

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA VLAHOVIČ

**UGOTAVLJANJE VPLIVA TRIKLOSANA IN TRIKLOKARBANA NA
ADHEZIJO CELIC RAKA DOJKE IN ČLOVEŠKE ENDOTELIJSKE VENSKE
CELICE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA VLAHOVIČ

**UGOTAVLJANJE VPLIVA TRIKLOSANA IN TRIKLOKARBANA NA
ADHEZIJO CELIC RAKA DOJKE IN ČLOVEŠKE ENDOTELIJSKE VENSKE
CELICE**

**DETERMINATION OF THE IMPACT OF TRICLOSAN AND TRICLOCARBAN
ON ADHESION OF BREAST CANCER CELLS AND HUMAN ENDOTHELIAL
VEIN CELL**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravila na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Katre Kolšek, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za vso pomoč, nasvete, spodbudo in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorici dr. Katri Kolšek, mag. farm. za vse nasvete in vsestransko pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela. Posebna zahvala gre tudi mojim domačim, Gorazdu in prijateljicam za potrpežljivost in spodbujanje tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Katre Kolšek, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	ii
KAZALO SLIK	iv
KAZALO PREGLEDNIC	vi
KAZALO PRILOG	vii
POVZETEK	viii
ABSTRACT	x
SEZNAM OKRAJŠAV	xii
1. UVOD	1
1.1. HORMONSKI MOTILCI	1
1.2. INTEGRINI	2
1.2.1. Vitronektinski receptor	5
1.3. CELIČNA ADHEZIJA	6
1.3.1. Spojine, ki vplivajo na celično adhezijo	7
1.4. TRIKLOKARBAN	7
1.4.1. Fizikalno-kemijske lastnosti TCC	7
1.4.2. Viri in izpostavljenost TCC	8
1.4.3. Delovanje in uporaba TCC	8
1.4.3.1. Farmakokinetika TCC	9
1.4.3.2. Toksični učinki TCC	9
1.5. TRIKLOSAN	10
1.5.1. Fizikalno-kemijske lastnosti TCS	10
1.5.2. Viri in izpostavljenost TCS	11
1.5.3. Delovanje in uporaba TCS	11
1.5.3.1. Farmakokinetika TCS	12
1.5.3.2. Toksični učinki TCS	12
2. NAMEN DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. MATERIALI	15
3.1.1. Testirani spojini	15
3.1.2. Reagenti	15
3.1.3. Raztopine	16

3.1.4.	Celični liniji	16
3.1.4.1.	Celična linija MCF-7.....	16
3.1.4.2.	Celična linija HUVEC.....	16
3.1.5.	Gojišči.....	17
3.1.5.1.	Gojišče za celično linijo MCF-7	17
3.1.5.2.	Gojišče za celično linijo HUVEC	17
3.1.6.	Laboratorijske aparature	17
3.1.7.	Ostala laboratorijska oprema in pripomočki	18
3.2.	METODE.....	18
3.2.1.	Osnove dela s celicami	18
3.2.2.	Odmrzovanje celic.....	19
3.2.3.	Gojenje celične linije	19
3.2.4.	Štetje celic.....	20
3.2.5.	Test viabilnosti	21
3.2.6.	Test adhezije	22
3.2.7.	Statistična analiza rezultatov	25
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1.	DELO NA CELIČNI LINIJI MCF-7.....	27
4.1.1.	Test viabilnosti	27
4.1.2.	Test adhezije	29
4.1.2.1.	TCC	30
4.1.2.2.	TCS.....	32
4.2.	DELO S HUVEC CELIČNO LINIJO	35
4.2.1.	Test viabilnosti	35
4.2.2.	Test adhezije	37
4.2.2.1.	TCC	37
4.2.2.2.	TCS.....	39
5.	SKLEP	41
	LITERATURA	43
	PRILOGE	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema integrina $\alpha_V\beta_3$	4
Slika 2: Hemocitometer	21
Slika 3: Princip sistema xCELLigence	23
Slika 4: Shema E-plošče	24
Slika 5: Diagram viabilnosti (v %) glede na 0,1 % DMSO za TCC in TCS na celični liniji MCF-7.	28
Slika 6: Celični indeks v odvisnosti od časa za celično linijo MCF-7 z VN in 0,1 % DMSO, brez VN in z 0,1 % DMSO ter z VN in cRGDfV	30
Slika 7: Celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCC na celični liniji MCF-7	31
Slika 8: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCC (celična linija MCF-7, prva biološka ponovitev)	31
Slika 9: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCC na celični liniji MCF-7, druga biološka ponovitev	32
Slika 10: Celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCS na celični liniji MCF-7	33
Slika 11: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCS na celični liniji MCF-7, prva biološka ponovitev	34
Slika 12: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCS na celični liniji MCF-7, druga biološka ponovitev	35
Slika 13: Diagram viabilnosti (v %) glede na 0,1 % DMSO za TCC in TCS na celični liniji HUVEC	36
Slika 14: Celični indeks v odvisnosti od časa za celično linijo HUVEC z VN in 0,1 % DMSO brez VN in z 0,1 % DMSO ter z VN in cRGDfV	37
Slika 15: Celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCC na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev	38
Slika 16: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCC na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev	38
Slika 17: Celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCS na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev	39

Slika 18: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCS na celični liniji HUVEC,
prva biološka ponovitev. 40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Testirani spojini s pripadajočimi osnovnimi kemijskimi podatki 15

KAZALO PRILOG

Priloga I: Kristalografska projekcija ligandov hormonov (ščitničnega hormona, steroida) in resveratrola na posebno receptorsko mesto (žep) v bližini RGD prepoznavnega mesta na glavi $\alpha_V\beta_3$ integrina.....	50
Priloga II: Splošni pregled poddržin integrinskih receptorjev.....	51
Priloga III: Tri splošne kristalne strukture integrina $\alpha_V\beta_3$ dobljene z elektronsko mikroskopijo.....	51
Priloga IV: Fizikalno – kemijske lastnosti TCC in TCS	52
Priloga V: Prisotnost toksičnih učinkov TCC in TCS pri človeku in v okolju	53

POVZETEK

S triklokarbanom (TCC) in triklosanom (TCS) se srečujemo vsakodnevno z uporabo različnih potrošniških izdelkov za osebno nego (trda in tekoča mila, geli za tuširanje, zobne paste, deodorantski stiki, itd.). Z njima so povezani mnogi neželeni učinki, med drugim sta uvrščena med hormonske motilce. Za slednje so dovzetni vsi fiziološki sistemi, ki so hormonsko občutljivi in vplivajo na plodnost moških in žensk, razvoj raka dojk, raka prostate, ščitnico, presnova, debelost itd. Nekatere hormone (tiroksin, tironin, dihidrotestosteron, itd) in tudi hormonske motilce povezujejo tudi z vplivom na adhezijo celic, saj se vežejo na vitronektinski receptor ($\alpha_v\beta_3$) in ga aktivirajo. Integrini so adhezijski proteini, preko katerih poteka adhezija celic na ekstracelularni matriks. Integrini z α_v - podenoto so vključeni v celično adhezijo in celično signaliziranje ter nekateri izmed njih so povezani z napredovanjem in razširjanjem tumorja. Integrin $\alpha_v\beta_3$ ali vitronektinski receptor je pomemben za angiogenezo in je pogosto ekspresiran v tumorskih celicah. Tako celice MCF-7 kot tudi HUVEC izražajo na površini $\alpha_v\beta_3$ integrine, ki jih najdemo tudi na tumorskih celicah.

Želeli smo določiti ali tako kot nekateri steroidni hormoni tudi triklokarban in triklosan vplivata na adhezijo celic MCF-7 in HUVEC na vitronektin. Najprej smo z testom viabilnosti preverili, pri kateri najvišji koncentraciji celice kažejo še ustrezno viabilnost. Tako smo določili najvišjo koncentracijo posamezne spojine, ki še ni citotoksična za izbrano celično linijo (na celicah MCF-7: 5 μM TCC in 10 μM TCS, na HUVEC pa 1 μM TCC in 5 μM TCS). To koncentracijo spojine in še dve nižji koncentraciji smo uporabili za test adhezije s sistemom xCELLigence RTCA. Rezultate smo dobili v obliki grafa celičnega indeksa v odvisnosti od časa, iz katerega smo izračunali povprečne naklone krivulje v izbranem intervalu med 30 minutami in 3 urami, ki je bil dolg vsaj 30 minut in ne več kot 1 uro. S pomočjo dobljenih rezultatov smo določili adhezijo celic, saj večji kot so celični indeksi, večji so povprečni nakloni krivulje in posledično večja je celična adhezija, kar lahko pomeni povečano možnost metastaziranja, če imamo v sistemu prisotne rakave celice.

Vpliva triklokarbana in triklosana na adhezijo celic MCF-7 nam ni uspelo dokazati. Določili pa smo, da triklokarban (1, 0,2 in 0,04 μM) in triklosan (5, 1 in 0,2 μM) povečata adhezijo HUVEC celic na vitronektin in tako lahko delujeta prokancerogeno. Za

triklokarban smo dokazali tudi koncentracijsko odvisen vpliv na celično adhezijo, pri triklosanu pa le delno koncentracijsko odvisnost.

Ključne besede:

triklokarban, triklosan, celična adhezija, MCF-7, HUVEC

ABSTRACT

Triclocarban (TCC) and triclosan (TCS) are encountered daily by using different consumers' products for personal care (solid and liquid soaps, shower gels, toothpaste, deodorant sticks, etc.). They are connected with many side effects and among other things they are classified as endocrine disrupting chemicals. Those are susceptible to all physiological systems which are hormone-sensitive. In addition, they affect men and women fertility, progress breast cancer, prostate cancer, thyroid, metabolism, obesity, etc. Some of the hormones (thyroxine, thyronine, dihydrotestosterone, etc.) and also the endocrine disrupting chemicals are connected with effects on cell adhesion, because they bind to the vitronectin receptor ($\alpha_V\beta_3$ integrin) and activate it. Integrins are adhesion proteins which enable adhesion of cells to extracellular matrix. Integrins with an α_V -subunit are involved in cell adhesion and cell signalling. Furthermore, some of them are related to the promotion and dissemination of tumor. Integrin $\alpha_V\beta_3$ or vitronectin receptor is important for angiogenesis and it is often expressed in the tumor cells. Both MCF-7 cells and HUVEC are expressed on the surface $\alpha_V\beta_3$ integrins, which are also found on tumor cells.

In the assay we wanted to determine if triclocarban and triclosan, similar at some other steroid hormones, have an impact on the adhesion of MCF-7 and HUVEC cells on vitronectin. Firstly, by the viability test the highest concentration that the cells still show properly viability was checked. The highest concentration of each compounds which is not cytotoxic for the chosen cell line (on MCF-7 cells 5 μ M TCC and 10 μ M TCS, on HUVEC cells 1 μ M TCC and 5 μ M TCS) was selected. This concentration of the compound and other two lower concentrations were used in an adhesion test with xCELLigence RTCA system. The results were obtained in the form of a graph cell index as a function of time. From the graph the average slope of the curve in the selected interval between 30 minutes and 3 hours was calculated. Each interval was at least 30 minutes long and no longer than 1 hour. Using the obtained results, the adhesion of cells was determined. The higher the cellular indexes are, the higher the average slope of the curve is and consequently the cell adhesion is higher. This can mean an increased possibility of metastasis if the cancer cells are present in the system.

The impact of triclocarban and triclosan on the adhesion of MCF-7 cells was not proven. It was determined that triclocarban (1, 0,2 in 0,04 µM) and triclosan (5, 1 in 0,2 µM) increase the adhesion of HUVEC cells on vitronectin and may operate procarcinogenic. For triclocarban it was also proved that there was a concentration-dependent effect on the cell adhesion, but for triclosan only partially concentration dependence.

Key words:

triclocarban, triclosan, cell adhesion, MCF-7, HUVEC

SEZNAM OKRAJŠAV

BSA	goveji serumski albumin
CI	celični indeks
cRGDfV	ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)
DMSO	dimetilsulfoksid
ECM	zunajcelični (ekstracelularni) matriks (ang. Extracellular matrix)
EGF	epidermalni rastni faktor
ENR	reduktaza enoil-acil nosilnega proteina (ang. enoyl-acyl-carrier protein reductase)
HM	hormonski motilci (ang. Endocrine Disrupting Chemicals – EDC)
HUVEC	endotelne celice popkovnične vene človeka (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
LAF	brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka
LC₅₀	srednja smrtna koncentracija – koncentracija snovi, ki ob enkratni izpostavljenosti usmrti 50 % testiranih osebkov
LD₅₀	srednja letalna doza ali srednji smrtni odmerek – je odmerek, ki pri polovici poskusnih živali povzroči smrt
LOAEL	najnižji odmerek, pri kateri so opazili neželeni učinek (ang. lowest-observed-adverse-effect level)
Log K_{ow}	porazdelitveni koeficient
MCF-7	linija človeških celic adenokarcinoma dojk (MCF-7 – Michigan Cancer Foundation-7, ang. Human breast adenocarcinoma cell line)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
NOAEL	najvišji odmerek, pri kateri še niso opazili neželeni učinek (ang. no-observed-adverse-effect level)
PBS	fosfatni pufer
PSI	pleksin-semaforin-integrin
RGD	Arg-Gly-Asp
RTCA	celična analiza v realnem času (ang. real-time cell analysis)
sEH	topna epoksidna hidrolaza (ang. soluble epoxide hydrolase)

t_{1/2}	razpolovna doba
TCC	triklokarban
TCS	triklosan
VN	vitronektin
Z₀	impedanca ozadja
Z_{celic}	impedanca celic

1. UVOD

1.1. HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci (HM) so snovi iz našega okolja, hrane in potrošnih izdelkov, ki so opredeljeni kot eksogeni dejavniki, ki ovirajo/spremenijo sintezo, sproščanje, transport, metabolizem, vezavo, izločanje hormonov prisotnih v telesu in so odgovorni za homeostazo, razmnoževanje in razvojne procese (1-3). Vsi fiziološki sistemi, ki so hormonsko občutljivi, so dovzetni za HM, vključno z možgani, nevroendokrinskim sistemom hipotalamusa, hipofizo, ščitnico, srčno-žilnim sistemom, maščobnim tkivom, trebušno slinavko ter pri ženskah mlečne žleze, jajčnikih in maternica, pri moških pa moda in prostata. Dokazano je, da HM vplivajo na plodnost moških in žensk, na razvoj raka dojk, raka prostate, ščitnico, presnovo, debelost itd. HM predstavljajo pomembno skrb za javno zdravje, kar lahko potrdimo z rezultati iz živalskih modelov, človeških kliničnih opažanj in epidemioloških študij (1).

HM imajo lahko agonistično ali antagonistično delovanje preko vezave na različne hormonske receptorje, kot so estrogensi, androgeni, progesteronski, glukokortikoidni, mineralokortikoidni, tiroidni in retinoidni receptorji. HM ne delujejo samo na jedrne receptorje, ampak tudi na steroidne nejedrne receptorje (membranski estrogensi) in nesteroidne receptorje (npr.: serotoninske, dopaminske in noradrenalinske) (1, 4, 5). Med HM danes vključujemo vse kemikalije oz. spojine, ki lahko vplivajo na sintezo, sekrecijo, transport, vezavo na receptorje ter eliminacijo endogenih hormonov in tako motijo ohranjanje homeostaznega ravnotesja (5). Skupina snovi opredeljena kot HM, je zelo heterogena, saj vključuje sintetične kemikalije, ki se uporabljajo kot industrijska topila in/ali maziva in njihove stranske produkte (npr.: poliklorirani bifenil, dioksini), plastiko (npr.: bisfenol A), mehčala (npr.: ftalati), pesticide (npr.: metoksiklor, diklorodifeniltrikloroetan-DDT), fungicide (npr.: vinklozolin) in zdravilne učinkovine (npr.: glatiramer acetat). Tudi naravne spojine, ki jih najdemo v hrani (npr.: fitoestrogen), lahko delujejo kot HM (1, 6).

V telesu je hkrati lahko prisotnih več različnih HM, tako znanih kot tudi neznanih, ki se lahko različno obnašajo v telesu glede na individualne razlike med ljudmi. Občutljivost za HM je povezana tudi z genetskimi dejavniki (1). Ob upoštevanju dejstev, ki veljajo za HM,

predvidevajo različno izražanje učinkov, in sicer se lahko kažejo na popolnoma drugačen način in s trajnimi posledicami pri zgodnjem zarodku, plodu ali novorojenčku, kot če je do izpostavitve prišlo v odrasli dobi. Glede na specifično razvojno obdobje, v katerem je prišlo do izpostavitve, se lahko spremeni potek razvoja. Spremembe se lahko izrazijo takoj in/ali šele potem, ko potomec dozori ali celo v srednjih letih, čeprav je do kritične izpostavljenosti prišlo že pri zgodnjem zarodku ali plodu (2, 5).

V večini primerov HM niso mutageni in akutno strupeni v koncentracijah izmerjenih v odpadnih vodah in blatu iz čistilnih naprav, zato jih sproščajo v okolje brez ustrezne previdnosti. Sam endokrini učinek spojin bi lahko ovrednotili s selekcioniranjem na hormonsko agonistično in antagonistično aktivnost z *in vitro* testi z uporabo hormonsko odvisnih celičnih kultur, saj ta preskus potrdi prisotnost HM, če so le ti hormonsko aktivni. Ta testiranja (*in vitro*) ne dajo popolnega odgovora o morebitnem učinku spojin na endokrini sistem, saj lahko motijo hormonski sistem preko drugih mehanizmov, zato je pomembno *in vivo* preučevanje medgeneracijskih učinkov na organizmih oz. živalih, kot so polži, raki, ribe itd (5, 6).

Hormonsko aktivne snovi, vključno z endogenimi ligandi, izkazujejo delovanje tudi na druge za življenje celic pomembne sisteme. Tako se nekateri hormoni (tiroksin, tironin, dihidrotestosteron, itd.) in tudi HM vežejo na vitronektinski (VN) receptor ($\alpha_V\beta_3$ integrin), ki omogoča adhezijo celic na VN (3, 7) in sicer v poseben žep na glavi $\alpha_V\beta_3$ integrina, ki se nahaja v bližini RGD prepoznavnega mesta (priloga I) (7).

1.2. INTEGRINI

Leta 1986 so Hynes in sodelavci za novo odkrito družino transmembranskih proteinov, ki služijo kot temeljne komponente ‚integralnega membranskega kompleksa,‘ ki povezuje citoskelet z zunajceličnim matriksom (ECM), uvedli izraz integrin (8). Integrini so transmembranski glikoproteini, ki omogočajo pritrditev (adhezijo) celic na ECM (celica-ECM) ali na druge celice (celica-celica) preko interakcij s proteini, kot so fibronektin, kolagen in vitronektin (VN) (8-10). Uravnavajo tudi signalno transduksijsko pot pomembno za najrazličnejše celične funkcije (8). Integrini so prisotni v vseh celicah z jedri, pogosto v velikem številu in več različnih je lahko hkrati izraženih v določeni celici (8, 11). Integrinski receptorji uravnavajo številne kritične celične procese, kot so adhezija, migracija, diferenciacija in izražanje genov. Ti procesi predstavljajo pomembno vlogo pri

rasti in razvoju angiogeneze, imunskega odziva, hemostaze, remodeliranju tkiva in pri številnih drugih fizioloških procesih (12). Integrini so predvsem receptorji za proteine ECM, vendar pa tudi prepoznavajo topne plazemske proteine in celo nekatere viruse in bakterije (8).

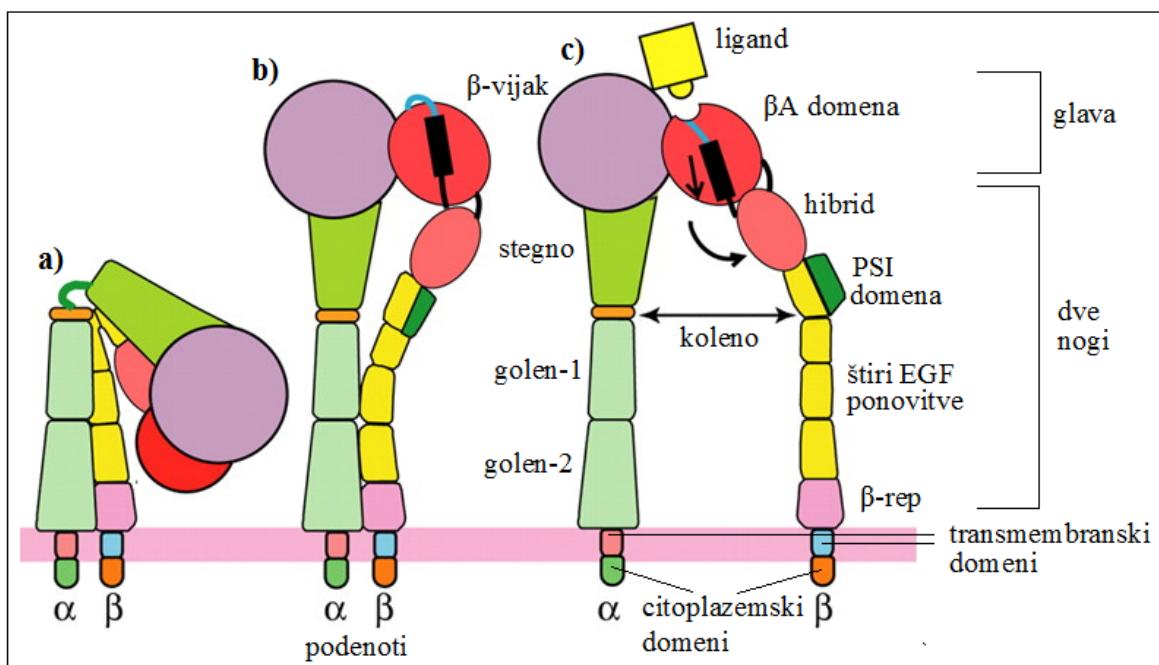
Integrini so heterodimeri različnih kombinacij α - in β -podenot, razdelimo jih lahko glede na njihove β -verige, vendar moramo upoštevati, da se nekatere α -verige lahko združijo z več različnimi β -verigami. Pri ljudeh je prisotnih 24 različnih integrinov, ki nastanejo z ne kovalentno povezavo med 18 različnimi α - in 8 različnimi β - podenotami (8, 11). Obe podenoti, α in β , sodelujeta pri prepoznavanju liganda, vendar obstaja nekaj odstopanj pri vezavi liganda z receptorjem, saj nekateri heterodimeri integrinov prepozna več kot en ligand in nekateri ligandi so prepoznani za več kot en integrin, razlikuje se le afiniteta vezave med njimi (8). Integrine lahko delimo tudi glede na prisotnost I domene (priloga II), na tiste, ki jo vsebujejo (α_1 -, α_2 -, α_{10} -, α_{11} -, α_D -, α_E -, α_L -, α_M - in α_X -podenota) in ostale, ki je ne vsebujejo. Delimo jih tudi na poddružine glede na vezavne sekvene oz. naravne ligande (priloga II):

- RGD receptorji – prepozna Arg-Gly-Asp (RGD) aminokislinsko zaporedje: $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_8$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$,
- kolagenski receptorji – vežejo kolagen: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$,
- lamininski receptorji – vežejo laminin: $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$,
- levkocitni receptorji – vežejo na imunoglobulinsko (Ig) naddružino receptorjev na nasprotnih celicah: $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_E\beta_7$ in
- ostali – vežejo na proteine ECM in receptorje: $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ (11-13).

Integrini so sestavljeni iz α - in β -podenote, ki tvorijo heterodimere, imajo dve »nogi«, na vrhu katerih je »glava« na katero se vežejo ligandi (11). Ena α -veriga in ena β -veriga skupaj tvorita dve nogi, ki sta vstavljeni v plazemske membrano (8). Vsaka podenota vsebuje veliko zunajcelično, transmembransko in kratko citoplazemske domene (razen integrini β_4 imajo precej daljšo) (14). Struktura integrina je prikazana na primeru za nas najbolj zanimivega $\alpha_V\beta_3$ integrina (slika 1).

Podenoto α sestavlja približno 1000 aminokislin, ki se delijo na štiri domene (pet domen pri integrinah, ki vsebujejo I-domeno). Zunajcelični (N-terminalni) del sestavlja β -vijak, stegno, gole 1 in gole 2. Na glavi se nahaja I domena oz. αA - domena pri integrinah z I-domeno. Med stegnom in gole 1 se nahaja še koleno, ki omogoča upogljivost α -

podenote. Golen 2 je pritrjena na kratko transmembransko domeno, le ta pa na citoplazemsko, ki predstavlja znotrajcelični (C-terminalni) del. I-domena je največje ligand vezavno mesto, ob njeni odsotnosti je za vezavo odgovoren β -vijak (slika 1) (8, 14). **Podenoto β** sestavlja približno 700 aminokislin, ki so razdeljene na osem domen. N-terminalni (zunajcelični) del je sestavljen iz β A- (oz I-domeni podobne), hibridne, PSI- (pleksin-semaforin-integrin) domene, štirih EGF (epidermalni rastni faktor) ponovitev in β -repa. PSI je s cisteinom bogata domena, ki je pomembna za vzdrževanje neaktivne konformacije integrina. Del vezavnega mesta za ligand tvori β A-domena. Med hibridno domeno, prvima dvema ponovitvama EGF in PSI-domenu se nahaja upogljiva kolsenska regija, ki je pomembna za tvorbo neaktivne konformacije integrina in se lahko zasuče do 135° . Pri regulaciji aktivnosti integrina ima pomembno vlogo β -rep, ki je pripet na transmembransko domeno in ta naprej na citoplazemsko, le ta je precej daljša kot pri α -podenoti, saj vsebuje štiri fibronektin tip III podobne ponovitve (slika 1) (8, 14).



Slika 1: Shema integrina $\alpha_V\beta_3$ – VN receptor v treh konformacijah; a) upognjena konformacija - neaktivna; b) zaprta iztegnjena konformacija – vmesno stanje; c) odprta iztegnjena konformacija - aktivna (15).

Glava je odgovorna za vezavo liganda, saj se med β -vijakom in β A-domeno tvori žep, v katerega se veže ligand. Ligand se lahko veže na integrin samo v iztegnjeni oz aktivni konformaciji, saj ima takrat visoko afiniteto do liganda. Domeni α A in β A vsebujueta od

kovinskega iona odvisno adhezijsko mesto (MIDAS), ki ima pri β A-domeni specifičen sekvenčni motiv Asp-X-Ser-X-Ser, katerega sekundarna struktura je podobna I-domeni in veže dvovalentne katione (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) (14).

Integrini komunicirajo preko plazemske membrane v obeh smereh, ločimo signalizacijo v celico (»outside-in«) in iz celice (»inside-out«). Signalizacija v celico poteka preko integrinov, ligandi se vežejo na ekstracellularne integrinske domene, kjer prihaja do konformacijskih sprememb, tako da se signal prenaša v celico. Signalizacija iz celice izhaja iz ne-integrinskih celičnih površinskih receptorjev ali citoplazemskih molekul in aktivira signalne poti znotraj celic, na koncu je posledica vidna v aktivaciji/deaktivaciji integrinov. Adhezija se ureja s konformacijskimi spremembami v integrinu (11, 16). Benigne in maligne epiteljske celice uporabljajo posebne integrine, da pridobijo epiteljsko mikrookolje za modeliranje najrazličnejše celične funkcije (preživetje, proliferacija, morfogeneza, diferenciacija, motiliteta, invazija in metastaziranje). Pokaže se pomembna spremembra, izguba polarizacije integrinov v malignih celicah. Integrini imajo na napredovanje tumorja splošen negativen regulatorni učinek, na kar kaže zmanjšano izražanje integrinov na karcinomih (npr. zmanjšano izražanje integrina $\alpha_2\beta_1$ pri karcinomu dojke, pankreasa in pljuč). Zaradi heterogenosti izražanja integrinov pri malignih epiteljskih tumorjih in pomembne vloge posameznih integrinov na rast tumorskih celic, preživetje, gibljivost in invazijo *in vitro*, so učinki integrinov na napredovanje tumorja odvisni od posameznih izraženih integrinov zaradi tumorja, vrste tumorja in molekulskega ozadja, v katerem so integrini izraženi (8).

1.2.1. Vitronektinski receptor

VN receptor ali $\alpha_V\beta_3$ integrin spada v družino RGD receptorjev, ki prepozna RGD zaporedje, ki omogoča prepoznanje proteinov ECM za osem različnih integrinov (7). Njegov naravni ligand je VN, ki se veže tudi na $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_5$ in $\alpha_{III}\beta_3$ integrine. Integrin $\alpha_V\beta_3$ je pomemben za angiogenezo in je pogosto ekspresiran v tumorskih celicah (7). Strukturne preuređitve zunajceličnih integrinskih domen so dokazali z elektronsko mikroskopijo. Dokazane so bile tri splošne kristalne strukture integrina $\alpha_V\beta_3$ (priloga III), upognjeno konformacijo – nizka afiniteta za ligand, podaljšana oblika z »zaprtim« delom glave (headpiece) konformacija – vmesno afinitetno stanje in razširjena oblika z »odprtim« naglavnim delom (headpiece) konformacija – visoka afiniteta (17).

Integrin $\alpha_v\beta_3$ prepozna poleg VN še druge glikoproteine, kot so adenovirusna kapsida, citotaktin, denaturirani kolagen, dezintegrin, fibronektin, fibrinogen, HIV Tat, kostni sialoprotein, laminin, MMP-2, osteopontin, protrombin, trombospondin in von Willebradov faktor (11). VN receptor $\alpha_v\beta_3$ lahko veže tudi nekatere hormone: dihidrotestosteron, tiroksin in trijodotironin (7). Interakcije z ligandi sprožijo terciarne in kvartarne strukturne preuređitve integrina, ki so potrebne za celično signalizacijo, vezava ligandov temelji na prepoznavni sekvenci RGD in prisotnosti dvovalentnih kationov. Na $\alpha_v\beta_3$ se v prisotnosti Ca^{2+} in Mn^{2+} veže VN, če pa je prisoten samo Mn^{2+} pa se veže osteopontin (20).

Integrini z α_v -podeno so vključeni v celično adhezijo in celično signaliziranje in nekateri izmed njih so povezani z napredovanjem in razširjanjem tumorja (21). Celice MCF-7 izražajo na površini $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ in $\alpha_v\beta_5$ integrine (21, 22). Celice HUVEC pa izražajo integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ in $\alpha_v\beta_3$. Endotelijski celični integrin $\alpha_v\beta_3$ omogoča interakcije med HUVEC in proteini ECM, kot so VN, fibronektin, fibrinogen, trombospondin itd. Te interakcije so pomembne za vaskularno celovitost, permeabilnost in angiogenezo, slednja je pomembna za razvoj zarodka ter celjenje ran, omogoča tudi rast tumorja, retinopatijo in različne vnetne motnje (23). Integrini posredujejo celično adhezijo in se neposredno vežejo na komponente ECM (kot so VN, fibronektin, laminin ali kolagen), s čimer zagotavlja sidrišče za celično motiliteto in invazijo. Tumorske celice izražajo integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ in $\alpha_6\beta_4$ v korelaciji z metastatskim napredovanjem v melanom, karcinom prostate, dojk, trebušne slinavke in raka na pljučih (24). Pomembno vlogo pri teh procesih ima integrin $\alpha_v\beta_3$, saj se izraža na nekaterih vrstah rakavih celic (na mnogih čvrstih tumorjih, vključno z rakom prostate, jajčnika, dojke, kože, ledvic in pljuč) in ima pomembno vlogo pri angiogenezi in metastaziranju tumorjev. Spojine, ki aktivirajo $\alpha_v\beta_3$ integrinski receptor, povečajo celično adhezijo in s tem tudi možnost za nastanek rakavih obolenj. To je bilo dokazano tudi za enega izmed potrjenih HM bisfenol AF, ki poveča celično adhezijo celične linije MCF-7 na VN (3).

1.3. CELIČNA ADHEZIJA

Celična adhezija je postopek vezave oz. pritrjevanja celic na druge celice ali ECM. Poteka preko adhezijskih proteinov, med katerimi so najpomembnejše adhezijske molekule integrini in selektini, poteka pa tudi preko kadherinov in imunoglobulinov (24, 25).

Celična adhezija je kompleksen proces, ki vključuje različne molekularne interakcije, kot so vezava receptor-ligand, spremembra toka informacij preko znotrajceličnih signalnih poti in modulacija citoskeleta. Pri eksperimentalnem delu smo preučevali adhezijo preko integrinov, ki so transmembranski receptorji, pomembni za pritrjevanje celic na ECM in celično signaliziranje (25).

1.3.1. Spojine, ki vplivajo na celično adhezijo

Več raziskav je bilo narejenih s spojinami, ki zmanjšajo celično adhezijo, tako da delujejo kot antagonisti VN receptorja. Takšne spojine bi lahko pomagale pri zdravljenju raka, osteoporoze in revmatoidnega artritisa. Nekaj primerov tovrstnih antagonistov so: cilengitid, vitaksin, L000845704, SB2730005. Te spojine so še v kliničnem razvoju (26, 27). V sklopu magistrske naloge pa smo se ukvarjali s spojinami, ki povečajo celično adhezijo, saj na podlagi tega sklepamo na povečano metastaziranje in povečano verjetnost za nastanek rakavih obolenj. Zanimale so nas predvsem spojine, ki povečajo adhezijo celic preko aktivacije $\alpha_V\beta_3$ integrina. Zasledili smo le bisfenol AF, ki signifikantno poveča celično adhezijo celic MCF-7 preko aktivacije $\alpha_V\beta_3$ integrina na VN (3). Adhezijo poveča tudi dobro raziskan kancerogen benzapiren, vendar preko vezave celičnih adhezijskih molekul (npr. ICAM-1) na β_2 integrine, kar pospeši potek ateroskleroze (28).

1.4. TRIKLOKARBAN

1.4.1. Fizikalno-kemijske lastnosti TCC

TCC, 3-(4-klorofenil)-1-(3,4-diklorofenil)sečnina, je bel fin prah, šibkega vonja, ki je v uporabi že več kot 45 let po vsem svetu (29-31). Gre za halogeniran amid, ki lahko reagira z azo in diazo spojinami, pri čemer nastajajo strupeni plini. TCC je kot ostali amidi zelo šibka baza, šibkejša kot voda (29). Fizikalno – kemijske lastnosti TCC so zbrane v prilogi IV (29-34). TCC je topen v metanolu, acetonu, dimetilformamidu, a v vodi je praktično netopen (30, 33). Zelo je obstojen na svetlobi, vendar razпадa pri visoki temperaturi (250-255 °C), pri tem oddaja zelo strupene hlapne vodikovega klorida in dušikovega oksida (30). TCC razпадa na p-kloroanilin in/ali 3,4-dikloroanilin, oba ali eden izmed njiju pa je tudi izhodna spojina pri proizvodnji TCC (32). TCC ima eksperimentalno vrednost porazdelitvenega koeficienta ($\text{Log } K_{ow}$) 4,2, kar nakazuje visok potencial kopčenja v organizmu (34, 35). TCC je analog triklosana (31).

1.4.2. Viri in izpostavljenost TCC

TCC se uporablja kot bakteriostatik in antiseptik. Najpogosteje smo mu izpostavljeni med osebno nego, saj ga najdemo v približno 30 % trdih in tekočih milih, gelih za tuširanje ter ostalih pripravkih za osebno nego. Najbolj je izpostavljena koža, ker te izdelke nanašamo dermalno. Najdemo ga tudi v plastiki in tekstu (29-31, 34, 36). Večina študij človeške izpostavljenosti za TCC je bilo narejenih z uporabo ^{14}C -označene spojine. Odkrili so TCC tudi v površinskih vodah in odpadnem blatu vseh analiziranih čistilnih naprav in kanalizacij (US EPA). Njegova ugotovljena vsebnost v odpadnem blatu je bila do 0,44 g/kg. Odpadno blato se pogosto uporablja kot gnojilo na zemljiščih in tako zagotavlja še en način vstopa TCC v vodno okolje in kopičenja v tleh. Ugotovili so tudi, da se kopiči v polžih, ribah in algah (32, 37, 38). V odpadnem blatu so odkrili oba, TCC in TCS v visokih koncentracijah, v vzorcu tal, ki so bila gnojena z njim pa sta v sledovih ali nizkih koncentracijah (39).

1.4.3. Delovanje in uporaba TCC

TCC je snov z antibakterijskim in protigličnim delovanjem, ki je aktiven predvsem proti gram-pozitivnim bakterijam. Identificirane aplikacije uporabe so antiseptik v kozmetiki in toaletnih milih, bakteriostatik in germicid. Ima omejen antimikroben spekter, saj je usmerjen le na nekatere bakterije in glive, preko inhibicije aktivnosti encima enoil-acil nosilne protein reduktaze (ENR), ki pomaga graditi celične membrane v nekaterih bakterijah in glivah. Evropska unija določa, da se lahko TCC uporablja kot konzervans do najvišje koncentracije 0,2 % v kozmetičnih izdelkih, vendar se lahko v nekaterih izdelkih, kot so izdelki za izpiranje rok in nego telesa, uporablja v višjih vrednostih do 1,5 % (pod pogojem, da se priložijo podatke, ki zagotavljajo njegovo varnost) (34, 36, 38).

Pred kratkim so ugotovili, da je TCC HM, ki poveča aktivnost endogenih hormonov na androgen in estrogenski receptor (*in vitro* biološki testi). Prav tako se je v *in vitro* študijah izkazalo, da ima protivnetne učinke, ki se lahko terapevtsko izkoriščajo preko inhibicije aktivnosti topne epoksidne hidrolaze (sEH) in tako vpliva na biološko regulacijo vnetja, bolečine in krvnega tlaka (37, 38, 40). Poleg tega so ugotovili, da oksidativni metabolizem TCC povzroči nastanek reaktivnih intermedirov, ki se lahko kovalentno vežejo na proteine (37).

1.4.3.1. Farmakokinetika TCC

Za določanje ADME lastnosti (absorpcije, distribucije, metabolizma in izločanja) TCC *in vivo* se uporablja radioaktivno označen ¹⁴C-TCC (40). TCC se zmerno absorbira (27 %) preko peroralne poti, kar je odvisno od nosilca in izpostavljenosti. Absorpcija in biološka uporabnost po dermalni aplikaciji pa je slabša, in sicer 7 % pri TCC raztopljenem v acetonu in nanesenem na kožo brez izpiranja. Ob upoštevanju, da kožo običajno izperemo, je sistemsko razpoložljivo le 0,39 % celotnega uporabljenega odmerka TCC. *In vitro* študije z modeli nepoškodovane in umetno spremenjene (poškodovane) človeške kože so pokazale, da je poškodovana koža 2-krat bolj prepustna kot nepoškodovana koža (36). TCC se obsežno in hitro presnavlja, še posebej v spojine, ki so bolj vodotopne in zato se tudi lažje izločijo iz telesa (36, 41). Podleže reakcijam konjugacije in hidroksilacije, pri čemer so glavni metaboliti: N- in N'-glukuronid TCC in sulfati 2',6-dihidroksi TCC ter 6-hidroksi TCC (36). Glavni presnovki v plazmi in urinu pri človeku so N- in N'-glukuronidi TCC, ki se iz plazme v urin eliminirajo z razpolovno dobo ($t_{1/2}$) 2 uri. Medtem pa se hidroksi- in dihidroksi-sulfati TCC eliminirajo z $t_{1/2}$ 20 h, predvidoma preko žolča. Ključno vlogo za izločitev TCC iz telesa ima glukuronidacija tako pri žolčnem, kot tudi pri ledvičnem očistku. Glavna pot izločanja metabolitov TCC je v blato in znaša približno 60 – 90 % (36, 37, 40, 41). Po vsaki izpostavljenosti ljudi z TCC so ga kvantificirali tudi v urinu, največje koncentracije N-glukuronida TCC v urinu so izmerili v 12-24 urah po izpostavljenosti, vendar močno variirajo med posamezniki. Po enkratni izpostavljenosti potrebuje človeško telo 72 ur, da se očisti TCC. Po dolgotrajni izpostavljenosti se TCC in njegovi presnovki ne kopijo v telesu, vendar pa izločanje z urinom doseže stalen nivo $79 \pm 20 \mu\text{g TCC/g kreatinina}$ in kaže na stalno stanje obremenitve telesa s TCC (37).

1.4.3.2. Toksični učinki TCC

Pri TCC ni bilo ugotovljenih rakotvornih in genotoksičnih učinkov, saj ni bila dokazana z odmerkom povezana povečana pojavnost tumorjev na katerem koli organskem sistemu ter v *in vitro* študijah niso dokazali genskih mutacij in kromosomskih nepravilnosti. Določili pa so zmerno reproduktivno toksičnost, ki se kaže kot znižana stopnja nosečnosti in števila živih mladičev ob rojstvu ter zmanjšana teža mod in majhna ohlapna moda. Ima tudi zmeren vpliv na endokrino aktivnost in je potencialen HM. Akutna toksičnost TCC za sesalce je nizka, gre za majhno nevarnost ob dermalni in peroralni aplikaciji ter je akutna peroralna LD₅₀ večja od 2.000 mg/kg (34-36). Pri ljudeh TCC ne povzroča tveganja za

iritacijo kože, saj je le ta možna v koncentracijah večjih od 9 % (36). Sistemski učinek TCC se razlikuje ali gre za enkratni ali ponavljajoči odmerek, pri enkratnem odmerku ima nizek vpliv, pri ponavljajočem pa zmeren, kar temelji na najnižjem ugotovljenem LOAEL 75 mg/kg/dan, ki je povzročil anemijo in povečano težo organov (povečanje jeter, vranice, teže srca itd.). NOAEL za TCC pa znaša 25 mg/kg/dan in izhaja iz študij toksičnosti s ponavljajočimi odmerki v ustrezno izvedenih 2 letnih študijah krmljenja podgan. Za oceno nevrotoksičnosti TCC so podatki pomanjkljivi. TCC ne povzroča preobčutljivosti kože ljudi, povzroči pa zmerno iritacijo oči, ki se kaže kot otekanje šarenice in rdečica (34-36). Za vodno okolje in vodne organizme (ribe, vodne nevretenčarje in vodne rastline) sta akutna in kronična toksičnost visoki, kar lahko potrdimo z naslednjimi podatki: LC₅₀ manjšim od 1 mg/L pri akutni in manjšim od 0,1 mg/L pri kronični toksičnosti (34). Uvrščamo ga v skupino kemikalij z visoko obstojnostjo, saj je slabo biorazgradljiv, ker ima t_{1/2} med 60 in 180 dni v zemlji. Log K_{ow} se uporablja za oceno bioakumulacije in znaša 4,2 za TCC, kar predstavlja zmerno nevarnost za kopičenje v organizmu. TCC ni vnetljiv, je slabo reaktiv, ni eksploziven in nima funkcionalnih skupin, ki bi se oksidirale ali tvorile visoko energetske vezi. Toksični učinki TCC so zbrani v prilogi V (34-36).

1.5. TRIKLOSAN

1.5.1. Fizikalno-kemijske lastnosti TCS

TCS, 5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol je bel do umazano bel kristaliničen prah z rahlo aromatičnim vonjem, ki je v uporabi že več kot 40 let. TCS je biocid, ki ga najdemo v številnih proizvodih, vključno s kozmetiko (42). Fizikalno kemijske lastnosti TCS so zbrane v prilogi IV (43-46). Topen je v alkahlih raztopinah in številnih organskih topilih, kot so aceton, etanol, izopropanol, propilen glikol, itd. V vodi pa je njegova topnost slaba, 12 mg/L pri 20 °C (42, 43). TCS je stabilen, vendar pa je nezdružljiv z močnimi oksidanti (44). Odporen je na hidrolizo, obstojen je v anaerobnih pogojih in stabilen v pH območju med 5 in 9, kjer je delno v anionski obliki (42, 47). TCS je lipofil, zato se lahko kopiči v organizmu v maščobnem tkivu (48). Razgradnja TCS v tleh poteka v aerobnih pogojih, preko tvorbe metil-TCS. Fotolitska razgradnja je bila eksperimentalno izmerjena v sladki (t_{1/2}=8 dni) in morski vodi (t_{1/2}= 4 dni), kjer je produkt razgradnje 2,8-diklorodibenzo-p-dioksin (47). Občutljiv je tudi na svetlobo. Eden glavnih produktov razpada je 2,4-diklorofenol. Do razgradnje TCS pride tudi z oksidacijo z ozonom, klorom, poteka pa tudi biorazgradnja z mikroorganizmi (42).

1.5.2. Viri in izpostavljenost TCS

TCS je vključen v številne izdelke za osebno nego, vključno z deodorantskimi mili in stiki, tekočimi mili ter izdelki za izpiranje ust ter zobnimi pastami. Uporabljen je tudi v izdelkih za čiščenje, kot so različni detergenti, pralni praški, površinska čistila, razkužila. Najdemo ga tudi v medicinskih pripomočkih, farmacevtskih in veterinarskih izdelkih, pesticidih, plastičnih materialih, barvah ter tekstu (40, 42, 45, 47-51). V Evropski uniji se 85 % proizvedenega TCS porabi za izdelke osebne nege, 10 % za plastične materiale in 5 % za tekstil (47). Izpostavljenost TCS je posledica lokalne uporabe izdelkov za osebno nego, dermalnega stika z različnimi proizvodi, ki ga vsebujejo, zaužitja zobne paste, kontaminirane hrane in vode ali drugih okoljskih izpostavljenosti, kot je vdihovanje onesnaženega prahu (40, 50). Skozi kanalizacijo se odstrani približno 96 % uporabljenega TCS, ki se nahaja v izdelkih in tako preko sistema za čiščenje odpadnih voda lahko preide v okoljske vode. S tem se poveča izpostavljenost vodnih organizmov (alge, ribe, nevretenčarji) in tudi ljudi, saj zaide tudi v pitno vodo. Alge so najbolj občutljiva vrsta za TCS (49). V čistilnih napravah so tudi našli TCS, ki se lahko preko odpadnega blata širi v površinske vode in tla ter tako obremenjuje naravo (42).

1.5.3. Delovanje in uporaba TCS

Uporablja se kot antiseptik, razkužilo (pri nižjih koncentracijah je bakteriostatik, pri višjih pa baktericid) in konzervans v različnih potrošniških izdelkih (42, 44). TCS je antimikrobno sredstvo s širokim spektrom delovanja, ki zajema gram-pozitivne in gram-negativne ne sporogene bakterije, nekatere glice, *Plasmodium falciparum* in *Toxoplasma gondii* (42, 48). TCS je tako kot TCC inhibitor ENR, ki je bistven encim pri sintezi maščobnih kislin pri bakterijah. Z zaviranjem aktivnega mesta, TCS inhibira ENR encim in tako bakterijam prepreči sintezo maščobnih kislin potrebnih za izgradnjo celične membrane in reprodukcijo. Ljudje nimamo ENR encima, zato je neškodljiv za nas. TCS je močan inhibitor, zato so potrebne majhne količine za močno protibakterijsko delovanje (42, 46, 48, 50). Inhibitorni učinki na mikroorganizme se začnejo že pri koncentraciji 25 µg TCS/L. Na encimsko aktivnost pa ima TCS minimalen vpliv (42). Uporaba TCS v potrošniških izdelkih je dovoljena pri najvišji koncentraciji 0,3 %. Evropska unija prepoveduje uporabo TCS za živilsko-kontaktno plastiko ter kot konzervans za živila in krmo (42, 47, 51, 52). Obstajajo pomisleki, da se ob razširjeni uporabi nizkih koncentracij

biocidov, vključno s TCS, lahko razvije rezistenca na njih, vendar pa doslej ni epidemioloških podatkov povezanih z izbruhom rezistence za TCS (42, 48).

Poleg tega, da ima TCS antimikrobnlo delovanje, so opazili tudi vpliv na endokrini sistem (HM), oslabitev kontrakcije srčne in skeletnih mišic, ugotovili pa so tudi povezavo med TCS in alergijskim ali senenim nahodom pri otrocih, alergijami in preobčutljivostjo na hrano (40). Za TCS se je izkazalo, da je akutno strupen za vodne organizme, predvsem za alge. Ugotovili so pa celo vpliv na delovanje ščitnice pri dvoživkah že pri zelo nizkih koncentracijah ($0,15 \mu\text{g/L}$) (42, 53).

1.5.3.1. Farmakokinetika TCS

Za proučevanje farmakokinetičnih lastnosti TCS se uporablja ^{14}C -označen TCS in/ali ^3H -označen TCS (52). Sistemsko cirkulacijo doseže TCS preko absorpcije skozi sluznico ustne votline in gastrointestinalnega trakta po peroralni administraciji, preko kože po dermalni aplikaciji in skozi mukozna tkiva po vaginalni uporabi (50). TCS se hitro in obširno absorbira iz prebavil po peroralni uporabi, in sicer do 98 %, vendar pa se v normalnih pogojih (geli za tuširanje) absorbira preko kože le 5-10 % odmerka. Največ TCS se porazdeli v plazmi in v nekatere organe, kjer so vrednosti višje kot $1,3 \mu\text{g/g}$. Iz tega sklepamo, da so tarčni organi dispozicije TCS gastrointestinalni trakt, ledvice, jetra in žolčnik. Vezavo TCS na plazemske proteine so določili z *in vitro* študijami ter opredelili za ljudi, da je vezava 98,4-99,2 %. V materino mleko se porazdeljuje 20-300 μg TCS/kg lipidov in posledično so izpostavljeni tudi dojenčki, vendar so pri njih določene koncentracije nižje. Več kot 90 % absorbiranega TCS se metabolizira, kar privede do hidroksilacije na obroču in cepitve eterske vezi, pri čemer nastajata dva produkta, 2,4-diklorofenol in 4-klorokatehol. V jetrih in koži se TCS presnavlja v prvi vrsti v glukuronidne in sulfatne konjugate. Po izpostavljenosti TCS je pri odraslih ljudeh $t_{1/2}$ med 13,4 in 21,0 ur. Po peroralni in intravenski izpostavitvi se izloči 57-87 % TCS z urinom in 10-33 % z blatom (40, 42, 50, 52, 54, 55). Najdemo ga v mnogih človeških tekočinah, vključno z urinom, krvjo, serumom, plazmo, mlekom in plodovnico (40, 42).

1.5.3.2. Toksični učinki TCS

TCS kaže zmerno reproduktivno toksičnost, ki se kaže z zmanjšano proizvodnjo sperme in histopatološkimi spremembami v spolnih žlezah, ki so povezane z motnjami v endokrinem sistemu. Zaradi učinkov na ščitnico in spolne hormone so ocenili zmerno verjetnost za

endokrine motnje, zato TCS spada med HM (46-48). Predstavlja zelo visoko tveganje za akutno toksičnost pri sesalcih, ki je bila določena na podlagi vdihovanja, LC₅₀ je manjša od 0,5 mg/L. Peroralno določen LD₅₀ je večji od 5000 mg/kg in po dermalni aplikaciji je večji od 6000 mg/kg (47). Ocena sistemске toksičnosti (imunotoksičnosti) po enkratnem odmerku predstavlja zelo visoko tveganje, po ponavljajočem odmerku pa zmerno ter opažene so bile patološke spremembe jeter. NOAEL za TCS je 12 mg/kg/dan. TCS predstavlja veliko nevarnost za draženje kože in oči. Tako akutna kot kronična strupenost TCS je za vodne organizme zelo visoka. Akutna toksičnost za vodne organizme je določena z LC₅₀ manj kot 1 mg/L, kronična pa pod 0,1 mg/L. TCS se v okolju ne razgrajuje in je obstojen v tleh. LogK_{ow} je 4,76, kar kaže na visoko bioakumulacijo. TCS je nereaktivnen in ni vnetljiv. Toksični učinki TCS so zbrani v prilogi V (46-48, 50, 52, 55).

2. NAMEN DELA

Veliko snovi, s katerimi se srečujemo vsakodnevno, lahko deluje kot hormonski motilec. V literaturi se pojavljajo podatki, da lahko endogeni hormoni (npr. tiroidni, steroidni hormoni) in njim podobni hormonski motilci, kot je npr. bisfenol AF, vplivajo tudi na adhezijske procese in na ta način posredno delujejo rakotvorno. Bisfenol AF izkazuje povečano adhezijo vitronektina preko aktivacije integrina $\alpha_v\beta_3$, ki se povečano izraža pri različnih rakavih obolenjih in ima pomembno vlogo pri angiogenezi in metastaziranju tumorjev. Za spojine, ki aktivirajo $\alpha_v\beta_3$ integrin, je potrjeno, da povečajo celično adhezijo. Kot testni sistem za *in vitro* določanje aktivnosti spojin na vitronektinski receptor se pogosto uporablja celični liniji MCF-7 in HUVEC, ki imata v membrani izražen ta receptor.

Cilj našega eksperimentalnega dela je določiti spremembo adhezije celic MCF-7 in HUVEC na vitronektinski receptor ob predhodni izpostavitvi triklokarbanu in triklosanu. S tem bomo skušali potrditi ali ovreči hipotezo, da se tako kot bisfenol AF, tudi TCC in TCS lahko vežeta na vitronektinski receptor in koncentracijsko odvisno povečata celično adhezijo ter tako delujeta prokancerogeno.

Sprva bomo testirali citotoksičnost spojin v različnih koncentracijah na obeh celičnih linijah (MCF-7 in HUVEC), tako da bomo preverjali viabilnost celic z MTS testom. Določili bomo najvišjo koncentracijo posamezne spojine, ki še ni citotoksična za izbrano celično linijo na osnovi deleža viabilnosti celic glede na kontrolo (0,1 % DMSO). Test adhezije bomo izvedli le za koncentracije spojin, ki bodo dosegle ustrezni delež viabilnosti (80 % pri celicah MCF-7 in 90 % pri HUVEC) in v dveh nižjih koncentracijah. Adhezijo bomo vrednotili s sistemom xCELLigence RTCA, ki je čitalec posebnih E-plošč in poda rezultate v obliki krivulje celičnega indeksa v odvisnosti od časa. S pomočjo xCELLigence RTCA programa bomo tudi izračunali povprečne naklone krivulje v prvih treh urah. Celični indeks in povprečni nakloni krivulj nam bodo služili za določitev adhezije celic, saj večji kot je celični indeks, večji so povprečni nakloni krivulje in posledično je večja adhezija celic.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Testirani spojini

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili spojini triklokarban (TCC) in triklosan (TCS).

Preglednica I: Testirani spojini s pripadajočimi osnovnimi kemijskimi podatki (33, 46).

Ime spojine	Triklokarban (TCC)	Triklosan (TCS)
Strukturna formula		
Molekulska formula	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
IUPAC ime	3-(4-klorofenil)-1-(3,4-diklorofenil)sečnina	5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol
Molska masa	315.58 g/mol	289.54 g/mol
Registrska številka CAS	101-20-2	3380-34-5
Kakovost, stopnja čistote	> 99 %	100 %
Proizvajalec, kraj	Sigma-Aldrich, Nemčija	Sigma-Aldrich, Nemčija

3.1.2. Reagenti

Reagenti in njihovi proizvajalci, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu:

- ~ goveji serumski albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- ~ ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (cRGDfV) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- ~ dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- ~ 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (MTS reagent) (Promega, Nemčija),
- ~ fosfatni pufer (PBS) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- ~ tripan modro (barvilo) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- ~ tripsin (Sigma-Aldrich, Nemčija),

- ~ tripsin nevtralizacijska raztopina (Lonza, Švica) in
- ~ vitronektin (VN) (Sigma-Aldrich, Nemčija).

3.1.3. Raztopine

Sestava raztopin, ki smo jih pripravili in uporabili pri eksperimentalnem delu:

- ~ 1 % BSA: 1 % BSA denaturiramo 10 minut pri 85 °C v vodni kopeli. BSA se uporablja za nespecifično blokado pri adheziji.
- ~ 0,2 % in 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (sestava medija – poglavje 3.1.5.) (krajše 0,2 % in 0,1 % DMSO).
- ~ VN (10 µg/mL): osnovna raztopina VN ima koncentracijo 1 µg/µL, le to razredčimo s PBS do ustrezne koncentracije. Odmerimo 1,5 mL PBS, ter odvzamemo 15 µL in zavržemo, nato dodamo 15 µL osnovne raztopine VN (1 µg/µL) ter nežno premešamo s koničnim mešalom (vortex).
- ~ Raztopine vzorcev (TCC, TCS) (µM): sprva pripravimo ti. založne raztopine (mM) v DMSO (stock solution), nato jih petstokrat redčimo z medijem, tako da imamo 0,2 % DMSO v mediju.

3.1.4. Celični liniji

Pri raziskovalnem delu smo uporabili dve celični liniji: MCF-7 in HUVEC. Celična linija MCF-7 je linija človeških celic adenokarcinoma dojk. HUVEC je celična linija endotelnih celic popkovnične vene človeka.

3.1.4.1. Celična linija MCF-7

Celična linija MCF-7 je izolirana iz celic raka dojke 69 letne kavkaške ženske leta 1970. MCF-7 je kratica za Michigan Cancer Foundation -7, ki se nanaša na inštitut v Detroitu, kjer je bila celična linija ustvarjena leta 1973 s strani Herberta Soule in njegovih sodelavcev. Michigan Cancer Foundation je zdaj znan kot Barbara Ann Karmanos Cancer institute. Celična linija MCF-7 so rakave celice in so nesmrtné (56, 57).

3.1.4.2. Celična linija HUVEC

Celična linija HUVEC so celice pridobljene iz človeškega endotelija popkovne vene, so primarne celice, v nasprotju od MCF-7 niso nesmrtné. Uporablja se kot laboratorijski model za proučevanje funkcije in patologije endotelijskih celic (58).

3.1.5. Gojišči

Vsako celično linijo gojimo v svojem mediju, ki je najbolj prilagojen potrebam za življenje posamezne celične linije.

3.1.5.1. Gojišče za celično linijo MCF-7

Celično linijo MCF-7 gojimo v sofisticiranem DMEM/F12 mediju (proizvajalec Invitrogen) dopolnjenim s 5 % FBS – fetalnim govejim serumom (Gibco), 20 ng/mL EGF – epidermalnim rastnim faktorjem (Sigma), 20 µg/mL insulinom (Sigma), 0,5 µg/mL hidrokortizonom (Sigma), 4 mM L-glutaminom (Sigma), 100 IU/mL penicilinom (Sigma) in 100 µg/mL streptomicinom (Sigma).

3.1.5.2. Gojišče za celično linijo HUVEC

Medij EGM-2 SingleQuots (proizvajalec Lonza) se uporablja za gojenje celične linije HUVEC in je sestavljen iz naslednjih komponent:

- ~ FBS – fetalni goveji serum (10 mL),
- ~ hidrokortizon (0,2 mL),
- ~ hFGF-β – humani fibroblastni rastni faktor-osnovni (2 mL),
- ~ VEGF – vaskularni endotelijski rastni faktor (0,5 mL),
- ~ R3-IGF-1 – rekombinantni inzulinu podoben rastni faktor-1 (0,5 mL),
- ~ askorbinska kislina (0,5 mL),
- ~ hEGF – humani epidermalni rastni faktor (0,5 mL),
- ~ GA – gentamicin/amfotericin-B (0,5 mL)
- ~ heparin (0,5 mL) in
- ~ EBM-2 – endotelijski rastni osnovni medij (do 500 mL).

Proizvajalec nam vse sestavine medija pošlje kot komplet, iz katerega pripravimo medij po njegovih navodilih.

3.1.6. Laboratorijske aparature

- ~ LAF komora (Iskra, Šentjernej, Slovenija) je brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka od zgoraj navzdol. Nameščena je v posebnem prostoru, kjer velja poseben režim čistote po načelih aseptičnih pogojev. V njej je potekalo delo s celicami, od zasajanja celic do nanosa na mikrotitrsko ploščice.
- ~ Centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija) se uporablja za centrifugiranje.

- ~ Inkubator MCO-18AIC (Sanyo, ZDA), ki v našem primeru vzdržuje temperaturo 37 °C in 5 % atmosfero CO₂.
- ~ Invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Tokio, Japonska)
- ~ Vibracijski mešalnik (Biosan, Latvija)
- ~ Avtomatska multiikanalna pipeta (Biohit, Helsinki, Finska) omogoča pipetiranje do 8 vdolbinic hkrati z razponom volumnov od 50 do 350 µL.
- ~ Čitalec mikrotitrskih plošč – Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek, Vermont, ZDA) se uporablja za spremljanje sprememb vzorcev na mikrotitrskih ploščah. Z njim smo merili absorbanco vzorcev na mikrotitrski ploščici pri 490 nm.
- ~ xCELLigence system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija): uporablja se za dinamično spremljanje celične adhezije in širjenja celic.

3.1.7. Ostala laboratorijska oprema in pripomočki

- ~ Gojivna posoda (TPP, Transadingen, Švica) je sterilna, ima površino 75 cm² in perforiran zamašek.
- ~ Krioviale – 1 mL (TPP, Transadingen, Švica)
- ~ Serološke pipete za enkratno uporabo – 1, 5, 10, 25 in 50 mL (TPP, Transadingen, Švica)
- ~ Hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija) je objektna ploščica s števnimi Neubauerjevimi komorami, ki se uporablja za štetje celic.
- ~ Mikrotitrská ploščica tipa 92096 (TPP, Transadingen, Švica) s 96 vdolbinami, prozorna.
- ~ Ploščica za adhezijo – E-Plate 16 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija) ima 16 vdolbinic, je za enkratno uporabo in se uporablja za izvedbo testov na sistemu xCELLigence.

3.2. METODE

3.2.1. Osnove dela s celicami

Pri delu s celicami se poslužujemo aseptične tehnike. S celicami smo delali v LAF komori, to je brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka, ki je nameščena v posebnem ločenem prostoru. Pred in po uporabi smo komoro sterilizirali s pol urnim obsevanjem z ultravijolično svetlobo in očistili delovno površino s 70-odstotnim etanolom. Ves material

smo razkužili s 70-odstotnim etanolom pred uporabo v LAF komori, prav tako smo razkužili tudi zaščitne rokavice, ki smo jih uporabljali pri celotnem eksperimentalnem delu.

Pomembno je pravilno ravnanje z nevarnimi odpadki, saj predstavljajo nevarnost za okolje. Vso laboratorijsko opremo in pripomočke za enkratno uporabo, ki so prišli v stik z biološkim materialom (celice), zavržemo v posebne zabojnike (rumene), ki se uporablja za nevarne odpadke. Te zabojnike nato odpelje in uniči za to usposobljena služba.

3.2.2. Odmrzovanje celic

Celice so v obliki suspenzije shranjene v krioviali v tekočem dušiku, zato jih moramo pred začetkom dela odmrzniti. Celice moramo na hitro odmrzniti (v vodni kopeli jih segrevamo na 37 °C 2-4 minute), da preprečimo toksične učinke krioprotектanta (DMSO). Odmrznjene celice smo prenesli v 15 mL centrifugirko in jih resuspendirali v 10 mL ustreznega gojišča ter jih nato centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli, a celice, ki so ostale v sedimentu, smo resuspendirali v svežem gojišču. Tako pripravljeno suspenzijo prenesemo v sterilno gojitveno posodo površine 75 cm² in postavimo v inkubator.

Zgoraj opisan postopek odmrzovanja uporabljamo za različne celične linije z manjšimi razlikami. Postopek za odmrzovanje celic MCF-7 poteka, kot je opisano v zgornjem postopku, medtem ko pri odmrzovanju HUVEC celic teh ne centrifugiramo, ampak takoj, ko jih odmrznemo, prenesemo vsebino krioviale skupaj z nekaj mL gojitvenega medija v gojitveno posodo. Počakamo 4 ure, da se celice pritrdijo na površino posode in nato zamenjamo medij.

3.2.3. Gojenje celične linije

Gojenje poteka enako pri obeh celičnih linijah, le da pri posamezni celični liniji uporabimo njej ustrezen gojitveni medij. Celično linijo MCF-7 gojimo v sofisticiranem DMEM/F12 mediju dopolnjenim s 5 % fetalnim govejim serumom, EGF, insulinom, hidrokortizonom, L-glutaminom, penicilinom in streptomycinom. Za gojenje celične linije HUVEC pa se uporablja medij EGM-2 Single Quots, ki je sestavljen iz FBS, hidrokortizona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, askorbinske kisline, hEGF, heparina in EBM-2.

Za svoje preživetje in rast potrebujejo celice kontrolirano okolje, zato smo jih gojili v sterilnih gojitvenih posodah velikosti 75 cm^2 , v specializiranem inkubatorju (pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ v navlaženi atmosferi s 5 % CO_2) in v ustremnem gojišču. Na 2 do 3 dni zamenjamo celicam gojitveni medij.

Celice se presajajo, ko prerastejo 80 % površine. Pred začetkom presajanja smo gojitveni medij, PBS in tripsin segreli na približno $37\text{ }^\circ\text{C}$ v posebej za to namenjenem inkubatorju ali vodni kopeli. Iz gojitvene posode smo najprej odpipetirali gojitveni medij. Obe celični liniji sta adhezijski, zato so celice ostale pritrjene na dno posode. Celice smo sprali s 5 mL PBS, tako da smo odstranili sledove medija. PBS inhibira tripsin in tako poslabša odlepljanje celic od površine s tripsinom. Nato smo dodali 5 mL raztopine tripsina in inkubirali 4 minute pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ v inkubatorju. Po inkubaciji preverimo, če so se celice odlepile od dna gojitvene posode z invertnim svetlobnim mikroskopom. Celotno dobljeno celično suspenzijo smo prenesli s serološko pipeto za enkratno uporabo v 15 mililitrsko centrifugirko, dodali 5 mL gojitvenega medija (MCF-7) oziroma 5 mL tripsin nevtralizacijske raztopine (HUVEC), s katerim nevtraliziramo tripsin in centrifugirali 5 min pri 1000 obratih/min. Po centrifugiranju odpipetiramo supernatant, ga zavrzemo in sediment celic na dnu centrifugirke resuspendiramo v svežem gojitvenem mediju s pomočjo pipete ali vibracijskega mešalnika. Presajanje celic smo izvajali po priporočilih proizvajalca v razmerju 1:3 (velja za obe celični liniji).

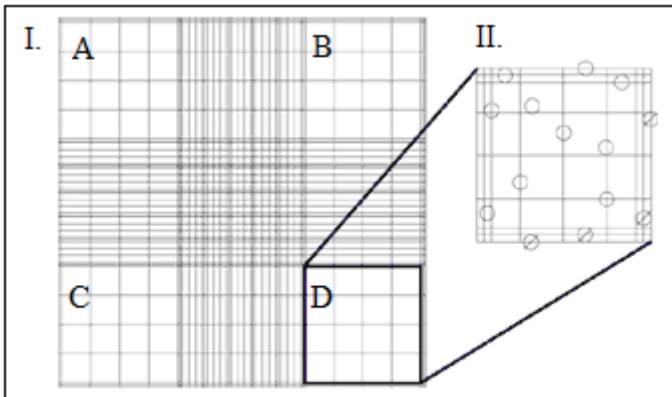
3.2.4. Štetje celic

Preden smo celice presadili ali nasadili, smo prešteli celice v suspenziji in na podlagi tega določili potreben volumen suspenzije celic, ki vsebuje priporočeno količino celic za presaditev ali nasaditev. Pri štetju celic smo uporabili barvilo tripan modro, ki prodre le v mrtve celice in jih obarva modro. Žive celice pa ostanejo svetle, vendar deluje barvilo citotoksično, tako da se po daljšem času tudi predhodno žive celice obarvajo (59-60).

Štetje celic izvedemo tako, da odpipetiramo $50\text{ }\mu\text{L}$ suspenzije celic in $50\text{ }\mu\text{L}$ barvila tripan modro (razmerje 1:1) ter vsebino homogeno premešamo. Na hemocitometer (slika 2) nanesemo $1\mu\text{L}$ homogene raztopine in preštejemo žive celice v vsakem kvadratu posebej (A, B, C in D). Skupno število celic v celotnem volumnu suspenzije celic izračunamo po formuli: $(\mathbf{A} + \mathbf{B} + \mathbf{C} + \mathbf{D})/4 * \mathbf{R} * \mathbf{K_p} * \mathbf{V}$ (60, 61).

~ **A, B, C, D**...stevilo celic v posameznem kvadratu.

- ~ **R**...faktor redčenja; v našem primeru je R enak 2, saj smo $50 \mu\text{L}$ suspenzije celic redčili s $50 \mu\text{L}$ barvila tripan modro.
- ~ **K_p**...znaša 10^4 , saj volumen, v katerem štejemo celice znaša 10^{-4} mL ($1 \text{ mm} * 1 \text{ mm} * 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$), a želeli smo izračunati število celic v 1 mL suspenzije.
- ~ **V**...celotni volumen suspenzije celic.



Slika 2: Hemocitometer; I.: predstavlja celotno polje hemocitometra, II.: prikazuje kvadrat D, ki je eden izmed štirih kvadratov, kjer preštejemo žive celice (na sliki prikazane s krogci) (59).

3.2.5. Test viabilnosti

Ob izpostavljenosti celic citotoksičnim snovem lahko pride do smrti celice (programirana celična smrt ali nekroza) ali do spremembe metabolizma celice. Glede na naravo testa citotoksičnosti ločimo test viabilnosti, test preživetja, metabolni test, test transformacije ali inflamatorni test. Citotoksičnost smo testirali s testom viabilnosti, bolj natančno MTS testom. MTS test je dobil ime po MTS barvilu (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol), ki je tetrazonijeva sol. V prisotnosti mitohondrijske reduktaze in koencima NADH ali NADPH se MTS reducira v formazan, le ta je topen v gojišču in absorbira pri 492 nm. Izmerjena absorbanca nam pove količino nastalega formazana, ki je sorazmeren deležu metabolno aktivnih celic (62).

Testirali smo preiskovani spojini (TCC in TCS) v izbranih koncentracijah na obeh celičnih linijah (MCF-7 ali HUVEC). Kot kontrolo smo uporabili celice v gojitvenem mediju in 0,1 % DMSO, ki služi kot kontrola topila. Na mikrotitrsko ploščico nasadimo $4 * 10^4$ celic v $100 \mu\text{L}$ in jih inkubiramo 24 ur v inkubatorju pri 37°C in 5 % CO_2 . Po 24 h inkubaciji tretiramo celice, tako da dodamo različne koncentracije TCS ali TCC v gojitvenem mediju

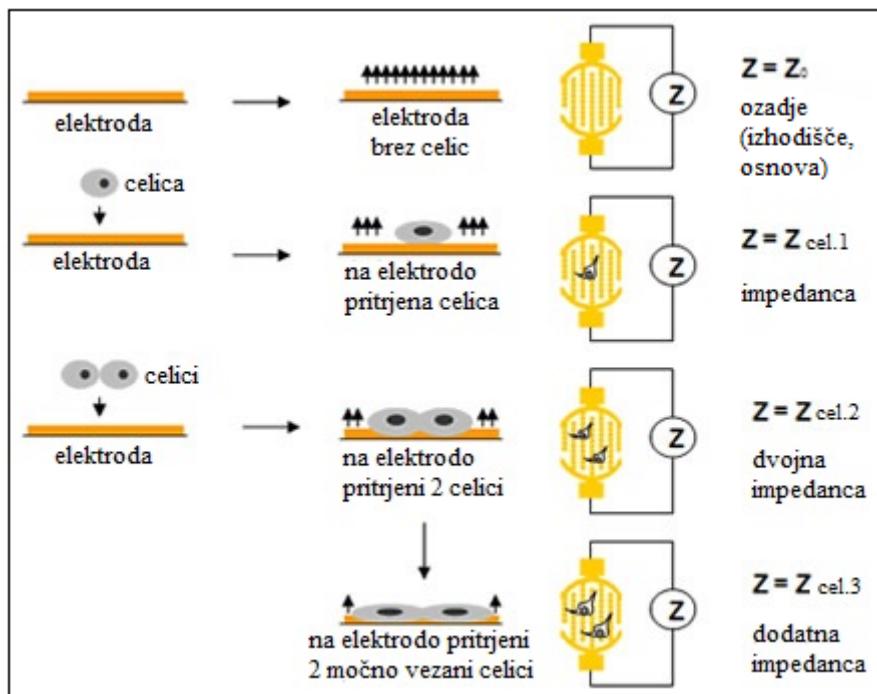
(100 µL). Kot kontrolo topila uporabimo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju in kot slepo kontrolo uporabimo 200 µL 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju brez celic. Eksperiment izvajamo v triplikatih. Na preostale prazne vdolbinice na mikrotitrski ploščici nanesemo po 200 µL PBS ali vode, da omogočimo enakomerno izhlapevanje medija preko vseh vdolbinic. Ponovno inkubiramo 24 ur v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji mikrotitrsko ploščico pregledamo pod svetlobnim mikroskopom in preverimo morebitno obarjanje. Nato odpipetiramo medij iz vdolbinic, dodamo 100 µL svežega gojitvenega medija in 15 µL MTS reagenta ter inkubiramo 1-2 ure pri 37 °C (za celično linijo MCF-7 je zadostovalo 40 minut inkubacije, za HUVEC pa 1,5 ure). Sledi merjenje absorbance pri 490 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader. Absorbanca 0,1 % DMSO, brez celic, služi kot slepa kontrola, ki jo odštejemo od izmerjenih absorbanc posameznih spojin. Nato izvedemo statistično obdelavo pridobljenih rezultatov z računalniškim programom Microsoft Excel.

3.2.6. Test adhezije

Preiskava mehanizmov regulacije celične gibeljivosti in adhezije je ključnega pomena za razumevanje metastaziranja in biologije širjenja tumorja. XCELLigence RTCA (real-time cell analysis = celična analiza v realnem času) smo uporabili za merjenje celične adhezije, saj ima številne prednosti pred standardnimi metodami za ovrednotenje celične adhezije, ker omogoča meritev v odvisnosti od časa in ne potrebuje pri analizi nobenih barvil oz. označevalcev. Kinetika v realnem času podatkov omogoča natančnejšo karakterizacijo kratkotrajnih celičnih dogodkov. Sistem xCELLigence je hiter in občutljiv za merjenje zgodnjih sprememb v obnašanju celic, npr. celične adhezije, in je sposoben razlikovati od odmerka dodanih testnih spojin odvisne spremembe celic. Omogoča učinkovit način za optimizacijo testiranja na celični ravni. Program nam poda rezultate v obliki grafa, celični indeks v odvisnosti od časa in omogoča izračun povprečnih vrednosti, standardnih deviacij ter povprečnih naklonov krivulje v izbranem časovnem intervalu s pripadajočimi standardnimi nakloni (63-66).

Sistem xCELLigence za določanje adhezije celic uporablja tehnologijo impedance, ki predstavlja razmerje med izmenično napetostjo in tokom v električnem krogu. Prisotnost celic na vrhu elektrod vpliva na lokalno ionsko okolje na prehodu med elektrodo in raztopino, kar vodi do povečanja impedance elektrode. Več kot je celic vezanih na elektrodo, večji je porast impedance elektrode, poleg tega je impedanca odvisna od

kakovosti interakcij celic z elektrodami. Povečana celična adhezija ali širjenje bo vodila do večje spremembe impedance elektrode (slika 3). Elektrodna impedance, ki je prikazana kot vrednost celičnega indeksa (CI), se lahko uporablja za spremeljanje preživetja celic, števila, morfologije in stopnje adhezije pri številnih testih na osnovi celic (63-67).



Slika 3: Princip sistema xCELLigence; vpliv števila celic na impedanco (64)

Parameter CI je izpeljan kot relativna sprememba izmerjene električne impedance, da bi predstavil stanje celic in je v vsaki časovni točki definiran kot razlika impedance ob prisotnosti celic in impedance ozadja deljeno s 15, kot prikazuje *enačba 1*:

$$CI = \frac{(Z_{celic} - Z_0)}{15}$$

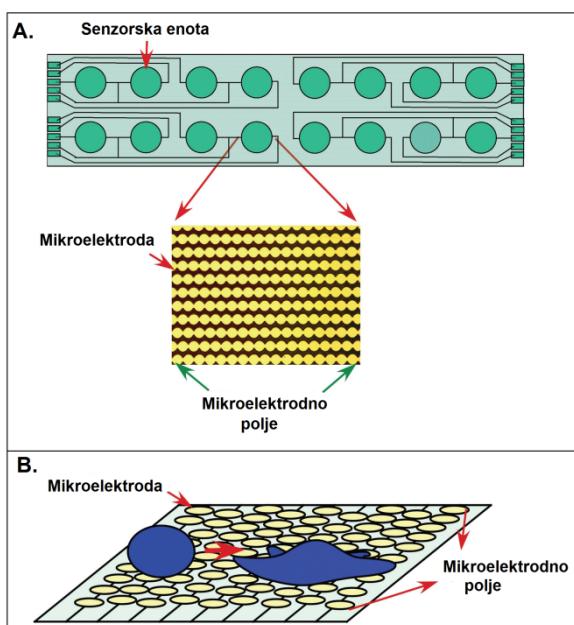
- ~ **CI**...celični indeks.
- ~ **Z_{celic}**...je impedance celica-elektroda, kjer so v vdolbinice nanesene celice.
- ~ **Z₀**...je impedance ozadja, vdolbinice napolnjene samo z medijem (65).

Značilnosti CI:

- ~ Kadar celice niso prisotne ali niso dobro adhezirane v vdolbinici na elektrodah, je CI enak nič.

- ~ Pod enakimi fiziološkimi pogoji, kadar je več celic vezanih na elektrode, je CI večji. CI je kvantitativno merilo števila celic prisotnih v vdolbinici.
- ~ Sprememba v stanju celic, kot na primer celična morfologija, celična adhezija ali preživetje celic, povzroči spremembo CI (64).

Za merjenje celične adhezije se uporabljajo posebne E-plošče za enkratno uporabo, ki so sestavljene iz 16 vdolbinic ali mikroelektrodnih polj in te so sestavljene iz več mikroelektrod (slika 4A). Okrogle celice (pred adhezijo) imajo nižjo izmerjeno impedanco kot adhezirane celice, saj interagirajo z večjim številom mikroelektrod (slika 4B) (67, 68).



Slika 4: Shema E-plošče; A. shematski prikaz vdolbinic mikropošče integrirane z mikroelektronskimi polji, B. prikaz oprijema okrogle in razširjene celice (67).

Merili smo vpliv dveh testnih spojin (TCC in TCS) na adhezijo dveh celičnih linij (HUVEC in MCF-7) s sistemom xCELLigence RTCA (Roche) na posebnih ploščicah za adhezijo – E-Plate 16 (Roche). S ploščicami za adhezijo delamo previdno, da ne poškodujemo dna vdolbinic, zato dodajamo in odvzemamo raztopine počasi in nežno. Ploščice za adhezijo prevlečemo s $40 \mu\text{L}$ VN, koncentracije $10 \mu\text{g/mL}$, ki smo ga predhodno pripravili iz VN $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in PBS. Ploščice inkubiramo čez noč na 4°C v hladilniku. Naslednji dan odpipetiramo VN, vdolbinice nežno speremo s $100 \mu\text{L}$ PBS in dodamo $100 \mu\text{L}$ denaturiranega 1% BSA v PBS, ki smo ga predhodno pripravili, ter inkubiramo 30 minut pri 37°C . Nato odpipetiramo 1% BSA iz vdolbinic, speremo ploščo s PBS in dodamo $100 \mu\text{L}$ dvakratnih želenih koncentracij testiranih spojin v gojitvenem

mediju (vsako testirano koncentracijo nanesemo v 3 vdolbinice) ter posnamemo ozadje na sistemu xCELLigence. Sam xCELLigence sistem skrbi, da se ozadje vsake vdolbinice ustrezeno odšteje pri meritvah CI. Potem v vdolbinice dodamo $1 * 10^4$ celic v 100 μL gojitevenega medija in merimo CI (večji kot je CI, večja je adhezija celic) s sistemom xCELLigence naslednjih 24 ur, vsaki 2 minuti. 0,1 % DMSO v mediju predstavlja kontrolo, na katero smo normalizirali rezultate. Že sam program nam poda rezultate v obliki grafa, CI v odvisnosti od časa za vsako koncentracijo raztopin posebej (TCC in TCS) in kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Iz tega grafa si izberemo časovni interval, kjer so nakloni največji znotraj prvih treh ur, vendar ne v prvih 30 minutah (interval naj bo dolg vsaj 30 minut in ne več kot eno uro). Narišemo še diagram povprečnih naklonov s pripadajočimi standardnimi odkloni in signifikantnostjo za testne spojine v primerjavi s kontrolo. Naredimo tri biološke ponovitve in jih primerjamo med seboj, pri tem vsakič uporabimo drugo pasažo celic. Rezultate pridobljene s sistemom xCELLigence statistično obdelamo z računalniškim programom Microsoft Excel.

3.2.7. Statistična analiza rezultatov

Rezultate testa viabilnosti in adhezije statistično obdelamo z računalniškim programom Microsoft Excel. V testu viabilnosti izmerjenim absorbancam posameznih spojin smo odšteli vrednost slepe kontrole (0,1 % DMSO, brez celic). Rezultate smo normalizirali glede na 0,1 % DMSO. Iz normaliziranih rezultatov smo izračunali povprečne vrednosti, standardne odklone in s t-test (signifikantnost rezultatov) treh paralel in treh bioloških ponovitev. Končni rezultat podamo relativno, v diagramu s standardnimi odkloni in signifikantnostjo.

Statistično signifikantnost rezultatov določamo z dvostranskim Studentovim t-testom. Z njim izračunamo enakost povprečne vrednosti 0,1 % DMSO in tretirane spojine. Za vsako paralelo TCC in TCS in vse tri biološke ponovitve izračunamo vrednost P glede na kontrolo (0,1 % DMSO) z računalniškim programom Microsoft Excel. Na osnovi relacije med kontrolo in izračunanimi vrednostmi oz. na osnovi P vrednosti postavimo sklep:

- ~ Odstopanja od kontrole so bila statistično značilna oz. signifikantna, kadar je bila verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša vsaj od 5 % ($P < 0,05$).
- ~ Kadar pa je bila vrednost P večja ali enaka 5 %, govorimo o nesignifikantnih rezultatih oz. odstopanja od kontrole niso statistično značilna ($P \geq 0,5$).

Statistično signifikantnost rezultatov za dvostranski Studentov t-test podamo v treh stopnjah kot vrednost P, in sicer:

- ~ prva stopnja pomeni $P<0,05$ in označimo z *,
- ~ druga stopnja pomeni $P<0,01$ in označimo z ** in
- ~ tretja stopnja pomeni $P<0,001$ in označimo z ***.

Signifikantnost rezultatov smo določili tako pri testu viabilnosti, kot tudi pri testu adhezije.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Preiskovali smo vpliv dveh HM TCC in TCS na adhezijo. Iz literature je znano, da se lahko nekateri hormoni, kot so tiroksin, tironin in dihidrotestosteron vežejo na integrin $\alpha_V\beta_3$. Prav tako vemo, da aktivacija $\alpha_V\beta_3$ integrina (VN receptor) omogoča adhezijo celic (7, 69). Posledično lahko modulacija VN receptorja vpliva na spremembe v adheziji celic. Ta povezava je že bila dokazana za HM bisfenol AF, analog bolj znanega HM bisfenola A (3). Zato nas je zanimalo, ali tudi HM TCC in TCS vplivata na adhezijo dveh celičnih linij, ki izražata $\alpha_V\beta_3$ integrin.

Da smo lahko ocenili vpliv TCC in TCS na adhezijo, smo morali najprej določiti koncentracije teh spojin, ki na testnih celičnih linijah ne povzročajo citotoksičnosti. Za to določanje smo uporabili test viabilnosti (MTS test). Najvišjo še necitotoksično koncentracijo ter dve nižji izbrani koncentraciji spojin smo nato uporabili za določanje vpliva spojin na adhezijo izbranih celičnih linij s sistemom xCELLigence. Citotoksičnost lahko testiramo tudi s sistemom xCELLigence, vendar je MTS test cenejši in enostavnnejši za izvedbo.

4.1. DELO NA CELIČNI LINIJI MCF-7

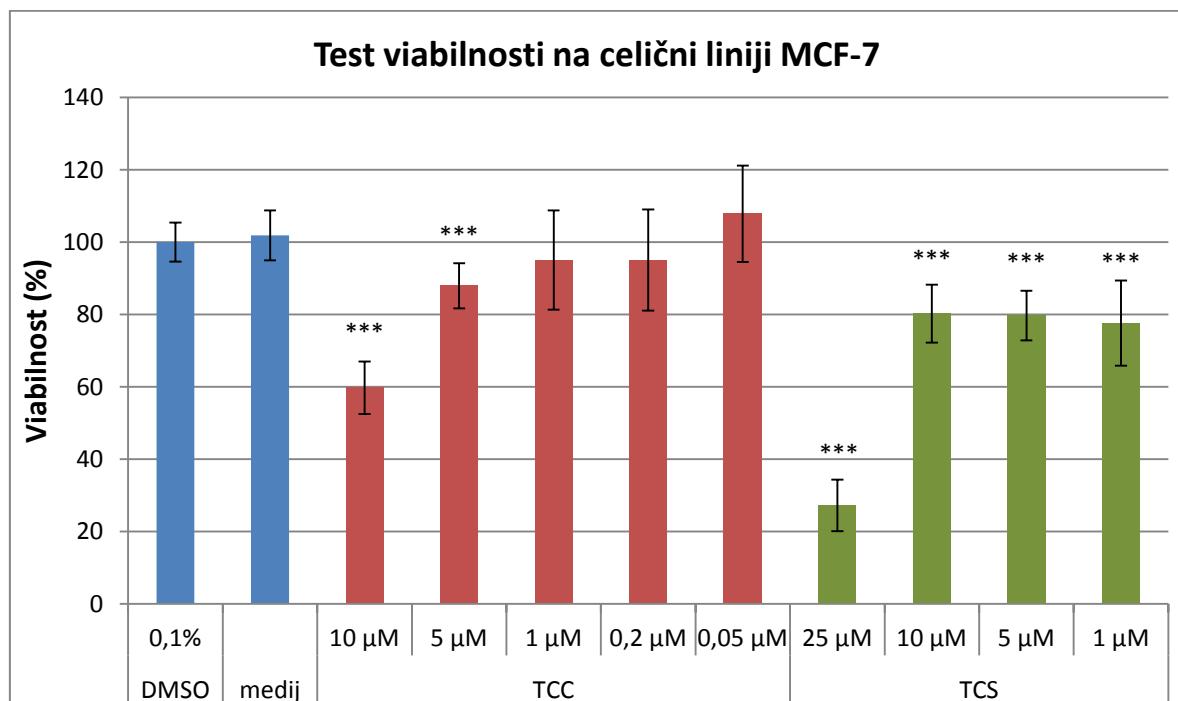
Celična linija MCF-7 je linija človeških celic adenokarcinoma dojk, ki izraža nekatere integrinske receptorje, na katere se vežejo proteini ECM in tako omogočajo adhezijo celic (56, 57). Podrobneje smo jo opisali v poglavju Materiali.

4.1.1. Test viabilnosti

S testom citotoksičnosti smo želeli določiti najvišjo koncentracijo spojin, ki jih lahko uporabimo za določanje vpliva spojin na adhezijo. Poleg tega pa smo hkrati ugotavljali, pri katerih koncentracijah morebitnoobarjanje spojin v testnem sistemu lahko moti testiranje adhezije. Izbrali smo različne koncentracije spojin TCC in TCS ter določili najvišjo koncentracijo posamezne spojine, ki še ni citotoksična za izbrano celično linijo MCF-7. TCC smo testirali v koncentracijah 10, 5, 1, 0,2 in 0,05 μM , TCS pa v koncentracijah 25, 10, 5 in 1 μM . Za te koncentracije smo se odločili na osnovi predhodnih preliminarnih testiranj citotoksičnosti TCC in TCS. Kot kontroli smo uporabili 0,1 % DMSO in sam gojitveni medij. Izmerjeni absorbanci obeh kontrol sta približno enaki, kar dokazuje, da 0,1 % DMSO ni citotoksičen za celice in ne vpliva na rezultate MTS testa, le to je pomembno,

saj imamo 0,1 % DMSO tudi v naših raztopinah testnih spojin. Izmerjene absorbance so premosorazmerne preživelim celicam.

Izmerjenim absorbancam treh paralel smo odšeli vrednost slepega poskusa ter rezultate normalizirali glede na 0,1 % DMSO. Iz normaliziranih rezultatov smo izračunali povprečne vrednosti, standardne odklone in signifikantnost rezultatov vseh treh bioloških ponovitev, ki so prikazane v spodnjem diagramu (slika 5).



Slika 5: Diagram viabilnosti (v %) glede na 0,1 % DMSO za TCC in TCS v izbranih koncentracijah ter pripadajoči standardni odkloni, na celični liniji MCF-7, n=9. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: ***: P<0,001.

Postavili smo si mejo preživetja, pod katero trdimo, da je spojina za celično linijo citotoksična, in sicer pod 80 % normalizirane povprečne absorbance. Pri TCC opazimo koncentracijsko odvisnost dobljenih rezultatov. Vendar je pri nižjih koncentracijah standardni odklon velik, kar kaže na nezanesljivost dobljenih rezultatov. TCC v koncentraciji 10 μM ima 60 % viabilnost glede na 0,1% DMSO, zato lahko zaključimo, da je citotoksičen za izbrano celično linijo. TCC v koncentraciji 5 μM sicer signifikantno zmanjša viabilnost celic, ki pa je še vedno 88 %, zato smo to koncentracijo določili za najvišjo necitotoksično. Pri testiranju viabilnosti TCS smo naleteli na prve težave. TCS ne kaže koncentracijsko odvisnega vpliva na viabilnost. Pri koncentraciji 25 μM je citotoksičen, saj smo določili le 27 % viabilnost v primerjavi s kontrolo. Tudi pri nižjih

koncentracijah TCS vedno signifikantno zmanjša viabilnost. TCS pri koncentracijah 10 in 5 μM doseže 80 %, pri 1 μM pa presenetljivo le 78 % viabilnost. Ker na vrednost CI pri adhezijskem testu vpliva tudi preživetje oz. število celic, smo za izvedbo testa adhezije uporabili vse koncentracije spojin, ki so dosegle več kot 80 % preživetje celic. Iz tega razloga smo bili zelo pozorni tudi pri interpretaciji rezultatov adhezijskih testih, saj število celic močno vpliva na CI.

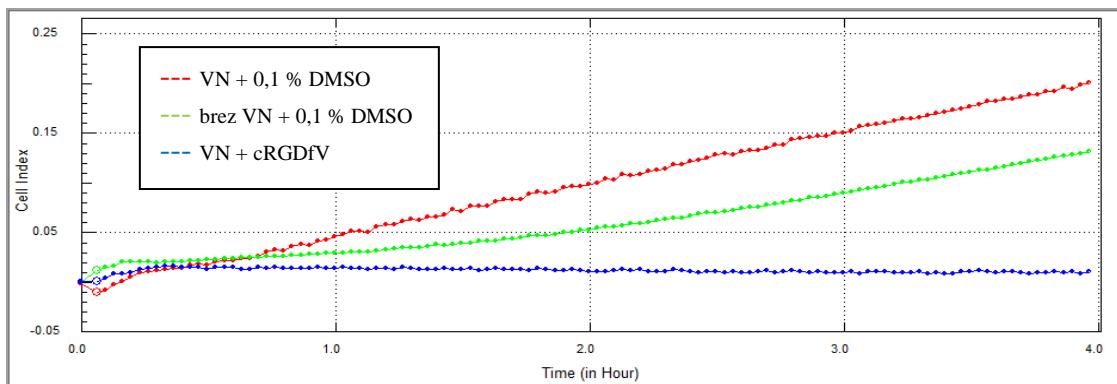
Na podlagi rezultatov dobljenih z MTS testom smo dobili najvišje necitotoksične koncentracije obeh spojin na celični liniji MCF-7. Tako je najvišja necitotoksična koncentracija za TCC 5 μM in za TCS 10 μM . Na podlagi teh koncentracij smo izbrali koncentracije obeh spojin, ki smo jih uporabili pri adhezijskem testu. Tako smo merili adhezijo celic pri koncentracijah 5, 1, 0,2, in 0,04 μM za TCC ter pri koncentracijah 10, 5, 1, 0,2 in 0,04 μM za TCS.

4.1.2. Test adhezije

Določiti smo želeli, kakšen vpliv imata izbrani spojni TCC in TCS v različnih koncentracijah na adhezijsko sposobnost celic MCF-7. Celično adhezijo smo merili s sistemom xCELLigence, za katerega se uporablajo posebne plošče (E-Plate 16) s 16 vdolbinicami. Za vsako biološko ponovitev smo v triplikatih nanesli ali 0,1 % DMSO ali spojni TCC in TCS v izbranih koncentracijah. Sistem xCELLigence temelji na tehnologiji impedance, več kot je celic vezanih na elektrodo, večja je porast impedance in posledično večji so CI. S pomočjo xCELLigence programa smo dobili graf CI v odvisnosti od časa za vsako vdolbinico posebej, iz teh lahko izračunamo povprečne CI v odvisnosti od časa in povprečne naklone krivulj. S sistemom xCELLigence smo merili CI vsaki 2 minuti 24 ur, vendar so za določanje celične adhezije najpomembnejše prve 4 ure, dokler še ne pride do proliferacije celic. V tem času tudi krivulja doseže največje naklone, zato smo si izbrali časovni interval za izračun povprečnih naklonov v času od 30 minut do 3 ur, ki je bil dolg vsaj 30 minut in ne več kot 1 uro. V izbranem intervalu smo izračunali povprečne naklone za vsako krivuljo CI v odvisnosti od časa, ki predstavlja hitrost adhezije oz. kar samo adhezijo. Povprečnim naklonom smo izračunali pripadajoče standardne odklone in ovrednotili signifikantnost rezultatov s t-testom.

Sprva smo želeli preveriti osnovne vplive na celično adhezijo celic MCF-7 na sistemu xCELLigence s pozitivno in negativno kontollo. Tako smo se naučili izvajati test in dobili

boljši vpogled v samo izvedbo testa. Merili smo celično adhezijo celic MCF-7 na podlagi VN-a in brez ter s podlogo VN in cRGDfV (slika 6). Pozitivno kontrolo nam predstavlja cRGDfV, ki je znan inhibitor celične adhezije, saj je selektivni antagonist $\alpha_v\beta_3$ integrina. Poskus z VN in brez njega smo naredili, da bi preverili adhezijske sposobnosti celic MCF-7 na VN. Ob prisotnosti VN je pričakovano hitrejša in večja celična adhezija kot pa brez VN podlage (slika 6), kar je razvidno tudi iz pripadajočih CI. Prav tako pričakovano cRGDfV inhibira celično adhezijo celic MCF-7 na VN, saj je znan inhibitor VN receptorja. Tako smo potrdili ustreznost našega testa.



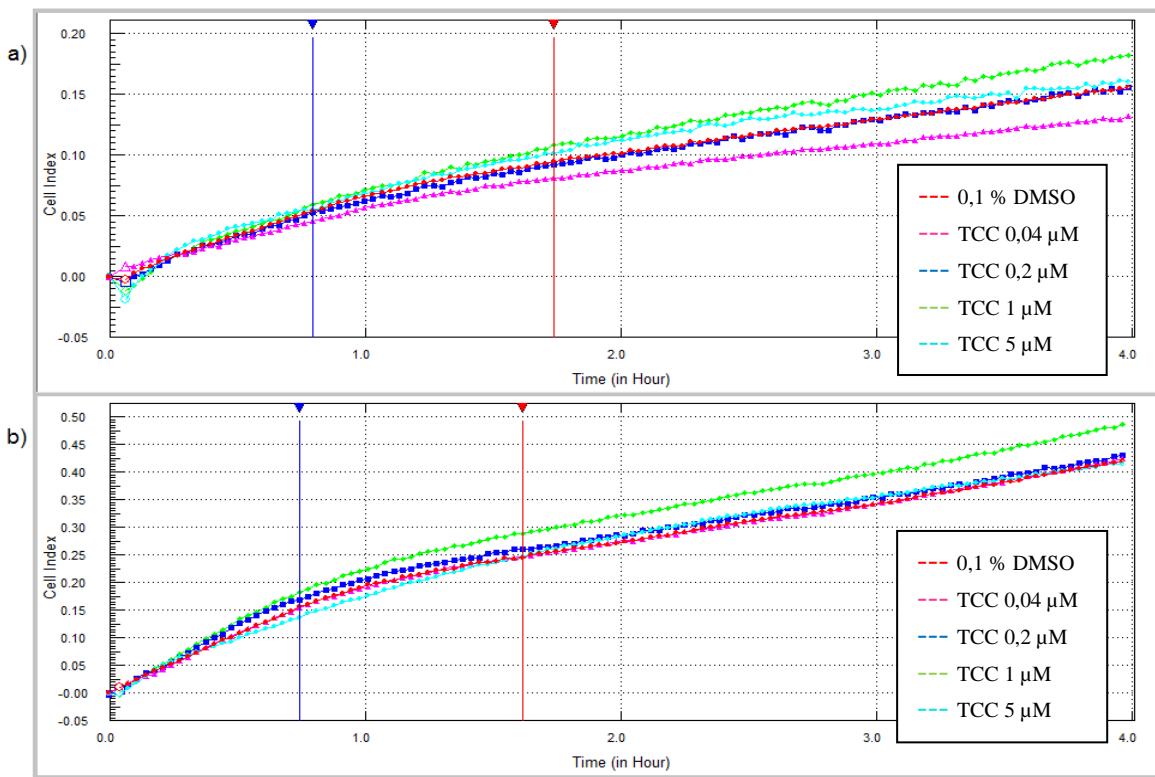
Slika 6: Celični indeks v odvisnosti od časa za celično linijo MCF-7 z VN in 0,1 % DMSO (VN + 0,1 % DMSO), brez VN in z 0,1 % DMSO (brez VN + 0,1 % DMSO) ter z VN in cRGDfV (VN +cRGDfV). Merili smo 24 h na vsaki 2 minuti, n=3.

4.1.2.1. TCC

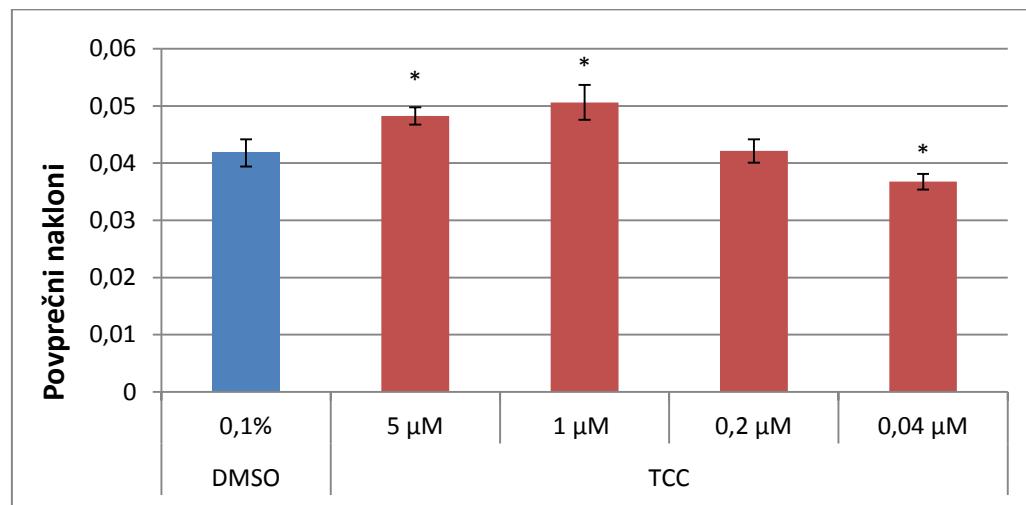
Spojino TCC smo na celični liniji MCF-7 testirali pri koncentracijah 5, 1, 0,2 in 0,04 μ M. Vpliv TCC na adhezijske sposobnosti celične linije MCF-7 smo spremljali prve 4 ure (slika 7).

Prva biološka ponovitev:

Izbrali smo si časovni interval od 48min 8s do 1h 44min 36s, kjer so nakloni krivulj največji (slika 7a). V tem intervalu smo izračunali povprečne naklone krivulje, standardne odklone in signifikantnost rezultatov za TCC v izbranih koncentracijah in 0,1% DMSO ter narisali diagram (slika 8). Glede na povprečne naklone adhezijske krivulje ugotovimo, da TCC v koncentracijah 5 in 1 μ M signifikantno poveča adhezijo celic, TCC v koncentraciji 0,2 μ M nima vpliva nanjo, 0,04 μ M koncentracija TCC pa jo celo signifikantno zmanjša glede na 0,1 % DMSO (slika 8). TCC v koncentraciji 5 in 1 μ M približno enako poveča celično adhezijo, saj med njima ni signifikantnih razlik.



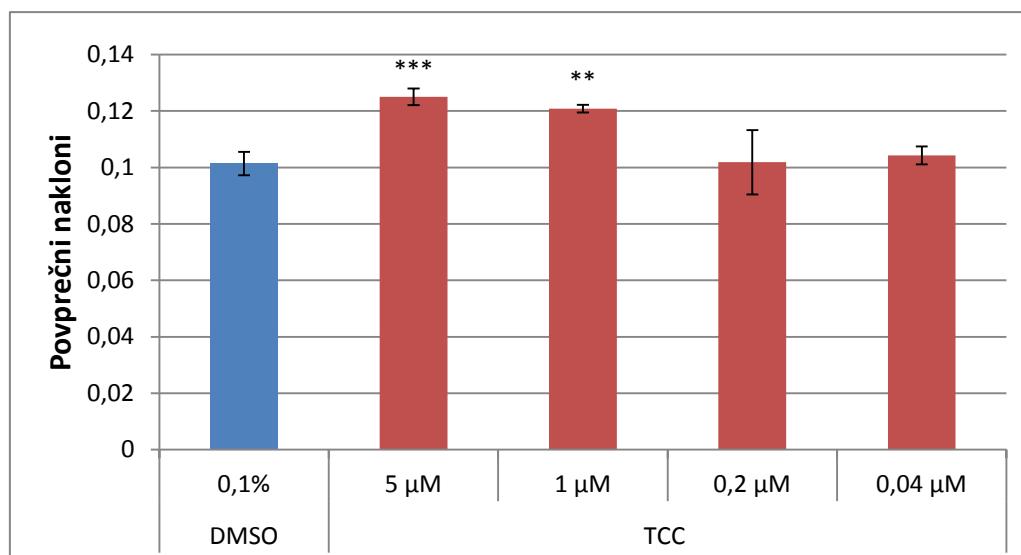
Slika 7: Celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCC v izbranih μM koncentracijah na celični liniji MCF-7, a) prva biološka ponovitev, b) druga biološka ponovitev. Navpični črti (modra in rdeča) predstavljata interval, v katerem smo izračunali naklone krivulj. Merili smo 24 h na vsaki 2 minuti, n=3.



Slika 8: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCC v izbranih koncentracijah in pripadajoči standardni odkloni ter signifikantnost rezultatov pridobljenih s t-testom (celična linija MCF-7, prva biološka ponovitev, n=3), dobljeni pri merjenju adhezije v izbranem časovnem intervalu: 00:48:08 – 01:44:36. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: *: P<0,05.

Druga biološka ponovitev:

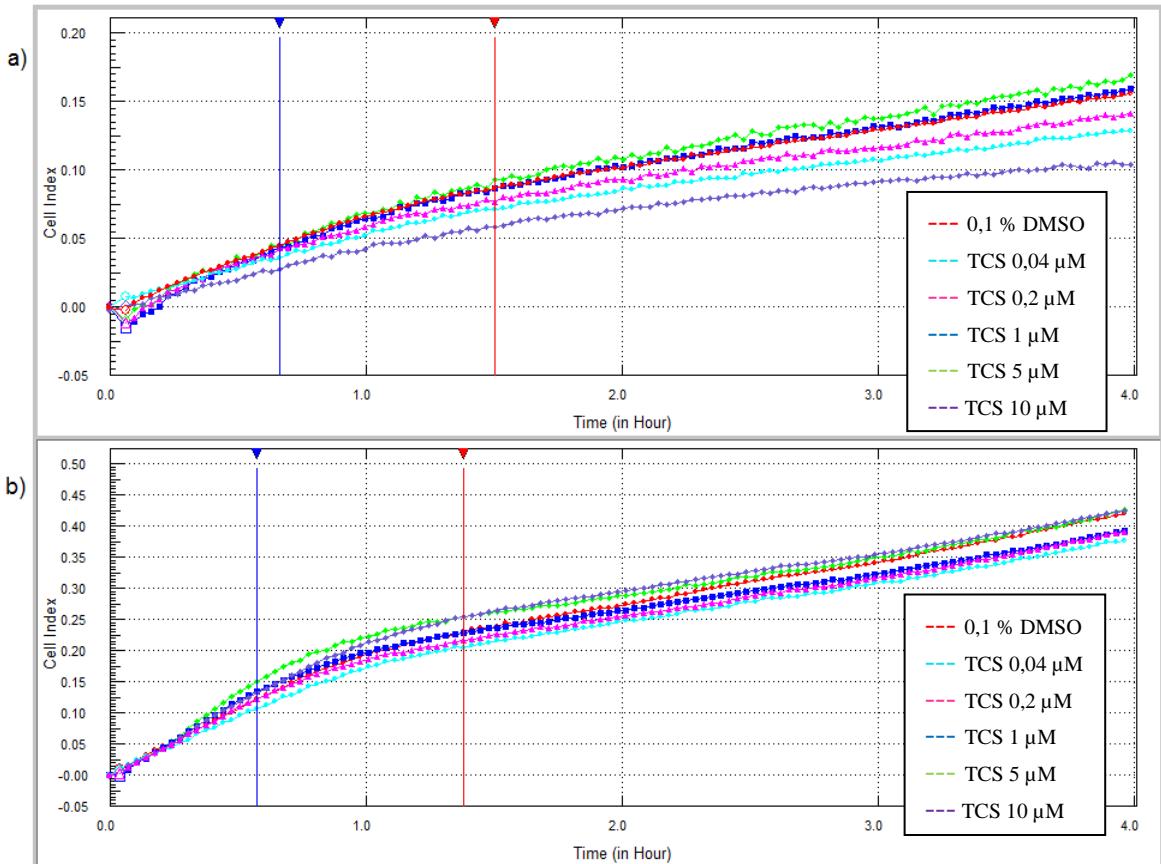
Ponovili smo eksperiment (slika 7b) in ponovno izračunali povprečne naklone krivulje v časovnem intervalu od 44min 58s do 1h 37min 15s. Izračunali smo še standardne odklone ter signifikantnost dobljenih rezultatov glede na 0,1 % DMSO. Za TCC v koncentraciji 5 in 1 μM smo izračunali, da signifikantno povečata adhezijo celic, TCC v koncentraciji 0,2 in 0,04 μM pa nimata vpliva nanjo (slika 9). Iz grafov 7b in 9 lahko opazimo, da se absolutne številke v CI med obema biološkima ponovitvama razlikujeta. Pri drugi biološki ponovitvi opazimo za polovico večje vrednosti CI (slika 7b) v primerjavi s prvo, za kar lahko krivimo celično linijo MCF-7, saj gre za živ sistem in lahko pride do variiranja v adheziji in širjenju celic. Posledično so tudi povprečni nakloni krivulj pri prvi biološki ponovitvi za približno polovico nižji v primerjavi z drugo. Le to se zgodi vzajemno, saj se ob povečanju vrednosti za CI, hkrati poveča tudi naklon krivulje.



Slika 9: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCC v izbranih koncentracijah in pripadajoči standardni odkloni ter signifikantnost rezultatov pridobljeni s t-testom, na celični liniji MCF-7, druga biološka ponovitev, n=3, dobljeni pri merjenju adhezije v izbranem časovnem intervalu: 00:44:58 – 01:37:15. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: **: P<0,01, ***: P<0,001.

4.1.2.2. TCS

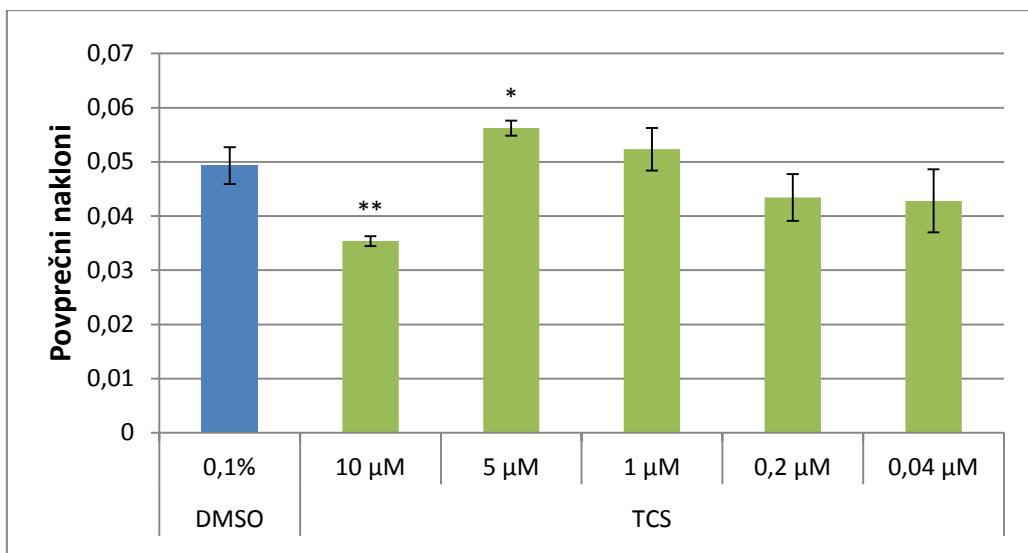
Spojini TCS smo določali vpliv na sposobnost adhezivnosti celične linije MCF-7 v koncentracijah 10, 5, 1, 0,2 in 0,04 μM , in sicer prve 4 ure (slika 10).



Slika 10: Celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCS v izbranih μM koncentracijah na celični liniji MCF-7, a) prva biološka ponovitev, b) druga biološka ponovitev. Merili smo 24 h na vsaki 2 minuti, n=3.

Prva biološka ponovitev:

Želeli smo določiti koncentracijsko odvisen vpliv TCS na celično adhezijo celic MCF-7, 0,1 % DMSO smo nanesli kot negativno kontrolo. Dobili smo graf CI v odvisnosti od časa (slika 10a). Izbrali smo si časovni interval od 40min 4s do 1h 30min 29s (slika 10a) in izračunali povprečne naklone krivulje, pripadajoče standardne odklone in statistično signifikantnost rezultatov za t-test (slika 11). TCS v koncentraciji 10 μM zniža celično adhezijo, TCS v koncentraciji 5 μM jo zviša glede na 0,1 % DMSO, pri ostalih koncentracijah (1, 0,2 in 0,04 μM) nismo dobili signifikantnih rezultatov zaradi visokih standardnih deviacij.

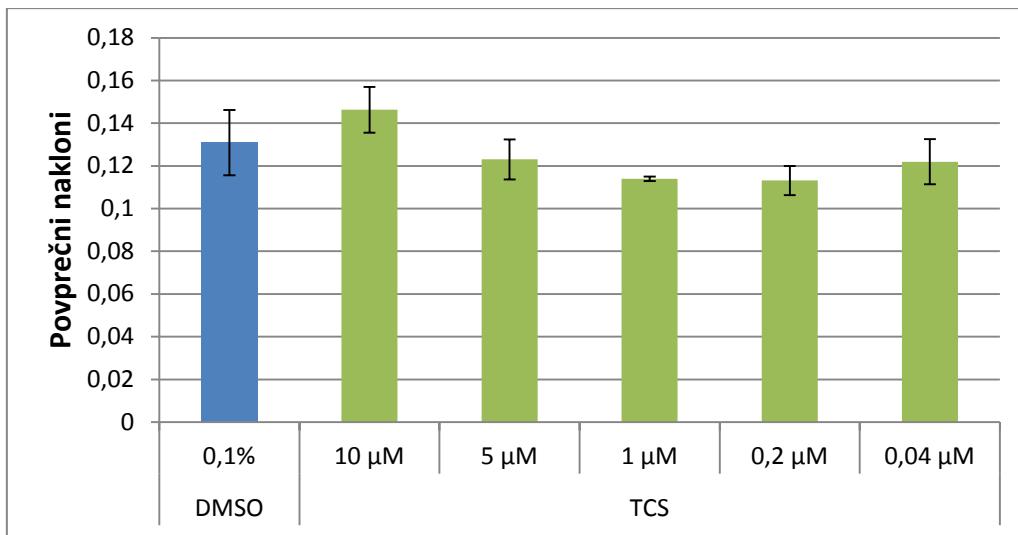


Slika 11: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCS v izbranih koncentracijah in pripadajoči standardni odkloni ter signifikantnost rezultatov pridobljena s t-testom, na celični liniji MCF-7, prva biološka ponovitev, n=3, dobljeni pri merjenju adhezije v izbranem časovnem intervalu: 00:40:04 – 01:30:29. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: *: P<0,05, **: P<0,01.

Druga biološka ponovitev:

Ponovili smo poskus in iz dobljenih rezultatov (slika 10b) ponovno naredili primerjavo povprečnih naklonov adhezijskih krivulj s pripadajočimi standardnimi odkloni in statistično signifikantnostjo s t-testom. Izbrali smo si časovni interval od 34min 54s do 1h 23min 10s, kjer smo opazili največje razlike v naklonih krivulj. TCS pri nobeni od testiranih koncentracij (10, 5, 1, 0,2, in 0,04 μM) ni statistično signifikantno vplival na celično adhezijo (slika 12), kljub navideznim razlikam med različnimi koncentracijami TCS in 0,1 % DMSO. Ponovno so bile standardne deviacije zelo velike.

Dobljeni rezultati na celični liniji MCF-7 so bili preveč raznoliki in neponovljivi za ustrezno oceno vpliva spojin na adhezijo. Poleg začetnih problemov pri testu viabilnosti smo pri testu adhezije imeli probleme s ponovljivostjo rezultatov in visoko standardno deviacijo, zaradi katere nam ni uspelo dobiti realnih rezultatov. Zaradi teh problemov smo se odločili, da ne bomo izvedeli še tretje biološke ponovitve, ampak raje zamenjali celično linijo. Odločili smo se za HUVEC celično linijo, ki je pravzaprav bolj primerna linija za proučevanje adhezije, vendar je njena uporaba bolj zahtevna.



Slika 12: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCS v izbranih koncentracijah in pripadajoči standardni odkloni ter signifikantnost rezultatov pridobljena s t-testom, na celični liniji MCF-7, druga biološka ponovitev, n=3, dobljeni pri merjenju adhezije v izbranem časovnem intervalu: 00:34:54 – 01:23:10.

4.2. DELO S HUVEC CELIČNO LINIJO

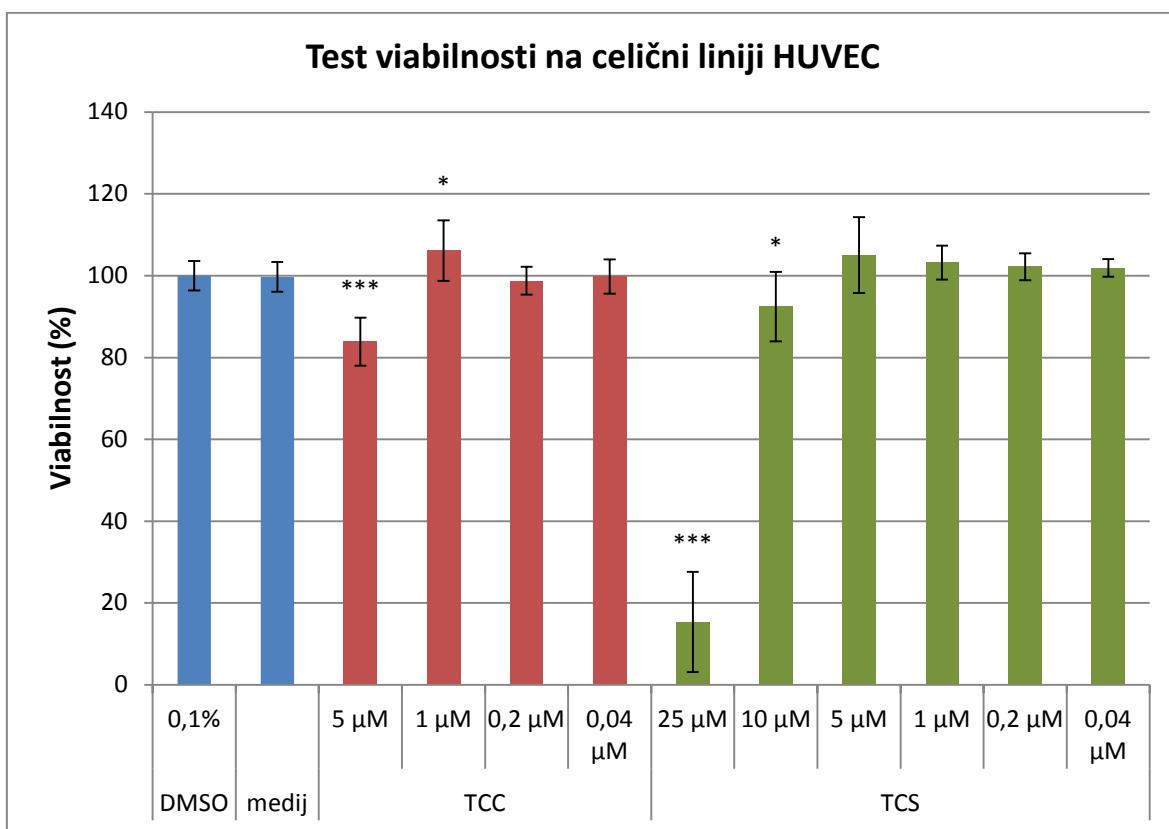
HUVEC je celična linija, ki je pridobljena iz človeškega endotelija popkovne vene. To so primarne celice, ki niso nesmrtni (*in vitro* imajo končno življensko dobo) (58). Celična linija HUVEC se uporablja kot standard za integrinske receptorje, odzovejo se na citokinsko stimulacijo v izražanju celične adhezije molekul. Uporabljajo se kot laboratorijski model za študije funkcije in patologije endotelijskih celic.

4.2.1. Test viabilnosti

Z MTS testom smo preverili spojini TCC in TCS v izbranih koncentracijah na morebitno citotoksičnost in/ali neustreznost zaradi obarjanja v gojišču (slika 13). TCC smo testirali v koncentracijah 5, 1, 0,2 in 0,04 μM , TCS pa v koncentracijah 25, 10, 5, 1, 0,2 in 0,04 μM , kot kontroli smo uporabili 0,1 % DMSO in sam gojitveni medij. Za posamezno spojino smo določili najvišjo koncentracijo spojine, ki še ni citotoksična za izbrano celično linijo HUVEC enako kot pri celični liniji MCF-7.

Izmerjeni absorbanci obeh kontrol, 0,1 % DMSO in gojitvenega medija sta približno enaki, kar dokazuje, da 0,1 % DMSO ni citotoksičen za to vrsto celic in ne vpliva na rezultate MTS testa. Spet smo si postavili sprejemljivo mejo preživetja celic, in sicer tokrat 90 %, glede na 0,1 % DMSO. V nadaljnje testiranje smo vključili samo tiste koncentracije spojin,

ki so omogočile 90 % preživetje. Iz predhodnih testiranj vpliva adhezije na HUVEC celice smo vedeli, da pri nižji viabilnosti dobimo lažno zmanjšanje adhezije zaradi citotoksičnosti spojin. TCC pri koncentraciji 5 μM enako kot pri celični liniji MCF-7 signifikantno zmanjša viabilnost celic, vendar pa je viabilnost v tem primeru večja kot 80 % (84 %), vendar smo jo zaradi višje postavljene meje viabilnosti izključili iz nadalnjih testiranj. TCC v koncentraciji 1 μM pa je signifikantno povišal viabilnost celic in sicer za 6 %. TCS v koncentraciji 25 μM je ponovno signifikantno znižal viabilnost, in sicer za 15 %. Za TCS v koncentraciji 10 μM smo določili 92 % viabilnost in smo to koncentracijo ne glede na to, da je šlo za signifikantno znižanje, uporabili za adhezijski test.

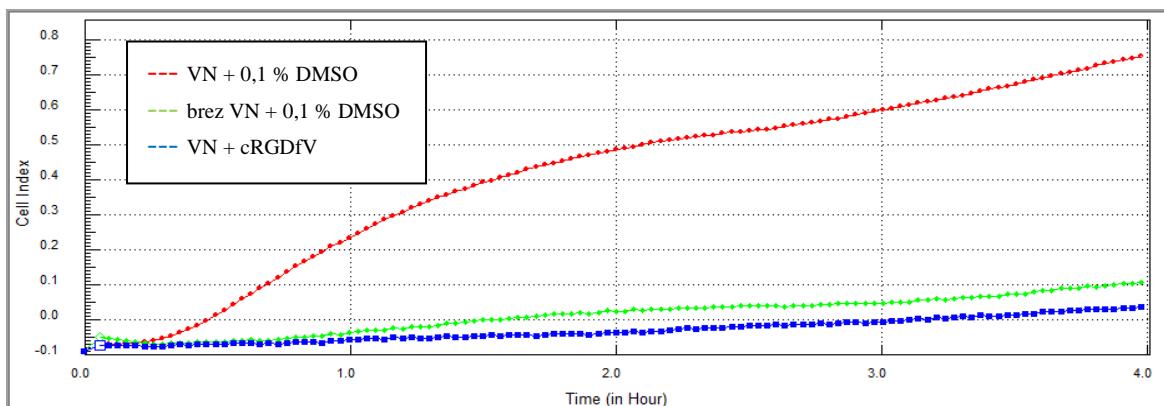


Slika 13: Diagram viabilnosti (v %) glede na 0,1 % DMSO za TCC in TCS v izbranih koncentracijah ter pripadajoči standardni odkloni, na celični liniji HUVEC, n=9. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: *: P<0,05, ***: P<0,001.

Na podlagi rezultatov dobljenih v MTS testu smo izbrali koncentracije spojin, ki smo jim merili vpliv na adhezijsko sposobnost celične linije HUVEC. Za spojino TCC smo izbrali koncentracije 1, 0,2 in 0,04 μM , za TCS pa 5, 1 in 0,2 μM .

4.2.2. Test adhezije

Želeli smo določiti vpliv TCC in TCS v različnih izbranih koncentracijah na adhezijo celic celične linije HUVEC. Najprej smo želeli preveriti test adhezije za celično linijo HUVEC na sistem xCELLigence, zato smo merili celično adhezijo a) z dodatkom VN in 0,1 % DMSO,b) brez VN in z 0,1 % DMSO ter c) z VN in cRGDFV (slika 14). Poskus z VN in brez nam pove ali se res in kako močno se celice adherirajo na protein. 0,1 % DMSO ob prisotnosti VN poveča celično adhezijo celične linije HUVEC bistveno bolj kot pa ob njegovi odsotnosti. Drugi del testa je služil, da preverimo ali antagonist $\alpha_v\beta_3$ integrina cRGDFV, ki je znan inhibitor celične adhezije, zmanjša adhezijo. Prav tako smo opazili, da je absolutni CI celične linije HUVEC mnogo višji (približno 6-krat) kot pri celični liniji MCF-7, kar nam daje boljšo ločljivost med rezultati meritev, zaradi boljše adhezije in širjenja celic.

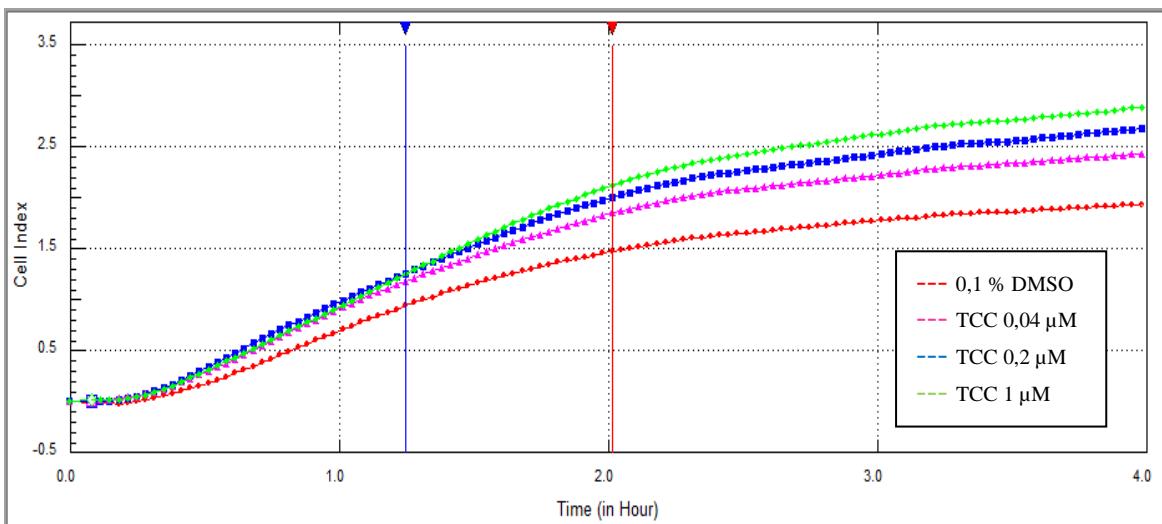


Slika 14: Celični indeks v odvisnosti od časa za celično linijo HUVEC z VN in 0,1 % DMSO (VN + 0,1 % DMSO), brez VN in z 0,1 % DMSO (brez VN + 0,1 % DMSO) ter z VN in cRGDFV (VN +cRGDFV). Merili smo 24 h na vsaki 2 minuti, n=3.

4.2.2.1. TCC

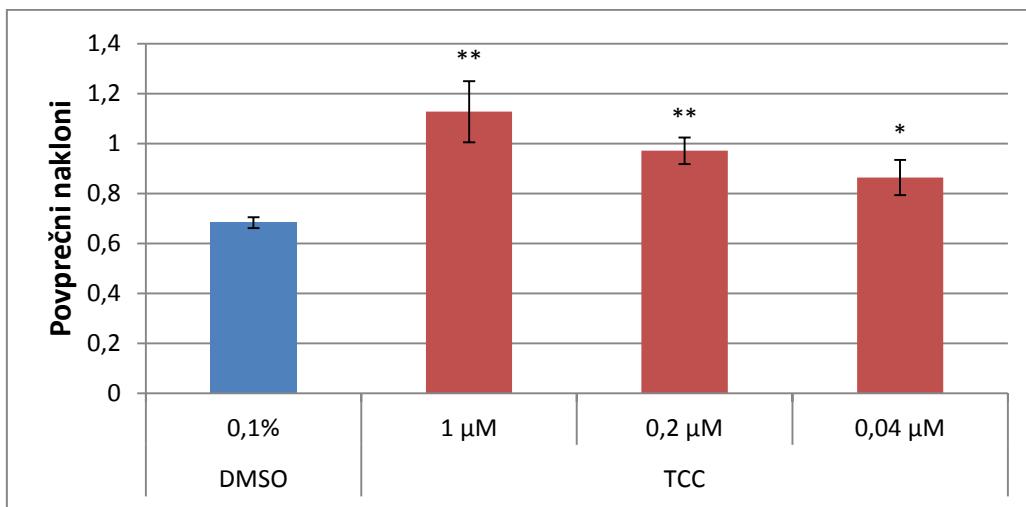
Enako kot pri celični liniji MCF-7 smo tudi tukaj merili vpliv TCC na adhezijo celic. V nasprotju z celično linijo MCF-7 pri HUVEC nismo imeli problemov s standardno deviacijo in ponovljivostjo rezultatov, tako da smo naredili tri biološke ponovitve, vendar je v magistrski nalogi prikazana le ena reprezentativna biološka ponovitev, saj imajo vse tri enak trend.

Želeli smo določiti koncentracijsko odvisen vpliv na adhezijo HUVEC za spojino TCC glede na 0,1 % DMSO, CI smo merili prve 4 ure. Že na prvi pogled (slika 15) vidimo, da so krivulje bolj ločene kot pri celični liniji MCF-7.



Slika 15: Graf prikazuje celični indeks v odvisnosti od časa izmerjen s sistemom xCELLigence za 0,1 % DMSO in TCC v različnih koncentracijah na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev. Merili smo 24 h na vsaki 2 minuti, n=3.

To smo seveda želeli potrditi, zato smo izračunali povprečne naklone krivulje v časovnem intervalu od 1 h 15 min 8 s do 2 h 1 min 8 s, pripadajoče standardne odklone in statistično signifikantnost s t-testom (slika 16). Ugotovili smo, da TCC pri vseh treh koncentracijah signifikantno poveča celično adhezijo. Prav tako lahko iz izračunanih povprečnih naklonov krivulje tudi vidimo koncentracijsko odvisnost povečanja adhezije.



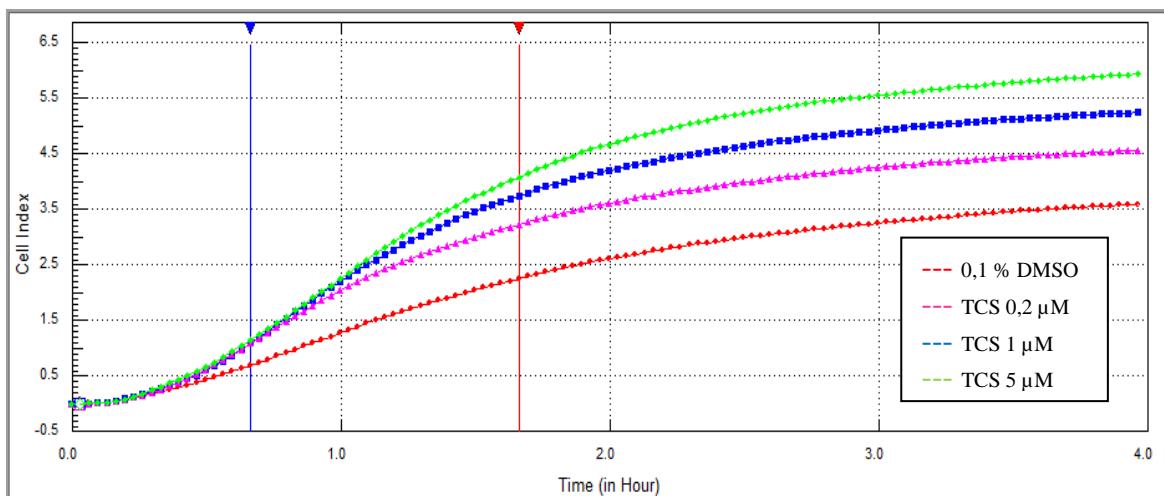
Slika 16: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCC v izbranih koncentracijah in pripadajoči standardni odkloni ter signifikantnost rezultatov pridobljena s t-testom, na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev, n=3, dobljeni pri merjenju adhezije v izbranem časovnem intervalu: 01:15:08 – 02:01:08. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: *: P<0,05, **: P<0,01.

Ostali dve biološki ponovitvi imata enak trend kot prva. Dokazali smo, da ima TCC v koncentracijah 1, 0,2 in 0,04 μM koncentracijsko odvisen vpliv na adhezijo celic, in sicer višja kot je koncentracija TCC, večji so povprečni nakloni krivulje, večji je CI in posledično je povečana celična adhezija.

4.2.2.2. TCS

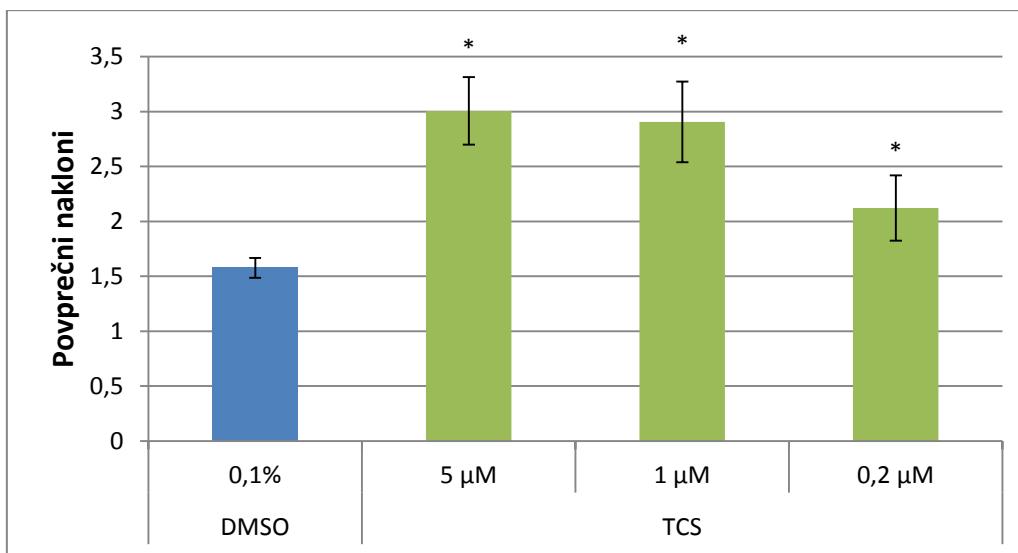
Na enak način, kot je opisan za TCC, smo skušali določiti vpliv TCS na celično adhezijo. Naredili smo tri biološke ponovitve, prikazali pa smo le reprezentativno biološko ponovitev, saj so bili eksperimenti ponovljivi.

Določiti smo želeli koncentracijsko odvisen vpliv TCS na celično adhezijo celične linije HUVEC glede na 0,1 % DMSO. Iz dobljenega 4 urnega grafa CI v odvisnosti od časa, lahko že na hitro brez statistične obdelave razberemo koncentracijsko odvisnost povečanja adhezije (slika 17).



Slika 17: Graf prikazuje celični indeks v odvisnosti od časa za 0,1 % DMSO in TCS v različnih koncentracijah na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev. Merili smo 24 h na vsaki 2 minuti, n=3.

V izbranem časovnem intervalu od 40 min 6 s do 1 h 40 min 6 s smo izračunali povprečne naklone krivulje, standardne odklone in statistično signifikantnost za t-test za TCS v testiranih koncentracijah in 0,1 % DMSO (slika 18). Ob pregledu diagrama povprečnih naklonov lahko ugotovimo, da TCS v vseh koncentracijah statistično signifikantno poveča celično adhezijo glede na 0,1 % DMSO. Koncentracijsko odvisnost dobljenih rezultatov, nam ni uspelo potrditi, saj zaradi prevelikih standardnih deviacij nismo dobili signifikantnosti med različnimi koncentracijami TCS.



Slika 18: Diagram povprečnih naklonov za 0,1 % DMSO in TCS v izbranih koncentracijah in pripadajoči standardni odkloni ter signifikantnost rezultatov pridobljena s t-testom, na celični liniji HUVEC, prva biološka ponovitev, n=3, dobljeni pri merjenju adhezije v izbranem časovnem intervalu: 00:40:06 – 01:40:06. Statistična signifikantnost pridobljena s t-testom: *: P<0,05.

Ob pregledu vseh treh bioloških ponovitev smo ugotovili enak trend poteka adhezijske krivulje in izračunanih povprečnih naklonov krivulj za TCS (5, 1 in 0,2 μM) in 0,1 % DMSO. Dokazali smo statistično signifikantno povečanje adhezije pri vseh treh koncentracijah, ne pa popolne koncentracijske odvisnosti.

Predvidevamo, da testni spojini, TCC in TCS, aktivirata integrin $\alpha_V\beta_3$, ki ima pomembno vlogo pri metastaziranju tumorjev in se izraža na nekaterih rakavih celicah. Integrinski receptor $\alpha_V\beta_3$ je tudi potencialna tarča HM, na njega se lahko vežejo tudi endogeni hormoni: tiroksin, tironin in dihidrotestosteron.

Nadaljnje raziskave bi lahko usmerili v potrditev, da TCC in TCS povečata adhezijo preko aktivacije $\alpha_V\beta_3$ integrina. To bi lahko naredili s testom vezave spojin na izoliran $\alpha_V\beta_3$ integrin, kot je bilo že narejeno za tiroidne hormone in HM bisfenol AF (3, 69).

Glede na dobljene rezultate vpliva dveh HM na adhezijo celic, bi bile potrebne nadaljnje študije na tem področju, saj je zelo malo raziskav narejenih na spojinah, ki preko aktivacije integrinov povečajo adhezijo celic.

5. SKLEP

TCC in TCS najdemo v izdelkih za vsakodnevno rabo in sta znana HM, ki aktivirata $\alpha_V\beta_3$ integrin (VN receptor). Le-ta ima pomembno vlogo pri metastaziranju tumorjev in se izraža na nekaterih rakavih celicah. Pomembno je določiti celično adhezijo, saj povečana adhezija poveča možnost metastaziranja in razvoj rakavih obolenj.

Na podlagi eksperimentalnega dela s TCC in TCS na celicah MCF-7 in HUVEC lahko zaključimo naslednje:

- ~ S testom viabilnosti na celični liniji MCF-7 smo določili najvišje necitotoksične koncentracije TCC in TCS. Postavili smo si mejo preživetja, pod katero trdimo, da je spojina citotoksična, in sicer pod 80 % viabilnostjo. Določili smo najvišjo necitotoksično koncentracijo za TCC 5 μM in TCS 10 μM za celično linijo MCF-7.
- ~ Vpliva TCC in TCS na adhezijo celic MCF-7 na vitronektin nam ni uspelo niti potrditi niti ovreči, saj smo dobili raznolike in neponovljive rezultate za dve biološki ponovitvi.
- ~ Pri testu viabilnosti za TCC in TCS na HUVEC celicah pa smo si postavili mejo 90 % viabilnost. Najvišjo necitotoksično koncentracijo smo določili za TCC 1 μM in TCS 5 μM .
- ~ Dokazali smo vpliv TCC in TCS na adhezijo HUVEC celic na vitronektin, oba signifikantno povečata adhezijo. Pri TCC smo dokazali tudi koncentracijsko odvisen vpliv na celično adhezijo za vse testirane koncentracije, ki so: 1, 0,2 in 0,04 μM . Višja kot je koncentracija TCC, večje je povečanje celične adhezije. Za TCS pa smo določili le delen koncentracijsko odvisen vpliv na adhezijo celic, in sicer za koncentracije 1 in 0,2 μM . Na podlagi rezultatov sklepamo, da TCC in TCS lahko delujeta prokancerogeno, saj povečanje adhezije poveča možnost metastaziranja in razvoja rakavih obolenj.
- ~ Celična linija HUVEC se je izkazala kot primeren model za proučevanje adhezije s sistemom xCELLigence, medtem ko so rezultati dobljeni na celicah MCF-7 manj zanesljivi oz. ponovljivi.

Pri uporabi in vrednotenju varnosti uporabe izdelkov, ki vsebujejo preiskovani spojini, bi bilo potrebno upoštevati tudi ta do sedaj še neopisan učinek in preveriti ali se spojine v

koncentracijah, za katere smo dokazali, da vplivajo na adhezijo celic, lahko nahajajo v telesu.

LITERATURA

1. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser S, Prins GS, Soto AM, Zoeller RS, in Gore AC: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 2009; 30 (4): 293-342.
2. <http://www.epa.gov/endocrine/> Dostop: 23.08.2014.
3. Kolšek K: Študij mehanizmov bioloških učinkov bisfenola A in njegovih analogov z alternativnimi metodami, doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014.
4. Swedenborg E, Rüegg J, Mäkelä S, Pongratz I: Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2009; 43: 1-10.
5. Colborn, T., F.S. vom Saal, Soto AM: Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 1993; 101 (5): 378-84.
6. http://www.oekotoxzentrum.ch/dokumentation/info/doc/hormonaktice_e.pdf. Dostop: 23.08.2014.
7. Davis PJ, Mousa SA, Cody V, Tang HY, Lin HY: Small Molecule Hormone or Hormone-Like Ligands of Integrin $\alpha_V\beta_3$: Implications for Cancer Cell Behavior. *Hormones and Cancer*, 2013; 4 (6): 335-342.
8. Gilcrease MZ: Integrin signaling in epithelial cells. *Science Direct, Cancer Letters*, 2006; 247 (2007): 1-25.
9. Hynes, RO: Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 2002; 110: 673-687.
10. Robaire B, Hinton BT: The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and Vas Deferens, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, 103-118.

11. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M: Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; 1790: 431-444.
12. Perdih A, Sollner Dolenc M: Small Molecule Antagonists of Integrin Receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 2010; 17: 2371-2392.
13. Nadrah K: Načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje modulatorjev delovanja integrinskih receptorjev, doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.
14. Shimaoka M, Springer TA: Therapeutic antagonist and conformational regulation of integrin function. *Drug Discovery*, 2003; 2: 703-715.
15. Zhu J, Zhu J, Negri A, Provasi D, Filizola M, Coller BS, Springer TA: Closed headpiece of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and its complex with an $\alpha_{IIb}\beta_3$ -specific antagonist that does not induce opening. *Blood*, 2010; 116 (23): 5050-5059.
16. Brunton VG, MacPherson IRJ, Frame MC: Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex tree-way circuitry. *Science Direct, Biochimica et Biophysica Acta*, 2004; 1692: 121-144.
17. Xiao T, Takagi J, Coller BS, Wang JH, Springer TA: Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature*, 2004; 432: 59-67.
18. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R: Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha_V\beta_3$. *Science*, 2001; 294: 339-345.
19. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M: Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha_V\beta_3$ in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science*, 2002; 296: 151-154.
20. Suehiro K, Smith JW, Plow EF: The Ligand Recognition Specificity of β_3 Integrins. *J Biol Chem*, 1996; 271 (17): 10365-10371.
21. Wong NC, Mueller BM, Barbas CF, Ruminski P, Quaranta V, Lin ECK, Smith JW: α_V Integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines. *Clinical & Experimental Metastasis*, 1998; 16 (1): 50-61.

22. Nista A, Leonetti C, Bernardini G, Mattioni M, Santoni A: Functional role of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin fibronectin receptors expressed on adriamycin-resistant MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 1997; 72: 133-141.
23. Juliano D, Wang Y, Marcinkiewicz C, Rosenthal LA, Stewart GJ, Niewiarowski S: Disintegrin Interaction with $\alpha v\beta 3$ Integrin on Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Expression of Ligand-Induced Binding Site on $\beta 3$ Subunit. *Experimental cell research*, 1996; 225: 132-142.
24. Bendas G, Borsig L: Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *International Jurnal of Cell Biology*, 2011; 2012: 1-10.
25. Humphries MJ: Cell adhesion assays. *Molecular Biotechnology*, 2001; 18 (1): 57-61.
26. Millard M, Odde S, Neamati N: Integrin Targeted Therapeutics. *Theranostics*, 2011; 1: 154-188.
27. Nadrah K: Načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje modulatorjev delovanja integrinskih receptorjev, doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.
28. Oesterling E, Toborek M, Hennig B: Benzo[a]pyrene induces intercellular adhesion molecule-1 through a caveolae and aryl hydrocarbon receptor mediated pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008; 232 (2): 309-316.
29. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7193925.htm, Dostop: 10.10.2014.
30. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7547?from=summary#section=Top>, Dostop: 10.10.2014
31. <http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/TRICLOCARBAN.htm>, Dostop: 10.10.2014.
32. <http://oehha.ca.gov/multimedia/biomon/pdf/052410Triclocarban.pdf>, Dostop: 10.10.2014.
33. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/105937?lang=en®ion=SI>, Dostop: 19.02.2014.

34. Triclocarban (CAS# 101-20-2) GreenScreen® for Safer Chemicals (GreenScreen®) Assessment. ToxServices LLC, 2014, iz: <http://www.cela.ca/sites/cela.ca/files/101-20-2-Triclocarban-GreenScreen.pdf>, Dostop: 10.10.2014.
35. Screening-level hazard characterization of high production volume chemicals, Sponsored chemical, Triclocarban (CAS No. 101-20-2), [9th CI Name: Urea, N-(4-chlorophenyl)-N'-(3,4-dichlorophenyl)-], INTERIM, 2008, iz: http://www.epa.gov/hpvis/hazchar/101202_Triclocarban_HC_INTERIM_March%202008.pdf, Dostop: 15.10.2014.
36. European commission: Scientific Committee on Consumer Products SCCP: Opinion on Triclocarban For other uses than as a preservative COLIPA n° P29. SCCP/0851/04, 2005, iz: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_016.pdf, Dostop: 10.10.2014.
37. Schebb NH, Inceoglu B, Ahn KC, Morisseau C, Gee SJ, Hammock BD: Investigation of human exposure to triclocarban after showering and preliminary evaluation of its biological effects. Environmental Science & Technology, 2011; 45 (7): 3109-3115.
38. Ahn KC, Kasagami T, Tsai HJ, Schebb NH, Ogunyoku T, Gee SJ, Young TM, Hammock BD: An immunoassay to evaluate human/environmental exposure to the antimicrobial triclocarban. Environmental Science & Technology, 2012; 46 (1): 374-381.
39. Cha J, Cupples AM: Determination of triclocarban and triclosan in biosolid and soil samples by application of pressurized liquid extraction and liquid chromatography with mass spectrometry. Geosystem Engineering, 2012; 15 (4): 280-291.
40. Pycke BF, Geer LA, Dalloul M, Abulafia O, Jenck AM, Halden RU: Human fetal exposure to triclosan and triclocarban in an urban population from Brooklyn, New York. Environmental Science & Technology, 2014; 48 (15): 8831-8838.
41. Schebb NH, Franze B, Maul R, Ranganathan A, Hammock BD: In vitro glucuronidation of the antibacterial triclocarban and its oxidative metabolites. Drug Metabolism and Disposition, 2012; 40 (1): 25-31.

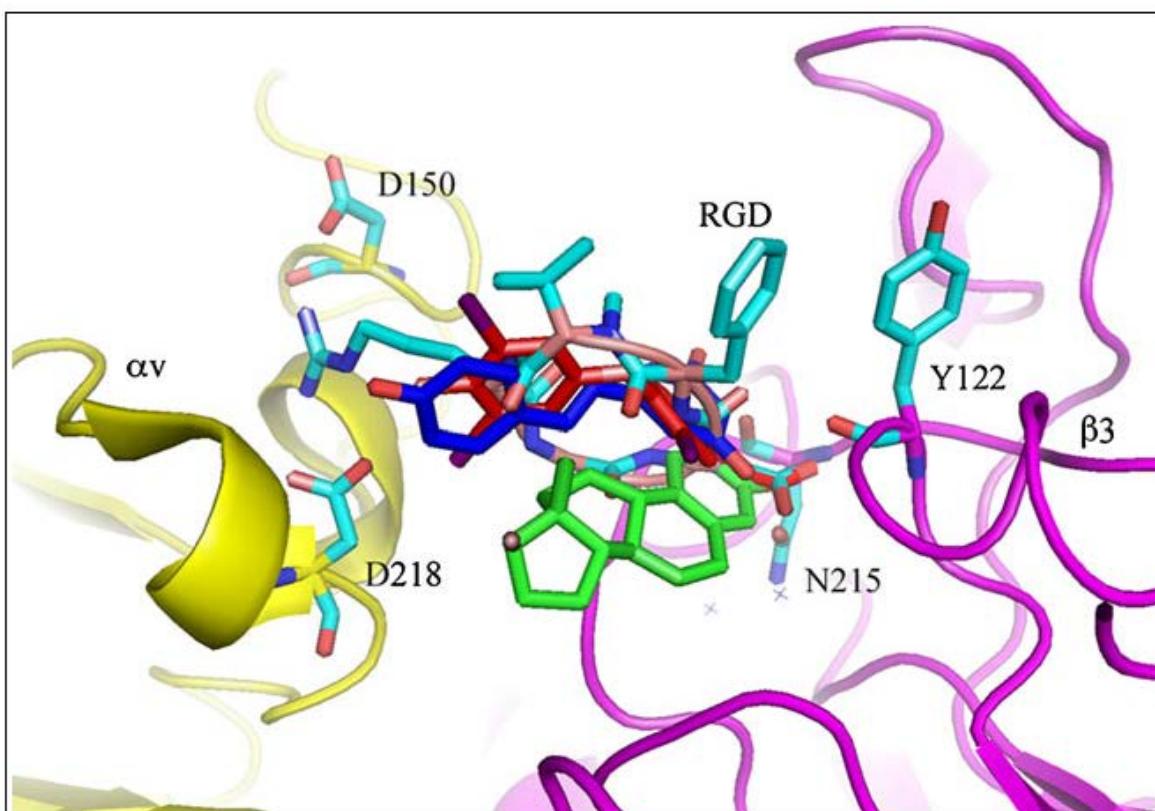
42. Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS, Opinion on triclosan, Antimicrobial resistance, 2010, iz: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_054.pdf, Dostop: 19.10.2014.
43. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triclosan#section=IUPAC-Name>, Dostop: 18.10.2014.
44. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6771432.htm, Dostop: 18.10.2014.
45. http://oehha.ca.gov/prop65/public_meetings/052909coms/triclosan/ciba3.pdf, Dostop: 18.10.2014.
46. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/phr1338?lang=en®ion=SI>, Dostop: 19.02.2014.
47. Triclosan (CAS# 3380-34-5) GreenScreen® for Safer Chemicals (GreenScreen®) Assessment. ToxServices LLC, 2014, <http://www.cela.ca/sites/cela.ca/files/3380-34-5-Triclosan-GreenScreenBW.pdf>, iz:, Dostop: 20.10.2014.
48. Triclosan, White Paper prepared by The Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA), 2011, iz: http://www.tufts.edu/med/apua/consumers/personal_home_21_4240495089.pdf, Dostop: 20.10.2014.
49. Reiss R, Mackay N, Habig C, Griffin J: An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002; 21 (11): 2483-2492.
50. Fang JL, Stingley RL, Beland FA, Harrouk W, Lumpkins DL, Howard P: Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. Journal of Environmental Science and Health, 2010; 28 (3): 147-171.
51. Piccoli A, Fiori J, Andrisano V, Orioli M: Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC). Il Farmaco, 2002; 57 (5): 369-372.

52. Scientific Committee on Consumer Products, SCCP, Opinion on Triclosan, COLIPA n° P32, 2009,
iz: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_166.pdf,
Dostop: 20.10.2014.
53. Chu S, Metcalfe CD: Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2007; 1164 (1-2): 212-218.
54. Allmyr M, Adolfsson-Erici M, McLachlan MS, Sandborgh-Englund G: Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via care products. Science of the Total Environment, 2006; 372 (1): 87-93.
55. <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/FR569.pdf>, Dostop: 20.10.2014.
56. Levenson AS, Jordan VC: MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. Cancer research, 1997; 57: 3071-3078.
57. Thawing, propagation, and cryopreserving protocol, MCF-7 Breast adenocarcinoma, iz: http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB22_MCF7_SOP-508.pdf, Dostop: 05.12.2013.
58. http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_TechSheet_-_Umbilical_Vein_Endothelial_Cell_Systems.pdf, Dostop: 19.02.2014.
59. <http://www40.homepage.villanova.edu/nicholas.falco/pd2.htm>, Dostop: 18.12.2013.
60. <http://futurescienceleaders.org/protocols/files/2013/02/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>, Dostop: 05.01.2014.
61. <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>, Dostop: 05.01.2014.
62. Biomedicinska analitika: Uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov citotoksičnosti, vaje iz biomedicinske analitike, iz: http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf, Dostop: 18.12.2013.

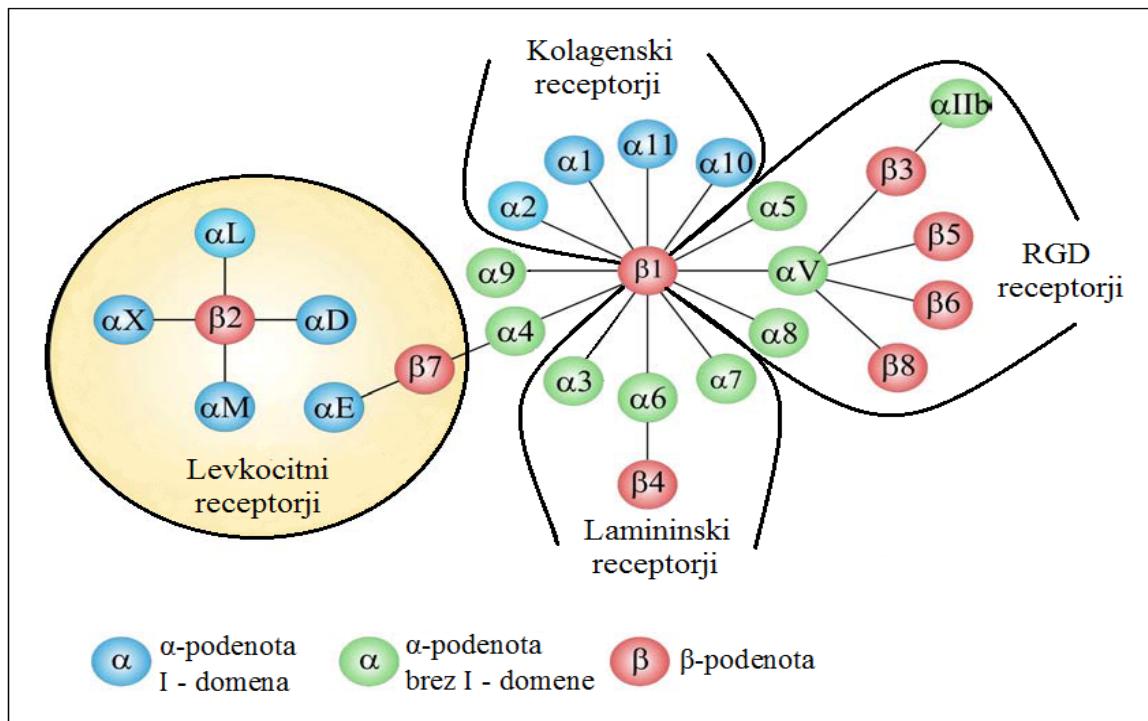
63. ATCC Technology Assessment of Roche xCELLigence™ System, iz: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Presentations/ATCC_Technology_Assessment.ashx. Dostop: 19.12.2013.
64. <http://www.aceabio.com/theory.aspx>, Dostop: 31.7.2014
65. xCELLigence System: Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading. Roche, Application Note No.2, 2013, iz: http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/xcell_appnotes/RTCA_AppNote02_acea_lores.pdf, Dostop: 31.07.2014.
66. Scrace S, O'Neill E, Hammond EM, Pires IM: Use of the xCELLigence system for real-time analysis of changes in cellular motility and adhesion in Physiological conditions. Methods Molecular Biology, 2013; 1046: 295-306.
67. Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y: Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. Journal of Biomolecular Screening, 2005; 10 (8): 795-805.
68. http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=179, Dostop: 17.12.2013
69. Cohen K, Flint N, Shalev S, Erez D, Baharal T, Davis PJ, Hercbergs A, Ellis M, Ashur-Fabiano O: Thyroid hormone regulates adhesion, migration and matrix metalloproteinase 9 activity via $\alpha_v\beta_3$ integrin in myeloma cells. Oncotarget, 2014; 5 (15): 6312-6322.

PRILOGE

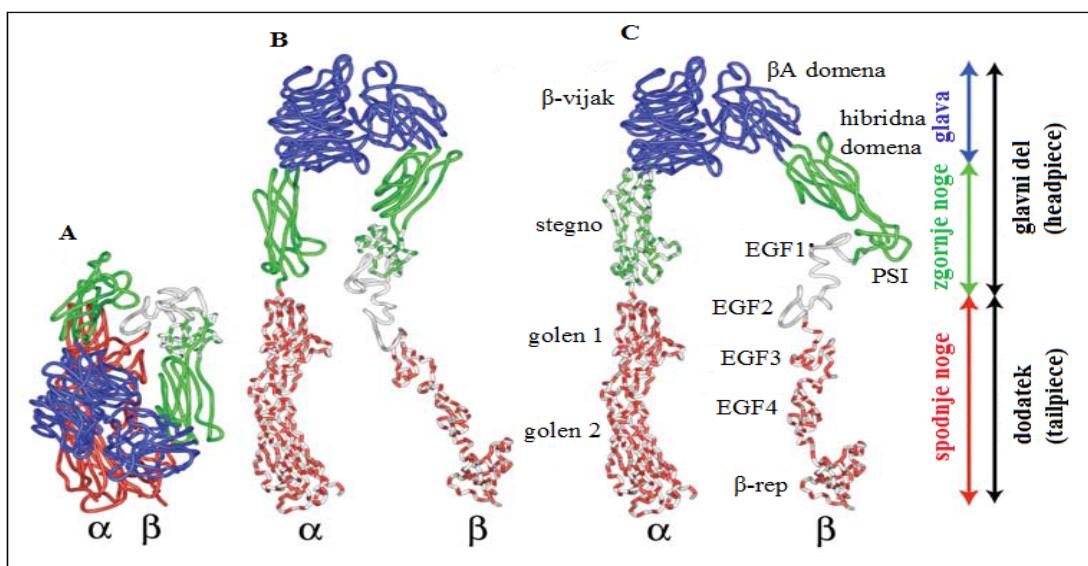
Priloga I: Kristalografska projekcija ligandov hormonov (ščitničnega hormona, steroida) in resveratrola na posebno receptorsko mesto (žep) v bližini RGD prepoznavnega mesta na glavi $\alpha_v\beta_3$ integrina. Glava $\alpha_v\beta_3$ integrina je sestavljena iz α_v (levo, rumeno) in β_3 (desno, vijolično) monomerov. Ligandi so tiroksin (rdeč), trans-resveratrol (temno moder) in estradiol (zelen). RGD ciklični peptid je svetlo moder. Identificirani integrinski aminokislinski ostanki so: Asp150 (D150) in Asp218 (D218) od α_v in Tyr122 (Y22) in Asn215 (N215) od β_3 (7).



Priloga II: Splošni pregled poddružin integrinskih receptorjev. Razdelitev integrinov glede na prisotnost I domene in glede na naravne ligande (13).



Priloga III: Tri splošne kristalne strukture integrina $\alpha_V\beta_3$ dobljene z elektronsko mikroskopijo; A) upognjena; B) »zaprta« iztegnjena in C) »odprta« iztegnjena konformacija (18).



Priloga IV: Fizikalno – kemijske lastnosti TCC in TCS (29-34, 43-46).

LASTNOSTI	VREDNOSTI za TCC	VREDNOSTI za TCS	
Strukturna formula			
Molekulska formula	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	
IUPAC ime	3-(4-klorofenil)-1-(3,4-diklorofenil)sečnina	5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol	
Ostala poimenovanja	/	2,4,4'-trikloro-2'-hidroksi-difenil eter, irgasan	
Molska masa	315,58 g/mol	289,54g/mol	
Tališče	254-256 °C	54-57,3 °C	
Vrelišče	/	280-290 °C	
Plamenišče	> 150 °C (> 302 °F)	/	
Specifična gostota	1,53 g/cm ³ pri 25 °C	1,55 g/cm ³ pri 22 °C	
Topnost v vodi	2,37 x 10 ⁻³ mg/L pri 25 °C	12 mg/L pri 20 °C	
Log K _{ow}	4,2	4,76	
pK _a	12,7	7,9	
Simbol in oznaka nevarnosti			
	N (nevorno za okolje)	Xi (dražilo); N (nevorno za okolje)	

Priloga V: Prisotnost toksičnih učinkov TCC in TCS pri človeku in v okolju. Razdeljeni so glede na to, kako visoka je verjetnost prisotnosti posameznega toksičnega učinka na zelo visoko (zV), visoko (V), zmerno (Z), nizko oziroma ni prisotna (N). Kjer podatkov ni, je oznaka (MP) (34-36, 46-48, 50, 52, 55).

TOKSIČNI UČINKI	TCC	TCS
<i>Vplivi na človeško zdravje:</i>		
Rakotvornost	N	N
Mutagenost/genotoksičnost	N	N
Reproducivna toksičnost	Z	Z
Strupenost za razvoj (razvojna nevrotoksičnost)	N	Z
Vpliv na endokrina aktivnost	Z	Z
Akutna toksičnost za sesalce	N	zV
Sistemska toksičnost (imunotoksičnost) – 1-X odmerek	N	zV
Sistemska toksičnost (imunotoksičnost) – več-X odmerek	Z	Z
Nevrotoksičnost – 1-X odmerek	MP	MP
Nevrotoksičnost – več-X odmerek	MP	Z
Preobčutljivost kože	N	N
Respiratorna preobčutljivost	MP	MP
Iritacija/jedkost kože	Z	V
Iritacija/jedkost oči	Z	V
<i>Strupenost za okolje:</i>		
Akutna toksičnost za vodno okolje	zV	zV
Kronična toksičnost za vodno okolje	zV	zV
<i>Okoljski vplivi:</i>		
Trdovratnost	V	V
Bioakumulacija (kopičenje)	Z	V
<i>Fizikalne nevarnosti:</i>		
Reaktivnost	N	N
Vnetljivost	N	N

