

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina
veterinarska medicina

UDK 504.5:661.723:611.78:611.018.3/.4:636.028:599.323.452(043.3)

Jana Brankovič, dr. vet. med.

**VPLIVI PLANARNEGA IN NEPLANARNEGA
HEKSAKLOROBIFENILA NA RAZVOJ STEGNEICE PRI
PODGANAH**

Doktorska disertacija

**EFFECTS OF (CO)PLANAR AND NONPLANAR
HEXACHLOROBIPHENYL ON FEMUR DEVELOPMENT IN
RATS**

PhD thesis

Ljubljana 2017

Jana Brankovič

Vplivi planarnega in neplanarnega heksaklorobifenila na razvoj stegenice pri podganah

Doktorska disertacija je zaključek interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina s področja veterine. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za predklinične vede in Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na oddelku za biomedicinske raziskave medicinske univerze v Gradcu v Avstriji in na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani v sodelovanju s Katedro za stomatološko protetiko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: prof. dr. Azra Pogačnik

Somentorica: prof. dr. Milka Vrecl Fazarinc

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni ter da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednik: prof. dr. Gregor Fazarinc

član: prof. dr. Gregor Majdič

članica: prof. dr. Janja Jan (Medicinska fakulteta UL, Katedra za zobne bolezni in normalno morfologijo zobnega organa)

IZVLEČEK

Ključne besede: Onesnaževalci okolja – toksičnost; razvoj kosti – anatomija in histologija; poliklorirani bifenili – škodljivi učinki; stegenica – rast in razvoj; spremembe telesne teže; biomehanski pojavi; podgane Wistar

Poliklorirani bifenili (PCB) so obstojni onesnaževalci okolja. Zaradi lipofilnosti se kopičijo v tkivih, bogatih z maščobo, ter s tem vplivajo na človeka in živali. Tvegana je predvsem izpostavljenost med prenatalnim in/ali zgodnjim postnatalnim obdobjem. V raziskavi smo želeli proučiti, kako neplanarni PCB-155 in planarni PCB-169 individualno in v kombinaciji po skotitvi učinkujeta na razvoj stegenic predpubertetnih sesnih podgan. Podganam Wistar smo v različnih časovnih razmikih po skotitvi intraperitonealno vnesli PCB. V celoti je prva skupina prejela 3 mg PCB-169/kg telesne mase (tm), druga 12 mg PCB-155/kg tm ter tretja 3 mg PCB-169 in 12 mg PCB-155/kg tm. Kontrolna skupina je prejela olivno olje. Mladiče smo žrtvovali 9. in 22. dan po skotitvi. Odvzeli smo kri za biokemično analizo ter stegenice za histomorfometrične, geometrične, biomehanske meritve in analizo vsebnosti mineralov. Pri mladičih, izpostavljenih PCB-169, smo ugotovili nižjo telesno maso, krajše in tanjše stegenice (zmanjšana mozgovna votlina) in spremembe v epifiznem rastnem hrustancu, kar nakazuje motnje v enhondralni in perihondralni osifikaciji. Na podlagi znižanih ravni sALP in sPO_4 ter nižjega deleža Ca v kosti sklepamo o zmanjšani aktivnosti osteoblastov in posledično upočasneni mineralizaciji. V skupini PCB-155 + PCB-169 so bile spremembe podobne, vendar manj izrazite, kar nakazuje zmanjšanje učinkov pri sočasni aplikaciji PCB-155 in PCB-169. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da izpostavitve planarnemu PCB-169 prek mleka povzroči motnje v rasti in razvoju stegenic.

ABSTRACT

Key words: Environmental pollutants – toxicity; bone development – anatomy and histology; polychlorinated biphenyls – adverse effects; femur – growth and development; body weight changes; biomechanical phenomena; rats, Wistar

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are highly persistent environmental pollutants. Due to their lipophilicity, they biomagnify in fat-rich tissues and thus affect humans and animals. Exposure during gestation and/or the early postnatal period is especially harmful. The aim of our study was to evaluate effects of nonplanar PCB-155 and (co)planar PCB-169, individually and in combination, on the femur development of prepubertal suckling and weaning rats, exposed through milk. Wistar rats were administered PCBs intraperitoneally at different points after delivery. In total, Group 1 received 3 mg of PCB-169 per kg body mass (bm), Group 2 received 12 mg of PCB-155 per kg bm and Group 3 received 3 mg of PCB-169 and 12 mg of PCB-155 per kg bm. The control group was administered olive oil. Offspring were sacrificed on postnatal day 9 or 22, blood samples collected for biochemical analysis, and femurs dissected for histomorphometrical, geometrical, biomechanical measurements and biochemical analysis of mineral content. Exposure to PCB-169 resulted in lower bm, shorter and thinner femurs (reduced bone marrow cavity) and affected epiphyseal growth plate, which reflects hindered endochondral and perichondral ossification. Due to the reduced serum levels of alkaline phosphatase and phosphate, and lower calcium bone level, we postulate lowered osteoblast activity and thus delayed mineralisation. In the PCB-155 + PCB-169 group, the changes were similar but less pronounced, suggesting minor effects in the PCB combination. Our results demonstrate that exposure to planar PCB-169 through lactation causes disorders in femur growth and development.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	5
ABSTRACT.....	7
KAZALO VSEBINE.....	9
KAZALO SLIK	13
KAZALO TABEL	15
SEZNAM OKRAJŠAV	17
1 UVOD.....	21
Namen dela.....	22
2 PREGLED LITERATURE	23
2.1 Problematika onesnaževanja okolja in vpliv na zdravje	23
2.2 PCB in njihova uporaba po svetu in v Sloveniji	23
2.2.1 Kemična zgradba in fizikalno-kemične lastnosti PCB	25
2.2.2 Vnos v organizem, porazdelitev in razgradnja	27
2.2.3 Vplivi PCB na organizme.....	28
2.2.4 Planarni PCB-169 in neplanarni PCB-155	30
2.3 Kostno tkivo.....	31
2.3.1 Sestava kosti in kostnega tkiva.....	31
2.3.2 Kostne celice, periost in endost	33
2.3.3 Tvorba in razvoj dolgih kosti – zakostenevanje ali osifikacija	34
2.3.4 Epifizni rastni hrustanec.....	36
2.4 Skelet in stegenica podgan.....	38
2.5 Zgodnje postnatalno obdobje podgan	41
2.6 Vplivi PCB na kostno tkivo	41
2.6.1 Prenos PCB z materinim mlekom	43
2.6.2 Serumski biokemični kazalniki presnove kostnega tkiva.....	44
2.6.3 Geometrija in biomehanika kosti	44
3 MATERIAL IN METODE.....	47
3.1 Dovoljenje za izvajanje poskusov	47
3.2 Material.....	47

3.2.1	Kongenerji PCB	47
3.2.2	Testne živali in protokol tretiranja	47
3.2.3	Odvzem tkiv	49
3.3	Metode.....	50
3.3.1	Geometrija stegenic mladičev	50
3.3.2	Priprava materiala za histometrično analizo	52
3.3.3	Morfometrična analiza stegenic.....	53
3.3.4	Stereometrična analiza stegenic	56
3.3.5	Biomehanično testiranje stegenic 22 dni starih mladičev.....	57
3.3.6	Biokemične preiskave serumskih kazalnikov kostne premene in jetrnih encimov	59
3.3.7	Biokemična analiza kosti (vsebnost kostnih mineralov).....	60
3.4	Statistična obdelava podatkov.....	61
4	REZULTATI	63
4.1	Koncentracije kongenerjev PCB v serumu mladičev	63
4.2	Vpliv kongenerjev PCB na relativno maso jeter in aktivnost jetrnih encimov. 63	
4.3	Vpliv kongenerjev PCB na telesno maso mladičev	65
4.4	Vplivi kongenerjev PCB na rast stegenic mladičev.....	66
4.5	Vpliv kongenerjev PCB na geometrijo prečnega preseka stegenic 22 dni starih mladičev	68
4.6	Vplivi kongenerjev PCB na morfometrijo stegenic mladičev	70
4.6.1	Histomorfometrične lastnosti distalnega epifiznega ravnega hrustanca (ERH).....	72
4.6.2	Volumenska gostota kostnih celic in kostnine	73
4.7	Vplivi kongenerjev PCB na trdnost stegenic 22 dni starih mladičev	74
4.8	Vpliv kongenerjev PCB na serumske biokemične kazalnike kostne premene 76	
4.9	Vplivi kongenerjev PCB na biokemično analizo kosti.....	77
5	RAZPRAVA	81
5.1	Vpliv PCB-155 in PCB-169 na rast mladičev	82
5.2	Vpliv PCB-155 in PCB-169 na rast stegenic.....	82
5.2.1	Devet dni stari mladiči	83
5.2.2	22 dni stari mladiči.....	84
5.3	Vpliv PCB na mineralizacijo stegenice podgan.....	90

5.4	Vpliv PCB na trdnost kosti 22 dni starih živali.....	93
5.5	Vpliv kombinacije PCB-155 in PCB-169 na rast in mineralizacijo stegnenic ...	94
6	SKLEPI.....	97
7	POVZETEK.....	99
8	SUMMARY	103
9	ZAHVALE	107
10	LITERATURA	109

KAZALO SLIK

SLIKA 1: Kemična zgradba molekule PCB.

Figure 1: Chemical structure of PCB molecule.26

SLIKA 2: Kemična zgradba planarnega PCB-169 in neplanarnega PCB-155.

Figure 2: Chemical structure of planar PCB-169 and non-planar PCB-155.30

SLIKA 3: Zgradba zrele scelne kostnine.

Figure 3: The structure of mature cortical bone.32

SLIKA 4: Shematični prikaz prve in druge faze endohondralne osifikacije v dolgih kosteh.

Figure 4: The first and the second stage of endochondral ossification in long bones schematically...35

SLIKA 5: Distalni epifizni rastni hrustanec: območja endohondralne osifikacije.

Figure 5: Distal epiphyseal growth plate: zones of the endochondral ossification.37

SLIKA 6: Shematska slika (A) desne zadnje okončine (medialna stran) in (B) desne stegenice (kavdalna stran) miši.

Figure 6: Schematically (A) mouse's right hind limb (medial aspect) and (B) mouse's right femur (caudal aspect).39

SLIKA 7: Krivulja »napetost-raztezek« ob obremenitvi kortikalne kostnine.

Figure 7: The stress–strain curve obtained by loading a sample of compact bone in tension.46

SLIKA 8: Časovni potek i. p. vnosov PCB podganam v laktaciji.

Figure 8: Experimental treatment regime of i. p. PCB applications to the lactating rats.48

SLIKA 9: Aparat mikroCT, s katerim smo merili geometrijo stegenic.

Figure 9: microCT for measuring geometry of femur samples.51

SLIKA 10: μ CT-posnetek stegenice 22 dni starega mladiča v dveh različnih ravninah.

Figure 10: μ CT scans of femur on PND 22 (two different planes).52

SLIKA 11: Morfometrična in stereometrična analiza stegenic 22 dni starega mladiča.

Figure 11: Femur morphometrical and stereometrical analysis of the offspring on PND 22.55

SLIKA 12: Univerzalni upogibni stroj Instron 4301 za izvedbo našega tritočkovnega upogibnega preizkusa stegenic.

Figure 12: Instron 4301 universal mechanical testing machine used for our three-point bending test of rat's femur. 58

SLIKA 13: (A) telesna masa (srednja vrednost $\pm$ SEM) in (B) dnevni prirast, ki je prikazan kot povprečno dnevno povečanje telesne mase mladičev podgan Wistar.

Figure 13: (A) Body mass (mean $\pm$ SEM) and (B) the growth rate, which was expressed as the average daily increase in the body mass of Wistar rat offspring.66

SLIKA 14: μ -CT-slike prečnega preseka stegenic primerkov vseh štirih poskusnih skupin v srednjem delu diafize.

Figure 14: Representative cross-sectional microCT images of the femur mid-diaphysis in differently exposed groups. 70

SLIKA 15: Distalni okrajek stegenice devet dni stare podgane v fazi enhondralne osifikacije.

Figure 15: Femur distal extremity of rat offspring on PND 9, endochondral ossification. 71

SLIKA 16: Distalni okrajek stegenice 22 dni stare podgane v fazi enhondralne osifikacije.

Figure 16: Femur distal extremity of a rat offspring on PND 22, endochondral ossification. 71

SLIKA 17: Tritočkovni preizkus stegenic.

Figure 17: Three-point bending test of the femur. 75

SLIKA 18: Stegenice devet dni starih živali v žarilnih lončkih po sežigu v žarilni peči, ko so postale »mehurčasto« nabrekli.

Figure 18: Femurs on PND 9 in quartz crucibles after their burning in a muffle furnace. The bones had a "foamy" appearance.78

KAZALO TABEL

TABELA 1: Število poskusnih živali (matere ter mladiči, 9. in 22. dan) v posameznih skupinah.

Table 1: Number of experimental animals (mothers and offspring) in the experimental groups.49

TABELA 2: Krvne koncentracije PCB (ng/mL) devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 2: PCB levels in blood (ng/mL) of the offspring on PND 9 and 22 in the different experimental groups.63

TABELA 3: Relativna masa jeter in serumske koncentracije aspartat aminotransferaze (s-AST), alaninske aminotransferaze (s-ALT) in laktat dehidrogenaze (s-LDH) devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 3. Relative liver mass and serum concentration of aspartate aminotransferase (s-AST), alanine aminotransferase (s-ALT) and lactate dehydrogenase (s-LDH) of rat offspring on PND 9 and 22 in the different experimental groups.64

TABELA 4: Dolžina in širina stegenic devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 4: The femur length and width of rat offspring on PND 9 and 22 in the different exposure groups.67

TABELA 5: Geometrični parametri prečnega preseka stegenic 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 5: Femur cross-sectional geometrical parameters of rat offspring on PND 22 in the different exposure groups.69

TABELA 6: Histomorfometrični parametri ERH v stegenici devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 6: Epiphyseal growth plate histomorphometric parameters in the femur of rat offspring on PND 9 and 22 in the different exposure groups.73

TABELA 7: Volumenska gostota scelne kostnine (Vv_{TB}), osteoklastov (Vv_{OK}) in osteoblastov (Vv_{OB}) v stegenici devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 7: Trabecular bone volume (Vv_{tb}), osteoclast volume density (Vv_{ok}) and osteoblast volume density (Vv_{ob}) of rat offspring femur on PND 9 and 22 in the different exposure groups.74

TABELA 8: Rezultati tritočkovnega preizkusa diafize stegenic 22 dni starih mladičev po posameznih poskusnih skupinah.

Table 8: The results of the three-point bending test of the femur mid-diaphysis of rat offspring on PND 22 in the different exposure groups.76

TABELA 9: Raven serumskega kalcija (s-Ca) in fosfata (s-PO₄) ter aktivnost nespecifične alkalne fosfataze (sALP) pri devet in 22 dni starih mladičih podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 9: Serum calcium (s-Ca) and phosphate (s-PO₄) level and total nonspecific alkaline phosphatase (sALP) activity of rat offspring on PND 9 and 22 in the different exposure groups.77

TABELA 10: Biokemična analiza parametrov anorganske snovi stegenice 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah.

Table 10: Biochemical analysis of the parameters of inorganic femur content on PND 22 of rat offspring in the different exposure groups.79

SEZNAM OKRAJŠAV

A	površina (angl. area)
α NF	alfanaftoflavon (2-fenilbenzo[h]kromen-4-on), sintetični derivat flavonov (angl. α -naphthoflavone)
ϵ	deformacija, raztezek (angl. deformation, strain)
σ	napetost (angl. stress, load)
A1221	Aroclor 1221
A1254	Aroclor 1254
AhR	citosolni arilogljikovodikov receptor (Ah receptor, angl. aryl hydrocarbon receptor)
ATSDR	ameriška agencija za toksične substance in register bolezni (angl. Agency for Toxic Substances and Disease Registry)
BMC	vsebnost kostnih mineralov (angl. bone mineral content)
BMD	mineralna gostota kosti (angl. bone mineral density)
BMPs	kostni morfogenetski proteini (angl. bone morphogenetic proteins)
CAR	konstitutivni receptor za androstan (angl. constitutive androstane receptor)
CSA	površina prečnega preseka (angl. cross-sectional area)
CSMI	geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka (angl. cross-sectional moment of inertia)
ctCSA	površina prečnega preseka kortikalne kostnine (angl. cortical CSA)
CTX	razgradni produkti karboksilnih koncev telopeptidov kolagena tipa I (angl. C-terminal telopeptide/carboxy-terminal collagen crosslinks)
d	premik (angl. displacement)
DDE	diklorodifenildikloroetilen (angl. dichlorodiphenyldichloroethylene)
DDT	diklorodifeniltrikloroetan (angl. dichlorodiphenyltrichloroethane)
DXA, DEXA	dvojna rentgenska absorpcijometrija (angl. dual-energy X-ray absorptiometry)
E	elastični ali Youngov prožnostni modul (angl. Young's modulus)
E_2	estradiol 17- β (angl. 17 β -estradiol)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EEA	Evropska agencija za okolje (angl. European Environment Agency)
ENDO	endostalni oz. notranji obseg stegenice na sredini diafize
ER	receptor za estrogen (angl. estrogen receptor)
ERH	epifizni rastni hrustanec (angl. epiphyseal growth plate)

FGF	fibroblastni rastni dejavnik (angl. fibroblast growth factors)
GD	dnevi brejosti (angl. gestational day)
GH	rastni hormon (angl. growth hormone)
H/W	linija podgan Han Wistar
HE	barvanje s hematoksilinom in eozinom
HZ	cona hipertrofije (angl. hypertrophic zone)
I	geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka (CSMI) (angl. cross-sectional moment of inertia)
i. p.	intraperitonealno (angl. intraperitoneally)
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo/spektrometrom (angl. Inductively coupled plasma mass spectrometry)
IGF-1	inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (angl. insulin-like growth factor 1)
IGFBP	vezavni proteini IGF (angl. insulin-like growth factor binding proteins)
Ihh	signalna molekula »Indian hedgehog«
IQR	interkvartilni razmik (angl. interquartile range)
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (angl. International Union of Pure and Applied Chemistry)
L-E	linija podgan Long-Evans
LD ₅₀	srednji letalni odmerek (angl. lethal dose, 50% or median lethal dose)
mikroCT/μCT	računalniška mikrotomografija (angl. micro computed tomography)
OB	osteoblasti (angl. osteoblasts)
OCN	osteokalcin (angl. osteocalcin)
OK	osteoklasti (angl. osteoclasts)
PBDE	polibromirani bifeniletri (angl. polybrominated diphenyl ethers)
PCB	poliklorirani bifenili (angl. polychlorinated biphenyls)
PCDD	poliklorirani dibenzodioksini, dioksini (angl. polychlorinated dibenzodioxins)
PCDF	poliklorirani dibenzofurani (angl. polychlorinated dibenzofurans)
PDGF	trombocitni rastni dejavnik (angl. platelet-derived growth factor)
PERI	periostalni oz. zunanji obseg stegenice na sredini diafize
PINP	N-terminalni propeptid prokolagena tipa I (angl. procollagen type I N-terminal propeptide)
PND	dan po skotitvi (angl. post-natal day)
POPs	obstojna organska onesnaževala (angl. persistent organic pollutants)
pQCT	periferna kvantitativna računalniška tomografija (angl. peripheral quantitative computed tomography)

PPT	selektivni agonist ER α hidroksifenilpropilpirazol (angl. 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole)
PTH	parathormon (angl. parathyroid hormone)
PTHrP	parathormonu sorodni peptid (angl. parathyroid hormone-related protein)
PZ	cona množitve oz. proliferacije hrustančnega vložka (angl. proliferative zone)
PXR	kсенobiotični receptor za pregnan (angl. pregnane xenobiotic receptor)
ROI	interesno meritveno okno (angl. region of interest)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)
Runx2	šibko povezan transkripcijski faktor 2
S-D	linija podgan Sprague Dawley
sALP	serumska alkalna fosfataza (celotna) (angl. total serum alkaline phosphatase)
s-ALT	serumska alaninska aminotransferaza (angl. serum alanine aminotransferase)
s-AST	serumska aspartat aminotransferaza (angl. serum aspartate aminotransferase)
s-Ca	serumski kalcij (angl. serum calcium)
s- γ -GT	serumska gamaglutamil transferaza (angl. serum gamma-glutamyl transferase)
s-LDH	serumska laktat dehidrogenaza (angl. serum lactate dehydrogenase)
s-PO ₄	serumski anorganski fosfat (angl. serum inorganic phosphate)
sp	stopinje prostosti (test hi-kvadrat – χ^2)
TB	gobasta kostnina (angl. trabecular bone)
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (angl. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)
tCSA	površina prečnega preseka celotne kosti (angl. total CSA)
TEF	faktor toksične ekvivalentnosti (angl. toxic equivalency factor)
TEQ	toksični ekvivalent (angl. toxic equivalents)
TGF- β	preoblikovalni rastni dejavnik β (angl. transforming growth factor beta)
TM	toluidinsko modrilo (angl. toluidine blue)
TRAP	kisla fosfataza, odporna na tartrat (angl. tartrate-resistant acid phosphatase)
USEPA	ameriška agencija za zaščito zdravja in okolja (angl. The United States Environmental United States Protection Agency)
Vv	volumenska gostota

1 UVOD

Poliklorirani bifenili (PCB) so sintetične organoklorove spojine iz skupine cikličnih ogljikovodikov in spadajo med zelo obstojne onesnaževalce okolja. Glede na število in položaj atomov klora v molekuli PCB poznamo 209 kongenerjev (strukturno sorodnih kemičnih substanc). Razlike v legi in številu klorovih atomov v molekuli bifenila vplivajo na njihove fizikalno-kemične lastnosti in biološko aktivnost. Planarni PCB so strukturno podobni 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksinu (TCDD), zato imajo njemu podoben način delovanja z visoko afiniteto za citosolni arilogljikovodikov receptor (AhR). Nasprotno imajo TCDD nepodobni PCB oz. neplanarni PCB izjemno nizko afiniteto za AhR in delujejo večinoma po drugih, manj raziskanih poteh. Izsledki številnih raziskav iz zadnjih nekaj desetletij so pokazali, da ciklični ogljikovodiki, med njimi tudi PCB, povzročajo različne škodljive učinke, kot so karcinogenost ter endokrine, nevrološke, imunske, razvojne in reprodukcijske motnje pri prostoživečih in laboratorijskih živalih ter človeku (Safe, 1990; Foster, 1995; Tilson in Kodavanti, 1998; Bustnes in sod., 2004). Plodovi in mladiči so občutljivejši na toksične učinke PCB kot odrasle živali (Hoffman in sod., 1996; Gutleb in sod., 2010). Raziskave kažejo, da je tudi skelet ciljni organ za PCB, saj se posamezni kongenerji PCB akumulirajo v kosteh (Jan in sod., 2001). TCDD in PCB lahko vplivajo na presnovo kostnega tkiva (tj. kostno premeno), geometrijo, kostno mineralno gostoto in mehanske lastnosti kosti (Jämsä in sod., 2001; Miettinen in sod., 2005; Finnilä in sod., 2010). Izpostavljenost TCDD in PCB v zgodnjih fazah razvoja kosti (intrauterino in prek mleka) povzroči večje spremembe v kosteh kot izpostavitve v odraslih dobi (Miettinen in sod., 2005; Elabbas in sod., 2011b).

V literaturi je zelo malo informacij o vplivu mešanice dveh kongenerjev PCB različne planarnosti na organizem (farmakokinetične interakcije kongenerjev, razporeditev v tkivih, raven porfirina v jetrih) (van Birgelen in sod., 1996a; van Birgelen in sod., 1996b; Lee in sod., 2002), medtem ko o vplivih mešanic na kosti nismo našli objavljenih virov.

Namen dela

Namen našega poskusa je bil proučiti kratkotrajni vpliv dveh kongenerjev PCB različne planarnosti na razvoj dolgih cevastih kosti pri predpubertetnih podganjih mladičih. Zato smo izbrali dioksinu podoben planarni PCB-169 (3,3',4,4',5,5') in dioksinu nepodoben neplanarni PCB-155 (2,2',4,4',6,6'), ki imata različno toksičnost in hitrost razgradnje. Ker so PCB v okolju prisotni v mešanica, škodljivi učinki posameznega kongenerja ne omogočajo ustrezne ocene celotnega vpliva vseh prisotnih kongenerjev PCB. Poleg tega so učinki takih mešanic na skelet pravzaprav še neraziskani, zato smo v svoji raziskavi proučili tudi učinke kombinacije planarnega in neplanarnega PCB na stegenice mladičev. Želeli smo raziskati vplive samo laktacijske izpostavljenosti PCB, zato smo podgane izpostavili kongenerjema šele po skotitvi. Ker smo želeli zaobiti učinek spolnih steroidov, tj. povečana rast dolgih kosti v dolžino med navalom pubertetne rasti (Shim, 2015), smo se osredotočili na spolno nezrele mladiče dveh različnih starostnih skupin. Starost mladičev smo izbrali glede na obdobja zgodnjega postnatalnega razvoja podgane: ko so stari devet dni, se mladiči prehranjujejo izključno z materinim mlekom (obdobje sesanja), pri 22 dneh starosti pa so v obdobju odstavljanja, v katerem ob mleku že uživajo manjše količine trdne hrane in vode. Stegjenica devet dni starih podgan ima hrustančni okvir z izoblikovano kostno manšeto v predelu diafize, ki je ločena od enhondralne kostnine v metafizi, medtem ko je pri podganah, starih 22 dni, distalna metafiza že del telesa stegenice. Z meritvami in analizo serumskih biokemičnih parametrov, histomorfologije, geometrije, trdnosti in mineralne sestave kosti smo ugotavljali vplive PCB-169 in PCB-155 ter njune kombinacije na razvoj stegenice pri mladičih podgan. V ta namen smo postavili te delovne hipoteze:

1. Izpostavljenost planarnemu (PCB-169) in neplanarnemu (PCB-155) heksaklorobifenilu prek materinega mleka vpliva na biokemične in morfometrične kazalnike razvoja stegenice pri podganjih mladičih.
2. Planarni PCB-169 ima večji vpliv kot neplanarni PCB-155.
3. Sočasna izpostavitve obema kongenerjema PCB vodi do zmanjšane vpliva PCB-169 na morfometrične parametre in mineralizacijo stegenic.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Problematika onesnaževanja okolja in vpliv na zdravje

Obstojna organska onesnaževala (angl. Persistent Organic Pollutants, POPs) so lipofilne kemične snovi, ki se slabo presnavljajo v organizmu, zato se bioakumulirajo v maščobnem tkivu in biomagnificirajo po prehranski verigi, s tem pa pomenijo tveganje za zdravje ljudi in živali (ATSDR, 2000). Po Stockholmski konvenciji so POPs organoklorni pesticidi (aldrin, endrin, dieldrin, diklorodifeniltrikloroetan (DDT), heptaklor, heksaklorobenzen, klordan, mireks, toksafen), poliklorirani bifenili (PCB), poliklorirani dibenzodioksini (PCDD) in poliklorirani dibenzofurani (PCDF). Med onesnaževala s podobnimi lastnostmi spadajo tudi diklorodifenildikloroeten (DDE), lindan in polibromirani bifeniletri (PBDE). Zaskrbljujoč je predvsem vpliv izpostavitve mešanici POPs v nizkih odmerkih v daljšem časovnem obdobju, še posebej v zgodnjem postnatalnem obdobju in med brejostjo/nosečnostjo (MOP, 2009). V okolju so najbolj razširjeni halogenirani aromatski ogljikovodiki, med katere prištevamo tudi PCB. Evropska agencija za okolje (EEA) opozarja, da lahko obstojne kemikalije, kot so PCB, ki so bili uporabljeni v obstojnih materialih (npr. v gradbeništvu), pomenijo tveganje za zdravje tudi po tem, ko je bila njihova proizvodnja že ukinjena (MOP, 2009).

2.2 PCB in njihova uporaba po svetu in v Sloveniji

PCB so obstojni onesnaževalci okolja, ki so po svetu močno razširjeni. Zaradi njihove kemične in termične obstojnosti jih lahko najdemo v polarnem ledu in snegu, usedlinah morja in jezer ter v morskih in kopenskih organizmih. PCB uvrščamo med ksenobiotike, ker so nastali sintetično in v naravi niso nikoli obstajali. Industrijska proizvodnja PCB se je v ZDA začela leta 1929, svetovna proizvodnja teh pa je dosegla višek v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. PCB je do sredine osemdesetih let uporabljala tudi slovenska elektroindustrija (MOP, 2009). Spekter njihove uporabe je bil izjemno širok in raznovrsten. Uporabljali so jih v proizvodnji izolativnih materialov, v transformatorjih, usmernikih, svetilnih ceveh, kondenzatorjih, električnih aparatih kot dielektrike, v izolacijskih in hladilnih tekočinah, v rudarstvu kot hidravlična olja ter kot različne oljne, emulzijske in protipožarne premaze,

mehčala tesnilnih mas in fug, v ovojih za kable, v proizvodnji papirja, insekticidih itd. (MOP, 2009). PCB so splošno pozornost javnosti pritegnili leta 1968 po množični zastrupitvi hrane na Japonskem, t. i. zastrupitev Jušo, ko se je v zahodnem delu Japonske z onesnaženim riževim oljem zastrupilo več kot 1600 ljudi (Higuchi, 1976), in leta 1979, ko se je na Tajvanu zastrupilo okoli 2000 ljudi, t. i. zastrupitev Jučeng (Chen in sod., 1981; Hsu in sod., 1985). V Sloveniji je bila zaradi industrijskega onesnaženja leta 1983 zabeležena precejšnja izpostavljenost PCB v dolini reke Krpe v Beli krajini (Jan in Tratnik, 1988).

Ko so potrdili, da se PCB nalagajo v okolju ter da njihova akumulacija in koncentracija v okolju lahko povzročata neželene učinke pri ljudeh in živalih, so leta 1977 v ZDA ustavili njihovo proizvodnjo (USEPA, 1996). Tudi v Evropi in drugod po svetu je njihova proizvodnja začela upadati, danes pa sta proizvodnja in uporaba PCB v večini držav prepovedani (v Sloveniji od sredine osemdesetih let) oz. omejeni na zaprte sisteme, ravnanje z njimi pa je strogo nadzorovano. Kljub temu jih še vedno veliko zaide v okolje, ker (i) lahko predmete, ki vsebujejo PCB, še danes najdemo v okolju (gradbeni materiali, delujoče naprave, ki še vedno vsebujejo PCB); (ii) zaradi nepravilnega ravnanja z odpadki (sežigi komunalnih odpadkov, nepravilno zavržena zastarela električna oprema ali ob zamenjavi dielektrika ali kondenzatorja in izključitvi transformatorja) in (iii) zaradi sproščanja v okolje ob nesrečah (mehanska okvara, puščanje na tesnilnih mestih, požari, razlitja). Po evropski zakonodaji vsakršno ravnanje pri vzdrževanju naprav, ki vsebujejo PCB, in priprava takih odpadkov na končno uničenje zahtevata posebno pozornost z vidika varstva pri delu ter varovanja zdravja in okolja. Direktiva Sveta 96/59/ES o odstranjevanju PCB in polikloriranih terfenilov je določila odstranitev vseh naprav, ki vsebujejo PCB in so večje od 5 dm³, najpozneje do konca leta 2010.

V Sloveniji uvrščamo PCB med nevarne kemikalije. Ravnanje z njimi ter njihovo odstranjevanje in dekontaminacijo, kot tudi odstranjevanje naprav, ki vsebujejo PCB, določa Uredba o odstranjevanju PCB in polikloriranih terfenilov (Uradni list RS, št. 34/08 in 9/09). Vlada RS je 30. junija 2016 sprejela operativni program ravnanja z odpadki, v katerem je po novem opredeljen program odstranjevanja PCB. Uporabo PCB v znanstvene in raziskovalne namene dovoljuje Pravilnik o omejitvi dajanja v promet ali uporabe določenih nevarnih snovi in pripravkov (Uradni list RS, št. 85/2006). Poleg tega spadajo PCB med prioritete kemikalije v biomonitoringu (Horvat in sod., 2015). Zaradi industrijske onesnaženosti in zabeležene precejšnje izpostavljenosti Bele krajine PCB leta 1983 je bil leta 1991 na tem območju izveden biomonitoring krvi, maščobe in mlečnih zob pri ljudeh skupaj z meritvami vsebnosti PCB v zraku, vodi, rečnem mulju, ribah, zemljinah ter doma pridelanih živilih živalskega in rastlinskega izvora (Jan in Tratnik, 1988; Fazarinc in sod., 1992; Jan in Vrbic,

2000). Vsebnosti kongenerjev PCB v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus*) iz izvira reke Krupe so bile leta 2008 več kot 28-krat višje v primerjavi z osebki z neonesnaženih območij Slovenije (Pezdirč in sod., 2011). Biomonitoring za opredelitev izpostavljenosti prebivalstva RS kemikalijam med letoma 2011 in 2014 je pokazal, da izmerjene vrednosti PCB, podane kot vsota posameznih kongenerjev pri posameznih vzorcih (gre za indikatorske kongenerje PCB: PCB-138, PCB-153 in PCB-180, pri mleku še PCB-118), v nobenem od preiskovanih vzorcev materinega mleka in krvnega seruma po Sloveniji niso presegale referenčnih vrednosti, značilnih za neobremenjena okolja za vsoto PCB* (najvišje vrednosti so bile na območju Bele krajine, obalnih mest, Ljubljane in Jesenic), zato je mogoče sklepati, da je v zadnjem obdobju obremenjenost prebivalcev Slovenije z ostanki indikatorskih PCB splošna in enakomerna (Horvat in sod., 2015).

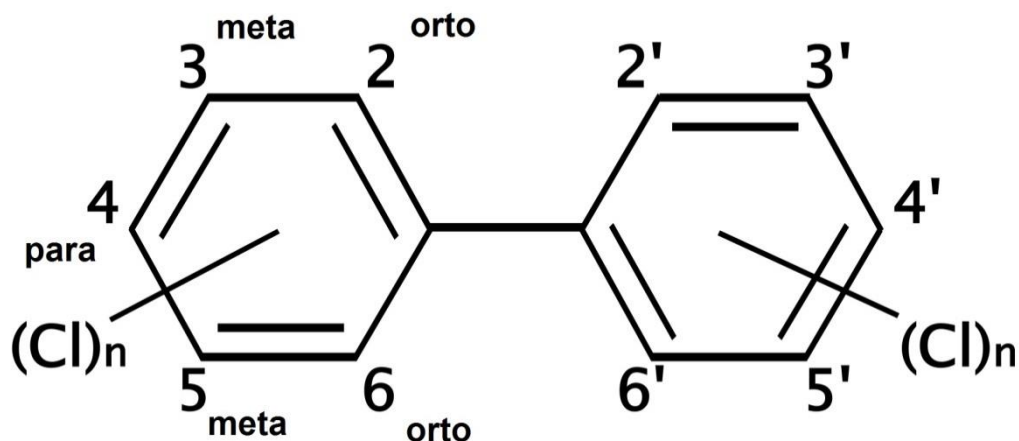
2.2.1 Kemična zgradba in fizikalno-kemične lastnosti PCB

PCB so skupina sintetičnih organskih spojin s formulo $C_{12}H_{10-n}Cl_n$. Molekulo sestavljata fenilna obroča z različnim številom klorovih atomov ($n = 1 - 10$), ki so vezani na različnih legah v molekuli (slika 1). Zaradi elektrostatičnih odbojnih sil močno elektronegativnih klorovih atomov sta obroča v molekuli bifenila lahko postavljena v isti ravnini (planarno) ali pa sta med seboj zasukana (ravnini sta postavljeni neplanarno), tako da število in lega/položaj klorovih atomov v molekuli bifenila določata obliko molekule ter vplivata na njihove lastnosti in biološko aktivnost. Kongenerje z enakim številom klorovih atomov imenujemo homologi, homologe z različnimi legami klorovih atomov pa izomeri (WHO, 2003). Kongenerji PCB, ki atoma klora nimajo v položaju orto (2,2',6 ali 6') ali imajo na tem položaju največ en klorov atom, spadajo v skupino (ko)planarnih kongenerjev ter so po obliki in toksikoloških lastnostih podobni TCDD, do danes najbolj toksični kemično sintetizirani spojini (Safe, 1994). Po Stockholmski konvenciji je kongenerjev PCB z delovanjem, podobnim dioksinu, 13 (ATSDR, 2000). Neplanarni kongenerji imajo na položajih orto dva klorova atoma ali več teh. Planarni in neplanarni kongenerji se med seboj razlikujejo po fizikalno-kemičnih lastnostih, bioloških učinkih in toksičnosti (Safe in sod.,

* Referenčna vrednost, značilna za neobremenjena okolja, se pri posameznih vzorcih nanaša na vsoto merjenih spojin iz skupine PCB, zato so tudi rezultati podani za vsoto naštetih PCB:

- materino mleko (posamezni vzorci) – referenčna vrednost je podana na vsoto posameznih merjenih kongenerjev iz skupine PCB: PCB-vsota 0,3–1,43 mg/kg mlečne maščobe (rezultati, izraženi na maščobo);
- materino mleko (sestavljene vzorci): vsota spojin PCDD/F+ dioksinu podobnih PCB 3,4–24 pg TEQ/g (rezultati, izraženi na maščobo)
- serum (posamezni vzorci): 0,6–3,3 µg/kg – PCB-153, 0,3–2,4 µg/kg – PCB-180 in 0,4–2,2 µg/kg – PCB-138 (rezultati, izraženi na serum oz. krvno plazmo).

1985; Safe, 1992). Kongenerji PCB so sistematično razporejeni po številkah od 1 do 209, nazadnje revidirano nomenklaturu iz leta 2007 (Mills in sod., 2007) je sprejela tudi Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (IUPAC).



Slika 1: Kemična zgradba molekule PCB. Na levem obroču so označeni položaji orto, meta in para, ki veljajo tudi za desni obroč (prirejeno po [https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_\(chemistry\)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_(chemistry)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg), dne 3.3.2016).

Figure 1: Chemical structure of PCB molecule. *Ortho*, *meta* and *para* positions marked on the left ring are also valid for the right ring (modified from [https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_\(chemistry\)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_(chemistry)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg), 3.3.2016).

PCB se pridobijo s postopnim kloriranjem bifenila, pri tem vedno nastane mešanica kongenerjev. V industriji so komercialno uporabljali 130 različnih kongenerjev. Tehnični PCB oz. mešanice, npr. Aroclor (ZDA), Clophen (Nemčija), Phenoclor in Pyralene (Francija), Kanechlor (Japonska), vsebujejo od 40 do 70 različnih kongenerjev PCB ter se med seboj razlikujejo po kemični sestavi in fizikalno-kemičnih lastnostih (WHO, 2003). Pri sintezi PCB nastajajo tudi PCDD in PCDF (WHO, 2003).

Pri sobnih pogojih so čisti PCB brezbarvni, kristalinični, brez vonja in okusa. Mešanice PCB so bistre, od svetlo do temno rumene tekočine različnih viskoznosti (ta narašča s stopnjo kloriranja) z zelo značilnim neugodnim vonjem, ki draži sluznico nosu, grla in oči. Pri nizkih temperaturah se spremenijo v trdne smole ali voske in ne kristalizirajo. Imajo visoko vrelišče nad 200 °C in zaradi visoke vsebnosti klora veliko specifično gostoto. So skoraj netopni v vodi, hitro pa se topijo v ogljikovodikih, lipidih in drugih organskih topilih. Njihova topnost v lipidih narašča s številom klorovih atomov. Termično so zelo stabilni, so nehlapni, težko vnetljivi in neeksplozivni. Odporni so na kisline in baze. Pri običajnih pogojih so kemično obstojni, nespremenljivi tudi v prisotnosti kisika, njihova električna prevodnost pa

je izjemno nizka. Zaradi svoje kemične in termične nespremenljivosti so tudi biološko stabilni (obstojni na biološko razgradnjo), počasi razgradljivi (več kot 30 let) s težnjo za bioakumulacijo (WHO, 2003). Obstočnost v okolju je odvisna od stopnje klorinacije, ocenjena razpolovna doba v človeškem telesu variira od nekaj do 20 let (Ogura in sod., 2004).

2.2.2 Vnos v organizem, porazdelitev in razgradnja

Rastline vsrkajo PCB iz onesnažene zemlje, podtalnice ali zraka. Tako PCB vstopijo v prehransko verigo, se na poti bioakumulirajo in biokoncentrirajo, zato je izpostavljenost človeka v primerjavi z drugimi živalskimi vrstami pri PCB relativno velika (Ahlborg in sod., 1992; Ahlborg in sod., 1994). Najpogostejši vnos PCB v telo je zaužitje z onesnaženimi živili in vodo (v 90 %). Pri delovnih nesrečah in v primeru nepravilnega odstranjevanja industrijskih odpadkov, onesnaženih s PCB (npr. v onesnaženih stavbah), pa pogosto pride do izpostavljenosti prek kože ali z inhalacijo hlapnih nižje kloriranih PCB (Ahlborg in sod., 1992; Schettgen in sod., 2012; Carpenter, 2015). Hrana se onesnaži pri proizvodnji v onesnaženem okolju ali z onesnaženimi surovinami, lahko pa tudi z embalažo ali po nesrečah (La Rocca in Mantovani, 2006). Največ PCB je v hrani, bogati z lipidi, kot so meso, ribe, mleko in jajca. PCB, zaužiti s hrano, se hitro absorbirajo v steni prebavnega trakta (od 85 do več kot 95 % pri človeku, 83 % pri brojlerjih in več kot 90 % pri kokoših nesnicah) (Vermeylen in sod., 2008), temu sledi začasno skladiščenje v jetrih in mišicah, nato se zaradi svoje lipofilnosti prerazporedijo v maščobno tkivo oz. tkiva, bogata z maščobo. Na koncu se vzpostavi dinamično ravnotežje koncentracije PCB med tkivi (Matthews in Dedrick, 1984).

PCB se lahko iz maščobe ponovno mobilizirajo ob izgubljanju maščobnega tkiva, npr. med hujšanjem ali laktacijo, obenem pa lahko v času gravidnosti prehajajo skozi posteljico. Izločajo se v mleko in med sesanjem prehajajo v mladiče. Placenta nekoliko omejuje prehod PCB, zato se ti na potomce prenašajo predvsem z dojenjem (Gallenberg in Vodcnik, 1989; Vrecl in sod., 1996; Bonfanti in sod., 2009; Bonfanti in sod., 2014).

V organizmu se PCB razgrajujejo v jetrih prek izoencimov sistema P450, izločajo pa se z blatom in urinom. Citokromi P450 so hemoproteini, monooksigenaze, ki presnavljajo različne endogene in eksogene substrate na notranji membrani mitohondrijev in v gladkem endoplazemskem retikulumu. Obseg razgradnje PCB v organizmu je majhen. Odvisen je od števila in postavitve klorovih atomov v molekuli ter tudi od posamezne živalske vrste (npr. pes zaradi višje ravni ustreznega izoencima P450 v jetrih odstrani PCB-153 hitreje kot druge vrste živali). S povečevanjem števila klorovih atomov v molekuli se obseg razgradnje

zmanjšuje. Poleg razgradnje kot detoksikacije lahko z biotransformacijo nastajajo tudi presnovki, ki so bolj toksični ali biološko dejavnejši kot osnovna spojina (Parkinson in Safe, 1987).

2.2.3 Vplivi PCB na organizme

Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) in ameriške agencije za zaščito zdravja in okolja (USEPA) so PCB nevarni, toksični, rakotvorni in trajni organski kemični odpadki, zato so kategorizirani kot POPs. V onesnaženem naravnem okolju so PCB prisotni v mešanica in tudi z drugimi onesnaževali, zato vplivov na organizem ne moremo pripisati samo enemu halogeniranemu aromatskemu ogljikovodiku (Giesy in Kannan, 1998). Pri živalih v naravnem okolju so poročali o toksičnih vplivih na ribe (Velika jezera v ZDA). PCB pri višjih koncentracijah povzročajo njihovo smrt, pri nižjih koncentracijah pa motnje in nezmožnost drstenja. Pri tjušnjih in kunah se PCB povezujejo z reprodukcijskimi motnjami in supresijo imunskega sistema (ATSDR, 2000). S številnimi raziskavami v zadnjih nekaj desetletjih so se ugotavljali vplivi oz. škodljivi učinki PCB na laboratorijske in prostoživeče živali, celične kulture in izpostavljeno prebivalstvo. Pri poskusnih živalih so se za proučevanje učinkov največkrat uporabljale tehnične mešanice PCB. Različni avtorji poročajo o vplivih PCB na:

- jetra (hepatomegalija, nekroze) (Hansen, 1987; Vrecl in sod., 1995),
- imunski sistem (atrofija limfatičnega tkiva, zavrt imunski odgovor) (Hansen, 1987; Lyche in sod., 2004a; Crinnion, 2011),
- živčni sistem (oviran razvoj in motnje v vedenju, spremembe v ravni kateholaminov) (Hansen, 1987; Crinnion, 2011),
- reprodukcijo (abortusi, nizka porodna teža, embrioletalnost, mutagenost, teratogenost) (Hansen, 1987),
- prebavila (ulceracije, nekroze) (Hansen, 1987),
- dihalo (bronhitis) (Hansen, 1987; Vrecl in sod., 2005),
- kožo (dermalna toksičnost) (Hansen, 1987),
- kostno tkivo (ovirana rast in mineralizacija) (Lind in sod., 2000a; Alvarez-Lloret in sod., 2009; Sonne in sod., 2015),
- ščitnico (znižanje ščitničnega hormona T4) (Wang in sod., 2005),
- moda (manjša moda, zmanjšana proizvodnja sperme, manjše število spermatid) (Kuriyama in Chahoud, 2004; Hsu in sod., 2007).

Ker se domneva, da so PCB rakotvorni, so uvrščeni med potencialne humane karcinogene (Lauby-Secretan in sod., 2013; Lauby-Secretan in sod., 2016).

Vpliv PCB na organizem oz. njihova toksičnost je zelo variabilna. Odvisna je od zgradbe oz. vrste kongenerja (oz. njihove mešanice), starosti in načina izpostavitve (intrauterino, prek mleka, v odrasli dobi), spola (Gutleb in sod., 2010), živalske vrste (specifična zmožnost hitrosti razgradnje PCB, vsebnost maščobnega tkiva), količine in števila vnosov PCB (akutno, kronično), medsebojne interakcije med kongenerji PCB v mešanici (antagonizem, sinergizem) ter vsebnosti drugih organoklorovih sestavin (PCDD in PCDF) in težkih kovin v mešanici kontaminantov (Hansen, 1987).

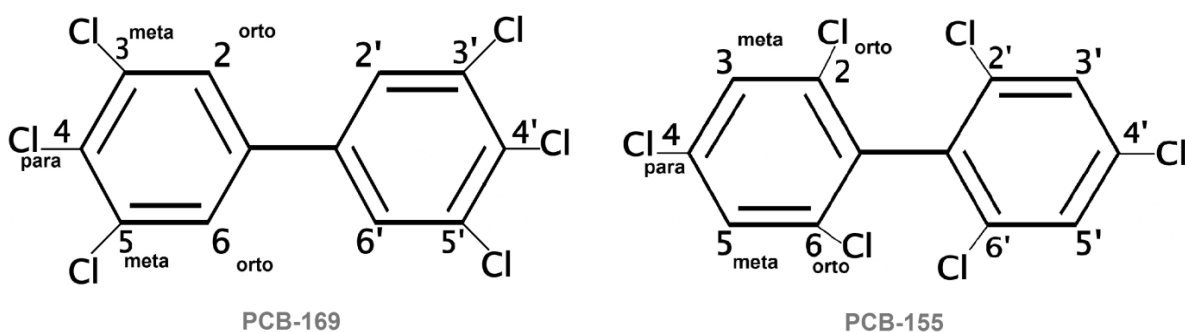
Glede na zgradbo kongenerjev razvrščamo PCB tudi na podlagi afinitete vezave za citosolni AhR. Dioksinu podobni PCB imajo močno afiniteto za tako vezavo in tekmovalno izrinjajo TCDD, ki je najmočnejši znani agonist, ter inducirajo njemu podobne antiestrogene učinke prek P450c in P450d. Monoortoanalogi imajo v položaju *orto* dodaten klorov atom in so induktorji mešanega tipa, ki sprožijo učinke prek P450a–e. Tudi ti izrinjajo TCDD z AhR, vendar je njihova relativna afiniteta za vezavo na AhR veliko nižja kot pri dioksinu podobnih PCB (Lauby-Secretan in sod., 2013). Zaradi svoje prostorske ureditve atomov in toksičnih učinkov (podobnim TCDD) so od 20 planarnih PCB in njihovih analogov za podgane najbolj toksični PCB-77, PCB-126 in PCB-169 (Safe in sod., 1985; Safe, 1990). Dioksinu nepodobni neplanarni PCB kongenerji delujejo prek AhR-neodvisnih mehanizmov, kot so vezava na estrogenski receptor, aktivacija dveh receptorjev za zaznavo ksenobiotikov (angl. »*xenobiotic-sensing receptors*«), konstitutivnega receptorja za androstan (CAR) in ksenobiotičnega receptorja za pregnan (PXR), ter vplivajo na medcelično komunikacijo in adhezijo celic (Lauby-Secretan in sod., 2013). Za ortosubstituirane neplanarne PCB so sprva domnevali, da so biološko neaktivni, zdaj pa vemo, da vplivajo na celično signalizacijo ter povzročajo nevrotoksičnost, imunosupresijo, nevroendokrine in endokrine motnje (Fischer in sod., 1998; Lyche in sod., 2004a; Lyche in sod., 2004b; Selgrade, 2007). Rezultat interakcij med kongenerji PCB je lahko antagonističen, aditiven ali sinergističen, pri čemer se toksičnost individualnega PCB lahko poveča ali zmanjša (Hansen, 1987).

Toksičnost posameznega kongenerja PCB lahko ovrednotimo s faktorjem toksične ekvivalentnosti (TEF). Uporaba TEF je omejena na tiste kongenerje, pri katerih način delovanja poteka prek AhR. Ta faktor ponazarja primerjavo toksičnosti nekega kongenerja PCB relativno na toksičnost TCDD, ki je bila ob uvedbi TEF najbolj znana strupena spojina in ima vrednost 1. Predlagane povprečne vrednosti TEF pri PCB segajo od 0,1 pri

neortosubstituiranih planarnih PCB in 0,0005 pri monoortoplanarnih PCB do 0,0001 pri diortoplanarnih PCB (van den Berg in sod., 2006).

2.2.4 Planarni PCB-169 in neplanarni PCB-155

Heksaklorobifenili so PCB, ki se najbolj kopičijo v organizmu. Nižje klorirani PCB se hitreje razgrajujejo, višje klorirani pa prek membran težje vstopajo v organizem. PCB-169 (3,3',4,4',5,5') in PCB-155 (2,2',4,4',6,6') sta heksaklorobifenila, ki imata vezanih šest klorovih atomov v molekuli, po tri klore na vsakem fenilnem obroču. Sta izomera, med seboj pa se razlikujeta po položaju klorovih atomov: PCB-169 ima klorove atome na mestih para in meta, PCB-155 pa na mestih orto in para (slika 2).



Slika 2: Kemična zgradba planarnega PCB-169 in neplanarnega PCB-155 (prirejeno po [https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_\(chemistry\)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_(chemistry)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg), dne 3.3.2016).

Figure 2: Chemical structure of planar PCB-169 and non-planar PCB-155 (modified from [https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_\(chemistry\)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Congener_(chemistry)#/media/File:Polychlorinated_biphenyl_structure.svg), 3.3.2016).

Dioksinu podoben planarni PCB-169 je lipofilnejši in presnovno obstojnejši kot dioksinu nepodoben neplanarni PCB-155. Vrednost TEF za PCB-169 je bila leta 2006 z 0,01 povečana na 0,03 (van den Berg in sod., 2006). Zaradi manjše hitrosti prehajanja skozi biološke membrane se PCB-169 v krvi zadržuje dalj časa ter počasneje prehaja v materino mleko in tkiva, bogata z lipidi. Zaradi večje lipofilnosti se v materinem mleku izloča v večjih količinah, zato je za potomce lahko bolj škodljiv kot PCB-155 (Vrecl in sod., 2005). Po zgradbi in toksičnih učinkih je najbolj podoben zelo dobro proučenemu planarnemu PCB-126 (3,3',4,4',5-pentaklorobifenil), ki je najbolj toksičen kongener PCB in ima vrednost TEF 0,1 (Safe, 1994; Van der Burght in sod., 2000; Van den Berg in sod., 2006). Tako *in vivo* kot in *in vitro* kaže antiestrogensko aktivnost, ki lahko spremeni estrogenski odgovor posredno prek vezave na AhR (Geyer in sod., 2000; Cooke in sod., 2001).

Delovanje in učinki neplanarnega tetraortosubstituiranega PCB-155 so slabo dokumentirani. Glede na njegovo zgradbo (neplanarnost) domnevamo, da ne inducira P4501A, ima nizko afiniteto za AhR in nizko akutno toksičnost (van der Burght in sod., 2000). Študije predvidevajo, da bi se dioksinu nepodobni PCB, ki so po kemični zgradbi podobni estradiolu 17- β (E_2), lahko vezali na receptor za estrogen (ER) in oponašali endogene ligande v nekaterih tkivih, npr. v kosteh (Geyer in sod., 2000; Cooke in sod., 2001; Dempster, 2008). Njemu najbolj podoben kongener je PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-diortoheksaklorobifenil) z estrogensko aktivnostjo (Geyer in sod., 2000), ki je najbolj razširjen (in zato tudi najbolj raziskan) neplanarni kongener PCB v okolju in tkivih sesalcev (Mühlebach in sod., 1991).

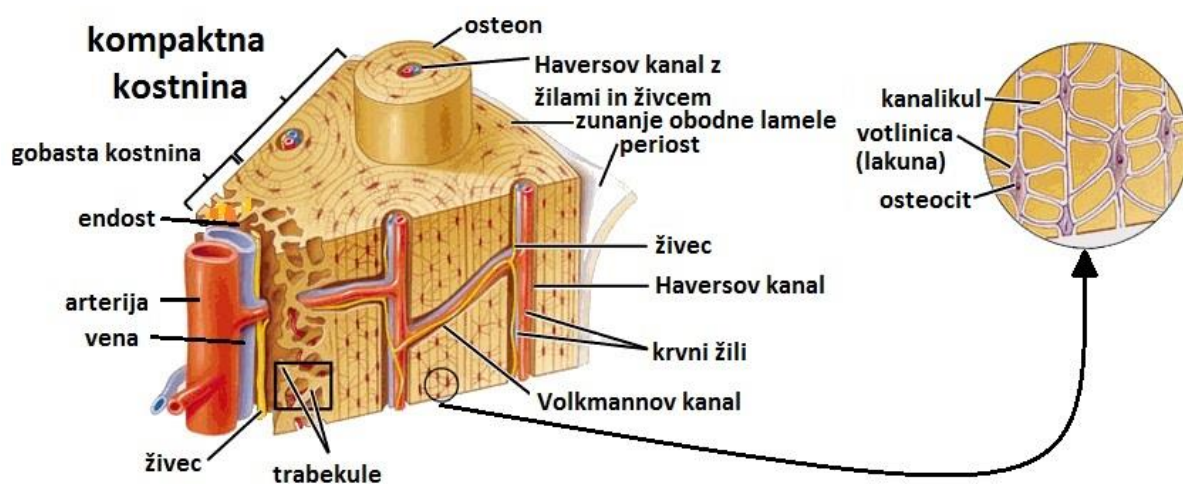
2.3 Kostno tkivo

2.3.1 Sestava kosti in kostnega tkiva

Kosti so deli skeleta/kostnega ogrodja, zgrajenega iz kostnine (strukturna komponenta kosti) in drugih tkiv, kot so hemopoetsko tkivo, tolščno tkivo, krvne žile in živci. Vse površine kosti – razen sklepnih – prekriva pokostnica (periost). Kostno tkivo ali kostnina je sestavljena iz celic in poapnele medceličnine. Anorganske snovi v medceličnini zagotavljajo trdnost (upiranje kompresiji), organske sestavine pa prožnost (upiranje raztegu, upogibu in obračanju). Organske sestavine kostne medceličnine (osteoida) sestavljajo 22 % kostne mase oz. približno 35 % mase v posušeni kosti. Več kot 90 % osteoida tvorijo kolagenska vlakna tipa I, preostalo so glikozaminoglikani (hondroitin-4-sulfat, hondroitin-6-sulfat in keratansulfat) in specifični glikoproteini (npr. sialoproteini in osteokalcin). Anorganski del medceličnine (70 % kostne mase) sestavljajo pretežno kalcijevi in fosfatni ioni, sledijo še bikarbonatni, citratni, magnezijevi, kalijevi in natrijevi ioni. Kalcij in fosfor tvorita kristale hidroksiapatita, lahko pa sta tudi v obliki amorfnega kalcijevega fosfata, kalcijevega sulfata, kalcijevega karbonata in magnezijevega fosfata. Kristali hidroksiapatita tvorijo plošče vzdolž kolagenskih vlaken z velikostjo $40 \times 25 \times 3$ nm (Ross in sod., 2003; Fazarinc in sod., 2007).

Glede na urejenost kolagenskih vlaken v osteoidu histološko ločimo prepleteno (ali nezrelo) kostnino, v kateri so vlakna prepletena v različnih smereh, in lamelarno (ali zrelo) kostnino, značilno za zrelo kost, v kateri imajo vlakna bolj vzporeden potek, poapnela medceličnina pa je naslojena v plasteh ali lamelah (Fazarinc in Pogačnik, 1997; Kierszenbaum in Tres, 2016). Makroskopsko ločimo scelno (kompaktno, kortikalno)

kostnino (*substantia compacta*) in gobasto (spongiozno, trabekularno) kostnino (*substantia spongioza*). Pri domačih živalih in človeku je osnovna gradbena in funkcionalna enota zrele scelne kostnine osteon ali Haversov lamelarni sistem (slika 3), v katerem je okoli žilnega (Haversovega) kanala 4–20 koncentrično urejenih kostnih lamel, med katerimi so votlinice (imenovane lakune) z osteociti. Med posameznimi osteoni so nepravilno urejene vmesne (intesticijske) lamele, ki so ostanki starih osteonov, ter krožno urejene obodne (cirkumferentne) lamele na zunanji površini pod periostom (zunanje obodne lamele) in na notranji površini pod endostom (notranje obodne lamele). Glede na lamelarno strukturo potekajo žilni kanali v dveh smereh: longitudinalno (Haversovi kanali) in prečno ali poševno (Volkmannovi kanali, ki povezujejo Haversove kanale) (slika 3). Gobasta kostnina v dolgih kosteh je brez osteonov in sestavljena iz lamel, naslojenih vzporedno s površino trabekule, kar daje videz tramičev (trabekul), cevč (tubulov) ali ploščic (lamel). Te se med seboj povezujejo v tridimenzionalno mrežo, v kateri so mozgovne votlinice s kostnim mozgom. Trabekule se oskrbujejo z difuzijo iz žil kostnega mozga. V dolgih cevastih kosteh je na epifizah gobasta kostnina pod tanko plastjo kompakte, na območju diafize pa je kortikalna kostnina zgoščena in debela ter oblikuje votel valj z osrednjim prostorom – medularno ali mozgovno votlino. Kortikalna kostnina ima predvsem podporno funkcijo, medtem ko je scelna kostnina bolj presnovno aktivna (Christenson, 1997; Fazarinc in Pogačnik, 1997; Kierszenbaum in Tres, 2016).



Slika 3: Zgradba zrele scelne kostnine: osteoni iz krožno urejenih lamel okoli Haversovega kanala (prirejeno po <http://orthotips.com/10-bone-structure-function>, 3. 3. 2016).

Figure 3: The structure of mature cortical bone: concentric lamellae around Haversian canals (modified from <http://orthotips.com/10-bone-structure-function>, 3.3.2016).

2.3.2 Kostne celice, periost in endost

V kostnini so štirje tipi kostnih celic: osteoblasti, osteociti, osteoklasti in osteoprogenitorne celice (mezenhimske matične celice kostnega mozga) (D'Ippolito in sod., 1999; Cör, 2012). V izgrajenem skeletu človeka je približno 4–6 % osteoblastov, 1–2 % osteoklastov in več kot 90 % osteocitov (Syed in Hoey, 2010).

a) Osteoblasti

Osteoblasti so enojedrne celice, ki se diferencirajo iz mezenhimskih matičnih celic kostnega mozga in sintetizirajo nemineralizirani osteoid. Aktivni osteoblasti izločajo velike količine kostno specifične alkalne fosfataze in na območju nastajajoče kostnine tvorijo epiteliju podobno plast izoprizmatskih celic in se medsebojno povezujejo s kratkimi citoplazemskimi podaljški. Nekaj osteoblastov ostane prostih na površini, medtem ko se preostali postopoma obdajo z medceličnino. Osteoblasti so odgovorni tudi za mineralizacijo osteoida (Rosol in Capen, 1997; Cör, 2012) in izražajo ER α/β (Longo in sod., 2004).

b) Osteociti

V medceličnino ujeti osteoblasti se preimenujejo v osteocite. Nimajo več možnosti delitve, prenehajo tvoriti osteoid oz. ga tvorijo v zelo majhnih količinah. Ležijo v lakunah, iz katerih izžarevajo številni majhni kanalčki (kanalikuli, slika 3), v katerih so njihovi celični podaljški, ki omogočajo stike s sosednjimi osteociti. Čeprav mreža osteocitov sama ne tvori niti ne razgrajuje zadostnih količin matriksa, vseeno deluje parakrino na osteoblaste in nadzoruje njihovo aktivnost (Rosol in Capen, 1997).

c) Osteoklasti

Osteoklasti so večjedrne celice, ki so velike 100 μm in več in razgrajujejo kostno medceličnino. Izvirajo iz hemopoetskih matičnih celic kostnega mozga in nastanejo z združitvijo več monocitov. Acidofilna citoplazma vsebuje številne mitohondrije in lizosome s hidrolitičnimi encimi za razgradnjo kolagena. Celice ležijo v vdolbinah na površini kosti, v t. i. resorpcijskih ali Howshipovih lakunah. Imajo visoko raven katepsina K in kisle fosfataze, odporne na tartrat (TRAP) (Fazarinc in Pogačnik, 1997; Rosol in Capen, 1997; Ross in sod., 2003; Cör, 2012).

d) Osteoprogenitorne celice

So multipotentne celice z visoko mitotsko aktivnostjo, ki se lahko diferencirajo v različne tipe celic mezodermalnega izvora: osteoblaste, fibroblaste, hondroците, miocyte in adipocyte. Diferenciacija osteoprogenitornih celic (predniške celice osteoblastov) je pod vplivom rastnih dejavnikov, predvsem kostnega morfogenetskega proteina (BMPs), poleg njega pa tudi fibroblastnega rastnega dejavnika (FGF), trombocitnega rastnega

dejavnika (PDGF) in preoblikovalnega rastnega dejavnika β (TGF- β). Glavni regulator celične diferenciacije je transkripcijski faktor 2, povezan s proteinom runt (Runx2) (Rosol in Capen, 1997; De Luca in Baron, 1999; Ducky in Karsenty, 2000).

Periost in endost

Periost pokriva kost in je sestavljen iz dveh plasti. Zunanja plast vsebuje fibroblaste, kolagena vlakna, elastin, živce in mikrovaskularno mrežo in skrbi za mehansko stabilnost. V notranji plasti so poleg živcev in krvnih žil tudi osteoblasti, osteoprogenitorne celice in manjši izodiametrični fibroblasti. Notranja plast je pomembna pri apozicijski rasti kosti in reparaciji poškodovane kosti (Allen in sod., 2004).

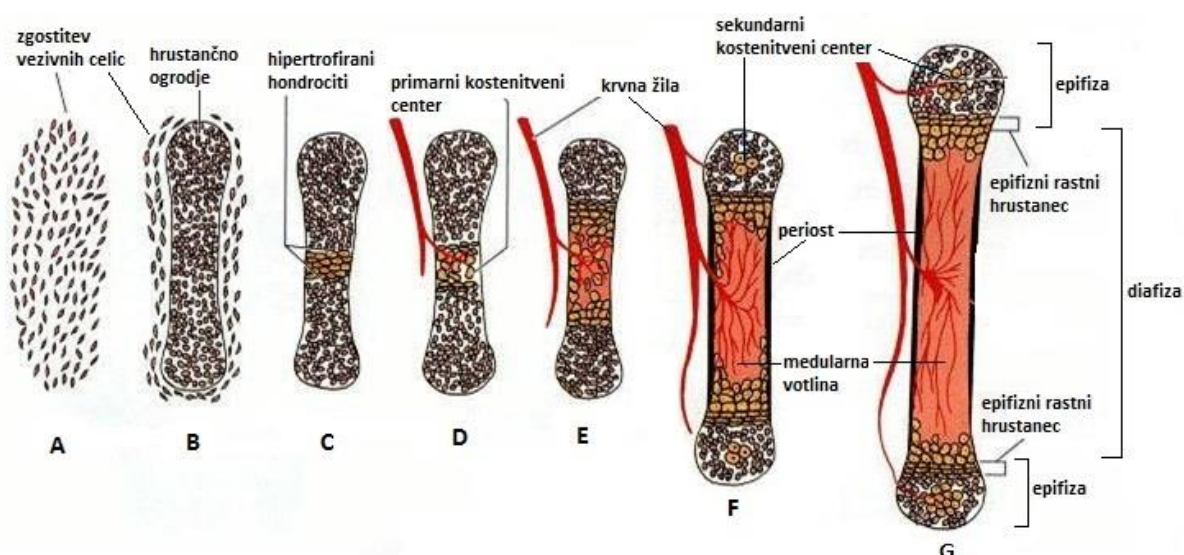
Notranjo površino kosti (mozgovno votlino, votlinice, žilne kanale) pokriva endost, vaskularizirana tanka plast veziva z eno plastjo ploščatih osteoprogenitornih celic, ki se po potrebi preobrazijo v osteoblaste (Ross in sod., 2003; Fazarinc in sod., 2007).

2.3.3 Tvorba in razvoj dolgih kosti – zakostenevanje ali osifikacija

Dolge cevaste kosti v telesu nastanejo s sekundarno (posredno, indirektno) osifikacijo. Zanj je značilno okostenevanje hrustančnega modela novonastajajoče kosti in poteka v dveh fazah (Fazarinc in Pogačnik, 1997). Prva faza, perihondralna (dezmalna) osifikacija, je zgodnja stopnja tvorbe enhondralne kosti. V zarodku se začne razvijati s pojavom meglično zaznavnih zgostitev skupine embrionalnih vezivnotkivnih celic, ki začnejo izražati značilne gene za razvoj hrustanca (Sox9) (slika 4A). Kmalu po začetku izražanja Sox9 se osrednje mezenhimske celice zgostitve diferencirajo v hondroblaste, začnejo izločati hrustančno medceličnino, se deliti in povečevati. Tako oblikujejo rastoče ogrodje hrustanca, ki ga na zunanji površini pokriva perihondrij iz zunanje vezivne in notranje celične plasti (slika 4B). Celice celične plasti perihondrija se diferencirajo v osteoblaste, ki okrog hrustančne osnove na območju novonastajajoče diafize izoblikujejo kostno manšeto, perihondrij pa se zaradi spremenjene vloge preimenuje v periost. Kostna manšeta in mineralizirana hrustančna medceličnina preprečita difuzijo in s tem prehranjevanje hondrocitov, ki se nehajo deliti. Hondrociti v osrednjem delu novonastajajoče diafize hipertrofirajo zaradi kopičenja glikogena, lipidov in alkalne fosfataze, začnejo izločati signalno molekulo »Indian Hedgehog« (Ihh) in izražati značilne gene za razvoj kostnine (npr. Runx2) ter končno propadejo (slika 4C) (Rosol in Capen, 1997; Ross in sod., 2003). Ob tem ena krvna žila ali več teh vstopi/-jo skozi kostno manšeto v votlino novonastajajoče diafize, ki je nastala s propadom hondrocitov. Iz periosta vanjo vdre mezenhimalni brstič iz veziva, mezenhimalnih in

osteoprogenitornih celic, makrofagov ter krvnih in limfnih žil. Osteoblasti začnejo na kalcificirane hrustančne pretine odlagati osteoid in tako nastaja gobasta kostnina. Pojavi se primarni osifikacijski center (osifikacijsko središče) v diafizi hrustančne zasnove dolgih kosti (slika 4D) (Fazarinc in Pogačnik, 1997; Rosol in Capen, 1997; Ross in sod., 2003). Primarno osifikacijsko središče se širi proti obema epifizama dolgih kosti, skupaj s tem se povečuje tudi koščeni tulec (slika 4E). Osteoklasti sledijo in dolbejo medularno votlino proti epifizama.

Temu sledi rast kosti v dolžino, ki poteka do zgodnje odrasle dobe. V fazi en(do)hondralne osifikacije sledi nastanek sekundarnih osifikacijskih središč v epifizah, ko mezenhimalni brstič iz perihondrija vstopi v propadajoči hrustanec epifize kosti (slika 4F). Osifikacija se širi radiarno po epifizah do sklepnega hrustanca in območja rastnega hrustanca (tudi hrustančne plošče ali vložka), ki se oblikuje v metafizi na meji med diafizo in epifizo rastoče kosti, kot je razvidno s slike 4G.



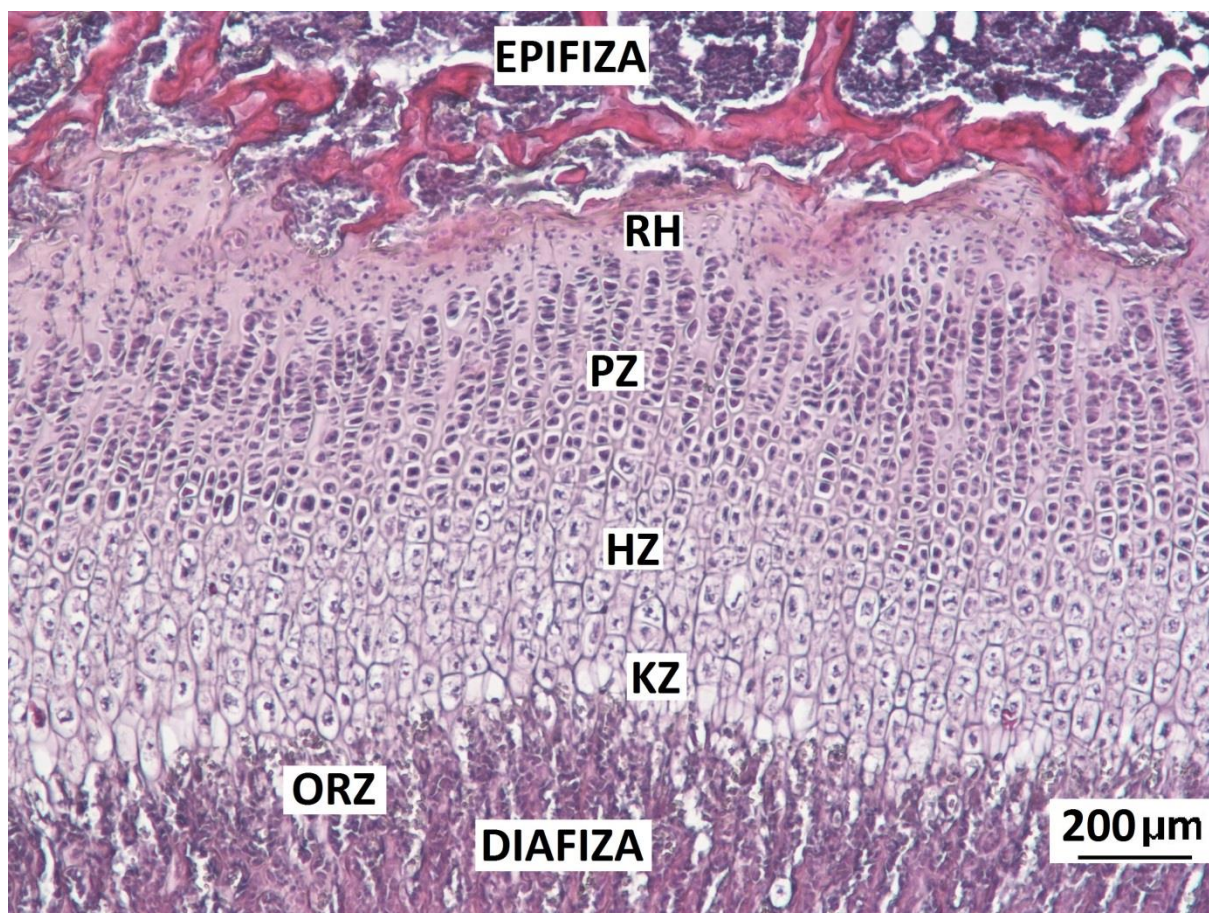
Slika 4: Shematični prikaz prve in druge faze endohondralne osifikacije v dolgih kosteh (prirejeno po (Gilbert, 2006)).

Figure 4: The first and the second stage of endochondral ossification in long bones schematically (modified from (Gilbert, 2006)).

V širino pa dolge kosti rastejo s primarnim zakostenevanjem, tj. apozicijska rast, pri kateri se kostno tkivo tvori iz periosta med zunanjimi obodnimi lamelami in periostom. Ko se zunanji premer kosti povečuje, se sočasno s pomočjo osteoklastov razgrajuje notranja (endostalna) površina kostnine (Allen, 2003).

2.3.4 Epifizni rastni hrustanec

Epifizni rastni hrustanec (ERH) (nekateri avtorji ga imenujejo tudi rastni hrustanec ali epifizni hrustanec (Cör, 2012)) ima najpomembnejšo vlogo pri regulaciji rasti kosti v dolžino. Na tem mestu se hrustanec daljše obdobje zamenjuje s kostnim tkivom. Proces poteka v petih fazah, kar se na območju ravnega hrustanca vidi v zaporednih conah, ki prehajajo druga v drugo (slika 5). Gledano s smeri kostnega okrajka proti telesu kosti je najprej cona rezervnega ali mirujočega hialinskega hrustanca (mirujoča cona), v kateri ni mogoče opaziti aktivnosti celic. V novejših raziskavah je navedeno, da mirujoča cona vsebuje celice, podobne matičnim, z omejenim potencialom proliferacije, ki vodi v iztrošenje in s tem v postopno zmanjševanje rasti kosti v dolžino (Alvarez in sod., 2002; Sanchez, 2010). Sledi cona proliferacije, v kateri se hrustančne celice množijo in urejajo v stebričke (palisade), vzporedne z vzdolžno osjo kosti, ter aktivno tvorijo in izločajo medceličnino. V coni hipertrofije hrustančne celice nabrekajo, zato so tam veliki hondrociti z glikogenom v citoplazmi. Medceličnina je stisnjena v pasove med hipertrofirane hondrocite. Tej sledi cona kalcifikacije hrustanca (kalcificirana hrustančna cona), v kateri hrustančne celice propadejo, hrustančna medceličnina pa mineralizira oz. poapni. Zadnja cona, najbližje diafizi, je cona resorpcije in osifikacije, v kateri mineralizirano hrustančno medceličnino neposredno obdajajo osteoblasti iz primarnega kostenitvenega centra, ki nalagajo osteoid, in osteoklasti, ki razgrajujejo novonastalo kostnino (Ross in sod., 2003; Fazarinc in sod., 2007).



Slika 5: Distalni epifizni rastni hrustanec: območja enhondralne osifikacije (stegenica 22 dni starih podgan, barvanje s HE, štirikratna povečava objektiva). ORZ – cona osifikacije in razgradnje, KZ – cona kalcifikacije, HZ – cona hipertrofije, PZ – cona proliferacije, RH – cona rezervnega hrustanca.

Figure 5: Distal epiphyseal growth plate: zones of the endochondral ossification (rat femur on post-natal day 22 (PND 22), HE staining, objective magnification x4). ORZ - zone of resorption, KZ - zone of calcified cartilage, HZ - zone of hypertrophy, PZ - zone of proliferation, RH - zone of reserve cartilage.

Na zorenje hondrocitov v rastnem hrustancu vplivata protein Runx2, ki zavira proliferacijo in hipertrofijo hondrocitov (Hinoi in sod., 2006), in inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (IGF-1) v močno hipertrofiranih hondrocitih rastnega hrustanca, ki z vezavo na različne vezavne proteine IGF (IGFBP) anabolno vpliva na skelet (Tahimic in sod., 2013). Na biološko aktivnost IGFBP lahko vplivajo prehrana, hormoni, zdravila, bazično-kislinsko ravnovesje ali različne sistemske bolezni (Sanchez, 2010).

Pas rastnega hrustanca je vseskozi enako debel, saj je količina novonastalega hrustanca na njegovi epifizni strani enaka količini razgrajenega kalcificiranega hrustanca na diafizni strani rastnega hrustanca. Do rasti v dolžino pride zaradi rasti hrustanca v epifiznem rastnem hrustancu (volumen hipertrofiranih hondrocitov se poveča za od tri- do desetkrat), ki

potiska epifizo proč od diafize, zaradi česar se distalni in proksimalni rastni hrustanec v dolgih kosteh vse bolj oddaljujeta drug od drugega (Ross in sod., 2003; Sanchez, 2010). Hrustančni vložek je ob koncu rasti (dolge kosti nog človeka nekje med 20. in 23. letom starosti) v celoti nadomeščen s kostnino in izgine, kost pa popolnoma zakosteni. Edini ostanek hrustanca v dolgih kosteh odraslih je sklepni hrustanec v obliki tanke gladke drseče plasti, ki pokriva površino kosti na sklepih (Fazarinc in Pogačnik, 1997; Rosol in Capen, 1997; Fazarinc in sod., 2007; Cör, 2012).

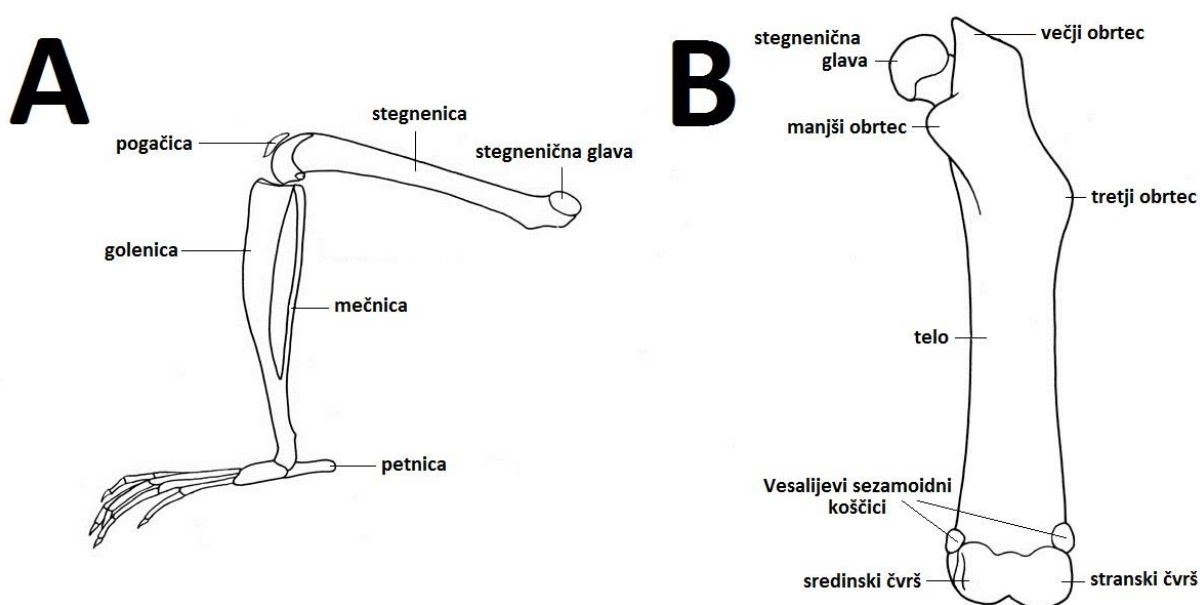
2.4 Skelet in stegenica podgan

Skelet podgane (*Rattus norvegicus*) v primerjavi z domačimi živalmi nima večjih posebnosti. Manjša razlika je počasnejša dozorelost kosti, ker se osifikacija še ne konča do prvega leta starosti. Na lobanji ima obsežnejšo medtemenico, na spodnji čeljustnici pa zelo izrazit kotni podaljšek (*processus angularis*). Hrbtenica je sestavljena iz sedmih vratnih, 13 prsnih, šestih ledvenih, 3–4 križničnih in kar 26–30 repnih vretenc. Miši in podgane imajo razvito ključnico, ki poteka od plečnice do prsnice, golenica in mečnica na zadnji okončini sta distalno zraščeni (slika 6A). Podgana ima po osem tarzalnih in karpalnih kosti. Na stegenici so vsi trije obrtci zelo izraziti (kar je pri domačih živalih značilno za konja), stegnenična glava in vrat sta manj izrazita.

Razvoj skeleta pri podgani se začne 13. dan prenatalnega razvoja z zgostitvijo mezenhimalnega tkiva. Čez dva dni se v skeletu pojavijo hrustančne strukture, in do 17. dneva prenatalnega razvoja so opazni prvi začetki osifikacije dolgih kosti okončin. Nato osifikacija hitro napreduje. Po skotitvi se nadaljuje z rastjo kosti (Miettinen in sod., 2005). Za linijo podgan Wistar je značilno normalno staranje skeleta, po 12. mesecu starosti pa progresivna izguba kostne gostote tako trabekularne kot kortikalne kostnine in tanjšanje kortikalne kosti (Syed in Hoey, 2010; Syed in Melim, 2011).

Stegenica daje stegnu koščeno osnovo in je najmočnejša oz. najdaljša cevasta kost v telesu. Pri miših in podganah je na proksimalnem okrajku stegnenična glava (*caput ossis femoris*), ki jo podpira izrazit stegnenični vrat (*collum ossis femoris*). Lateralno od glave je večji obrtec (*trochanter major*), ki sega višje od stegnenične glave. Na kavdalni strani stegenice leži medialno od večjega obrtca obrtčeva jama (*fossa trochanterica*). Pod stegnenično glavo je na kavdomedialnem robu telesa kosti izrazit manjši obrtec (*trochanter minor*), na lateralnem robu pa je pod večjim obrtcem izrazit še tretji obrtec (*trochanter*

tertius). Telo stegnenice (*corpus ossis femoris*) je gladko in ima obliko valja. Na sredi diafize je v prečnem preseku skoraj pravilne okrogle oblike. Na distalnem okrajku stegnenice sta kavdodistalno usmerjena stranski in sredinski čvrš (*condylus lateralis et medialis*), kranialno od njiju je stegnenični valj (*trochlea ossis femoris*) za sklepno povezavo s pogačico. Na čvrših sta kranioproksimalno usmerjena stranski in sredinski nadčvrš (*epicondylus lateralis et medialis*). Kavdalno sta pri miših in podganah na vsakem od čvršev sklepni ploskvici za Vesalijevi sezamoidni koščici (*fabellae*) (slika 6B).



Slika 6: Shematska slika (A) desne zadnje okončine (medialna stran) in (B) desne stegnenice (kavdalna stran) miši (z dovoljenjem založbe Elsevier (Cook, 1965)).

Figure 6: Schematically (A) mouse's right hind limb (medial aspect) and (B) mouse's right femur (caudal aspect) (with permission of Elsevier publishing company (Cook, 1965)).

V postnatalnem obdobju razvoja stegnenice pri podganah ločimo nekaj faz. V neonatalnem obdobju (mladiči stari do devet dni) so osteoblasti periosta že izoblikovali kostno manšeto v predelu diafize, ki je še ločena od kostnine v metafizi, nastale z enhondralno osifikacijo. V naslednji fazi, 11–14 dni po skotitvi, se v distalni metafizi pojavijo spremembe zaradi nastanka sekundarnega kostenitvenega centra. Hondrociti v epifizih hipertrofirajo, zato se epifiza in metafiza povečata in dobita nabrekel videz. 22. dan starosti je

distalna metafiza že del telesa stegenice. Kost nima več nabreklih videza, večina prvotne kostnine kostne manšete izgine, razen majhnega obročka okrog distalnega dela rastnega hrustanca. Na območju diafize pa kostnino, nastalo z enhondralno osifikacijo, pokriva kostnina, nastala z apozicijsko rastjo iz periosta. Metafizno preoblikovanje se ustavi do 157. dneva starosti (Pratt, 1959). Pri stegenici glavna nutritivna odprtina (*foramen nutricium*) ohranja svoj položaj med rastjo v dolžino (v nasprotju golenico, na kateri se premika proti distalnemu okrajku), in sicer leži na medialni strani pod glavo stegenice v višini malega obrtca (Henderson, 1978).

Za raziskave posameznega tipa kostnine ima stegenica zelo primerno razporeditev teh tipov. Zato so dolge kosti za ocenjevanje učinkov na geometrijo (dolžina in širina kosti, parametri prečnega preseka kosti ipd.), mineralno gostoto in biomehanične lastnosti kosti tudi primernejše kot vretenca (Herlin in sod., 2010). Na območju diafize je večinoma kortikalna kostnina, nasprotno pa je na epifizah ter v okolici proksimalnega in distalnega rastnega hrustanca oz. metafizah predvsem gobasta kostnina. V nasprotju z golenico je pri stegenici za opazovanje in proučevanje primernejša distalna metafiza, ker je enovita (proksimalna metafiza je razdeljena v dva dela – na stegeničnem vratu in večjem obrtcu (Serrat in sod., 2007)).

Posebnost v mikroskopski zgradbi kosti podgan je, da skelet podgane do približno leta dni starosti nima Haversovih sistemov oz. dobro razvitega sistema »Haversove kostne premene (remodelacije)«, značilne za domače živali, kunce, primare in človeka. Šele s starostjo pride do postopnega prehoda iz modelacije kosti (neodvisna aktivnost aktivacija-tvorba in aktivacija-resorpcija kosti) v remodelacijo kosti (usklajeno zaporedje aktivacija-resorpcija-tvorba kosti) pri obeh tipih kostnine (npr. v proksimalni metafizi golenice pride do tega pri starosti 6–9 mesecev pri scelni kostnini in 9–12 mesecev pri kortikalni kostnini). Poleg tega pri podgani nekatere kosti ohranijo sposobnost rasti v dolžino do pozne starosti, saj je epifizni rastni hrustanec prisoten tudi v odrasli dobi. Pri samcih podgan nekatere metafize dolgih kosti ostanejo odprte tudi po 30. mesecu starosti. Pri samicah se rast kosti v proksimalni epifizni golenice ustavi pri 15 mesecih, v distalni epifizni pa pri treh mesecih starosti, pri ledvenih vretencih pa pri 21 mesecih. Zaradi rasti kosti do pozne starosti morajo biti denzitometrične, tomografske in histomorfometrične meritve pri odrasli podgani opravljene vsaj 1 mm od rastnega hrustanca proti diafizi in ne tik ob njem (Turner, 2001; Lelovas in sod., 2008).

2.5 Zgodnje postnatalno obdobje podgan

Obdobje sesanja pri podganjih mladičih se začne pri približno šestih urah po skotitvi in poteka do približno 17. dneva, ko mladiči že začnejo uživati trdno hrano (npr. pelete). S tem se začne obdobje odstavitve, ki traja do 27. oz. 28. dneva starosti. Največje količine mleka so mladiči sposobno zaužiti med 12. in 19. dnem starosti, vodo začnejo piti, ko so stari 18 dni (Ost'adalova in Babicky, 2012). Pri poskusih v laboratorijih odstavljanje navadno poteka, ko so mladiči stari 21 oz. 22 dni. Puberteta naj bi se pri podganah začela med 22. in 25. dnem starosti glede na aktivnost proksimalnega rastnega hrustanca golenice (Hansson in sod., 1972).

2.6 Vplivi PCB na kostno tkivo

Od zastrupitev Jušo in Jučeng v Aziji so se začeli aktivneje proučevati vplivi halogeniranih aromatskih ogljikovodikov na človeka in živali, tudi njihovi učinki na skelet. Z raziskavama pri ljudeh so v letih 2000 in 2005 na Švedskem ugotovili, da raven POPs nima pomembnih učinkov na mineralno gostoto kosti pri starejših moških (Glynn in sod., 2000) oziroma da izpostavljenost POPs ne pomeni tveganja za prizadetost presnove kosti pri odrasli populaciji žensk in moških (Wallin in sod., 2005). Raziskava pri ljudeh v bližini Baltskega morja je pokazala, da so imeli moški, ki so živeli v bližine reke, onesnažene s PCB, in so bili izpostavljeni nizkim odmerkom kongenerjev PCB, znižano mineralno gostoto kosti, medtem ko pri ženskah ta povezava ni bila dokazana (Hodgson in sod., 2008). Tudi raziskave pri divjih živalih, kot so sivi tuljnji (Lind in sod., 2003), polarni medvedi (Sonne in sod., 2004; Sonne in sod., 2015) in srebrni galebi (Fox in sod., 2008), so pokazale spremembe (znižanje) v gostoti kostnega tkiva ter tudi geometrije, mineralizacije in biomehanike kosti. V zadnjem obdobju je bilo narejenih več raziskav, ki poročajo o motnjah v kostni premeni po kratkotrajnih ali kroničnih izpostavitvah: (i) mešanici onesnaževal (težke kovine, POPs, kot so PCB, organoklorini ...), prisotnih v okolju (Elabbas in sod., 2011a), (ii) dioksinom (Jämsä in sod., 2001; Lind in sod., 2009; Nishimura in sod., 2009; Herlin in sod., 2013) in (iii) PCB (Lind in sod., 2000b; Lundberg in sod., 2006; Ramajayam in sod., 2007). V njih so proučevali tudi vpliv na mladiče, izpostavljene perinatalno. Največ poskusov o vplivu aromatskih ogljikovodikov na kosti je bilo narejenih s TCDD.

Poskusi na laboratorijskih živalih so potrdili, da TCDD pri podganah vplivajo na geometrijo (zmanjšujejo dolžino in širino), mineralno gostoto in mehanske lastnosti dolgih

kosti, kot sta stegenica in golenica, tudi pri mladičih, izpostavljenih v obdobju embrionalnega razvoja in prek mleka (Jämsä in sod., 2001; Miettinen in sod., 2005; Finnilä in sod., 2010). Da je skelet tudi ciljni organ za akumulacijo PCB, kažejo raziskave na spodnjih čeljustnicah odraslih živalih in mladičev (Jan in sod., 2006; Jan in sod., 2013) in lobanjah mladičev (Grošelj in sod., 2014). PCB lahko vplivajo na morfologijo, razvoj in mineralno gostoto kosti pri divjih in laboratorijskih živalih (Andrews, 1989; Lind in sod., 2000a; Cocchi in sod., 2009; Elabbas in sod., 2011b; Sonne in sod., 2015). V raziskavah so največkrat opisane krajše kosti z manjšim premerom in zmanjšana trdnost kosti. V študiji dveh različnih industrijskih mešanic PCB so ugotovili, da PCB v nižje klorirani mešanici Aroclor 1221 (A1221) in v dioksinu podobni mešanici Aroclor 1254 (A1254) lahko vplivajo na mehanizme kostne premene in sprožajo učinke prek ER (A1221) ali AhR (A1254) (Yilmaz in sod., 2006). Lind s sod. v več raziskavah z dioksinu podobnim PCB-126 pri podganah opisuje tanjše nadlahtnice, znižano mineralno gostoto kosti ob povečani vsebnosti organske snovi in površini osteoida v kosti, oslABLJENO moč kosti, toda povečano debelino kortikalne kostnine golenice (1999; 2000b; 2004). PCB-126 je pri mladih želvah vplival na počasnejšo rast in zmanjšano kostno gostoto stegenice, lobanje mladičev pa so imele večjo vsebnost organskih snovi in so bile fenotipsko značilnejše za mlajše živali (Holliday in Holliday, 2012). To se sklada s predhodno raziskavo pri podganah, izpostavljenih dioksinu samo z materinim mlekom (Alaluusua in sod., 1993; Lukinmaa in sod., 2001). Rezultati raziskav *in vitro* so prav tako pokazali zmanjšano proliferacijo/diferenciacijo osteoblastov in dodatno podprli dokaze o sproženi toksičnosti TCDD v kosteh prek AhR (Carpi in sod., 2009).

V literaturi so tudi podatki o vplivu neplanarnih PCB. Spremembe v kortikalni kosti, odvisne od spola živali, so opisane pri stegenicah plodov ovac, ki so bili izpostavljeni neplanarnemu PCB-153 v primerjavi z manj potentnim dioksinu podobnim monoorto PCB-118 (TEF = 0,00003 (van den Berg in sod., 2006)) (Gutleb in sod., 2010). Prav tako so v tej raziskavi poročali, da je pri PCB-118 in PCB-153 scelna kostnina bolj prizadeta kot gobasta, in sicer v smislu povečane gostote in debeline kortikalne kosti (Gutleb in sod., 2010). Podobno so pri samicah mladičev koz odkrili, da intrauterina in laktacijska izpostavljenost PCB-153, ne pa tudi planarnemu PCB-126, povzročata spremembe v sestavi metakarpalnih kosti (Lundberg in sod., 2006).

V okolju so kongenerji PCB prisotni v mešanicah. Literatura navaja, da je estrogenska zmožnost nekaterih okoljskih onesnaževal, vključno s kongenerji PCB, lahko podcenjena v primeru njihovih individualnih testiranj (Arnold in sod., 1996). Presenetljivo malo je študij o interakcijah mešanice TCDD in/ali (dveh) PCB različne planarnosti in učinkih take mešanice na organizem, nismo pa uspeli najti poročil o učinkih takih mešanic na skelet. Pri

kombinaciji TCDD in neplanarnega PCB-153 je do interaktivnega učinkovanja teh spojin prišlo samo v visokih dozah. TCDD je sinergistično učinkoval na PCB-153 ter pri miših in podganah zvišal raven porfirina v jetrih, do česar samostojno pri PCB-153 ni prišlo (van Birgelen in sod., 1996a; van Birgelen in sod., 1996b). Kombinacija planarnega PCB-126 in neplanarnega PCB-153 je vplivala na zastajanje PCB-153 v jetrih in zmanjšala njegovo akumulacijo v maščobi (Lee in sod., 2002) ali spremenila vzorec indukcije določenih izoform P450 (Chubb in sod., 2004).

2.6.1 Prenos PCB z materinim mlekom

Plodovi in mladiči so dovzetnejši za toksičnost PCB kot odrasle živali (Hoffman in sod., 1996; Gutleb in sod., 2010). Sesalci so v naravnem okolju izpostavljeni PCB že med intrauterinim razvojem, saj PCB prehajajo skozi posteljico, vendar je to prehajanje bistveno manjše kot pozneje prek materinega mleka (Bonfanti in sod., 2009; Bonfanti in sod., 2014). Planarnost, število klorovih atomov in njihova razporejenost v molekuli PCB so prav tako odločilni dejavniki mobilizacije PCB iz maščobnega tkiva v mleko matere (Ramos in sod., 1997). Kongenerji PCB kažejo različne koeficiente porazdelitve v mleku in krvi. Njihovo izločanje v mleko narašča z lipofilnostjo. Višje klorirani, planarni in presnovno obstojnejši kongenerji PCB se v mleku kopičijo v večjem obsegu kot neplanarni kongenerji (Vrecl in sod., 1996; Vrecl in sod., 2005). Pri ljudeh so poročali, da imajo nižje klorirani PCB (šest klorov ali manj) nižje razmerje serum/mleko (približno 0,9) kot višje klorirani PCB (lahko tudi do 2,6 pri dekaklorobifenilu) (Mannetje in sod., 2012).

Izpostavitvev TCDD ali tehnični mešanici PCB intrauterino in z mlekom se je na kostnem tkivu (v zgodnjih fazah razvoja kosti) izkazala kot škodljivejša v primerjavi s poznejšo laktacijsko izpostavljenostjo (Miettinen in sod., 2005; Elabbas in sod., 2011b). Izpostavitvev samo skozi placento pa tudi ni bila zadostna (oz. je bila zanemarljiva), da bi sprožila učinke, ki so jih opazili pri kombinirani izpostavitvi (Li in sod., 1995; Hurst in sod., 2000; Miettinen in sod., 2005). V raziskavi pri sedem, 14 in 21 dni starih mladičih podgan, ki so bile izpostavljeni TCDD samo prek materinega mleka, so ugotovili ovirano mineralizacijo kosti zaradi zmanjšane aktivnosti osteoblastov, do katere naj bi prišlo zaradi vpliva TCDD na povečano sintezo vitamina D (Nishimura in sod., 2009). Tudi pri ljudeh se ocenjuje, da je izpostavitvev dojenčkov dioksinu prek mleka več kot dvakrat višja kot pri odraslih (Papke, 1998).

2.6.2 Serumski biokemični kazalniki presnove kostnega tkiva

Biokemični kazalniki kostne premene v serumu in urinu so encimi ali stranski produkti, ki nastajajo v premeni in prehajajo iz skeleta v krvni obtok. Ti kazalniki pokažejo akutne spremembe v kostni premeni (aktivnost kostnih celic) (Christenson, 1997; Rosol in Capen, 1997; Swaminathan, 2001; Allen, 2003). Snovi, ki jih tvorijo in izločajo osteoblasti, kažejo njihovo aktivnost, zato jih lahko štejemo med kazalnike tvorbe kostnine: alkalna fosfataza, osteokalcin, propeptidi kolagena I in kostni sialoprotein.

Serumska alkalna fosfataza (sALP) je membransko vezan protein in sestoji iz več izoencimov, večinoma jetrnega in kostnega. Kostni izoencim se sprošča iz osteoblastov med gradnjo kostnine in prevladuje v dobi odraščanja, kar vpliva na povišano raven celotne ALP v serumu. Nasprotno pa nizke vrednosti serumske ALP ne označujejo zmanjšane delovanja osteoblastov (Rosol in Capen, 1997; Swaminathan, 2001). Presnovo kostnine lahko spremljamo tudi prek serumskih koncentracij kalcija in fosfata ter z ugotavljanjem kalcija in fosforja v anorganskem delu kosti (pepelu). V kosteh je v obliki kalcijevega fosfata uskladiščeno 99 % kalcija in 86 % fosforja, ki sta v telesu. V zunajcelični tekočini pa imamo 0,1 % kalcija in 0,08 % fosforja. V krvi se fosfor večinoma pojavlja kot anorganski ortofosfat (PO_4). Kalcij v kosteh služi kot zaloga, zato sta mehanizma tvorbe in resorpcije kostnine pomembna pri uravnavanju koncentracije kalcija v krvi (Cör, 2012).

2.6.3 Geometrija in biomehanika kosti

Kakovost kosti je odvisna od njene biomehanike in strukture. Popolna ocena stanja kosti se lahko izvede s kombinacijo ugotavljanja geometrijskih parametrov kosti, ki jih v zadnjem času omogoča računalniška tomografija, in biomehaničnih testov, ki ocenijo trdnost kosti (Beaupied in sod., 2007). V zadnjem času vse pogostejša uporaba računalniške mikrotomografije (μCT) pri glodavcih (pod splošno anestezijo) prav tako omogoča neinvazivne meritve kostne gostote in vsebnosti kostnih mineralov (BMC), saj lahko prikaže posamezno trabekulo, podobno kot pri histomorfometričnem rezu, in rekonstrukcijo podatkov tridimenzionalne slike ter določi razmerje med arhitekturo in trdnostjo kosti (Turner, 2001).

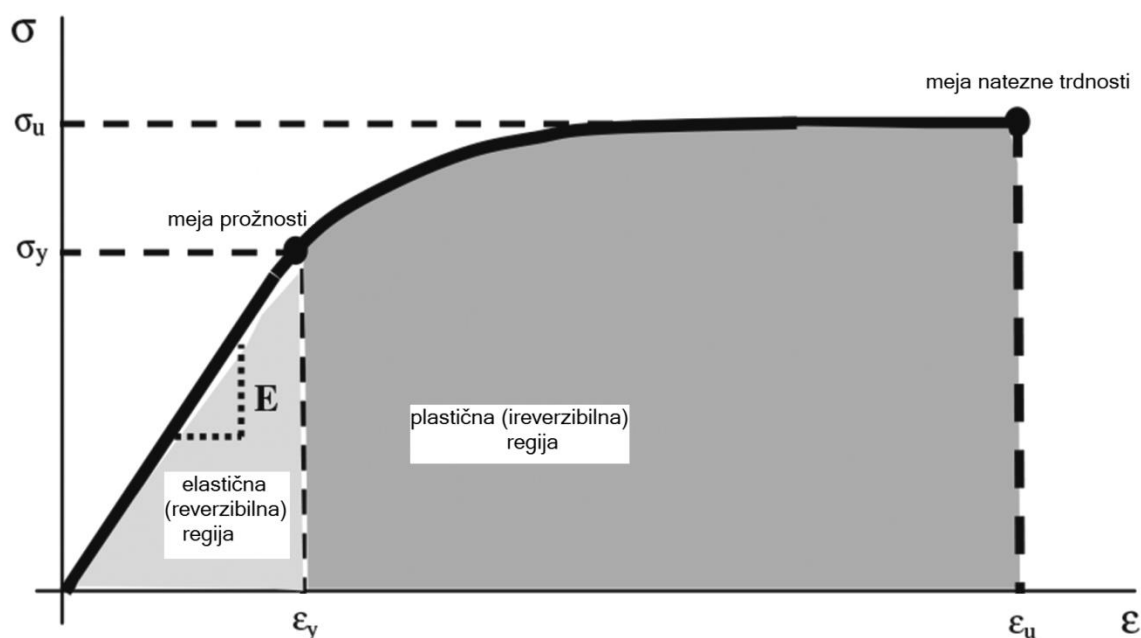
Mehanski odziv oz. biomehaniko celotne kosti (op. v angleščini uporabljajo izraz »bone« za kost in kostnino) je težko napovedati, ker jo določata lastnost materiala (oz. materialov), iz katerega je kost zgrajena, in njena geometrijska prostorska arhitektura (mikrostrukturna razporejenost). Lastnosti materiala niso odvisne od geometrije. Zmanjšanje mineralne kostne gostote in spremenjena mikro-arhitektura lahko vodita v povečano tveganje

za zlome. Trdnost kosti je lastnost kosti glede na največjo obremenitev, ki jo prenese, povečuje pa se s starostjo. Lahko jo ocenimo z večtočkovnimi upogibnimi preizkusi in vrednostmi mineralne gostote kosti (BMD) (Beaupied in sod., 2007). Na ravni osteonov so razlike v mineralizaciji opazne že v enoti, ker so notranje (mlajše) koncentrične lamele v začetku manj mineralizirane kot zunanje. Pozneje te notranje lamele postanejo bolj mineralizirane zaradi bližine oskrbe s krvjo. Intersticijske lamele, ki so ostanki starih osteonov, so veliko bolj mineralizirane kot osteoni, med katerimi ležijo. Ta stopnjevanost mineralizacije oz. strukture vpliva na mehanski odziv kosti, še posebej pri širitvi/napredovanju razpok in lomov (Peng in sod., 1994; Taylor in Lee, 2003; Beaupied in sod., 2007; Sharir in sod., 2008). Do zdaj so samo v nekaj raziskavah pri podganah (Elabbas in sod., 2011a; Elabbas in sod., 2011b) in kozah (Lundberg in sod., 2006) ugotavljali učinek perinatalne izpostavitve PCB na mlade kosti s pomočjo meritev upogibne moči diafize cevastih kosti. Predhodne raziskave so potrdile, da zamrzovanje stegenic in golenic ne vpliva na njihove denzitometrične, mikroarhitekturne in biomehanične lastnosti (Beaupied in sod., 2006).

Najpomembnejši parametri pri biomehaniki kosti so tisti, ki opišejo elastičnost (prožnost) in togost kosti. Gre za lastnost kosti, da se po prenehanju delovanja sile povrne v prvotno obliko (elastična deformacija), če ta sila ni povzročila ireverzibilne deformacije. Deformacija (relativni raztezek ali relativni upogib, angl. »strain«) je za majhne obremenitve sorazmerna z napetostjo (angl. »stress«), ki povzroča deformacijo. Obratno vrednost koeficienta med deformacijo in napetostjo imenujemo elastična konstanta oziroma pogovorno elastičnost (slika 7). Elastičnost materiala opredelimo z elastičnim modulom (pri kosti se pogosto uporablja tudi izraz Youngov (prožnostni) modul, E , MPa) in ta poleg geometrijskega vztrajnostnega momenta prečnega preseka vpliva na zmožnost, s katero se kost upira upogibanju (tj. spremembi oblike telesa), ko je podvržena bremenu (Kuščer in Kodre, 1994; Sharir in sod., 2008). Geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka (CSMI) je pri dolgih cevastih kosteh na območju diafize opredeljen kot vsota zmnožkov ploščine kortikalne kostnine s kvadratom razdalj njihovih težišč od izbrane osi, zato je močno odvisen od notranjega in zunanjega polmera kosti. Pogosto se pri cevastih dolgih kosteh v obdobju rasti zgodi, da se notranji (endostalni) polmer kortikalne kostnine na sredini diafize v primerjavi z zunanjim (periostalnim) polmerom bolj poveča, s čimer se debelina korteksa stanjša. Kljub temu se CSMI poviša, zato se tudi togost in neupogljivost novozrastle kosti na tem delu povečata (Kuščer in Kodre, 1994; Sharir in sod., 2008).

Togost (N/m) je lastnost kosti kot trdnega telesa, da se upira spremembi oblike zaradi pritiska nekega drugega trdnega telesa. Je obratno sorazmerna elastičnosti in nam pove,

kolikšen upor prenese kost, preden pride do deformacije. Elastičnost oz. togost sta na diagramu podani z naklonom krivulje »linearni raztezek-sila«, ki je prikazana na sliki 7. Bolj ko je telo togo, strmejša je krivulja; bolj ko je telo elastično, manj strma je krivulja. Prožna telesa se vrnejo v prvotno obliko, dokler z obremenitvijo ne presežemo meje sorazmernosti, kar imenujemo elastična ali reverzibilna deformacija. Po povečanju obremenitve čez to mejo (meja prožnosti), se telo po razbremenitvi ne vrne več v prvotno obliko, temveč se trajno (ireverzibilno) plastično deformira za določen odstotek svoje dolžine. Če obremenitev dodatno povečujemo, se telo v točki natezne trdnosti zlomi, pretrga ali počí (meja natezne trdnosti) (Farčnik in sod., 2001).



Slika 7: Krivulja »napetost-raztezek« ob obremenitvi kortikalne kostnine. Elastični (prožni, reverzibilni) deformaciji po točki preloma sledi plastična (ireverzibilna) deformacija. E – modul elastičnosti, ki ponazarja togost kosti, σ – napetost (obremenitev), σ_u – največja napetost, σ_y – prožnostna napetost, ε – raztezek (deformacija), ε_u – največji raztezek, ε_y – prožnostni raztezek (prirejeno po (Sharir in sod., 2008)).

Figure 7: The »stress–strain« curve obtained by loading a sample of compact bone in tension. After yield point the elastic (reversible) region is followed by the plastic (irreversible) region. E - stiffness of the material, σ – stress (load), σ_u – ultimate stress, σ_y – yield stress, ε – strain (deformation), ε_u – ultimate strain, ε_y – yield strain (modified from (Sharir in sod., 2008)).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Dovoljenje za izvajanje poskusov

Veterinarska uprava RS je 4. januarja 2001 izdala dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih (številka 323-02-206/00), 14. novembra 2006 dovoljenje za dopolnitev poskusa (številka 3440-165/2006) in 4. januarja 2012 obvestilo o uporabi tkivnih vzorcev iz prej omenjenih poskusov (številka 34401-53/2011/2). Celoten poskus je potekal v skladu z Zakonom o zaščiti živali (ZZZiv, Uradni list RS, št. 98/99 in 126/03) in Direktivo Sveta 86/609/EGS.

3.2 Material

3.2.1 Kongenerji PCB

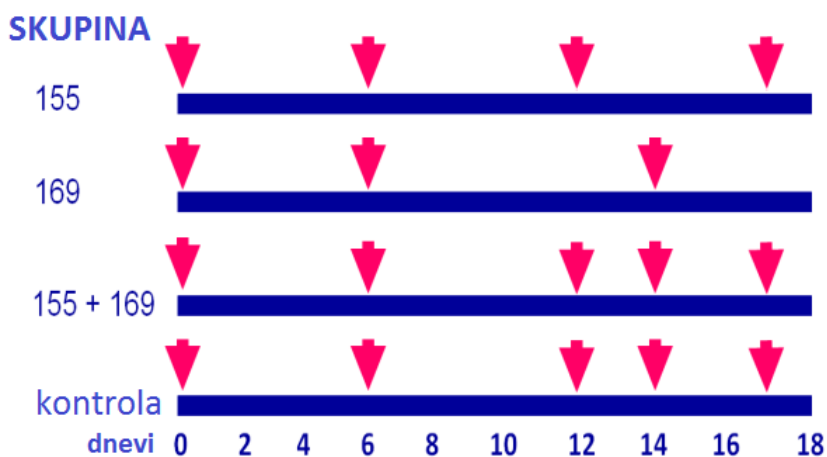
Pri poimenovanju kongenerjev PCB smo upoštevali smernice nomenklature organske kemije IUPAC (IUPAC, 1976). Kongenerja PCB-155 in PCB-169 smo v obliki prahu kupili pri podjetju Promochem (Wesel, Nemčija).

3.2.2 Testne živali in protokol tretiranja

Spolno zrele (odrasle) samice podgan seva Wistar, stare 8–10 tednov, s povprečno telesno maso 230–250 g, smo si priskrbeli pri podjetju Lek (Ljubljana, Slovenija). Poskus je potekal na Inštitutu za fiziologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani. Podgane so bile nameščene v kletkah ter standardiziranih pogojih s konstantno temperaturo 25°C, 55-odstotno vlago in 12-urnim ciklom osvetlitve svetloba/tema. Hrano, popolno krmno mešanico za laboratorijske miši in podgane (peleti M-K 02; Biotehnična fakulteta, Inštitut za prehrano) in vodo so dobivale *ad libitum*. Po uspešni paritvi (prisotnost vaginalnega čepa) smo podgane premestili v individualne kletke. V poskus je bilo vključenih 15 samic, ki so bile po kotitvi skupaj s svojim zarodom naključno dodeljene v eno od štirih skupin (tri poskusne skupine in kontrolna skupina). Samice v poskusnih skupinah so bile intraperitonealno (i. p.)

tretirane s PCB-169 ali PCB-155, raztopljenima v olivnem olju, posamično ali v kombinaciji. Prvi oz. začetni odmerek PCB-155 je bil 6 mg/kg telesne mase (t. m.), PCB-169 pa 2 mg PCB-169/kg t. m. Vzdrževalni odmerki, ki so sledili, so bili 2 mg PCB-155/kg t. m. in 0,5 mg PCB-169/kg t. m. Živali v kontrolni skupini so i. p. prejele ustrezno količino olivnega olja, in sicer 0,5 mL v začetnem odmerku in 0,15 mL v vzdrževalnem odmerku. Časovni postopek vnosov je shematično prikazan na sliki 8. Celotna količina prejetih kongenerjev PCB na žival je tako v poskusnih skupinah znašala:

- 12 mg PCB-155/kg t. m. v skupini PCB-155,
- 3 mg PCB-169/kg t. m. v skupini PCB-169 (tj. 90 µg TEQ/kg t. m.) ter
- 12 mg PCB-155/kg t. m. in 3 mg PCB-169/kg t. m. v skupini PCB-155 + PCB-169.



Slika 8: Časovni potek i. p. vnosov PCB podganam v laktaciji. Začetne (najvišje) odmerke PCB so prejele i. p. takoj po skotitvi (dan 0), vzdrževalni odmerki so sledili na različne dni po skotitvi, odvisno od kongenerja PCB. Kontrolna skupina je prejemala samo olivno olje.

Figure 8: Experimental treatment regime of i. p. PCB applications to the lactating rats. Lactating rats were given a loading dose of individual PCB congener in olive oil by i. p. injection on the day of the delivery (day 0). Subsequent maintenance doses were administered as indicated.

Izbrani odmerek PCB-169 je bil določen glede na njegov TEF (van den Berg in sod., 2006), na podlagi katerega smo izračunali relativno toksičnost prejetega PCB-169 oz. njegovo koncentracijo toksičnega ekvivalenta (TEQ), ki predstavlja oceno celotne toksične aktivnosti posameznih PCB oz. njihovih mešanic glede na aktivnost 2,3,7,8-TCDD (van den Berg in sod., 2006). Na podlagi predhodnih rezultatov o izločanju/prehajanju PCB-155 in PCB-169 v mleko pri ovcah (Vrecl in sod., 1996; Vrecl in sod., 2005) so bili količine začetnih in vzdrževalnih odmerkov in časovni postopek vnosov posameznega kongenerja za našo

raziskavo izbrani tako, da je bila dosežena primerljiva in konstantna raven obeh kongenerjev PCB v celotnem obdobju izpostavljenosti ter da so bili dani odmerki za matere in sesne mladiče nižji od letalnih. Lipofilnejši in presnovno obstojnejši PCB-169 ostaja v krvi dalj časa in tudi počasneje prehaja v materino mleko, obenem pa se v njem kopiči v večjih količinah kot PCB-155. Odmerki PCB-169 so bili primerljivi z odmerki v podobnih raziskavah s kongenerjema PCB-126 in PCB-169 (Yamamoto in sod., 2005; Xiao in sod., 2011) in podobnih raziskavah s TCDD (Lukinmaa in sod., 2001).

Za testne živali smo uporabili mladiče podgan, ki so sesali mleko pri materah in medtem prejeli PCB. Sesne mladiče smo vsakodnevno do žrtvovanja tehtali do 0,01 g natančno (tehnica Železniki ET-1111, Slovenija). Na koncu poskusa smo jih anestezirali z etrom in evtanazirali z izkravitvijo. V vseh poskusnih skupinah smo približno polovico mladičev žrtvovali deveti dan, drugo polovico pa 22. dan po skotitvi. Število poskusnih živali oz. mladičev na poskusno skupino je prikazano v tabeli 1. Matere smo žrtvovali 84. dan poskusa.

Tabela 1: Število poskusnih živali (matere ter mladiči, 9. in 22. dan) v posameznih skupinah.

Table 1: Number of experimental animals (mothers and offspring) in the experimental groups.

	PCB-169	PCB-155	PCB-155 + PCB-169	Kontrolna skupina
Matere	4	4	3	4
mladiči 9. dan	19	19	14	22
mladiči 22. dan	19	17	14	23

3.2.3 Odvzem tkiv

Iz očesnega venskega pleteža (*plexus ophtalmicus*) smo s heparinizirano stekleno kapilaro odvzeli kri za določitev koncentracije PCB v krvi, biokemijo in aktivnosti jetrnih encimov v serumu, po evtanaziji pa smo odvzeli tudi jetra in stegenice. Iz vzorcev krvi so na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani z metodo visoko ločljive plinske kromatografije z detektorjem na zajetje elektronov določili koncentracijo kongenerjev PCB v krvi mater in mladičev, kot je opisano v predhodni raziskavi (Vrecl in sod., 2005), na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center v Ljubljani) pa so opravili biokemične preiskave seruma in določili aktivnost jetrnih encimov.

3.3 Metode

3.3.1 Geometrija stegenic mladičev

Preliminarne meritve dolžine in širine ter biokemične analize stegenic devet dni starih živali niso pokazale razlik med poskusnimi skupinami, kosti so se izkazale kot premalo mineralizirane za nadaljnje analize geometrije, biomehanike in biokemije, zato smo geometrijske meritve stegenic opravili samo pri 22 dni starih mladičih.

Leve stegenice smo do meritev hranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Geometrijo stegenic 22 dni starih mladičev smo ocenili z napravo za računalniško tomografijo, namenjeno manjšim laboratorijskim živalim, t. i. aparat mikroCT (μCT , slika 9). Meritve smo opravili na oddelku za biomedicinske raziskave medicinske univerze v Gradcu v Avstriji, pod vodstvom dr. Birgit Reininger-Gutmann in s tehnično podporo dr. Alexandra Hofmeisterja. Naprava Siemens Inveon mikroCT je bila opremljena s programom Siemens »Inveon Research Workplace« (Siemens Medical Solutions USA, Inc., Malvern, PA, ZDA). Za stegenice smo namensko izdelali nosilec iz samolepilnega traku za ustrezno vstavitv v aparat CT. Pred slikanjem smo določili protokol za merjenje geometrije stegenic. Položaj slikanja smo prilagodili s preliminarno sliko, t. i. »scout view«, hitro dostopnim posnetkom, s katerim se potrdi, da je vzorec v napravi dobro nameščen, da polje slikanja zaobjema naše interesno meritveno okno, da se preverijo nastavitve (protokol) slikanja, saj je nadaljnje slikanje CT dolgotrajnejše.

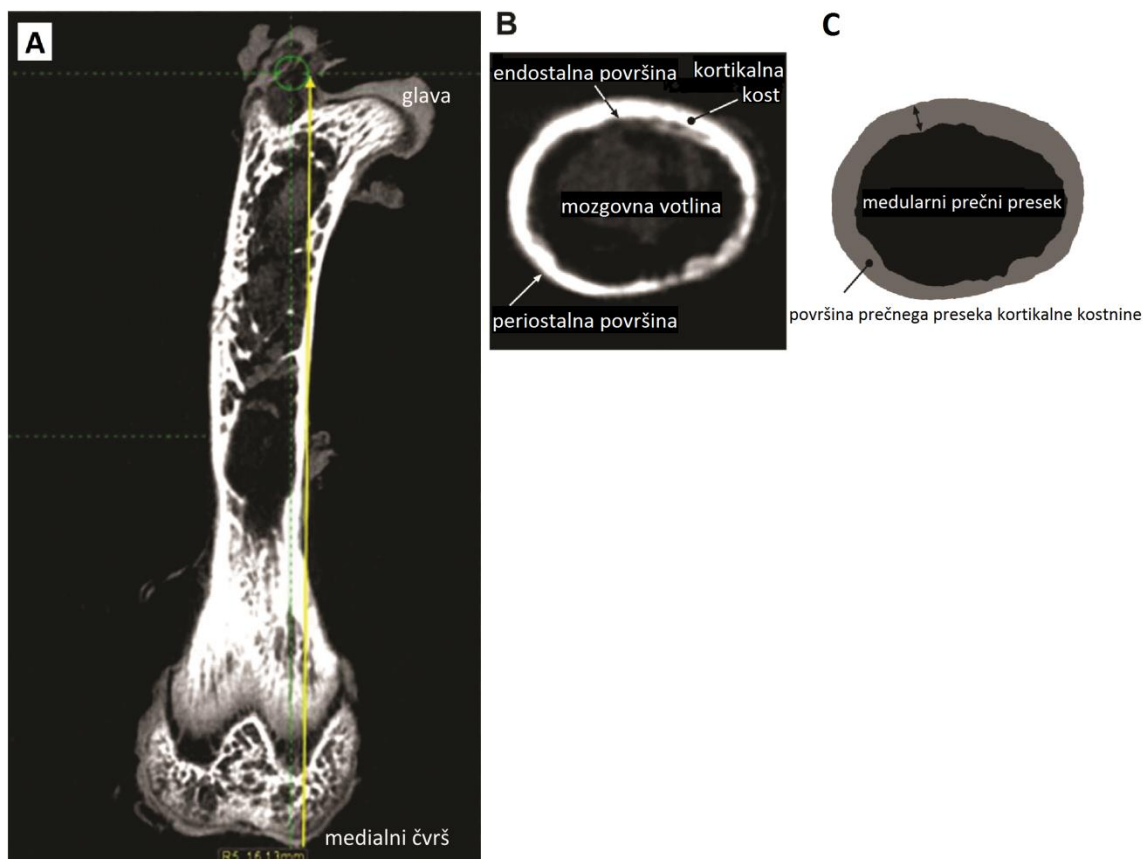
Zaradi večje natančnosti smo dolžino in širino kosti 22 dni starih mladičev izmerili s slik μCT . Za meritve dolžine stegenice (od vrha stegenične glave do najbolj distalne točke medialnega čvrša) smo uporabili longitudinalno sliko cele stegenice (slika 10A). Za meritve na prečnem preseku stegenic smo za vsakega 22 dni starega mladiča (število vzorcev na poskusno skupino = 10) naredili individualno tomografsko rezino (sliko) z debelino $19,1\text{ }\mu\text{m}$ na najožjem delu kosti, tj. v srednjem delu diafize. Rezina je bila pravokotna na os stegenice in oddaljena za 50 % dolžine celotne kosti od distalnega konca medialnega čvrša, kar označuje zelena presledkasta črta (slika 10A). Na tem delu obdaja mozgovno votlino kortikalna kostnina, ki smo jo želeli raziskati. V bližini okrajkov se endoostalno začne pojavljati tudi gobasta kostnina. Za mejni kriterij, s katerim aparat loči kortikalno kostnino od okolice, smo določili od 450 do 3000 cm^{-1} . Na podlagi pridobljenih slik (primer slika 10B) smo izmerili premer/širino kosti, površino preseka celotne kosti (tCSA, v mm^2), površino preseka kortikalne kostnine (ctCSA, slika 10C, v mm^2), periostalni oz. zunanji in endostalni oz. notranji obseg (PERI in ENDO, v mm) ter debelino kortikalne kostnine (v mm). Iz teh

podatkov smo izračunali razmerja med velikostjo kortikalnega in celotnega preseka ($ctCSA/tCSA$, v odstotkih), površino mozgovne votline (v mm^2), notranji in zunanji polmer kortikalne kostnine (v mm). Iz dolžin in širin stegenice smo izračunali razmerja s telesno maso (dolžina stegenice/telesna masa in širina stegenice/telesna masa, v $mm/g \times 100$), s katerimi smo želeli odstraniti učinek individualnih velikosti kosti, kot je opisal Lang (Lang in sod., 2005). Gostoto kortikalne kostnine smo izmerili s slik prečnega preseka kosti s programom ImageJ 1.43 tako, da smo na sliki označili površino kortikalne kostnine in izmerili gostoto označenega dela (slika 10C).



Slika 9: Aparat mikroCT, s katerim smo merili geometrijo stegenic (oddelek za biomedicinske raziskave, medicinska univerza, Gradec, Avstrija).

Figure 9: microCT for measuring geometry of femur samples (Division of Biomedical Research, Medical University of Graz, Austria).



Slika 10: μ CT-posnetek stegenice 22 dni starega mladiča v dveh različnih ravninah. (A) Posnetek stegenice vzdolžno: rumena puščica prikazuje meritve dolžine stegenice, zelena presledkasta črta pa zajema mesto prečne ravnine. (B) Posnetek stegenice prečno: periostalna in endostalna površina določata zunanjo in notranjo mejo kortikalne kosti. (C) Shematični prikaz stegenice prečno: črno – mozgovna votlina, sivo – kortikalna kostnina, puščica – debelina kortikalne kosti (Brankovič in sod., 2016).

Figure 10: μ CT scans of femur on PND 22 (two different planes). (A) Longitudinal μ CT image: yellow arrow shows femur length measurements: green interrupted line shows femur location of cross section plane. (B) Cross-sectional μ CT image: periosteal and endosteal surface envelop outer and inner border of cortical bone, respectively. (C) Femur cross-section schematically: black – medullary cavity, grey – cortical bone, arrow – the thickness of cortical bone (Brankovič et al., 2016).

3.3.2 Priprava materiala za histometrično analizo

Z odvzetih stegenic smo odstranili okolno mišično tkivo in pogačice. Desne stegenice smo fiksirali v 5-odstotnem nevtralnem puferiranem formalinu pri sobni temperaturi vsaj 24 ur, demineralizirali (dekalificirali) pri sobni temperaturi v raztopini 4,13-odstotne etilendiaminotetraoetne kisline (EDTA), dehidrirali v alkoholih naraščajoče koncentracije, presvetlili tkivo s sintetičnim nadomestkom ksilena (Neo-Clear, Merck, Darmstadt, Nemčija) in vklopili v parafin z medialno stranjo stegenice navzdol, da je ležala na stegenični glavi in medialni strani sredinskega čvrša. Z drsnim mikrotomom (Leica

SM2000R, Nussloch, Nemčija) smo rezali 5 μm debele tkivne rezine vzporedno z longitudinalno osjo stegenice iz lateralne proti medialni strani. Po potrebi smo prilagajali ravnino vzdolžnega reza, da so bile rezine različnih vzorcev stegenic primerljive. Morfološke značilnosti stegenice devet oziroma 22 dni stare podgane smo uporabili za določitev sredinske rezine stegenice. Pri obeh starostih smo sredinsko rezino določili tam, kjer je na proksimalnem okrajku stegenice obrtčeva jama prešla v večji obrtec in tako navidezno razdelila večji obrtec v dva dela in kjer se je na distalnem okrajku rastni hrustanec čim bolj poravnal v ravno črto. Nutritivne odprtine na histoloških rezinah nismo uspeli določiti.

Histološke rezine stegenic smo barvali s hematoksilinom in eozinom (HE) ter toluidinskim modrilom (TM, pH 7,2), z encimsko histokemijo pa smo ugotavljali aktivnost TRAP (komercialno dostopen komplet 387A »*Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit*«, proizvajalec Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA, dobavitelj Mikro-Polo, Maribor, Slovenija). V svoji raziskavi smo morali postopek prirediti, saj je ta komplet v osnovi namenjen prikazu levkocitov v krvnem razmazu, sušenem na zraku. Parafinske rezine smo deparafinizirali in rehidrirali v deionizirani vodi, nato pa sledili navodilom proizvajalca. Po končanem postopku encimske histokemije je sledilo spiranje rezin z deionizirano vodo in kratkotrajno barvanje s hematoksilinom (7–10 s) za obarvanje jeder. Barvilo smo 10 minut spirali pod tekočo vodo, da se je razvila barva, nato pa smo ga pokrili z vodnim medijem za pokrivanje Aquatex® (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Rezine smo pregledali in ovrednotili s svetlobnim mikroskopom (Microphot-FXA, Nikon, Tokio, Japonska) in digitalno kamero (DS-Fi1, Nikon, Tokio, Japonska). Slike izbranih rezin, ki so najbolj ustrezale sredinskemu vzdolžnemu rezu stegenice, smo kvantitativno ovrednotili z računalniškim programom za analizo slike NIS-Elements D.32 (Nikon, Tokio, Japonska).

3.3.3 Morfometrična analiza stegenic

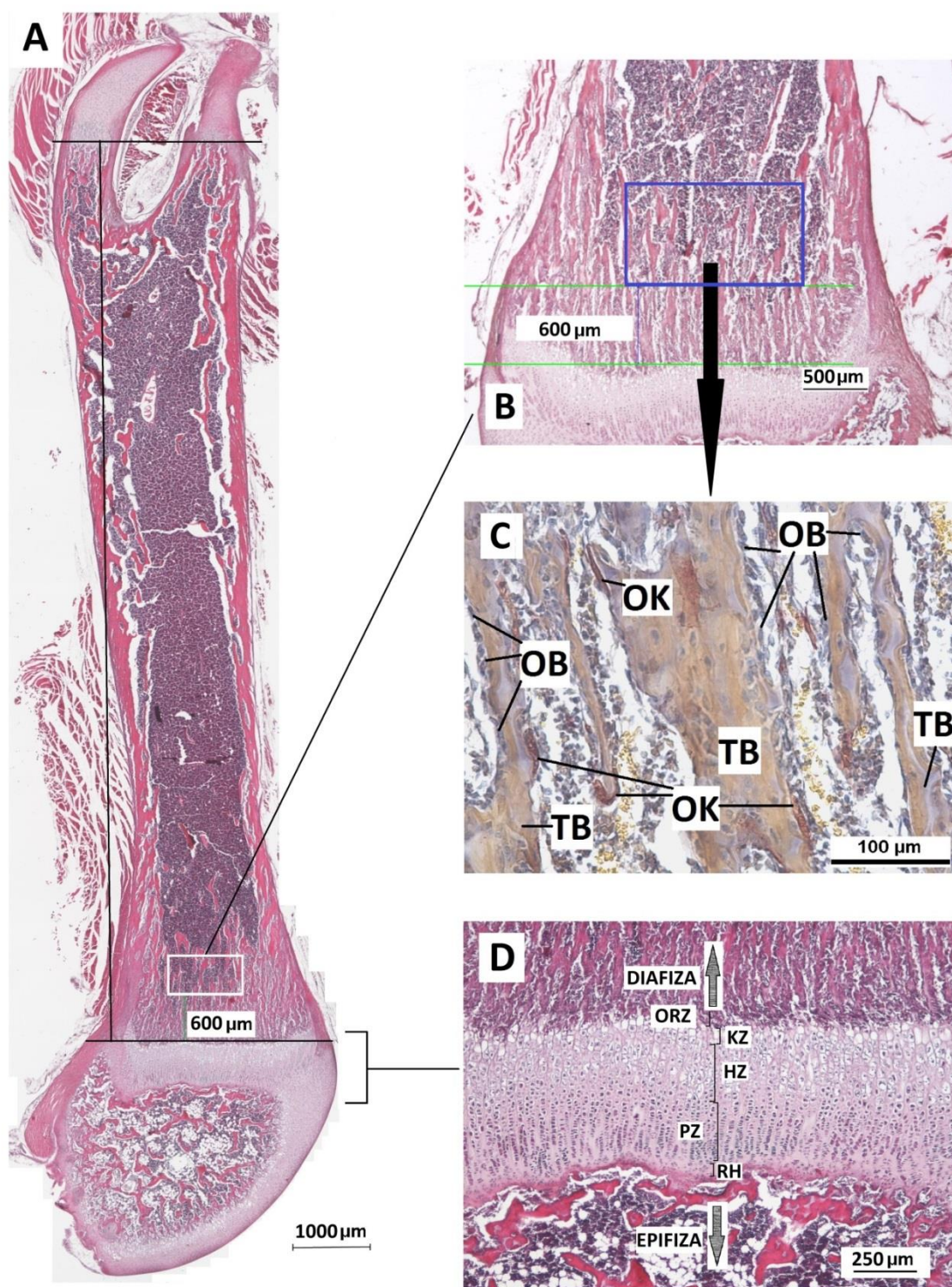
Za morfometrično analizo stegenic smo uporabili tkivne rezine (po en vzorec na mladiča), obarvane s HE (slika 11A). Pri devet in 22 dni starih mladičih smo opravili meritve distalnega epifiznega rastnega hrustanca (ERH), cone proliferacije, con hipertrofije in kalcifikacije skupaj, razdalje med proksimalnim in distalnim ERH ter izračunali razmerje med cono proliferacije in hipertrofije s kalcifikacijo distalnega ERH. Po potrebi smo meje med conami preverili pri isti seriji rezin, barvanih s TM.

1. Distalni epifizni rastni hrustanec (ERH) (v μm) smo izmerili pri štirikratni povečavi objektiva z vsaj sedmimi med seboj enakomerno oddaljenimi (približno 250 μm) meritvami in upoštevali povprečno vrednost teh meritev. V meritve smo zajeli rastni hrustanec od cone rezervnega hrustanca do cone kalcifikacije (cona osifikacije in resorpcije ni bila vključena v meritve, slika 11D).
2. Cono proliferacije (PZ) distalnega ERH (v μm) smo določili glede na pomnoženo oz. večje število hondrocitov, urejenih v značilne stebričke, približno vzporedne z vzdolžno osjo stegenice (slika 11D). Izmerili smo jo pri štirikratni povečavi objektiva z vsaj tremi meritvami in upoštevali povprečno vrednost teh meritev. Meritve so bile med seboj enakomerno oddaljene (približno 200 μm pri devet dni starih mladičih in 250 μm pri 22 dni starih mladičih), upoštevali smo povprečno vrednost vseh meritev.
3. Coni hipertrofije in kalcifikacije (HZ) distalnega ERH (v μm) smo določili glede na hipertrofirane (nabrekle) hondroците, ki so imeli močno povečan volumen celice z neobarvano citoplazmo (izplavljen glikogen) in slabo vidna piknotična jedra (cona hipertrofije). V celicah cone kalcifikacije jeder nismo več prepoznali (slika 11D). Slabo opazen zunajcelični matriks je bil stisnjen med stebričke močno hipertrofiranih hondrocitov. Coni smo izmerili pri štirikratni povečavi objektiva z vsaj sedmimi meritvami. Meritve so bile med seboj enakomerno oddaljene (približno 200 μm pri devet dni starih mladičih in 250 μm pri 22 dni starih mladičih), upoštevali smo povprečno vrednost vseh meritev.
4. Razdaljo med proksimalnim in distalnim ERH (v μm), tj. dolžino diafize, smo izmerili od meje med cono kalcifikacije ter cono osifikacije distalne in proksimalne metafize pri dvakratni povečavi objektiva (slika 11A).

Slika 11 (desno): Morfometrična in stereometrična analiza stegenic 22 dni starega mladiča.

(A) Sredinska rezina stegenice, barvanje s HE, dvakratna povečava objektiva; (B) interesno meritveno okno (ROI) za stereometrijo, 600 μm oddaljeno od distalnega ERH, barvanje s HE, dvakratna povečava objektiva; (C) scelna kostnina (TB) z osteoklasti (OK) in osteoblasti (OB), encimska metoda TRAP, 20-kratna povečava objektiva in (D) distalni ERH z označenimi conami: cona osifikacije in razgradnje (ORZ), cona kalcifikacije (KZ), cona hipertrofije (HZ), cona proliferacije (PZ) in cona rezervnega hrustanca (RH), barvanje s HE, štirikratna povečava objektiva.

Figure 11 (right): Femur morphometrical and stereometrical analysis of the offspring on PND 22. (A) Central histological section of rat's femur on PND 22, HE staining, objective magnification x2, (B) region of interest (ROI) used for stereometry, 600 μm distanced from the distal ERH, HE staining, objective magnification x2 (C) trabecular bone (TB) with osteoclasts (OK) and osteoblasts (OB), enzymatic method TRAP, magnification x20, and (D) distal ERH with marked zones: zone of resorption (ORZ), zone of calcified cartilage (KZ), zone of hypertrophy (HZ), zone of proliferation (PZ), and zone of reserve cartilage (RH), HE staining, objective magnification x4.



3.3.4 Stereometrična analiza stegenic

Stereometrično analizo stegenic devet in 22 dni starih mladičev smo opravili na rezinah, na katerih smo ugotavljali aktivnost TRAP, saj je bilo na rezinah, obarvanih s HE, osteoklaste in osteoblaste težko ločiti od okolnega tkiva. Osteoklasti so imeli rdečkasto obarvano in zrnato citoplazmo, ležali pa so neposredno ob trabekuli. Na končnih delih trabekul so bili največkrat bolj okrogle oblike, ob samih trabekulah pa so bili vzdolžno »razpotegnjeni«. Osteoblaste smo prepoznali glede na njihovo lego (naslojenost) ob trabekuli v eni plasti in glede na njihovo značilno polimorfno (nepravilno poligonalno ali pravokotno) obliko (slika 11C). Volumensko (prostorninsko) gostoto scelne kostnine, osteoblastov in osteoklastov smo določili podobno, kot je bilo opisano pri nekaterih drugih avtorjih (Basso in sod., 2005; Haider in sod., 2015; Kauschke in sod., 2015). V ta namen smo pri šestih stegenicah vsake poskusne skupine izbrali dve najbolj sredinski zaporedni rezini in nanju usmerili interesno meritveno okno (ROI), to je območje merjenja na sliki, ki je bilo predmet naše analize. Glede na velikost kosti in obsežnost gobaste kostnine smo v obeh starostnih skupinah poskusili zajeti primerljivo oddaljeno območje od cone kalcifikacije ERH distalnega okrajka stegenice. Tako je bil ROI pravokotnik s površino $0,51 \text{ mm}^2$ ($1020 \times 505 \mu\text{m}^2$) pri devet dni starih mladičih in $1,09 \text{ mm}^2$ ($1380 \times 790 \mu\text{m}^2$) pri 22 dni starih mladičih. Od ravnega hrustanca je bil pri devet dni starih mladičih oddaljen $200 \mu\text{m}$, pri 22 dni starih mladičih pa $600 \mu\text{m}$ proti diafizi (slika 11B). Morfometrične meritve smo opravili pri 20-kratni povečavi objektiva z mnogonamenskim testnim sistemom (M100) na osmih sosednjih testnih poljih (4×2) pri devet dni starih mladičih in na desetih sosednjih poljih (5×2) pri 22 dni starih mladičih na posamezno histološko rezino. Ustrezno število polj za štetje zadetkov smo izbrali glede na širino kosti, da smo na mestu merjenja izključili prisotnost kortikalne kostnine in osteoklastov za razgradnjo njene endostalne površine (rast kosti v širino). Določili smo število zadetkov (presečišč) v mreži, ki so padli na scelno kostnino ali osteocit v njej (Pv_{TB}), TRAP pozitivne večjedralne celice, ki so predstavljale osteoklaste (Pv_{OK}), in na osteoblaste (Pv_{OB}). Drugi zadetki v mreži so predstavljali kostni mozeg. Volumensko gostoto (Vv) posameznih sestavin smo izračunali kot kvocient relativne količine scelne kostnine/osteoklastov/osteoblastov in števila vseh presečišč, ki predstavlja celotni kostni volumen, po formuli 1:

Formula 1: $Vv_{(TB, OK, OB)} = Pv_{(TB, OK, OB)} / P_t$

($P_t = 800$ pri devet dni starih mladičih in $P_t = 1000$ pri 22 dni starih mladičih)

Vv_{TB} – volumenska gostota (prostornina) gobaste kostnine

Vv_{OK} – volumenska gostota osteoklastov

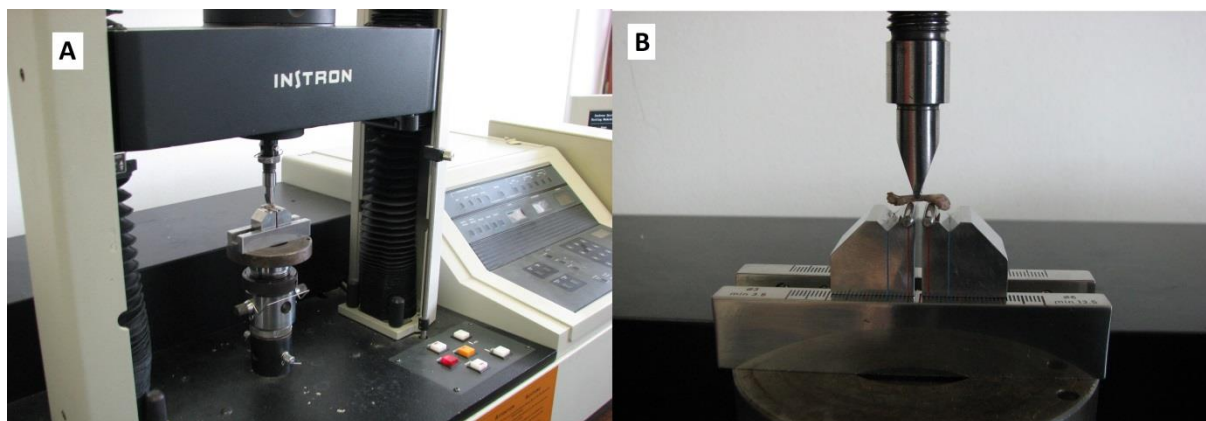
Vv_{OB} – volumenska gostota osteoblastov

3.3.5 Biomehanično testiranje stegenic 22 dni starih mladičev

Po meritvah geometrije kosti smo testirali biomehanične lastnosti stegenic 22 dni starih mladičev (pri vsaki poskusni skupini smo testirali deset vzorcev). Testiranje smo izvedli na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani s tritočkovnim upogibnim preizkusom pod vodstvom doc. Petra Jevnikarja s Katedre za stomatološko protetiko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter s tehnično podporo dr. Saša Jovanovskega in dr. Maje Antanasove. Tritočkovni preizkus smo izvedli na univerzalnem upogibnem stroju (model 4301, Instron Corp., Canton, MA, ZDA, slika 12A), kot je bilo predhodno opisano (Jämsä in sod., 1998; Lind in sod., 2009; Elabbas in sod., 2011b). Za svoje meritve smo na Institutu »Jožef Stefan« izdelali nosilca, ki sta bila premično vpeta v vodilo s skalo (razdalja v mm), in pritisko glavo oz. »giljotino«. Na nosilcih sta bili prečno položeni palčki s premerom 3 mm, na kateri smo položili vzorce. Pritisni glavi smo zaokrožili konico (premer konice 2 mm) (slika 12B). Zaokroženost treh točk, na katerih se izvaja pritisk na vzorec, je pomembna, da se prepreči morebitni vrez v vzorec med pritiskanjem. Dolžina razdalje med nosilcema oz. središčem palčk na nosilcih je znašala 6 mm. Stegenice smo na nosilce položili horizontalno s kranialno stranjo obrnjeno navzgor ter pazili, da so bile vse postavljene in podprte na nosilcih na enak način. Na eni palčki je bila stegenica podprta na višini tik pod malim obrtcem, na drugi strani pa malo nad distalno metafizo oz. distalnim ERH. Sila pritiska s stalno hitrostjo 0,5 mm/min do zloma je bila usmerjena pravokotno na sredino diafize stegenice, na isto mesto, na katerem smo s μ CT merili parametre prečnega preseka kosti. Nenadni padec sile je pomenil, da se je kost zlomila, zato smo takrat ustavili stroj in prenehali meritve. Računalnik je beležil podatke o sili in premiku stegenice s hitrostjo 10 Hz, dokler nismo zaznali občutnega padca na krivulji »sila-premik«, ki jo je sproti ob meritvi risal računalniški program (premik je bil na osi x, sila pa na osi y).

S tritočkovnim preizkusom smo izmerili (največjo) silo zloma in premik ob zlomu stegenice. Končna oz. največja sila zloma (F , v N) kosti je definirana kot obremenitev v trenutku zloma kosti. Premik kosti ob zlomu (d , v mm) je definiran kot deformacija kosti do

točke zloma. Iz izmerjenih podatkov smo izračunali togost, napetost, Youngov modul in geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka (Jämsä in sod., 1998; Sharir in sod., 2008). Togost oz. čvrstost kosti ob zlomu (N/mm) je bila izračunana glede na naklon linearnega (elastičnega) dela krivulje »sila oz. obremenitev-premik«, ki jo je izrisal računalnik ob upogibanju kosti.



Slika 12: Univerzalni upogibni stroj Instron 4301 za izvedbo našega tritočkovnega upogibnega preizkusa stegenic. (A) Stroj Instron, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana. (B) Pogled od blizu na nosilec v vodilu (spodaj) in pritisna glava (zgoraj), vmes je pripravljena stegenica za izvedbo testa.

Figure 12: Instron 4301 universal mechanical testing machine used for our three-point bending test of rat's femur. (A) Instron machine, Josef Stefan Institute, Ljubljana. (B) Rat's femur prepared to take a bending test on custom-made holders, above press head.

(Dejanska) napetost do zloma (σ , v MPa) pomeni obremenitev na dejanski presek ($\text{Pa} = \text{N/m}^2$) (formula 2). Ker predstavlja paskal (Pa) zelo majhno vrednost, se v mehaniki večinoma uporablja večja enota Mpa (N/mm^2). Napetost smo izračunali po formuli 2 (Jämsä in sod., 1998).

Formula 2: Formula, po kateri smo izračunali napetost:

$$\sigma = \frac{FLc}{4I}$$

σ – napetost

F – končna sila zloma

L – razdalja med nosilcema (6 mm)

c – polmer kosti v sredini diafize (izmerjeno z aparatom μCT)

I – geometrijski vztrajnostni moment preseka

Učinkovitost ali zmožnost, s katero se kost upira upogibanju in s tem zlomu, je neposredno povezana z elastičnim modulom E in vztrajnostnim momentom I . Elastični

modul (v MPa) ponazarja razmerje med napetostjo, ki jo povzročamo vzorcu (σ), in deformacijo (raztežkom, ϵ), ki se posledično dogaja vzorcu – formula 3 (Sharir in sod., 2008):

Formula 3: Formula za izračun elastičnega modula: $\sigma = E\epsilon$

E – elastični modul

ϵ – raztezek vzorca

Youngov modul lahko odčitamo na krivulji »napetost-raztezek« kot naklon krivulje, mi pa smo ga izračunali po formuli 4 (Finnilä in sod., 2010):

Formula 4: Formula, po kateri smo izračunali Youngov modul: $E = FL^3/d48I$

F – končna sila zloma

L – razdalja med nosilcema (6 mm)

d – premik kosti ob zlomu

I – geometrijski vztrajnostni moment preseka

Geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka (I , CSMI, v mm⁴) za cevaste strukture, med katere lahko štejemo tudi diafizo stegnenice, smo izračunali po formuli 5 (Sharir in sod., 2008):

Formula 5: Formula, po kateri smo izračunali geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka: $I = \pi/4 (r_o^4 - r_i^4)$

r_o – zunanji polmer

r_i – notranji polmer

3.3.6 Biokemične preiskave serumskih kazalnikov kostne premene in jetrnih encimov

Biokemične analize označevalcev kostne premene v serumu, tj. serumskega kalcija (s-Ca), anorganskega fosfata (s-PO₄) in aktivnost nespecifične alkalne fosfataze (sALP), in jetrnih encimov so bile opravljene z encimsko kolorimetrično metodo v avtomatskem kemičnem analizatorju (Olympus Corp., Hamburg, Nemčija) v biokemičnem laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo UKC v Ljubljani pod vodstvom prof. dr. Joška Osredkarja. Če je bila količina seruma posamezne žrtvovane živali premajhna

za posamezno preiskavo, je bilo treba vzorce več živali iste skupine in starosti združiti (devet dni stare živali).

3.3.7 Biokemična analiza kosti (vsebnost kostnih mineralov)

Leve stegnenice devet in 22 dni starih mladičev smo pripravili za ugotavljanje mase pepela ter kemične sestave kalcija in fosforja v kosti s tehniko induktivno sklopljene plazme z masno spektrometrijo (ICP-MS). Zamrznjene leve stegnenice smo odtalili na sobni temperaturi in po dveh urah za tri dni prenesli v deionizirano vodo (rehidracija organskega materiala okrog kosti zaradi nadaljnjega postopka). Nato smo stegnenice osem ur namakali v 5M-raztopini natrijevega hidroksida (Merck, Darmstadt, Nemčija). Vmes smo raztapljanje organskih snovi spremljali ter preverjali s spiranjem in namakanjem v vodi. Pazili smo, da kosti niso razpadle v metafizah. Po odstranitvi organskih snovi smo jih za dve uri prenesli v deionizirano vodo, nato pa jih 16 ur dehidrirali v 99-odstotnem acetonu (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francija). Sledilo je 36-urno sušenje na zraku in 30-minutno sušenje v sušilniku na 80 °C (Termo 60V, Dema, Ilirska Bistrica, Slovenija). Potem smo jih stehtali do 0,0001 g natančno (tehnica H45, Mettler Toledo, ZDA).

Meritve kalcija in fosforja v anorganski snovi smo izvedli na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani z masnim spektrometrom ICP (ICP MS, Varian 820-MS, Avstralija) pod mentorstvom dr. Gabrijele Tavčar Kalcher in s tehnično podporo Katarine Pavšič Vrtač. Žarilne lončke smo prežarili na 550 °C in jih stehtali do 0,00001 g natančno. V te lončke smo posamično (v vsak lonček po en vzorec) razporedili stegnenice in jih čez noč sušili na 103 °C v sušilniku (UFE 500, Memmert, Schwabach, Nemčija). Naslednji dan smo lončke z vzorci spet stehtali, jih postavili v žarilno peč (Nabertherm, Bremen, Nemčija) in žgali pri temperaturi 550 ± 5 °C, da smo upepelili stegnenice do belega pepela brez karboniziranih ostankov. Lončke smo iz peči prestavili v eksikator, da so se ohladili, nato pa smo jih ponovno stehtali. Iz meritev tehtanja mase lončka in mase pepela v lončku smo izračunali maso pepela oz. anorganske snovi v stegnenicah. Zaradi prenizke mase pepela stegnenic devet dni starih mladičev za ICP-MS metodo smo v enem žarilnem lončku združili stegnenice treh živali iste skupine (iste matere). Pripravljeni pepel vzorca smo pretresli v 300 ml erlenmajerico in žarilni lonček sprali z deionizirano vodo. Raztopini smo dodali 5,0 ml klorovodikove kisline (37 %, Merck, Darmstadt, Nemčija) in vse skupaj previdno segrevali na grelni plošči, da je vrelo nekaj minut. Ohlajeno raztopino smo prefiltrirali skozi filtrirni papir in dobro sprali z deionizirano

vodo do 5 ml (stegnenice devet dni starih mladičev) oz. do 50 ml (stegnenice 22 dni starih mladičev).

Pred merjenjem vsebnosti kalcija in fosforja v kosti smo aparaturo ICP MS sprali z enoodstotno raztopino dušikove kisline. Najprej smo izmerili standardne raztopine. Korelacijski koeficient umeritvene krivulje je moral biti vsaj 0,995. Nato smo izmerili koncentracijo kalcija (Ca) in fosforja (P). Po vsakem desetem vzorcu in na koncu serije smo izmerili eno od standardnih delovnih raztopin.

3.4 Statistična obdelava podatkov

Rezultate smo statistično obdelali s programom IBM SPSS za Windows, različica 20.0 (SPSS Inc., Čikago, ZDA). Podatki so prikazani v tabelah, srednje vrednosti so navedene kot povprečja (aritmetične sredine) s standardnimi odkloni (SD), pri asimetričnih razporeditvah pa kot mediane z interkvartilnimi razmiki (IQR). Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinami smo v primeru normalne porazdelitve (Kolmogorov-Smirnov test) in homogenih varianc (Levenov test) uporabili enosmerni statistični test analize variance (ANOVA) s *post hoc* testom Tukey oz. Bonferroni (pri enakem številu vzorcev) ali Hochbergov GT2-test (pri neenakem številu vzorcev), v primeru nenormalne razporeditve in nehomogenih varianc pa smo uporabili neparametrični test Kruskal-Wallis s *post hoc* testom Mann-Whitney. Razlike so bile statistično značilne pri vrednosti $P < 0,05$. Pri pogostnosti zlomljenih kosti med poskusnimi skupinami (biomehanični test) smo uporabili test hi-kvadrat (χ^2).

4 REZULTATI

4.1 Koncentracije kongenerjev PCB v serumu mladičev

Z visoko ločljivo plinsko kromatografijo smo v serumu devet in 22 dni starih mladičev vseh treh poskusnih skupin določili koncentracije kongenerjev PCB in s tem potrdili izpostavljenost mladičev (tabela 2).

Tabela 2: Krvne koncentracije PCB (ng/mL) devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so srednje vrednosti ($\pm$ SD), (n) – število vzorcev (z dovoljenjem urednika Slo Vet Res (Grošelj in sod. (2014))).

Table 2: PCB levels (mean values $\pm$ SD) in blood (ng/mL) of the offspring on PND 9 and 22. Number of animals tested is given in parentheses (with editor's permission of Slo Vet Res (Grošelj in sod. (2014))).

Starost mladičev		PCB-169 (n)	PCB-155 (n)	PCB-155 + PCB-169 (n)
9. dan	PCB-155	–	8,0 $\pm$ 5,5 (5)	8,2 $\pm$ 2,6 (5)
	PCB-169	1,4 $\pm$ 0,1 (5)	–	1,8 $\pm$ 0,3 (5)
22. dan	PCB-155	–	10,3 $\pm$ 3,1 (10)	14,8 $\pm$ 3,6 (3)
	PCB-169	3,2 $\pm$ 0,1 (11)	–	1,9 $\pm$ 0,1 (3)

4.2 Vpliv kongenerjev PCB na relativno maso jeter in aktivnost jetrnih encimov

Da bi ugotovili morebitne hepatotoksične učinke PCB, ki bi lahko vplivali na naše rezultate, smo ob evtanaziji stehali jetra ter opravili biokemične serumske analize pri devet in 22 dni starih mladičih (tabela 3). Izpostavljenost PCB-169 je povzročila značilen dvig relativne mase jeter (masa jeter/100 g telesne mase $\times$ 100 %) v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155 ($P < 0,001$) pri devet in 22 dni starih mladičih. Poleg tega je bila pri devet dni starih živalih relativna masa jeter povišana v skupini PCB-169 v primerjavi s skupino PCB-155 + PCB-169 ($P < 0,05$), medtem ko je bila pri 22 dni starih mladičih relativna masa jeter povišana v skupini PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s skupino PCB-169 ($P < 0,05$).

Poleg relativne mase jeter smo spremljali tudi serumske koncentracije oz. aktivnost štirih jetrnih encimov: aspartat aminotransferaze (s-AST), alaninske aminotransferaze (s-ALT), gamaglutamil transferaze (s-γ-GT) in laktat dehidrogenaze (s-LDH). Tako pri devet kot 22 dni starih živalih serumske koncentracije jetrnih encimov v poskusnih skupinah niso bile statistično povišane v primerjavi s kontrolno skupino ($P > 0,05$), kot je razvidno iz tabele 3. Koncentracija s-γ-GT je bila prenizka, da bi s svojo metodo lahko zaznali razlike (vrednosti so bile večinoma 0,00), zato te vrednosti v tabeli niso navedene.

Tabela 3: Relativna masa jeter in serumske koncentracije aspartat aminotransferaze (s-AST), alaninske aminotransferaze (s-ALT) in laktat dehidrogenaze (s-LDH) devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD ali *mediana z IQR.

Table 3. Relative liver mass and serum concentration of aspartate aminotransferase (s-AST), alanine aminotransferase (s-ALT) and lactate dehydrogenase (s-LDH) of rat offspring on PND 9 and 22 in the different experimental groups. Values are shown as the mean $\pm$ SD or *median with IQR.

Parameter	Starost (dn)	PCB-169	PCB-155	PCB-155 + PCB-169	Kontrolna skupina
(n)	9	(19)	(19)	(14)	(22)
	22	(19)	(17)	(14)	(21)
relativna masa jeter (%) ¹	9	3,41 $\pm$ 0,19 ^{a, b, d}	2,55 $\pm$ 0,15 ^{c, d}	3,22 $\pm$ 0,45 ^{a, b, c}	2,49 $\pm$ 0,17
	22	4,55 $\pm$ 0,19 ^{a, b, d}	3,84 $\pm$ 0,28 ^{c, d}	4,85 $\pm$ 0,41 ^{a, b, c}	3,81 $\pm$ 0,52
s-AST (mkat/L)	9	1,22 $\pm$ 0,22 (9)	1,38 $\pm$ 0,43 (8)	1,35 $\pm$ 0,35 (4)	1,53 $\pm$ 0,60 (13)
	22	1,48 $\pm$ 0,73 (16)	1,59 $\pm$ 0,41 (12)	1,47 $\pm$ 0,54 (12)	1,49 $\pm$ 0,26 (21)
s-ALT (mkat/L)	9	0,19 $\pm$ 0,04 (9)	0,22 $\pm$ 0,09 (8)	0,19 $\pm$ 0,06 (4)	0,25 $\pm$ 0,10 (13)
	22	0,31 $\pm$ 0,11 (16)	0,41 $\pm$ 0,06 (12)	0,31 $\pm$ 0,06 (12)	0,46 $\pm$ 0,09 (21)
s-LDH (μkat/L) ¹	9	*12,52 (8,32) (9)	*11,53 (6,73) (8)	*12,19 (10,22) (4)	*14,64 (14,08) (13)
	22	*9,80 (11,55) (16)	*12,20 (4,77) (12)	*8,91 (6,24) (12)	*11,97 (7,55) (21)

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili enosmerni test ANOVA s *post hoc* testom Bonferroni (devet dni stari mladiči) ali Tukey (22 dni stari mladiči) ali test Kruskal-Wallis¹ s *post hoc* testom Mann-Whitney. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169, ^d – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155 + PCB-169.

(n) – število vzorcev (pri jetrnih encimih so napisani ob navedenih vrednostih), dn – starost mladičev v dneh.

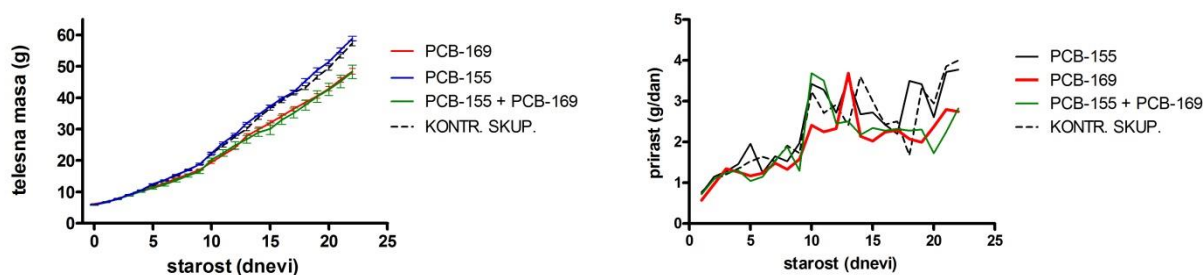
The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by one-way ANOVA, followed by the *post hoc* test Bonferroni's (PND 9) or Tukey (PND 22), or ¹by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test when appropriate. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group, ^d - significantly different from the PCB-155+169 group.

(n) – number of samples (for the liver enzymes numbers are written next to their values), (dn) – PND.

4.3 Vpliv kongenerjev PCB na telesno maso mladičev

V članku smo poročali, da med poskusnimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v številu mladičev ob skotitvi ter med deležem samcev in samic (Grošelj in sod., 2014). Masa mladičev je ob skotitvi znašala povprečno $6,83 \pm 0,64$ g. Deveti dan so bili mladiči vseh treh poskusnih skupin statistično značilno lažji kot mladiči kontrolne skupine, poleg tega so bili mladiči, izpostavljeni PCB-169 ter mešanici PCB-155 in PCB-169, statistično značilno lažji kot mladiči, izpostavljeni PCB-155. 22. dan so bili mladiči, izpostavljeni PCB-169, ter mladiči, izpostavljeni mešanici PCB-155 in PCB-169, statistično značilno lažji kot mladiči kontrolne skupine in mladiči, izpostavljeni PCB-155.

Nižja telesna masa je bila posledica zmanjšane dnevnega telesnega prirasta (Brankovič in sod., 2016). Od devetega dneva starosti naprej je bilo naraščanje telesne mase mladičev v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 nižje kot v skupini PCB-155 in kontrolni skupini (slika 13A). Ker med zgodnjim postnatalnim obdobjem podgane telesna masa ne narašča linearno (Ost'adalova in Babicky, 2012), smo pri mladičih za določitev vzorca hitrosti rasti po dneh izračunali dnevne priraste telesne mase (slika 13B). V kontrolni skupini in skupini PCB-155 smo opazili prvi vrh v dnevni prirasti okrog desetega dne po skotitvi (PND), ki mu je sledil padec med 16. in 18. PND, kar sovpada z obdobjem nezadostne oskrbe z materinim mlekom in prehodom na trdno hrano (Ost'adalova in Babicky, 2012). Temu je sledil drugi vrh v dnevni prirasti telesne mase. V skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 sta bila vzorca dnevnih prirastov spremenjena. V obeh skupinah smo najprej opazili rahel padec v dnevnem prirastu telesne mase okrog petega PND. Po prvem vrhu prirasta, ki je v skupini PCB-169 zaostajal glede na preostale poskusne skupine (okrog 13. PND), je sledilo obdobje zmanjšanih dnevnih prirastov med 15. in 20. PND, brez drugega vrha po 18. PND.



Slika 13: (A) Telesna masa (srednja vrednost $\pm$ SEM) in (B) dnevni prirast, ki je prikazan kot povprečno dnevno povečanje telesne mase mladičev podgan Wistar po posameznih poskusnih skupinah od dneva 0 do 22. PND (Brankovič in sod., 2016).

Figure 13: (A) Body mass (mean $\pm$ SEM) and (B) the growth rate, which was expressed as the average daily increase in the body mass of Wistar rat offspring in the different exposure groups from day 0 to PND 22 (Brankovič et al., 2016).

4.4 Vplivi kongenerjev PCB na rast stegnenic mladičev

Za oceno dolžine in širine stegnenic devet dni starih mladičev smo uporabili kljunato merilo, parametri so prikazani v tabeli 4. Dolžina in širina stegnenic različnih poskusnih skupin se nista razlikovali ($P = 0,091$ in $P = 0,202$). Podobno nismo ugotovili statističnih razlik niti pri korekciji na telesno maso. Pri razmerju dolžine oziroma širine stegnenice s telesno maso je bil $P = 0,086$ oz. $P = 0,064$.

Dolžino in širino stegnenic 22 dni starih mladičev smo izmerili s slik mikroCT, rezultati meritev so navedeni v tabeli 4. Dolžina in širina stegnenice sta bili v skupini PCB-169 statistično značilno zmanjšani v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$) in skupino PCB-155 ($P < 0,001$ pri dolžini in $P < 0,05$ pri širini), krajše so bile tudi stegnenice mladičev v skupini PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s skupino PCB-155 ($P < 0,05$). Po prilagoditvi vrednosti na telesno maso sta bila razmerje dolžine stegnenic na telesno maso in širina stegnenic na telesno maso statistično značilno povišana v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155 ($P < 0,05$). Dodatno smo opazili, da sta bili v skupini PCB-155 značilno povišani dolžina in širina kosti v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$), vendar so te razlike izginile po prilagoditvi na telesno maso.

Tabela 4: Dolžina in širina stegenic devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD ali *mediana z IQR.

Table 4: The femur length and width of rat offspring on PND 9 and 22 in the different exposure groups. Values are shown as mean $\pm$ SD or *median with IQR.

Parameter	Starost (dn)	PCB-169	PCB-155	PCB-155 + PCB-169	Kontrolna skupina
(n)	9	(18)	(16)	(13)	(19)
	22	(8)	(7)	(7)	(8)
dolžina (mm)	9	*11,27 (0,59)	*11,49 (0,47)	*11,15 (1,03)	*11,20 (0,65)
	22	15,73 $\pm$ 0,44 ^{a, b}	16,85 $\pm$ 0,24 ^{a, c, d}	15,77 $\pm$ 0,95 ^b	16,44 $\pm$ 0,64
dolžina/telesna masa (mm/g) x 100	9	*64,41 (4,27)	*60,08 (5,94)	*62,19 (21,55)	*61,88 (9,47)
	22	*33,58 (2,43) ^{a, b}	*28,16 (2,57) ^{c, d}	*29,52 (12,05) ^{a, b}	*28,14 (2,03)
širina	9	1,54 $\pm$ 0,16	1,63 $\pm$ 0,20	1,57 $\pm$ 0,17	1,66 $\pm$ 0,19
(mm)	22	1,86 $\pm$ 0,15 ^{a, b}	2,08 $\pm$ 0,16 ^c	1,94 $\pm$ 0,26	2,06 $\pm$ 0,16
širina/telesna masa (mm/g) x 100	9	*8,83 (1,31)	*8,47 (1,32)	*9,07 (2,02)	*9,42 (2,77)
	22	*4,03 (0,31)	*3,66 (0,04)	*3,95 (0,90)	*3,60 (0,26)

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili test Kruskal-Wallis s *post hoc* testom Mann-Whitney. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169, ^d – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155 + PCB-169.

(n) – število vzorcev, (dn) – starost mladičev v dneh.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group, ^d - significantly different from the PCB-155+169 group.

(n) – number of femurs, (dn) – PND.

4.5 Vpliv kongenerjev PCB na geometrijo prečnega preseka stegnenic 22 dni starih mladičev

Parametre prečnega preseka v srednjem delu diafize stegnenic 22 dni starih mladičev smo izmerili in izračunali s slik mikroCT, podatki so predstavljeni v tabeli 5. Geometrija prečnega preseka je bila večinoma prizadeta pri mladičih, izpostavljenih PCB-169, saj smo pri tej skupini opazili statistično značilno zmanjšan endostalni in periostalni obseg (ENDO in PERI), zmanjšano površino preseka celotne kosti (tCSA) in zmanjšano površino preseka mozgovne votline v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$) in skupino PCB-155 ($P < 0,003$). Podobno je bil zmanjšan tudi zunanji in notranji polmer kortikalne kostnine v skupini PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$) ali skupino PCB-155 ($P < 0,003$). Površina, debelina in gostota kortikalne kostnine se med poskusnimi skupinami nista razlikovali ($P = 0,230$, $P = 0,526$ in $P = 0,611$), zato tudi razmerje med velikostjo kortikalnega in celotnega preseka ($ctCSA/tCSA$) ni bilo spremenjeno ($P = 0,925$). Na sliki 14 so prikazani primeri slik μ CT stegnenic vseh štirih poskusnih skupin, ki kažejo spremembe v geometriji prečnega preseka v srednjem delu diafize.

Tabela 5: Geometrični parametri prečnega preseka stegenic 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so mediane z IQR.

Table 5: Femur cross-sectional geometrical parameters of rat offspring on PND 22 in the different exposure groups. Values are shown as median with IQR.

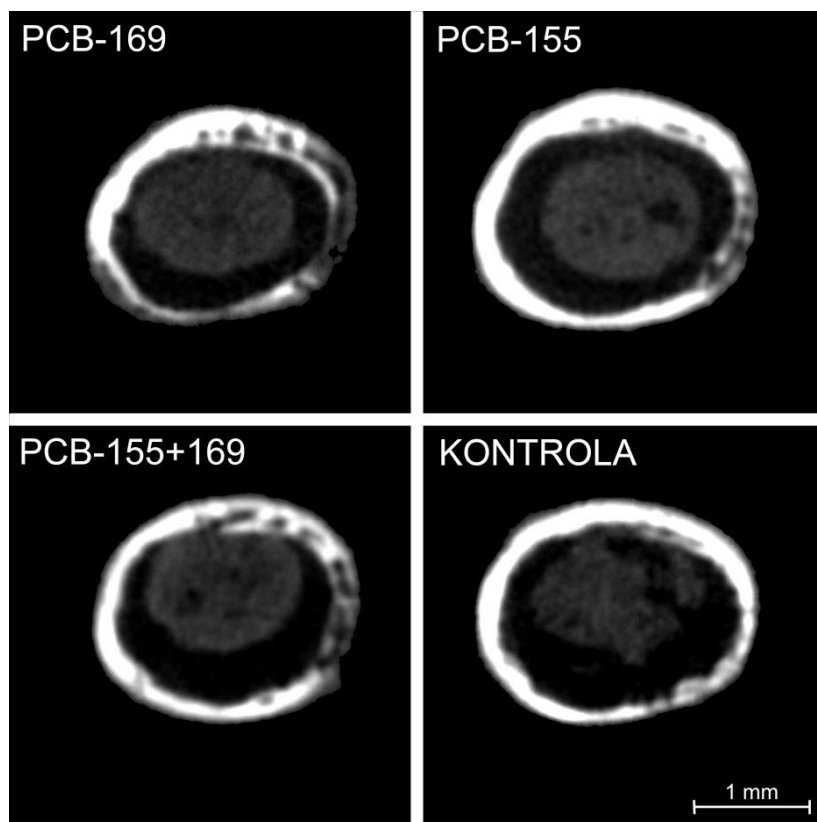
Parameter	PCB-169	PCB-155	PCB-155 + PCB-169	Kontrolna skupina
(n)	(8)	(7)	(7)	(8)
endostalni obseg (mm)	5,36 (0,38) ^{a, b}	6,10 (0,41) ^c	5,85 (1,30)	5,80 (0,66)
periostalni obseg (mm)	6,17 (0,61) ^{a, b}	6,94 (0,51) ^c	6,50 (1,79)	6,64 (0,88)
tCSA (mm ²)	2,89 (0,61) ^{a, b}	3,77 (0,60) ^c	3,26 (1,78)	3,43 (1,04)
ctCSA (mm ²) ¹	0,72 (0,36)	0,98 (0,13)	0,65 (0,53)	0,93 (0,31)
površina mozgovne votline (mm ²)	2,13 (0,33) ^{a, b}	2,76 (0,40) ^c	2,61 (1,02)	2,49 (0,73)
ctCSA/tCSA (%)	23,71 (9)	26,35 (2)	25,96 (5)	25,90 (2)
notranji polmer (mm)	0,824 (0,063) ^{a, b}	0,937 (0,069) ^c	0,911 (0,193)	0,891 (0,125)
zunani polmer (mm)	0,958 (0,102) ^{a, b}	1,095 (0,088) ^c	1,019 (0,286)	1,046 (0,155)
debelina kortikalne kostnine (μm)	126,65 (59,2)	154,70 (11,0)	120,70 (55,6)	149,30 (32,2)
gostota kortikalne kostnine (a. e.)	152,79 (90,30)	215,61 (6,42)	194,93 (33,37)	180,85 (74,83)

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili test Kruskal-Wallis s *post hoc* testom Mann-Whitney ali enosmerni test ANOVA¹ s *post hoc* testom Bonferroni. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169.

ctCSA – površina preseka kortikalne kosti, tCSA – površina preseka celotne kosti, a. e. – arbitrarna enota, (n) – število vzorcev, (dn) – starost mladičev v dneh.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test or by one-way ANOVA¹, followed by the Bonferroni's *post hoc* test. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group.

ctCSA – cortical cross-sectional area, tCSA – total cross-sectional area, a. e. – arbitrary unit, (n) – number of femurs, (dn) – PND.



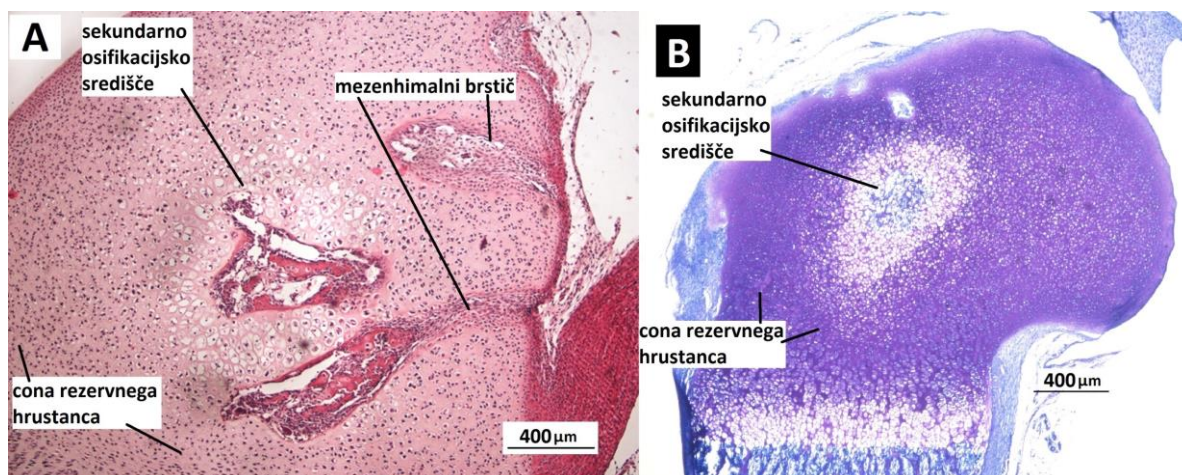
Slika 14: μ -CT-slike prečnega preseka stegenic primerkov vseh štirih poskusnih skupin v srednjem delu diafize. Slike so zajete natanko na polovici kosti (50 % proč od obeh okrajkov). Parametri prečnega preseka (periostalni/endostalni obseg, površina celotne kosti/mozgovne votline) so zmanjšani v skupini PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155 (Brankovič in sod., 2016).

Figure 14: Representative cross-sectional microCT images of the femur mid-diaphysis in differently exposed groups. Femur mid-diaphysis cross-sections were taken at 50% of the total bone length. Geometrical cross-sectional parameters (perimeters, total/bone marrow area) were reduced in the PCB-169 group compared to control and PCB-155 groups (Brankovič et al., 2016).

4.6 Vplivi kongenerjev PCB na morfometrijo stegenic mladičev

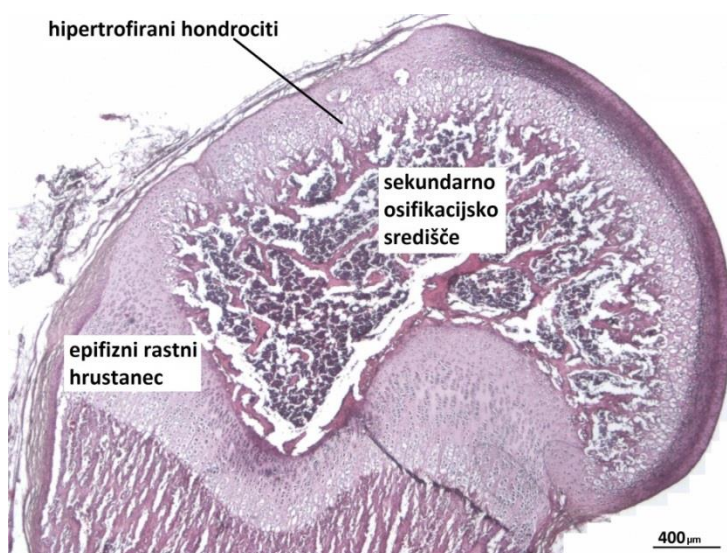
Za histomorfometrično analizo preparatov stegenic devet in 22 dni starih mladičev podgan smo uporabili tkivne rezine, obarvane s HE in TM, in rezine, na katerih smo ugotavljali aktivnost TRAP. Pri devet dni starih mladičih je sekundarni osifikacijski center v distalni epifizni prisoten oz. v nastajanju, vendar še ni obširno razvit. Mezenhimalni brstič s krvnimi žilami in osteoprogenitornimi celicami je že vstopil v epifizo in aktiviral okolne hondroците (vidimo njihovo nabrekanje). Večina hondroцитов v distalni epifizni je še vedno v fazi mirovanja (slika 15).

V distalnem okrajku stegenice 22 dni starih živali je sekundarno osifikacijsko središče že močno razširjeno, epifiza je večinoma osificirana, v ERH so prisotne vse cone (slika 16).



Slika 15: Distalni okrajek stegenice devet dni stare podgane v fazi enhondralne osifikacije. Na slikah vidimo nastajanje sekundarnega osifikacijskega središča, vdor mezenhimalnega brstiča v distalno epifizo in aktivacijo hondrocitov, ki so radiarno najbližje temu središču. Bolj oddaljeni hondrociti so še vedno v fazi mirovanja. (A) HE, štirikratna povečava objektiva, (B) na sliki vidimo tudi distalni ERH, barvanje s TM, dvakratna povečana objektiva.

Figure 15: Femur distal extremity of rat offspring on PND 9, endochondral ossification. The secondary ossification centre can be seen with blood vessels and connective tissue cells invasion and chondrocyte activation (close to the ossification centre). Surrounding chondrocytes are still in the resting phase. (A) HE, 4x objective. (B) Distal ERH can also be seen. Toluidine blue staining, 2x objective.



Slika 16. Distalni okrajek stegenice 22 dni stare podgane v fazi enhondralne osifikacije. Distalni okrajek je večinoma že osificiran, hondrociti so prisotni v ERH in pod sklepnim hrustancem. HE, dvakratna povečava objektiva.

Figure 16. Femur distal extremity of a rat offspring on PND 22, endochondral ossification. Distal extremity is mostly ossified, chondrocytes are present in the epiphyseal growth plate and radially under the articular cartilage. HE, objective magnification x2.

4.6.1 Histomorfometrične lastnosti distalnega epifiznega rastnega hrustanca (ERH)

Za histomorfometrične meritve distalnega ERH in njegovih con proliferacije in hipertrofije s kalcifikacijo smo uporabili rezine, obarvane s HE. Vsi rezultati so predstavljeni v tabeli 6.

Zaradi nepopolne razvitosti sekundarnega osifikacijskega centra v distalni epifizni stegenice pri devet dni starih mladičih (slika 15) pri njih nismo mogli izvesti meritev distalnega ERH. Pri 22 dni starih mladičih med poskusnimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v višini distalnega ERH ($P = 0,059$). Pri devet dni starih živalih je bila v skupinah PCB-169, PCB-155 in PCB-155 + PCB-169 razdalja med proksimalnim in distalnim rastnim hrustancem (razdalja inter-ERH) manjša kot v kontrolni skupini ($P < 0,05$), medtem ko je bila pri 22 dni starih mladičih razdalja inter-ERH v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 manjša kot v kontrolni skupini ($P < 0,05$) in skupini PCB-155 ($P < 0,002$).

V celični arhitekturi ERH pri devet dni starih mladičih ni bilo mogoče opaziti sprememb, ugotovili pa smo razlike v obsežnosti con. Cona proliferacije (PZ) je bila značilno znižana v skupini PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino ter skupinama PCB-155 in PCB-169 ($P < 0,05$), medtem ko je bila višina cone hipertrofije s cono kalcifikacije (HZ) znižana v skupinah PCB-169, PCB-155 + PCB-169 in PCB-155 v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$). Predvsem na podlagi znižanja con hipertrofije s kalcifikacijo smo ugotovili trend povečanega razmerja med cono proliferacije in conama hipertrofije s kalcifikacijo (PZ/HZ) v skupinah PCB-155 in PCB-169 ($P < 0,005$) v primerjavi s kontrolno, medtem ko je bilo značilno povišano razmerje v skupini PCB-169 v primerjavi s skupino PCB-155 + PCB-169 ($P < 0,05$).

Pri 22 dni starih mladičih v conah ERH nismo opazili sprememb v obliki celic. V nasprotju z devet dni starimi mladiči sta bili v vseh poskusnih skupinah HZ obsežnejši kot PZ. Višina PZ je bila znižana v skupini PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,001$), skupino PCB-155 ($P < 0,003$) in skupino PCB-155 + PCB-169 ($P < 0,05$), medtem ko se višina HZ in razmerje PZ/HZ med poskusnimi skupinami nista razlikovala ($P = 0,838$ in $P = 0,071$).

Tabela 6: Histomorfometrični parametri ERH v stegenici devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD ali *mediana z IQR.

Table 6: Epiphyseal growth plate histomorphometric parameters in the femur of rat offspring on PND 9 and 22 in the different exposure groups. Values are shown as the mean $\pm$ SD or *median with IQR.

Parameter	Starost (dn)	PCB-169	PCB-155	PCB-155 + PCB-169	Kontrolna skupina
(n)	9	(12)	(9)	(9)	(12)
	22	(15)	(14)	(13)	(10)
višina ERH (μm)	22	569,71 $\pm$ 50,13	610,43 $\pm$ 34,09	604,59 $\pm$ 45,71	602,50 $\pm$ 39,36
med-ERH	9	6,65 (0,65) ^a	6,84 (0,24) ^a	6,522 (0,804) ^a	7,068 (0,394)
razdalja (mm) ¹	22	*12,49 (0,34) ^{a, b}	*13,11 (0,29) ^{c, d}	*12,005 (1,227) ^{a, b}	*13,165 (0,502)
PZ (μm)	9	327,28 $\pm$ 25,33 ^d	337,85 $\pm$ 25,41 ^d	288,55 $\pm$ 30,20 ^{a, b, c}	339,55 $\pm$ 32,86
	22	211,39 $\pm$ 28,58 ^{a, b, d}	241,85 $\pm$ 32,12 ^c	231,68 $\pm$ 21,40 ^c	246,13 $\pm$ 18,62
HZ (μm)	9	252,23 $\pm$ 15,97 ^a	266,63 $\pm$ 20,93 ^a	260,51 $\pm$ 25,47 ^a	291,33 $\pm$ 17,62
	22	283,62 $\pm$ 31,32	292,48 $\pm$ 24,76	286,65 $\pm$ 29,23	290,23 $\pm$ 22,56
razmerje PZ/HZ	9	*1,26 (0,26) ^d	*1,25 (0,21)	*1,07 (0,11) ^c	*1,16 (0,21)
	22	0,75 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,10

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili enosmerni test ANOVA s *post hoc* testom Bonferroni ali testom Kruskal-Wallis¹ s *post hoc* testom Mann-Whitney. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169, ^d – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155 + PCB-169.

ERH – epifizni rastni hrustanec, PZ – cona proliferacije, HZ – cona hipertrofije in kalcifikacije, (n) – število vzorcev, (dn) – starost mladičev v dneh.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni's *post hoc* test, or ¹by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test when appropriate. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group, ^d - significantly different from the PCB-155+169 group.

ERH – epiphyseal growth plate, PZ – proliferative zone, HZ – hypertrophic and calcified zones, (n) – number of samples, (dn) – PND.

4.6.2 Volumenska gostota kostnih celic in kostnine

Stereometrično oceno stegenic devet in 22 dni starih mladičev smo opravili na rezinah, na katerih smo za identifikacijo osteoklastov ugotavljali aktivnost TRAP (tabela 7). Pri devet dni starih mladičih smo ugotovili, da je bil delež volumenske gostote scelne kostnine (Vv_{TB}) nižji v skupini PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$) ter skupinama PCB-169 ($P < 0,05$) in PCB-155 ($P < 0,001$). Volumenski gostoti

osteoklastov (Vv_{OK}) in osteoblastov (Vv_{OB}) nista bili spremenjeni ($P = 0,092$ in $P = 0,593$). Pri 22 dni starih živalih se delež volumenske gostote scelne kostnine ni razlikoval med poskusnimi skupinami ($P = 0,284$), prav tako ni bilo razlik pri volumenski gostoti osteoklastov (Vv_{OK}) in osteoblastov (Vv_{OB}) ($P = 0,950$ in $P = 0,512$).

Tabela 7: Volumenska gostota scelne kostnine (Vv_{TB}), osteoklastov (Vv_{OK}) in osteoblastov (Vv_{OB}) v stegenici devet in 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD ali *mediana z IQR.

Table 7: Trabecular bone volume (Vv_{TB}), osteoclast volume density (Vv_{OK}) and osteoblast volume density (Vv_{OB}) of rat offspring femur on PND 9 and 22 in the different exposure groups. Values are shown as the mean $\pm$ SD or *median with IQR.

Parameter (n)	Starost (dn)	PCB-169 (6)	PCB-155 (6)	PCB-155 + PCB-169 (6)	Kontrolna skupina (6)
Vv_{TB}	9	*0,258 (0,064)	*0,302 (0,028)	*0,184 (0,092) ^{a, b, c}	*0,288 (0,08)
	22	0,274 $\pm$ 0,04	0,270 $\pm$ 0,055	0,304 $\pm$ 0,027	0,297 $\pm$ 0,161
Vv_{OK}	9	0,039 $\pm$ 0,007	0,030 $\pm$ 0,010	0,027 $\pm$ 0,012	0,039 $\pm$ 0,009
	22	0,035 $\pm$ 0,013	0,037 $\pm$ 0,013	0,039 $\pm$ 0,014	0,039 $\pm$ 0,011
Vv_{OB}	9	0,124 $\pm$ 0,007	0,134 $\pm$ 0,019	0,136 $\pm$ 0,041	0,148 $\pm$ 0,023
	22	*0,160 (0,07)	*0,145 (0,05)	*0,157 (0,04)	*0,167 (0,02)

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili enosmerni test ANOVA s *post hoc* testom Bonferroni. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169.

TB – scelna kostnina, OK – osteoklasti, OB – osteoblasti, (n) – število vzorcev, (dn) – starost mladičev v dneh.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni's *post hoc* test. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group.

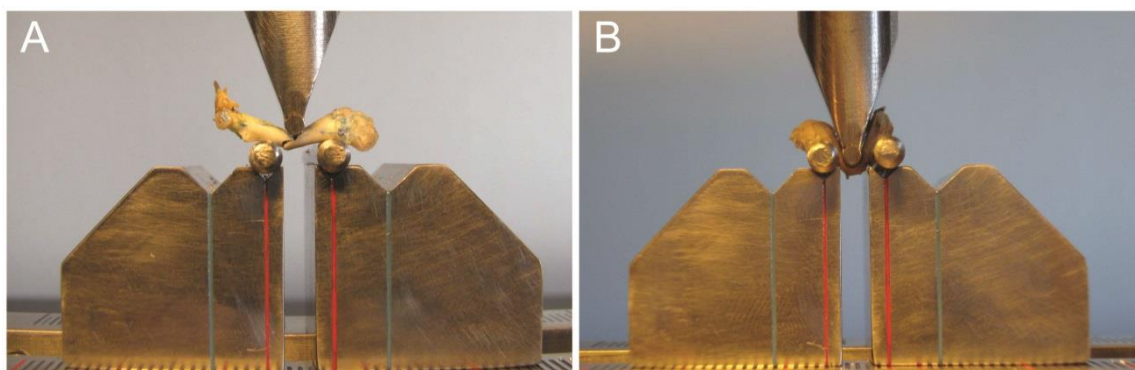
TB – trabecular bone, OK – osteoclasts, OB – osteoblasts, (n) – number of samples, (dn) – PND.

4.7 Vplivi kongenerjev PCB na trdnost stegenic 22 dni starih mladičev

Za oceno trdnosti (biomehanike) stegenic 22 dni starih mladičev smo uporabili tritočkovni preizkus na območju sredine diafize. Rezultati meritev so prikazani v tabeli 8. Pri preizkusu se niso zlomili vsi vzorci (slika 17). Od devetih oziroma desetih vzorcev na poskusno skupino so se ireverzibilno plastično deformirali (upognili) brez zloma dva vzorca v skupini PCB-169, trije v skupini PCB-155, eden v skupinah PCB-155 + PCB-169 in dva v kontrolni skupini. Test χ^2 je pokazal, da med poskusnimi skupinami ni razlik v deležu

zlomljenih in nezlomljenih (plastično deformiranih) kosti ($P = 0,946$, sp 3). Nezlomljene kosti so bile izločene iz nadaljnjih analiz.

Pri izmerjenih in izračunanih parametrih trdnosti kosti med poskusnimi skupinami nismo opazili razlik v maksimalni sili zloma ($P = 0,130$), premiku ob zlomu ($P = 0,311$), togosti ($P = 0,102$), vztrajnostnem momentu ($P = 0,054$), napetosti ($P = 0,636$) in elastičnem modulu ($P = 0,224$), kar je razvidno iz tabele 8.



Slika 17: Tritočkovni preizkus stegenic: (A) primer zlomljene stegenice in (B) primer plastične deformacije stegenice (Brankovič in sod., 2016).

Figure 17: Three-point bending test of the femur. (A) A representative example of a broken femur and (B) a femur plastic deformation (Brankovič et al., 2016).

Tabela 8: Rezultati tritočkovnega preizkusa diafize stegenic 22 dni starih mladičev po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so mediane z IQR.

Table 8: The results of the three-point bending test of the femur mid-diaphysis of rat offspring on PND 22 in the different exposure groups. Values are shown as median with IQR.

Parameter (n)	PCB-169 (6)	PCB-155 (6)	PCB-155 + PCB-169 (6)	Kontrolna skupina (6)
število nezlomljenih kosti	2 (od 9)	3 (od 10)	1 (od 9)	2 (od 10)
premik (mm)	1,28 (1,42)	0,81 (0,48)	0,94 (0,68)	0,85 (0,73)
končna sila zloma (N)	17,45 (3,73)	14,20 (6,75)	13,55 (8,83)	14,46 (5,65)
togost (N/mm)	25,70 (24,39)	24,20 (21,54)	35,03 (55,95)	25,76 (38,86)
napetost (MPa) ¹	72,35 (35,05)	47,27 (13,14)	58,50 (28,10)	49,78 (15,05)
elastični modul (MPa) ¹	197,99 (184,35)	172,73 (141,34)	254,69 (203,86)	146,26 (82,84)
CSMI (mm ⁴)	0,328 (0,206)	0,527 (0,106)	0,251 (0,281)	0,467 (0,261)

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili enosmerni test ANOVA ali test Kruskal-Wallis¹ s *post hoc* testom Mann-Whitney.

CSMI – geometrijski vztrajnostni moment prečnega preseka, (n) – število vzorcev.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by one-way ANOVA, or ¹by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test when appropriate.

CSMI – cross-sectional moment of inertia, (n) – number of samples.

4.8 Vpliv kongenerjev PCB na serumske biokemične kazalnike kostne premene

Za oceno biokemičnih kazalnikov kostne premene v serumu devet in 22 dni starih mladičev smo uporabili encimsko-kolorimetrično metodo v avtomatskem kemičnem analizatorju. Podatki meritev so povzeti v tabeli 9.

Analiza serumskih kazalnikov kostne premene pri devet dni starih mladičih ni pokazala razlik v koncentracijah s-Ca ($P = 0,088$), s-PO₄ ($P = 0,057$) in aktivnosti sALP ($P = 0,094$).

V nasprotju z devet dni starimi mladiči je analiza kostnih označevalcev pri 22. dnevu pokazala nižje koncentracije s-PO₄ v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolnimi mladiči ($P < 0,001$) in skupino PCB-155 ($P < 0,004$). Podobno je bila tudi aktivnost sALP nižja v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolnimi mladiči ($P < 0,05$) in v skupini PCB-169 v primerjavi s skupino PCB-155 ($P < 0,05$). Tudi s-Ca ni bil spremenjen ($P = 0,054$).

Tabela 9: Raven serumskega kalcija (s-Ca) in fosfata (s-PO₄) ter aktivnost nespecifične alkalne fosfataze (sALP) pri devet in 22 dni starih mladičih podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so povprečne vrednosti ± SD.

Table 9: Serum calcium (s-Ca) and phosphate (s-PO₄) level and total nonspecific alkaline phosphatase (sALP) activity of rat offspring on PND 9 and 22 in the different exposure groups. Values are shown as the mean ± SD.

Parameter	Starost (dn)	PCB-169	PCB-155	PCB-155 + PCB-169	Kontrolna skupina
(n)	9	(8)	(9)	(3)	(10)
	22	(17)	(14)	(13)	(21)
s-Ca	9	2,56 ± 0,22	2,74 ± 0,20	2,65 ± 0,26	2,50 ± 0,30
(mmol/L)	22	2,83 ± 0,33	2,95 ± 0,10	2,87 ± 0,20	3,02 ± 0,11
s-PO₄	9	3,08 ± 0,40	3,23 ± 0,26	3,47 ± 0,10	3,20 ± 0,20
(mmol/L)	22	2,86 ± 0,49 ^{a, b}	3,55 ± 0,22 ^{c, d}	3,16 ± 0,36 ^{a, b}	3,74 ± 0,34
sALP	9	4,93 ± 0,61	5,64 ± 0,85	5,63 ± 0,26	4,88 ± 0,38
(μkat/L)	22	4,34 ± 0,77 ^{a, b}	5,01 ± 0,68 ^c	4,61 ± 1,43 ^a	5,49 ± 0,97

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili test Kruskal-Wallis test s testom Mann-Whitney. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169, ^d – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155 + PCB-169.

(n) – število serumskih vzorcev, (dn) – starost mladičev v dneh.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group, ^d - significantly different from the PCB-155+169 group.

(n) – number of samples, (dn) – PND.

4.9 Vplivi kongenerjev PCB na biokemično analizo kosti

Za biokemično analizo levih stegenic devet in 22 dni starih mladičev smo uporabili ICP-MS. Kljub združevanju vzorcev devet dni starih mladičev nam vzorcev tako majhnih in mladih živali tehnično ni uspelo pripraviti tako, da bi lahko pridobili ustrezne in medsebojno primerljive koncentracije kalcija in fosforja (v večini združenih vzorcev so bile izmerjene vrednosti kalcija in fosforja popolnoma porušene, enako velja za njuno razmerje (Dickerson, 1962)), zato rezultatov devet dni starih živali ne moremo navesti. Kostni teh živali so po sežigu postale »mehurčasto« nabrekle, kar pri tem postopku ni običajno (slika 18).



Slika 18: Stegnenice devet dni starih živali v žarilnih lončkih po sežigu v žarilni peči, ko so postale »mehurčasto« nabrekle.

Figure 18: Femurs on PND 9 in quartz crucibles after their burning in a muffle furnace. The bones had a »foamy« appearance.

Pri 22 dni starih mladičih so sežgane kosti ohranile obliko, pri nadaljnjem tretiranju pa se je videlo, da so krhke in lomljive, saj so se brez težav zdrobile v prah. Rezultati biokemične analize parametrov anorganske snovi so prikazani v tabeli 10. Masa pepela je bila v skupini PCB-169 nižja kot v skupini PCB-155 ($P < 0,05$), medtem ko masa pepela glede na dolžino stegnenice med poskusnimi skupinami ni bila različna ($P = 0,081$). Pri masi pepela, korigirani na dolžino stegnenice, je bila razlika med skupinama PCB-169 in PCB-155 na meji statistične značilnosti ($P = 0,052$). Količina kalcija v stegnenicah je bila v skupini PCB-169 nižja kot v kontrolni skupini in skupini PCB-155 ($P < 0,05$). Razmerje med kalcijem in fosforjem v kosti ni bilo različno ($P = 0,243$).

Tabela 10: Biokemična analiza parametrov anorganske snovi stegenice 22 dni starih mladičev podgan po posameznih poskusnih skupinah. Prikazane so mediane z IQR.

Table 10: Biochemical analysis of the parameters of inorganic femur content on PND 22 of rat offspring in the different exposure groups. Values are shown as median with IQR.

Parameter (n)	PCB-169 (6)	PCB-155 (6)	PCB-155 + PCB-169 (6)	Kontrolna skupina (6)
masa pepela (mg)	9,99 (5,95) ^b	21,86 (8,65) ^c	11,06 (11,16)	15,21 (14,76)
masa pepela/dolžina stegenice	0,64 (0,33)	1,30 (0,52)	0,71 (0,64)	0,94 (0,80)
Ca v pepelu (%)	25,75 (5,82) ^{a, b}	30,92 (2,74) ^c	28,33 (3,10)	29,86 (3,94)
P v pepelu (%)	16,83 (1,20)	17,98 (1,70)	16,90 (1,88)	18,33 (2,43)
razmerje med Ca in P ¹	1,58 (0,23)	1,67 (0,08)	1,66 (0,09)	1,71 (0,27)

Za ugotavljanje značilnosti razlik med poskusnimi skupinami ($P < 0,05$) smo uporabili enosmerni test ANOVA s *post hoc* testom Bonferroni ali testom Kruskal-Wallis¹ s *post hoc* testom Mann-Whitney. ^a – značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, ^b – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-155, ^c – značilne razlike v primerjavi s skupino PCB-169.
(n) – število vzorcev.

The statistical significance of differences between groups ($P < 0.05$) was analyzed by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni's *post hoc* test, or ¹by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test when appropriate. ^a - significantly different from control group, ^b - significantly different from the PCB-155 group, ^c - significantly different from the PCB-169 group.
(n) – number of samples.

Rezultate naše študije v poglavjih 4.3, 4.4 (22 dni stari mladiči), 4.5, 4.7, 4.8 in 4.9 smo objavili v članku z naslovom »Spremembe v geometriji, biomehaniki in vsebnosti kostnih mineralov v stegenicah juvenilnih podgan, povzročene s strani neplanarnega PCB-155 in/ali planarnega PCB-169 (*Alterations in Geometry, Biomechanics and Mineral Composition of Juvenile Rat Femur Induced by Non-planar PCB-155 and/or Planar PCB-169*)" v ameriški reviji Environmental Toxicology (Brankovič in sod., 2017).

5 RAZPRAVA

V raziskavi smo proučili učinke dveh heksaklorobifenilov, planarnega PCB-169 in neplanarnega PCB-155, individualno in v kombinaciji, na razvoj predpubertetnih dolgih kosti pri sesnih mladičih podgan Wistar. Morebitne učinke smo spremljali z geometričnimi in histomorfometričnimi meritvami stegenic ter z določanjem njihove mineralizacije in trdnosti. Laktacijska izpostavitve dioksinu podobnemu PCB-169 je imela zaviralni učinek na telesno rast, rast stegenic v dolžino in širino ter na mineralizacijo kosti. Izpostavitve PCB-169 v kombinaciji z dioksinom nepodobnim PCB-155 je povzročila podobne, toda manj izrazite zaviralne vplive kot individualna izpostavitve PCB-169, medtem ko se pri laktacijski izpostavitvi PCB-155 nakazujejo spodbujevalni učinki na rast stegenic.

Laktacijsko izpostavljenost mladičev poskusnih skupin kongenerjem PCB smo potrdili z visoko ločljivo plinsko kromatografijo. Serumske koncentracije PCB-169 so bile nižje kot koncentracije PCB-155 (Grošelj in sod., 2014), kar je pričakovano glede na količino vnesenih odmerkov obeh kongenerjev. Koncentracije obeh kongenerjev v krvi mladičev so bile zaradi vzdrževalnih odmerkov višje na 22. PND kot na deveti. Ta razlika v koncentraciji je bila opazna predvsem pri bolj lipofilnem PCB-169 in kaže na njegov otežen (počasnejši) prehod iz krvi mater v mleko in s tem v mladiče, kar je bilo dokazano v predhodnih raziskavah vzorca razporeditve ter izločanja planarnih in neplanarnih kongenerjev PCB (Vrecl in sod., 1996; Vrecl in sod., 2005). PCB-169 ima skoraj dvakrat višjo konstanto adsorpcije in približno dvakrat nižjo konstanto desorpcije v primerjavi s PCB-155, kar se je opazilo po enkratnem vnosu obeh kongenerjev, ko je bil višek izločanja PCB-169 v materino mleko med 10. in 20. dnevom po vnosu, medtem ko je bil višek koncentracije PCB-155 dosežen že okrog tretjega dneva po vnosu (Vrecl in sod., 2005). Pri kombinirani izpostavitvi so bile pri 22. PND koncentracije PCB-155 v serumu mladičev višje, PCB-169 pa nižje kot pri individualnih izpostavitvah, kar nakazuje njuno medsebojno interakcijo in možnost kopičenja PCB-169 v jetrih mater in tudi mladičev. Zadnje domnevamo na podlagi (i) izsledkov predhodne raziskave, v kateri so poročali o znatno večjem kopičenju TCDD v jetrih miši, ki so bile sočasno z njo izpostavljene tudi visokemu odmerku neplanarnega PCB-153 (van Birgelen in sod., 1996b), in (ii) najvišjih relativnih mas jeter pri 22 dni starih mladičih skupine PCB-155 + PCB-169 (tabela 3) in njihovih mater (Vrecl in sod., 2004).

5.1 Vpliv PCB-155 in PCB-169 na rast mladičev

V predhodni raziskavi smo poročali o znižanju telesne mase v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155 tako deveti kot 22. PND (Grošelj in sod., 2014). Somatska rast je pri predpubertetnih mladičih, vključenih v našo študijo, primerljiva, saj spolne razlike v telesni masi postanejo očitne šele po 33. PND (Gabriel in sod., 1992). Podobni vplivi na rast po izpostavitvi dioksinu so bili opisani pri mladih odraslih podganah (Alaluusua in sod., 1993) ter tudi v času razvoja in intenzivne rasti pri podganah na 35. PND (Kattainen in sod., 2001; Miettinen in sod., 2002). Pri višjih odmerkih dioksina so bili vplivi na telesno maso podgan očitnejši (Viluksela in sod., 2000). Z nadaljnjimi analizami rezultatov smo ugotovili, da je nižja telesna masa posledica spremenjenega vzorca v dnevnih prirastih telesne mase v prvih dneh postnatalnega življenja (Brankovič in sod., 2016). V skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 je bila nižja telesna masa mladičev posledica zmanjšanih dnevnih prirastov med 15 in 20. PND in odsotnosti značilnega drugega vrha v pridobivanju telesne mase po 18. PND (Ost'adalova in Babicky, 2012). O podobnih opažanjih so poročali tudi pri otrocih staršev, izpostavljenih PCB (Patandin in sod., 1998; Larsen, 2006), in tudi pri podganah, ki so bile eksperimentalno izpostavljene (i) TCDD individualno ali v kombinaciji z mešanico PCB (Chu in sod., 2001), (ii) mešanici kongenerjev PCB (Bowers in sod., 2004; Ramajayam in sod., 2007; Chu in sod., 2008) ali (iii) planarnemu PCB-126 (Lind in sod., 2000b; Lind in sod., 2004; Alvarez-Lloret in sod., 2009). V naši raziskavi individualna izpostavitvev PCB-155 ni vplivala na pridobivanje telesne mase (prirast) sesnih mladičev, podobno tudi izpostavitvev mladičev podgan Sprague-Dawley (S-D) neplanarnemu diorto-PCB-153 intrauterino ni imela vpliva na njihovo telesno maso in dolžino nos–anus (Kobayashi in sod., 2008).

5.2 Vpliv PCB-155 in PCB-169 na rast stegenic

Vpliv na rast in razvoj stegenic smo ugotavljali z meritvami dolžine in širine stegenic, histomorfometrično analizo distalnega ravnega hrustanca in geometričnimi meritvami prečnega preseka srednjega dela diafize stegenic.

5.2.1 Devet dni stari mladiči

Pri devet dni starih živalih iz različnih poskusnih skupin pri merjenju z ročnim kljunatim merilom nismo ugotovili značilnih razlik v dolžini in širini celotne stegenice. Absolutne mere dolžine in širine stegenic ter korekcija dimenzij na telesno maso mladičev, s čimer naj bi se zmanjšal vpliv velikosti individualnih kosti (Lang in sod., 2005), niso bile statistično značilno različne.

Meritve dolžine diafize stegenic (razdalja med proksimalnim in distalnim ERH) pod svetlobnim mikroskopom so pokazale krajšo dolžino diafiz v vseh poskusnih skupinah in s tem nakazale zaviralni vpliv kongenerjev PCB na rast stegenice v dolžino. Podobno so ti kongenerji vplivali tudi na dolžino spodnje čeljustnice poskusnih živalih (Grošelj in sod., 2014). Krajša diafiza v poskusnih skupinah je bila predvidoma posledica sprememb v conah ERH, tj. znižanje debeline cone hipertrofije in kalcifikacije v vseh poskusnih skupinah, dodatno pa je bila v skupini PCB-155 + PCB-169 znižana tudi cona proliferacije. Take spremembe ERH lahko vodijo v zaostalo rast stegenice (Freitas in sod., 2005). Spremembe v conah ERH, še posebej znižana cona proliferacije hondrocitov, so vplivale na nastanek gobaste kostnine v diafizi pri devetem PND, saj ugotavljamo manjši delež te kostnine pri kombinirani izpostavitvi. Tudi nekaj predhodnih raziskav kaže podobne negativne spremembe v gostoti trabekularne kostnine in rasti dolgih kosti v dolžino zaradi spremenjenih značilnosti con rastnega hrustanca. Pri hipotiroidnih podganah nekateri raziskovalci poročajo o krajših golenicah in stegenicah v primerjavi z evtiroidnimi kontrolnimi skupinami, o znižanem ERH na račun 45-odstotnega znižanja cone proliferacije in 62-odstotnega znižanja cone hipertrofije, o odsotnosti epifizne trabekularne kostnine in generalizirani zaostalosti endohondralne osifikacije četrtega ledvenega vretenca (L_4) (Freitas in sod., 2005). Podobno je tudi izpostavitve TCDD pri podganah privedla do 32-odstotnega zmanjšanja volumenske gostote gobaste kostnine ($V_{V_{TB}}$) v proksimalni metafizi golenice in prizadela kostno premeno (Jämsä in sod., 2001).

Pri biokemičnih kazalnikih presnove kosti in volumenski gostoti osteoblastov v gobasti kostnini nismo ugotovili značilnih razlik med skupinami, zato sklepamo, da v tem obdobju še ni prišlo do opaznega vpliva PCB na osteoblaste. Iz rezultatov je razvidno, da so na ravni svetlobne mikroskopije histomorfometrične spremembe zaznavne že deveti PND, vendar še niso zadostne, da bi se izrazile v značilno krajših stegenicah. Glede na protokol tretiranja in vzorec izločanja obeh kongenerjev v materino mleko (Vrecl in sod., 2005) lahko sklepamo,

da je bil čas izpostavitve mladičev pri devetih PND prekratek. Poleg tega na podlagi svojih meritev dolžine stegenice in diafize menimo, da je za meritve dolžine in širine stegenic tako mladih živali metoda merjenja z ročnim kljunatim merilom premalo natančna.

5.2.2 22 dni stari mladiči

Pri starejših živalih, starih 22 dni, smo pri rasti kosti v dolžino ugotovili spremembe v conah ERH v skupini mladičev, izpostavljenih PCB-169, v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155, kar je vodilo do krajših stegenic, tj. nižjih absolutnih vrednosti. Morfometrična analiza ERH je pokazala precejšen vpliv PCB-169 na cono proliferacije in manjši vpliv na cono hipertrofije, vendar samo pri individualni izpostavitvi. Poleg tega smo opazili vpliv individualne izpostavitve PCB-155 na povečanje absolutne dolžine in širine stegenice. Pri korekciji na telesno maso to povečanje ni bilo več značilno, kar je skladno z meritvami razdalje med obema ERH in obsežnosti con ERH, glede na novejšo poročilo o učinkih dveh dioksinu nepodobnih neplanarnih kongenerjev na osteoblaste (Herlin in sod., 2015) pa naših podatkov absolutnih dolžin ni mogoče prezreti. Pri apozicijski rasti kosti 22 dni starih mladičev v širino smo na slikah CT ugotovili ožje stegenice (absolutne vrednosti) in posledično znižane vrednosti večine drugih geometrijskih parametrov srednjega dela diafize v prečnem preseku v skupini mladičev, izpostavljenih PCB-169, v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155. Podoben trend kot pri mladičih iz skupine PCB-169 se je nakazoval tudi pri mladičih iz skupine PCB-155 + PCB-169. Debelina kortikalne kostnine na preseku srednjega dela diafize ni bila spremenjena in je v vseh skupinah predstavljala 13,4–14,2 odstotka polmera stegenice.

O zaviralnih učinkih na rast dolgih kosti poročajo tudi v predhodnih študijah *in vivo* s TCDD in planarnim PCB-126 pri različnih sevih podgan (Lind in sod., 2000b; Jämsä in sod., 2001; Herlin in sod., 2010). Te študije povezujejo spremembe na kosteh, povzročene s TCDD/dioksinom podobnim PCB, z aktivnostjo AhR. Podgane Han/Wistar (H/W) z mutiranim AhR so manj dovzetne za vplive TCDD kot podgane Long-Evans (L-E) z normalno strukturo tega receptorja (Miettinen in sod., 2005). 20-tedenska izpostavitve odraslih samic podgan H/W in L-E različnim odmerkom TCDD je povzročila krajše in ožje golenice pri obeh sevih in krajše stegenice, zmanjšano celotno in kortikalno površino diafize golenice/stegenice pri sevu L-E, medtem ko so pri podganah H/W opazili samo zmanjšan endostalni obseg golenice in stegenice (Herlin in sod., 2010). Pri podobnem poskusu je bila rast golenice podgan L-E prav tako prizadeta pri nižjih odmerkih TCDD (zmanjšanje površine kosti ter

zunanjega in notranjega obsega kortikalne kostnine v prečnem preseku diafize golenice) v nasprotju s podganami H/W. Dodatno se je medularna površina zmanjšala pri obeh sevih, kortikalna površina pa samo pri L-E v višjih odmerkih (Jämsä in sod., 2001). Pri obeh raziskavah se je endostalni obseg izkazal kot občutljivejši za vplive TCDD kot periostalni (Jämsä in sod., 2001; Herlin in sod., 2010). Krajše stegnenice skupaj z zmanjšano CSA in obsegom so opazili pri mladih in odraslih podganah, izpostavljenih TCDD intrauterino pri 35. in 70. PND (Finnilä in sod., 2010), vendar so bile te spremembe reverzibilne. Podobno je Miettinen s sodelavci izvedla tri različne raziskave o vplivu TCDD na razvoj kosti (Kattainen in sod., 2001; Miettinen in sod., 2002; Miettinen in sod., 2005): (i) vpliv različno visokih enkratnih odmerkov TCDD (vnesenih 15. dan brejosti (15. GD)) pri samicah 35. PND treh različnih linij podgan (A, B in C); (ii) vpliv enkratnega odmerka 1 µg/kg TCDD, vnesenega v različnih časovnih obdobjih razvoja mladičev podgan linije C (11., 13. ali 19. GD ali 0., 2. ali 4. PND) na mladiče 40. PND in (iii) nadaljnja raziskava, t. i. raziskava »follow-up«, prve raziskave po letu dni (starost samic 52 tednov). Linija podgan A je imela AhR odporen na TCDD, značilen za podgane H/W (Ahr^{hw}), linija B je imela odporen alel B^{hw} , linija C pa je bila brez odpornih alelov na TCDD, zato so imele zelo različne srednje letalne odmerke (LD_{50}) za TCDD (> 2000 µg/kg, 410 µg/kg in 19 µg/kg v linijah A, B oz. C). Krajša dolžina golenic in stegnenic in zmanjšana kortikalna površina kosti v prečnem preseku je bila pri 35 dni starih samičkah samo v najobčutljivejši liniji C pri najvišjem odmerku TCDD in v drugi raziskavi pri intrauterini izpostavljenosti, manj pri laktacijski izpostavitvi (Miettinen in sod., 2005). Prav tako so pri teh samicah opazili zmanjšano površino medularne votline ter zmanjšan obseg golenice in stegnenice samo pri najvišjem odmerku. Pri različnih časovnih izpostavitvah istemu odmerku (1 µg/kg TCDD) sta bila pri 40 dni starih podganah znižana endostalni in periostalni obseg v vseh obdobjih, razen periostalnega obsega pri samcih. V raziskavi po letu dni se je večina parametrov, ki so bili spremenjeni zaradi intrauterine izpostavitve ali prek mleka, vrnila na kontrolno vrednost. Reverzibilnost spremenjenih parametrov, povzročenih s TCDD, kaže na popravilo poškodb, najverjetneje zaradi remodelacije kostnine, če se TCDD odstrani iz telesa in ni novih naknadnih vnosov (Miettinen in sod., 2005). Podobne reverzibilne spremembe pri mladičih podgan 35. PND, inducirane intrauterino in z laktacijsko izpostavitvijo A1254 (Elabbas in sod., 2011b) ali mešanico onesnaževal, ki je vsebovala 14 kongenerjev PCB (Elabbas in sod., 2011a), kot so krajše stegnenice/golenice, zmanjšana površina celotnega in kortikalnega prečnega preseka ter obseg dolgih kosti, so izzvenele do 77. in 350. dneva starosti (Elabbas in sod., 2011a; Elabbas in sod., 2011b). Pri samicah podgan S-D je razpolovni čas eliminacije TCDD približno 26 dni (Li in sod., 1995). Pri ljudeh je razpolovni čas daljši: pri TCDD približno 6,5–8,5 leta, pri PCB-169 pa 10–13 let (Ogura,

2004). Obstajajo raziskave o učinkih planarnega PCB-126 na kostno tkivo spolno zrelih podgan, nismo pa uspeli najti objavljenih podatkov o učinkih PCB na rast in geometrijo (kortikalne) kosti sesnih in predpubertetnih mladičev podgan, izpostavljenih prek mleka. Pri odraslih podganah S-D je šest odmerkov PCB-126, prejetih i. p. v trimesečnem obdobju, povzročilo zmanjšano površino prečnega preseka in medularne votline nadlahtnic in stegenic (Lind in sod., 2000b), medtem ko isti avtor v dveh podobnih raziskavah nasprotno poroča o povečani kortikalni debelini golenice pri odraslih podganah S-D, za medularno površino pa ni podatka (Lind in sod., 1999; Lind in sod., 2004). Pri sesnih mladičih podgan so bili že opisani podobni zaviralni vplivi PCB-169, individualno in v kombinaciji s PCB-155, ter tem nasprotni vplivi PCB-155 na rast kraniofacialnega področja lobanje pri devetem in 22. PND (Grošelj in sod., 2014). Nevrofacialne kosti lobanje razen senčnic okostenevajo s primarno osifikacijo, podobno kot dolge kosti rastejo v širino z apozicijsko rastjo (Allen, 2003), v spodnji čeljustnici pa potekata oba tipa zakostenevanja (intramembransko v telesu in večini spodnječeljustnične veje in enhondralno v čvrstem podaljšku) (Kaufman, 1992). Mladiči skupin PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 so imeli 22. dan bolj okrogle glave, tj. krajše lobanje in spodnje čeljustnice, kot mladiči kontrolne skupine in skupine PCB-155 (Grošelj in sod., 2014), kar je skladno tudi z drugimi raziskavami na lobanjah in spodnjih čeljustnicah (Alaluusua in sod., 1993; Kattainen in sod., 2001; Lukinmaa in sod., 2001; Miettinen in sod., 2002; Bowers in sod., 2004; Sholts in sod., 2015a; Sholts in sod., 2015b;).

Znižanje *con* ERH, ki ga povzroča izpostavljenost PCB-169, individualno ali v kombinaciji, kaže na zmanjšano zmožnost enhondralne osifikacije v distalnem okrajku stegenice. Proliferacija hondrocitov ERH, ki omogoča rast kosti (podaljševanje) v dolžino, je vodena prek kompleksne mreže nutritivnih, celičnih, parakrinih (PTHrP, *Ihh*; BMPs, FGF) in endokrinih (os GH-IGF-1, estrogeni, androgeni) dejavnikov (Shim, 2015) ter mora biti poleg faze zorenja in končne apoptoze hipertrofiranih hondrocitov natančno koordinirana. Časovni zamik katerekoli faze lahko vodi do motenj rasti kosti v dolžino (Sanchez in He, 2009; Sanchez, 2010). GH in IGF-1 sta glavna spodbujevalca rasti kosti v dolžino, v predpubertetni dobi pa sta poleg tega pomembna tudi pri mineralizaciji in pridobivanju kostne mase (Giustina in sod., 2008). Na rast, razvoj in vzdrževanje optimalne strukture skeleta vplivajo tudi estrogeni, direktno prek vezave predvsem na ER α ali posredno prek aktivacije osi rastni hormon (GH)-IGF-1 (Borjesson in sod., 2013). Na vlogo estrogenov v predpubertetnem obdobju kaže tudi primerljiva raven izražanja mRNA za ER α in ER β v osteoblastih, osteoklastih in redkih osteocitih metafize golenice v predpubertetnem obdobju in po doseženi spolni zrelosti (van der Eerden in sod., 2004). V metafizi stegenic 18 dni starih podgan

poročajo o izražanju mRNA za ER v osteoblastih trabekularne kostnine, nizka raven izražanja je bila še v mezenhimskih celicah in osteocitih, medtem ko v hipertrofiranih hondrocitih in osteoklastih ni bilo zaznavnega izražanja (Windahl in sod., 2000). O izražanju ER α in ER β poročajo tudi v mirujočih in proliferativnih hondrocitih proksimalnega ERH golenice in distalnega ERH nadlahtnice podgan od skotitve do spolne zrelosti (Nilsson in sod., 2002), medtem ko pri ljudeh navajajo povečanje izražanja obeh oblik ER med diferenciacijo osteoblastov (Rickard in sod., 1998).

Znano je, da PCB-169 povzroča antiestrogene učinke prek vezave na AhR, vendar natančen način delovanja od aktivacije AhR do antiestrogenih učinkov še ni znan. Domnevno se z ligandom aktivirani AhR veže na specifična zaporedja DNA, t. i. hormonsko odzivne elemente, vendar ne aktivira prepisovanja genov, odzivnih na estrogene; obenem pa fizično onemogoči vezavo z ligandom aktiviranega ER na omenjena zaporedja DNA (Cooke in sod., 2001). AhR se ubikvitarno izraža v več organih, med drugim tudi v hondrocitih rastnega hrustanca (Cedervall in sod., 2015), osteoblastih (Naruse in sod., 2002; Herlin in sod., 2015) in osteoklastih (Korkalainen in sod., 2009; Yu in sod., 2014). AhR-signalne poti naj bi imele vlogo tudi pri normalnem razvoju kosti, saj je bila diferenciacija osteoprogenitornih celic kostnega mozga v zrele osteoblaste motena pri celicah brez AhR v primerjavi s celicami z normalno ravno receptorja (Herlin in sod., 2013). Znane so interakcije med AhR in potmi, ki vključujejo več jedrnih receptorjev (estrogenski, androgenski, glukokortikoidni receptorski sistemi) (Brunnberg in sod., 2012). Dioksinu podobni PCB lahko delujejo antiestrogeno tudi na druge načine, npr. prek vpliva na aktivno obliko vitamina D (Li in sod., 1995; Nishimura in sod., 2009), kar kaže njihove različne načine vplivanja na remodelacijo kosti prek AhR (Herlin in sod., 2013). PCB bi lahko vplivali tudi na katerega od hormonov, katero od signalnih molekul ali katerega od rastnih faktorjev, vključenih v proliferacijo in diferenciacijo hondrocitov v ERH (parathormon/parathormonu sorodni peptid (PTHrP), Ihh, TGF- β , Runx2, IGF-1, IGFBP, T₄) (Alvarez-Lloret in sod., 2009; Sanchez, 2010), čeprav pri TCDD tega niso opazili (Cedervall in sod., 2015). TCDD namreč ni vplival na rast metatarzalnih kosti plodov v kulturi, kar kaže na njegov sistemski in ne na neposreden lokalni vpliv na rast kosti (Cedervall in sod., 2015).

Zaradi dokazanega izražanja ER v mirujočih in proliferativnih hondrocitih ERH dolgih kosti podgane v postnatalnem obdobju (Nilsson in sod., 2002) lahko PCB vplivajo na rast kosti v dolžino prek vpliva na hondroците, še posebej na njihovo proliferacijo. Nasprotno pa je izražanje ER v coni hipertrofije po skotitvi minimalno in se zviša pozneje s starostjo, kar kaže

na vlogo ER v tej coni šele pri fuziji ERH, do katere pri podgani prihaja v pozni starosti (Nilsson in sod., 2002). Krajše stegenice zaradi sprememb v (conah) ERH so opisali pri razvoju kosti hipotiroidnih podgan, pri katerih so proučevali vlogo receptorja tiroidnega hormona $\beta 1$ (Freitas in sod., 2005). Podobno so krajše golenice opazili pri miših, tretiranih z E_2 ali selektivnim agonistom $ER\alpha$, tj. hidroksifenilpropilpirazolom (PPT), pri katerih je bila višina ERH prizadeta zaradi znižane cone proliferacije in predvsem hipertrofije. Snovi naj bi učinkovale prek $ER\alpha$, dokazali pa so tudi, da je supresija rasti kosti odvisna od selektivnosti agonista $ER\alpha$ (Iravani in sod., 2017).

Pri apozicijski rasti kosti v širino se nova kostnina tvori na zunanjem obodu kosti, razgrajuje pa na endostalni strani. S tem se povečujeta zunanji premer kosti in prostornina mozgovne votline, hkrati pa se ohranja razmerje med kortikalno kostnino in premerom medularnega kanala (Allen, 2003), čeprav v obdobju rasti velikokrat pride do relativnega večjega povečanja endostalnega polmera v primerjavi s periostalnim in se debelina kortikalne kostnine celo stanjša (Sharir in sod., 2008). Glede na znižane vrednosti zunanjega in notranjega polmera in obsega ter celotne in mozgovne površine pri 22 dni starih mladičih skupine PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155 v svoji študiji ugotavljamo, da PCB-169 vpliva zaviralno tudi na apozicijsko rast kosti. V skladu s predhodno raziskavo (Herlin in sod., 2015) predvidevamo, da je dioksinu podoben PCB-169 v koncentracijah, uporabljenih v našem poskusu, deloval antiestrogeno na osteoblaste periosta posredno prek AhR in s tem negativno vplival na tvorbo kosti (upočasnil rast) v širino. Dodatno nam to nakazujejo meritve površine in debeline kortikalne kostnine, pri katerih nismo ugotovili povečanih vrednosti, temveč trend zmanjšanja, pri skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169. Tudi poskusi na osteoblastih *in vitro* so pokazali, da TCDD in dioksinu podobni PCB vplivajo na osteogenezo. TCDD ni vplival na njihovo proliferacijo, ampak na oblikovanje zgoščenih večceličnih skupkov na mestu osifikacije, ki so zasnova za prihodnjo kost (Gierthy in sod., 1994). Med diferenciacijo osteoblastov je bilo izražanje ALP, ki se primarno kaže pred začetkom mineralizacije, in osteokalcina (OCN), ki se izraža v zrelih osteoblastih, znižano v celicah, izpostavljenih TCDD, dodatno pa je bilo zmanjšano tudi odlaganje kalcija (Korkalainen in sod., 2009), kar kaže na zaviralne učinke v fazi zorenja in mineralizacije medceličnine. Podobne učinke v izražanju označevalcev osteoblastov skupaj z aktivacijo označevalcev za AhR je povzročila tudi tehnična mešanica predvsem dioksinu podobnih PCB in manj dioksinu nepodobnih PCB, tj. A1254, kar nakazuje zavirto diferenciacijo v mešanici predvsem s strani dioksinu podobnih PCB, katerih učinki prevladajo nad učinki dioksinu nepodobnih PCB (Herlin in sod., 2015). Čas izpostavitve A1254 med

procesom diferenciacije osteoblastov se ni pokazal za relevantnega (Herlin in sod., 2015). Zaradi znižanega števila večjedrnih pozitivnih celic TRAP in zmanjšane površine resorpcije kosti je TCDD domnevno vplival tudi na diferenciacijo osteoklastov v kulturi (Korkalainen in sod., 2009), vendar kljub vplivom na velikost in mehanično trdnost resorpcija kosti ni bila motena (Ilvesaro in sod., 2005). Drugih raziskav o vplivu PCB na osteoklaste nismo opazili. Prav tako v svoji raziskavi nismo zaznali vpliva PCB na število osteoklastov, vendar vpliva na njihovo aktivnost ne moremo izključiti.

Čeprav so v skupini PCB-155, kjer smo ugotovili značilno daljše stegenice kot pri živalih v kontrolni skupini, te spremembe izzvenele pri pretvorbi na telesno maso, je kljub temu treba omeniti spodbujevalne učinke dveh dioksinu nepodobnih neplanarnih kongenerjev PCB-19 (2,2',6) in PCB-52 (2,2',5,5') na diferenciacijo osteoblastov (Herlin in sod., 2015). Podobno smo tudi pri širini kosti opazili trend povečane rasti. Rezultati več meritev kažejo višje srednje vrednosti v skupini PCB-155 (aritmetične sredine in mediane) v primerjavi s kontrolno skupino in zelo majhno razpršenost podatkov (majhne odklone) v skupini, kar kaže, da PCB-155 ne zavira rasti, temveč ima nasproten vpliv kot kongener PCB-169. Spodbujanje rasti stegenic bi lahko pripisali estrogenemu delovanju PCB-155 z agonistično vezavo na ER v hondrocitih ERH in osteoblastih, kar je v skladu s predhodnimi raziskavami (Geyer in sod., 2000; Cooke in sod., 2001; Longo in sod., 2004; Dempster, 2008). Ker se ER pri podgani izraža v hondrocitih in osteoblastih že pred začetkom pubertete, bi lahko PCB-155 že v zgodnjem postnatalnem razvoju estrogeno vplival na rast v dolžino (torej na ERH oz. njegove proliferativne hondrocite) direktno ali prek spodbujanja osi GH-IGF-1 (Borjesson in sod., 2013) ter v širino direktno prek spodbujanja osteoblastogeneze in zaviranja apoptoze zrelih osteoblastov v periostu (Shim, 2015). Ker nismo ugotovili sprememb na endostalni strani kosti in v številu osteoklastov, bi to lahko dodatno potrjevalo, da PCB-155 nimajo estrogenega vpliva na osteoklaste (Shim, 2015). Slabo/mejno zaznani vplivi v tej starosti (22. PND) bi lahko bili posledica nizkih uporabljenih odmerkov PCB-155, predpubertetnega obdobja mladičev (Borjesson in sod., 2013) ali šibke vezave PCB-155 na ER in s tem nizke učinkovitosti (Cooke in sod., 2001). Da nismo zaznali estrogenih učinkov PCB-155 pri devet dni starih mladičih, bi lahko pripisali starosti mladičev (zgodnje postnatalno obdobje, sekundarno osifikacijsko središče v epifizah stegenice se šele oblikuje). Redke raziskave o vplivih dioksinu nepodobnih PCB pri mladičih so poročale o (i) estrogenih in antiestrogenih učinkih PCB-153 na dolge kosti mladičev koz, starih devet mesecev (Lundberg in sod., 2006) (čeprav so avtorji v naslednjem članku te kontradiktorne rezultate pojasnili z onesnaženjem njihovega PCB-153 z dioksinom (Gutleb in sod., 2010)), in (ii) spolno različnih

učinkih PCB-153 na kosti (krajša dolžina, zmanjšana mozgovna votlina) plodov ovac tik pred jagnjivitvijo (Gutleb in sod., 2010).

Pri mladičih, izpostavljenih kombinaciji PCB-155 + PCB-169, smo skoraj pri vseh geometrijskih parametrih opazili nižje srednje vrednosti kot pri živalih v kontrolni skupini in skupini PCB-155, vendar pa te razlike zaradi prevelike razpršenosti podatkov v skupini PCB-155 + PCB-169 niso dosegle meje 95-odstotnega intervala zaupanja. Ker naj spol živali med 20. in 40. PND še ne bi vplival na različno pridobivanje telesne mase (Gabriel in sod., 1992) in dnevne priraste rasti distalnega rastnega hrustanca koželjnice (Hansson in sod., 1972), opažene razlike v rasti stegenice v dolžino in širino kažejo vpliv uporabljenih kongenerjev.

5.3 Vpliv PCB na mineralizacijo stegenice podgan

Pri ugotavljanju vplivov PCB na mineralizacijo predpubertetne stegenice podgan smo se osredotočili na aktivnost osteoblastov (posredno prek aktivnosti sALP), mineralno sestavo anorganskega dela kosti in gostoto kortikalne kostnine. Ker so bile v več raziskavah vrednosti sALP povišane na račun hepatotoksičnosti in ne zaradi povečane aktivnosti osteoblastov (Jämsä in sod., 2001; Yilmaz in sod., 2006; Kutlu in sod., 2007; Pereira in Rao, 2007), smo določili tudi aktivnost jetrnih encimov.

Od serumskih kazalnikov kostne premene smo v svojem poskusu znižano aktivnost sALP in znižano vrednost s-PO₄ opazili samo pri starejših, 22 dni starih, mladičih v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino in skupino PCB-155. Analize pepela v vseh štirih skupinah pa so po pričakovanjih pokazale nižjo koncentracijo anorganske snovi v stegenicah v primerjavi z odraslimi podganami (Prabhakara Reddy in Lakshmana, 2003), kar potrjuje nedokončano mineralizacijo ter s tem bolj elastične in manj trdne dolge kosti v mladostnem obdobju. Nizka vsebnost anorganskih snovi (čeprav zaradi prevelike razpršenosti podatkov v kontrolni skupini ni kazala statističnih razlik) in kalcija v kosteh v povezavi s serumskimi kazalniki kažejo zmanjšano/zakasnelo mineralizacijo stegenic v skupini PCB-169 v primerjavi s kontrolno skupino (predvsem pa s skupino PCB-155) (Brankovič in sod., 2016). Vrednosti mase pepela, preračunane na dolžino stegenice, so bile primerljive z absolutnimi vrednostmi mase pepela. Novejša raziskava na splošni populaciji ljudi je pokazala pomembno povezavo med serumsko koncentracijo PCB in

krvnimi parametri, vključno z znižano aktivnostjo sALP in koncentracijo fosfata (Serdar in sod., 2014). Pri ovirani oz. zakasneli mineralizaciji sta proizvodnja in izločanje kostne ALP iz osteoblastov znižani ali nespremenjeni (Hermsen in sod., 2008; Nishimura in sod., 2009), medtem ko so povišane vrednosti nespecifične sALP povezane predvsem s TCDD/PCB medirano hepatotoksičnostjo in ne s povišano aktivnostjo osteoblastov. V zadnjem primeru so poleg sALP povišane tudi serumske koncentracije jetrnih encimov ALT in AST, kar nakazuje poškodbe hepatocitov (Jämsä in sod., 2001; Yilmaz in sod., 2006; Kutlu in sod., 2007). Pri podganah, izpostavljenih višjim odmerkom TCDD, so poročali o zmanjšani masi celotnega pepela kosti zaradi zmanjšane rasti oz. krajših kosti in ne zaradi sprememb v mineralizaciji (Jämsä in sod., 2001). Vsakodnevna i. p. izpostavitve odraslih samcev seva Wistar dioksinu podobni mešanici A1254 v 30-dnevem obdobju je povzročila znižano aktivnost kostne ALP in zvišano aktivnost TRAP v stegenici, kar kaže na zaviranje aktivnosti osteoblastov in aktivacijo osteoklastov, domnevno s strani reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), nastalih pri oksidativnem stresu (Ramajayam in sod., 2007). Podobno je enkratna i. p. izpostavitve samcev podgan TCDD porušila ravnovesje med delovanjem osteoblastov in osteoklastov, kar se je pokazalo z izgubo in hkrati povišano gostoto kostnine, s tem pa povečano zrelostjo kosti (Lind in sod., 2009). TCDD je zaviralno učinkoval na mineralizacijo osteoida v fazi zorenja in mineralizacije medceličnine (i) pri mišjih mladičih, izpostavljenih prek mleka tako, da je povečal tvorjenje vitamina D (ki vpliva na mineralizacijo osteoida prek absorpcije kalcija) in zmanjšal aktivnost osteoblastov, kar je vodilo v povišane količine osteoida (Nishimura in sod., 2009), in (ii) med diferenciacijo osteoblastov iz mezenhimskih matičnih celic *in vitro*, kot že omenjeno, pri apozicijski rasti kosti, z zmanjšanjem odlaganja kalcija ter znižanjem ekspresije ALP in OCN v različnih fazah tvorbe kostnine (Korkalainen in sod., 2009). Prav tako je PCB-126 pri podganah prizadel proces mineralizacije ter s tem sestavo in trdnost kosti, kar je opazno iz povečane količine organske komponente in površine osteoida v golenici (Lind in sod., 1999).

Znižane koncentracije serumskega fosforja so pri sedem, 14 in 21 dni starih miših, laktacijsko izpostavljenih TCDD, povezovali tudi s povečanim izločanjem kalcija in fosforja z urinom zaradi funkcionalnih poškodb ledvic in nepopolne reabsorpcije mineralov (Nishimura in sod., 2009). Podgane, ki so intrauterino prejele enkratni odmerek TCDD, so imele zmanjšano mineralno gostoto kosti pri 35. in 70. PND (Finnilä in sod., 2010), medtem ko pri dvomesečnih samcih podgan enkratni odmerek TCDD ni vplival na mineralizacijo golenice, spremenil pa je kemično sestavo (fosfatne komponente) kosti na molekularni ravni (Lind in sod., 2009).

Mineralna gostota (BMD) kortikalne ali trabekularne kostnine se v zadnjem času največkrat določa s pomočjo periferne kvantitativne računalniške tomografije (pQCT). V svoji raziskavi gostote kortikalne kostnine zaradi tehničnih zmožnosti aparata μ CT nismo mogli odčitati neposredno, temveč smo jo naknadno odčitali s slik CT (prečni presek sredine diafize) 22 dni starih mladičev. Z meritvami nismo ugotovili statistično značilnih razlik med poskusnimi skupinami, opazili pa smo trend nižje gostote v skupini PCB-169 in višje gostote v skupini PCB-155 v primerjavi z drugimi skupinami, kar se sklada z drugimi meritvami mineralizacije in rasti stegenic naše raziskave. Drugi raziskovalci so razlike v gostoti kortikalne kostnine zaznali samo pri mladičih, starih 35 dni, pri odraslih pa ne več. Mineralna gostota kortikalne kostnine je bila znižana samo pri najvišjem odmerku TCDD pri najobčutljivejši liniji podgan pri intrauterini izpostavitvi (pri izpostavitvi samo prek mleka niso zaznali razlik), vendar pa so se vrednosti najpozneje, ko so bile te podgane stare leto dni, vrstile na raven kontrolne skupine (Miettinen in sod., 2005). Prav tako raziskovalci pri živalih, izpostavljenih TCDD ali PCB-126, v odrasli dobi niso zaznali razlik v BMD kortikalne kostnine na dolgih kosteh okončin (Lind in sod., 1999; Lind in sod., 2000b; Jämsä in sod., 2001), poročali pa so o povečani gostoti trabekularne kostnine (in ne kortikalne) v ledvenem vretencu po trimesečni izpostavitvi odraslih podgan PCB-126 (Alvarez-Lloret in sod., 2009).

Pri jetrnih encimih v svoji raziskavi nismo opazili povišanih vrednosti v poskusnih skupinah, zato znižane vrednosti sALP pripisujemo vplivu planarnega PCB-169, individualno ali v kombinaciji s PCB-155, ki je zaviralno vplival na aktivnost osteoblastov in poleg rasti učinkoval tudi na mineralizacijo kosti, hkrati pa bi lahko posredno vplival tudi na izločanje oz. reabsorpcijo anorganskega fosfata v ledvicah (Brankovič in sod., 2016). Podobno kot pri dolžini stegenic smo pri vsebnosti pepela in kalcija v kosti najvišje vrednosti opazili v skupini PCB-155, kar dodatno nakazuje njegov že prej predlagani spodbujevalni, tj. estrogeni, učinek. Domnevamo, da je vpliv PCB-169, individualno ali v kombinaciji s PCB-155, na mineralizacijo stegenic minimalen zaradi starosti proučevanih živali in kratkega obdobja od izpostavitve do merjenja učinkov. Edino sALP, ki pokaže trenutne procese v kosteh, je nakazala znižano aktivnost osteoblastov, zato sklepamo, da bi spremembe, nakazane pri 22 dni starih mladičih, postale značilne pozneje pri starejših živalih. Ledvice so eden glavnih tarčnih organov za organske spojine, kot so PCB, dioksini in furani, ki povzročajo poškodbe (večjo prepustnost) predvsem v proksimalnih ledvičnih cevkah (Horvat in sod., 2015), zato bi bilo v nadaljnjih raziskavah vplivov PCB smiselno spremljati tudi funkcijo ledvic.

5.4 Vpliv PCB na trdnost kosti 22 dni starih živali

Zaradi svoje funkcije so kosti okončin v glavnem zelo dolge (v primerjavi s širino) in cevaste, vendar morajo prenesti obremenitve telesne teže in gibalne impulze, zato je njihov mehanski odziv zelo pomemben, meritve biomehanike, ki to ugotavljajo, pa so klinično zelo uporabne diagnostične metode. V svojem poskusu smo z meritvami različnih intrinzičnih in ekstrinzičnih parametrov biomehanike ugotavljali trdnost stegnenice (njene kortikalne kostnine) na sredini diafize. Ker na biomehaniko kosti vplivajo lastnosti materialov, njena geometrija in arhitektura, je treba rezultate teh meritev vedno razlagati skupaj z drugimi parametri. Pri meritvah biomehanike smo imeli težave z lomljenjem stegnenic. V vsaki poskusni skupini smo imeli nekaj stegnenic, ki so se plastično upognile brez meritveno zaznavne in makroskopsko vidne razpoke. Izkazalo se je, da elastičnost kosti (in nezmožnost zloma) ni bila posledica vpliva PCB, ampak starosti živali, saj imajo 22 dni stare podgane zelo elastično upogibne in premalo mineralizirane stegnenice za ugotavljanje trdnosti s pomočjo tritočkovnega upogibnega testa (Brankovič in sod., 2016). Pri devet dni starih mladičih takega testa ne bi bilo mogoče izvesti zaradi prekratkih kosti (prekratka medsebojna razdalja med nosilcema kosti in giljotino) in premalo mineraliziranih (preveč elastičnih) kosti. Verjetno zato v literaturi nismo uspeli najti podatkov o trdnosti stegnenic živali, mlajših od 35 dni.

Biomehانيčni parametri zlomljenih stegnenic 22 dni starih mladičev, pridobljenih s tritočkovnim preizkusom, se med poskusnimi skupinami niso razlikovali, kar ni presenetljivo glede na to, da nismo opazili večjih sprememb pri lastnosti materiala oz. mineralizaciji stegnenic (Brankovič in sod., 2016). Nižji CSMI in trend višjih vrednosti elastičnega modula materiala v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 nakazujeta večjo togost stegnenic, kar ni v skladu s podatki o rasti in mineralizaciji stegnenic. Močno razpršeni podatki in nezlomljene kosti v poskusnih skupinah prav tako kažejo nekonsistentnost meritev. Kortikalna kostnina na mestu zloma bi morala predstavljati vsaj 33-odstotkov celotne površine prečnega preseka kosti, da bi imeli vrednosti Youngovega modula znotraj 95-odstotnega intervala zaupanja (v naši raziskavi se je delež gibal okrog 25 odstotkov) (Beaupied in sod., 2007). Zaradi navedenega predvidevamo, da so bile v našem poskusu tudi stegnenice 22 dni starih podgan premalo mineralizirane za meritve trdnosti s tritočkovnim preizkusom (Brankovič in sod., 2016). Novejša raziskava je pokazala, da je povečana krhkost kosti povezana z zmanjšanjem kristalizacije hidroksiapatita in vsebnosti kolagena, povišano razmerje med mineralno in kolageno komponento v kosti pa je dodatno povezano tudi

s povečano napetostjo in elastičnim modulom (Bi in sod., 2016). Kljub našim sklepom in novim dognanjem v drugih raziskavah niso ugotovili sprememb v biomehaniki kosti pri izpostavljenih mladičih (Lundberg in sod., 2006; Lind in sod., 2009) ali pa so razlike v navoru zloma (ekstrinzični parameter) pripisali predvsem različnim širinam kosti (vpliv PCB-126) in manj razlikam v trdnosti (Lind in sod., 2000b). Pri intrauterini in laktacijski izpostavitvi PCB-153 in PCB-126 nista povzročila sprememb v trdnosti in mineralni sestavi diafize kračnic mladičev koz (Lundberg in sod., 2006), podobno tudi kratka izpostavitve TCDD pri samcih podgan ni povzročila sprememb v biomehaniki (Lind in sod., 2009). Nižjo upogibno trdnost in končno silo zloma golenice so ugotovili pri 35 in 70 dni starih podganah (intrauterina izpostavitve enkratnemu odmerku TCDD) (Finnilä in sod., 2010) ter pri golenici in stegenici (ne pa na stegneničnem vratu in vretencih) odraslih samic L-E pri kronični izpostavitvi TCDD (Herlin in sod., 2010). Vplivi TCDD na trdnost stegenic so izzveneli najpozneje, ko so bile živali stare leto dni (Miettinen in sod., 2005). Zaradi razlik med odzivnostjo različnih (delov) kosti istih živali znanstveniki v študijah predlagajo uporabo dolgih kosti (predvsem diafize), saj naj bi bile te najprimernejše za oceno učinkov toksičnosti prek AhR (Herlin in sod., 2010).

5.5 Vpliv kombinacije PCB-155 in PCB-169 na rast in mineralizacijo stegenic

Ker danes v okolju še vedno lahko najdemo PCB v mešanicah, obenem pa literatura pri poskusih vplivov individualnih kongenerjev PCB na laboratorijske živali omenja podcenjenost njihovega medsebojnega vpliva (Arnold in sod., 1996), smo v svoji raziskavi proučili tudi vpliv obeh kongenerjev v kombinaciji. Glede na svoje preliminarne raziskave smo predvidevali zmanjšan vpliv PCB-169 na razvoj stegenic v kombinaciji s PCB-155. Pri več parametrih rasti in mineralizacije stegenic smo dejansko opazili, da je bil vpliv kombinacije PCB-155 in PCB-169 podoben vplivu individualno uporabljenega PCB-169, toda manj izrazit (Brankovič in sod., 2016). V nekaj primerih je bil vpliv kombinacije primerljiv z vplivom PCB-169, uporabljenega individualno, pri večini parametrov pa je bil nakazan trend sicer podoben vplivu kongenerja PCB-169, vendar se razlike pri $P < 0,05$ niso pokazale kot značilne. Kljub nižjim srednjim vrednostim skupine PCB-155 + PCB-169 v primerjavi s tistimi v kontrolni skupini so bili podatki v kombinirani skupini pri skoraj vseh parametrih preveč razpršeni za ugotovitev značilnih razlik, česar nismo opazili v drugih dveh poskusnih skupinah z individualnimi vnosi.

Na podlagi pridobljenih rezultatov predvidevamo interakcijo med kongenerjema PCB-169 in PCB-155 pri učinkovanju na kosti. Do razlik med vplivi kombinirane izpostavitve in individualnima vnosoma kongenerjev bi lahko prišlo zaradi že omenjene možnosti retencije PCB-169 v prisotnosti dioksinu nepodobnega PCB-155 v jetrih mater in mladičev in zaradi različnega delovanja naših dveh kongenerjev PCB. Podobne raziskave o farmakokinetičnih interakcijah med TCDD/dioksinu podobnim PCB-126 in dioksinu nepodobnim PCB-153 v jetrih poročajo, da je do medsebojnih interakcij v kombinaciji prišlo samo pri najvišjih uporabljenih odmerkih (van Birgelen in sod., 1996b; van Birgelen in sod., 1996c; Lee in sod., 2002; Chubb in sod., 2004). Taka opažanja in vrednosti koncentracije kongenerjev PCB, ki smo jih izmerili v serumu 22 dni starih mladičev in so pokazale približno 1,7-krat nižje serumske koncentracije PCB-169 v kombinirani izpostavitvi s PCB-155 v primerjavi z individualnim vnosom (Grošelj in sod., 2014), nakazujejo že predhodno omenjeno povečano kopičenje PCB-169 v jetrih zaradi vpliva PCB-155, kar bi lahko prispevalo k manj izrazitim učinkom na kosteh, opaženih v skupini kombinirane izpostavitve (Brankovič in sod., 2016). Ker PCB-169 deluje antiestrogeno, PCB-155 pa, nasprotno, nakazuje estrogene učinke, bi ta različnost delovanja lahko dodatno prispevala k vplivu kombinirane izpostavitve PCB na kosti, tako da bi bile spremembe v rasti in mineralizaciji manjše, toda podobnejše spremembam skupine PCB-169.

6 SKLEPI

- Laktacijska izpostavljenost planarnemu heksaklorobifenilu PCB-169 vpliva zaviralno na biokemične (mineralizacijske), morfometrične, geometrične in biomehanične kazalnike razvoja stegnenice pri podganjih mladičih, medtem ko izpostavljenost neplanarnemu heksaklorobifenilu PCB nima značilnega vpliva na prej naštete kazalnike razvoja stegnenice pri podganjih mladičih, vendar pa se je nekajkrat nakazal njegov spodbujevalni vpliv. Zato lahko hipotezo 1 delno potrdimo (potrdimo v primeru kongenerja PCB-169) in delno ovržemo (ovržemo v primeru kongenerja PCB-155).
- Planarni PCB-169 ima večji vpliv kot neplanarni PCB-155 na omenjene kazalnike razvoja stegnenice. Zato lahko hipotezo 2 potrdimo.
- Sočasna izpostavitve kongenerjema PCB-169 in PCB-155 prek materinega mleka vodi do zmanjšane vpliva PCB-169 na morfometrične, geometrične in biomehanične parametre ter mineralizacijo stegnenic pri podganjih mladičih, saj je vpliv kombinacije teh podoben vplivu PCB-169, toda manj izrazit. Zato lahko hipotezo 3 potrdimo.

7 POVZETEK

PCB so sintetične organoklorove spojine iz skupine cikličnih ogljikovodikov, ki so zelo obstojni onesnaževalci okolja. V Sloveniji je v Beli krajini leta 1983 prišlo do močnega onesnaženja s PCB. Njihova uporaba je od 80. let prejšnjega stoletja sicer prepovedana, vendar so ti zaradi slabe razgradljivosti še vedno prisotni v okolju. Tudi v Sloveniji njihovo raven spremljamo z rednimi biomonitoringi. Ker so PCB lipofilni, se nabirajo v tkivih, bogatih z maščobo, in se biomagnificirajo po prehranjevalni verigi, s tem pa vplivajo na človeka in živali. Najbolj toksični so tisti dioksinu podobni planarni kongenerji PCB, katerih način delovanja je podoben dioksinu. PCB v nosečnosti delno prehajajo skozi posteljico, iz maščobe se lahko ponovno mobilizirajo med dojenjem in prehajajo v otroka, kar je glavni prenos PCB z matere na potomce.

Namen naše raziskave je bil proučiti vpliv dioksinu podobnega PCB-169 in dioksinu nepodobnega PCB-155 individualno in v kombinaciji na razvoj stegnenic predpubertetnih sesnih podgan Wistar, izpostavljenih PCB samo prek materinega mleka. Planarni PCB-169 (3,3',4,4',5,5') in neplanarni PCB-155 (2,2',4,4',6,6') sta heksaklorobifenila. Dioksinu podoben PCB-169 (TEF 0,03) je bolj lipofil in presnovno obstojnejši kot dioksinu nepodoben PCB-155, ker kaže antiestrogensko aktivnost in domnevno deluje prek vezave na AhR. PCB-155 je po zgradbi podoben E₂, ima nizko afiniteto za AhR in nizko akutno toksičnost. Njemu najbolj podoben PCB-153 ima dokazano estrogensko aktivnost. V študijo smo vključili petnajst samic podgan Wistar, ki so bile razdeljene v eno od štirih poskusnih skupin (PCB-169, PCB-155, PCB-155 + PCB-169 in kontrolno skupino). Intraperitonealno smo jim v različnih časovnih razmikih po skotitvi vnesli kongenerja PCB, raztopljen v olivnem olju. V celoti je prva skupina prejela 3 mg PCB-169/kg tm, druga 12 mg PCB-155/kg tm ter tretja 3 mg PCB-169 in 12 mg PCB-155/kg tm. Kontrolna skupina je prejela olivno olje. Testne živali so bili mladiči podgan, ki so sesali mleko pri materah in s tem prejeli PCB. Količine začetnih in vzdrževalnih odmerkov in časovni postopek aplikacij so bili izbrani tako, da je bila v celotnem obdobju izpostavljenosti dosežena primerljiva in konstantna raven obeh kongenerjev PCB ter da so bili dani odmerki za matere in sesne mladiče nižji od letalnih. Mladiče smo dnevno tehtali in žrtvovali 9. in 22. dan po skotitvi. Iz oftalmičnega venskega pleteža smo odvzeli vzorce krvi, nato pa odstranili in očistili stegnenice za nadaljnje raziskave. V vzorcih krvi smo določili koncentracijo PCB, sCa, s-PO₄, aktivnosti sALP in jetrnih encimov. Morfometrične meritve stegnenic devet in 22 dni starih živali smo opravili na

histoloških rezinah, obarvanih s HE in TM, na katerih smo izmerili ERH in njegove cone proliferacije, hipertrofije in kalcifikacije. Z encimsko histokemijo smo ugotavljali aktivnost TRAP za stereometrično oceno scelne kostnine, osteoklastov in osteoblastov. Na stegenicah 22 dni starih živali smo opravili analize geometrije in trdnosti kosti. Geometrijo stegenic smo izmerili z aparatom mikro CT, trdnost pa preverili s tritočkovnim upogibnim preizkusom na univerzalnem stroju Instron 4301. Nazadnje smo pri stegenicah devet in 22 dni starih mladičev z masnim spektrometrom ICP določili maso pepela ter biokemično vsebnost kalcija in fosforja v anorganski snovi. Rezultate smo statistično obdelali s programom SPSS z uporabo enosmernega statističnega testa analize variance (ANOVA) ali neparametričnega Kruskal-Wallis testa.

Ugotovili smo povišano relativno maso jeter v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 pri obeh starostih brez povišanih vrednosti jetrnih encimov. Nižja telesna masa v skupinah PCB-169 in PCB-155 + PCB-169 je bila posledica spremenjenega vzorca in zmanjšane dnevnega telesnega prirasta mladičev. Dolžina stegenice ni bila prizadeta pri devet dni starih mladičih, pri 22 dni starih pa je bila krajša pri izpostavitvi PCB-169. Geometrija prečnega preseka stegenic 22 dni starih mladičev je bila zmanjšana v skupini PCB-169 (predvsem individualna aplikacija, manj v kombinaciji) zaradi manjše širine in površine preseka kosti (zmanjšana mozgovna votlina), medtem ko površina in debelina kortikalne kostnine nista bili spremenjeni. Pri mladičih, izpostavljenih kombinaciji PCB-155 + PCB-169, smo pri večini geometrijskih parametrov rasti v širino opazili nižje srednje vrednosti, vendar so bili podatki v skupini preveč razpršeni. V ERH je bila prizadeta predvsem cona proliferacije in manj cona hipertrofije s kalcifikacijo. Pri devet dni starih mladičih sta bili znižani cona proliferacije v skupini PCB-155 + PCB-169 v primerjavi z drugimi tremi skupinami in cona hipertrofije s kalcifikacijo v vseh poskusnih skupinah, medtem ko smo pri 22 dni starih mladičih lahko opazili le znižano cono proliferacije v skupini PCB-169 v primerjavi z drugimi poskusnimi skupinami. Pri biomehničnem testu smo v vsaki poskusni skupini imeli nekaj stegenic, ki so se plastično upognile brez loma, vendar je bilo to posledica starosti in ne vplivov kongenerjev PCB, zato ugotavljamo, da so do vključno 22. dneva starosti stegenice podgan premalo mineralizirane za izvedbo testa trdnosti kosti s tritočkovnim preizkusom. PCB-169 je individualno ali v kombinaciji s PCB-155 pri 22 dni starih mladičih vplival na znižanje sALP in sPO_4 in v kosti znižal količino kalcija, kar nakazuje motnje v procesu mineralizacije.

Na podlagi pridobljenih rezultatov sklepamo, da je imela laktacijska izpostavitv dioksinu podobnemu PCB-169 zaviralni učinek na telesno rast, rast stegnenic v dolžino in širino (vpliv na enhondralno in perihondralno osifikacijo) in mineralizacijo kosti. Izpostavitv PCB-169 v kombinaciji z dioksinu nepodobnemu PCB-155 je povzročila podobne, toda manj izrazite, zaviralne vplive kot individualna izpostavitv PCB-169, medtem ko je laktacijska izpostavitv PCB-155 povzročila komaj zaznavne estrogene učinke na rast in mineralizacijo stegnenic.

8 SUMMARY

PCBs are synthetic organochlorines from the cyclic hydrocarbon group of chemicals and are highly persistent environmental pollutants. In 1983, there was a major PCB contamination in Bela Krajina. Most countries have banned their use since the 1980s; however, due to their resistance to degradation, they remain in the environment. In Slovenia, their levels are being regularly biomonitoring. Due to their lipophilicity, they concentrate in fat-rich tissues and thus biomagnify through the food chain and consequently affect humans and animals. The most toxic PCBs are dioxin-like (co)planar congeners whose mechanisms of action are comparable to that of dioxin. During gestation, PCBs transfer through the placenta to some extent; afterwards they can be excreted from fat into milk during lactation and transferred to an infant which represent the major transfer from a mother to offspring.

The aim of our study was to evaluate the effects of dioxin-like PCB-169 and non-dioxin-like PCB-155 individually and in combination, on the femur development of prepubertal suckling and weaning Wistar rats, exposed to PCBs solely through mothers' milk. Planar PCB-169 (3,3',4,4',5,5') and non-planar PCB-155 (2,2',4,4',6,6') are hexachlorobiphenyls. Dioxin-like PCB-169 (TEF 0.03) is more lipophilic and metabolically stable than the non-dioxin-like PCB-155 because of its antiestrogenic activity and supposedly induced effects through the AhR. PCB-155 is structurally similar to E₂, has low AhR affinity and low acute toxicity. Its most comparable congener PCB-153 has a documented estrogenic activity. We included 15 female Wistar rats, assigned to one of the four experimental groups (PCB-169, PCB-155, PCB-155 + PCB-169, and control). We administered PCBs, diluted in olive oil, intraperitoneally at different time points after delivery. In total, Group 1 received 3 mg of PCB-169 per kg bm, Group 2 received 12 mg of PCB-155 per kg bm and Group 3 received 3 mg of PCB-169 and 12 mg of PCB-155 per kg bm. The control group was administered olive oil. The experimental animals were rat offspring that suckled mothers' milk through which they were exposed. The volume of the loading/maintenance doses and the time of the application regime were determined to attain comparable and constant levels of both PCBs throughout the complete experimental period and considering the fact that the administered doses to be less than lethal. Offspring were weighted daily and sacrificed on PND 9 or 22. Blood samples were collected from the ophtalmic plexus, and femurs dissected and cleaned for further research. Serum levels of PCB, sCa, sPO₄ and sALP activity were determined from the blood samples together with liver enzyme activity. Femur histomorphometrical

measurements of the offspring on PND 9 and 22 were performed using HE and TB stained histology resins and EGP with its proliferative, hypertrophic and calcified zones were measured. Stereometrical evaluation of trabecular bone, osteoclasts and osteoblasts were determined using an enzyme histochemistry technique measuring TRAP activity. Additionally, on the PND 22, femur geometrical and biomechanical analyses were conducted. Geometry was measured using microCT, and the strength using three-point bending test on an Instron mechanical testing machine. Finally, on PND 9 and 22, the femur ash mass and biochemical content of calcium and phosphorus in the inorganic substance were determined using ICP-MS. The results were statistically analysed via one-way ANOVA or the non-parametric Kruskal-Wallis test using SPSS Programme.

We observed increased relative liver mass in the PCB-169 and PCB-155 + PCB-169 groups in both ages without elevated liver enzymes. Offsprings' body mass in the PCB-169 and PCB-155 + PCB-169 groups were decreased because of altered increment patterns and decreased daily body mass increments. The femur length was not altered on PND 9, while on PND 22 the femurs were shorter in the PCB-169 group. On PND 22, exposure to PCB-169 reduced femur cross-sectional geometry (mostly individual exposure, less in combination) because of smaller width and cross-sectional area (reduced medullary area) while the cortical bone area and width were not altered. Offspring exposed to the combination of both congeners had lowered mean/median values in most of the geometrical parameters, reflecting width growth; however, the data in this group were too dispersed. Within EGP we mostly detected an affected proliferation zone and less hypertrophic and calcified zones. On PND 9, we detected a lower proliferation zone in the PCB-155 + PCB-169 group compared to other three groups and a lower hypertrophic zone in all the experimental groups, while on PND 22 only a lower proliferation zone in the PCB-169 group compared to all the other groups were observed. Using a three-point bending test resulted in a few femurs per each experimental group that exhibited plastic deformation without fracture, which was a consequence of the animals' age and not the PCB effect. Therefore, we conclude that rat femurs aged up to PND 22 are not mineralised enough to perform a three-point bending test as an adequate biomechanical test. PCB-169, individually or in combination with PCB-155, reduced serum ALP activity and PO_4 level together with the calcium level in bone on PND 22, which reflects disorders in the mineralisation process.

In conclusion, lactational exposure to dioxin-like PCB-169 hindered body growth, femur growth in length and width (affected endochondral and perichondral ossification), and bone

mineralisation. Exposure to PCB-169 in combination with non-dioxin-like PCB-155 induced similar but less prominent negative effects than individual PCB-169 exposure did, while lactational exposure to PCB-155 induced scarcely detectable estrogenic effects in femur growth and mineralisation.

9 ZAHVALE

Doktorski študij je delno sofinancirala Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada, za kar se zahvaljujem tudi Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo v okviru javnega razpisa Inovativne sheme. Sofinanciranje se je izvajalo v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, 1. razvojne prioritete Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti; prednostne usmeritve 1.3: Štipendijske sheme.

Sofinanciranje je bilo omogočeno tudi s strani raziskovalnega programa P4-0053 Javne agencije RS za raziskovalno dejavnost.

Pri nastajanju doktorske naloge so mi pomagali številni, še posebej se zahvaljujem:

- mentorici prof. dr. Azri Pogačnik in somentorici prof. dr. Milki Vrecl Fazarinc za večletno vodenje in mentorstvo pri pripravi doktorske naloge, strokovne nasvete in zamisli tudi v na videz brezizhodnih okoliščinah;
- članom komisije za oceno in zagovor disertacije: prof. dr. Janji Jan, prof. dr. Gregorju Majdiču in prof. dr. Gregorju Fazarincu za koristne pripombe in dopolnitve disertacije;
- dr. Nini Novak Kerbler, prof. slovenščine in uni. dipl. lit. komparativistki, za temeljit pregled besedila in neumorno jezikovno svetovanje;
- Terryju T. Jacksonu, učitelju angleščine, za lektoriranje delov naloge v angleškem jeziku;
- oddelku za biomedicinske raziskave medicinske univerze v Gradcu, še posebej dr. Birgit Reininger-Gurmannin in dr. Vladimirju Bubali za izvedbo meritev CT, angažiranost in mednarodno sodelovanje ter dr. Alexandru Hofmeistru za izvedbo meritev;
- asist. Katarini Pavšič Vrtač, univ. dipl. kem., z Inštituta za varno hrano, krmo in okolje VF za konstruktivno sodelovanje in analize ICP-MS;
- dr. Maji Antanasovi, dr. dent. med., prof. dr. Petru Jevnikarju in prof. dr. Janji Jan za izvedbo biomehaničnih testov na Institutu Jožef Stefan;
- sodelavki Jasni Šporar, vet. tehn. z dolgoletnimi izkušnjami in znanjem, za pripravo težavnih histoloških preparatov stegnenic;
- mag. Mateji Stvarnik, dr. vet. med., vodji Centra za podiplomski študij, za njeno angažiranost in energijo ter uspešno prebroditev administrativnih postopkov pri pridobivanju naziva doktorica znanosti;

- mag. Brigiti Greccs-Smole, dr. vet. med., za skrben pregled navedene literature ter
- našima računalničarjema Alešu Budkoviču, univ. dipl. org. inf., in Jerneju Alifu, dr. vet. med., za preprečitev večkratnih izbruhov panike z uspešnimi in inovativnimi računalniškimi rešitvami in za namestitev programa povezave med računalniki – ene najuporabnejših stvari.

Poleg tega bi se iz srca rada zahvalila:

- dolgoletni prijateljici in moji statistični gurujki dr. Ireni Bertonec za neprecenljive raziskovalne, statistične in življenjske nasvete ter njeno levo in desno ramo;
- preostalim sodelavcem nekdanjega Inštituta za anatomijo, histologijo in embriologijo (zdaj del Inštituta za predklinične vede) za pregled končnega besedila, pomirjujoče in spodbudne besede, dobro voljo, zamisli, poslušanje in nalezljiv smeh v času, ko sem bila tega najbolj potrebna (hvala vam: »cimer« doc. dr. Matjaž Uršič, dr. Marko Cotman, doc. dr. Valentina Kubale Dvojmoč, prof. dr. Jelka Zabavnik Piano, Magdalena Dobravec in Brane Travnikar!!!);
- asist. dr. Maji Grošelj, kolegici stomatologinji, brez katere zadnjih sedem let ne bi bilo tako zanimivih in PCB-razmišljujočih;
- sodelavki doc. dr. Marini Štukelj za prebijanje ledu in kamenja pri pisanju disertacije, za spodbude in poslušanje v zadnjih intenzivnih letih;
- dr. Jasmini Kerčmar, kolegici veterinariki, za olajšanje vstopa v raziskovalne vode in marsikateri dober nasvet ter
- še posebej svoji najožji družini za podporo, ljubezen in razumevanje.

10 LITERATURA

- Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, et al. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* 1994; 28: 1049–67.
- Ahlborg UG, Brouwer A, Fingerhut MA, et al. Impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls on human and environmental health, with special emphasis on application of the toxic equivalency factor concept. *Eur J Pharmacol* 1992; 228: 179–99.
- Alaluusua S, Lukinmaa PL, Pohjanvirta R, Unkila M, Tuomisto J. Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin leads to defective dentin formation and pulpal perforation in rat incisor tooth. *Toxicology* 1993; 81: 1–13.
- Allen MJ. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet Clin Pathol* 2003; 32: 101–13.
- Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* 2004; 35: 1003–12.
- Alvarez J, Sohn P, Zeng X, Doetschman T, Robbins DJ, Serra R. TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development* 2002; 129: 1913–24.
- Alvarez-Lloret P, Lind PM, Nyberg I, Orberg J, Rodriguez-Navarro AB. Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxine and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 2009; 187: 63–8.
- Andrews JE. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) induced changes in femur morphometry calcium metabolism and nephrotoxicity. *Toxicology* 1989; 57: 83–96.
- Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, GuillelteLJ, McLachlan JA. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 1996; 272: 1489–92.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2000 (Online). <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp17.pdf> (20. jan. 2016)
- Basso N, Jia Y, Bellows CG, Heersche JN. The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: studies in hind limb unloaded rats. *Bone* 2005; 37: 370–8.
- Beaupied H, Dupuis A, Arlettaz A, et al. The mode of bone conservation does not affect the architecture and the tensile properties of rat femurs. *Biomed Mater Eng* 2006; 16: 253–9.
- Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou CL. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 233–9.
- Bi X, Grafe I, Ding H, et al. Correlations between bone mechanical properties and bone composition parameters in mouse models of dominant and recessive osteogenesis imperfecta and the response to anti-TGF-beta treatment. *J Bone Miner Res* 2017; 32: 347–59.
- Bonfanti P, Colombo A, Villa S, Comelli F, Costa B, Santagostino A. The effects of accumulation of an environmentally relevant polychlorinated biphenyl mixture on

cytochrome P450 and P-glycoprotein expressions in fetuses and pregnant rats. *Chemosphere* 2009; 75: 572–9.

Bonfanti P, Comelli F, Assi L, et al. Responsiveness of hepatic and cerebral cytochrome P450 in rat offspring prenatally and lactationally exposed to a reconstituted PCB mixture. *Environ Toxicol* 2014; 29: 856–66.

Borjesson AE, Lagerquist MK, Windahl SH, Ohlsson C. The role of estrogen receptor alpha in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 4023–37.

Bowers WJ, Nakai JS, Chu I, et al. Early developmental neurotoxicity of a PCB/organochlorine mixture in rodents after gestational and lactational exposure. *Toxicol Sci* 2004; 77: 51–62.

Brankovič J, Jovanovski S, Jevnikar P. Alterations in geometry, biomechanics, and mineral composition of juvenile rat femur induced by nonplanar PCB-155 and/or planar PCB-169. *Environ Toxicol* 2017; 32: 1135–46.

Brunnberg S, Swedenborg E, Gustafsson J. Functional interactions of AHR with other receptors. In: Pohjanvirta R, eds. *The AH receptor in biology and toxicology*. New Jersey: Wiley, 2012: 127–41.

Bustnes JO, Hanssen SA, Folstad I, Erikstad KE, Hasselquist D, Skaare JU. Immune function and organochlorine pollutants in Arctic breeding glaucous gulls. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004; 47: 530–41.

Carpenter DO. Exposure to and health effects of volatile PCBs. *Rev Environ Health* 2015; 30: 81–92.

Carpi D, Korkalainen M, Airola L, et al. Dioxin-sensitive proteins in differentiating osteoblasts: effects on bone formation in vitro. *Toxicol Sci* 2009; 108: 330–43.

Cedervall T, Lind PM, Savendahl L. Expression of the aryl hydrocarbon receptor in growth plate cartilage and the impact of its local modulation on longitudinal bone growth. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 8059–69.

Chen PH, Chang KT, Lu YD. Polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the toxic rice-bran oil that caused PCB poisoning in Taichung. *Bull Environ Contam Toxicol* 1981; 26: 489–95.

Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997; 30: 573–93.

Chu I, Bowers WJ, Caldwell D, et al. Toxicological effects of in utero and lactational exposure of rats to a mixture of environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations. *J Toxicol Environ Health A* 2008; 71: 93–108.

Chu I, Lecavalier P, Hakansson H, et al. Mixture effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chemosphere* 2001; 43: 807–14.

Chubb LS, Andersen ME, Broccardo CJ, et al. Regional induction of CYP1A1 in rat liver following treatment with mixtures of PCB 126 and PCB 153. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 467–73.

Cocchi D, Tulipano G, Colciago A, et al. Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat: Part 1: effects on somatic growth, growth hormone-axis activity and bone mass in the offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 237: 127–36.

- Cook MJ. The anatomy of the laboratory mouse. London, New York: Academic Press, 1965.
<http://www.informatics.jax.org/cookbook/chapters/contents2.shtml> (28. febr. 2017)
- Cooke P, Sato T, Buchanan S. Disruption of steroid hormone signaling by PCBs. In: Robertson LW, Hansen LB, eds. PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects. Lexington: The University Press of Kentucky, 2001: 257–64.
- Crinnion WJ. Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Altern Med Rev* 2011; 16: 5–13.
- Cör A. Kostnina. In: Petrovič D, Zorc M, eds. Histologija: učbenik. Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 2012: 35–42.
- D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115–22.
- De Luca F, Baron J. Control of bone growth by fibroblast growth factors. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 61–5.
- Dempster DW. Histomorphometric analysis of bone remodeling. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin JT, eds. Principles of bone biology. 3rd ed. London: Elsevier, 2008: 447–58.
- Dickerson JW. The effect of development on the composition of a long bone of the pig, rat and fowl. *Biochem J* 1962; 82: 47–55.
- Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000; 57: 2207–14.
- Elabbas LE, Finnillä MA, Herlin M, et al. Perinatal exposure to environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations changes bone geometry and biomechanical properties in rat offspring. *J Toxicol Environ Health A* 2011a; 74: 1304–18.
- Elabbas LE, Herlin M, Finnillä MA, et al. In utero and lactational exposure to Aroclor 1254 affects bone geometry, mineral density and biomechanical properties of rat offspring. *Toxicol Lett* 2011b; 207: 82–8.
- Farčnik F, Ovsenik M, Drevenšek M, Vremec G. Osnove fiksnih ortodontskih aparatov. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani (Slovensko ortodontsko društvo), 2008: 3–4.
- Fazarinc A, Dodič-Fikfak M, Pečavar A, et al. Ocena zdravstveno ekoloških razmer na območju občin Metlika in Črnomelj v Beli Krajini v zvezi z ekološko obremenitvijo s polikloriranimi bifenili. Ljubljana: Univerzitetni zavod za zdravstveno in socialno varstvo, 1992 (Raziskovalna naloga).
- Fazarinc G, Lovšin Barle E, Štrbenc M, Uršič M. Anatomija domačih sesalcev: Osteologija in artrologija: skripta za študente veterinarstva. Ljubljana: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, 2007.
- Fazarinc G, Pogačnik A. Slikovni priročnik iz splošne histologije. Ljubljana: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1997: 28–40.
- Finnillä MA, Zioupos P, Herlin M, et al. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on bone material properties. *J Biomech* 2010; 43: 1097–103.
- Fischer LJ, Seegal RF, Ganey PE, Pessah IN, Kodavanti PR. Symposium overview: toxicity of non-coplanar PCBs. *Toxicol Sci* 1998; 41: 49–61.
- Foster WG. The reproductive toxicology of Great Lakes contaminants. *Environ Health Perspect* 1995; 103(suppl. 9): 63–9.

- Fox GA, Lundberg R, Wejheden C, et al. Health of herring gulls (*Larus argentatus*) in relation to breeding location in the early 1990s. III. Effects on the bone tissue. *J Toxicol Environ Health A* 2008; 71: 1448–56.
- Freitas FR, Capelo LP, O'Shea PJ, et al. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 294–304.
- Gabriel SM, Roncancio JR, Ruiz NS. Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 619–25.
- Gallenberg LA, Vodcnik MJ. Transfer of persistent chemicals in milk. *Drug Metab Rev* 1989; 21: 277–317.
- Geyer H, Rimkus G, Scheunert I, et al. Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In: Beek B, ed. *The Handbook of environmental chemistry*. Vol. 2. Part J. Berlin; Heidelberg: Springer, 2000.
- Gierthy JF, Silkworth JB, Tassinari M, Stein GS, Lian JB. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits differentiation of normal diploid rat osteoblasts in vitro. *J Cell Biochem* 1994; 54: 231–8.
- Giesy JP, Kannan K. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1998; 28: 511–69.
- Gilbert SF. *Developmental biology*. 8th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2006.
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 2008; 29: 535–59.
- Glynn AW, Michaelsson K, Lind PM, et al. Organochlorines and bone mineral density in Swedish men from the general population. *Osteoporos Int* 2000; 11: 1036–42.
- Grošelj M, Brankovič J, Zupančič-Kralj L, Fazarinc G, Vrecl M, Jan J. Effects of lactational exposure to non-planar PCB-155 and planar PCB-169 on body weight gain and craniofacial growth in rat offspring. *Slov Vet Res* 2014; 41: 179–88.
- Gutleb AC, Arvidsson D, Orberg J, et al. Effects on bone tissue in ewes (*Ovis aries*) and their foetuses exposed to PCB 118 and PCB 153. *Toxicol Lett* 2010; 192: 126–33.
- Haider MT, Hunter KD, Robinson SP, et al. Rapid modification of the bone microenvironment following short-term treatment with Cabozantinib in vivo. *Bone* 2015; 81: 581–92.
- Hansen L. Environmental toxicology of polychlorinated biphenyls. In: Safe S, ed. *Polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology*. Berlin: Springer, 1987.
- Hansson LI, Menander-Sellman K, Stenstrom A, Thorngren KG. Rate of normal longitudinal bone growth in the rat. *Calcif Tissue Res* 1972; 10: 238–51.
- Henderson RG. The position of the nutrient foramen in the growing tibia and femur of the rat. *J Anat* 1978; 125: 593–9.
- Herlin M, Finnila MA, Zioupos P, et al. New insights to the role of aryl hydrocarbon receptor in bone phenotype and in dioxin-induced modulation of bone microarchitecture and material properties. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 273: 219–26.
- Herlin M, Kalantari F, Stern N, et al. Quantitative characterization of changes in bone geometry, mineral density and biomechanical properties in two rat strains with

- different Ah-receptor structures after long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 2010; 273: 1–11.
- Herlin M, Öberg M, Ringblom J, et al. Inhibitory effects on osteoblast differentiation in vitro by the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 are mainly associated with the dioxin-like constituents. *Toxicol In Vitro* 2015; 29: 876–83.
- Hermesen SA, Larsson S, Arima A, et al. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects bone tissue in rhesus monkeys. *Toxicology* 2008; 253: 147–52.
- Higuchi K. PCB poisoning and pollution. Tokyo: Kodansha & Academic Press, 1976.
- Hinoi E, Bialek P, Chen YT, et al. Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. *Genes Dev* 2006; 20: 2937–42.
- Hodgson S, Thomas L, Fattore E, et al. Bone mineral density changes in relation to environmental PCB exposure. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 1162–6.
- Hoffman DJ, Melancon MJ, Klein PN, et al. Developmental toxicity of PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *Fundam Appl Toxicol* 1996; 34: 188–200.
- Holliday DK, Holliday CM. The effects of the organopollutant PCB 126 on bone density in juvenile diamondback terrapins (*Malaclemys terrapin*). *Aquat Toxicol* 2012; 109: 228–33.
- Horvat M, Baskar M, Cencič-Kodba Z, et al. Monitoring kemikalij in njihovih ostankov v ljudeh za leto 2011-2014: zaključno poročilo o rezultatih kemijskih analiz. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2015.
- Hsu PC, Pan MH, Li LA, Chen CJ, Tsai SS, Guo YL. Exposure in utero to 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis-related gene expression in rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221: 68–75.
- Hsu ST, Ma CI, Hsu SK, et al. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup. *Environ Health Perspect* 1985; 59: 5–10.
- Hurst CH, Devito MJ, Setzer RW, Birnbaum LS. Acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats: association of measured tissue concentrations with developmental effects. *Toxicol Sci* 2000; 53: 411–20.
- Ilvesaro J, Pohjanvirta R, Tuomisto J, Viluksela M, Tuukkanen J. Bone resorption by aryl hydrocarbon receptor-expressing osteoclasts is not disturbed by TCDD in short-term cultures. *Life Sci* 2005; 77: 1351–66.
- Iravani M, Lagerquist M, Ohlsson C, Savendahl L. Regulation of bone growth via ligand-specific activation of estrogen receptor alpha. *J Endocrinol* 2017; 232: 403–10.
- IUPAC. Nomenclature of cyclitols: IUPAC Commission on the nomenclature of organic chemistry and IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature recommendations. *Biochem J* 1976; 153: 23–31.
- Jan J, Vrecl M, Pogačnik A, Gašperšič D, Zorko M. Distribution of organochlorine pollutants in ovine dental tissues and bone. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 21: 103–7.
- Jan J, Tratnik M. Polychlorinated biphenyls in residents around the River Krupa, Slovenia, Yugoslavia. *Bull Environ Contam Toxicol* 1988; 41: 809–14.
- Jan J, Uršič M, Vrecl M. Levels and distribution of organochlorine pollutants in primary dental tissues and bone of lamb. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 36: 1040–5.

- Jan J, Vrbič V. Polychlorinated biphenyls cause developmental enamel defects in children. *Caries Res* 2000; 34: 469–73.
- Jan J, Vrecl M, Pogačnik A, Gašperšič D. Bioconcentration of lipophilic organochlorines in ovine dentine. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 1111–6.
- Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 1998; 23: 155–61.
- Jämsä T, Viluksela M, Tuomisto JT, Tuomisto J, Tuukkanen J. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on bone in two rat strains with different aryl hydrocarbon receptor structures. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1812–20.
- Kattainen H, Tuukkanen J, Simanainen U, et al. In utero/lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure impairs molar tooth development in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 174: 216–24.
- Kaufman MH. The atlas of mouse development. San Diego: Academic Press, 1992: 495–506.
- Kauschke V, Kneffel M, Floel W, et al. Bone status of acetylcholinesterase-knockout mice. *Int Immunopharmacol* 2015; 29: 222–30.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and cell biology: an introduction to pathology. 4th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.
- Kobayashi K, Miyagawa M, Wang RS, Suda M, Sekiguchi S, Honma T. Effects of in utero exposure to 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) on somatic growth and endocrine status in rat offspring. *Congenit Anom (Kyoto)* 2008; 48: 151–7.
- Korkalainen M, Kallio E, Olkku A, et al. Dioxins interfere with differentiation of osteoblasts and osteoclasts. *Bone* 2009; 44: 1134–42.
- Kuriyama SN, Chahoud I. In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology* 2004; 202: 185–97.
- Kutlu S, Colakoglu N, Halifeoglu I, et al. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 167–72.
- Kuščer I, Kodre A. Matematika v fiziki in tehniki. Ljubljana: Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije, 1994.
- La Rocca C, Mantovani A. From environment to food: the case of PCB. *Ann Ist Super Sanita* 2006; 42: 410–6.
- Lang DH, Sharkey NA, Lionikas A, et al. Adjusting data to body size: a comparison of methods as applied to quantitative trait loci analysis of musculoskeletal phenotypes. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 748–57.
- Larsen JC. Risk assessments of polychlorinated dibenzo- p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 885–96.
- Lauby-Secretan B, Loomis D, Baan R, et al. Use of mechanistic data in the IARC evaluations of the carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and related compounds. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; 23: 2220–9.
- Lauby-Secretan B, Loomis D, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. *Lancet Oncol* 2013; 14: 287–8.

- Lee SK, Ou YC, Yang RS. Comparison of pharmacokinetic interactions and physiologically based pharmacokinetic modeling of PCB 153 and PCB 126 in nonpregnant mice, lactating mice, and suckling pups. *Toxicol Sci* 2002; 65: 26–34.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008; 58: 424–30.
- Li X, Weber LW, Rozman KK. Toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female Sprague-Dawley rats including placental and lactational transfer to fetuses and neonates. *Fundam Appl Toxicol* 1995; 27: 70–6.
- Lind PM, Bergman A, Olsson M, Orberg J. Bone mineral density in male Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*). *Ambio* 2003; 32: 385–8.
- Lind PM, Eriksen EF, Lind L, Orberg J, Sahlin L. Estrogen supplementation modulates effects of the endocrine disrupting pollutant PCB126 in rat bone and uterus: diverging effects in ovariectomized and intact animals. *Toxicology* 2004; 199: 129–36.
- Lind PM, Eriksen EF, Sahlin L, Edlund M, Orberg J. Effects of the antiestrogenic environmental pollutant 3,3',4,4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB #126) in rat bone and uterus: diverging effects in ovariectomized and intact animals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154: 236–44.
- Lind PM, Larsson S, Johansson S, et al. Bone tissue composition, dimensions and strength in female rats given an increased dietary level of vitamin A or exposed to 3,3',4, 4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) alone or in combination with vitamin C. *Toxicology* 2000a; 151: 11–23.
- Lind PM, Larsson S, Oxlund H, et al. Change of bone tissue composition and impaired bone strength in rats exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126). *Toxicology* 2000b; 150: 41–51.
- Lind PM, Wejheden C, Lundberg R, et al. Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. *Chemosphere* 2009; 75: 680–4.
- Longo M, Brama M, Marino M, et al. Interaction of estrogen receptor alpha with protein kinase C alpha and c-Src in osteoblasts during differentiation. *Bone* 2004; 34: 100–11.
- Lukinmaa PL, Sahlberg C, Leppaniemi A, et al. Arrest of rat molar tooth development by lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 173: 38–47.
- Lundberg R, Lyche J, Ropstad E, et al. Perinatal exposure to PCB 153, but not PCB 126, alters bone tissue composition in female goat offspring. *Toxicology* 2006; 228: 33–40.
- Lyche J, Larsen H, Skaare JU, et al. Effects of perinatal exposure to low doses of PCB 153 and PCB 126 on lymphocyte proliferation and hematology in goat kids. *J Toxicol Environ Health A* 2004a; 67: 889–904.
- Lyche JL, Oskam IC, Skaare JU, et al. Effects of gestational and lactational exposure to low doses of PCBs 126 and 153 on anterior pituitary and gonadal hormones and on puberty in female goats. *Reprod Toxicol* 2004b; 19: 87–95.
- Mannetje A, Coakley J, Mueller JF, Harden, F, Toms LM, Douwes J. Partitioning of persistent organic pollutants (POPs) between human serum and breast milk: a literature review. *Chemosphere* 2012; 89: 911–8.
- Matthews HB, Dedrick RL. Pharmacokinetics of PCBs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1984; 24: 85–103.

- Miettinen HM, Alaluusua S, Tuomisto J, Viluksela M. Effect of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on rat molar development: the role of exposure time. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184: 57–66.
- Miettinen HM, Pulkkinen P, Jämsä T, et al. Effects of in utero and lactational TCDD exposure on bone development in differentially sensitive rat lines. *Toxicol Sci* 2005; 85: 1003–12.
- Mills SA 3rd, Thal DI, Barney J. A summary of the 209 PCB congener nomenclature. *Chemosphere* 2007; 68: 1603–12.
- MOP. Operativni program odstranjevanja polikloriranih bifenilov in polikloriranih terfenilov za obdobje od 2009 do konca 2012. Ljubljana: Ministrstvo za okolje in prostor RS, 2009.
- Mühlebach S, Wyss PA, Bickel MH. The use of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) as an unmetabolizable lipophilic model compound. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69: 410–5.
- Naruse M, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Koyama A, Hagiwara H. 3-Methylcholanthrene, which binds to the arylhydrocarbon receptor, inhibits proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and ossification in vivo. *Endocrinology* 2002; 143: 3575–81.
- Nilsson O, Abad V, Chrysis D, Ritzen EM, Savendahl L, Baron J. Estrogen receptor-alpha and -beta are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate. *J Endocrinol* 2002; 173: 407–14.
- Nishimura N, Nishimura H, Ito T, et al. Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 236: 301–9.
- Ogura I. Half-life of each dioxin and PCB congener in the human body. *Organohalogen Compounds* 2004; 66: 3329–37.
- Ogura I, Masunaga S, Nakanishi J. Quantitative source identification of dioxin-like PCBs in Yokohama, Japan, by temperature dependence of their atmospheric concentrations. *Environ Sci Technol* 2004; 38: 3279–85.
- Ost'adalova I, Babicky A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiol Res* 2012; 61(suppl. 1): S1–7.
- Papke O. PCDD/PCDF: human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ Health Perspect* 1998; 106(suppl. 2): 723–31.
- Parkinson A, Safe S. Mammalian biologic and toxic effects of PCBs. In: Safe S, ed. *Polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology*. New York, ZDA: Springer-Verlag, 1987: 49–75.
- Patandin S, Koopman-Esseboom C, de Ridder MA, Weisglas-Kuperus N, Sauer PJ. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatr Res* 1998; 44: 538–45.
- Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone* 1994; 15: 523–32.
- Pereira C, Rao CV. Toxicity study of maternal transfer of polychlorinated biphenyls and diethyl phthalate to 21-day-old male and female weanling pups of Wistar rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007; 68: 118–25.
- Pezdiric M, Heath E, Bizjak Mali I, Bulog B. PCB accumulation and tissue distribution in cave salamander (*Proteus anguinus anguinus*, *Amphibia*, *Urodela*) in the polluted karstic hinterland of the Krupa River, Slovenia. *Chemosphere* 2011; 84: 987–93.

- Prabhakara Reddy N, Lakshmana M. Prevention of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by OST-6, a herbal preparation. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 259–64.
- Pratt CW. Postnatal changes in the shaft of the rat's femur. *J Anat* 1959; 93: 309–22.
- Ramajayam G, Sridhar M, Karthikeyan S, et al. Effects of Aroclor 1254 on femoral bone metabolism in adult male Wistar rats. *Toxicology* 2007; 241: 99–105.
- Ramos L, Hernández LM, González MJ. Variation of PCB congener levels during lactation period and relationship to their molecular structure. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997; 33: 97–103.
- Rickard DJ, Hofbauer LC, Bonde SK, Gori F, Spelsberg TC, Riggs BL. Bone morphogenetic protein-6 production in human osteoblastic cell lines. Selective regulation by estrogen. *J Clin Invest* 1998; 101: 413–22.
- Rosol TJ, Capen CC. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In: Kaneko JJ, Harvey JJ, Bruss ML, eds. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. London: Academic Press, 1997: 619–673.
- Ross MK, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: a text and atlas*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 1990; 21: 51–88.
- Safe S. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ Health Perspect* 1992; 100: 259–68.
- Safe S, Bandiera S, Sawyer T, et al. PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* 1985; 60: 47–56.
- Safe SH. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1994; 24: 87–149.
- Sami W. OrthoTips: Bone structure and function. (online) 2015: <http://orthotips.com/10-bone-structure-function> (1. mar. 2017).
- Sanchez CP. Growth-plate cartilage in chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 643–9.
- Sanchez CP, He YZ. Bone growth during rapamycin therapy in young rats. *BMC Pediatr* 2009; 9: e3 (13p) <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2431-9-3> (febr. 2017).
- Schettgen T, Gube M, Esser A, Alt A, Kraus T. Plasma polychlorinated biphenyls (PCB) levels of workers in a transformer recycling company, their family members, and employees of surrounding companies. *J Toxicol Environ Health A* 2012; 75: 414–22.
- Selgrade MK. Immunotoxicity: the risk is real. *Toxicol Sci* 2007; 100: 328–32.
- Serdar B, Leblanc WG, Norris JM, Dickinson LM. Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: a cross-sectional assessment of the NHANES 2003-2004 data. *Environ Health* 2014; 13: e114 (12p) <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-13-114> (febr. 2017).

- Serrat MA, Reno PL, McCollum MA, Meindl RS, Lovejoy CO. Variation in mammalian proximal femoral development: comparative analysis of two distinct ossification patterns. *J Anat* 2007; 210: 249–58.
- Sharir A, Barak MM, Shahar R. Whole bone mechanics and mechanical testing. *Vet J* 2008; 177: 8–17.
- Shim KS. Pubertal growth and epiphyseal fusion. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 20: 8–12.
- Sholts SB, Esteban J, Herlin M, Viluksela M, Hakansson H. Craniofacial form is altered by chronic adult exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in Han/Wistar and Long-Evans rats with different aryl hydrocarbon receptor (AhR) structures. *Toxicol Rep* 2015a; 2: 472–81.
- Sholts SB, Korkalainen M, Simanainen U, Miettinen HM, Hakansson H, Viluksela M. In utero/lactational and adult exposures to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) show differential effects on craniofacial development and growth in rats. *Toxicology* 2015b; 337: 30–8.
- Sonne C, Dietz R, Born EW, et al. Is bone mineral composition disrupted by organochlorines in east Greenland polar bears (*Ursus maritimus*)? *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1711–6.
- Sonne C, Dyck M, Rig  t FF, et al. Penile density and globally used chemicals in Canadian and Greenland polar bears. *Environ Res* 2015; 137: 287–91.
- Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 95–105.
- Syed FA, Hoey KA. Integrative physiology of the aging bone: insights from animal and cellular models. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1211: 95–106.
- Syed FA, Melim T. Rodent models of aging bone: an update. *Curr Osteoporos Rep* 2011; 9: 219–28.
- Tahimic CG, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: e6 (14p) <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00006/full> (febr. 2017).
- Taylor D, Lee TC. Microdamage and mechanical behaviour: predicting failure and remodelling in compact bone. *J Anat* 2003; 203: 203–11.
- Tilson HA, Kodavanti PR. The neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology* 1998; 19: 517–25.
- Turner AS. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001; 1: 66–81.
- USEPA. PCBs: cancer-dose response assessment and application to environmental mixtures. Washington, DC: National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U. S. Environmental Protection Agency, 1996.
- van Birgelen AP, Fase KM, van der Kolk J, et al. Synergistic effect of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic porphyrin levels in the rat. *Environ Health Perspect* 1996a; 104: 550–7.
- van Birgelen AP, Ross DG, Devito MJ, Birnbaum LS. Interactive effects between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in female B6C3F1 mice: tissue distribution and tissue-specific enzyme induction. *Fundam Appl Toxicol* 1996b; 34: 118–31.

- van Birgelen AP, Devito MJ, Akins JM, Ross DG, Diliberto JJ, Birnbaum LS. Relative potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls derived from hepatic porphyrin accumulation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996c; 138: 98–109.
- van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006; 93: 223–41.
- van der Burght AS, Tysklind M, Andersson PL, Jean Horbach G, van den Berg M. Structure dependent induction of CYP1A by polychlorinated biphenyls in hepatocytes of male castrated pigs. *Chemosphere* 2000; 41: 1697–708.
- van der Eerden BC, Lowik CW, Wit JM, Karperien M. Expression of estrogen receptors and enzymes involved in sex steroid metabolism in the rat tibia during sexual maturation. *J Endocrinol* 2004; 180: 457–67.
- Vermeylen W, De Vos S, De Schrijver R. Effects of dietary wheat bran on absorption and accumulation of PCBs in rats. *Chemosphere* 2008; 71: 277–83.
- Viluksela M, Bager Y, Tuomisto JT, et al. Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains. *Cancer Res* 2000; 60: 6911–20.
- Vrecl M, Jan J, Pogačnik A, Bavdek SV. Transfer of planar and non-planar chlorobiphenyls, 4,4'-DDE and hexachlorobenzene from blood to milk and to suckling infants. *Chemosphere* 1996; 33: 2341–6.
- Vrecl M, Pogačnik A, Sek S, Lorger J, Bavdek SV. Quantitative alterations in the liver and adrenal gland in pregnant rats induced by Pyralene 3000. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995; 54: 900–6.
- Vrecl M, Pogačnik A, Fazarinc G, Zupančič-Kralj L, Jan J. Toxicity of individual planar and non-planar hexachlorobiphenyls (PCB-169, PCB-155) and their mixture on selected parameters in rats. In: 9th International Conference on Life Sciences & 1st International Congress on Toxicology: book of abstracts. Nova Gorica, Slovenija: Slovenian Toxicology Society, 2004: 138.
- Vrecl M, Uršič M, Pogačnik A, Zupančič-Kralj L, Jan J. Excretion pattern of co-planar and non-planar tetra- and hexa-chlorobiphenyls in ovine milk and faeces. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 170–4.
- Wallin E, Rylander L, Jonsson BA, Lundh T, Isaksson A, Hagmar L. Exposure to CB-153 and p,p'-DDE and bone mineral density and bone metabolism markers in middle-aged and elderly men and women. *Osteoporos Int* 2005; 16: 2085–94.
- Wang SL, Su PH, Jong SB, Guo YL, Chou WL, Papke O. In utero exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls and its relations to thyroid function and growth hormone in newborns. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1645–50.
- WHO. Polychlorinated biphenyls: human health aspects. Geneva: World Health Organisation, 2003 (Concise international chemical assessment document, 55).
- Windahl SH, Norgard M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Andersson G. Cellular distribution of estrogen receptor beta in neonatal rat bone. *Bone* 2000; 26: 117–21.
- Xiao W, Zhang J, Liang J, Zhu H, Zhou Z, Wu Q. Adverse effects of neonatal exposure to 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on hormone levels and testicular function in male Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol* 2011; 26: 657-68.

- Yamamoto M, Narita A, Kagohata M, Shirai M, Akahori F, Arishima K. Effects of maternal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) or 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB169) on testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring rats. *J Androl* 2005; 26: 205–14.
- Yilmaz B, Seyran AD, Sandal S, et al. Modulatory effects of Aroclors 1221 and 1254 on bone turnover and vertebral histology in intact and ovariectomized rats. *Toxicol Lett* 2006; 166: 276–84.
- Yu TY, Kondo T, Matsumoto T, Fujii-Kuriyama Y, Imai Y. Aryl hydrocarbon receptor catabolic activity in bone metabolism is osteoclast dependent in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 450: 416–22.