

## Ispitivanje toksičnosti i teratogenosti metilparabena i natrijum-benzoata na modelu zebrice (*Danio rerio*)

---

Natrijum-benzoat (E 211) i metilparaben (E 218) se zbog svog poznatog antimikrobnog dejstva decenijama koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji kao konzervansi. Osim u komercijalno dostupnim proizvodima, prisustvo ovih jedinjenja je potvrđeno u zemljištu, otpadnim i površinskim vodama, gde mogu imati negativan uticaj na terestrične i akvatične organizme. Budući da je toksičnost kombinacije ova dva jedinjenja na humanoj populaciji još uvek neispitana, kao i uticaj na razvoj humanih embriona i fetusa, cilj ovog rada je bilo određivanje dozno-zavisnog toksikološkog profila pojedinačnih jedinjenja na modelu zebrice (*Danio rerio*), kao i kombinacije jedinjenja primenjenih u netoksičnim dozama. Embrioni zebrice stari 6 sati tretirani su različitim koncentracijama natrijum-benzoata (5, 10, 25, 50, 75 i 100 µg/mL) i metilparabena (5, 10, 15, 20, 25 i 30 µg/mL), kao kombinacijom obe supstance u različitom masenom odnosu. Test je trajao 120 sati. Tokom testa embrioni su u razvojnim stadijumima od 24, 48, 72, 96 i 120 h nakon fertilizacije posmatrani pod mikroskopom. Praćeno je njihovo preživljavanje i pojava različitih znakova toksičnosti (hepatotoksičnost, ototoksičnost, kardiovaskularni i skeletni poremećaji), kao indikatora letalnog i teratogenog uticaja. Utvrđeno je da su ispitivane koncentracije metilparabena pokazale toksičniji efekat od natrijum-benzoata, sa aspekta preživljavanja tretiranih embriona, dok je natrijum-benzoat imao izraženiji teratogeni efekat, gde je pojava malformacija (ototoksičnost) detektovana već u ranom stadijumu embrionalnog razvoja (48 h nakon fertilizacije). Oba jedinjenja su ispoljila dozno-zavisni hepatotoksični i kardiotoksični efekat. S druge strane, pokazan je toksičan efekat kombinacija ova dva jedinjenja, primenjenih u netoksičnim dozama. Rezultati ove studije ukazuju na postojanje potencijalnog rizika za razvoj humanih embriona istovremeno izloženih metilparabenu i natrijum-benzoatu, i ukazuju na neophodnost sprovođenja detaljnih toksikoloških analiza i daljih ispitivanja toksičnosti i teratogenosti drugih konzervanasa koji se koriste kao dodaci hrani.

---

Marija Stefanović  
(1999), Beograd,  
Omladinskih brigade 47,  
učenica 4. razreda  
Devete gimnazije  
„Mihailo Petrović Alas”  
u Beogradu

MENTOR:  
dr Aleksandar Pavić,  
viši naučni saradnik,  
Institut za molekularnu  
genetiku i genetičko  
inženjerstvo, Univerzitet  
u Beogradu

## Uvod

Rastuća proizvodnja i konzumacija konzerviranih i prerađenih proizvoda prehrambene industrije dovela je do preterane upotrebe konzervanasa i aditiva. Konzervansi se dodaju kako bi se sprečile neželjene hemijske promene i rast mikroorganizama, i time zadržale nutritivne karakteristike prehrambenih proizvoda (Davidson *et al.* 2013). Natrijum-benzoat i metilparaben su supstance koje se već decenijama koriste kao konzervansi u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima.

**Natrijum-benzoat (E 211)** je so benzoeve kiseline koja se zbog svojih poznatih antimikrobnih svojstava koristi kao konzervans. Benzoati ostvaruju svoj antimikrobni efekat tako što menjaju pH vrednost unutarćelijske sredine mikroorganizama, smanjuju permeabilnost membrane i ometaju usvajanje aminokiselina iz spoljašnje sredine. Pored ovog efekta, zapaženo je da benzoati u unutarćelijskoj sredini mnogih bakterija i kvasaca ometaju aktivnost enzima uključenih u metabolizam sirćetne kiseline i oksidativnu fosforilaciju (Chiplely 2005). Benzoati se takođe koriste u namirnicama i pićima kao regulatori kiselosti. Osim u prehrambenoj industriji, natrijum-benzoat se primenjuje kao konzervans u farmaceutskoj industriji i kao medicinsko sredstvo za tretiranje urođenih poremećaja ciklusa uree (Gaur *et al.* 2018). Pokazano je da benzoati nemaju značajnije toksične efekte na ljudsku populaciju i da usled hroničnog izlaganja ne dolazi do akumulacije ovih jedinjenja u ljudskom organizmu (WHO 2000).

**Metilparaben (E 218)** je metil ester p-hidroksibenzoeve kiseline. Ovo jedinjenje je stabilno na širokom opsegu pH vrednosti, dobro rastvorljivo u vodi i ima širok spektar antimikrobnog dejstva zbog čega se koristi kao konzervans u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji već više od 50 godina (Soni *et al.* 2002). Metilparaben je najzastupljeniji antimikrobni agens u kozmetičkim preparatima. *In vivo* studije pokazuju da metilparaben ima nisku akutnu toksičnost na laboratorijskim sisarskim model sistemima, kao i da ne dolazi do akumulacije ovog jedinjenja u organizmu. Međutim, skorija istraživanja ukazuju na to da toksičnost ovih konzervanasa može zavisi od načina i trajanja izlaganja, kao i od korišćenog model organizma (Dambal *et al.* 2017). Usled transplacentalnog transporta ovih jedinjenja putem krvi, mogu uticati na formiranje i razviće embriona, što ukazuje na neophodnost ispitivanja genotoksičnosti i teratogenosti ovih jedinjenja. U industrijskim proizvodima se neretko koriste kombinacije ovih aditiva, a njihovo prisustvo je potvrđeno u zemljištu, površinskim i otpadnim vodama, gde mogu imati negativan uticaj na terestrične i akvatične ekosisteme i organizme koji ih naseljavaju.

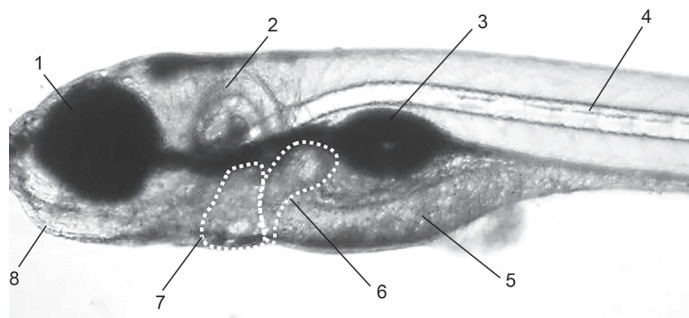
**Zebrica (*Danio rerio*)** predstavlja univerzalnu biotehnološku platformu za ispitivanje toksičnosti i teratogenosti biološki aktivnih jedinjenja, mehanizama njihovog dejstva i interakcija sa različitim biološkim strukturama. Embrioni zebrica se razvijaju u spoljašnjoj sredini, potpuno su optički transparentni i moguće je vizuelno pratiti njihovu embriogenezu. Embrionima zebrica je lako manipulirati i malformacije nastale tokom

organogeneze su lako uočljive. Zbog značajne sličnosti na molekularno-genetičkom, morfološkom, fiziološkom i imunonološkom nivou sa kičmenjacima, uključujući i čoveka, zebrice se kostiste kao model sistem u biologiji razvića i molekularnoj genetici za praćenje procesa i interakcija koji su evoluciono konzervirane među kičmenjačkim vrstama (Spitsbergen i Kent 2003). S druge strane, zebrica danas predstavlja jedan od glavnih animalnih model sistema za ispitivanje toksičnosti jedinjenja svetskih farmaceutskih kompanija.

Cilj ovog istraživanja bilo je određivanje dozno-zavisnog toksikološkog profila natrijum-benzoata (NB) i metilparabena (MP), kao toksičnosti i teratogenosti kombinacije ova dva jedinjenja primenjenih u netoksičnim dozama na modelu zebrice (*Danio rerio*).

## Materijal i metode

Odrasle jedinke zebrice su čuvane u akvarijumu sa konstantnom aeracijom, na sobnoj temperaturi (u svetlosnom režimu 14 h dan, 10 h mrak) i hranjene tri puta dnevno komercijalno dostupnim suplementima. Noć pred mrest, muške i ženske jedinke (u odnosu 2 : 1) su izdvojene u akvarijume za mrešćenje i ostavljene u mraku preko noći. Jaja su sakupljena 30 minuta nakon prve pojave svetla i prebačena u Petri šolje sa medijumom za embrione (5.03 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.33 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Nakon dva sata jaja su pregledana pod invertinim mikroskopom i neoplođena jaja su odbačena. Embrioni zebrice stari šest sati su prebačeni u mikrotitar ploče sa 24 bunarića i tretirani rastvorima ispitivanih supstanci. Embrioni su inkubirani na 28°C. Korišćeni su rastvori natrijum-benzoata (5, 10, 25, 50, 75 i 100 µg/mL) i metilparabena (5, 10, 15, 20, 25 i 30 µg/mL) datih koncentracija. Simultano dejstvo ovih jedinjenja ispitano je korišćenjem rastvora natrijum-benzoata i metilparabena u sledećim masenim odnosima: 2.5, 5, 10, 25, 30 µg/mL NB + 7.5 µg/mL MP; 2.5, 5, 10, 25, 30 µg/mL NB + 15 µg/mL MP. Test supstance su rastvorene u dimetilsulfoksidu (DMSO), tako da finalna koncentracija DMSO u medijumu nije bila veća od 0.25 %. Kao negativna kontrola korišćen je 0.25% DMSO.



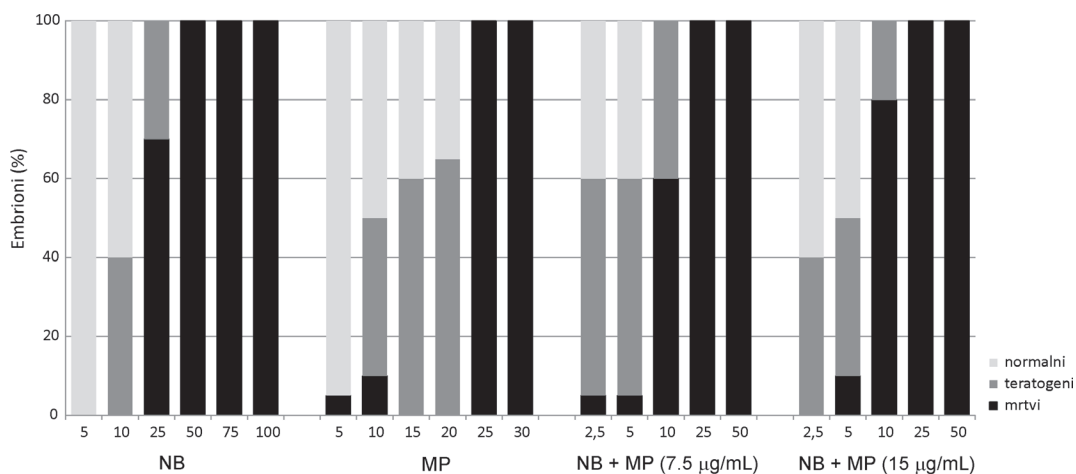
Slika 1. Izgled normalnog embriona 120 h nakon fertilizacije sa obeleženim strukturama: 1 – oko, 2 – otocist sa otolitima, 3 – mehur, 4 – notohorda, 5 – žumance, 6 – jetra, 7 – perikardijalna duplja, 8 – vilica.

Figure 1. Zebrafish larva at 120 h post fertilization with major organs indicated: 1 – eye, 2 – otocyst with otoliths, 3 – air bladder, 4 – notochord, 5 – egg yolk, 6 – liver, 7 – pericardial cavity, 8 – jaw.

**FET** (eng. fish embryo toxicity) test. Praćenje uticaja ispitivanih supstanci na preživljavanje i organogenezu embriona je trajalo 120 h, nakon čega su embrioni anestetizirani trikaninom i usmrćeni. Nakon 24, 48, 72 i 96 časova embrioni su posmatrani pod mikroskopom i praćene su morfološke promene u različitim fazama embrionalnog razvika opisane u literaturi (Kimmel *et al.* 1995) upoređene sa negativnom kontrolom. Na slici 1 je prikazan izgled pravilno formiranog embriona zebrice 120 h nakon fertilizacije. Na skici su obeležene strukture čije je razvike praćeno tokom testa. Letalni i teratogeni efekti su određeni na osnovu standardnog OECD protokola (OECD 2013). Praćeno je preživljavanje embriona i učestalost pojave malformacija (malformacije otolita i otocista, edem perikardijalne duplje, nekroza jetre i edem žumancetne kese, kao i skeletni deformiteti).

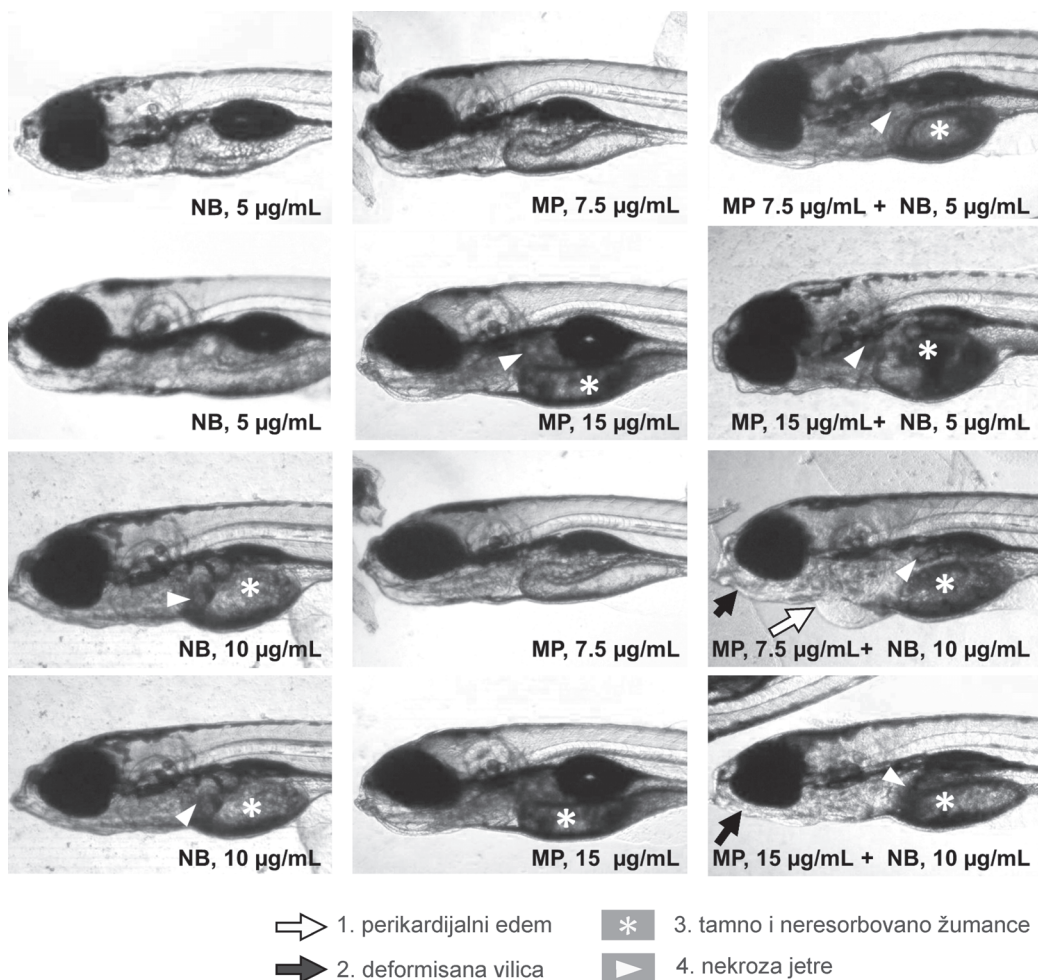
## Rezultati i diskusija

**Preživljavanje embriona.** Praćenje letalnog i teratogenog uticaja natrijum-benzoata, metilparabena i njihove kombinacije na embrione zebrice trajalo je 120 h. U sva tri slučaja uočen je dozno- i vremenski-zavisani toksični efekat. Kombinacija jedinjenja u netoksičnim dozama je takođe ispoljila uticaj na preživljavanje i teratogenezu. Pregled toksičnog i teratogenog efekta ispitivanih jedinjenja zabeležen nakon 114 h trajanja tretmana prikazan je na slici 2. Teratogeni embrioni su oni kod kojih je uočena neletalna malformacija (edem perikardijalne duplje, kardiovaskularni poremećaji, nekroza jetre, edem žumancetne kese, malformacije otocista sa otolitima, skeletni deformiteti). Navedene abnormalnosti ukazuju na potencijalnu kardiotoksičnost, hepatotoksičnost i ototoksičnost ispitivanih jedinjenja.



Slika 2. Uticaj natrijum-benzoata (NB), metilparabena (MP) i njihove kombinacije na preživljavanje i teratogenezu embriona zebrica nakon 114 h trajanja tretmana

Figure 2. Dose-dependent effect of sodium-benzoate (NB), methylparaben (MP) and their combination on the survival rate (black – dead) and teratogenesis (grey) of zebrafish larva after 114-h exposure



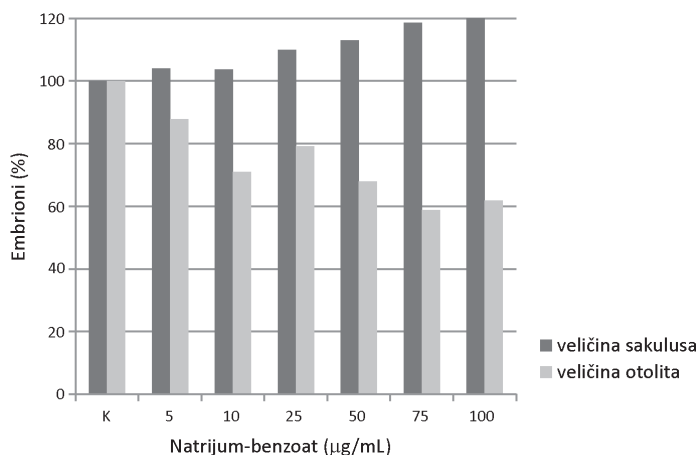
Slika 3. Morfologija embriona zebrice nakon 114 h tretmana NB, MP i kombinacijom njihovih neletalnih koncentracija. Označene su najučestalije malformacije: perikardijalni edem, tamno i neresorbovano žumance, nekroza jetre i deformitet vilice.

Figure 3. Morphology of zebrafish larvae exposed to non-lethal concentrations of NB, MP and their combination. The most common malformations are marked: pericardial edema (1), yolk opacity (3), hepatic necrosis (4) and jaw deformation (2).

Prvi teratogeni efekti uočeni su već 48 h nakon fertilizacije (začetak perikardijalnog edema, deformacije otolita) kod embriona tretiranih konzervansima pojedinačno. Deformacije su uočene kod embriona tretiranih kombinacijom konzervanasa. Na kraju testa (120 h nakon fertilizacije) tretmani najvišim koncentracijama NB (50, 75 i 100 µg/mL) i MP (25 i 30 µg/mL) su imali letalan ishod kod 100% embriona. Kod embriona tretiranih nižim koncentracijama NB i MP uočeni su teratogeni i toksični efekti (slika 2). Jedino najniže koncentracije NB i MP (5 µg/mL) nisu imale efekat na preživljavanje i embriogenezu. Tretman kombinacijom konzervanasa

(25, 30  $\mu\text{g/mL}$  NB + 7.5  $\mu\text{g/mL}$  MP, 25, 30  $\mu\text{g/mL}$  NB + 15  $\mu\text{g/mL}$  MP) pokazao je letalni efekat kod 100% embriona. Kod embriona tretiranih kombinacijom konzervanasa sa nižim udelom NB (2.5, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  NB + 7.5  $\mu\text{g/mL}$  MP, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  NB + 15  $\mu\text{g/mL}$  MP) primećeni su veći mortalitet i učestalost malformacija nego kod embriona tretiranih istim koncentracijama NB i MP pojedinačno. Na slici 3 je prikazana uporedna morfologija zebrića nakon 114 h tretmana netoksičnim dozama NB i MP pojedinačno, kao i njihovom kombinacijom. Na skici su označene najučestalije malformacije (perikardijalni edem, tamno i neresorbovano žumance, nekroza jetre i deformitet vilice). Kombinacija konzervanasa imala je efekat na embriogenezu i preživljavanje embriona zebrića što ukazuje na potencijalno aditivno/sinergističko dejstvo ovih jedinjenja.

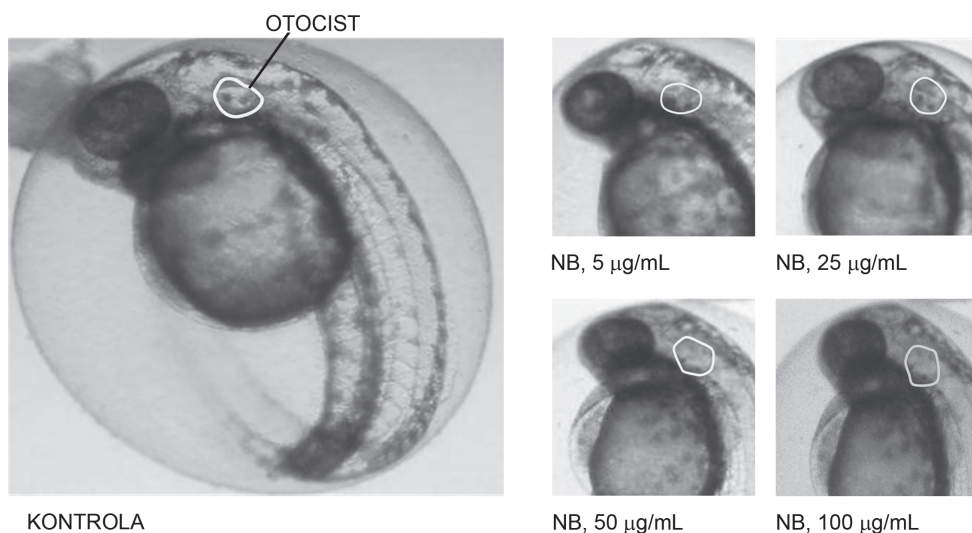
**Ototoksičnost.** Prve malformacije embriona tretiranih natrijum-benzoatom uočene su već u fazi ranog razvika, 48 h nakon fertilizacije u vidu promene u veličini otocista sa otolitima u odnosu na kontrolu. Rezultati morfometrijske analize obima otocista i veličine otolita su prikazani na slici 4. Na slici 5 prikazana je uporedna morfologija kontrolnog embriona i embriona tretiranih natrijum-benzoatom na kojima su označeni otocisti i otoliti. Za razliku od viših kičmenjaka, zebriće nemaju spoljašnje i srednje uho, te unutrašnje uho obavlja sve vestibularne i deo auditivnih funkcija (Ton i Paring 2005). Iako se građa unutrašnjeg uha razlikuje među kičmenjačkim vrstama, molekularne osnove koje determinišu razviće ovog organa i njegova fiziologija su evolutivno konzervirani (Han *et al.* 2011). Otoliti predstavljaju kristalne strukture proteina i kalcijum-karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) koje se kod zebrića formiraju iznad senzornog epitela tokom perioda kasne segmentacije (10-24 h nakon fertilizacije) (Kimmel *et al.* 1995). Nakon 48 h kod embriona tretiranih natrijum-benzoatom (10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) uočeno je značajno proširenje otocista i smanjenje i delokalizacija otolita u odnosu na kontrolu. Kako formiranje ovih struktura uključuje seriju procesa u unutarćelijskoj i vanćelijskoj sredini koji su vremenski i prostorno dobro koordinisani, više faktora može uticati na njihovu malformaciju. Do



Slika 4. Dozno-zavisni efekat natrijum-benzoata na veličinu otocista i otolita kod tretiranih embriona zebrića 48 h nakon fertilizacije

Figure 4. Dose-dependent effect of sodium benzoate on the scale of otic vesicle and otoliths (light grey) of zebrafish embryos at 48 hpf developmental stage





Slika 5. Morfologija embriona zeblica u fazi ranog razvića (48 h nakon fertilizacije) tretiranih natrijum-benzoatom kod kojih su uočene promene u veličini i položaju otocista sa otolitima

Figure 5. Morphology of zebrafish embryos at the early development period (48 h post fertilization) exposed to sodium-benzoate. Malformations of otic vesicle and otoliths are shown.

promena u morfologiji otocista sa otolitima može doći usled poremećaja u strukturi transmembranskih pumpi za  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  koje učestvuju u regulisanju homeostaze lumena otocista i formiranju odgovarajuće jonske sredine za razviće otolita (Lundberg *et al.* 2014). Kao objašnjenje proširenja otocista i smanjenja otolita Hardison *et al.* 2005 navode mutacije proteina iz porodice kladina koji grade čvrste adhezivne veze (zonula occludens) između otocista i ćelija polarizovanog senzornog epitela koji ga okružuje. Zbog ovih promena dolazi do povećanog transćelijskog transporta i narušavanja jonske ravnoteže u ćelijama što ometa formiranje otolita (Lundberg *et al.* 2014). Kod embriona tretiranih metilparabenom nisu uočene značajnije promene u građi otocista i otolita. Kod embriona tretiranih kombinacijom konzervanasa uvećanje otocista i smanjenje otolita je uočeno samo pri najvišim koncentracijama natrijum-benzoata (7.5 µg/mL MP + 50 µg/mL NB i 15 µg/mL MP + 50 µg/mL NB). Budući da biohemijski mehanizmi kojima NB i MP interferiraju sa prekursorima razvića unutrašnjeg uha zeblica nisu poznati, potrebno je sprovesti detaljne genetičke i mehanističke studije za objašnjenje dobijenih rezultata. Razviće unutrašnjeg uha je kod riba povezano sa razvićem ribljeg mehura koji, iako nije ključni organ za održavanje ravnoteže i koordinacije pokreta, doprinosi stabilnosti tela i omogućava plutanje u vodi (Riley i Moorman 2000). Riblji mehur je struktura analogna plućima kopnenih kičmenjaka (Winata *et al.* 2009). Kod embriona zeblica tretiranih NB su već u ranom embrionalnom razviću uočene malformacije statoakustičkog aparata, te 96 h nakon fertilizacije u ovim embrionima nije došlo do inflacije ribljeg mehura, kao što je i očekivano. Kod embriona tretiranih metilparabenom nije bilo vidljivih

deformacija mehura. Rezultati dobijeni ispitivanjem ototoksičnosti hemikalija na modelu zebrića mogu se ekstrapolirati na sisare, te pretpostavljamo da akutno izlaganje datim koncentracijama natrijum-benzoata, kao i kombinaciji natrijum-benzoata i metilparabena u navedenom odnosu, može izazvati poremećaje čula sluha i ravnoteže kod ljudskih embriona.

**Kardiotoksičnost.** Tokom embrionalnog razvića zebrića srce se formira već 22 h nakon fertilizacije, dok je 48 h nakon fertilizacije moguće uočiti kontrakcije srca i cirkulaciju (McGrath i Li 2008). Kod embriona tretiranih NB u najvišim koncentracijama (50 µg/mL i 100 µg/mL) već ranom embrionalnom razviću (48 h nakon fertilizacije) uočeni su prvi znaci kardiotoksičnosti: blago proširena perikardijalna duplja i akumulacija eritorcita u perikardijalnoj duplji i mozgu. Kod embriona tretiranih MP svih koncentracija uočen je začetak perikardijalnog edema. Kod embriona tretiranih kombinacijom konzervanasa koncentracija 5, 10, 25, 30 µg/mL NB + 15 µg/mL MP uočeno je proširenje perikardijalne duplje i akumulacija eritrocita. Perikardijalni edem, kao najučestalija manifestacija kardiotoksičnog efekta, nastaje usled sakupljanja tečnosti u perikardijalnoj duplji što izaziva oštećenje srčanih funkcija. Kod embriona sa perikardijalnim edemom su u kasnijim fazama razvića uočene promene u ritmičnosti, kontraktilnosti i građi srčanog mišića, kao i usporena periferna cirkulacija. Zbog sličnosti u funkcionalnim karakteristikama kardiovaskularnog sistema zebrića i sisara, moguće je pretpostaviti da ovi konzervansi imaju kardiotoksični efekat i na embrione čoveka.

**Hepatotoksičnost.** Kombinacija konzervanasa ispoljila je hepatotoksični efekat na embrione zebrića, koji se vizuelno manifestovao u vidu tamne, nerazvijene jetre. Kako se u jetri sintetišu enzimi uključeni u katabolizam lipida deponovanovih u žumancetu, usled oštećenja jetre došlo je do retencije žumanceta. Na kraju tretmana uočeni su tamno, neresorbovano žumance i edem žumancetne kese kod embriona. Zebrice predstavljaju prikladan model sistem za proučavanje hepatotoksičnosti različitih ksenobiotika zbog velike sličnosti u građi i funkciji jetre između zebrića i sisara (Hinton i Couch 1998). Hepatogeneza i histopatologija poremećaja kao što suolestaza, masna jetra i neoplazma su takođe komparibilne (He *et al.* 2013). U jetri zebrića su prisutni enzimi homologni enzimima citohroma P450, koji su u organizmu sisara zaduženi za metabolizam toksina (*ibid.*). Budući da se ovi konzervansi metabolišu u jetri, a kasnije izlučuju putem mokraće, moguće je da je akumulacija sporednih metabolita ovih biohemijskih procesa ili njihova interakcija sa fiziološki značajnim enzimima dovela do oštećenja funkcija jetre embriona.

## Zaključak

Rezultati ukazuju da metilparaben ima toksičniji efekat od natrijum-benzoata, sa aspekta preživljavanja embriona, dok su kombinacije oba jedinjenja primenjena u netoksičnim dozama pokazala toksični i teratogeni efekat na embrione zebrića. U sva tri slučaja uočen je dozno- i vremen-



ski-zavisan toksični efekat. Natrijum-benzoat ispoljio je ototoksično dejstvo već u ranom embrionalnom razviću (48 h nakon fertilizacije). Tretman pojedinačnim supstancama, kao i njihovom kombinacijom, pokazao je kardiotoksičan i hepatotoksičan efekat. Dati rezultati ukazuju na neophodnost detaljnih toksikoloških analiza ovih jedinjenja i njihovog simultanog dejstva, kao i ispitivanja toksičnosti ostalih jedinjenja koja se koriste kao konzervansi i aditivi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji i mehanizma pomoću kojih ostvaruju ovakve efekte. Rezultati pokazuju mogući teratogeni efekat na embrione ljudi ukoliko su istovremeno izloženi uticaju i natrijum-benzoata i metilparabena.

---

## Literatura

- Chipley J. R. 2005. Sodium benzoate and benzoic acid. U *Antimicrobials in food. 3rd ed.* (ur. P. M. Davidson *et al.*). Boca Raton: Taylor & Francis, str. 11-48.
- Dambal V. Y., Selvan K. P., Lite C., Barathi S., Santosh W. 2017. Developmental toxicity and induction of vitellogenin in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to methyl Paraben. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **141**: 113.
- Davidson M. P., Taylor M. T., Schmidt S. E. 2013. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. U *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (ur. M. P. Doyle i L. R. Bauchat). Washington: ASM Press, str. 765-801.
- Gaur H., Purushothaman S., Pullaguri N., Bhargava Y., Bhargava A. 2018. Sodium benzoate induced developmental defects, oxidative stress and anxiety-like behaviour in zebrafish larva. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **502** (3): 364.
- Han Y., Mu Y., Li X., Xu P., Tong J., Liu Z., *et al.* 2011. Grhl2 deficiency impairs otic development and hearing ability in a zebrafish model of the progressive dominant hearing loss DFNA28. *Human Molecular Genetics*, **20** (16): 3213.
- Hardison A., Lichten L., Banerjee-Basu S., Becker T., Burgess S. 2005. The zebrafish gene claudin<sub>j</sub> is essential for normal ear function and important for the formation of the otoliths. *Mechanisms of Development*, **122** (7-8): 949.
- He H., Liu X., Peng L., Gao Z., Ye Y., Su Y., *et al.* 2013. Promotion of hepatic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized cell-deposited extracellular matrix. *BioMed research international*: 406871
- Hinton D., Couch J. 1998. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. U *Fish ecotoxicology* (ur. T. Braunbeck *et al.*). Basel: Birkhauser, str. 141-164.

- Kimmel C. B., Ballard W. W., Ullmann B., Kimmel S.R., Schilling T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, **203**: 253.
- Lundberg Y., Xu Y., Thiessen K., Kramer K. 2014. Mechanisms of otoconia and otolith development. *Developmental Dynamics*, **244** (3): 239.
- McGrath P., Li C. 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, **13** (9-10): 394.
- OECD 2013. *OECD guidelines for the testing of chemicals 236. Fish embryo acute toxicity (FET) test*. Paris: OECD
- Riley B., Moorman S. 2000. Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish. *Journal of Neurobiology*, **43** (4): 329.
- Soni M. G., Taylor S. L., Greenberg N. A., Burdock G. A. 2002. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, **40** (10): 1335.
- Spitsbergen J. M., Kent M. L. 2003. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research – Advantages and Current Limitations. *Toxicologic Pathology*, **31** (1 suppl): 62.
- Ton C., Paring C. 2005. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hearing Research*, **208** (1-2): 79.
- Winata C., Korzh S., Kondrychyn I., Zheng W., Korzh V., Gong Z. 2009. Development of zebrafish swimbladder: The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. *Developmental Biology*, **331** (2): 222.
- WHO (World Health Organization) 2000. *Benzoic acid and sodium benzoate*. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42310>

---

*Marija Stefanović*

## Toxicity and Teratogenicity Evaluation of Food Preservatives Methylparaben and Sodium-Benzoate in the Zebrafish (*Danio rerio*) Model

Numerous chemically different compounds are used as additives in the food and cosmetic industry, and their toxicity has not been fully elucidated, particularly when used together. Among them, methylparaben and sodium-benzoate have been used for decades as additives in the food, drug

and cosmetic industry, due to their antimicrobial activity. Also, these additives can often be present together in food and cosmetic products. Since contamination with these compounds has previously been documented in soil, waste and surface waters, they could affect the development of terrestrial and aquatic organisms, as well as humans. As the toxicity of the combination of these compounds has not yet been explored in the human population, particularly their effect on human fetal development, the aim of this study was to determine the dose-dependent toxicological profile of each individual compound in the zebrafish (*Danio rerio*) model, as well as the combination of these compounds applied at non-toxic doses. The zebrafish embryos were treated at the 6 hours post fertilization (hpf) stage with different concentrations of the tested compounds and their mixture, and inspected daily for survival and appearance of teratogenic malformations (hepatotoxicity, cardiovascular and skeletal disorders) in a period up to 120 hpf. The results obtained in this study revealed the dose-dependent mortality and teratogenicity of both compounds, where methylparaben appeared more toxic than sodium-benzoate. On the other hand, sodium-benzoate caused ototoxic defects already in early embryonic development (by 48 hpf). Both compounds were hepatotoxic and cardiotoxic. Moreover, hepatotoxicity and cardiotoxicity have been detected in the embryos upon the combined application of non-toxic doses of both compounds. Taken together, the results of this study suggest a potential risk for human embryo development in pregnant women exposed to methylparaben, sodium-benzoate and their combinations, and strongly indicate a need for detailed toxicological analyses of other additives which can be found in food products.

