,4,5-tetrabromobenzojske kisline (TBBA) in mono(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalata (TBMEHP) na androgenske (AR) in glukokortikoidne (GR) receptorje. Kot modelni sistem smo uporabili celično linijo MDA-kb2, ki izraža AR in GR ter omogoča razlikovanje antagonističnega in agonističnega učinka spojin na posameznem receptorju. Najprej smo z metabolnim MTS-testom določili prvo necitotoksično koncentracijo in območje, v katerem smo nato testirali posamezno spojino. Za določanje aktivnosti na AR in GR smo uporabili luciferazni test, ki temelji na aktivaciji transkripcije gena za luciferazo po vezavi liganda na AR oziroma GR.

Rezultati eksperimentalnega dela kažejo, da nobena od preiskovanih spojin na AR ne deluje agonistično, vse pa so izkazovale signifikantno antagonistično aktivnost. Na GR so signifikanten antagonističen učinek imele vse preiskovane spojine, agonistično pa sta delovala samo TBB in TBPH. Najmočnejše antagonistične oziroma agonistične učinke na obeh receptorjih je imel TBPH, najšibkeje pa je agonistično oziroma antagonistično na GR in AR deloval TBB. Rezultati naše raziskave so zaenkrat edini, ki kažejo, da imajo preiskovane spojine učinke na GR, in prvi, ki dokazujejo vplive TBBA in TBMEHP na androgenski in glukokortikoidni sistem. Potrebne bodo še nadaljnje študije za popolno ovrednotenje tveganja, ki ga preiskovane spojine predstavljajo za zdravje živih bitij.

**Ključne besede:** novejši bromirani zaviralci gorenja, endokrini motilci, androgenski receptorji, glukokortikoidni receptorji

## ABSTRACT

Flame retardants are added to different materials to improve their fire resistance. Brominated flame retardants are commonly used and have become global pollutants because of their high stability and extensive use. Many of them act like endocrine disruptors and are associated with different diseases. Because of this, use of some retardants is already prohibited. 2-Ethylhexyl 2,3,4,5-tetrabromobenzoate (TBB) and bis(2-ethylhexyl) 3,4,5,6-tetrabromophthalate (TBPH) are novel brominated flame retardants. There is scant information about their toxicity which is alarming because of their major use and the rate of their accumulation in the environment. They were detected in the air, houses and biota. There are not many studies on effects on organisms, but these indicate that TBB and TBPH or their metabolites can accumulate and have negative impact on the health of living beings.

In this master thesis we studied effect of TBB and TBPH as well as their known metabolites 2,3,4,5-tetrabromobenzoic acid (TBBA) and mono(2-ethylhexyl) 3,4,5,6-tetrabromophthalate (TBMEHP) on androgen (AR) and glucocorticoid (GR) receptors. We used cell line MDA-kb2 as a model system. It expresses AR and GR and enables distinction of antagonistic and agonistic effect of compounds on specific receptor. First we determined the first non-cytotoxic concentration and range in which we later tested each compound with metabolic MTS test. For determination of activity on AR and GR we used luciferase test which is based on activation of transcription of luciferase gene after ligand binding on AR or GR.

Results of experimental work indicate that on AR none of tested compounds acts agonistic, but all compounds show significant antagonistic activity on AR. All tested compounds had significant antagonistic effect on GR, only TBB and TBPH also acted agonistic. TBPH had the strongest antagonistic and agonistic effects on both receptors, as the weakest agonist and antagonist on GR and AR acted TBB. Results of our study are for now the only one which indicate that tested compounds have effect on GR and the first that demonstrate the impact of TBBA and TBMEHP on androgen and glucocorticoid system. Further studies are needed for complete risk evaluation to the health of living beings of tested compounds.

**Keywords:** novel brominated flame retardants, endocrine disruptors, androgen receptors, glucocorticoid receptors

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ADME	absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija
AMP	adenozin monofosfat
AR	androgenski receptor
ATP	adenozin trifosfat
BFR	bromiran zaviralec gorenja
DEHP	di(2-etilheksil) ftalat
DHT	dihidrotestosteron
DMSO	dimetilsulfoksid
EC <sub>50</sub>	koncentracija, pri kateri spojina doseže 50 % maksimalnega učinka
EC <sub>25</sub>	koncentracija, pri kateri spojina doseže 25 % maksimalnega učinka
EC <sub>10</sub>	koncentracija, pri kateri spojina doseže 10 % maksimalnega učinka
FBS	fetalni goveji serum
FLUT	flutamid
FR	zaviralec gorenja
GR	glukokortikoidni receptor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HC	hidrokortizon
HLM	humani jetrni mikrosomi
IC <sub>50</sub>	koncentracija spojine, ki biološki proces zavre za 50 %
logP	logaritem porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda
MEHP	mono(2-etilheksil) ftalat
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid

---

NADPH	nikotinamid adnenin dinukleotid fosfat
NBFR	novejši bromiran zaviralec gorenja
NOAEL	najvišji testirani odmerek, pri katerem ni opaziti nobenih negativnih učinkov
PBDE	polibromirani difenilni etri
PBS	fosfatni pufer
PCE	prašičja jetrna karboksilesteraza
PES	fenazin etosulfat
PP <sub>i</sub>	pirofosfat
PPAR <sub>α</sub>	s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor α
PPAR <sub>γ</sub>	s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor γ
RU-486	mifepriston
SD	standardna deviacija
t <sub>1/2</sub>	čas, v katerem se količina spojine zmanjša za 50 %
T3	trijodtironin
T4	tiroksin
TBB	2-etilheksil 2,3,4,5-tetrabromobenzoat
TBBA	2,3,4,5-tetrabromobenzojska kislina
TBMEHP	mono(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalat
TBPH	bis(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalat
TT	telesna teža

## 1. UVOD

Ideja o zaščiti materiala pred ognjem sega že v čas pred našim štetjem. Egipčani so okrog 450 let pr. n. š. so uporabljali galun (kovina/amonijak, aluminijev sulfat) za zmanjšanje vnetljivosti lesa. Okrog 200 let pr. n. š. pa so Rimljani zmanjšali gorljivost lesa z mešanico galuna in kisa. [1]

Ogenj lahko povzroči obsežne poškodbe nepremičnin, osebnih stvari in opreme, smrt ali telesne poškodbe ter visoke finančne stroške sanacije. Za zmanjšanje verjetnosti vžiga in nastanka požara ter povečanje možnosti pobega iz gorečega prostora se številnim potrošniškim izdelkom dodajajo zaviralci gorenja. [2]

Zaviralci gorenja (FR) so kemijske snovi, ki izboljšajo odpornost materiala na ogenj. Dodajajo se naravnim in umetnim polimernim snovem, zato da zmanjšajo njihovo dovzetnost za vžig ali omejijo širjenje plamena v primeru vžiga. [2] FR se v materiale dodajajo z namenom ustrežanja standardom, povezanim z gorljivostjo materialov, ki jih predpisujejo organi za standarde, npr. Mednarodna organizacija za standarde (ISO), Mednarodna elektrotehniška komisija (IEC). [3] Uporaba zaviralcev gorenja je močno narasla leta 1975 zaradi uvedbe Tehničnega standarda 117 (*Technical Bulletin 117*) v Kaliforniji. Ta zahteva, da morajo pene v oblazinjenih izdelkih prenesti 12-sekundno izpostavitv majhnemu plamenu. Posledično so številni proizvajalci začeli izdelovati pohištvo z dodanimi zaviralci gorenja, ne glede na to, ali je bilo namenjeno kalifornijskemu trgu ali ostalim delom Amerike. [4] V zadnjih desetletjih pa uporaba FR narašča zaradi velike in raznovrstne uporabe novih polimerov, ki so večinoma gorljivi. [1]

### 1.1 GORENJE IN MEHANIZMI DELOVANJA ZAVIRALCEV GORENJA

Gorenje (*flammability*) materiala je sestavljeno iz štirih faz: predgrevanja, razpada, vžiga in izgorevanja/širjenja (*preheating, decomposition, ignition and combustion/propagation*). V fazi predgrevanja zunanji vir toplote segreva material. Ko je dovolj segret, material začne razpadati, pri čemer nastajajo vnetljivi plinasti produkti. Le-ti pri določeni koncentraciji v prisotnosti zunanjega vira vžiga in kisika povzročijo oksidacijo in vžig materiala. Ob zadostnem nastajanju toplote, ki se izžareva nazaj v material in omogoča njegovo nadaljnje razpadanje, se gorenje širi samo, brez pomoči zunanjega vira toplote. [2]

Zaviranje gorenja se lahko doseže z vplivanjem na katerokoli fazo gorenja. Mehanizmi delovanja zaviralcev gorenja so:

- a) redčenje z inertnim plinom: inertni plin nastane pri razpadu FR in zmanjša koncentracijo kisika ali vnetljivih plinov pod mejo vžiga (npr. kovinski hidroksidi in soli),
- b) hlajenje: endotermni razpad zaviralcev gorenja zniža temperaturo na površini materiala in upočasni gorenje (npr. dušikove spojine, kovinski hidroksidi),
- c) zaščitna plast: zaviralci gorenja tvorijo plast na površini materiala in tako zmanjšajo razpoložljivost polimera za gorenje ali zmanjšajo prenos toplote v material (npr. fosforjeve spojine),
- d) odvajanje toplote: FR delujejo kot toplotni odvodi in zvišajo toplotno kapaciteto polimera (npr. smukec, steklena vlakna),
- e) kemijska reakcija: zaviralci gorenja razpadejo na radikale, ki tekmujejo z radikali v procesu gorenja (npr. halogenirane spojine). [2]

## 1.2 VRSTE ZAVIRALCEV GORENJA

Zaviralce gorenja se dodaja v gorljive materiale, kot so plastika, papir, les in tekstil. Glavni kriteriji za uporabo spojine kot FR je njegova stabilnost tekom življenjske dobe produkta, združljivost s polimerom in zaviranje gorenja. [1] FR se lahko kovalentno vežejo na polimerne molekule med procesom polimerizacije (reaktivni FR) ali pa se nahajajo v prosti obliki med molekulami polimera in se dodajo pred, med ali največkrat po polimerizaciji (aditivni FR). [2]

FR so zelo raznolika skupina kemikalij. Danes jih poznamo več kot 175 vrst. Razdeljeni so v štiri glavne skupine: anorganski, organofosforni, halogenirani in dušik-vsebujoči zaviralci gorenja. [1]

### 1.2.1 ANORGANSKI ZAVIRALCI GORENJA

Ta skupina predstavlja okoli 50 vol. % proizvodnje FR na svetovnem nivoju. Najpogostejši anorganski zaviralci gorenja so aluminijev hidroksid, magnezijev hidroksid, amonijev polifosfat in rdeči fosfor. V to skupino je uvrščen tudi antimonijev (III) oksid, ki se uporablja kot sinergist s halogeniranimi FR. Med gorenjem namreč reagira z njimi,

produkti reakcije pa prekrijejo površino materiala ter preprečijo stik s plamenom in kisikom. [2]

### 1.2.2 ORGANOFOSFORNI ZAVIRALCI GORENJA

Organofosforni zaviralci gorenja predstavljajo približno 20 vol. % svetovne proizvodnje in se uporabljajo predvsem v tekstilnih izdelkih in plastiki. Najpogosteje uporabljeni so fosfatni estri, ki imajo lahko vezane tudi klorove ali bromove atome (npr. tris (1-kloro-2-propil) fosfat). [2]

### 1.2.3 HALOGENIRANI ZAVIRALCI GORENJA

Skupina halogeniranih zaviralcev gorenja predstavlja okoli 25 vol. % vseh FR, njihova proizvodnja pa po ocenah narašča za 5 vol. % na leto. [5] Halogeni radikali, ki nastanejo pri razpadu FR, zavirajo gorenje z lovljenjem radikalov, ki so nujni za širjenje plamena. Kot FR se uporabljajo zgolj klorirane in bromirane spojine, slednje so zaradi boljših lastnosti najpogosteje uporabljene. Fluorirane spojine so namreč močno stabilne in razpadajo pri višjih temperaturah kot gorijo polimeri. Stabilnost jodiranih pa je slaba in razpadejo že pri rahlo povišanih temperaturah. [2]

### 1.2.4 DUŠIK-VSEBUJOČI ZAVIRALCI GORENJA

Uporaba zaviralcev gorenja, ki vsebujejo dušik, je primarno omejena na dušik-vsebujoče polimere (npr. poliuretani, poliamidi), dodajajo pa se tudi v polivinilklorid in zaščitne protipožarne premaze. Najpogosteje uporabljene spojine so melamin in njegove soli. [2]

## 1.3 BROMIRANI ZAVIRALCI GORENJA

Obstaja več kot 75 različnih bromiranih zaviralcev gorenja (BFR), ki so glede na osnovno molekulsko strukturo razdeljeni v tri razrede: alifatske, cikloalifatske in aromatske. Trenutno sta najpogosteje uporabljena tetrabromobisfenol A (TBBP-A), ki ima najvišjo letno proizvodnjo med BFR, in heksabromociklododekan (HBCD). [1] Slednji je bil leta 2013 uvrščen na Stockholmsko listo obstojnih organskih onesnaževalcev in bo v Evropi odvzet iz uporabe do sredine leta 2015. [6, 7]

BFR izkazuje visoko učinkovitost pri lovljenju radikalov, imajo ustrezno temperaturo razpada in so bolj kompatibilni s plastiko kot večina ostalih spojin. [1] Visoka zmogljivost

in ugodna cena se odražata v njihovi vse večji priljubljenosti v proizvodnji. Svetovna uporaba BFR se je namreč med letoma 2001 in 2008 podvojila z 200 000 na 410 000 ton letno. Najpogosteje se dodajajo v gradbene materiale (npr. izolacije), elektronske naprave, pohištvo in prevozna sredstva. V poliuretanskih penah (npr. sedežne garniture in otroški izdelki) BFR predstavljajo do 5 % teže izdelka, v ohišju elektronskih naprav pa njihova vsebnost presega tudi več kot 20 % teže izdelka. Kljub naraščajoči porabi BFR pa je za večino teh spojin znanega le malo o vplivih na okolje in zdravje. [3]

### 1.3.1 PROBLEMATIČNOST BFR

BFR so visoko stabilne in hidrofobne spojine. [1] Zaradi teh lastnosti in obsežne uporabe so postali globalni onesnaževalci. Zaznali so jih po celem svetu v vodi, zraku, prsti, prahu, školjkah, rakih, ribah, ptičih, plazilcih, sesalcih in ljudeh. BFR v okolje prehajajo na različne načine: z emisijo med proizvodnjo, iz izdelkov med uporabo, z izpiranjem iz deponij ali med recikliranjem izdelkov. [3] Predvsem so problematični aditivni BFR, saj niso kovalentno vezani na polimere in posledično hitreje pride do njihovega odpuščanja v okolje. [1] Številni halogenirani FR so že bili prepovedani ali opuščeni zaradi stabilnosti v okolju in toksičnosti. [3]

Proizvajalci pogosto nadomestijo prepovedane spojine s spojinami, ki imajo podobne lastnosti. Leta 1977 so prepovedali uporabo tris(2,3-dibromopropil) fosfata (Tris-BP) v otroških oblačilih, saj se je spojina izkazala za mutageno ter sposobno dermalne absorpcije. Nadomestila jo je klorirana različica tris(1,3-dikloro-2-propil) fosfat (TDCPP), ki so jo proizvajalci zelo kmalu prostovoljno umaknili iz uporabe v otroških oblačilih, saj je bilo zanjo ravno tako ugotovljeno mutageno delovanje. TDCPP se kljub temu še vedno uporablja v poliuretanski peni sedežnih garnitur. Obe spojinini, TDCPP in Trsi-BP, spadata tudi med potencialne človeške karcinogene. [3]

V zadnjem času je bila najbolj aktualna prepoved treh mešanic polibromiranih difenilnih etrov (PBDE). PBDE so bili nekoč najpogosteje uporabljeni zaviralci gorenja v elektronskih napravah, pohištvenih in tekstilnih izdelkih. Nato se je izkazalo, da so te spojine v okolju visoko stabilne in bioakumulativne ter imajo neželene učinke na zdravje. Študije so jih povezale z rakavimi obolenji, endokrinimi motnjami, debelostjo, diabetesom, težavami v razmnoževanju in razvoju živčevja. [4] Mešanici PentaBDE in OktaBDE sta bili leta 2004 prepovedani v Evropi in umaknjeni iz proizvodnje v Združenih državah



Amerike. Leta 2009 sta bili dodani na Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalcih. Mešanica DekabDE je bila v Evropski uniji prepovedana leta 2008, v Ameriki pa je bila njena uporaba postopno opuščena do konca leta 2013. [3]

### 1.3.2 NOVEJŠI BFR

Novejši/alternativni bromirani zaviralci gorenja (NBFR) so bromirani zaviralci gorenja, ki so novi na trgu, ali pa so bili na novo zaznani v okolju. Njihova letna proizvodnja naj bi po ocenah obsegala 180 000 ton. Med NBFR se uvršča 21 do sedaj znanih spojin, kot so 1,2-bis(pentabromodifenil)etan (DBDPE), 1,2-bis(2,4,6-tribromofenoksi)etan (BTBPE), 2-etilheksil 2,3,4,5-tetrabromobenzoat (TBB), bis(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalat (TBPH) in heksaklorociklopentadienildibromo-ciklooktan (HCDBCO). [5]

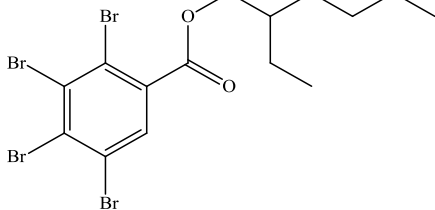
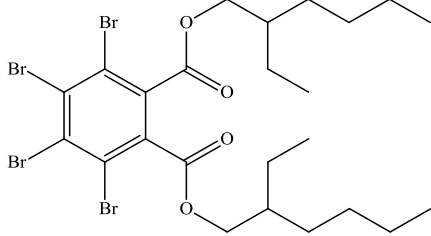
NBFR so predvsem nadomestili prepovedane Penta-, Okta- in DekabDE. Nedavne študije so poročale o prisotnosti NBFR v notranjem in zunanem okolju, v prahu, zraku in organizmih. [5] Številne spojine imajo podoben potencial za bioakumulacijo, obstojnost in prenos po ozračju na velike razdalje kot PBDE. Kljub temu je o njihovih okoljskih koncentracijah in toksičnih učinkih znanega malo. [8] Evropska unija je leta 2006 uvedla nov predpis o ocenjevanju potencialnih problematičnih kemijskih spojin preko že obstoječega sistema Registracije, vrednotenja in avtorizacije kemikalij (REACH), ki zbira informacije o fizikalno-kemijskih in toksičnih lastnostih spojin pred njihovo odobritvijo za prodajo. Znotraj REACH ima za toksične kemikalije in kemikalije z visoko stopnjo proizvodnje pomembno vlogo Evropska agencija za kemikalije (ECHA), ki vodi evidenco o njihovi proizvodnji, obstojnosti, zračnem prenosu na dolge razdalje in bioakumulaciji. Na podlagi teh kriterijev je zaskrbljujočih več BFR. [1]

## **1.4 2-ETILHEKSIL 2,3,4,5-TETRABROMOBENZOAT (TBB) IN BIS(2-ETILHEKSIL) 3,4,5,6-TETRABROMOFTALAT (TBPH)**

TBPH se uporablja v polivinilkloridu, neoprenu, izolacijah kablov, hrbitiščih preprog in tapetah. Skupaj s TBB sestavlja mešanico Firemaster 550, ki je nadomestila PentaBDE v poliuretanskih penah oblazinjenega pohištva, otroške opreme (npr. oblazinjenih stolčkih, blazinah za dojenje), notranje opreme letal in avtomobilov. [3, 5] Firemaster 550 poleg TBB (35 %) in TBPH (15 %) vsebuje še fosfatne zaviralce gorenja (50 %). TBB (70 %) in TBPH (30 %) najdemo še v mešanici BZ-54. TBPH je tudi komponenta mešanice DP-45,

ki deluje tudi kot plastifikator. Proizvajalec vseh treh mešanic je Chemtura. [1, 3, 8] Osnovne kemijske lastnosti TBB in TBPH so navedene v tabeli I.

Tabela I: Osnovne kemijske lastnosti TBB in TBPH. [9–11]

Kemijska spojina	TBB	TBPH
Molekulska struktura		
CAS število	183658-27-7	26040-51-7
Molekulska masa	549.93	706.14
Topnost v vodi (mg/L, 25 °C)	$1.14 \times 10^{-5}$	$1.98 \times 10^{-9}$
LogP	8.8	12.0
$t_{1/2}$ v vodi (dan, 25 °C, pH 7)	/	29

Obe spojini spadata med kemikalije z visokim volumnom proizvodnje. Izdelava TBPH je v letih 1990–2006 v ZDA obsegala 450–4500 ton letno, po letu 2006 ni več podatkov. Informacij o proizvodnji TBB ni. [5, 8] Kljub temu, da se TBPH in TBB uporabljata v velikih volumnih, obstaja malo študij o njihovih neželenih učinkih na zdravje živali ali ljudi. [3] Leta 2005 je Agencija za varstvo okolja (EPA) v Združenih državah Amerike mešanici Firemaster 550 pripisala nizko do zmerno tveganje za zdravje ljudi, nizko stopnjo obstojnosti in bioakumulacije. Ta ocena je bila verjetno narejena zgolj na podlagi strokovne presoje, saj dokumentacija ni vsebovala podatkov o karcinogenosti, nevrotoksičnosti, kronični in subkronični toksičnosti, vplivih na razvoj in reprodukcijo ...

Pomanjkanje teh informacij je zaskrbljujoče predvsem zaradi hitrosti, s katero se spojini kopičita v okolju. Po nekaterih ocenah naj bi se koncentracija TBPH in TBB v okolju podvojila v enem oziroma dveh letih. [4]

## 1.5 POJAVNOST TBB IN TBPH

TBB in TBPH sta bila detektirana v različnih okoljih. Koncentracije v zraku notranjih prostorov so višje kot v zunanjem zraku, kar nakazuje na njuno odpuščanje iz potrošniških izdelkov. Prisotnost v zraku in prahu notranjih prostorov predstavlja možno pot izpostavitve za človeka. Njuno prisotnost so določili tudi v živalih (ribah, ptičih in sesalcih), kar nakazuje, da se spojini lahko absorbirata in bioakumulirata. TBB in TBPH se verjetno lahko prenašata po zraku na dolge razdalje, saj so ju zaznali tudi na Arktiki. [1]

### 1.5.1 NEŽIVA NARAVA

#### 1.5.1.1 Zrak

TBB in TBPH sta v zraku zaznana zelo pogosto (> 60 %) v Ameriki, Evropi, Aziji, Afriki in Avstraliji, kar nakazuje, da sta svetovno razširjena onesnaževalca. Na področju ameriških Velikih jezer sta bila zaznana v večini zračnih vzorcev, in sicer v fazi delcev. V plinasti fazi nista bila prisotna. Najvišje določene koncentracije so bile  $55 \text{ pg/m}^3$  TBB in  $290 \text{ pg/m}^3$  TBPH, povprečen delež TBB glede na TBPH pa je bil 0.45, kar je manj kot v Firemaster 550 (0.77). TBPH je bil detektiran pogosteje in pri višjih koncentracijah kot TBB. Verjetno se zaradi višjega logP bolj obsežno veže na delce. V mestih so bile njune izmerjene koncentracije višje kot na podeželju. Ocenjeni čas podvojitve koncentracije obeh spojin skupaj je bil 1–2 leti. [12, 13] TBB in TBPH sta bila zaznana tudi v kanadskem delu Arktike in na Tibetanski planoti, ki se smatrata za odročni območji brez lokalnih onesnaževalcev. Prisotnost spojin je verjetno posledica prenosa po zraku. Povprečne koncentracije TBB in TBPH so bile  $0.74$  in  $0.80 \text{ pg/m}^3$  na Arktiki ter  $0.54$  in  $0.38 \text{ pg/m}^3$  v Tibetu. Njuno razmerje je bilo spremenjeno v primerjavi z razmerjem v Firemaster 550. [14]

#### 1.5.1.2 Prah

Glavne študije, ki so določale koncentracijo TBB in TBPH v prahu notranjih prostorov, in njihovi rezultati so predstavljeni v tabeli II. TBB in TBPH sta bila v najvišjih koncentracijah določena v dnevni sobah. [15] Zaznali so ju tudi v letalih, kjer so bile

koncentracije podobne kot po domovih. [16] Izmerjene koncentracije TBB in TBPH v prahu notranjih prostorov zelo variirajo med posameznimi študijami. To je verjetno posledica uporabe različnih količin in različnih BFR v izdelkih ter razlik v spektru uporabe posamezne spojine. [17]

Tabela II: Izmerjene koncentracije TBB in TBPH (ng/g prahu) v prostorih iz glavnih študij.

Okolje	Spojina	Pojavnost %	Mediana	Minimalna konc.	Maksimalna konc.
Domovi, Boston [15]	TBB	95	322 <sup>a</sup>	< 6.6	15030
	TBPH	100	234 <sup>a</sup>	3.0	10630
Domovi, Boston [18]	TBB	44	840 <sup>a</sup>	< 450	75000
	TBPH	60	650 <sup>a</sup>	< 300	47110
Učilnice, Anglija [19]	TBB	92	25	< 2	289
	TBPH	97	96	< 2	6175
Domovi, Belgija [19]	TBB	31	1	< 2	436
	TBPH	97	13	< 2	5004
Pisarne, Belgija [19]	TBB	67	7	< 2	31
	TBPH	100	64	16	265
Obrat za odpadke, Tajska [20]	TBB	95	13	< 2	59
	TBPH	100	180	79	1300
Domovi, Boston [21]	TBB	47	409 <sup>a</sup>	/	72460
	TBPH	63	377 <sup>a</sup>	/	47110
Domovi, Nemčija [17]	TBB	40	< 3.0	< 3.0	13.6
	TBPH	100	343	25	2274

<sup>a</sup> podana je geometrična sredina

#### 1.5.1.3 Prst in sediment

TBB in TBPH sta bila detektirana v blatu iz čistilnih naprav, ki se vse pogosteje uporablja kot s hranili bogat dodatek v kmetijstvu. Posledica bi lahko bila prevzem teh spojin v

poljščine in vstop v prehransko verigo. TBPH in TBB sta bila določena v koncentracijah do 1631 in 3749 ng/(g suhe teže). [22] Spojini sta bili zaznani tudi v Južni Afriki, ki v zadnjih letih s širjenjem ekonomije doživlja tudi tehnološki razvoj. TBB in TBPH sta bila v različnih vzorcih sedimentov detektirana v 91 in 60 %, njune koncentracije pa so segale do 13900 in 899 ng/(g celokupnega organskega ogljika). [6]

Študije, ki so ugotovile, da se razmerje TBB : TBPH v okolju razlikuje od tistega v mešanicah Firemaster 550 in BZ-54 [12–15, 19, 22, 23], so predvidevale, da je neenakost posledica dodatnega vira TBPH iz mešanice DP-45 ali razlike v hitrosti odpuščanja posameznega FR iz končnih produktov. Kot tretjo možnost so podale razliko v hitrosti razgradnje v okolju, ki je zelo verjetna, saj so v umetnem vodnem okolju zaznali hitrejšo razgradnjo TBB v primerjavi s TBPH. To sta potrdila določena razpolovna časa v fazi delcev, ki sta 9 dni za TBB in 25 dni za TBPH. [24]

## 1.5.2 ŽIVA NARAVA

### 1.5.2.1 Ribe, mehkužci

V vzorcu 22 rib iz petih Velikih jezer in dveh kanadskih jezer je bila povprečna koncentracija TBB 0.029 ng/(g mokre teže), povprečna koncentracija TBPH pa 0.060 ng/(g mokre teže). [9] Spojini sta bili zaznani tudi v školjkah (*Corbicula fluminea*) in vodnih polžih (*Elimia proxima*) pri izpustu čistilne naprave proizvajalca tekstila. TBB je bil v mehkužcih detektiran le direktno pri izpustu, a v zelo visokih koncentracijah, do 2220 ng/(g maščobe). TBPH je bil pri izpustu določen v koncentracijah do 1370 ng/(g maščobe), v mehkužcih pa so ga detektirali še 44.6 km nižje od izpusta. [7]

### 1.5.2.2 Ptiči

Pri progastokljunem galebu (*Larus delawarensis*) iz območja južno od Velikih jezer so zaznali TBPH v 89 % in TBB v 11 % vzorcev. TBPH se je v jetrih nahajal v zelo visokih koncentracijah, v povprečju 58.3 ng/(g maščobe), koncentracija TBB pa je segala do 8.64 ng/(g maščobe). V plazmi spojini nista bili detektirani. [25] V študiji, ki je preučevala deponije kot vir bioakumulativnih zaviralcev gorenja, so prisotnost BFR določali pri navadnih škorcih (*Sturnus vulgaris*), ki prebivajo na področju odlagališč. TBPH so določili v 47 % vzorcev s koncentracijami do 550 ng/(g maščobe). [26]

### 1.5.2.3 Sesalci

Na prisotnost TBB in TBPH so analizirali mast indopacifiškega belega delfina (*Sousa chinensis*) in brezplavutega svinjeka (*Neophocaena phocaenoides*). TBB je bil prisoten v 12 % vzorcev v območju < 0.04–70 ng/(g maščobe). TBPH je bil detektiran v 40 % vzorcev, koncentracije pa so bile v območju < 0.04–3859 ng/(g maščobe). Vrednost razmerja TBB : TBPH je variirala med 0.0003 in 3. [27] TBPH so našli tudi v dlaki hišnih ljubljencev. Prisotnost TBPH pri mačkah je bila višja kot pri psih, verjetno zaradi počasnejšega metabolizma ali večje izpostavljenosti mačk preko hrane ali zaužitja/vdihovanja prahu. V mačji dlaki je bil TBPH prisoten 0.2–1.65 ng/(g dlake), pri psih pa 0.2–0.8 ng/(g dlake). [28]

Prvo in zaenkrat edino prisotnost TBPH pri ljudeh so določili Songjie in sodelavci [29] pri prebivalcih province Shandong, kjer je glavna proizvodnja halogeniranih FR na Kitajskem. TBPH je bil zaznan v serumu ene same skupine testirancev in očitno z njim še ni prišlo do večje kontaminacije prebivalcev te regije. Prisoten je bil v skupini žensk starih 30–39 let v koncentraciji 260 ng/(g serumskih lipidov). [29]

## 1.6 RAZGRADNJA

Razgradnja spojin lahko poteka v kemijskih ali bioloških procesih, posledica pa je sprememba njihove strukture in s tem tudi lastnosti. Pri razgradnji lahko namreč nastanejo (še bolj) toksične in bioakumulativne spojine. [1]

### 1.6.1 FOTOKEMIJSKI RAZPAD

Razpad pod vplivom svetlobe so preučevali Stapleton in sodelavci. [30] Ugotovili so, da se TBB in TBPH pod vplivom svetlobe razgradita počasneje kot dekaBDE, verjetno zaradi manjšega vpliva aromatskega dela. Novejša FR sta fotolitično očitno lahko bolj obstojna v okolju kot nekateri že prepovedani PBDE. Fotoliza je pri TBB potekala hitreje kot pri TBPH, verjetno zaradi večje sterične oviranosti slednjega. [30] Razpad obeh spojin poteka z direktno fotolizo [31] do produktov z manjšim številom bromidnih atomov. TBB je razpadel na tribromiran analog in dva izomera dibromiranega analoga. V masnem spektru so bili prisotni še signali drugih, neznanih razgradnih produktov. Fotoliza TBPH je potekla do nastanka treh tribromiranih in dveh dibromiranih analogov, večina je imela odcepljeni

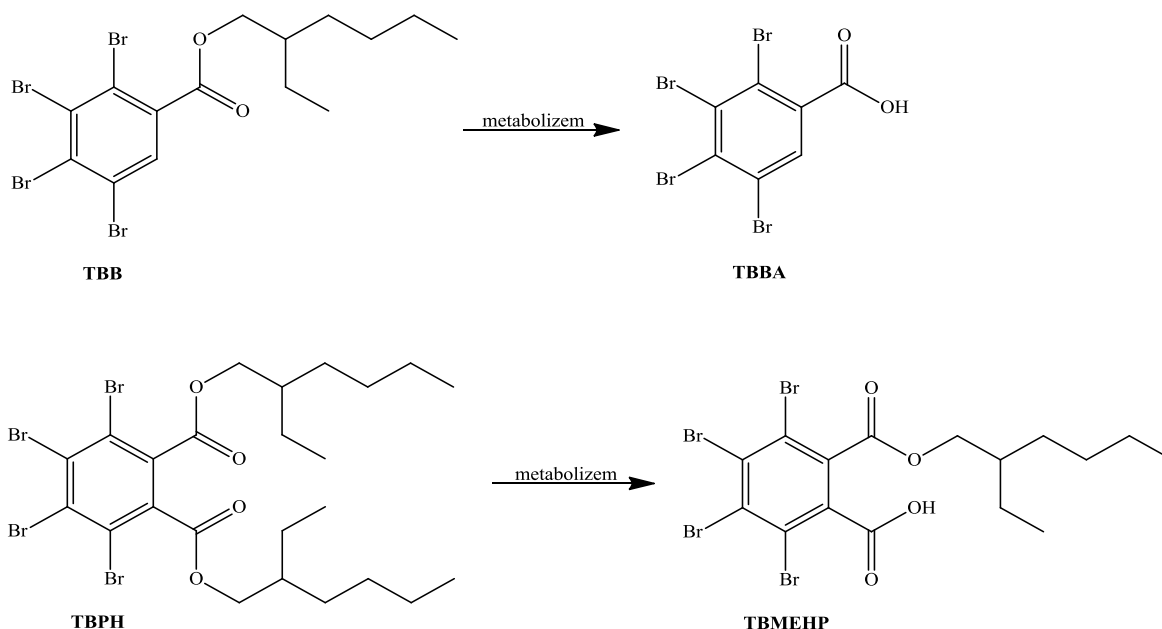
tudi obe alkanski verigi. [30] Pri preučevanju usode TBPH v vodnem okolju so detektirali tudi tribromirani anhidrid, ki nastane po hidrolizi obeh estrskih skupin. [24]

Strukture identificiranih fotokemijskih razgradnih produktov TBB in TBPH niso znane, vendar nakazujejo, da preučevana NBRF pod vplivom svetlobe podležeta zaporedni reaktivni debrominaciji. [30]

### 1.6.2 IN VITRO METABOLIZEM

Poznavanje mehanizma metabolizma spojin je pomembno za napoved njihovega razpolovnega časa ter razgradnih produktov, ki so lahko mediatorji toksičnosti spojin. [32]

Roberts in sodelavci [32] so metabolizem TBB in TBPH predvideli na podlagi poznane metabolizma di(2-etilheksil) ftalata (DEHP). DEHP je nebromirani analog TBPH, ki se presnavlja s hidrolizo etilheksilne skupine do monoestra, mono(2-etilheksil) ftalata (MEHP). Hidrolizo vezi katalizirajo lipaze in esteraze. Metabolizem TBB in TBPH so v študiji preučevali s človeškimi jetrnimi mikrosomi (HLM) in prašičjo jetrno karboksilesterazo (PCE), s katero so potrdili hidrolizo z esterazami.



Slika 1: In vitro metabolizem TBB in TBPH. [32]

TBB se je metaboliziral hitro tako s HLM kot PCE do glavnega metabolita, 2,3,4,5-tetrabromobenzojske kisline (TBBA). Pri HLM niso zaznali nobenih metabolitov ali spremembe koncentracije TBPH. V prisotnosti PCE se je počasi hidroliziral do mono(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalata (TBMEHP). Hidroliza estrske vezi je bila 100-krat počasnejša kot pri DEHP, kar je verjetno posledica steričnega oviranja bromidnih atomov na aromatskem obroču TBPH. Pri preučevanju II. faze metabolizma (sulfatiranje, glukuronidacije, konjugacije z glutationom) niso detektirali nobenega metabolita II. faze ali sprememb koncentracije TBBA in TBMEHP. [32]

Rezultati študije so pomembno pripomogli k vpogledu v usodo in potencialno toksičnost TBB in TBPH. Metabolizem TBB zmanjša potencial za njegovo bioakumulacijo, vendar ima za posledico nastanek nove spojine. Toksični učinki TBBA niso znani, uporabljala pa bi se lahko kot biomarker izpostavljenosti TBB. TBPH ima verjetno daljši biološki razpolovni čas kot TBB, saj je bolj odporen na encimsko hidrolizo. Njegov metabolizem je lahko tudi hitrejši, saj so karboksilesteraze razširjene po različnih organih in tkivih organizma, v katerih se lahko kopiči tudi TBPH. Metabolit TBMEHP pa je lahko nosilec toksičnosti. [32]

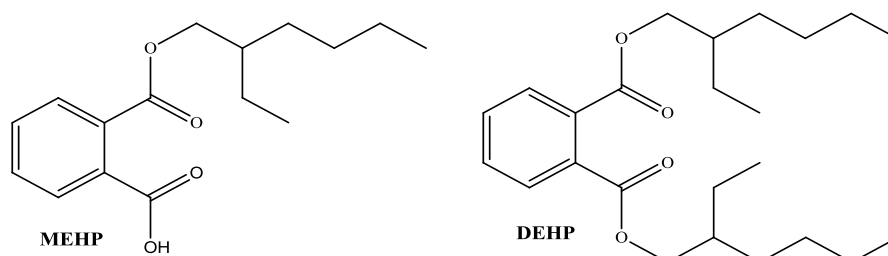
## 1.7 TOKSIČNOST TBB IN TBPH

Agencija za varstvo okolja (EPA) v Združenih državah je pri študijah kronične toksičnosti TBPH na podganjih modelih za najvišji odmerek, ki ne povzroči neželenih učinkov, (NOAEL) določila 223 mg/kg TT/dan. V študiji akutne toksičnosti pri podganah enkratna izpostavitve 5000 mg/kg TT TBPH ni povzročila smrti, navzven vidnih sprememb in sprememb pri obdukciji. [11] Chemtura je na poziv EPA izvedla študiji reproduktivne in razvojne toksičnosti Firemaster 550 in za obe postavila NOAEL 50 mg/kg TT/dan. [33] Patisaul in sodelavci [33] so ugotovili, da ima mešanica Firemaster 550 neželene učinke na endokrini sistem podgan v odmerku 100 µg/dan. Takemu dnevni odmerku je človek lahko izpostavljen preko hišnega prahu (najvišja določena količina TBB in TBPH v prahu skupaj je bila 124 µg/g prahu) in je mnogo nižji od NOAEL, ki ga je določila Chemtura.

TBB in TBPH sta strukturno podobna spojinam, za katere je znano, da se absorbirajo, metabolizirajo in imajo negativne učinke na organizem. Nebromiran analog TBB je 2-etilheksil benzoat, ki je rahlo toksičen in je dovoljen kot prehranski dodatek. [32] DEHP je nebromiran analog TBPH in se v organizmu metabolizira v toksični MEHP, ki je znan



razvojni, reproduktivni in endokrini motilec. [8, 32] MEHP je strukturno podoben TBB in TBMEHP. Ker je malo podatkov o toksičnosti TBB in TBPH, so študije njihovih analogov pomemben vir informacij o potencialnih neželenih učinkih. [10]



Slika 2: Molekulski strukturi DEHP in MEHP. [10]

### 1.7.1 IZPOSTAVLJENOST LJUDI

Firemaster 550 je druga najpogostejša mešanica zaviralcev gorenja v poliuretanski peni. Študije so zaznale njegovi komponenti TBB in TBPH v različnih okoljih. [33] Ljudje smo FR izpostavljeni predvsem preko prahu v domovih, avtomobilih in na delovnih mestih. Glavni način vnosa v telo je iz rok v usta, predvsem pri otrocih. Pri njih so namreč določili pozitivno korelacijo med prisotnostjo TBB na rokah in v prahu domov kot tudi povezavo med starostjo in pogostostjo umivanja rok s količino TBB na rokah. Drugi možni poti vnosa sta vdihovanje delcev in dermalna absorpcija. [11, 34] Ker so prisotnost TBB in TBPH zaznali v ribah in mehkužcih, bi bil možen vnos tudi s hrano.

Na podlagi količine zaužitega prahu in izmerjenih koncentracij zaviralcev gorenja so Ali in sodelavci [19] grobo ocenili njihovo dnevno izpostavljenost. Po ocenah naj bi otroci stari 1–5 let povprečno zaužili 50–200 mg prahu/dan, odrasli pa 20–50 mg prahu/dan. Otroci tako pri visokem vnosu prahu povprečno na dan zaužijejo 0.08 ng/kg TT TBB in 0.40 ng/kg TT TBPH, odrasli pa 0.01 ng/kg TT TBB in 0.02 ng/kg TT TBPH. [19] Podobne vrednosti dnevnega vnosa TBB so dobili tudi Fromme in sodelavci. Za TBPH pa so določili veliko višji dnevni vnos, 0.35 ng/kg TT za odrasle in 4.06 ng/kg TT za otroke. [17]

### 1.7.2 AKUMULACIJA TBB IN TBPH

Prva študija, ki je preučevala akumulacijo TBB in TBPH, je bila izvedena na črnoglavem pisancu (*Pimephales promelas*). [10] Študija je pokazala, da pri izpostavljenosti rib hrani, ki vsebuje TBB (330–430 µg/dan) in TBPH (150–180 µg/dan), pride do njune absorpcije

in minimalne akumulacije (zgolj 1 % dnevnega odmerka po dvomesečni izpostavitvi). Obseg absorpcije je neznan, a je verjetno zaradi velikosti in lipofilnosti molekul slabši kot pri DEHP, ki se absorbira okrog 70-odstotno. Predvsem pri TBB na delež akumulacije vpliva tudi metabolizem, saj se spojina zelo hitro hidrolizira. Novejša študija je kopičenje komponent Firemaster 550 preučevala v tkivih podgan in njihovih mladičih po skotitvi. [33] Pri podganah ženskega spola so TBB zaznali v jetrih, mišicah, možganskem in adipoznem tkivu. V slednjem so bile izmerjene najvišje koncentracije. TBPH je bil detektiran le v jetrih, kjer so zaznali tudi TBBA. TBMEHP ni bil detektiran. Pri mladičih so zaznali le TBB v adipoznem tkivu, kar nakazuje na možnost transplacentalnega prehoda ali prenosa preko materinega mleka.

## 1.7.4 UČINKI NA HORMONSKI SISTEM

### 1.7.4.1 Učinki na steroidne hormone

TBPH in TBB na kvasovkah nista izkazovala agonističnih učinkov na androgenskih receptorjih. TBPH je deloval od odmerka odvisno receptorsko antiandrogensko, TBB pa je le šibko zavrl receptorje. Na estrogenskih receptorjih sta obe spojini delovali šibko antagonistično in od odmerka odvisno. [8] Spojini imata tudi od receptorjev neodvisne učinke na steroidne hormone. TBPH lahko zviša produkcijo testosterona, ta učinek pa je nasproten kot pri njegovemu analogu DEHP, ki povzroči upad koncentracije preko aktivacije PPAR $\alpha$ . Sintezo estradiola sta inducirala oba, TBB šibko. TBPH predvsem poveča ekspresijo encimov, ki usmerjajo steroidogenezo v produkcijo spolnih hormonov (npr. CYP11A1). TBB pa ima večji vpliv na izražanje encimov, ki vodijo steroidogenezo v večjo sintezo kortikosteroidnih hormonov (npr. CYP21A1). [8, 35] Metabolit TBMEHP pri izpostavitvi *in utero* ni imel vpliva na tvorbo testosterona v testisih podganjega ploda. Povzročil pa je povečanje števila večjedrnih zarodnih celic, kar privede do deformacije semenskih kanalčkov zarodka. Ta učinek je značilen za MEHP in druge ftalate. [11]

### 1.7.4.2 Učinki na ščitnične hormone

Pri človeku koncentracija trijodtironina (T3) pozitivno korelira s koncentracijo TBPH v hišnem prahu. [21] Pri izpostavitvi podgan metabolitu TBMEHP pa je prišlo do upada serumskega T3. TBMEHP morda moti delovanje ščitnice na podoben način kot MEHP, saj je pri obeh značilna negativna povezava med koncentracijo spojine in serumskimi vrednostmi T3. Znižanje T3 je lahko posledica zaviranja encima dejodinaze, ki pretvarja

tiroksin (T4) v T3, za katero je značilen hiter padec serumskih vrednosti T3 in postopen dvig T4. [11] Dvig serumskega T4 (za 64 %) so opazili pri brejih podganah po izpostavitvi mešanici Firemaster 550, verjetno zaradi zaviranja encimov, odgovornih za metabolizem T4. Zaviralni učinek TBB in TBPH na dejodinazo namreč ni bil opažen. Hipertiroidizem pri nosečnicah povezujejo s povečanim tveganjem za splav, nizko porodno težo, mrtvorojenost in preklampsijo ter večjo občutljivostjo potomcev na stres. [33]

### 1.7.5 UČINKI NA JETRA

Na črnoglavem pisancu so preučevali poškodbe DNA po izpostavitvi mešanicama BZ-54 in Firemaster 550. Povečana izguba integritete DNA, ki je bila reverzibilna, je bila zaznana v jetrnih celicah, kjer poteka njun metabolizem. Mehanizem poškodbe DNA ni znan, lahko pa bi TBB, TBPH ali njuna metabolita delovali kot agonisti PPAR ali kinaz, kar privede do oksidativnega stresa. Ta mehanizma sta namreč dokazana za DEHP in PBDE, ki so strukturno sorodne spojine. [10] Pri podganah, izpostavljenim mešanici Firemaster 550, so zaznali zmanjšano aktivnost jetrne karboksilesteraze. Spremenjena aktivnost bi lahko imela za posledico podaljšanje razpolovnega časa TBB in TBPH, saj je ta encim direktno udeležen v njunem metabolizmu. [33] Izpostavitvev podgan TBMEHP je povzročila spremembe serumskih jetrnih encimov (znižana alkalna fosfataza, zvišana alanin transferaza), kar je kazalo na poškodbo jeter. Histopatološke preiskave so pokazale prisotnost apoptoze in proliferacije hepatocitov. Verjeten mehanizem hepatotoksičnosti TBMEHP je preko aktivacije PPAR $\alpha$ , ki je značilen tudi za MEHP. TBPH *in vitro* ni deloval na PPAR $\alpha$ . [11]

### 1.7.6 OSTALI TOKSIČNI UČINKI

Študije na podganah so pokazale, da Firemaster 550 (izpostavljenost 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{dan}$ ) verjetno pripomore k razvoju debelosti in metabolnega sindroma ter vpliva na spremembo vedenja. Pri podganah ženskega spola je zvišano telesno maso spremljala glukozna intoleranca, zmanjšana aktivnost, povečana anksioznost in hitrejši nastop pubertete. Pri moških podganah je debelost spremljal zvišan bazalni nivo glukoze v krvi, odebeljena stena levega ventrikla in spremenjeno raziskovalno vedenje, ki je značilno za prekomerno težke osebkke. [33] Z razvojem debelosti je verjetno povezan TBMEHP in ne TBPH, saj metabolit *in vitro* stimulira diferenciacijo adipocitov in adipogenezo preko aktivacije PPAR $\gamma$ , a manj učinkovito kot MEHP. TBPH ne izkazuje učinkov na PPAR $\gamma$ . [11]

## 2. NAČRT DELA

Uporaba zaviralcev gorenja sega daleč v preteklost, vendar njihova uporaba drastično narašča šele v zadnjih desetletjih. Številne spojine, ki se uporabljajo za zaviranje gorenja, so bioakumulativne, kar je zaskrbljujoče zaradi nepoznavanja njihovih negativnih učinkov na živali in ljudi, predvsem pri novejših bromiranih zaviralcih gorenja.

V magistrski nalogi bomo kot potencialne hormonske motilce testirali dva novejša zaviralca gorenja TBB in TBPH ter njuna hidrolizirana metabolita TBBA in TBMEHP. Navedena zaviralca gorenja se v industriji obsežneje uporabljata šele v zadnjem desetletju, zato jima še ni bilo posvečeno veliko pozornosti in je znanega le malo o njihovih vplivih in usodi v okolju in organizmih. Odločili smo se, da bomo v okviru magistrske naloge v *in vitro* sistemu raziskali agonistične in antagonistične učinke navedenih spojin na androgenskih (AR) in glukokortikoidnih receptorjih (GR). Za modelni sistem smo izbrali celično linijo MDA-kb2, ki hkrati izraža funkcionalne ter endogene AR in GR, saj še nobena do sedaj objavljena študija ni ugotavljala vpliva preiskovanih spojin na navedeni celični liniji in GR.

Eksperimentalni del bomo začeli z MTS testom, s katerim bomo v območju izbranih koncentracij testiranih spojin določili njihovo mejno, necitotoksično koncentracijo. Prva necitotoksična koncentracija bo v naslednjem testu, tako imenovanem luciferaznem testu, predstavljala najvišjo koncentracijo testiranega območja. Z luciferaznim testom bomo določili agonistične in antagonistične učinke spojin na AR in GR. Za razlikovanje agonističnega in antagonističnega učinka na specifičnem receptorju (AR ali GR) bomo pri posameznem testu spojine dodajali v določenem zaporedju s časovnim zamikom pol ure. Pri testiranju antagonističnega delovanja na določenem receptorju bomo celicam najprej dodali preiskovano spojino, čez pol ure pa bomo dodali še spojino, ki je znan agonist preiskovanega receptorja. Pri testiranju AR antagonizma je to dihidrotestosteron (DHT), pri GR antagonizmu pa hidrokortizon (HC). Prišlo bo do potencialne kompeticije med preiskovano spojino in dodanim receptorskim agonistom za vezavo na receptor. Antagonističen učinek testirane spojine se bo izrazil v zmanjšanju jakosti učinka dodanega agonista na preiskovanem receptorju. Pri testiranju agonističnega delovanja izbranih spojin na določenem receptorju bomo z znanim antagonistom zasedli receptor, ki nas trenutno ne bo zanimal. Pri testiranju GR agonizma bomo najprej dodali flutamid (FLUT), ki je antagonist AR, po pol urni inkubaciji pa še preiskovane spojine, ki bodo svoje učinke

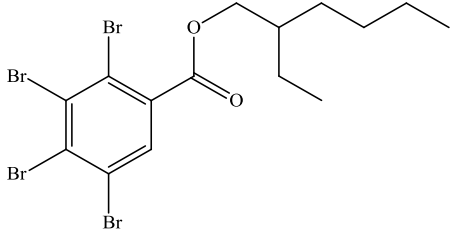
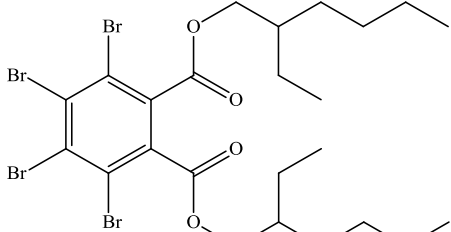
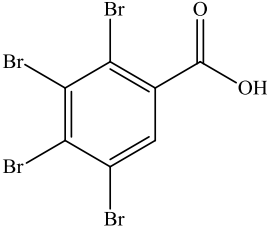
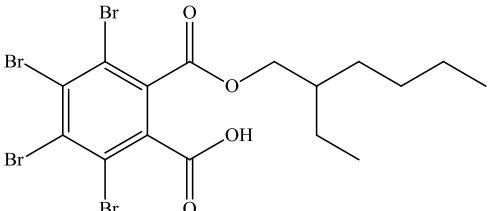
zaradi zasedenosti AR izrazile zgolj preko GR. Pri testiranju agonizma na AR pa bomo najprej dodali mifepriston (RU-486), ki je antagonist GR. Po inkubaciji bomo dodali še preiskovane spojine, ki se bodo vezale le na AR.

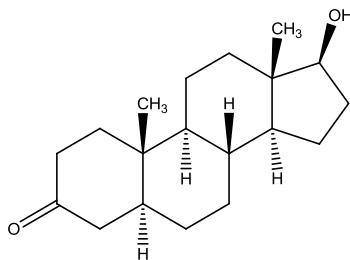
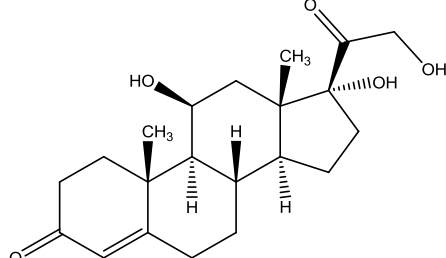
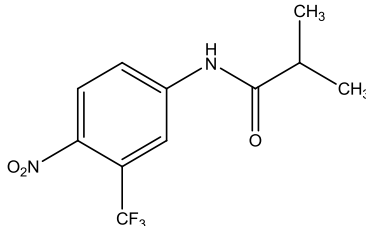
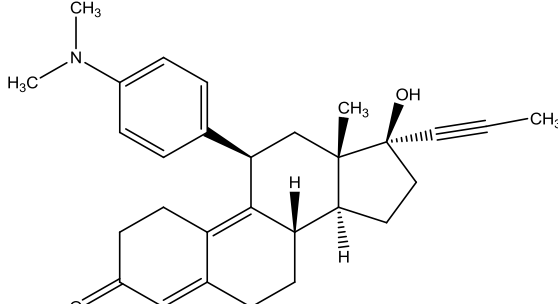
### 3. MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 TESTIRANE SPOJINE

Učinek na AR in GR smo preučevali pri spojinah TBB, TBPH, TBBA in TBMEHP. Pri luciferaznem testu smo kot kontrolne spojine uporabili DHT, HC, FLUT in RU-486. V tabeli III so navedene molske mase, strukturne formule, CAS številke, stopnje čistosti in proizvajalci vseh uporabljenih spojin. TBBA in TBMEHP sta bila sintetizirana in analitsko ovrednotena na Fakulteti za farmacijo.

Tabela III: Tabela struktur preiskovanih spojin. Poleg imena vsake spojine je navedena njena oznaka, CAS številka, molska masa, stopnja čistosti v odstotkih ter proizvajalec spojine.

<p>2-etilheksil 2,3,4,5-tetrabromobenzoat (<b>TBB</b>), CAS <u>183658-27-7</u>, 549.92 g/mol, 95 %, TRC, Kanada</p>	
<p>Bis(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalat (<b>TBPH</b>), CAS <u>26040-51-7</u>, 706.14 g/mol, 97 %, TRC, Kanada</p>	
<p>2,3,4,5-tetrabromobenzojska kislina (<b>TBBA</b>), CAS <u>27581-13-1</u>, <math>\geq 98</math> %, 437.71 g/mol</p>	
<p>Mono(2-etilheksil) 3,4,5,6-tetrabromoftalat (<b>TBMEHP</b>), CAS <u>61776-60-1</u>, <math>\geq 98</math> %, 593.92 g/mol</p>	

<p>Dihidrotosteron (<b>DHT</b>), CAS <u>521-18-6</u>, 290.44 g/mol, <math>\geq 97.5</math> %, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	
<p>Hidrokortizon (<b>HC</b>), CAS <u>50-23-7</u>, 362.46 g/mol, <math>\geq 98</math> %, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	
<p>Flutamid (<b>FLUT</b>), CAS <u>13311-84-7</u>, 276.21 g/mol, <math>\geq 99</math> %, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	
<p>Mifepriston (<b>RU-486</b>), CAS <u>84371-65-3</u>, 429.59 g/mol, <math>\geq 98</math> %, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	

### 3.1.1 PRIPRAVA VZORCEV SPOJIN

Založne raztopine testnih in kontrolnih spojin smo pripravili v epicah v 1000-krat višjih koncentracijah od najvišje dejanske testirane koncentracije. Spojine smo natehtali na analitski tehtnici (model A6245; Mettler Toledo, Švica) in raztopili v 99.9 % DMSO (Sigma-Aldrich, ZDA). Nato smo založne raztopine 1000-krat razredčili z gojitvenim medijem. Pri pripravi nižjih koncentracij smo za redčenje uporabili 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju. Končna koncentracija DMSO je v vseh raztopinah znašala 0.1 % (v/v) in ni delovala citotoksično.

### 3.1.2 DOLOČITEV OBMOČIJ TESTNIH KONCENTRACIJ

Kontrolni spojini DHT in HC smo testirali v koncentracijah, ki na receptorjih izbrane celične linije dosežejo 50 % maksimalnega učinka ( $EC_{50}$ ).  $EC_{50}$  vrednost za DHT (agonist na AR) znaša 0.5 nM, za HC (agonist na GR) pa 500 nM. Kontrolni FLUT in RU-486 smo testirali pri najnižji koncentraciji, pri kateri dosežeta maksimalno zaviranje receptorskega učinka agonista DHT oziroma HC pri  $EC_{50}$ . Ta koncentracija znaša 5  $\mu$ M za FLUT (antagonist na AR) in 100  $\mu$ M za RU-486 (antagonist na GR).

Preiskovane spojine smo v luciferaznem testu testirali pri sedmih koncentracijah, ki so obsegale  $\mu$ M in nM koncentracijsko območje. Območje je bilo smiselno izbrano, saj se spojine v naravi nahajajo v nizkih koncentracijah in takšne koncentracije so tudi zanimive za toksikološke raziskave. TBB smo testirali v območju 100–0.50  $\mu$ M, TBBA 125–0.75  $\mu$ M, TBMEHP 75–0.25  $\mu$ M ter TBPH 50–0.10  $\mu$ M. Najvišja testna koncentracija je bila prva koncentracija, ki na celice ni delovala citotoksično. TBPH smo začeli testirati pri 50  $\mu$ M koncentraciji zaradi težav s topnostjo.

### 3.2 OSNOVNE METODE DE LA S CELIČNO KULTURO

V magistrski nalogi smo za delo uporabili celično linijo MDA-kb2 (ATCC, Nemčija), ki jo uvrščamo med adherentne celične linije. Celična linija MDA-kb2 je bila pridobljena s stabilno transfekcijo človeških epiteljskih celic raka dojke linije MDA-MB-453. Slednje izražajo funkcionalne endogene AR in GR, v majhnem obsegu še estrogenske receptorje  $\beta$ . Celicam MDA-MB-453 so vstavili reporterski gen luciferase-neo, ki je pod nadzorom promotorja mišjega sesalskega tumorskega virusa (MMTV), ki se odziva na aktivacijo AR in GR. Celična linija MDA-kb2 ima številne prednosti, zaradi katerih smo jo tudi izbrali za delo:

- nezahtevno gojenje in vzdrževanje celic,
- stabilno izražanje luciferaznega reporterja preko 80 pasaž,
- možnost hitrega izvajanja testov (v 24 urah),
- ponovljivost, občutljivost in nizka variabilnost,
- možnost razlikovanja delovanja spojin na AR in GR. [36, 37]

Delo s celicami je potekalo v aseptičnem prostoru v komori z laminarnim pretokom zraka (Iskra, Šentjernej, Slovenija). V LAF komori smo pred pričetkom dela za 15–20 minut



prižgali UV-luč, nato smo delovno površino dezinficirali še s 70 % etanolom. Ves material, ki smo ga potrebovali pri delu, smo dobro prebrisali s 70 % etanolom, preden smo ga postavili v komoro. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice, ki smo jih pred vstopom v komoro prav tako dezinficirali s 70 % etanolom. Sterilizacijo nekaterih materialov (npr. epic, pipetnih nastavkov) smo izvedli v parnem sterilizatorju Laboklav 25 (SHP Steriltechnik AG, Nemčija).

### 3.2.1 ODMRZOVANJE CELIČNE LINIJE

Celice linije MDA-kb2 so bile shranjene v zamrzovalniku (MDF-U54V; Sanyo, Japonska) pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V krioviali (TPP, Švica) je bilo 1.5 mL suspenzije celic s koncentracijo  $5 \times 10^6$  celic/mL, ki smo jo hitro (1–2 min) odtajali na vodni kopeli pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tako da je v viali ostalo še nekaj ledenih kristalov. V 10 mL centrifugirko (TPP, Švica) smo dali 9 mL gojitvenega medija ter vanj prenesli odmrznjene celice. Vsebino smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min (Tehtnica, Slovenija). Nato smo odstranili in zavrgli supernatant ter resuspendirali celice v sedimentu v 5 mL svežega gojitvenega medija. Tako smo odstranili krioprotektant, 10 % DMSO, ki je citotoksičen. Suspenzijo smo nato prenesli v sterilno gojitveno posodo, dodali še 5 mL medija in celice inkubirali.

### 3.2.2 GOJENJE CELIČNE KULTURE

Celice MDA-kb2 smo gojili v sterilnih gojitvenih posodah s površino  $75\text{ cm}^2$  (plastenke T oblike s perforiranim zamaškom; TPP, Švica), pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in brez  $\text{CO}_2$  v inkubatorju tipa BB 6060 O2 (Kendro Heraeus, Nemčija). Pred vsakim delom in po njem (npr. menjavi medija, presajanju) smo pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Olympus CKX41; Olympus, Japonska) preverili izgled celične linije.

Osnova gojitvenega medija celične kulture je Leibovitz L-15 medij (Sigma-Aldrich, Nemčija). Za pripravo 500 mL gojitvenega medija smo potrebovali:

- 6.9 g L-15 medija,
- 500 mL prečiščene vode,
- 50 mL (10 %) fetalnega govejega seruma (FBS; Gibco, ZDA),
- 5 mL (1 %) antibiotika – 10000 U/mL penicilina in 10000  $\mu\text{g/mL}$  streptomocina (Sigma-Aldrich, ZDA).

Pripravljen medij smo na koncu vakuumsko filtrirali preko sistema Filtermax-rapid (TPP, Švica) z velikostjo por 0.22  $\mu\text{m}$ . Gojitveni medij smo hranili v hladilniku pri 4 °C (Gorenje, Slovenija) in ga pred uporabo na vodni kopeli ali v inkubatorju segreli na približno 37 °C. Celicam smo medij običajno menjali na dva do tri dni, oziroma glede na njegovo obarvanost. Medij namreč vsebuje pH indikator fenol rdeče, ki je pri fiziološkem pH rdeče-rožnate barve. V primeru zakisanja se gojitveni medij obarva oranžno do rumeno, pri alkalnih pogojih pa postane vijolične barve.

### 3.2.3 PRESAJANJE CELIČNE KULTURE

Celično kulturo smo razdelili na subkulture, ko so celice dosegle približno 80-odstotno razraščeno na gojišču. Pred presajanjem smo na vodni kopeli segreli gojitveni medij in 10-krat s HBSS (brez Ca, Mg in fenol rdečega; Gibco, ZDA) razredčen tripsin (Sigma-Aldrich, Nemčija), slednji omogoči odlepljenje celic s površine posode. Najprej smo iz posode s celicami odstranili gojitveni medij ter celice dobro sprali s 5 mL fosfatnega pufru (PBS; Gibco, ZDA). Pufer smo nato odstranili in celicam dodali 5 mL razredčenega tripsina ter jih inkubirali 5 minut pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> (inkubator MCO-18AIC; Sanyo, ZDA). Med čakanjem smo pripravili 15 mL centrifugirko s 5 mL svežega medija in 1.5 mL epico z 80  $\mu\text{L}$  tripan modrega (Sigma-Aldrich, Nemčija). Po inkubaciji smo celice s površine posode odlepili še fizično s spiranjem s serološko pipeto (TPP, Švica). Odlepljene celice smo prenesli v pripravljeno centrifugirko, premešali ter v epico s tripan modrim prenesli 80  $\mu\text{L}$  suspenzije. Suspenzijo celic v centrifugirki smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min. Med čakanjem smo na hemocitometru prešteli celice. Po končanem centrifugiranju smo odstranili in zavrgli supernatant, celicam dodali 5 mL svežega medija in jih nežno resuspendirali z vibracijskim mešalnikom. Suspenzijo celic smo nato prenesli v dve novi gojitveni posodi v takem volumnu, da je bilo končno število 1.0–1.5 x 10<sup>6</sup> celic/posodo. Celicam smo dodali še 7–8 mL svežega medija in jih inkubirali.

### 3.2.4 ŠTETJE CELIC

Celice smo šteli v postopku presajanja in nasajanja, saj smo morali izračunati volumen celične suspenzije, ki je vsebovala določeno število živih celic za presaditev oziroma nasaditev. Za štetje celic smo uporabili vitalno barvilo tripan modro, ki prodre samo v mrtve celice preko uničene celične membrane in jih obarva modro. Žive celice ostanejo

nepobarvane in jih pod mikroskopom vidimo kot bele pike na modri podlagi. Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra (Brand, Wertheim, Nemčija).

V epico smo odpipetirali 80  $\mu\text{L}$  suspenzije celic in 80  $\mu\text{L}$  tripan modrega ter vsebino homogeno premešali. Suspenzijo smo nanegli na hemocitometer in pod invertnim svetlobnim mikroskopom prešteli žive celice v dveh kvadrantih. Celice smo šteli v dveh paralelah. Povprečno število celic smo izračunali po formuli:

$$\frac{(A + B + C + D)}{4} \cdot R \cdot \frac{V_s}{V_h}$$

- A, B, C, D ... število celic v posameznem kvadrantu
- R ... faktor redčenja; v našem primeru je imel vrednost 2
- $V_h$ ... volumen kvadranta, v katerem smo šteli celice, ima vrednost  $10^{-4}$  mL ( $1 \text{ mm} \cdot 1 \text{ mm} \cdot 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$ )
- $V_s$  ... volumen suspenzije, v kateri določamo število celic

### 3.2.5 NASAJANJE CELIC

Celice smo nasajali na mikrotitrne plošče z 96 vdolbinami. Pri testu citotoksičnosti smo uporabili prozorne plošče tipa 92096 (TPP, Švica), pri luciferaznem testu pa bele Microlon Lumitrac 600 (Greiner bio-one, Avstrija).

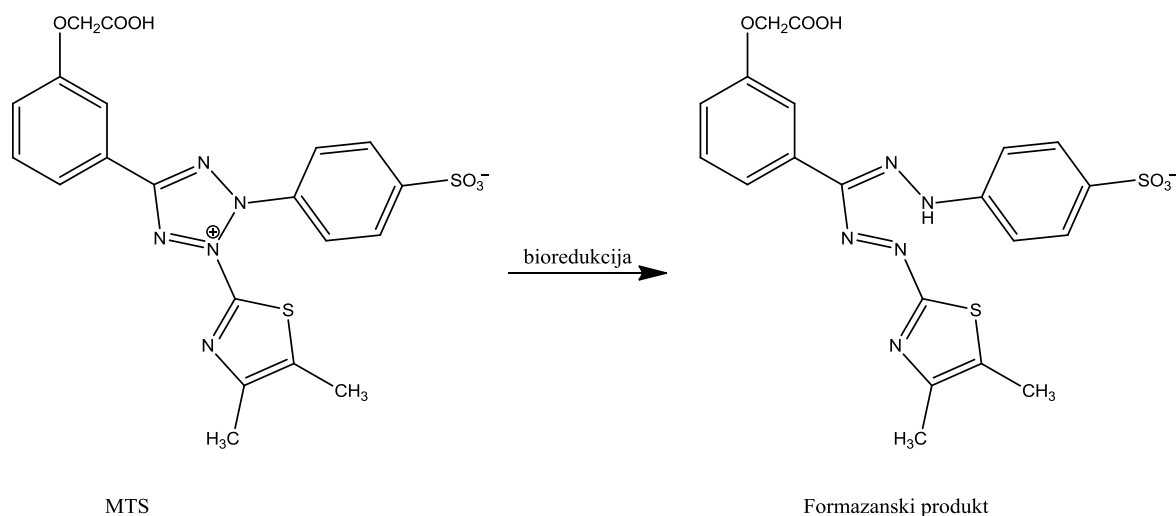
Postopek nasajanja celic je bil do koraka, ko smo resuspendirali celice v 5 mL svežega medija (suspenzija  $C_1$ ), enak kot pri presajanju. Za nasajanje smo nato morali pripraviti suspenzijo z  $10^5$  celic/mL (suspenzija  $C_2$ ). Iz koncentracije celic v suspenziji  $C_1$  smo izračunali volumen te suspenzije, ki je vseboval potrebno število celic za vse testne vdolbine. Dobljenemu volumnu suspenzije  $C_1$  smo za pripravo suspenzije  $C_2$  nato dodali še potrebno količino svežega gojitvenega medija. Z avtomatsko multikanalno pipeto (Biohit, Finska) smo nato v vdolbine prenesli po 100  $\mu\text{L}$  celične suspenzije  $C_2$ . Vsaka vdolbina je tako vsebovala  $10^4$  celic. Pri luciferaznem testu smo vdolbine brez celic napolnili še s 100  $\mu\text{L}$  PBS.

### 3.3 EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.3.1 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Za testiranje preživetja celic po tretiranju s preiskovanimi spojinami smo izbrali metabolni citotoksični test, tako imenovani MTS test. Gre za kolorimetrično metodo, ki na podlagi merjenja encimske aktivnosti omogoča določitev števila živih celic. Za testiranje smo uporabili komercialni test CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent, ki vsebuje tetrazolijevo spojino 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol (MTS) v obliki soli in fenazin etosulfat (PES), ki omogoča prenos elektronov.

V metabolično aktivnih celicah dehidrogenazni encimi tvorijo reducirajoče spojine (NADH ali NADPH) in s pomočjo PES reducirajo MTS v obarvan formazan, ki je topen v gojitvenem mediju (slika 3). Količino formazanskega produkta določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 490 nm in je direktno sorazmerna s številom živih celic v celični kulturi. [38, 39]



Slika 3: Strukturni formuli tetrazolijeve spojine MTS in reduciranega formazanskega produkta. [39]

Za izvedbo testa smo potrebovali naslednje reagente:

- gojitveni medij,

- DMSO, 99.9 % (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- založne raztopine preiskovanih spojin v 99.9 % DMSO; 200 mM TBB, TBPH in TBBA, 175 mM TBMEHP,
- MTS reagent, CellTiter 96®AQ<sub>ueous</sub> One Solution Reagent (Promega, ZDA).

TBB in TBBA smo testirali pri 200, 175, 150, 125 in 100  $\mu$ M koncentracijah, TBMEHP pa pri 175, 150, 125, 100 in 75  $\mu$ M koncentracijah. TBPH smo na citotoksičnost testirali pri koncentraciji 50  $\mu$ M. Pri 100 nM smo testirali še HC in 0.5 nM DHT. Kot kontrole smo uporabili mešanico gojitvenega medija in 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju v volumskem razmerju 1 : 1 (slepi vzorec), raztopino 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju (kontrola topila) in gojitveni medij (negativna kontrola).

MTS test je potekal tri dni. Prvi dan smo nasadili celice na mikrotitrne plošče in jih inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 37 °C brez prisotnosti CO<sub>2</sub>. Drugi dan smo celicam odstranili gojitveni medij in jim dodali 100  $\mu$ L raztopine preiskovanih in kontrolnih spojin (stimulirane celice) oziroma kontrole topila in gojitvenega medija (nestimulirane celice). V vdolbinah brez celic pa smo pripravili slepi vzorec. Po 24-urni inkubaciji (tretji dan) smo v vse vdolbine (s celicami in brez njih) dodali 10  $\mu$ L MTS reagenta, inkubirali celice 3 ure in nato s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, ZDA) izmerili absorbanco pri 490 nm. Absorbanca slepega vzorca (brez celic) je predstavljala absorbanco ozadja. Vrednost slepega vzorca smo odšteli od absorbanco stimuliranih in nestimuliranih celic, dobljene vrednosti pa normalizirali na nestimulirane celice v 0.1 % DMSO.

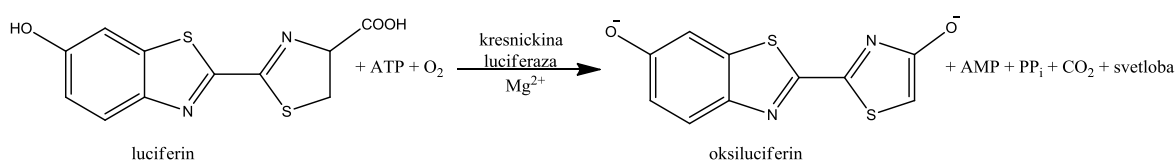
### 3.3.2 LUCIFERAZNI TEST

Aktivacija AR oziroma GR ima v celici za posledico kaskado dogodkov, ki privedejo do sinteze specifičnih proteinov, odgovornih za različne biološke učinke. Endogene ali eksogene spojine lahko z vezavo na receptorje spodbujajo izražanje proteinov (agonistično delovanje) ali pa ga zavirajo (antagonistično delovanje). V *in vitro* testih se delovanje spojin preko receptorjev določa preko merljivih parametrov, ki so neposredno povezani z jakostjo delovanja oziroma s koncentracijo spojine. Aktivnost spojine se določi relativno glede na specifično kontrolo.

Za določanje učinkov preiskovanih spojin na AR in GR smo izbrali luciferazni test, ki temelji na izražanju reporterskega gena za kresničkino luciferazo. Reporterski gen je

uravnavan s promotorskim zaporedjem, na katero se po vezavi liganda veže dimer AR oziroma GR, ki deluje kot transkripcijski faktor. Stopnja aktivnosti encima luciferaze je pokazatelj učinka preiskovanih spojin na AR oziroma GR. Prednost luciferaznega testa je predvsem v njegovi enostavnosti in visoki občutljivosti. [40]

Aktivnost kresničkine luciferaze (*firefly luciferase*) se meri z bioluminiscentno reakcijo, v kateri kot substrat nastopa luciferin (slika 4). Encim v prisotnosti kisika, ATP in magnezijevega iona katalizira oksidacijo luciferina do oksiluciferina. Oksiluciferin je sprva v vzbujenem stanju, pri prehodu v osnovno stanje pa odda energijo v obliki svetlobe. [41]



Slika 4: Bioluminiscentna reakcija, ki jo katalizira kresničkina luciferaza. [40]

Za izvedbo testa smo potrebovali naslednje reagente:

- gojitveni medij,
- DMSO, 99.9 % (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- PBS (Gibco, ZDA),
- založne raztopine preiskovanih spojin v 99.9 % DMSO; TBB 100 mM, TBBA 125 mM, TBMEHP 75 mM, TBPH 50 mM,
- izhodni lizirni pufer Reporter Lysis 5X Buffer (RLB; Promega, ZDA),
- luciferazni reagent Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate (Promega, ZDA).

Preiskovane spojine smo testirali pri koncentracijah, navedenih v tabeli IV. Za negativno kontrolo smo uporabili gojitveni medij, za kontrolo topila pa raztopino 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju. Kombinaciji FLUT/DHT in RU-486/HC sta služili kontroli antagonist, kombinacija HC/FLUT pa kontroli agonista.

Tabela IV: Koncentracije raztopin preiskovanih spojin, ki smo jih uporabili v luciferaznem testu.

<b>Spojina</b>	<b>Koncentracija (<math>\mu\text{M}</math>)</b>						
TBB	100	75	50	25	1.0	0.75	0.50
TBBA	125	100	75	50	25	1.0	0.75
TBMEHP	75	50	25	1.0	0.75	0.50	0.25
TBPH	50	25	1.0	0.75	0.50	0.25	0.10

Luciferazni test je potekal tri dni. Prvi dan smo na mikrotitrne plošče nasadili celice in jih inkubirali 24 ur v inkubatorju brez  $\text{CO}_2$  pri  $37^\circ\text{C}$ . Drugi dan smo odstranili gojitveni medij in celicam dodali raztopine preiskovanih spojin oziroma kontrol. Celicam smo glede na posamezen test dodajali raztopine v določenem vrstnem redu s polurnim zamikom (inkubacija pri  $37^\circ\text{C}$  brez prisotnosti  $\text{CO}_2$ ):

- test agonističnega delovanja na GR: najprej smo dodali  $50\ \mu\text{L}$  raztopine FLUT (antagonist AR), inkubirali 30 minut in nato dodali še po  $50\ \mu\text{L}$  raztopin preiskovanih spojin oziroma kontrol (0.1 % DMSO, gojitveni medij, HC),
- test antagonističnega delovanja na GR: najprej smo dodali po  $50\ \mu\text{L}$  raztopin preiskovanih spojin oziroma kontrol (0.1 % DMSO, gojitveni medij, RU-486), inkubirali pol ure in nato dodali še  $50\ \mu\text{L}$  raztopine HC (agonist GR),
- test antagonističnega delovanja na AR: najprej smo dodali po  $50\ \mu\text{L}$  raztopin preiskovanih spojin oziroma kontrol (0.1 % DMSO, gojitveni medij, FLUT), inkubirali 30 minut in nato dodali še  $50\ \mu\text{L}$  DHT (agonist AR)

Po dodatku vseh raztopin je sledila 24-urna inkubacija. Tretji dan smo iz vdolbin odstranili vse raztopine, celice sprali s  $100\ \mu\text{L}$  PBS. Po odstranitvi PBS smo v vsako vdolbino dodali  $20\ \mu\text{L}$  lizirnega pufra (predhodno s sterilno vodo 5-krat redčen izhodni RLB). Mikrotitrne plošče smo nato prenesli v zamrzovalnik (Sanyo, Japonska) na  $-80^\circ\text{C}$  in jih zamrznili do naslednjega dne ali izvedli 4-urni postopek zamrzovanja in odmrzovanja (celice zamrznemo za 1 uro, nato jih 1 uro odtajamo na sobni temperaturi, sledi ponovno enourno zamrzovanje ter odtajanje 1 uro). Po odtajanju smo v vdolbine dodali po  $35\ \mu\text{L}$  luciferaznega reagenta in takoj pomerili luminiscenco s čitalcem mikrotitrskih ploščic.

Izmerjene intenzitete signalov smo normalizirali na intenziteto luminiscence celic, izpostavljenih 0.1 % DMSO.

### 3.4 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Pridobljene rezultate smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost meritev vsaj treh neodvisnih ponovitev vsakega testa. Vsakič smo preiskovane spojine pri določeni koncentraciji in kontrole testirali vsaj v duplikatu. Z dvostranskim Studentovim t-testom smo primerjali rezultate vzorčnih skupin (preiskovane spojine) in kontrole (0.1 % DMSO v gojitvenem mediju). Odstopanja od kontrole so bila statistično značilna, kadar je bila verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 5 % (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Za grafično predstavitev rezultatov smo meritve normalizirali glede na kontrolo, katere vrednost smo vzeli za 100 %. Normaliziranim povprečnim vrednostim smo določili še standardne deviacije, ki so morale biti  $< 20$  %. Rezultate luciferaznega testa smo obdelali s programom GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., ZDA), v katerem smo narisali krivulje odvisnosti odziva od koncentracije spojine in določili vrednost  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  in  $EC_{10}$  oziroma  $IC_{50}$ .

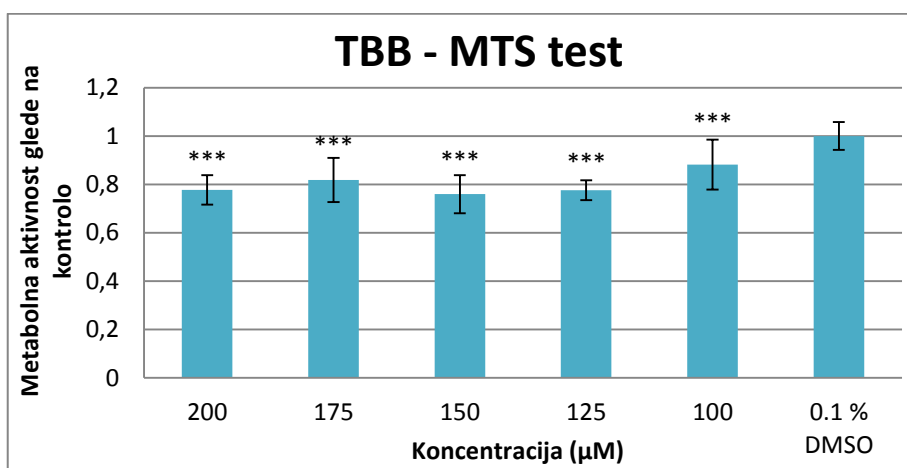


## 4. REZULTATI

### 4.1 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

Z MTS testom smo želeli določiti koncentracije, pri katerih preiskovane spojine ne delujejo toksično na celice. Preiskovane spojine smo testirali v območju petih koncentracij, izjema je bil TBPH. Citotoksičnost posamezne raztopine preiskovanih spojin smo določili z normalizacijo vrednosti absorbanc stimuliranih celic glede na celice, ki so bile izpostavljene 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju. Najnižji povprečni vrednosti 0.1 % DMSO z upoštevanjem standardne deviacije smo odšteli 10 % in tako dobili mejo citotoksičnega delovanja. Le-ta je imela vrednost 0.84. Vse koncentracije, pri katerih so rezultati relativne metabolne aktivnosti nižji od meje citotoksičnosti, pa so citotoksične. Prvo dobljeno necitotoksično koncentracijo posamezne spojine smo vzeli za zgornjo mejo testiranega koncentracijskega območja v luciferaznem testu.

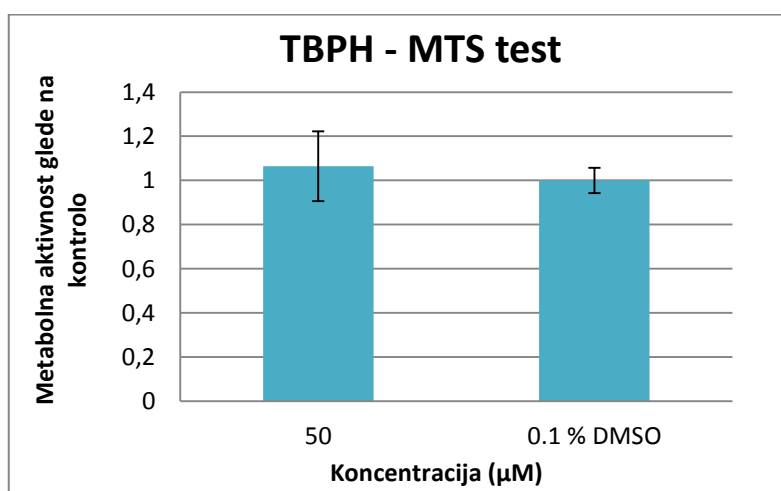
Kot kontroli smo na vsaki mikrotitrski plošči sočasno testirali vpliv gojitvenega medija in 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju na rezultate testa. Absorbanci obeh kontrol sta bili približno enaki. Tako smo potrdili predpostavko, da DMSO pri 0.1 % ne deluje citotoksično na linijo MDA-kb2 in njegova uporaba pri pripravi raztopin spojin ni problematična.



Slika 5: Rezultati citotoksičnega testa za TBB. Podane so povprečne vrednosti relativnih metabolnih aktivnosti ( $\pm$  SD).

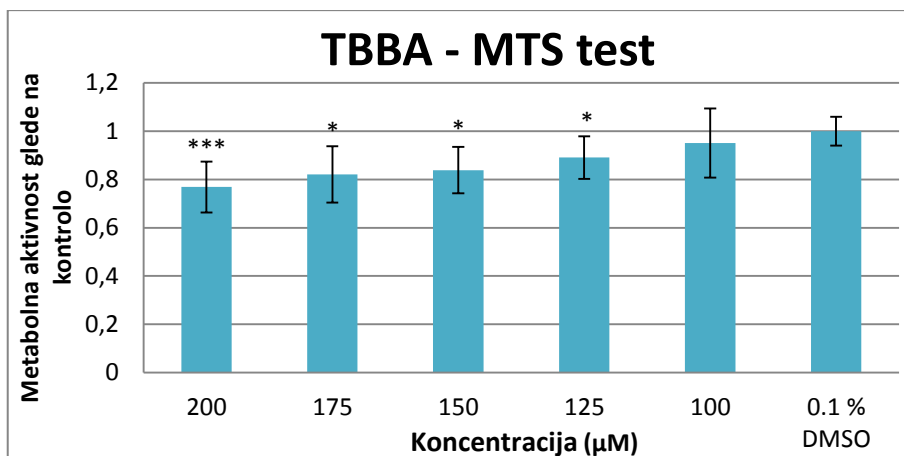
Rezultati MTS testa za spojino TBB so predstavljeni na sliki 5. TBB se je kot citotoksična izkazala pri vseh koncentracijah, razen pri 100  $\mu\text{M}$ . Pri tej koncentraciji je bila metabolna aktivnost glede na 0.1 % DMSO 0.882, zato je bila primerna za nadaljnje testiranje v luciferaznem testu.

TBPH je z vidika topnosti problematičen v primerjavi z ostalimi preiskovanimi spojinami. Za testiranje citotoksičnosti smo izbrali 50  $\mu\text{M}$  koncentracijo, saj smo pri tej vrednosti zagotovili njegovo popolno raztapljanje. Ker je bila ta koncentracija veliko nižja od testiranih koncentracij ostalih spojin, je bila tudi edina, ki smo jo testirali v MTS testu. TBPH pri 50  $\mu\text{M}$  ni izkazoval citotoksičnega učinka, izmerjena vrednost metabolične aktivnosti celic je bila namreč 1.06 (slika 6).



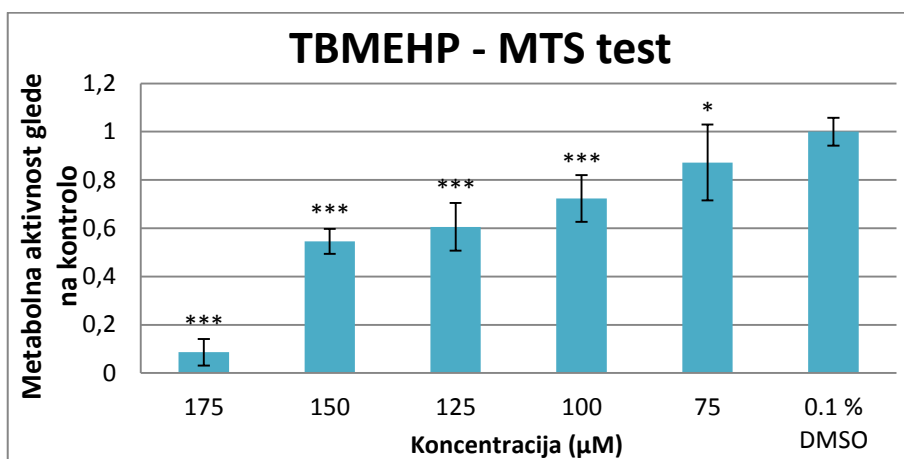
Slika 6: Rezultati citotoksičnega testa za TBPH. Podane so povprečne vrednosti relativnih metabolnih aktivnosti ( $\pm$  SD).

TBBA se je za citotoksično izkazala pri 200, 175 in 150  $\mu\text{M}$  koncentracijah, kjer je bila metabolna aktivnost 0.769, 0.821 in 0.839. Za nadaljnje testiranje smo vzeli 125  $\mu\text{M}$  raztopino, ki je imela metabolno aktivnost 0.891. S histograma na sliki 7 je razviden trend zniževanja citotoksičnega delovanja TBBA s padanjem njene koncentracije.



Slika 7: Rezultati citotoksičnega testa za TBBA. Podane so povprečne vrednosti relativnih metabolnih aktivnosti ( $\pm$  SD).

175  $\mu$ M raztopina TBMEHP se je izkazala za zelo toksično, saj je bila vrednost metabolne aktivnosti pri tej koncentraciji zgolj 0.09. S padanjem koncentracije spojine je metabolna aktivnost celic rastle (slika 8), tako je pri 150  $\mu$ M znašala 0.546, pri 125  $\mu$ M 0.605 in pri 100  $\mu$ M 0.723. Pri 75  $\mu$ M je aktivnost celic presegla mejo zadostne metabolične aktivnosti, znašala je 0.872, zato smo jo izbrali za izhodišče nadaljnje testiranja.



Slika 8: Rezultati citotoksičnega testa za TBMEHP. Podane so povprečne vrednosti relativnih metabolnih aktivnosti ( $\pm$  SD).

## 4.2 UČINKI TBB, TBBA, TBPH IN TBMEHP NA ANDROGENSKE IN GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE

Androgensko in glukokortikoidno delovanje preiskovanih spojin smo testirali z luciferaznim reporterskim sistemom. Najprej smo izvedli presejalne teste za posamezen učinek na AR in GR. Pokazalo se je, da nobena izmed spojin ne izraža signifikantnega agonističnega delovanja na AR, zato le-tega nismo vključili v nadaljnja podrobnejša testiranja. Antagonistični učinki spojin na AR oziroma GR so določeni glede na jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenkega oziroma glukokortikoidnega agonista. Vsi rezultati so podani relativno glede na kontrolo, 0.1 % DMSO v gojitvenem mediju.

### 4.2.1 ANTAGONISTIČNI UČINKI NA ANDROGENSKE RECEPTORJE

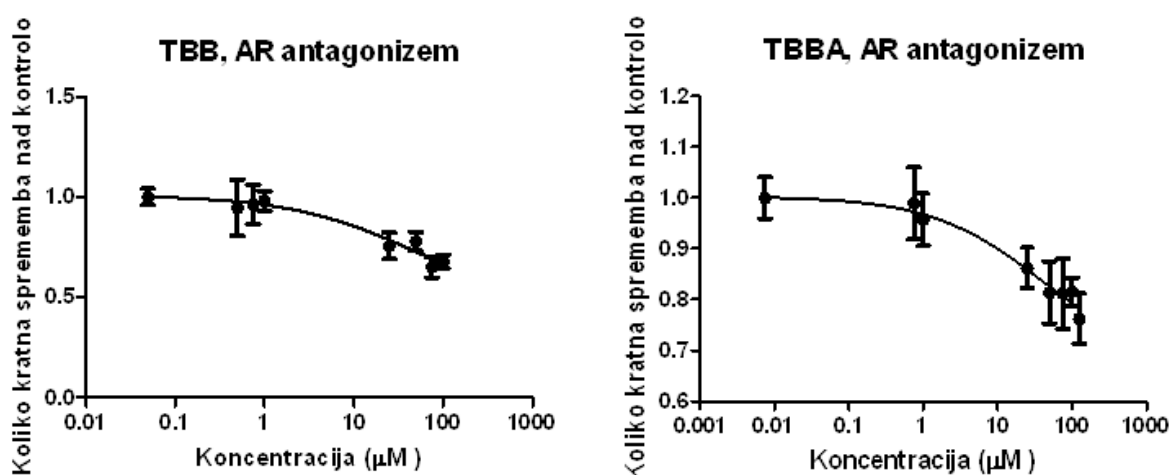
Antagonističen učinek na AR je bil določen po 24-urni izpostavitvi celic preiskovanim spojinam. Sposobnost zaviranja receptorja je bila določena glede na zmanjšanje učinka hkrati dodanega androgenkega agonista DHT pri 0.5 nM koncentraciji ( $EC_{50}$  na celični liniji MDA-kb2). Kontrolna raztopina je tudi vsebovala 0.5 nM DHT. Vse preiskovane spojine so izkazovale signifikantno antiandrogensko delovanje pri najmanj štirih testiranih koncentracijah. Vrednosti  $IC_{50}$  glede na 0.5 nM DHT so za vse spojine navedene v tabeli V.

Tabela V:  $IC_{50}$  vrednosti preiskovanih spojin na AR. Koncentracije so podane v  $\mu M$ .

Spojina	$IC_{50}$
TBB	47.6
TBBA	40.7
TBPH	0.15
TBMEHP	1.14

TBB je signifikatno zmanjšal luciferazno aktivnost pri 100, 75, 50 in 25  $\mu\text{M}$  koncentracijah. Določene relativne aktivnosti luciferaze pri teh koncentracijah so bile 0.68, 0.65, 0.78 in 0.76. Pri nižjih koncentracijah učinek ni bil signifikantno različen od kontrole.

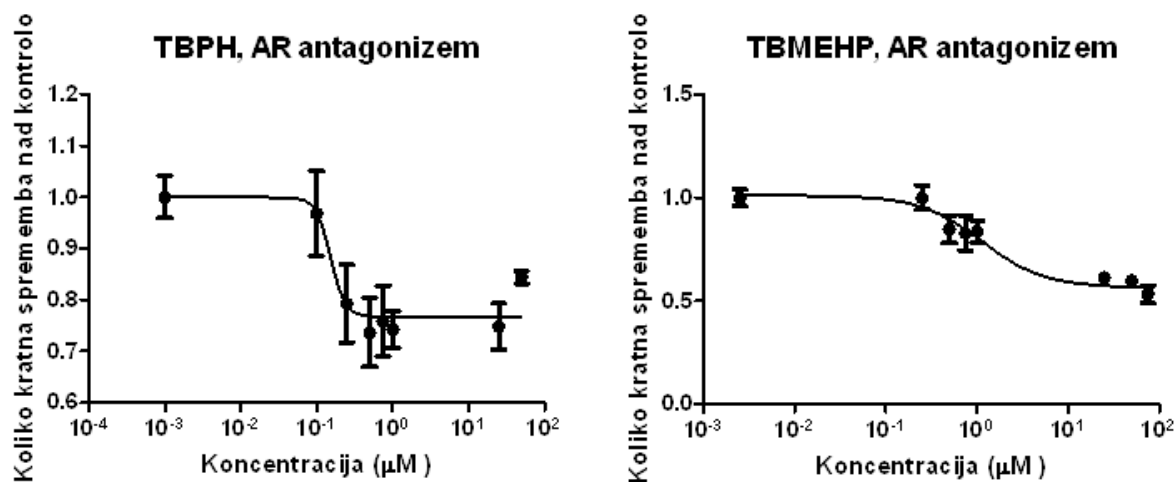
TBBA ni izkazovala signifikantnega antiandrogenega delovanja pri najnižjih koncentracijah, 0.75 in 1.0  $\mu\text{M}$ . Izražanje luciferaze glede na kontrolo je bilo pri 125  $\mu\text{M}$  znižano za 23.7 %, pri 100  $\mu\text{M}$  15.7 %, pri 75  $\mu\text{M}$  za 18.8 %, pri 50  $\mu\text{M}$  18.6 % in pri 25  $\mu\text{M}$  za 15.7 %.



Slika 9: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za antagonizem TBB in TBBA na AR. Prikazana je relativna luciferazna aktivnost glede na kontrolo ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) po izpostavitvi celic naraščajočim koncentracijam TBB oziroma TBBA in 0.5 nM DHT. Aktivnost 1.0 ustreza 0.5 nM DHT.

TBPH je na AR deloval signifikantno antagonistično pri vseh koncentracijah, razen pri 0.1  $\mu\text{M}$ . Izmerjene relativne aktivnosti luciferaze so bile naslednje: 0.84 (50  $\mu\text{M}$ ), 0.75 (25  $\mu\text{M}$ ), 0.74 (1.0  $\mu\text{M}$ ), 0.76 (0.75  $\mu\text{M}$ ), 0.74 (0.50  $\mu\text{M}$ ) in 0.79 (0.25  $\mu\text{M}$ ).

Rezultati antagonizma na AR za TBMEHP so bili signifikantni pri 75, 50, 25 in 1.0  $\mu\text{M}$  koncentracijah. Učinek DHT je bil zmanjšan za 42.5, 21.9, 18.7 in 16.4 % glede na kontrolo.



Slika 10: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za antagonistične učinke TBPH in TBMEHP na AR. Prikazana je relativna luciferazna aktivnost glede na kontrolo ( $\bar{x} \pm SD$ ) po izpostavitvi celic naraščajočim koncentracijam TBPH oziroma TBMEHP in 0.5 nM DHT. Aktivnost 1.0 ustreza 0.5 nM DHT.

#### 4.2.2 AGONISTIČNI UČINKI NA GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE

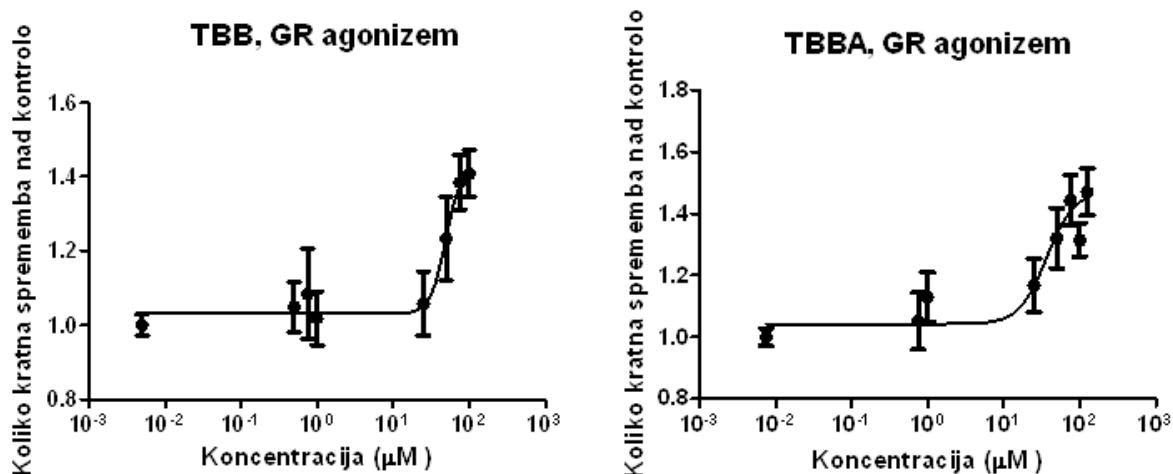
Selektiven agonističen glukokortikoidni učinek smo določili ob prisotnosti 5  $\mu\text{M}$  FLUT, ki je zasedel AR in tako omogočil, da so preiskovane spojine izrazile svoje delovanje zgolj preko GR. Signifikantno agonistično delovanje na GR so izkazovale vse štiri testirane spojine. Določene vrednosti  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  in  $EC_{10}$  so za vse spojine navedene v tabeli VI.

Tabela VI: Vrednosti  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  in  $EC_{10}$  za TBB, TBBA, TBPH in TBMEHP za agonističen učinek na GR. Vse koncentracije so podane v  $\mu\text{M}$ .

Spojina	$EC_{50}$	$EC_{25}$	$EC_{10}$
TBB	49.2	38.1	29.5
TBBA	36.6	23.1	0.28
TBPH	0.37	0.28	0.22
TBMEHP	0.81	0.66	0.53

TBB je signifikantno zvišal izražanje luciferaze za 40.8 in 38.4 % glede na kontrolo pri 100 in 75  $\mu\text{M}$ . Pri ostalih koncentracijah je prišlo do povečanja aktivnosti encima, a se ni statistično razlikovalo od 0.1 % DMSO.

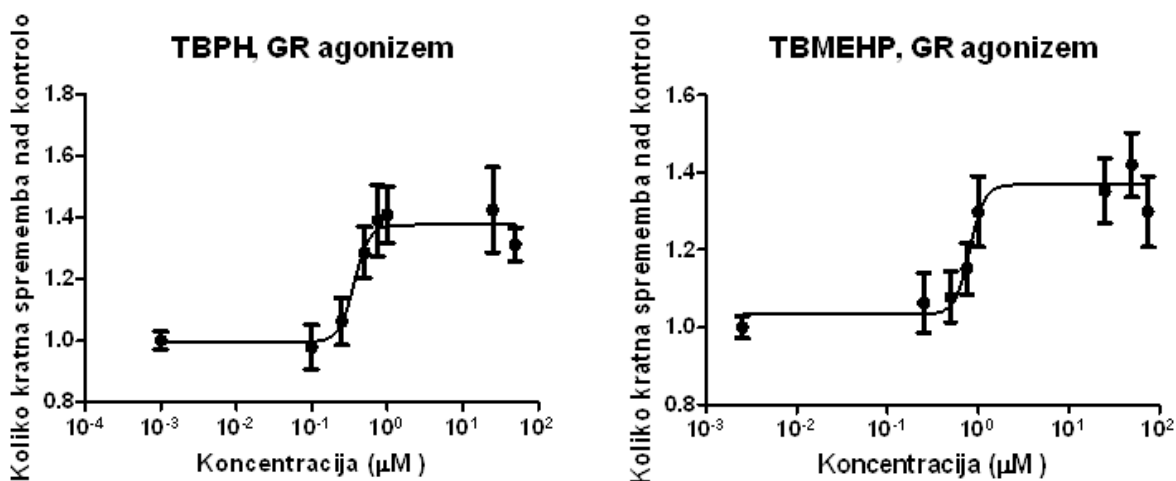
TBBA je signifikantno deloval na glukokortikoidne receptorje pri 125, 75 in 50  $\mu\text{M}$ . Aktivnost encima je bila glede na kontrolo povišana za 47.0, 44.4 in 32.1 %.



Slika 11: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za agonistične učinke TBB in TBBA na GR. Prikazana je relativna luciferazna aktivnost glede na kontrolo ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) po izpostavitvi celic naraščajočim koncentracijam TBB oziroma TBBA. Aktivnost 1.0 ustreza 0.1 % DMSO.

Agonistično delovanje TBPH je bilo signifikantno pri štirih koncentracijah, 50, 25, 1.0 in 0.50  $\mu\text{M}$ . Pri teh koncentracijah so bile relativne vrednosti luciferazne aktivnosti 1.31, 1.42, 1.41 in 1.29.

TBMEHP je signifikantno povečal izražanje luciferaze pri 75  $\mu\text{M}$  za 29.9 %, 50  $\mu\text{M}$  za 42.0 %, 25  $\mu\text{M}$  za 35.2 % in pri 1.0  $\mu\text{M}$  za 29.9 %.



Slika 12: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za agonistično delovanje TBPH in TBMEHP na GR. Prikazana je relativna luciferazna aktivnost glede na kontrolo ( $\bar{x} \pm SD$ ) po izpostavitvi celic naraščajočim koncentracijam TBPH oziroma TBMEHP. Aktivnost 1.0 ustreza 0.1 % DMSO.

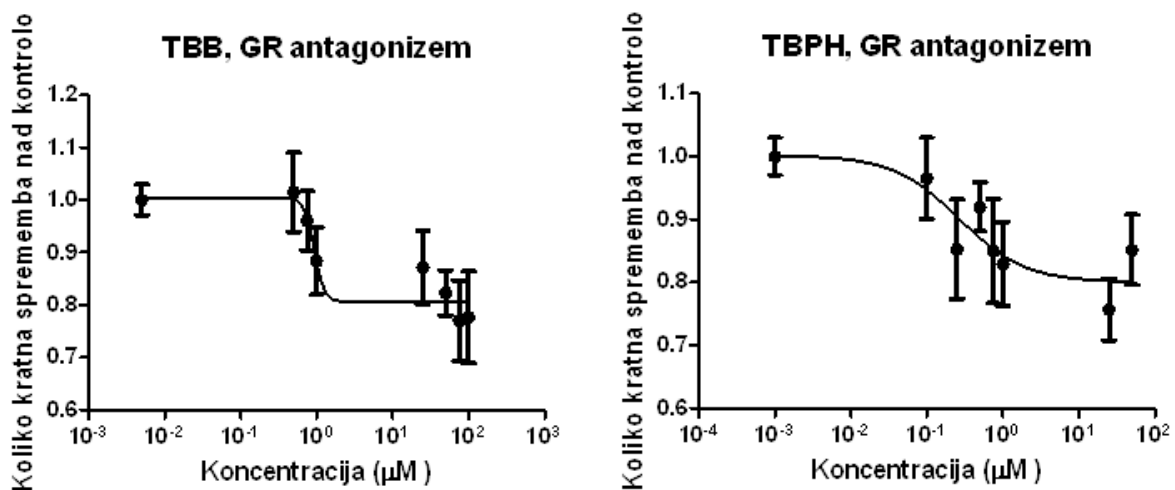
#### 4.2.3 ANTAGONISTIČNI UČINKI NA GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE

Pri testiranju antagonističnega učinka na GR smo aktivnost spojin določili glede na njihovo jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega glukokortikoidnega agonista HC pri koncentraciji 500 nM ( $EC_{50}$  na celični liniji MDA-kb2). HC je bil v omenjeni koncentraciji dodan tudi kontroli, 0.1 % DMSO. Signifikantno receptorsko antiglukokortikoidno delovanje smo zaznali pri dveh preiskovanih spojinah, TBB in TBPH.

TBB je signifikantno zmanjšal učinek HC na GR pri dveh koncentracijah, 75 in 50  $\mu\text{M}$ . Pri 50  $\mu\text{M}$  je luciferazna aktivnost padla za 17.7 %, pri 75  $\mu\text{M}$  pa za 23.0 %. Iz slike 13 je razvidno, da z naraščanjem koncentracije TBB narašča tudi antagonističen učinek. Vrednost  $IC_{50}$  je bila določena pri 0.93  $\mu\text{M}$ .

TBPH je signifikantno antagonistično delovanje izkazal pri 50, 25 in 1.0  $\mu\text{M}$ . Izmerjena relativna luciferazna aktivnost je bila 0.85, 0.76 in 0.83.  $IC_{50}$  je bila izmerjena pri 0.27  $\mu\text{M}$ .





Slika 13: Krivulji odvisnosti učinka od odmerka za antagonistično delovanje TBB in TBPH na GR. Prikazana je relativna luciferazna aktivnost glede na kontrolno po izpostavitvi celic naraščajočim koncentracijam TBB oziroma TBPH in 100 nM HC. Aktivnost 1.0 ustreza 500 nM HC.

## 5. RAZPRAVA

TBB in TBPH sta relativno novi spojini in sta se v večjem obsegu začeli uporabljati šele v začetku 21. stoletja s prepovedjo uporabe mešanice PentaBDE. O njihovih učinkih na organizme ni veliko znanega, saj sta pogostejši predmet toksikoloških raziskav postali šele v tem desetletju. Naša raziskava je tako pomemben del odkrivanja morebitnega motečega delovanja TBB, TBPH ter njihovih metabolitov TBBA in TBMEHP na hormonski sistem.

### 5.1 UČINKI SPOJIN NA ANDROGENSKIH RECEPTORJIH

S presejalnim testom, s katerim smo spojine testirali v širšem naboru koncentracij (od nekaj 100  $\mu\text{M}$  do konca nM območja), smo poiskali območje, v katerem preiskovane spojine kažejo učinke na receptorje. Slednje smo nato natančneje preučili, kot je opisano v poglavju *Materiali in metode dela*. Androgenskega delovanja v presejalnem testu nismo zaznali za nobeno od preiskovanih spojin. Za TBB in TBPH je bilo to pričakovano, saj v študiji, ki je bila sicer izvedena na kvasovkah in pri drugačnih koncentracijah preiskovanih spojin kot v naši raziskavi, [8] ti spojini nista pokazali agonističnih učinkov na AR. Nasprotno pa je nebromiran analog DEHP na celični liniji MDA-kb2 deloval šibko agonistično na androgenskih receptorjih ( $\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). [42] Ker se TBPH od DEHP razlikuje zgolj v bromiranem aromatskem obroču, lahko sklepamo, da pripenjanje bromidnih atomov na benzen povzroči izgubo agonističnega učinka na AR. Razloga sta verjetno povečanje velikosti in hidrofobnosti spojine. TBMEHP tako kot njegov nebromiran analog MEHP ni izkazoval agonističnega delovanja na AR, je pa v nasprotju z MEPH deloval antagonistično na AR. MEPH sicer deluje antiandrogensko, vendar učinek ni povzročen preko AR. [43]

Ker sta TBB in TBPH na kvasovkah pri vseh koncentracijah signifikantno zavrla izražanje  $\beta$ -galaktozidaze, uravnavane preko AR [8], smo tudi v naši raziskavi pričakovali antagonistično delovanje. TBPH je izkazoval od odmerka odvisen antagonističen učinek pri koncentracijah 0.1–25  $\mu\text{M}$ . Pri 50  $\mu\text{M}$  je prišlo do izrazitega povečanja izražanja luciferaze, kar nakazuje, da spojina deluje antagonistično le v ozkem koncentracijskem območju. V raziskavi, izvedeni na bioluminiscentnih sevih kvasovk (*S. cerevisiae* BMAEReluc/AR) [44], TBPH pri 2.5  $\mu\text{M}$  ni zmanjšal učinka testosterona, kar je v nasprotju z našimi rezultati in prej omenjeno študijo [8]. V naši raziskavi je pri podobni koncentraciji, to je 1.0  $\mu\text{M}$ , signifikantno zmanjšal jakost luminiscence. Rezultati se

verjetno ne ujemajo zaradi uporabe različnih *in vitro* sistemov. Sesalske celične linije namreč izkazujejo višjo občutljivost kot kvasovke. Razlika je tudi v uporabljenih kontrolah, saj smo v našem eksperimentu uporabili 0.5 nM DHT, ki je sicer močnejši agonist AR kot testosteron, vendar je bil slednji v omenjeni študiji uporabljen pri višji koncentraciji.

Na receptorsko antiandrogensko delovanje TBPH smo sklepali tudi na podlagi antagonističnega delovanja njegovega nebromiranega analoga (DEHP), ki je bilo prav tako dokazano na celični liniji MDA-kb2. [42] Njegova vrednost  $IC_{50}$  je presegala 100  $\mu\text{M}$ , kar glede na naše rezultate pomeni, da je več kot 660-krat šibkejši antagonist kot TBPH in več kot 2-krat šibkejši antagonist kot TBB. Tako visok  $IC_{50}$  je lahko posledica uporabe 2-krat višje koncentracije DHT (1.0 nM) kot v naši raziskavi ali pa je posledica strukturne razlike spojin. Ker se DEHP in TBPH razlikujeta v substituiranosti aromatskega obroča, verjetno popolnoma bromiran obroč TBPH pripomore k močnejšemu zaviranju AR.

Glede na jakost antagonistične aktivnosti lahko spojine razdelimo po naslednjem vrstnem redu:  $TBB < TBBA < TBMEHP < TBPH$ .  $IC_{50}$  vrednost je za TBB znašala 47.8  $\mu\text{M}$ , za TBPH pa le 0.15  $\mu\text{M}$ , kar je več kot 300-krat nižje od TBB. Slednji je verjetno šibek antagonist AR, kar so nakazali že Saunders in sodelavci. [8] Vrednost  $IC_{50}$  za TBMEHP, monoestra TBPH je 1.14  $\mu\text{M}$ , kar pomeni, da metabolizem (hidroliza estrske vezi) zmanjša jakost antagonističnega delovanja za približno 8-krat. TBMEHP pa ima v primerjavi s TBBA oziroma TBB še vedno 35-krat oziroma 42-krat močnejšo zaviralno aktivnost na AR, morda zaradi dodatne karbonilne skupine. TBBA, metabolit TBB, ima vrednost  $IC_{50}$  40.7  $\mu\text{M}$  in je le nekoliko močnejši antagonist kot TBB. Iz molekulskih struktur spojin in njihovih  $IC_{50}$  vrednosti lahko sklepamo, da na moč antagonističnega delovanja najbolj vpliva število karbonilnih skupin v molekuli, preko katerih se lahko tvorijo vodikove vezi z vezavnim mestom AR. V manjši meri morda na jakost vplivajo tudi razvejane alkanske verige estrske skupine, ki omogočajo tvorbo hidrofobnih interakcij z receptorskim mestom. Pri TBB hidroliza estra poveča antagonistično aktivnost, pri TBPH pa metabolizem oslabi moč delovanja. Da bi ugotovili točen vpliv strukture spojin na antagonističen učinek, bi morali izvesti dodatna testiranja aktivnosti strukturno podobnih spojin na AR (npr. 1,2,3,4-tetrabromobenzena, tetrabromoftalne kisline, spojin z daljšimi oziroma krajšimi verigami estrskih skupin).

Predstavljeni rezultati so prvi, ki kažejo na sposobnost delovanja preiskovanih spojin na androgenske receptorje humane celične linije, in prvi, ki dokazujejo hormonsko aktivnost metabolitov TBB in TBPH.

## 5.2 UČINKI SPOJIN NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH

Antagonistično aktivnost na GR sta v luciferaznem testu izkazovala le TBB in TBPH, ki sta delovala odvisno od odmerka. Z metabolizmom se ta aktivnost verjetno izgubi, saj njuna metabolita TBBA in TBMEHP v testu nista zavrila s 500 nM HC inducirane izražanja luciferaze. Vzrok za neaktivnost metabolitov je lahko prosta karboksilna skupina v strukturi, ki morda negativno vpliva na vezavo na receptorsko mesto. Na zaviranje učinkov, izraženih preko GR, pa lahko ugodno vpliva bromiranje benzenskega obroča. TBPH se je namreč v našem eksperimentu izkazal kot antagonist GR, njegov nebromiran analog DEHP pa na isti celični liniji ni zmanjšal s HC (500 nM) spodbujenega izražanja luciferaze. [45] TBB in TBPH sta sicer delovala kot močna antagonista na GR ( $IC_{50} < 1.0 \mu M$ ), vendar je TBPH 50-odstotno zaviranje izražanja luciferaze glede na HC dosegel pri 3.5-krat nižji koncentraciji kot TBB. Glede na to, da se spojini strukturno razlikujeta v eni sami funkcionalni skupini, lahko sklepamo, da dodatna (2-etilheksil)-oksikarbonilna skupina poveča afiniteto TBPH za vezavno receptorsko mesto.

Pri testiranju agonističnega glukokortikoidnega receptorskega delovanja so vse preiskovane spojine inducirale izražanje luciferaze. TBPH je tako izkazal enako delovanje kot njegov nebromiran analog DEHP, ki je pri 50  $\mu M$  na celični liniji MDA-kb2 deloval kot agonist na GR. [45] Glede na jakost agonistične aktivnosti imajo spojine naslednji vrstni red: TBB < TBBA < TBMEHP < TBPH (vrednosti  $EC_{50}$  so navedene v tabeli VI). TBB se je izkazal kot najšibkejši agonist GR, s hidrolizo estra pa nastane le nekoliko močnejši metabolit TBBA. TBPH je izmed preiskovanih spojin najmočnejši agonist GR, z  $EC_{50}$  vrednostjo (0.37  $\mu M$ ) celo nižjo od vrednosti endogenega liganda HC (0.50  $\mu M$ ) na uporabljeni celični liniji MDA-kb2. TBPH se metabolizira v monoester TBMEHP, ki ima jakost delovanja zmanjšano le 2.2-krat v primerjavi z izhodno spojino. Molekulska struktura vidno vpliva na vrednosti  $EC_{50}$ , saj imata obe ftalatni spojini vrednosti nižji od 1.0  $\mu M$ , TBBA in njen ester pa imata vrednosti nad 35  $\mu M$ . Ker imajo preiskovane spojine enak vrstni red glede na moč delovanja pri AR antagonizmu in GR agonizmu, lahko sklepamo, da imajo tudi strukture spojin enak vpliv na njihovo moč tako pri antagonističnem delovanju na AR kot pri agonističnem delovanju na GR. Na agonistično

delovanje na GR tako verjetno ugodno vpliva večje število karbonilnih skupin, vpliv estrov pa je različen. V primeru TBB estrska skupina zmanjša moč agonizma glede na TBBA, TBPH pa ob prisotnosti dveh razvejanih alkanskih verig deluje močnejše kot monoester TBMEHP.

Do sedaj so to prvi znani rezultati testiranj na *in vitro* sistemu za receptorsko glukokortikoidno delovanje TBB, TBBA, TBPH in TBMEHP. Za točne zaključke glede povezav med strukturo in jakostjo agonistične oziroma antagonistične receptorske aktivnosti preiskovanih spojin na GR bi bila potrebna še dodatna testiranja delovanja strukturno podobnih spojin.

### **5.3 MOREBITNE POSLEDICE DELOVANJA SPOJIN NA HORMONSKE RECEPTORJE**

Industrijske kemikalije, ki oponašajo delovanje endogenih hormonov, najbolj vplivajo na biološke procese med razvojem zarodka (izpostavljenost preko placent), v poporodni dobi (izpostavljenost preko materinega mleka) in v obdobju pubertete (izpostavljenost preko hrane in vode). Študije, ki preučujejo mehanizme delovanja endokrinih motilcev, se predvsem osredotočajo na njihove (anti)estrogene in (anti)androgenske učinke, saj se motnje na nivoju spolnih hormonov hitreje izrazijo (spremenjeno spolno vedenje, fenotip in reprodukcija). Kljub pomembni funkciji glukokortikoidov pa je o posledicah vmešavanja eksogenih spojin v njihovo delovanje znanega malo. [46] Vpliv eksogenih hormonsko aktivnih substanc na organizem ima lahko kompleksne posledice, saj lahko hkrati delujejo preko različnih hormonskih sistemov in tako motijo različne biološke procese. [47] Tudi v naši raziskavi so preiskovane spojine na sesalski celični liniji hkrati izkazovale aktivnost tako na AR kot na GR, ki je bila antagonistična in/ali agonistična.

Glukokortikoidi, glavni predstavnik je kortizol (95 %), nastajajo v skorji adrenalne žleze in sodelujejo pri uravnavanju različnih fizioloških procesov. Nujni so pri uravnavanju imunskega odziva, omogočajo normalen razvoj zarodka in ustrezno delovanje možganov, uravnavajo koncentracijo elektrolitov, krvni pritisk, metabolizem ogljikovih hidratov, proteinov in maščevja ter proliferacijo in diferenciacijo celic. [45, 48] Motnje v delovanju glukokortikoidov so povezali z boleznimi, kot so sladkorna bolezen tipa 2, debelost, osteoporoza, vnetne in avtoimune bolezni ter bolezni kardiovaskularnega sistema. [45]

Prekomerna glukokortikoidna aktivnost, povzročena s spojinami, ki delujejo agonistično na GR, deluje na plod enako kot povišane koncentracije kortizola (npr. zaradi prekomernega stresa matere), s katerimi so povezane nizka porodna teža in prizadetost ploda ter povečano tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 in ishemične bolezni srca med puberteto ali v odrasli dobi. [46, 47] V postnatalnem obdobju lahko povečana aktivacija ali zaviranje GR povzroči motnje v razvoju možganov in trajne spremembe v njihovem delovanju (motnje spomina, učenja in vedenja). [47] Agonistično aktivnost na GR lahko privede do porušanja metabolizma ogljikovih hidratov, lipidov in proteinov, kar lahko poveča tveganje za razvoj visceralne debelosti, visokih koncentracij glukoze v krvi, glukozne intolerance in inzulinske rezistence ter mišične oslabelosti. [46–48] Povečano glukokortikoidno aktivnost povezujejo tudi s pojavom depresije, anksioznosti in psihoz. [46] Lahko pripomore tudi k razvoju osteoporoze (pospešena kostna resorpcija), hipertenzije (spodbujena vazokonstrikcija) in povečani dovzetnosti za okužbe (imunosupresivno delovanje). [46, 48] Po drugi strani pa zaviranje GR vodi v prekomeren vnetni odziv in bolezenska stanja, kot je revmatoidni artritis. Poveča se tudi verjetnost pojava rakavih obolenj, saj pride do motenj v uravnavanju celičnega cikla (zavrto je izražanje zaviralcev od ciklina odvisnih kinaz). [46]

Androgeni so moški spolni hormoni, glavni predstavnik je testosteron. Testosteron nastaja predvsem v Leydigovih celicah testisov, manj kot 5 % pa v adrenalni žlezi. V tarčnih tkivih se ga s  $5\alpha$ -reduktazo večina pretvori v DHT. Testisi največ testosterona proizvajajo med razvojem ploda, nekaj mesecev po rojstvu in v puberteti, zato lahko sklepamo, da androgeni motilci pri človeku najbolj vplivajo na ta razvojna obdobja. Androgeni so odgovorni za razvoj zarodka v moški osebek (razvoj moških spolnih organov) ter da se v času pubertete pri dečkih povečajo spolni organi in pojavijo sekundarni moški spolni znaki (povečana poraščenost določenih predelov telesa, mutacija, povečana mišična masa). Pri odraslem moškem imajo pomembno vlogo pri spodbujanju spermatogeneze. [48]

Pomanjkanja učinkov testosterona, ki se lahko pojavi zaradi antagonistične aktivnosti hormonskih motilcev, lahko pri moškem zarodku povzroči motnjo v razvoju moških spolnih organov. Pojavijo se lahko anomalije, kot so hipospadija, kriptorhizem, zmanjšane ali odsotne pomožne spolne žleze (npr. prostata, semenski vrečki), zmanjšana anogenitalna razdalja, odsotnost obmodka, nožnični žep, nepravilno izoblikovana semenska izvodila. [49] Androgenski antagonisti lahko v obdobju pubertete zavrejo ali zmanjšajo

maskulinizacijo, kar se lahko kaže v ohranitvi otroških spolnih organov ali pa se le-ti ne razvijejo popolnoma, nemutiranjem glasu, manjši ali odsotni poraščenosti, otroški postavi (ozka ramena, manjša mišična masa). Motijo lahko tudi spermatogenezo, kar vodi v zmanjšano število ali morfološke nepravilnosti semenčic. [48] Agonistično delovanje eksogenih spojin na AR lahko pri dečkih povzroči prezgodnje spolno dozorevanje, pri deklicah in ženskah pa pojav moških značilnosti (nižji glas, povečana poraščenost telesa, mišičastost in virilizacija spolovila) ter motnje menstrualnega cikla. [48] Številne od navedenih motenj imajo za posledico neplodnost moških in žensk.

Vzporednice med vmešavanjem TBB in TBPH oziroma njunih metabolitov in preiskovanima hormonskima sistemoma lahko poiščemo v študiji, ko so izpostavili podgane mešanici Firemaster 550. [33] Motnje v glukokortikoidni aktivnosti bi lahko povezali z opaženo glukozno intoleranco, zvišanim bazalnim nivojem glukoze v krvi, debelostjo in anksioznostjo. Prezgodnja puberteta pa je morda nastopila zaradi vplivov na spolne hormone. Pri tem ni podatkov, ali sta za opažene učinke odgovorni izhodni spojini ali gre za posledico delovanja njunih metabolitov, ki se lahko tvorita pod vplivom esteraz.

V naši raziskavi smo dokazali, da so TBB in TBPH ter njuna metabolita sposobni motiti delovanje endogenih ligandov AR in GR ter tako vplivati na organizme. Rezultati nekaj študij so tudi pokazali, da lahko nekatere od preiskovanih spojin spremenijo produkcijo spolnih hormonov, kortikosteroidov in ščitničnih hormonov. [11, 21, 33, 35] To kaže, da lahko te spojine motijo funkcije različnih hormonov na različnih nivojih bioloških procesov in da so njihovi končni učinki na organizem posledica prepletanja vseh možnih načinov delovanja.

#### **5.4 POVEZAVA UČINKOV SPOJIN Z NIVOJEM OKOLJSKE IZPOSTAVITVE LJUDI**

Realno povezavo med znanimi količinami TBB in TBPH v okolju ter končnimi učinki na človeško telo preko AR in GR je težko predvideti, saj je o njiju ter TBBA in TBMEHP znanega zelo malo, tako s toksikološkega vidika kot tudi z vidika ADME procesov. Podatkov o obsegu absorpcije preko kože, gastrointestinalnega trakta ali dihal ni. Glede na velikost in lipofilnost molekul pa je verjetno slaba in tako v krvni obtok vstopi le manjši delež izpostavljene količine. TBB verjetno zapade obsežnemu metabolizmu prvega prehoda, saj so ga jetrne esteraze v *in vitro* pogojih sposobne hitro hidrolizirati. [32] Po

drugi strani pa so v *in vivo* študiji opazili zmanjšano aktivnost jetrne karboksilesteraze po izpostavitvi Firemaster 550 [33], kar lahko vodi v podaljšan razpolovni čas TBB. Produkt metabolizma je TBBA, ki se je v naši raziskavi izkazala za bolj toksično kot TBB, saj je izkazovala močnejše antagonistično delovanje na AR in močnejše agonistično delovanje na GR. Do presnove TBPH v jetrih verjetno ne pride, saj v *in vitro* študiji s HLM ni prišlo do njegove pretvorbe v metabolit TBMEHP, ki je glede na naše rezultate manj toksičen. [32] O poti in hitrosti eliminacije spojin ter metabolitov tudi ni podatkov. Izločanje namreč pomembno vpliva na njihov nivo v krvi in s tem razpoložljivost za akumulacijo ter delovanje na tarčne biološke procese. Za TBB, TBPH in TBBA je bilo dokazano, da se lahko kopičijo v telesu. Slednja predvsem v jetrih, TBB še v maščevju in mišicah [33], in tako ustvarjajo nekakšne zaloge, od koder se lahko sproščajo v kri in motijo biološke procese, tudi ko jim organizem v okolju ni izpostavljen. TBB verjetno prehaja preko placente in/ali se kopiči v materinem mleku, tako da lahko pride otrok z njim v stik v prenatalni in/ali postnatalni dobi. [33] Izpostavljenost endokrinim motilcem v fazi razvoja predstavlja povečano tveganje za patološka stanja, saj je organizem takrat najbolj občutljiv.

O prisotnosti preiskovanih spojin pri človeku je znan le en podatek. TBPH je bil detektiran v serumu prebivalcev kitajskega industrijskega področja, kjer tudi proizvajajo halogenirane zaviralce gorenja. [29] Ker njegova koncentracija v okolju ni bila določena, serumske vrednosti ne moremo povezati z nivojem izpostavljenosti prebivalcev. Koncentracija TBPH je bila 260 ng/(g serumskih lipidov), kar z upoštevanjem povprečne koncentracije celokupnih serumskih lipidov 6.5 g/L ustreza 2.39 nM koncentraciji v krvi. Ta vrednost je veliko nižja (približno 40-krat) od najnižje koncentracije TBPH, ki smo jo testirali na receptorsko aktivnost in ni imela signifikantnega vpliva na GR in AR. Zato lahko sklepamo, da TBPH pri izmerjeni koncentraciji ni toksičen za prebivalstvo, vsaj z vidika aktivnosti na androgenskem in glukokortikoidnem receptorskem sistemu.

Pomen izmerjenih koncentracij TBB in TBPH v okolju z vidika toksičnosti za ljudi lahko ocenimo s primerjavo količin TBB in TBPH, katerim smo v eksperimentu izpostavili celice, in izračunanih količin dnevne zaužitja omenjenih FR v domačem okolju pri otrocih in odraslih na podlagi ocene Ali in sodelavcev [19]. Iz tabele VII je razvidno, da najvišji dnevni vnos TBB s prahom tako pri odraslih kot pri otrocih ne presega najnižje količine te spojine, ki so ji bile izpostavljene celice v našem eksperimentu. Dnevni vnos TBPH pri otrocih skoraj dosega nivo, ki so mu bile izpostavljene celice pri najnižji



testirani koncentraciji (0.1  $\mu$ M). Pri tej koncentraciji TBPH ni deloval signifikantno (ant)agonistično na nobenem od preučevanih receptorjev. Tako lahko trdimo, da dnevna izpostavitve ocenjenim količinam TBB in TBPH z vidika glukokortikoidne in androgenske aktivnosti ni problematična. Vendar je potrebno upoštevati, da so bile izmerjene koncentracije TBB in TBPH po domovih v študiji Ali in sodelavcev veliko nižje kot v nekaterih drugih primerih analize prahu, kot je razvidno iz tabele II. Maksimalna koncentracija TBB je v nekaterih primerih več kot 150-krat, pri TBPH pa do 10-krat višja kot po belgijskih domovih. Posledično je lahko dejanski dnevni vnos obeh zaviralcev gorenja preko prahu veliko višji, kot so ga ocenili Ali in sodelavci. Že Fromme in sodelavci [17] so ocenili mnogo višji vnos TBPH s prahom. Iz tabele VII je razvidno, da nemški otroci zaužijejo do 10-krat več TBPH kot belgijski.

Tabela VII: Primerjava količin TBB in TBPH, ki so jim bile izpostavljene celice, in ocenjenega vnosa s prahom. Navedene so količine (ng) TBB in TBPH v 100  $\mu$ L koncentracijsko najvišjih in najnižjih raztopinah, ki so jim bile izpostavljene celice linije MDA-kb2. Navedene so še najvišje vrednosti dnevnega zaužitja TBB in TBPH s prahom po domovih za otroka, starega 3 leta (TT 15 kg), in odraslo osebo (TT 70 kg), ki smo jih izračunali na podlagi ocene dnevne izpostavitve Ali oz. Fromme in sodelavcev. [17, 19] Predpostavljena je 100-odstotna absorpcija. Ocenjene vrednosti zaužitja TBB pri odraslih in otrocih so bile v obeh študijah podobne.

	<b>TBB</b>	<b>TBPH</b>	
Maksimalna izpostavljenost celic (ng)	5499	3531	
Minimalna izpostavljenost celic (ng)	27.5	7.1	
Maksimalni dnevni vnos s prahom, otrok, 15 kg (ng)	1.2	6.0 <sup>a</sup>	60.9 <sup>b</sup>
Maksimalni dnevni vnos s prahom, odrasel, 70 kg (ng)	0.7	1.4 <sup>a</sup>	24.5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> vrednost, izračunana na podlagi ocene Ali in sodelavcev [19]

<sup>b</sup> vrednost, izračunana na podlagi ocene Fromme in sodelavcev [17]

Količina TBPH, ki ga s prahom zaužijejo otroci in odrasli v Nemčiji, ustreza nivoju TBPH, kateremu so bile izpostavljene celice v območju 0.10–1.0  $\mu\text{M}$ . V tem območju koncentracij smo opazili signifikantne učinke TBPH tako na AR kot na GR. Tako bi TBPH pri vnosu, ki so ga ocenili Fromme in sodelavci, morda že lahko imel moteče vplive na androgenski in glukokortikoidni sistem. Kot smo že omenili, se je pri teh predpostavkah potrebno zavedati, da ni znano, v kolikšni meri prideta TBB in TBPH do tarčnih molekul, in to tudi težko ocenimo. Obsega absorpcije za TBB in TBPH ne poznamo in morda v krvni obtok prideta zgolj v minimalnih količinah glede na izpostavljene koncentracije. Nosilci toksičnih učinkov so lahko njihovi metaboliti, na primer TBBA in TBMEHP, vendar obseg pretvorbe v omenjena metabolita še ni znan. Na nivo FR in njihovih metabolitov v krvi pa vpliva tudi hitrost eliminacije, ki še ni bila določena.

Izpostavitve ljudi TBB in TBPH se bo s časom povečala, saj naj bi se po ocenah njune koncentracije v okolju podvojile v enem oziroma dveh letih. [12] To pomeni, da bo, v primeru istega obsega uporabe v industriji, prisotnost omenjenih FR v okolju v enem desetletju močno narastla. Tako visoki nivoji TBB in TBPH pa bi lahko imeli resne posledice za organizem z vidika antagonističnega oziroma agonističnega delovanja na AR oziroma GR. Potrebno se je tudi zavedati, da v realnosti organizem ni nikoli izpostavljen eni sami kemikaliji. Zmesi pa imajo lahko nepredvidljive učinke, kar še dodatno otežuje oceno varnosti posamezne spojine. Poleg tega so opažene spremembe pri organizmih lahko posledica prepletanja kompleksnega delovanja posameznih endokrinih motilcev, saj imajo lahko v telesu številne različne biološke tarče.

## 5.5 PREDLOGI ZA NADALJNE RAZISKAVE

O TBB, TBPH ter njihovih metabolitih TBBA in TBMEHP je malo znanega z vidika ADME procesov in toksičnih učinkov pri organizmih. Zato bo potrebno še veliko *in vitro* in *in vivo* študij, ki bodo omogočile razjasniti vse neznanke ter pomagale oceniti tveganje, ki ga predstavljajo spojine za živa bitja. Potrebno je določiti vrednosti NOAEL, saj je znana le za kronično toksičnost TBPH, ter varnega dnevnega odmerka (TDI) za oba preiskovana zaviralca gorenja.

Glukokortikoidi, mineralokortikoidi, androgeni, estrogeni in progestini so hormoni, ki jih uvrščamo v skupino steroidnih hormonov. Gre za strukturno podobne spojine, katerih osnova je steroidni skelet. Ker so TBB, TBPH, TBBA in TBMEHP v naši raziskavi

izkazovali aktivnost na GR in AR, lahko predpostavljamo, da motijo receptorske učinke vseh steroidnih hormonov. Tako bi bilo smiselno temeljito preveriti delovanje preiskovanih spojin še na ostalih steroidnih hormonskih receptorjih; estrogenskih (nekaj študij jih je že obravnavalo), progestinskih in mineralokortikoidnih.

Ker imajo endokrini motilci pogosto neželene učinke na tiroidni hormonski sistem, predlagamo tudi testiranje TBB in TBPH ter njunih metabolitov na morebitno aktivnost na tiroidnih receptorjih. Spojine imajo nekatere strukturne elemente namreč enake ščitničnima hormonoma T3 in T4; aromatski obroč s halogenimi elementi, lipofilen stranski del in karbonilno skupino. Tiroidni hormoni imajo številne pomembne funkcije, katerih motnje bi lahko imele obsežne negativne posledice za organizem.

## 6. SKLEP

O vplivih spojin TBB in TBPH ter njunih metabolitov TBBA in TBMEHP na organizme je znanega malo, saj so z vidika toksikologije te spojine postale zanimive šele v zadnjih letih. V magistrski nalogi smo se osredotočili na učinke TBB, TBPH, TBBA in TBMEHP na AR in GR celične linije MDA-kb2. Na podlagi rezultatov našega eksperimentalnega dela lahko glede preiskovanih spojin zaključimo naslednje:

- TBB se je pri koncentracijah nad 100  $\mu\text{M}$  izkazal za citotoksičnega, zato smo za luciferazni test izbrali koncentracije v območju 100–0.50  $\mu\text{M}$ . TBBA je na celice delovala toksično nad 125  $\mu\text{M}$ , nadaljnje teste smo izvedli pri 125–0.75  $\mu\text{M}$ . TBMEHP je bil citotoksičen nad 75  $\mu\text{M}$ , luciferazni test smo tako izvedli pri koncentracijah 75–0.25  $\mu\text{M}$ . Zaradi težav s topnostjo smo TBPH na citotoksičnost testirali pri 50  $\mu\text{M}$ , kjer smo zagotovili popolno raztapljanje. Pri tej koncentraciji ni bil toksičen za celice. V luciferaznem testu smo TBPH testirali v območju 50–0.10  $\mu\text{M}$ .
- V presejalnem testu nobena izmed preiskovanih spojin ni izkazala potenciala za agonistično delovanje na AR, zato nadaljnjih testiranj AR agonizma nismo izvedli.
- Pri testiranju antagonistične aktivnosti na AR so vse spojine izkazovale signifikantne vplive na z DHT inducirano izražanje luciferaze. Vrednosti  $\text{IC}_{50}$  so bile za TBB 47.6  $\mu\text{M}$ , TBBA 40.7  $\mu\text{M}$ , TBPH 0.15  $\mu\text{M}$  in TBMEHP 1.14  $\mu\text{M}$ . Najšibkeje je antagonistično na AR deloval TBB, najmočnejše zaviralne učinke na receptor pa je imel TBPH.
- Testiranje agonističnega delovanja na GR je pokazalo, da so se vse spojine sposobne vezati na receptorsko mesto in sprožiti izražanje luciferaznega encima. Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  so bile določene pri 49.2  $\mu\text{M}$  za TBB, 36.6  $\mu\text{M}$  TBBA, 0.37  $\mu\text{M}$  TBPH in 0.81  $\mu\text{M}$  TBMEHP. Za najmočnejši agonist GR se je izkazal TBPH, za najšibkejšega pa TBB.
- Signifikantne antagonistične učinke na GR sta imela le TBB in TBPH, njuna metabolita pa nista zavrla s HC inducirane izražanja luciferaze. Najmočnejše antagonistično je deloval TBPH z  $\text{IC}_{50}$  0.27  $\mu\text{M}$ , TBB pa je nekoliko šibkejši antagonist GR z  $\text{IC}_{50}$  0.93  $\mu\text{M}$ .

- Pri vseh učinkih, agonističnih in antagonističnih na AR oziroma GR je opazna povezava med jakostjo delovanja spojin na receptor in njihovimi molekulskimi strukturami.

Predstavljene ugotovitve glede TBB, TBPH, TBBA in TBMEHP so prve, ki temeljijo na eksperimentalnih rezultatih, pridobljenih na humani celični liniji. So tudi prve, ki obravnavajo receptorsko androgensko aktivnost metabolitov preiskovanih zaviralcev gorenja in učinke na glukokortikoidne receptorje vseh preiskovanih spojin. Realnih zaključkov glede vpliva spojin na obravnavana hormonska sistema še ni mogoče narediti, saj imamo premalo podatkov o njihovi usodi v organizmih. Na podlagi naših eksperimentalnih rezultatov pa lahko predpostavljamo, da preiskovane spojine predstavljajo tveganje za zdravje ljudi in živali.

Potrebne so še nadaljnje študije TBB in TBPH ter njunih metabolitov, ki bodo pripomogle k zaključkom glede tveganja, ki ga predstavljajo za živa bitja. Vplive spojin je potrebno še raziskati tako na področju androgenkega in glukokortikoidnega sistema kot tudi drugih hormonskih sistemov.

## 7. LITERATURA

1. Eljarrat E, Barcelo D: *Brominated flame retardants*. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 16, Springer, Heidelberg, 2011: 3–7, 142, 187–9, 241, 269.
2. Esch GJv: *Flame retardants: a general introduction*. Environmental Health Criteria 192, World Health Organization and I.P.f.C. Safety, World Health Organisation, Geneva, 1997.
3. Shaw SD et al.: *Halogenated flame retardants: Do the fire safety benefits justify the risks?* Rev Environ Health 2010; 25: 261–305.
4. Brown VJ: *Why Is It So Difficult to Choose Safer Alternatives for Hazardous Chemicals?* Environ Health Perspect 2012; 120: a281–3.
5. Covaci A et al.: *Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour*. Environ Int 2011; 37: 532–56.
6. La Guardia MJ et al.: *Brominated flame-retardants in Sub-Saharan Africa: burdens in inland and coastal sediments in the eThekweni metropolitan municipality, South Africa*. Environ Sci Technol 2013; 47: 9643–50.
7. La Guardia MJ et al.: *In situ accumulation of HBCD, PBDEs, and several alternative flame-retardants in the bivalve (Corbicula fluminea) and gastropod (Elimia proxima)*. Environ Sci Technol 2012; 46: 5798–805.
8. Saunders DM et al.: *In vitro endocrine disruption and TCDD-like effects of three novel brominated flame retardants: TBPH, TBB, & TBCO*. Toxicol Lett 2013; 223: 252–9.
9. Bergman A et al.: *Scientific Opinion on Emerging and Novel Brominated Flame retardants (BFRs) in Food*. EFSA Journal 2012; 10: 15–18, 37–40.
10. Berr JS et al.: *Accumulation and DNA damage in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to 2 brominated flame-retardant mixtures, Firemaster 550 and Firemaster BZ-54*. Environ Toxicol Chem 2010; 29: 722–9.
11. Springer C et al.: *Rodent thyroid, liver, and fetal testis toxicity of the monoester metabolite of bis-(2-ethylhexyl) tetrabromophthalate (tbph), a novel brominated flame retardant present in indoor dust*. Environ Health Perspect 2012; 120: 1711–9.

12. Ma Y, Venier M, Hites RA: *2-Ethylhexyl tetrabromobenzoate and bis(2-ethylhexyl) tetrabromophthalate flame retardants in the Great Lakes atmosphere*. Environ Sci Technol 2012; 46: 204–8.
13. Ma Y et al.: *Has the phase-out of PBDEs affected their atmospheric levels? Trends of PBDEs and their replacements in the Great Lakes atmosphere*. Environ Sci Technol 2013; 47: 11457–64.
14. Xiao H et al.: *Atmospheric concentrations of halogenated flame retardants at two remote locations: the Canadian High Arctic and the Tibetan Plateau*. Environ Pollut 2012; 161: 154–61.
15. Stapleton HM et al.: *Alternate and new brominated flame retardants detected in U.S. house dust*. Environ Sci Technol 2008; 42: 6910–6.
16. Allen JG et al.: *Exposure to flame retardant chemicals on commercial airplanes*. Environ Health 2013; 12: 17.
17. Fromme H et al.: *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and "novel" brominated flame retardants in house dust in Germany*. Environ Int 2014; 64: 61–8.
18. Stapleton HM et al.: *Detection of organophosphate flame retardants in furniture foam and U.S. house dust*. Environ Sci Technol 2009; 43: 7490–5.
19. Ali N et al.: *"Novel" brominated flame retardants in Belgian and UK indoor dust: implications for human exposure*. Chemosphere 2011; 83: 1360–5.
20. Ali N et al.: *Analytical characteristics and determination of major novel brominated flame retardants (NBFRs) in indoor dust*. Anal Bioanal Chem 2011; 400: 3073–83.
21. Johnson PI et al.: *Associations between brominated flame retardants in house dust and hormone levels in men*. Sci Total Environ 2013; 445–446: 177–84.
22. Davis EF et al.: *Measurement of flame retardants and triclosan in municipal sewage sludge and biosolids*. Environ Int 2012; 40: 1–7.
23. Ali N et al.: *Occurrence of alternative flame retardants in indoor dust from New Zealand: indoor sources and human exposure assessment*. Chemosphere 2012; 88: 1276–82.
24. de Jourdan BP et al.: *Environmental fate of three novel brominated flame retardants in aquatic mesocosms*. Environ Toxicol Chem 2013; 32: 1060–8.

25. Gentes ML et al.: *Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St. Lawrence River, Canada*. Environ Sci Technol 2012; 46: 9735–44.
26. Chen D et al.: *European Starlings (Sturnus vulgaris) Suggest That Landfills Are an Important Source of Bioaccumulative Flame Retardants to Canadian Terrestrial Ecosystems*. Environ Sci Technol 2013; 47: 12238–47.
27. Lam JC et al.: *Temporal trends of hexabromocyclododecanes (HBCDs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and detection of two novel flame retardants in marine mammals from Hong Kong, South China*. Environ Sci Technol 2009; 43: 6944–9.
28. Ali N et al.: *Organohalogenated contaminants (OHCs) in the serum and hair of pet cats and dogs: biosentinels of indoor pollution*. Sci Total Environ 2013; 449: 29–36.
29. He S et al.: *Concentrations and trends of halogenated flame retardants in the pooled serum of residents of Laizhou Bay, China*. Environ Toxicol Chem 2013; 32: 1242–7.
30. Davis EF, Stapleton HM: *Photodegradation pathways of nonabrominated diphenyl ethers, 2-ethylhexyltetrabromobenzoate and di(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate: identifying potential markers of photodegradation*. Environ Sci Technol 2009; 43: 5739–46.
31. Rayne S, Forest K: *Comment on "Photodegradation pathways of nonabrominated diphenyl ethers, 2-ethylhexyltetrabromobenzoate and di(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate: identifying potential markers of photodegradation"*. Environ Sci Technol 2009; 43: 7992–3.
32. Roberts SC et al.: *In vitro metabolism of the brominated flame retardants 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabromobenzoate (TBB) and bis(2-ethylhexyl) 2,3,4,5-tetrabromophthalate (TBPH) in human and rat tissues*. Chem Res Toxicol 2012; 25: 1435–41.
33. Patisaul HB et al.: *Accumulation and endocrine disrupting effects of the flame retardant mixture Firemaster® 550 in rats: an exploratory assessment*. J Biochem Mol Toxicol 2013; 27: 124–36.
34. Stapleton HM et al.: *Flame retardant associations between children's hand wipes and house dust*. Chemosphere, 2014, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.12.100.
35. Mankidy R et al.: *Effects of novel brominated flame retardants on steroidogenesis in primary porcine testicular cells*. Toxicol Lett 2014; 224: 141–6.



36. MDA-kb2 (ATCC CRL-2713): [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2713.aspx?geo\\_country=si#characteristics](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2713.aspx?geo_country=si#characteristics) (dostopano 18. 3. 2014).
37. Wilson VS et al.: *A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists*. Toxicol Sci 2002; 66: 69–81.
38. Protocols & applications guide: Cell Viability: <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/paguide/a4/chap4a4.pdf?la=en> (dostopano 22. 3. 2014).
39. CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf> (dostopano 22. 3. 2014).
40. Luciferase Assay System: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf> (dostopano 22. 3. 2014).
41. Baldwin TO: *Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains*. Structure 1996; 4: 223–8.
42. Shen O et al.: *Comparison of in vitro hormone activities of selected phthalates using reporter gene assays*. Toxicol Lett 2009; 191: 9–14.
43. Lehraiki A et al.: *Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism*. Toxicol Sci 2009; 111: 372–82.
44. Ezechiáš M, Svobodová K, Cajthaml T: *Hormonal activities of new brominated flame retardants*. Chemosphere 2012; 87: 820–4.
45. Kolšek K et al.: *Molecular docking revealed potential disruptors of glucocorticoid receptor-dependent reporter gene expression*. Toxicol Lett 2014; 226: 132–9.
46. Odermatt A, Gumy C: *Glucocorticoid and mineralocorticoid action: why should we consider influences by environmental chemicals?* Biochem Pharmacol 2008; 76: 1184–93.
47. Odermatt A et al.: *Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: potential mechanisms and relevance*. J Steroid Biochem Mol Biol 2006; 102: 222–31.

48. Guyton AC, Hall JE: *Textbook of medical physiology*, 11th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006: 944–959, 996–1010.
49. Gray LE et al.: *Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat*. *Toxicol Sci* 2000; 58: 350–65.