

Ispitivanje uticaja dibutil ftalata (DBP) na endotelne ćelije krvnih sudova na modelu humane ćelijske linije EA.hy926

Ftalati su hemikalije širokog obima proizvodnje, koje se koriste za omekšavanje i poboljšavanje fleksibilnosti proizvoda od plastike, uključujući komplete za infuziju, kese za skladištenje krvi i drugih telesnih tečnosti, dečje igračke i plastične zavese. Pored toga, prisutni su i u rastvaračima, mazivnim uljima, fiksativima i deterdžentima koji se koriste u automobilskoj industriji. Nalaze se i u proizvodima za ličnu negu kao što su sprejevi za kosu, lakovi za nokte i hidratantne kreme. Jedan od najzastupljenijih plastifikatora (engl. plastic-associated chemicals, PACs) i endokrinih ometača je dibutil ftalat (engl. dibutyl phthalate, DBP). U grupu endokrinih ometača (engl. endocrine disrupting chemicals, EDCs) svrstava se zbog sposobnosti da remeti normalno funkcionisanje endokrinog sistema. DBP može povećati toksičnost drugih hemikalija, a poznato je da ima i mutageni efekat. Epidemiološke studije su pokazale da je prisustvo DBP u serumu ili urinu pozitivno korelisano sa različitim tipovima kardiovaskularnih bolesti (engl. cardiovascular diseases, CVD). Kardiovaskularne bolesti su klasa bolesti koje zahvataju srce i krvne sudove, a jedna od najzastupljenijih CVD je ateroskleroza. Po izveštaju Svetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine, kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrti sa približno 17.7 miliona smrtnih slučajeva, što predstavlja 31% od svih slučajeva. Brojne *in vivo* studije na laboratorijskim životinjama su pokazale uzročnu povezanost između PACs i CVD, međutim specifični mehanizmi putem kojih PACs uzrokuju nastanak i razvoj CVD nisu identifikovani, zbog čega su neophodna *in vitro* istraživanja u cilju sagledavanja subcelularnih mehanizama preko kojih PACs dovode do nastanka CVD. Razumevanje mehanizama bolesti je od ključnog značaja za formulisanje efikasnih strategija prevencije i spoznaje novih terapijskih strategija.

Cilj ovog istraživanja je produbljanje znanja o mehanizmima uključenim u aktivaciju vaskularnih endotelnih ćelija nakon izlaganja DBP. Pretpostavljeno je da DBP dovodi do promena u endotelnim ćelijama koje su specifične za rane faze nastanka ateroskleroze, poput povećane propustljivosti za različite molekule.

U istraživanjima je korišćena linija humanih vaskularnih endotelnih ćelija EA.hy926. Uticaj DBP na vijabilnost EA.hy926 ćelija je ispitivan merenjem mitohondrijske aktivnosti pomoću MTT testa koji se zasniva na konverziji tetrazolijumovih soli u formazan u prisustvu mitohondrijalne reduktaze. Praćenjem transfera albumina kroz ćelijski monosloj u Transwell® sistemu (polikarbonatni inserti sa porama veličine 0.4 µm) je ispitivan uticaj DBP na propustljivost endotelnih ćelija.

Uočava se sličan uticaj DBP na vijabilnost EA.hy926 ćelija nakon tretmana u trajanju od 24 i 48 h, s tim što je citotoksičan efekat viših testiranih koncentracija (200, 250 i 500 µM) izraženiji nakon 48 h. Niže koncentracije DBP (1, 10 i 100 µM) nisu imale uticaja na vijabilnost ćelija, te je testiran efekat DBP u tim koncentracijama na propustljivost konfluentnog sloja EA.hy926 ćelija za albumin. Nakon 6 h, najniža koncentracija DBP (1 µM) je najviše uticala na povećanje propustljivosti ćelijskog monosloja, nakon 24 h sve ispitivane koncentracije su ispoljavale sličan efekat, dok su nakon 48 h srednja i najveća koncentracija DBP (10 i 100 µM) ostvarile najizraženiji efekat. Važno je napomenuti da je u svim ispitivanim koncentracijama i vremenima izlaganja efekat DBP bio veoma diskretan (za 4-7% povećana propustljivost u odnosu na kontrolnu grupu koja nije tretirana DBP).

Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal DBP da dovede do promena u propustljivosti sloja

Vuk Gordić (1999), Užice, Jovana Sterije Popovića 28, učenik 3. razreda Užičke gimnazije

MENTOR: dr Bojana Stanić, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

endotelnih EA.hy926 ćelija, ali imajući u vidu male razlike koje su detektovane u odnosu na kontrolnu grupu neophodna su dalja istraživanja u cilju optimizacije metoda koje smo koristili za ispitivanje potencijalnih mehanizama uključenih u aktivaciju vaskularnih endotelnih ćelija nakon izlaganja DBP. Predložen je nastavak ovog istraživanja tokom naredne godine, uz izvesne modifikacije. Kako bi se što bolje imitirali realni uslovi izloženosti, umesto subhroničnog izlaganja fiziološki relevantnim koncentracijama DBP, EA.hy926 ćelijska linija će biti hronično izlagana ovoj zagađujućoj materiji u laboratoriji ENDOS na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, a eksperimenti u cilju opisivanja mehanizama koji su u osnovi promena na koje ukazuju rezultati ovogodišnjeg istraživanja će biti izvedeni u Laboratoriji za biologiju IS Petnica.

Effect of Dibutyl Phthalate (DBP) on the Human Cell Line EA.hy926 as a Model of Endothelial Cells of Blood Vessels

Dibutyl phthalate (DBP) is one of the most commonly used plastic-associated chemicals (PACs) and endocrine disruptors, which has recently attracted the attention of the scientific community due to the widespread use of plastics, and potential negative impact on health. Epidemiological studies have shown that the presence of DBP in urine or serum were positively correlated with various types of cardiovascular disease (CVD) and cardiovascular risk factors. Numerous *in vivo* studies have shown a causal relationship between PACs and CVD, but spe-

cific mechanisms by which PACs promote the development and progression of CVD remain unclear. Therefore, *in vitro* research is necessary to identify subcellular mechanisms by which PACs cause CVD. The aim of this research is to deepen the knowledge about the mechanisms involved in the activation of vascular endothelial cells after exposure to dibutyl phthalate. The central hypothesis is that DBP leads to changes specific to early stages of atherosclerosis in endothelial cells, such as increased cellular permeability for different molecules. We used the human cell line EA.hy926 as a model of human vascular endothelial cells. The effect of DBP on the viability of the EA.hy926 cells was tested by measuring the mitochondrial activity by MTT assay, and the effect of DBP on the permeability of endothelial cells was examined by monitoring the transfer of albumin through the cellular monolayer using Transwell® system. Based on the results of the MTT test, a similar effect of DBP on the viability of EA.hy926 cells was observed after 24 and 48 hours of treatment, with the cytotoxic effect of higher concentrations (200, 250 and 500 µM) more pronounced after 48 h. Lower concentrations of DBP (1, 10 and 100 µM) had no effect on cell viability, and therefore were used to test the permeability of the confluent layer of EA.hy926 cells for albumin. In all tested concentrations and exposure times, the effect of DBP on the permeability of cells was very discrete (4-7% increased permeability compared to the control group). The obtained results indicate the potential of DBP to lead to changes in the permeability of the endothelial EA.hy926 cell line. Bearing in mind slight differences in cell permeability detected here, further research is needed to optimize the method. 