

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠULA GRABNAR

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



URŠULA GRABNAR

**OCENA ENDOKRINEGA DELOVANJA BARVIL DOVOLJENIH ZA  
UPORABO V KOZMETIČNIH IZDELKIH Z IN SILICO METODO**

**PREDICTION OF ENDOCRINE ACTIVITY OF COLOURS  
PERMITTED TO USE IN COSMETIC PRODUCTS WITH *IN SILICO*  
METHOD**

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm..

### **ZAHVALA**

*Najlepše se zahvaljujem mentorju doc. dr. Andreju Perdihi, mag. farm., in somentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za strokovno pomoč, usmerjanje, razumevanje ter potrpežljivost med izdelavo diplomske naloge.*

### **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo naredila samostojno pod mentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm..

Uršula Grabnar

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

**VSEBINA**

SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
POVZETEK .....	VII
ABSTRACT .....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 Endokrini sistem.....	1
1.1.1 Hormoni.....	2
1.1.2 Receptorji v endokrinem sistemu .....	3
1.1.3 Hormonsko ravnovesje .....	6
1.2 Hormonski motilci.....	6
1.3 Metode določanja hormonskih motilcev .....	12
1.4 Barvila v kozmetičnih izdelkih.....	13
1.4.1 Razdelitev barvil.....	15
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	18
3.1 Materiali .....	18
3.1.1 Opis seznama dovoljenih barvil v kozmetičnih izdelkih .....	18
3.1.2 Opredelitev barvil v prilogi.....	19
3.2 Metode.....	21
3.2.1 Program Endocrine Disruptome .....	21
3.2.1.1 Uporaba programa Endocrine Disruptome.....	22
3.2.1.2 Napovedi in omejitev programa .....	24
3.3 Iskanje strukturne formule barvil .....	25
3.3.1 Cosing baza podatkov .....	25
3.3.2 Baza podatkov The Good Scents .....	26
3.3.3 Programske pakete ChemDraw Professional .....	27
3.3.4 Spletna baza podatkov ChemSpider .....	28
3.3.5 Spletna baza podatkov PubChem .....	29
3.4 Primerjava rezultatov ED z bazo podatkov TEDX .....	30
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	32

4.1	Spojine, za katere ED napove zelo veliko verjetnost vezave na jedrne receptorje (uvrstitev v rdeči razred).....	33
4.2	Spojine, za katere ED ne napove nobenih interakcij z jedrnimi receptorji (uvrstitev v zeleni razred) .....	40
4.3	Skladnost uvrščanja preiskovanih barvil med HM z ED in bazoTEDX .....	46
5	ZAKLJUČEK .....	52
6	LITERATURA .....	54
7	PRILOGE .....	63

**KAZALO SLIK**

Slika 1. Prenos hormonskih motilcev v človeško telo (31).....	9
Slika 2. Viri in poti izpostavitve hormonskim motilcem pri ljudeh (31). .....	10
Slika 3. Del seznama dovoljenih barvil v KI iz Priloge IV Uredbe št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih. ....	19
Slika 4. Glavne kategorije za razvrščanje barvil v skladu z mednarodno referenčno bazo podatkov o barvilih Coulor Index International (55).....	20
Slika 5. Osnovni grafični vmesnik programa ED znotraj spletnega brskalnika (60). .....	22
Slika 6. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 26100. ....	23
Slika 7. Vstopna internetna stran pdatkovne baze Cosing (62).....	26
Slika 8. Vstopna internetna stran baze podatkov The Good Scents (63). .....	27
Slika 9. Rezultati iskanja kemijske strukture in SMILES kode s programom ChemDraw Professional.....	28
Slika 10. Prikaz rezultatov iskanja programa ChemSpider za barvilo CI 26100. ....	29
Slika 11. Prikaz možnosti iskanja potencialnih HM na podatkovni bazi TEDX (68).....	31
Slika 12. Število barvil, ki jih ED razvrsti v rdeči razred glede na vezavo na posamezni jedrni receptor.....	35
Slika 13. Prikaz barvil, uvrščenih v rdeči razred glede na rezultate programa ED po kemijskih skupinah, izražen v odstotkih.....	38
Slika 14. Prikaz spojin po kemijskih skupinah, za katere program ED ne napove interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji izražen v odstotkih. ....	42
Slika 15. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za CI 15985.....	47
Slika 16. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 40800. ....	48
Slika 17. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 42053. ....	49
Slika 18. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 58000. ....	50

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1. Seznam barvil, za katere ED z veliko verjetnostjo napove vezavo s proučevanimi jedrnimi receptorji.....	34
Preglednica 2. Prikaz barvil, ki se z veliko verjetnostjo glede na rezultate, pridobljene z ED, vežejo na proučevane jadrne receptorje.....	37
Preglednica 3. Seznam spojin, za katere program ED ne napove interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji.....	41
Preglednica 4. Prikaz spojin po kemijskih skupinah, za katere program ED ne napove interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji.....	41

**KAZALO PRILOG**

PRILOGA I. Rezultati napovedi ED za barvila.....	63
--------------------------------------------------	----

**SEZNAM OKRAJŠAV**

AR	– androgeni receptor
CAS št.	– Chemical Abstract Service; številka kemikalije v skladu s sistemom ameriške Službe za povzetke o kemikalijah
CI	– Colour Index (barvni indeks)
Cosing	– baza podatkov Evropske komisije za informacije o kozmetičnih sestavinah
ED	– program Endocrine Disruptome
EINECES, ES number	– Existing Commercial Chemical Substances (evropski popis obstoječih trgovskih kemičnih snovi s sedem mestno kodo)
EPA	– Environmental Protection Agency (Agencija za zaščito okolja)
ER	– estrogenski receptor
EU	– Evropska unija
GR	– glukokortikoidni receptor
HM	– hormonski motilec
IUPAC	– International Union of Pure and Applied Chemistry (Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo)
KI	– kozmetični izdelki
LC	– lethal concentration (letalna koncentracija)
LD	– lethal dose (letalni odmerek)
LD 50	– enkratni odmerek, ki pri polovici poskusnih živali povzroči smrt
LXR	– jetrni X receptor
OECD	– Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj)

PAINS	– pan-assay-interference-structure
PPAR	– s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor
RXR	– receptor retinojske kisline
SCCS	– Scientific Committee On Consumer Safety (Znanstveni svet za varstvo potrošnikov)
SMILES	– Simplified molecular input line entry sistem
T3 – 3,5,3'	– trijodo-L-tironin
T4	– tiroksin
TEDX	– The Endocrine Disruptor Exchange (Organizacija za izmenjavo informacij o hormonskih motilcih)
TR	– receptor za ščitnične hormone
WHO	– World Health Organisation (Svetovna zdravstvena organizacija)

## POVZETEK

Toksičnost različnih kemikalij, s katerimi človek prihaja v stik, postaja vse večji problem. Posebno skrb vzbujajo kemikalije, ki motijo hormonski sistem, saj lahko že v majhnih koncentracijah povzročajo škodljive učinke za zdravje človeka. Vplivajo na eno ali več funkcij endokrinega sistema in povzročijo škodljive spremembe v razvoju, rasti, razmnoževanju, fiziologiji in dolžini življenjske dobe osebka ali cele populacije. Večkrat se spremembe kažejo tudi na potomcih, ki so jim bili prenatalno izpostavljeni sami ali njihovi starši. Takšne kemikalije imenujemo hormonski motilci (HM). Epidemiološke študije na ljudeh in živalih kažejo jasno povezavo med izpostavljenostjo HM in neplodnostjo, različnimi oblikami raka, naraščanjem debelosti in sladkorno bolezni tipa II.

Med kemikalijami, s katerimi prihajamo v stik vsak dan, so tudi sestavine v kozmetičnih izdelkih (KI). Uredba o kozmetičnih izdelkih (Uredbe št. 1223/2009), ki je začela veljati 11. 7. 2013, določa strožje varnostne standarde in točnejše informacije za potrošnika kot prejšnja zakonodaja. Prepoveduje dokazovanje učinka kot tudi toksičnosti s testiranjem na živalih in narekuje uporabo alternativnih metod.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na oceno endokrinega delovanja barvil, dovoljenih za uporabo v KI, z *in silico* metodo s programom Endocrine Disruptome (ED), ki je delo slovenskih znanstvenikov. Omogoča sidranje spojine v aktivna mesta 12 različnih jedrnih receptorjev. Afiniteto vezave na testirane jedrne receptorje poda s štirimi barvno kodiranimi razredi. Uvrstitev spojine v rdeči razred je znak za zelo veliko verjetnost vezave, ki pa je manjša, če je spojina uvrščena v oranžni ali rumeni razred. Če ED ne napove vezave z receptorjem, je spojina uvrščena v zeleni razred.

Z ED smo testirali 176 spojin, ki pripadajo 153 barvilom; za nekatere ED zaradi omejitev ni podal rezultatov. Ugotovili smo, da je med barvili 36 spojin, ki jih program ED uvršča v rdeči razred vsaj za en proučevan receptor, in 15 spojin, ki jih program ED uvrsti v zelenega, ker ne kažejo afinitete za vezavo na testirane jedrne receptorje. Podatke, ki smo jih pridobili, smo primerjali s podatkovno bazo TEDX za izmenjavo informacij o HM. TEDX med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, navaja samo 6 spojin kot potencialne HM. Podatkov je premalo in niso istovrstni kot rezultati programa ED, zato ne moremo oceniti napovednosti programa ED, lahko pa nam pomagajo pri hitri oceni HM

med barvili, ki so dovoljeni za uporabo v KI v EU. Spojine, za katere ED napoveduje zelo visoko afiniteto vezave na testirane jedrne receptorje, bi bilo smiselno preveriti še po drugih podatkovnih bazah in tiste, za katere ni podatkov, testirati še s testi *in vitro*.

**Ključne besede:** barvila, kozmetični izdelki, hormonski motilci, jedrni receptorji, program Endocrine Disruptome, TEDX (The Endocrine Disruption Exchange, izmenjava informacij o hormonskih motilcih)

## ABSTRACT

The toxicity of various chemicals with which human beings come into contact, is becoming an increasing problem. Particularly worrying are chemicals which disrupt the hormone system, because even in small concentrations they cause adverse effects to human health. They affect one or more functions of the endocrine system and cause adverse changes in the development, growth, reproduction, physiology and life cycles of the specimen or the entire population. Changes frequently affect also the offspring who were prenatally exposed to those changes themselves or their parents. Such chemicals are called endocrine disruptors. Epidemiological studies in humans and animals have shown a clear link between exposure to endocrine disruptors and infertility, cancers, increasing obesity and type II diabetes.

Among the chemicals with which we come into contact every day, are also ingredients in cosmetic products. The regulation on cosmetic products (Regulation (EC) No. 1223/2009), which became valid on 11.07. 2013 sets more strict safety standards and more accurate information for the consumer as the previous legislation. It prohibits the demonstration effect and toxicity testing in animals and requires the use of alternative methods.

In this thesis, we focused on the assessment of the endocrine activity of the coloring agents allowed for use in cosmetic products with *in silico* method using the programme Endocrine Disruptome (ED) being the work of Slovenian scientists. It allows docking of the compound in the active sites of 12 different nuclear receptors. Binding affinity of the tested nuclear receptors is given in the four color-coded classes. The ranking of the compound into the red class is a sign of a very high probability of binding which is smaller if the compound is ranked into the orange or yellow class. If the ED does not predict the binding to receptor, the compound is ranked into the green class.

With the ED 176 compounds belonging to 153 dyes had been tested; due to limitations the ED gave no results for some compounds. We have found out that among the dyes there are 36 compounds, which the ED ranks into the red class for at least one examined receptor and 15 compounds which the ED ranks into the green class because they do not show affinity for the tested nuclear receptors. We compared the data that we have obtained with a database TEDx for the exchange of information on endocrine disruptors. Among dyes

which are permitted for use in the EU TEDX states only 6 compounds as potential endocrine disruptors. Data are insufficient and not of the same nature as the results of the ED as to assess the possibility of prediction of the ED. Yet, data can help us as to quickly evaluate endocrine disruptors among the dyes which are permitted for use in cosmetic products in the EU. It would be useful to check the compounds for which the ED predicts a very high affinity of binding also by other databases and to check those for which there are no data by also *in vitro* tests.

**Key words:** colorants, cosmetic products, endocrine disruptors, nuclear receptors, Endocrine disruptome, TEDX (The Endocrine Disruption Exchange)

## 1 UVOD

V svetovnem merilu opažajo, da narašča število bolezni, ki so povezane s HM. Predvsem se povečuje neplodnost, število različnih rakov, povezanih s hormoni, narašča debelost in diabetes tipa 2 (1). Veča se skrb zaradi izpostavitve tem kemikalijam, saj vse več raziskav potrjuje, da lahko že v majhnih koncentracijah povzročajo škodljive učinke v okolju in na človekovo zdravje. Za kemikalije s tovrstnim delovanjem v literaturi srečamo tudi poimenovanje endokrini modulatorji, okoljski hormoni in endokrino aktivne spojine (2). Včasih se sicer endokrine motnje predstavlja zgolj kot vprašanje akademskih krogov, vendar pa epidemiološke študije pri ljudeh in živalih kažejo jasno povezavo med določenimi boleznimi in izpostavljenostjo kemikalijam, ki povzročajo endokrine motnje. Intenzivne raziskave o učinkih HM potekajo že več kot petnajst let (3). Posebno je zaskrbljujoče, če je organizem vsakodnevno izpostavljen takšnim kemikalijam, četudi v nizkih odmerkih. Med pripomočke, ki jih dnevno uporabljamo skoraj vsi ljudje, sodijo tudi KI, ki so bistvenega pomena za zdravje in dobro počutje. To so naprimer kreme za sončenje, zobne paste ter izdelki za osebno higieno (4). KI morajo biti varni in ne smejo predstavljati tveganja za zdravje ljudi (5). 11. julija 2013 je začela veljati Uredba o kozmetičnih izdelkih, ki je bila sprejeta 30. novembra 2009 (5). Tako morajo vsi KI, ki so v prometu v Evropski uniji (EU) (tako izdelani v EU, kot uvoženi od drugod), izpolnjevati zahteve iz te uredbe, ki določa strožje varnostne standarde in točnejše informacije za potrošnike kot prejšnja zakonodaja (4). Ta pravni dokument posega tudi v preverjanje KI, da so ti varni za uporabo. Prepoveduje tako dokazovanje učinka, kot tudi toksičnosti s testiranjem na živalih (5). Narekuje alternativne metode za določanje varnosti sestavin v KI, ki so hitre, niso drage in niso etično sporne, kot so bili predhodni testi na živalih (6). Vse bolj pomembno postaja tudi ugotavljanje, ali sestavine KI lahko vplivajo na endokrini sistem.

### 1.1 Endokrini sistem

Endokrini sistem je v našem telesu zadolžen, da nadzoruje številne telesne funkcije. Ima pomembno vlogo pri kratkoročnem in dolgoročnem uravnavanju mnogih procesov in tako vzdržuje homeostazo v našem organizmu z negativno in pozitivno povratno zvezo. Bolj pogosta je negativna povratna zveza, kjer povečana koncentracija hormona preko

hipofize izzove zmanjšano izločanje omenjenega hormona. Endokrini sistem sestavljajo velike endokrine žleze ter tkiva in organi, ki imajo endokrino funkcijo. Med mrežo endokrinskih žlez, tako imenovanih žlez z notranjim izločanjem, štejemo hipofizo, češeriko, ščitnico, obščitnične žleze, nadledvični žlezi, trebušno slinavko, jajčnike in testise, med organe z endokrino funkcijo pa npr. osrednji živčni sistem, ledvica, želodec, srce, jetra, adipozno tkivo, mišice in placento. Ves sistem endokrinskih žlez in tkiv ter organov, ki imajo endokrino funkcijo, lahko med seboj komunicira na več različnih načinov. Pri avtokrinem mehanizmu hormon deluje na tiste celice, ki so ga proizvedle in se razlikuje od parakrinskega v tem, da se proizveden hormon v celici iz nje izloči v intersticijsko tekočino in po njej prispe do sosednjih tarčnih celic, kjer deluje nanje v istem tkivu. Pri parakrinem mehanizmu delovanja pa se proizvedeni hormoni v celici iz nje izločijo v kri in po njej potujejo do oddaljenih organov oziroma tkiv, kjer se nahajajo tarčne celice, na katerih ti hormoni izzovejo učinke. Hormoni so biološke molekule, ki v našem organizmu izzovejo svoj učinek že v zelo nizkih koncentracijah (od  $10^{-12}$  M do  $10^{-7}$  M) (7). Za delovanje hormona je bistvena vezava hormona na receptor. Posledica tega je sprememba v ekspresiji posameznih proteinov, ki pomembno regulirajo celotno delovanje tarčne celice. Po vezavi hormona na določen receptor pride do izražanja specifično določenih genov in posledično sinteze novih proteinov ali pa do spremembe v signaliziranju celičnih proteinov. Čeprav so spremembe in motnje v delovanju hormonskega sistema normalni vsakodnevni proces, je to normalno, dokler se telo lahko tem spremembam prilagaja. Ko pa tega ne zmore več, pride do škodljivih posledic za organizem.

### 1.1.1 Hormoni

Hormoni so organske molekule, ki jih glede na organsko strukturo razdelimo v tri skupine:

- **polipeptidi in proteini;** hormoni adenohipofize in nevrohipofize, trebušne slinavke in obščitnic, antidiuretični hormon, folikle stimulirajoči hormon, rastni hormon, luteinizirajoči hormon, oksitocin, prolaktin, tiroliberin, tirotropni hormon, glukagon,
- **steroidni hormoni;** aldosteron, estrogeni, progesteron, testosteron, kortizol,
- **derivati aminokislina;** ščitnični hormoni, kateholamini, dopamin (7).

Nadalje delimo hormone glede na učinek, ki ga izzovejo v tarčni celici preko vezave na ustreerneceptore. Tu poznamo agoniste, antagoniste, inverzne agoniste, delne (parcialne) agoniste. Pomembno je poudariti tudi to, da lahko hormoni delujejo le na en tip celic ali pa na različne tipe celic (angiotenzin II v ledvicah poveča izločanje aldosterona, v žilah pa deluje kot vazokonstriktor, zato poveča krvni tlak). Zgoraj predstavljene različne učinke hormonov lahko predstavimo grafično (učinek v odvisnosti od koncentracije hormona, ki mnogokrat ni monoton) v obliki sigmoidne krivulje ali tudi s krivuljo v obliki črke U ali obrnjene črke U. To je značilnost hormonskega delovanja, ki ga poimenujemo hormetični učinek (8).

### 1.1.2 Receptorji v endokrinem sistemu

Receptorji so proteinske molekule, ki se lahko nahajajo na površini ali v notranjosti celice. Točneje povedano, umeščeni so v celično membrano ali pa jo prebadajo. To pomeni, da imajo vezavne domene (podenote) v intra- in ekstracelularni tekočini glede na celico. Na receptorje, ki se nahajajo na površini celice, se vežejo peptidni hormoni in derivati aminokislin, ki ne morejo prehajati membrane zaradi svoje velikosti in prenizke lipofilnosti. Receptorji znotraj celice, tako imenovani znotrajcelični receptorji, se nahajajo v citoplazmi celice ali pa v celičnem jedru (jedrni receptorji). Učinke preko teh znotrajceličnih receptorjev izvajajo npr. steroidni hormoni, ki lahko prehajajo celične membrane zaradi svoje majhne molekulske mase in lipofilnosti. Za receptorje je značilna specifičnost vezave na določen hormon, kar se odraža z visoko afiniteto vezave, ki je običajno reverzibilna. Število receptorjev je končno, zato lahko pride do zasičenja receptorjev. Nekateri receptorji pa se lahko prilagodijo preko »up ali down« regulacije in tako spreminja svoje število. To se zgodi s povečanjem ali zmanjšanjem njihove sinteze, ki je pogosto funkcija količine stimulacije, ki jo je celica deležna. Za interakcijo receptorja s hormonom je pomembno število razpoložljivih receptorjev, koncentracija hormona in afiniteta tega hormona do receptorja (9).

**Jedrni receptorji** se nahajajo v notranjosti celice in so odgovorni za delovanje hormonov. Vežejo se neposredno na DNK in regulirajo ekspresijo sosednjih genov. Aktivirajo se z vezavo liganda nanje in nastanejo tako imenovani transkripcijski faktorji. Posledično pride do konformacijske spremembe receptorja. To je signal, ki aktivira niz dogodkov, ki vodijo do represije ali podvajanja tarčnih genov.

Imamo skupine jedrnih receptorjev, kjer so znani ligandi. Druga skupina pa so receptorji sirote, za katere ligandi niso znani ali ne obstajajo ali pa so bili šele pred kratkim odkriti. Jedrni receptorji imajo pomembno vlogo pri metabolizmu, razvoju in tudi nekaterih drugih fizioloških funkcijah.

Jedrne receptorje sestavlja pet domen (N, C, D, E, F): N terminalna domena je najbolj variabilna domena, tako po velikosti kot tudi po aminokislinski sestavi. C domena je na DNK vezova domena. D domena je gibljiva regija, ki omogoča vrtenje brez steričnih ovir. E domena je ligand vezova domena. F domena ni prisotna pri vseh jedrnih receptorjih in se spreminja v odvisnosti od vrste receptorja. C in E domeni sta najpomembnejši domeni, saj delujejo neodvisno druga od druge. Najpogosteje je za aktivacijo transkripcije potrebna hetero- ali homodimerizacija dveh jedrnih receptorjev. Tako jedrne receptorje lahko razvrstimo glede na način vezave na DNA na: homodimerne, heterodimerne ter monomerne (10).

V nadaljevanju navajamo lastnosti in pomen za delovanje živega organizma najpomembnejših jedrnih receptorjev, ki so najpogosteje tudi tarče HM.

**Androgeni receptorji** Aktivacija androgenih receptorjev (AR) je odgovorna za razvoj sekundarnih spolnih znakov pri moškem (moška plodnost, spolno obnašanje). Poleg tega vpliva na presnovo, razvoj in razmnoževanje. Žal pa je odločilna tudi za razvoj in nastanek raka prostate. Množično se AR nahajajo v moških tkivih urogenitalnega trakta in prostati. Naravna liganda za AR sta androgena  $5\alpha$ -dihidrotestosteron in testosteron. Ko se omenjena hormona vežeta na AR, se le-ta premakne v jedro in tam uravnava transkripcijo ciljnih genov. Zato pride do fiziološkega odziva, ki se kaže v androgenih učinkih (rast mišične mase, razvoj mod in moških splovil, povečanje kostne gostote, sprememba glasu, poraščenost, zaviranje skladisčenja maščob v nekaterih maščobnih celicah, vpliv na vedenje) (11).

**Estrogenski receptorji** Obstajata dve vrsti estrogenskih receptorjev (ER), transmembranski zunajcelični estrogenski receptor GPER (G protein-coupled estrogen receptor, z G proteinom sklopljen ER) in jedrni ER, ki se delijo na ER  $\alpha$  in  $\beta$ . Sodelujejo pri regulaciji rasti in razvoja, imajo pomembno vlogo pri razmnoževanju in splošnem zdravju človeka. Odločilno funkcijo igrajo tudi pri poteku različnih bolezni, kot so rak dojke, Alzheimerjeva bolezen, osteoporoz, kardiovaskularna obolenja. Naravni ligand za

ER je  $\alpha$ -estradiol, ki je odgovoren za izražanje estrogenih učinkov. Za ER  $\beta$  pa so naravni ligandi estradiol,  $5\alpha$ -androstan in  $17\beta$ -estradiol. ER  $\alpha$  je lokaliziran predvsem v maternici, jajčnikih, dojkah in kosteh, manj pa na prostati, testisih, različnih predelih možganov in belem maščevju. ER  $\beta$  pa najdemo v debelem črevesju, prostati, testisih, žlezah, žilnem endoteliju in določenih predelih možganov (12).

**Glukokortikoidni receptorji** Glukokortikoidni receptor (GR) se nahaja skoraj v vseh tkivih in celicah. Ima pomembno vlogo pri metabolizmu ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob. Naravni ligand je kortizol (hidrokortizon). Njegova funkcija je izražanje glukokortikoidne aktivnosti, to je spodbujanje glukoneogeneze in glikogenolize. Funkcija GR je tudi spodbujanje katabolizma beljakovin v skeletnem mišičju, s čimer se zagotavlja substrate za glukoneogenezo, obenem pa tudi aktiviranje ključnih encimov v jetrih za glukoneogenezo. Tako se poveča koncentracija glukoze v krvi. To je zaščita organizma oziroma tkiv, odvisnih od glukoze (možgani, srce) v času stradanja. Glukokortikoidi imajo velik vpliv tudi na imunski sistem, delovanje živčevja, ledvic, prebavil in hematopoetskih organov. Svoje glukokortikoidne učinke izražajo tako kot vsi jedrni receptorji preko regulacije genskega prepisovanja (13).

**Receptorji za ščitnične hormone** Ti receptorji sodijo v veliko družino jedrnih receptorjev. Naravna hormona, ki ju sintetizira in sprošča v kri ščitnica, sta tiroksin (T4) in trijodtironin (T3). Hormonska aktivnost je povezana predvsem s T3, T4 vezan na plazemske beljakovine pa predstavlja zалог hormona (14). Vezava hormona povzroči konformacijsko spremembo receptorja, ki deluje kot transkripcijski aktivator in povzroči ekspresijo genov. Receptorji za ščitnične hormone (TR) povezani z DNA v odsotnosti hormona pa običajno vodijo do represije transkripcije. Najpomembnejše funkcije receptorjev ščitničnih hormonov so regulacija metabolizma in delovanja srca. Poleg tega imajo odločilno vlogo v razvoju organizma. Pri ljudeh in tudi pri drugih sesalcih imamo 2 obliki receptorjev za ščitnične hormone, vsaka ima še 2 izooblike, torej imamo 4 vrste receptorjev za ščitnične hormone: TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2. Prisotnost različnih oblik receptorja je različna v različnih tkivih in različna v različnih razvojnih obdobjih pri človeku. TR $\alpha$ 1 je npr. značilna izooblika v možganih pri zarodku, kmalu po porodu pa je izražena TR $\beta$  oblika (15). TR $\alpha$ 1 je pri odraslih prisoten večinoma v srčnih in skeletnih mišicah, TR $\beta$ 1 največ v možganih, jetrih in ledvicah, TR $\beta$ 2 ekspresija je primarno omejena

na hipotalamus in hipofizo, TR $\alpha$ 2 je homologen z virusnim onkogenom c-erb-A in je široko izražen, vendar ne more vezati hormonov (16).

### 1.1.3 Hormonsko ravnovesje

Hormonsko ravnovesje v našem telesu se vzdržuje preko povezav med endokrinim sistemom, živčevjem in imunskim sistemom. Gre za vpliv na metabolizem, rast in mnoge specifične telesne funkcije (sestavo telesnih tekočin, kardiovaskularne funkcije, reprodukcijo in druge razvojne funkcije). Endokrine celice se odzovejo na različne notranje ali pa zunanje dražljaje, ki povzročajo, da te celice začnejo izločati hormone. Koncentracija hormona, ki potuje po krvi v endokrinem sistemu, je ustrezno uravnavana količina glede na potrebo po delovanju tega hormona. Ta nadzor poteka redko preko pozitivnih in pogosteje preko negativnih povratnih zank in tudi preko nekaterih drugih mehanizmov, ki se odzivajo na spremembe v telesu (oploditev, nosečnost, nastavitev hormonov na nove razmere nosečnosti). Koncentracija hormona, ki se nahaja v krvi, večinoma hitro pada, saj je njihova biološka razpolovna doba manj kot 10 minut. Izjema so šeitnični hormoni, kjer je  $t_{1/2}$  5 do 7 dni. Upoštevati je potrebno tudi, da se hormoni po sproščanju iz celic endokrinskega sistema v kri (hipotalamus, hipofiza, periferne endokrinske žleze) hitro razgrajujejo v manj aktivno obliko in se hkrati eliminirajo iz telesa (največ preko blata in urina). To pomeni dodaten padec njihove koncentracije v krvi, posledično pa pada tudi koncentracija v intracelularni tekočini znotraj celice. Zato hormon oddisociira z receptorja, posledica tega pa je prenehanje delovanja tega hormona na danem receptorju. V primeru, ko v telesu nastane stanje presežka ali pomanjkanja določenega hormona zaradi motnje v delovanju ali uravnavanju endokrinskega sistema zaradi vzrokov zunaj ali znotraj telesa, se soočamo s stanjem dekompenzacije regulacije. To lahko pripelje do akutnih ali kroničnih bolezenskih stanj (9,17).

## 1.2 Hormonski motilci

Obravnav problemov povezanih s HM zahteva kompleksen pristop. Zato smo se v tem poglavju odločili, da podamo problematiko z več vidikov.

**Definicija HM;** v endokrinem sistemu lahko pride do sprememb, ki so posledica fizioloških sprememb v telesu in so namenjene temu, da ohranjajo hormonsko ravnovesje. Lahko pa pride tudi do takšnih sprememb, ki povzročajo nenormalno delovanje organizma, ki se kaže v škodljivih posledicah. Te lahko povzročajo spojine, ki jih imenujemo HM.

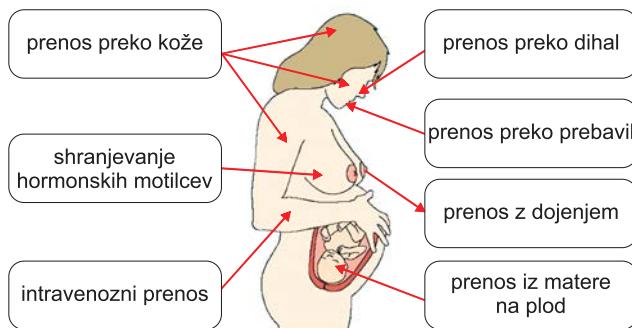
WHO (World Health Organization, Svetovna zdravstvena organizacija) definira, da je HM spojina ali zmes spojin, ki vpliva na eno ali več funkcij endokrinega sistema in s tem povzroči škodljive spremembe v organizmu ali na njegovih potomcih (1). Škodljive spremembe lahko nastopijo v razvoju, rasti, razmnoževanju, fiziologiji in dolžini življenjske dobe osebka ali cele populacije. Podobna je definicija EPA (Environmental Protection Agency, Agencija za zaščito okolja), ki navaja, da so HM kemikalije ali kemijske spojine, ki motijo sintezo, izločanje, transport, vezavo ali eliminacijo naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za vzdrževanje homeostaze, reprodukcije, razvoja in/ali obnašanje (18). HM so zelo heterogeni (19). Lahko jih razdelimo na različne načine (20). So takšni, ki se pojavijo v naravi kot hrana za človeka in živali (npr. fitoestrogeni) ali pa so sintetični (industrijska topila, maziva in njihovi stranski proizvodi, plastika, mehčalci, pesticidi, fungicidi in nekatere farmacevtske učinkovine). Glede na izvor jih razdelimo v naravne in umetne hormone (npr. fitoestrogeni, 3-omega maščobne kisline, kontraceptivi, zdravila za ščitnico), zdravila s hormonskim neželenim učinkom (npr. naproxen, metoprolol in klofibrat), v industrijske in gospodinjske kemikalije (npr. ftalati, zaviralci ognja, mehčalci, 1,4-diklorobenzen, topila) ter stranske proizvode industrijskih in gospodinjskih procesov (npr. dioksin, pentaklorobenzen) (21).

**Zgodovinski pregled ugotavljanja pomena HM;** študije o težavah, ki jih zdaj imenujemo hormonske motnje, so bile objavljene že v letih 1940 in 1950, ko so obsežno preučevale vpliv HM na divje živali. Ker narašča skrb za javno zdravje pri dolgotrajni izpostavitvi nizkim odmerkom HM, potekajo intenzivne raziskave o njihovih učinkih že več kot petnajst let (3), kar se kaže z naraščajočim številom znanstvenih člankov o tej temi (22). Študija o hormonskih motnjah se je začela z znamenitim sestankom v konferenčnem centru v Wingspreadu v ZDA, ki ga je julija 1991 organizirala znanstvenica Theo Colborn s sodelavci. Zbrala je podatke z zelo ločenih področij in uvedla novo paradigma o toksičnem delovanju HM. Od takrat naprej so HM predmet različnih pravnih uredb, ki jih oblikujejo različne mednarodne organizacije, regulatorne inštitucije EU, ZDA in nekaterih drugih držav (23). Skrb različnih mednarodnih organizacij se kaže v omejevanju in prepovedi uporabe nekaterih kemikalij, kot so bisfenol A in nekaterih ftalatov, tako v ZDA kot v EU in nekaterih drugih državah (24, 25, 26).

**Vloga HM v okolju;** različne študije dokazujejo, da smo obdani s številnimi HM, ki so prisotni v zraku, vodi in v zemlji. Študije na živalih so za kemikalije, ki so HM,

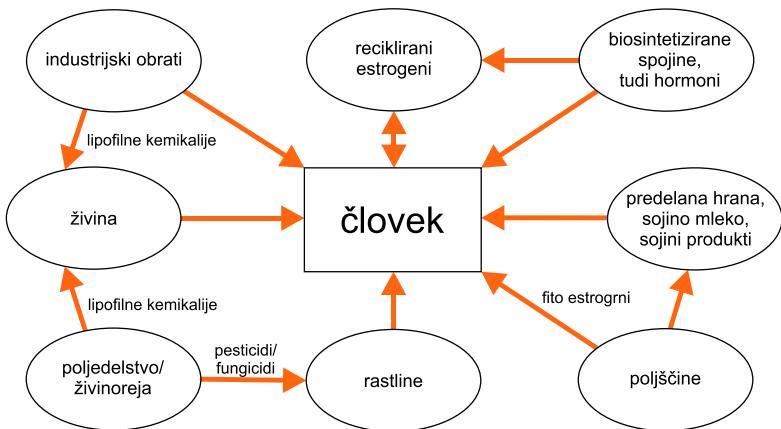
pokazale, da posnemajo/zavirajo delovanje ali modulirajo sintezo in metabolizem nevropeptidov, nevrotransmiterjev ali nevrohormonov (27). To povzroči različne spremembe fizioloških, vedenjskih in hormonskih procesov v živalskih organizmih, kar ima za posledico spremenjeno reprodukcijo, razvoj, sposobnost za spopadanje z izzivi in številne druge nepravilnosti (27). Sicer pa HM v glavnem povzročajo spremembe hormonskega sistema, ki je vključen v uravnavanje metabolizma, spolni razvoj, produkcijo in porabo inzulina, rast, stresni odgovor, spolno obnašanje, razmnoževanje in razvoj zarodka. Različne pre- in postnatalne eksperimentalne študije na miših nakazujejo škodljive učinke HM, kot so prezgodnja puberteta, povečana telesna masa, spremembe mlečnih žlez, spremenjen genitalni trakt pri samičkah, sprememba strukture in funkcije ventralnega dela prostate pri miših, zmanjšana rodnost in plodnost, maskulinizacija obnašanja in struktur možganov pri samičkah ter zmanjšana plodnost pri moških potomcih (28). Za razliko od eksperimentalnih živali smo ljudje in divje živali izpostavljeni kompleksni mešanici HM. Ključnega pomena je tudi način stika s HM. Prenos HM v človeško telo je prikazan na Sliki 1. Pomembno vlogo igra tudi obstojnost HM v okolju. Nekateri so obstojni, drugi ne. Nekatere HM razgrajujejo sončna svetloba, bakterije in kemijski procesi, drugi pa so bolj obstojni in so v okolju prisotni različno dolgo časa (29). Mnogi procesi odstranjevanja ne morejo popolnoma odstraniti HM iz okolja. Novejše tehnike prinašajo napredek pri odstranjevanju HM iz okolja. Velik uspeh so dosegli z oksidacijo z ozonom, s klorom,  $TiO_2$  in natrijevim permanganatom, ki učinkovito razgrajujejo HM. Zaradi teh uspešnih oksidacij znanstveniki sedaj razmišljajo o razgradnji s pomočjo oksidacijskih procesov v prisotnosti UV (30).

Tudi tisti HM, ki niso obstojni, pridejo v stik z živimi bitji zaradi rednega odlaganja v okolje. Ko pridejo v telo, so HM podvrženi metaboličnim procesom in procesom eliminacije. Nekateri se akumulirajo v maščevju in se eliminirajo na različne načine (izločajo se lahko preko mleka in gredo v potomce). Jetra so glavna pot metabolizma. Presnovki pa se potem izločajo iz telesa preko urina in blata (29).



Slika 1. Prenos hormonskih motilcev v človeško telo (31).

**Viri izpostavitve HM;** viri izpostavitve HM so običajno raznoliki in na široko porazdeljeni v okolju. Različne države te substance različno uporabljajo, izpostavljenost ni zlahka predvidljiva niti ne konstantna. Nekatere države so uporabo teh kemikalij že prepovedale, druge pa jih še uporabljajo. Študije, ki kažejo na direktno vzročno povezavo med posamezno kemikalijo in endokrino ali reproduktivno disfunkcijo pri ljudeh in divjih živalih, so bile izvedene le za posamezne kemikalije. Na voljo ni raziskav, kako vpliva dolgotrajna izpostavitev široki mešanici onesnaževalcev, med katerimi so tudi HM. Do izpostavljenosti HM lahko pride s pitjem kontaminirane vode, dihanjem onesnaženega zraka, z uživanjem onesnažene hrane ali če pridemo v stik z onesnaženo zemljo, izpostavljeno pesticidom, mehčalcem, alkil fenilom in zavircalcem ognja. To so kemikalije, ki jih pogosto uporabljam v kmetijstvu, industriji in gospodinjstvu. Prav ti HM lahko končajo v vodnjem okolju. Vzrok je nepopolna odstranitev onesnaževalcev v procesu čiščenja odplak in izpusti v vodo in zemljo (22). Nekateri sistemi čiščenja vode, kot so kosmičenje, sedimentacija in kloriranje, ne morejo odstraniti in uničiti teh onesnaževalcev iz vode (32). Posebej alarmantno je to, da do neželenih/toksičnih učinkov lahko pride pri zelo nizkih koncentracijah HM. Veliko HM, ki končajo v odpadnih vodah, izvira iz farmacevtskih in drugih odpadnih voda (33). Tu lahko najdemo potencialne HM, kot so naravni človeški hormoni, hormoni iz farmacevtskih proizvodov, kot so kontraceptivi. Lahko so v detergentih, milih, plastiki, hrani in izdelkih za osebno nego. Študije kažejo, da so bili HM, kot sta estrogen in androgen, ki se nahajata povsod v okolju v sledeh, prav tako sproščeni iz različnih panog industrije (34). Raziskovalci EPA so dokazali, da zmes kemikalij v nekaterih odpadnih vodah povzroča feminizacijo ribje populacije (13). Opazne so tudi katastrofalne spremembe na rastlinah v okolju, kar povzroča veliko skrb. Na Sliki 2 so prikazani viri in poti izpostavitve HM pri ljudeh.



Slika 2. Viri in poti izpostavitve hormonskim motilcem pri ljudeh (31).

**Mehanizmi delovanja HM;** zaradi raznolikosti HM je težko predvideti njihov mehanizem delovanja. Mehanizem delovanja so predvideli iz študij na živalih raziskovalci National Institute of Environmental Health Sciences (Narodni inštitut za okoljske zdravstvene vede) (31). HM lahko delujejo po dveh poteh. Lahko delujejo direktno na kompleks hormon-receptor ali pa direktno na specifične proteine, ki so vključeni v nadzor transporta hormonov v pravem času na pravi kraj (31). HM lahko posnemajo ali delno posnemajo naravne hormone, tako da potencialno povzročajo povečano stimulacijo/zaviranje aktivnosti jedrnih receptorjev (npr. ER, AR, TR). Delujejo lahko kot antagonisti, tako da se vežejo na receptorje endogenega hormona v celici. Tako se endogeni hormon ne more vezati na receptor, ni signala do DNA, telo se ne odzove. HM lahko motijo ali blokirajo naravne hormone in njihove receptorje tudi s spreminjanjem njihovega metabolizma v jetrih. Nekateri HM lahko vplivajo na negenomske poti endogenih receptorjev in povzročajo endokrine motnje (35). Izpostavitev kemikalijam lahko vpliva na zdravje več naslednjih generacij (31). Pri živalih so dokazali, da so spremembe zaradi izpostavitvi HM v obdobju zarodnih celic lahko vzrok za spremembo razvoja tkiva in s tem bolezni v zreli dobi preko neznanega mehanizma. Čeprav poznamo mehanizme, preko katerih HM delujejo v biološkem sistemu, pa ne moremo zagotovo reči, da so HM vključeni v določeno bolezen. Da se z gotovostjo določi njihovo sodelovanje pri določeni bolezni, je treba pretehtati več vidikov, kot so enkratna izpostavitev več znanim in neznanim HM, individualne razlike pri metabolizmu in sestavi telesa (variiranje razpolovne dobe, obstojnost, razgradnja HM v telesnih tekočinah in tkivih), razlike v genetskem polimorfizmu in latentnost od izpostavljenosti HM do izraženih motenj. Še več,

pojav bolezni je verjetno posledica kronične izpostavitve nizkim količinam mešanic HM, kar pa je zelo težko dokazati (20).

**Primerjava učinkov endogenih hormonov in hormonskih motilcev;** na splošno HM delujejo v 100 do 1000 krat večji koncentraciji kot endogeni hormoni (36). Endogeni hormoni delujejo preko specifičnih receptorjev, le nekateri lahko aktivirajo/zavirajo delovanje več različnih receptorjev. HM pa so večkrat promiskuitetni in delujejo preko več receptorjev. Koncentracije izpostavitve HM so praviloma nizke (37). Težko je narediti podrobne primerjave med študijami in ocenami učinkov mešanic HM. Kemijske analize in ocene izpostavljenost HM še niso standardizirane (31). Veliko je problemov, ker so HM različno obstojni, razpolovna doba *in vivo* je kratka, strukture HM so različne (31). Tako pri hormonih kot pri HM koncentracije v krvi vedno ne odražajo aktivnosti. Endogeni hormoni so lahko vezani na serumske proteine, v prosti obliki so prisotni v zelo nizkih koncentracijah. Prav tako so lahko HM vezani na serumske proteine. Pri endogenih hormonih ni bioakumulacije, pri HM je bioakumulacija možna. Za endogene hormone in HM je značilen nelineraren odnos med odmerkom in odgovorom. Pri obojih so učinki tkivno specifični in specifični za določeno življensko obdobje. HM imajo različne učinke pri odraslih, pri razvoju zarodka in pri otrocih (20). Večja nevarnost je, če so HM izpostavljeni organizmi v zgodnjem razvoju. Škodljive posledice HM se lahko kažejo šele na naslednjih generacijah, čeprav le-te niso direktno izpostavljene HM (20).

**Škodljivi učinki HM za človeško zdravje;** podatki epidemioloških študij pri ljudeh kažejo razširjenost nekaterih bolezni, ki so povezane s HM (rak dojk, prostate, testisov, kot tudi diabetes, debelost in zmanjšana plodnost). Nekatere HM, ki so znani, da povzročajo škodljive učinke za človeško zdravje, so v ZDA prepovedali (dietilstilbestrol, poliklorirani bisfenoli, DDT) (38). HM lahko povzročajo spremembe različnih organskih sistemov. HM lahko direktno motijo delovane ščitnice v več fazah, npr. v zapletenem sistemu prevzema joda, produkciji ščitničnega hormona, medsebojnih pretvorbah tiroidnih hormonov, celičnem prevzemu, aktiviranju celičnih receptorjev, razgradnji in v izločanju hormonov (39). HM, ki motijo nevroendokrino homeostazo, lahko povzročajo motnje v hipotalamus-hipofiza-ščitnični osi. To vodi do motenj metabolizma in energijskega ravnovesja. HM lahko motijo živčni sistem z različnimi mehanizmi. Hormonski in živčni sistem sta med seboj zelo povezna (40). HM lahko povzročajo motnje pri moških in ženskah v zvezi z njihovo spolnostjo. Znano je, da estrogeni in androgeni v velikem obsegu vplivajo na

razvitje moškega osebka. HM povzročajo bolezni pri ženskah in moških, ker HM lahko delujejo kot estrogeni in/ali androgeni antagonisti (20). Bolezni reproduktivnega sistema pri ženskah, ki so povezani s HM, so prezgodnja puberteta, sindrom policističnih jajčnikov, prezgodnja odpoved jajčnikov, povečana rast endometrija in večja možnost za raka dojke (42). Motnje pri moških se izražajo kot npr. anomalije sperme, hipospadija in ektopični testisi in so najbrž posledica perinatalne izpostavitve HM med občutljivimi fazami spolne diferenciacije ploda (42, 43).

### 1.3 Metode določanja hormonskih motilcev

Zdravstveni problemi, ki lahko nastanejo zaradi izpostavitve HM, so danes tako zaskrbljujoči, da so se med seboj povezale različne organizacije, kot so OECD (Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj), UNEP (Program Združenih narodov za okolje) in IPCS (Mednarodni program za kemijsko varnost) (31). Ena od njihovih skupnih nalog je ocena tveganja in razvoj različnih testnih metod za zdravje ljudi in okolja pri izpostavitvi tovrstnim kemikalijam. Določanje HM je zelo zapleteno, saj so različnih struktur, njihovi mehanizmi motnje endokrinega sistema so različni ter pogosto raznovrstni, in večkrat se škodljivi učinki na organizme kažejo šele po dolgih letih po izpostavitvi (31). Pomembno je, da bi bila testiranja in ocenjevanje HM globalno poenotena. S tem namenom je leta 1996 OECD oblikovala posebno skupino EDTA (Ocenjevanje in testiranje HM) (44). Ta skupina je oblikovala možne presejalne teste in vire podatkov o endokrini toksičnosti, ki so urejeni v pet nivojev. **1. nivo** ocenjuje spojine glede na že znane podatke, ki niso pridobljeni s testiranjem. To so fizikalno-kemijske lastnosti (npr. molska masa, reaktivnost in posledično biorazgradljivost), vsi dostopni (eko)toksikološki podatki iz standardiziranih in nestandardiziranih testov, pregled, v katero kemijsko skupino jih uvrščamo, QSAR in druge napovedi *in silico* ter napovedi z modeli ADME. **2. nivo** so podatki iz testov *in vitro*, ki dajejo podatke o izbranih mehanizmih/poteh na sesalcih in nesesalcih (npr. afiniteta vezave na ER in AR, transaktivacija ER, androgena in tiroidna transaktivacija, steroidogeneza *in vitro*). **3. nivo** so testi *in vivo*, ki dajejo podatke o endokrinih mehanizmih toksičnosti pri sesalcih (npr. uterotrofni test, Hershbergerjev test) in nesesalcih. **4. nivo** so testi *in vivo*, ki dajejo podatke o škodljivih endokrinih učinkih po določenem času izpostavitve (npr. 28-dnevna študija s ponavljanjočimi odmerki, 90-dnevna študija s ponavljanjočimi odmerki, dvogeneracijska študija reproduktivne toksičnosti) in **5. nivo** so testi *in vivo*, ki

zagotavljajo bolj celovite podatke o škodljivih endokrinih učinkih na relevantnih endokrinih točkah v daljših obdobjih življenjskega cikla organizma (npr. razširjena študija o reproduktivni toksičnosti ene generacije, študija reproduktivne toksičnosti na dveh generacijah) (45, 46).

**Metode *in silico*** za določanje endokrine toksičnosti spadajo v 1. nivo ocenjevanja toksičnosti HM glede na razdelitev OECD. Gre za računalniške metode, ki potekajo virtualno v nasprotju s procesi *in vitro* in *in vivo* (47). Ta testiranja so hitrejša incenejša kot testiranja *in vitro* in *in vivo*. Z njimi se izognemo odvečnim testiranjem na živalih. *In silico* metode in druge alternativne metode, s katerimi pridobivamo podatke o fizikalno-kemijskih, okolijskih in toksikoloških lastnostih kemikalij, so priporočene s strani regulatornih ustanov EU (48). HM nas obdajajo praktično povsod, kjer živimo. Ker imajo škodljiv vpliv na naše zdravje, je zelo pomembno, da jih hitro identificiramo. To je nemogoče s standardnimi testi *in vivo* in *in vitro*. To možnost nam dajejo računalniške presejalne metode oz. računalniški modeli in metode za ocenjevanje toksičnosti. Sem sodijo sidranje potencialno toksične snovi v vezavno mesto endogenega liganda jedrnega receptorja (docking), QSAR modeliranje in grupiranje ter kategorizacija kemikalij (read across- metoda navzkrižnega branja). Eden takšnih programov je ED, ki sodi med računalniške programe za sidranje spojin v vezavno mesto 12 jedrnih receptorjev in predstavlja metodo, ki je enostavna za uporabo in primerna za napovedovanje interakcij s temi receptorji za večino kemikalij (6). Podrobnejše ga bomo predstavili v poglavju Materiali in metode.

#### 1.4 Barvila v kozmetičnih izdelkih

Barve so sestavni del našega življenja. Vplivajo na naše počutje, na nas lahko delujejo pomirjujoče ali dražeče, lahko nas privlačijo ali odbijajo. Posegajo v vsa področja našega življenja. Znan je tudi njihov vpliv na zdravje. Sama zaznava barve je povezana s sposobnostjo človeškega očesa, da zazna elektromagnetno sevanje v intervalu od 400-700 nm. Vpliv barv na človeka s pridom uporabljajo različne vrste industrije za večjo prodajo obarvanih izdelkov. Tudi kozmetična industrija EU, ki ima z več kot 4000 proizvajalci in več kot 1,5 milijona zaposlenimi ljudmi pomembno mesto v svetovnem gospodarstvu, se še kako zaveda tega tako imenovanega "psiho marketinga". A barvila, ki so sestavni del večine KI in ga naredijo zanimivega za določeno ciljno skupino uporabnikov, imajo v KI tudi druge funkcije. Ga značilno obarvajo in povečajo njegovo prepoznavnost ter tako

olajšajo identifikacijo, korigirajo neenotno obarvanost, lahko tudi izboljšajo stabilnost izdelka in formulacije, namerna motnost varuje aktivne kozmetične sestavine, ki so občutljive na svetlobo (npr. z uporabo TiO<sub>2</sub>, ZnO). Posebno vlogo imajo barvila v dekorativni kozmetiki, katere namen je prekriti določene nepravilnosti na koži ali poudariti naravno lepoto in tako ustvariti bolj svež in mladosten videz, kar je želja večine uporabnikov. Da lahko barvila vključimo v KI, morajo imeti določene lastnosti. Med najpomembnejšimi so ustrezena topnost (v vodi topna/netopna), morajo biti stabilna tako med izdelavo kot tudi v času shranjevanja (temperaturne spremembe, svetloba, hidroliza, mikroorganizmi, oksidoreduktijski procesi, sprememba pH), imeti morajo visoko barvno moč, da jih v KI dodamo čim manj, morajo biti nereaktivna in kompatibilna z ostalimi sestavinami, fiziološko sprejemljiva, brez vonja in okusa ter tudi ekonomsko dostopna. Barvila v KI morajo biti varna. Ne smejo povzročati preobčutljivostnih reakcij, ne genotoksičnosti oz. rakotvornosti in ne reproduktivnih nepravilnosti. Uredba št. 1223/2009 evropskega parlamenta in sveta (5) definira KI takole: "*kozmetični izdelek pomeni katero koli snov ali zmes, namenjeno stiku z zunanjimi deli človeškega telesa (povrhnjico, lasičem, nohti, ustnicami in zunanjimi spolnimi organi) ali z zobmi in sluznico ustne votline zaradi izključno ali predvsem njihovega čiščenja, odišavljenja, spreminjanja njihovega videza, njihovega varovanja, ohranjanja v dobrem stanju ali korekcije telesnega vonja.*" Barvila v isti uredbi v poglavju, kjer opredeljuje pojme, opisuje kot: "*barvila pomeni snovi, ki so izključno ali v glavnem namenjena barvanju kozmetičnega izdelka, celotnega telesa ali določenih delov telesa, in sicer na osnovi absorpcije ali odboja vidne svetlobe.*"

V Prilogi IV Uredbe št. 1223/2009, ki je seznam dovoljenih barvil v KI, so barvila predstavljena s kemijskim imenom, številko barvnega indeksa oz. imenom skupnih sestavin, kot je ta naveden v glosarju, CAS št. (št. kemikalije po sistemu ameriške Službe za povzetke o kemikalijah) in ES številko, nekatera tudi z E številko. Skoraj vsako barvilo ima poleg kratice CI (barvni indeks) petmestno število, ki jo pridobi glede na svojo kemijsko strukturo in ga uvršča v določeno skupino barvil (npr. nitrozo, nitro, monoazo, diazo, triazo, poliazo) (49). Prilog IV Uredbe št. 1223/2009 podrobneje predstavljamo v poglavju 3.1. Materiali.

#### 1.4.1 Razdelitev barvil

Barvila razdelimo na različne načine: po izvoru jih delimo na naravna in sintetična; kemijsko na organska in anorganska; glede na topnost v neki osnovi, pa na topna barvila (dyes) in netopne pigmente.

V kozmetiki barvila delimo na: organske pigmente (netopni v vodi, olju, alkoholu in drugih topilih: azo pigmenti, indigoidi, ftalocianidi) in barvila (topna v različnih topilih: azo barvila, ksanteni, kinolini, trifenilmetani, antrakinoni); naravna barvila; anorganske pigmente (netopni v večini topil-TiO<sub>2</sub>, ZnO, ultramarini); pigmente, ki dajajo biserni sijaj.

Za naravna barvila skoraj ne poročajo o neželenih učinkih, a se jih zaradi njihovih slabih lastnosti, kot je slabša moč barvanja, občutljivost na svetlobo in neprofitabilnost, redkeje uporablja. Lahko jih pridobivajo iz rastlin (npr. riboflavini, karoteni, antocianini, betanin), iz živali (karmini) in tudi iz sladkorjev (karamel). Zgodovina sintetičnih barvil sega v leto 1856. Od več kot pol milijona različnih sintetičnih barvil se jih uporablja le okoli 1 % (50). Praviloma so ta barvila v obliki soli in so vodotopna, so cenejša kot naravna, lahko se med seboj mešajo. Njihova sinteza je dobro znana in standardizirana in so dobro topna v različnih topilih (voda, etanol, glicerol). Med sintetična barvila spadajo različne skupine barvil. Glede na njihovo kemijsko strukturo so najpomembnejše skupine: azo barvila, trifenilmetani, sulfonirani indigi, ksanteni, kinolini in antrakinoni. Kemijsko barvila delimo na anorganska in organska. Anorganska barvila so pravzaprav anorganski pigmenti, med katere uvrščamo kovine, kovinske okside in silikate kovin. Imenujemo jih tudi mineralni pigmenti. Anorganska barvila v vodi niso topna, organska pa praviloma so. Organska, ki so pripravljena v obliku lakov (t.i. lakes), so v vodi netopna, topijo pa se npr. v oljih. V izbranem mediju topne barve (dyes) in netopne pigmente, ne ločuje le topnost, pač pa tudi druge lastnosti in s tem povezana uporaba. Pri uporabi topnih barvil (dyes), je obarvanost izdelka posledica njihovega raztopljanja v mediju in absorpcije določenega spektra vidne svetlobe (določen del slednje absorbirajo, drugi del odbijejo). Uporabljajo se v glavnem za obarvanje KI. Pigmenti, ki so v mediju navadno netopni, so največkrat kristalinični delci anorganskega izvora, ki jih v izbranem mediju (enakomerno) dispergiramo, da nastane motna suspenzija. Obarvanost izdelka s pigmenti je posledica sisanja in odboja vidne svetlobe. Uporabljajo se predvsem v dekorativni kozmetiki ali za zaščito kot UV filtri, kot sta npr. ZnO, TiO<sub>2</sub> (51, 52).

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Med širokim izborom KI mnogi vsebujejo barvila. Zaradi njihove vsakodnevne uporabe je velika verjetnost, da ob izpostavitvi povzročijo neželene učinke. V zadnjem času se precej pozornosti namenja spojinam, ki povzročajo motnje v hormonskem sistemu, HM. Že v nizkih koncentracijah motijo hormonsko homeostazo. Svoj toksičen učinek lahko dosežejo neposredno, z vezavo na hormonske receptorje (agonisti, antagonisti) ali pa motnjo hormonskega sistema izzovejo posredno (motijo sintezo, porazdelitev in razgradnjo endogenih hormonov oz. hormonskih receptorjev). Najbolj občutljivi za škodljive učinke HM so organizmi v razvoju. Poškodbe (npr. morfološke spremembe v različnih tkivih, funkcionalne motnje, vedenjske motnje, maligna obolenja) so lahko hude in trajne, večkrat se pokažejo šele čez leta. Tudi za nekatere kozmetične sestavine so že dokazali, da motijo hormonsko homeostazo. Pri osebni uporabi jih lahko dnevno nanašamo na zunanje dele telesa (koža, lasišče, nohti, ustnice, zunanji spolni organi, prehajajo tudi preko sluznice ustne votline). Lahko pa prihajamo v stik z njimi tudi posredno, saj na različne načine prehajajo v naše bivalno okolje (ko jih uporabljam drugi ljudje, med proizvodnjo, med skladiščenjem in med odlaganjem).

V diplomski nalogi bomo z uporabo računalniškega programa ED ugotavliali, ali med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU (Priloga IV Uredbe št. 1223/2009 in njene dopolnitve), obstajajo tudi takšna, ki kažejo afiniteto za vezavo na jedrne receptorje, kar je posledično lahko povezano z možnostjo sprožitve endokrinih motenj. Program je bil razvit na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani in na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Ta program omogoča sidranje spojine v aktivna mesta 12 različnih jedrnih receptorjev. Z njim bomo tako ocenili verjetnost vezave 153 barvil, ki so trenutno dovoljena za uporabo v KI, na 12 različnih jedrnih receptorjev. Naše dobljene rezultate s programom ED bomo primerjali s podatkovno bazo podatkov TEDX za izmenjavo informacij o HM.

Na osnovi rezultatov, ki jih bomo dobili s programom ED, bomo poskušali dokazati ali zavreči naslednje hipoteze:

1. Med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI, so spojine, ki kažejo zelo veliko afiniteto vezave na testirane jedrne receptorje glede na rezultate dobljene s programom ED in tako obstaja možnost, da so potencialni HM.
2. Med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI, so spojine, ki ne kažejo verjetnosti vezave na testirane jedrne receptorje glede na rezultate dobljene s programom ED.
3. Napovednost ED o interakciji barvil z jedrnimi receptorji se sklada s podatki podatkovne baze za izmenjavo informacij o HM TEDX.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

Barvila, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, za katera smo ugotavljali verjetnost vezave na jedrne receptorje, smo povzeli po Seznamu dovoljenih barvil v kozmetičnih izdelkih iz Priloge IV Uredbe št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih, ki je bila objavljena v Uradnem listu Evropske unije L 342/59, dne 22.12.2009 in njenih dopolnitvah (5, 54). Barvila v diplomi so poimenovana v skladu s to uredbo in z imeni INCI (International nomenclature cosmetic ingredient- mednarodna nomenklatura kozmetičnih sestavin).

##### 3.1.1 Opis seznama dovoljenih barvil v kozmetičnih izdelkih

Za EU in vse njene članice, torej tudi za Slovenijo, je 11. julija 2013 stopila v veljavo Uredba št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih (sprejeta 30. novembra 2009). Vsebuje deset poglavij: Področje uporabe, opredelitve pojmov; Varnost, odgovornost, prosti pretok; Ocena varnosti, dokumentacija z informacijami o izdelku, priglasitev; Omejitve za nekatere snovi; Testiranje na živalih; Informacije za potrošnike; Nadzor trga; Neizpolnjevanje obveznosti, zaščitna klavzula; Upravno sodelovanje; Izvedbeni ukrepi in končne določbe. Za podrobnejšo opredelitev določenih področij so dodane priloge. Za področje barvil je v Prilogi IV dodana preglednica, ki vsebuje seznam 153 dovoljenih barvil v KI. Na Sliki 3 je prikazan del seznama Priloge IV s Seznamom dovoljenih barvil v KI.

## PRILOGA IV

## SEZNAM DOVOLJENIH BARVIL V KOZMETIČNIH IZDELKIH

## Preamble

Brez poseganja v druge določbe te uredbe barvilo zajema svoje soli in karminske rdeča barvila, kadar pa je barvilo izraženo kot posamezna sol, pa druge svoje soli in karminske rdeča barvila.

številka	Kemijsko ime	Opredelitev snovi					Pogoji			Besedilo pogojev uporabe ali opozoril
		Številka barvnega indeksa/Ime skupnih sestavin kot v glosarju	Številka CAS	Številka ES	Barva	Vrsta izdelka, deli telesa	Najvišja koncentracija v izdelkih, pripravljenih za uporabo	Drugo		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
1	Natrijev tris(1,2-naftokinon 1-oksimato-O,O') ferat (1-)	10006			zelena	izdelki, ki se izperejo				
2	Trinatrijev tris[5,6-dihidro-5-(hidroksiimino)-6-oksonaftalen-2-sulfonato(2-)-N5,O6]ferat(3-)	10020			zelena	se ne uporablja v izdelkih, ki se nanašajo na sluznice				
3	Dinatrijev 5,7-dinitro-8-oksidonaftalen-2-sulfonat in njegova netopna barjeva, stroncijeva in cirkonijeva pigmenti	10316			rumena	se ne uporablja				
4	2-[4-(4-metil-2-nitrofenil)azo]-3-okso-N-fenilbutiramid	11680			rumena	se ne uporablja v izdelkih, ki se nanašajo na sluznice				

Slika 3. Del seznama dovoljenih barvil v KI iz Priloge IV Uredbe št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih.

Barvila, ki so dovoljena za uporabo v KI, so predstavljena v preglednici z 10 stolpcem, označenimi s črkami od a do j. Stolpec a podaja referenčno številko barvila od 1 do 153. V stolpcu b je barvilo opredeljeno s kemijskim imenom, v stolpcu c je podana številka barvnega indeksa ali ime skupnih sestavin, kot so v glosarju, stolpec d podaja identifikacijsko številko CAS, stolpec e identifikacijsko številko ES in stolpec f barvo barvila. Naslednji trije stolpci za posamezna barvila opisujejo specifične pogoje uporabe: stolpec g vrsto izdelkov in dele telesa, stolpec h najvišjo koncentracijo v izdelkih, pripravljenih za uporabo, stolpec i drugo, kot npr. E št., merila čistosti. Stolpec j je namenjen za besedilo pogojev uporabe ali opozoril.

### 3.1.2 Opredelitev barvil v prilogi

V prilogi so barvila predstavljena s kemijskim imenom. Nadalje je 144 barvil opredeljeno s številko Colour Index (CI) v skladu z mednarodno referenčno bazo podatkov o barvilih Colour Index International, 9 barvil na koncu priloge pa nima CI številke, pač pa je predstavljeno z imenom skupnih sestavin kot v glosarju Uredbe št. 1223/2009 (npr. riboflavin, karamel, kapsantin, kapsorubin, rdeča rdeče pese, antocianini, Bromothymol blue, Bromocresol green in Acid Red 195) (5). Colour Index International vzdržujeva in posodablja združenji Society of Dyers and Colourists in American Association of Textile

Chemists and Colorists že od leta 1925. V okviru te mednarodne baze podatkov je poimenovanje barvil (barv in pigmentov) dvojno. Barvilo tako pridobi barvni indeks-identifikacijsko številko (CI Constitution Number) ali barvni indeks-generično ime (CI Generic Name). Če je poimenovano z identifikacijsko številko kot v zgoraj omenjeni uredbi, ima barvilo poleg okrajšave CI še petmestno številko. Ta ni izbrana naključno ali glede na namen uporabe, pač pa na osnovi njihove kemijske strukture. Tako nam npr. razpon CI 11000 do 19999 navaja, da so to monoazo barvila, trifenilmetanska barvila med CI 42000 in 44999, anorganski pigmenti so označeni s CI med 77000 in 77999. Ta način opredelitve barvil je v primerjavi s staro zakonodajo, ko so bila barvila poimenovana z generičnimi imeni, veliko bolj enostaven in pregleden (51, 54, 55). Na Sliki 4 so prikazane skupine barvil glede na kemijsko strukturo s pripadajočim razponom CI številk.

skupina barvil	CI številka
nitrozo	10000—10299
nitro	10300—10999
monoazo	11000—19999
diazo	20000—29999
triazo	30000—34999
poliazo	35000—36999
azo	37000—39999
stilben	40000—40799
karotenoid	40800—40999
difenilmelan	41000—41999
triarilmelan	42000—44999
ksanten	45000—45999
akridin	46000—46999
kvinolin	47000—47999
metin	48000—48999
tiazol	49000—49399

skupina barvil	CI številka
indamin	49400—49699
indofenol	49700—49999
azin	50000—50999
oksaizin	51000—51999
tiazin	52000—52999
žveplo	53000—54999
lakton	55000—55999
aminoketon	56000—56999
hidroksiketon	57000—57999
antrakinon	58000—72999
indigoid	73000—73999
ftalocianin	74000—74999
naravna	75000—75999
oksidacijske baze	76000—76999
anorganski pigmenti	77000—77999

Slika 4. Glavne kategorije za razvrščanje barvil v skladu z mednarodno referenčno bazo podatkov o barvilih Color Index International (55).

Da je prepoznavanje barvil, ki se uporablja v KI lažje, sta v preglednici zgoraj omenjene priloge v stolpcih d in e pri nekaterih barvilih dodani številki CAS in ES. Številka CAS je enoznačni številčni identifikator kemijskih elementov, spojin, polimerov, bioloških sekvenc, zmesi in zlitin. Za podeljevanje je pooblaščen CAS (Chemical Abstracts Service), ki je oddelek Ameriškega kemijskega društva. Sama številka nima nobenega posebnega dodatnega pomena (56).

Nekatera barvila, ki so dovoljena za uporabo v KI, se uporabljajo tudi v živilih. Pri njih je v stolpcu i priloge dodano število E in podatek, da zanje veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES. Sistem označevanja s števili E je sad prizadavanj Evropske unije za večjo preglednost označevanja na področju aditivov v živilih. Aditiv ima tako značilno predpono E, ki ji sledi številka (5,57).

### 3.2 Metode

V množici raznolikih kemikalij, ki jih danes skoraj vsak človek srečuje v vsakdanjem življenju v svojem bivalnem okolju, so nekatere HM. Povzročajo motnje hormonskega sistema ali pa posredno povzročajo motnje različnih organskih sistemov (6). Pomembno je, da jih hitro prepoznamo. To možnost nam nudijo alternativne metode, ki so hitre in poceni. Z njimi se izognemo spornim testiranjem na živalih. Med njimi imajo pomembno vlogo metode *in silico*, ki nam dajo rezultat s podporo računalnikih programov. Na področju KI nas k temu vzpodbuja in obvezuje nova kozmetična regulativa iz leta 2009 (5,6). Za oceno endokrinega delovanja barvil dovoljenih za uporabo v KI smo v diplomski nalogi uporabili računalniški program ED.

#### 3.2.1 Program Endocrine Disruptome

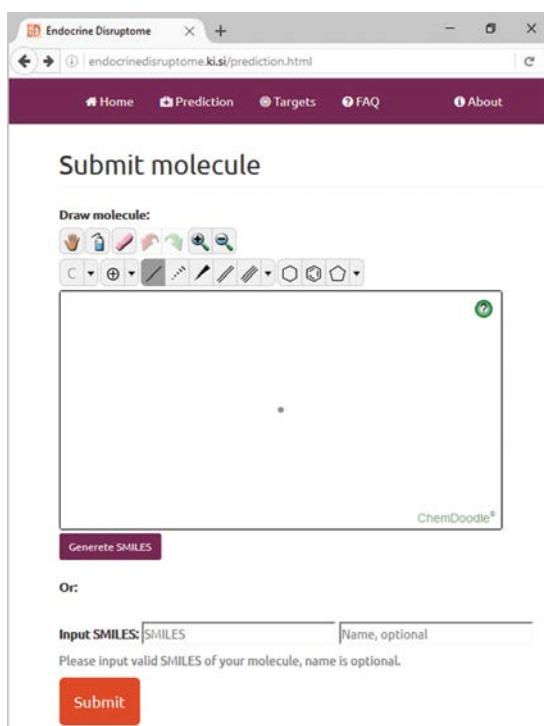
Računalniški program ED je dosežek slovenskih strokovnjakov. Razvit je bil na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani in na Kemijskem inštitutu v Ljubljani v letu 2014 in se stalno nadgrajuje (58).

Koncept metode je molekulske sidranje, ki kot osnovo uporablja eksperimentalno določene strukture vezavnih mest jedrnih receptorjev. ED je zasnovan na odprtokodni programske platformi Docking interface for Target Systems (DoTS), katerega osnovna funkcija je izračun sidranja ene molekule v več tarč hkrati. Pri izdelavi napovedi afinitete spojine za jedrne receptorje uporablja podprogram AutoDock Vina, ki v ozadju izvaja napoved sidranja. Program ED omogoča sidranje ene spojine hkrati v aktivna mesta 16 struktur, ki pripadajo 12 različnim humanim jedrnim receptorjem: AR (agonistična in antagonistična oblika), ER  $\alpha$  in  $\beta$  (agonistična in antagonistična oblika), GR (agonistična in antagonistična oblika), jetrnima X receptorjema (LXR)  $\alpha$  in  $\beta$ , s peroksisomskimi proliferatorji aktiviranim receptorjem (PPAR)  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  in  $\gamma$ , retinoidnemu X (RXR) receptorju  $\alpha$  in TR  $\alpha$  in  $\beta$ . Vseh 16 struktur, ki so integrirane v ED, je bilo predhodno validiranih (58).

ED je novo računalniško orodje, presejalna metoda, ki daje možnost za hitro napoved, ali je določena testirana spojina potencialni HM. Strokovnjakom na različnih področjih lahko olajša pomembne odločitve v zvezi z nadaljnji testiranji spojin. Tako se računalniška kemija, ki ima že pomembno mesto pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic, lahko uprablja tudi v ta namen (59).

### 3.2.1.1. Uporaba programa Endocrine Disruptome

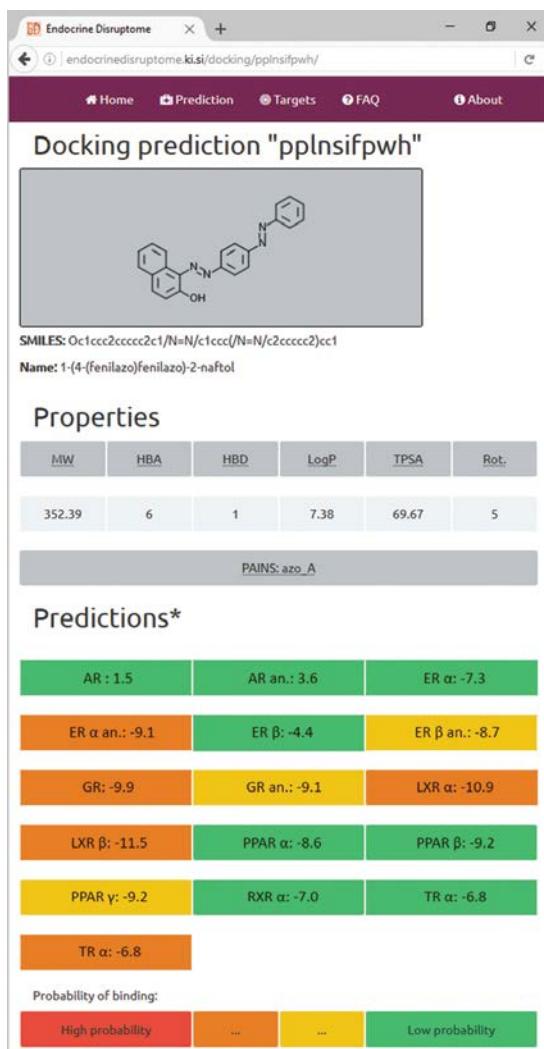
Do programa prosto dostopamo na medmrežnem spletnem naslovu <http://endocrinedisruptome.ki.si/>. Upravljam ga preko standardnega spletnega brskalnika (Windows Internet Explorer, Mozilla Firefox, Google Chrome, itd.). Po vstopu na opisani internetni naslov se nam v oknu spletnega brskalnika odpre uporabniški vmesnik programa ED. Ta je pregleden, razumljiv in prijazen do uporabnika. Na Sliki 5 je prikazan osnovni grafični vmesnik programa ED znotraj spletnega brskalnika.



Slika 5. Osnovni grafični vmesnik programa ED znotraj spletnega brskalnika (60).

Vhodni podatek programa je kemijska struktura spojine, ki jo želimo preveriti. Vnesemo jo lahko v obliki SMILES kode (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) ali pa jo sami izrišemo v obliki strukturne formule v priloženem vmesniku programa ED. Za preglednost in boljše arhiviranje izberemo poljubno ime po lastni presoji.

Sam postopek preverjanja napovedi o verjetnosti vezave spojine na jedrne receptorje se izvaja na računalniškem strežniku, ki je lociran na lokaciji na Kemijskem inštitutu. Čas, potreben za izračun napovedi, je odvisen od zahtevnosti kemijske strukture in od razpoložljivih kapacitet na računalniškem strežniku. Rezultat nam program izpiše v napovednem vmesniku, prikazan je na Sliki 6. Doda mu unikaten spletni naslov in ga arhivira. Na tem naslovu lahko tudi naknadno dostopamo do rezultatov napovedi za izbrano kemijsko strukturo.



Slika 6. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 26100.

Na Sliki 6 je kot primer prikazan rezultat napovedi za spojino 1-(4-(fenilazo)fenilazo)-2-naftol. To je spojina z referenčno številko 51 seznama dovoljenih barvil v KI, barvilo z barvnim indeksom CI 26100. Rezultati napovedi vezave na jedrne receptorje so barvno kodirani in razdeljeni na 4 razrede označene z rdečo, oranžno, rumeno in zeleno bravo in

temeljijo na vrednosti vezalnih energij (58). Rdeča barva je znak za veliko verjetnost vezave, oranžna in rumena za srednjo in zelena, da ni verjetnosti vezave.

ED nam posreduje tudi nekatere druge podatke o testirani spojini. Predstavi jo z nekaterimi molekulskimi deskriptorji (molska masa, logaritem porazdelitvenega koeficiente, število vezi z možnostjo rotacije, merilo polarnosti površine molekule, število donorjev/akceptorjev H-vezi) in nas opozarja, ali ima spojina PAINS (pan-assay interference structures) (58, 61). PAINS so strukturni elementi v molekuli, ki so lahko vzrok za določene neželene interakcije in lahko motijo napovednost, v našem primeru umeščanje spojine na receptorju. Najpogostejši PAINS so sposobnost za kovinsko keliranje, kemično agregacijo, redoks aktivnost, fluorescenco spojine, oksidacijo cisteina ali promiskuitetno vezavo s proteini (58).

### 3.2.1.2. Napovedi in omejitve programa

Namen delovanja programa ED je hitro preverjanje vezave spojine na jadrne receptorje. Program je v osnovni namenjen za rešetanje (screening). Zato so napovedi, ki nakazujejo, da ni verjetnosti vezave spojine v aktivno mesto receptorja, predvidene z večjo stopnjo verjetnosti kot rezultati, ki napovedujejo vezavo (58).

Program ED ima že v opisu nekatere omejitve. Ne upošteva biotransformacijo spojine v človeškem telesu. Za spojine, katerih molska masa presega 800 g/mol, ne daje napovedi pri vseh receptorjih razen na TR, kjer so molske mase naravnih ligandov T<sub>3</sub> in T<sub>4</sub> že tako visoke (58). Pri strukturah, vnesenih v obliki soli, program ED sidra le večji del (ion) (58). Molekule, za katere želimo, da jim program napove verjetnost vezave na jadrne receptorje, morajo biti vnešene v neionizirani oblici. Spojino, ki jo vnesemo, program sam ionizira, kot da bi bila v fiziološkem okolju s pH 7,4.

Za nekatera barvila, ki smo jih testirali, nismo dobili napovedi o vezavi na jadrne receptorje, ker njihova molska masa presega 800 g/mol. To so barvila CI 21108, CI 24790, CI 45430, CI 74260. Napovedi nismo dobili tudi za naslednja barvila CI 77000, CI 77002, CI 77004 (delno, samo za bentonit), CI 77007, CI 77015, CI 77120, CI 77163, CI 77220, CI 77231, CI 77267, CI 77268:2, CI 77288, CI 77289, CI 77346, CI 77480, CI 77492, CI 77713, CI 77742, CI 77745, CI 77820, CI 77891, barvilo pod referenčno št. 146 (karamel) barvilo pod referenčno št.150 (aluminijevi, cinkovi, magnezijevi in kalcijevi stearati). Barvila s CI 77000 do CI 77999 so anorganski pigmenti. Veliko jih je v obliki soli, ki

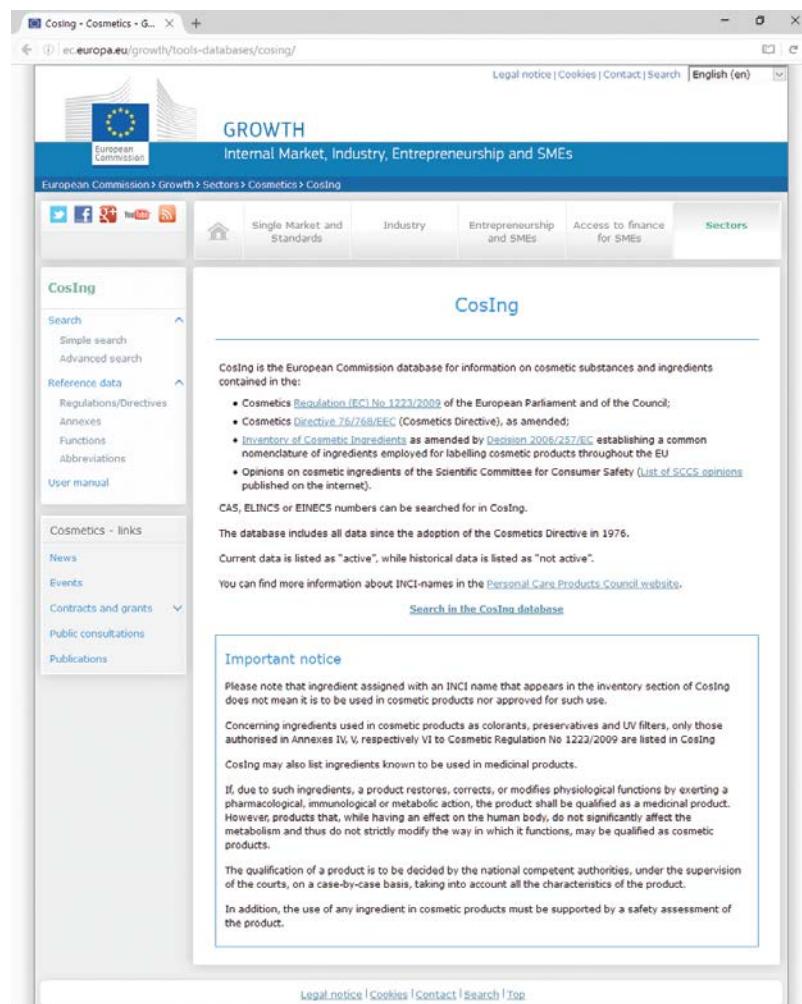
disociirajo, torej je že v omejitvi programa povedano, da ED zanje ne daje rezultatov napovedi.

### 3.3 Iskanje strukturne formule barvil

Strukturno kemijsko formulo barvil, ki so dovoljena za uporabo v KI, smo iskali po več podatkovnih bazah, ker večkrat določenega barvila nismo našli v le eni bazi, v kateri smo ga iskali. Kemijska imena snovi, ki pripadajo barvilom v KI, so komplikirana, v Prilogi IV Uredbe št. 1223/2009 je veliko tiskarskih napak, vsa kemijska imena niso zapisana v skladu z IUPAC nomenklaturo, kar je dodatno otežilo iskanje strukturne formule.

#### 3.3.1 Cosing baza podatkov

Cosing je baza podatkov Evropske komisije za informacije o kozmetičnih substancah in sestavinah, ki jih vsebujejo veljavni pravni predpisi na področju KI. Vsebuje tudi mnenja SCCS (Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov) o posameznih kozmetičnih sestavinah. Baza podatkov vsebuje vse podatke od sprejetja direktive iz 1976. Na Sliki 7 je prikazana vstopna internetna stran podatkovne baze Cosing.



Slika 7. Vstopna internetna stran podatkovne baze Cosing (62).

Pri diplomski nalogi smo v tej bazi podatkov iskali natančnejše podatke o barvilih (barva, CAS številka, formula, kemijska strukturna formula) iz Priloge IV Uredbe št. 1223/2009 in mnenja SCCS o njih. Baza podatkov je prosto dostopna na internetni strani [https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing\\_en](https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing_en) (62).

### 3.3.2 Baza podatkov The Good Scents

Baza podatkov The Good Scents je del The Good Scents informacijskega sistema, ki združuje različne podatke tudi o barvilih, ki se uporabljajo v KI. Za posamezno kemikalijo dobimo osnovne podatke (EINECES številko, CAS številko, kemijsko ime, molsko maso, formulo, področje uporabe). Pri iskanem barviliu nam da informacije o fizikalnih in organoleptičnih lastnostih, kozmetične informacije (poveže nas s podatkovno bazov Cosing), podatke o dobaviteljih, podatke o varnosti (toksikološke lastnosti), sinonime in drugo. Daje nam možnost povezave z Googlovimi spletnimi naslovi, ki obravnavajo

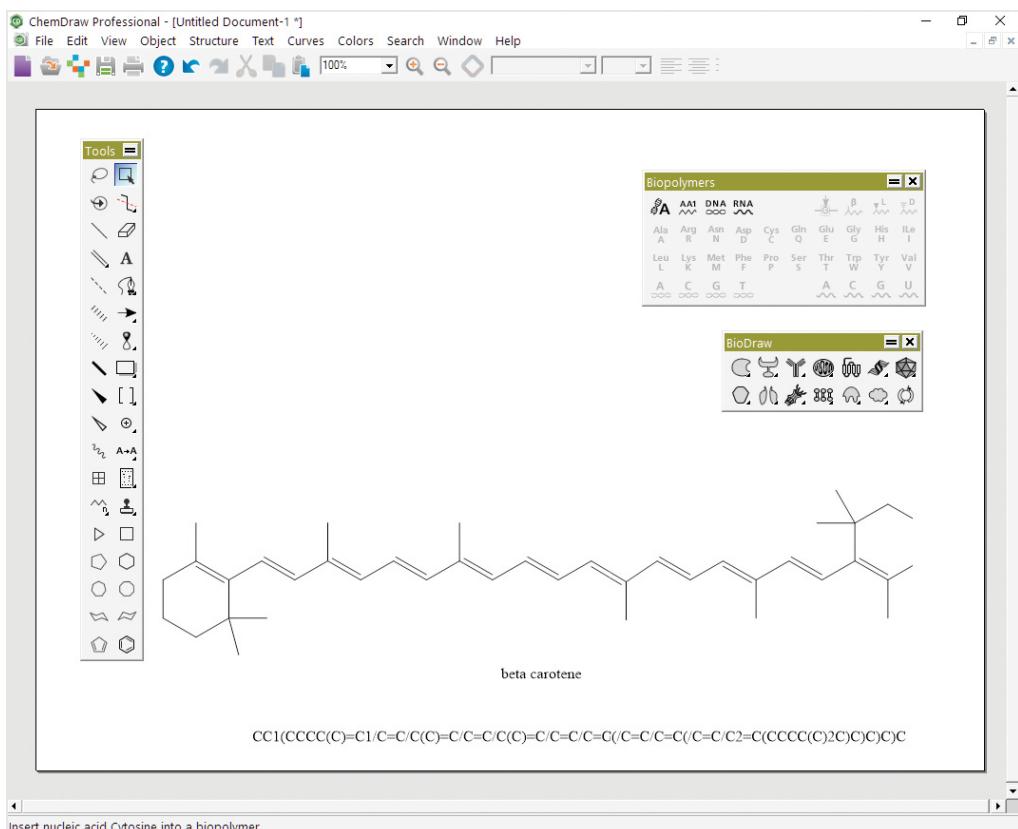
določeno barvilo. Med njimi tudi Google scholar, ki nas povezuje s strokovnim članki o določeni kemikaliji. Baza podatkov je prosto dostopna na internetni strani <http://www.thegoodscentscompany.com/> (63). Slika 8 podaja vstopno internetno stran baze podatkov The Good Scents.



Slika 8. Vstopna internetna stran baze podatkov The Good Scents (63).

### 3.3.3 Programske pakete ChemDraw Professional

Za iskanje strukturnih molekul barvil smo uporabljali računalniški program ChemDraw Professional, ki je v sklopu programa ChemOffice, ki vsebuje tudi druge aplikacije: ChemDraw, ChemDraw for Excel, Chem3D (generira 3D molekule), ChemFinder (omogoča organiziranje spojin in iskanje ter korelacije struktur z lastnostmi), ChemFinder for Office, ChemScript. ChemDraw Professional nam omogoča risanje molekul, hitro in učinkovito risanje reakcij, bioloških entitet za uporabo v dokumentih in elektronskih laboratorijskih beležnicah. Daje nam možnost iskanja podatkovnih baz (zdaj vključuje SciFinder). Generira točna imena iz struktur in omogoča napovedovanje lastnosti in spektrov. ChemDraw Professional, ki smo ga uporabljali pri diplomski nalogi, je proizvod ameriške nacionalke PerkinElmer (64).



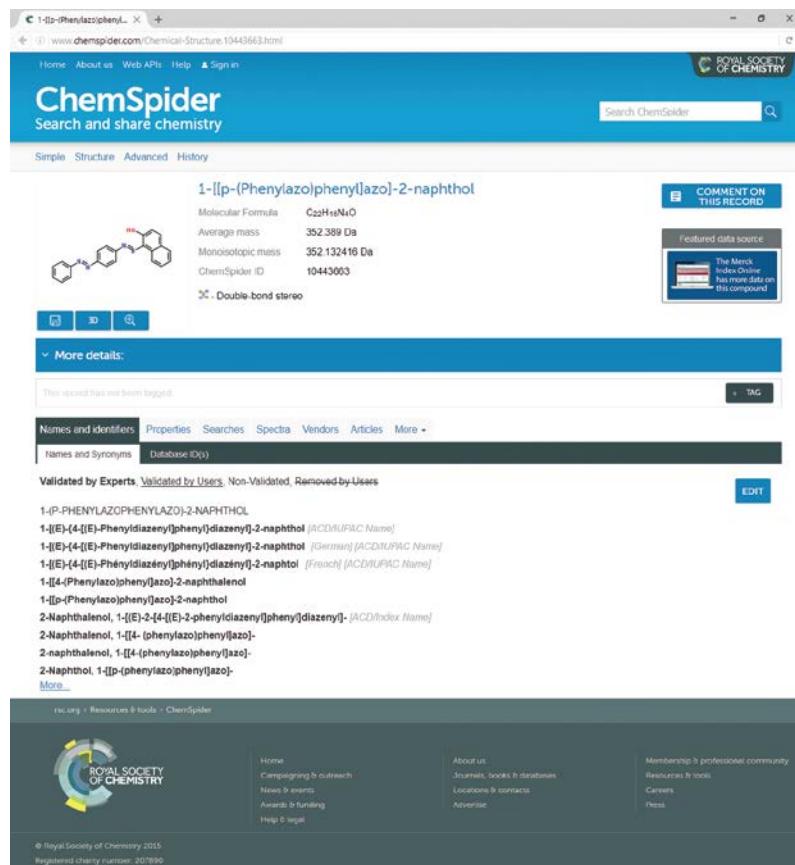
Slika 9. Rezultati iskanja kemijske strukture in SMILES kode s programom ChemDraw Professional.

Potem, ko se program zažene, je enostaven za uporabo. Na ikoni Structure poiščemo možnost Convert Name to structure, odpre se pogovorno okno, kamor vpišemo kemijsko ime. Program nariše kemijsko strukturo in pod njo kemijsko ime. Če želimo dobiti še SMILES kodo, gremo v ikono Edit. V njej izberemo copy as in nato SMILES, potem pa z ukazom paste program izpiše SMILES kodo. Na Sliki 9 so prikazani rezultati iskanja kemijske strukture in SMILES kode za barvilo beta karoten, barvilo CI 40800. Ker program prepozna ime samo, če je napisano v skladu z IUPAC nomenklaturo, za vsa kemijska imena barvil, ki so dovoljena za uporabo v KI z računalniškim orodjem ChemDraw, nismo pridobili strukturnih formul, zato smo jih iskali in pridobili v drugih bazah podatkov.

### 3.3.4 Spletna baza podatkov ChemSpider

ChemSpider je podatkovna baza, ki vsebuje in združuje podatke o kemikalijah (57 milijonov kemijskih struktur iz 525 baz podatkov). Je prostoz dostopna na internetnem naslovu <http://www.chemspider.com/> (65). Lastnik te zbirke podatkov je Royal Society of Chemistry (Kraljeva kemijska družba, Velika Britanija). Kemijske entitete lahko iščemo na

več načinov: po kemijskem imenu (sistematicna imena, sinonimi, trgovska imena), po CAS številki, po SMILES kodi in ID ChemSpiderja. Tu najdemo pomembne podatke o iskanih kemikalijah, kot so imena in identifikatorji, lastnosti, spektri in dobavitelji. Omogočeno nam je tudi hitro povezovanje z drugimi bazami podatkov. Na Sliki 10 je prikaz rezultatov iskanja programa ChemSpider za barvilo 1-(4-(fenilazo)fenilazo)-2-naftol, CI 26100.



Slika 10. Prikaz rezultatov iskanja programa ChemSpider za barvilo CI 26100.

Podatkovno bazo ChemSpider smo uporabljali za iskanje strukturne formule in SMILES kode barvil, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU oziroma za potrditev kemijskih struktur, ki smo jih pridobili iz drugih baz podatkov.

V to podatkovno zbirko kemikalij smo vstopali s kemijskim imenom, ki smo ga pridobili iz uredbe o KI, Priloga IV.

### 3.3.5 Spletna baza podatkov PubChem

PubChem je podatkovna baza o kemikalijah in njihovih aktivnostih v bioloških testih. Deluje pod okriljem ameriške Narodne medicinske knjižnice (National Library of

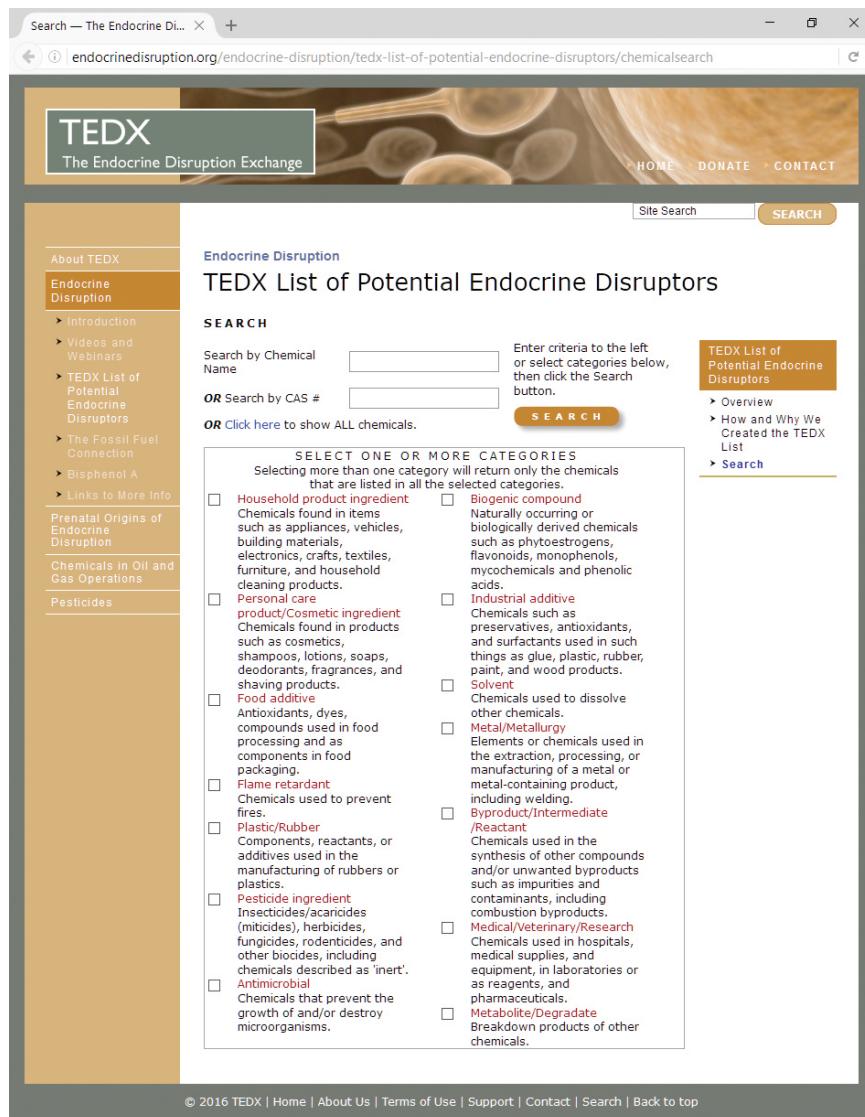
Medicine, USA). Obsega troje področij informacij: o kemikalijah, zmeseh, ekstraktih in podatkih o biološki aktivnosti. Baza daje podatke o sinonimih, kemijskih lastnostih, kemijskih strukturah, vključno s SMILES kodo, o bioaktivnosti in povezavo do strukturno podobnih spojin (66).

V tej podatkovni bazi smo iskali kemijsko strukturo in SMILES kodo za barvila, ki so dovoljena za uporabo v KI oz. smo želeli potrditi podatke, ki smo jih dobili v drugih podatkovnih bazah, kadar rezultati niso bili dovolj jasni.

### 3.4 Primerjava rezultatov ED z bazo podatkov TEDX

TEDX (The Endocrine Disruption Exchange) je organizacija, ki obravnava probleme zdravja ljudi in okoljske probleme, ki so posledice izpostavitvam nizkim dozam HM. Ustanovila jo je znanstvenica dr. Theo Colborn. Osredotoča se na probleme povezane s HM, ki jih najdemo v bivalnem okolju. Ta organizacija ima eno od najbolj popolnih podatkovnih baz o HM. Razvita je bila zato, ker so tradicionalne toksikološke raziskave uporabljale visoke doze na popolnoma razvitih tkivih in osebkih, s tem pa niso zajele posledic, ki jih HM povzroča na tkivih v razvoju (67).

TEDX seznam oziroma baza podatkov potencialnih HM, je zbirka kemikalij, ki so potencialni HM. Kemikalije v tej bazi podatkov lahko iščemo po CAS številki, s kemijskim imenom ali glede na področje uporabe kemikalije oziroma njen izvor. Slika 11 kaže možnost iskanja potencialnih HM na podatkovni bazi TEDX.



Slika 11. Prikaz možnosti iskanja potencialnih HM na podatkovni bazi TEDX (68).

Barvila, dovoljena za uporabo v KI, smo preverjali po CAS številkah, ki smo jih pridobili iz baze podatkov Cosing, Good Scents in PubChem. Pri barvilih, ki so potrjeni HM, nam TEDX baza podatkov da informacije o znanstvenih člankih, ki se nanašajo na določen HM. Baza podatkov TEDX je prosto dostopna na internetnem naslovu <http://endocrinedisruption.org> (67).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo z *in silico* metodo s programom ED preverjali, kakšna je verjetnost vezave 153 barvil, ki so dovoljena v KI v EU (Priloga IV Uredbe št. 1223/2009) na jedrne receptorje in zato obstaja določena možnost, da povzročajo endokrine motnje.

Program ED nam verjetnost vezave barvil na 16 struktur, ki pripadajo 12 jedrnim receptorjem, podaja v obliki štirih barvnih razredov: rdeča barva razreda pove, da je zelo velika verjetnost vezave, oranžna označuje manjšo verjetnost, rumena zelo majhno verjetnost vezave, zelena barva pa označuje, da ni verjetnosti interakcij s proučevanimi jedrnimi receptorji. S programom ED smo testirali 176 spojin (nekatera barvila so sestavljena iz več spojin) in pridobili 135 rezultatov napovedi za verjetnost vezave kemijskih spojin na testirane receptorje. Program ED ima določene omejitve, ki so opisane v poglavju Materiali in metode, zato pri nekaterih barvilih nismo dobili napovedi o verjetnosti vezave. Takih barvil je 26. Za eno barvilo smo dobili samo delni rezultat, le za eno od komponent, to je barvilo CI 77004 (delno, samo za bentonit). Za nekatera barvila, ki smo jih testirali, nismo dobili napovedi o vezavi na jedrne receptorje, ker njihova molska presega 800 g/mol. To so barvila CI 21108, CI 24790, CI 45430, CI 74260. Napovedi nismo dobili tudi za naslednja barvila CI 77000, CI 77002, CI 77007, CI 77015, CI 77120, CI 77163, CI 77220, CI 77231, CI 77267, CI 77268:2, CI 77288, CI 77289, CI 77346, CI 77480, CI 77492, CI 77713, CI 77742, CI 77745, CI 77820, CI 77891, barvilo pod referenčno št. 146 (karamel) barvilo pod referenčno št. 150 (aluminijevi, cinkovi, magnezijevi in kalcijevi stearati). Barvila s CI 77000 do CI 77999 so anorganski pigmenti, veliko jih je v obliki soli, ki disocirajo, torej je že v omejitvi programa povedano, da ED zanje ne daje rezultatov napovedi. Rezultate napovedi verjetnosti vezave na jedrne receptorje za vsa barvila podajamo v Prilogi 1.

Glede na napovedi programa ED o verjetnost vezave na jedrne receptorje za barvila, ki so dovoljena v KI, smo barvila obravnavali po naslednjih skupinah spojin:

- barvila, ki imajo s programom ED vsaj za en jedrni receptor napovedano zelo veliko verjetnost vezave (uvrstitev v rdeči razred);
- barvila, za katere rezultati pridobljeni s programom ED ne napovedujejo nobene interakcije z jendrnimi receptorji (uvrstitev v zeleni razred);

- barvila, ki jih baza podatkov organizacije TEDX navaja, da so potencialni HM. Primerjali smo skladnost uvrščanja preiskovanih barvil med HM z ED in bazoTEDX.

Barvila, ki jih program ED uvrsti glede na verjetnost vezave na testirane jedrne receptorje v rdeči in zeleni razred, smo pregledali po podatkovnih bazah TEDX in SCCS.

Barvila smo razvrstili tudi na osnovne kemijske strukture in ocenili, kako so kemijske skupine barvil zastopane v t.i. zelenem in rdečem razredu napovedi verjetnosti vezave na jedrne receptorje glede na rezultate programa ED.

#### 4.1 **Spojine, za katere ED napove zelo veliko verjetnost vezave na jedrne receptorje (uvrstitev v rdeči razred)**

Med 135 spojinami, za katere smo dobili rezultate verjetnost vezave na jedrne receptorje, je 33 spojin, za katere smo s programom ED ugotovili veliko verjetnost vezave na jedrne receptorje (rdeči razred). V Preglednici 1 so predstavljena ta barvila s številko barvnega indeksa, s kemijskim in generičnim imenom.

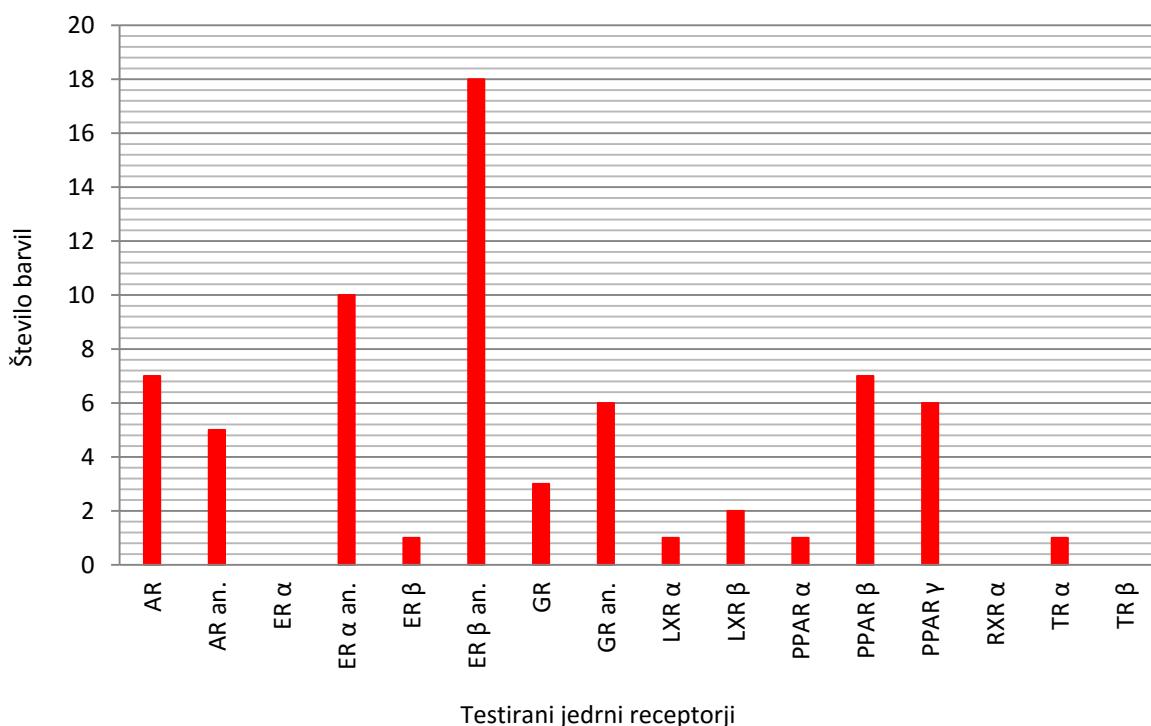
Rezultati napovedi vezave barvil na jedrne receptorje s programom ED so pokazali, da imajo testirana barvila razvrščena v rdeči razred veliko verjetnost vezave do različnih jedrnih receptorjev. Izstopa jedrni receptor ER  $\beta$  an., za katerega je ED podal največjo jakost vezave za 18 barvil, kar predstavlja 54,55 % vseh barvil v rdečem razredu. Sledijo mu jedrni receptor ER  $\alpha$  an. z vezavo 10 barvil (30,30 %), jedrna receptorja AR in PPAR  $\beta$  z vezavo 7 barvil (21,21 %), jedrna receptorja GR an. in PPAR  $\gamma$  z vezavo 6 barvil (18,18 %), jedrni receptor AR an. z vezavo 5 barvil (15,15 %), jedrni receptor GR z vezavo 4 barvil (12,12 %), jedrni receptor LXR  $\beta$  z vezavo 2 barvil (6,06 %) in jedrni receptorji ER  $\beta$ , LXR  $\alpha$ , PPAR  $\alpha$ , TR  $\alpha$  z vezavo 1 barvila (3,03 %). Na jedrne receptorje ER  $\alpha$ , RXR  $\alpha$  in TR  $\alpha$  nobeno barvilo ni pokazalo zelo velike jakosti vezave (rdeči razred). Podatek v oklepaju o vezavi na jedrni receptor se nanaša na odstotek barvil, ki jih je ED razvrstil v rdeči razred in kažejo zelo veliko afiniteto vezave na opisani jedrni receptor.

Preglednica 1. Seznam barvil, za katere ED z veliko verjetnostjo napove vezavo s proučevanimi jedrnimi receptorji.

št. barvnega indeksa	kemijsko ime	generično ime	jedrni receptorji z veliko verjetnostjo vezave
CI 12370	3-hidroksi-N-(o-tolil)-4-[(2,4,5-triklorofenil)azo]naftalen-2-karboksamid	Pigment Red 112	PPAR $\beta$
CI 12420	N-(4-kloro-2-metilfenil)-4-[(4-kloro-2-metilfenil)azo]-3-hidroksinaftalen-2-karboksamid	Pigment Red 7	PPAR $\beta$
CI 15580	barijev bis [4-[(2-hidroksi-1-naftil)azo]-2-metilbenzensulfonat]	Pigment Red 51	AR, ER $\beta$ , ER $\beta$ an.
CI 15880	kalcijev 3-hidroksi-4-[(1-sulfonato-2-naftil)azo]-2-naftoat	Pigment red 63	GR
CI 18130	2,7-naftalandisulfonska kislina, 3-((4-cikloheksil-2-metilfenil)azo)-4-hidroksi-5-(((4-metilfenil)sulfonyl)amino)-, dinatrijeva sol	Acid Red 155	ER $\beta$ an.
CI 20040	N,N'-(3,3'-dimetil[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis[2-[(2,4-diklorofenil)azo]-3-oksobutiramid]	Pigment Yellow 16	PPAR $\gamma$
CI 21100	2,2'-(3,3'-dikloro[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis(azo)]bis[N-(2,4-dimetilfenil)-3-oksobutiramid]	Pigment Yellow 13	ER $\alpha$ an.
CI 21230	2,2'-(cikloheksilidenbis[(2-metil-4,1-fenilen)azo])bis[4-cikloheksilfenol]	Solvent Yellow 29	ER $\alpha$ an., ER $\beta$ an., GR an., PPAR $\gamma$
CI 42053	benzenmetanamonij, N-etil-N-(4-((4-(etil((3-sulfofenil)metil)amino)fenil)(4-hidroksi-2-sulfophenyl)metilen)-2,5-cikloheksadien-1-iliden)-3-sulfo-, hidroksid, notranja sol, dinatrijeva sol	Food Green 3	ER $\beta$ an., GR an., PPAR $\gamma$
CI 42090	benzenmetanamonij, N-etil-N-(4-((4-(etil((3-sulfofenil)metil)amino)fenil)(4-hidroksi-2-sulfophenyl)metilen)-2,5-cikloheksadien-1-iliden)-3-sulfo-, hidroksid, notranja sol, dinatrijeva sol	Acid Blue 9	ER $\beta$ an., GR an.
CI 42100	hidrogen[4-[(2-klorofenil)[4-[etil(3-sulfonatobenzil)amino]fenil]metilen]cikloheksa-2,5-dien-1-iliden] (etil) (3-sulfonatobenzil)amonij, natrijeva sol	Acid Green 9	ER $\alpha$ an., ER $\beta$ an., GR an., PPAR $\gamma$
CI 42170	hidrogen[4-[(2-klorofenil)[4-[etil(3-sulfonatobenzil)amino]o-tolil]metilen]-3-metilcikloheksa-2,5-dien-1-iliden] (etil)(3-sulfonatobenzil)amonij, natrijeva sol	Acid Green 22	ER $\alpha$ an., ER $\beta$ an.
CI 42510	(4-(4-aminofenil)(4-iminocikloheksa-2,5-dieniliden)metil)-2-metilanilinhidroklorid	Basic Violet 14	ER $\alpha$ an., ER $\beta$ an.
CI 42520	4-[(4-amino-m-tolil)(4-imino-3-metilcikloheksa-2,5-dien-1-iliden)metil]-o-toluidin monohidroklorid	Basic Violet 2	ER $\alpha$ an., ER $\beta$ an.
CI 42735	hidrogen[4-[[4-(dietilamino)fenil][4-[etil[(3-sulfonatobenzil)amino]o-tolil]metilen]-3-metilcikloheksa-2,5-dien-1-iliden] (etil) (3-sulfonatobenzil)amonij, natrijeva sol	Acid Blue 104	ER $\beta$ an.
CI 45350	dinatrijev 2-(3-okso-6-oksidsanten-9-il)benzoat	Acid Yellow 73	ER $\beta$ an.
CI 47000	1,3-izobenzofurandion, reakcijski produkti z metilkolinom in kinolinom	Solvent Yellow 33	AR, AR an., ER $\beta$ , ER $\beta$ an., TR $\alpha$
CI 58000	1,2-dihidroksiantrakinon	Pigment Red 83	AR, AR an.
CI 60725	1-hidroksi-4-(p-toluidino)antrakinon	Solvent Violet 13	ER $\beta$ an., GR
CI 61565	1,4-bis(p-tolilamino)antrakinon	Solvent Green 3	ER $\beta$ an., PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$
CI 61585	natrijev 3,3'-(9,10-dioksoantracen-1,4-dilidiimino)bis(2,4,6-trimetilbenzensulfonat)	Acid Blue 80	PPAR $\beta$
CI 69800	6,15-dihidroantrazin-5,9,14,18-tetron	Pigment Blue 60	ER $\beta$ an., GR, GR an., PPAR $\gamma$

CI 69825	7,16-dikloro-6,15-dihidroantrazin-5,9,14,18-tetron	Pigment Blue 64	ER $\alpha$ an., PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$
CI 71105	bisbenzimidazo[2,1-b:2',1'-i]benzo[1mn][3,8]fenantrolin-8,17-dion	Pigment Orange 43	GR an., LXR $\beta$ , PPAR $\beta$
CI 73000	2-(1,3-dihidro-3-okso-2H-indazol-2-iliden)-1,2-dihidro-3H-indol-3-on	Pigment Blue 66	AR
CI 73900	5,12-dihidrokino[2,3-b]akridin-7,14-dion	Pigment Violet 19	ER $\beta$ an., LXR $\alpha$ , PPAR $\beta$
CI 73915	5,12-dihidro-2,9-dimetilkino[2,3-b]akridin-7,14-dion	Pigment Red 122	ER $\beta$ an., PPAR $\gamma$
CI 74100	29H,31H-ftalocianin	Pigment Blue 16	ER $\alpha$ an.
CI 74160	29H,31H-ftalocianinato(2)-N29, N30, N31, N32 baker	Pigment Blue 15	ER $\alpha$ an.
CI 74180	dinatrijev [29H,31H-ftalocianindisulfonato(4)-N29,N30, N31,N32]kuprat(2-)	Solvent Blue 38	PPAR $\gamma$
antocianini-cianidin	cianidin	cianidin	AR, AR an.
antocianin-delphinidin	delfinidin	delfinidin	AR, AR an.
antocianini-pelargonidin	pelargonidin	pelargonidin	AR, AR an., ER $\beta$ an

Slika 12 prikazuje število barvil, ki jih ED razvrsti v rdeči razred glede na vezavo na posamezni jedrni receptor.



Slika 12. Število barvil, ki jih ED razvrsti v rdeči razred glede na verjetnost vezave na posamezni jedrni receptor.

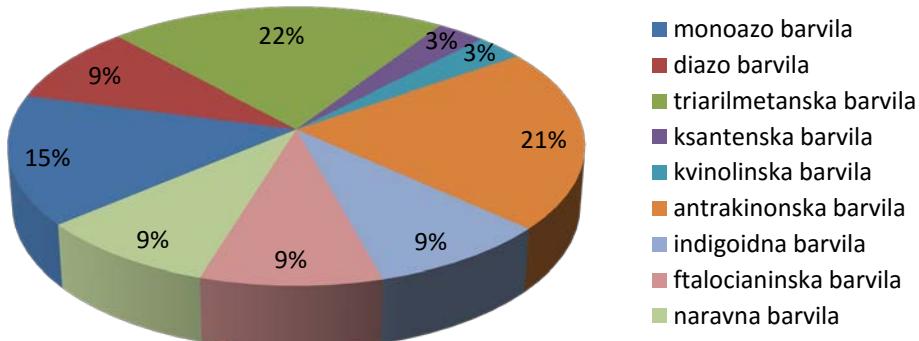
Posamezna barvila, ki smo jih glede na rezultate programa ED razvrstili v razred z veliko verjetnostjo vezave na jedrne receptorje (rdeči razred), kažejo veliko afiniteto

nekatera do enega, druga pa do več jedrnih receptorjev. Za barvilo CI 47000 z generičnim imenom Solvent Yellow 33 je program ED napovedal zelo veliko verjetnost vezave (rdeči razred) na 5 jedrnih receptorjev: AR, AR an., ER  $\beta$ , ER  $\beta$  an., TR  $\alpha$ . Za troje barvil je program ED napovedal zelo veliko verjetnost vezave (rdeči razred) na 4 jedrne receptorje: za barvilo CI 21230 z generičnim imenom Solvent Yellow 29 na jedrne receptorje: ER  $\alpha$  an., ER  $\beta$  an., GR an., PPAR  $\gamma$ ; za barvilo CI 42100 z generičnim imenom Acid Green 9 na jedrne receptorje: ER  $\alpha$  an., ER  $\beta$  an., GR an., PPAR  $\gamma$ ; za barvilo CI 69800 z generičnim imenom Pigment Blue 60 na jedrne receptorje ER  $\beta$  an., GR, GR an., PPAR  $\gamma$ . Sedmim barvilm v rdečem razredu je program ED napovedal vezavo na tri jedrne receptorje: barviliu CI 15580 z generičnim imenom Pigment red 63 na jedrne receptorje AR, ER  $\beta$ , ER  $\beta$  an.; barviliu CI 42053 z generičnim imenom Food Green 3 na jedrne receptorje ER  $\beta$  an., GR an., PPAR  $\gamma$  barviliu CI 61565 z generičnim imenom Solvent Green 3 na jedrne receptorje ER  $\beta$  an., PPAR  $\beta$ , PPAR  $\gamma$ ; barviliu CI 69825 z generičnim imenom Pigment Blue 60 na jedrne receptorje ER  $\alpha$  an., PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\gamma$ ; barviliu CI 71105 z generičnim imenom Pigment Orange 43 na jedrne receptorje GR an., LXR  $\beta$ , PPAR  $\beta$ ; barviliu CI 73900 z generičnim imenom Pigment Violet 19 na jedrne receptorje ER  $\beta$  an., LXR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$ ; barviliu Pelargonidin (antocianini) na jedrne receptorje AR, AR an., ER  $\beta$  an. Preostala barvila iz rdečega razreda napovedi vezave na jedrne receptorje so glede na rezultate programa ED pokazala afiniteto za vezavo na 2 oz. 1 jedrni receptor. V Preglednici 2 prikazujemo, katera barvila se vežejo po napovedi ED z največjo verjetnostjo na določen proučevan jedrni receptor.

Preglednica 2. Prikaz barvil, ki se z veliko verjetnostjo glede na rezultate, pridobljene z ED, vežejo na proučevane jedrne receptorje.

	ime barvila po glosariju	jedrni receptorji														
		AR	AR an.	ER $\alpha$	ER $\alpha$ an.	ER $\beta$	ER $\beta$ an.	GR	GR an.	LXR $\alpha$	LXR $\beta$	PPAR $\alpha$	PPAR $\beta$	PPAR $\gamma$	RXR $\alpha$	TR $\alpha$
CI 12370												+				
CI 12420												+				
CI 15580		+														
CI 15880						+	+									
CI 18130							+									
CI 20040													+			
CI 21100				+												
CI 21230					+			+		+			+			
CI 42053						+			+				+			
CI 42090							+			+						
CI 42100						+			+				+			
CI 42170							+							+		
CI 42510						+										
CI 42520							+									
CI 42735								+								
CI 45350								+								
CI 47000		+	+				+	+							+	
CI 58000		+	+													
CI 60725								+	+							
CI 61565								+					+			
CI 61585												+				
CI 69800								+	+	+	+			+		
CI 69825						+						+			+	
CI 71105									+			+		+		
CI 73000		+														
CI 73900									+							
CI 73915									+							
CI 74100										+						
CI 74160																
CI 74180													+			
Antocianinini-Cianidin		+	+													
Antocianinidin		+	+													
Antocianinidi-Pelargonidin		+	+					+								

Barvila, ki jih je program ED uvrstil v rdeči razred zaradi visoke afinitete za vezavo na jedrne receptorje, smo razvrstili tudi glede na njihovo kemijsko strukturo (69). Zanimalo nas je, kako so barvila, ki jih ED razvršča v rdeči razred, razporejena glede na kemijsko strukturo. Na Sliki 13 je razvidno, da jih največ spada v triarilmetsansko skupino barvil (22 %). Sledita ji antrakinonska (21 %) in monoazo (15 %) skupina barvil. Diazo barvila, naravna barvila, ftalocianinska barvila in indigoidna barvila so zastopana vsaka z 9 % odstotki, ksantenska in kinolinska barvila pa s 3 %. Druge kemijske skupine barvil nimajo predstavnikov v razredu, kjer se nahajajo spojine, ki se z veliko verjetnostjo vežejo na proučevane receptorje glede na rezultate, pridobljene z ED.



Slika 13. Prikaz barvil, uvrščenih v rdeči razred glede na rezultate programa ED po kemijskih skupinah, izražen v odstotkih.

### Toksikološki podatki za nekatera barvila uvrščena v rdeči razred in primerjava podatkov o njihovem vplivu na endokrini sistem glede na bazo podatkov TEDX in pridobljene podatki z ED

Barvilo **CI 12370** z generičnim imenom Pigment Red 112 sodi v monoazo skupino barvil. Je rdeče barve. Uporablja se le v izdelkih, ki se izperejo. SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (70). Preiskave glede njegove toksičnosti so pokazale, da niso ugotovili ne peroralne, ne parenteralne, ne dermalne in ne inhalacijske toksičnosti (71). Program ED je za barvilo CI 12370 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) za jedrni receptor PPAR  $\beta$ . V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvilo **CI 12420** z generičnim imenom Pigment Red 7 sodi v monoazo skupino barvil. Je rdeče barve. Uporablja se v le izdelkih, ki se izperejo (72). Oralna, parenteralna, dermalna in inhalacijska toksičnost niso ugotovljene (73). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (72). Program ED je za barvilo CI 12420 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) za jedrni receptor PPAR  $\beta$ . V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvilo **CI 15580** z generičnim imenom Pigment Red 51 glede na kemijsko strukturo sodi v monoazo skupino barvil. Obarva rdeče. Kot kozmetično barvilo se uporablja samo za zunanjo uporabo. (74). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (75). Peroralna, parenteralna, dermalna in inhalacijska toksičnost niso ugotovljene (74). Program ED je za barvilo CI 15580 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) za jedrni receptor GR. V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvilo **CI 47000** z generičnim imenom Solvent Yellow 33 glede na kemijsko strukturo sodi v kinolinsko skupino barvil. Je svetlo zelenorumeni prah (76). Obarva rumeno. Ne uporablja se v izdelkih, ki se nanašajo na sluznice (5). SCCS o njem ni izdal nobenega mnenja (77). Pri podghanah je peroralno toksičen, najnižji letalni odmerek je: LD (podgana, peroralno): 5000 mg/kg. Pri zajcih je toksičen po dermalni aplikaciji, LD<sub>50</sub> (zajec, koža) > 2000 mg/kg. Inhalacijska toksičnost ni ugotovljena (76). Program ED je za barvilo CI 47000 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) na jedrne receptorje AR, AR an., ER β, ER β an., TR α. V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvilo **CI 21230** z generičnim imenom Solvent Yellow 29 glede na kemijsko strukturo sodi v diazo skupino barvil. Obarva rumeno. V izdelkih, ki se na našajo na sluznice, se ne uporablja. SCCS o njem ni izdal nobenega mnenja (78). Peroralna, parenteralna, dermalna in inhalacijska toksičnost niso bile ugotovljene (79). Program ED je za barvilo CI 21230 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) na jedrne receptorje: ER α an., ER β an., GR an., PPAR γ. V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvilo **CI 42100** z generičnim imenom Acid Green 9 je glede na svojo kemijsko strukturo triarilmetsansko barvilo. Je temno rumen prah (80). Obarva zeleno. Uporablja se v izdelkih, ki se izperejo. SCCS ni o tem barvili izdal nobenega mnenja (81). Peroralna, parenteralna, dermalna in inhalacijska toksičnost niso bile ugotovljene (82). Program ED je za barvilo CI 42100 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) na jedrne receptorje: ER α an., ER β an., GR an., PPAR γ. V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvilo **CI 69800** z generičnim imenom Pigment Blue 60 glede na svojo kemijsko strukturo sodi med antrakinonska barvila. Je v obliki modrih igličastih kristalov (83). Obarva modro. SCCS o tem barvili ni izdal nobenega mnenja (84). Pri podghanah povzroča toksičnost po intratrahealni in peroralni aplikaciji, LD<sub>50</sub> (podgana, intratrahealno): 250 mg/kg, LD<sub>50</sub> (podgana, peroralno): 2000 mg/kg. Dermalna in inhalacijska toksičnost nista bili ugotovljeni (83). Program ED je za barvilo CI 69800 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) na naslednje jedrne receptorje: ER β an., GR, GR an., PPAR γ. V TEDX bazi podatkov ni naveden kot HM.

Barvila, ki ju program ED glede na afiniteto vezave na jedrne receptorje razvrsti v rdeči razred, za katerega baza podatkov TEDX navaja, da sta HM, sta barvilo CI 42053 in

barvilo CI 58000, ki sta opisana v poglavju 4.3., kjer so opisani mehanizmi, po katerih so te spojine uvrstili v skupino HM.

Ker je med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU v TEDX podatkovni bazi samo 6 spojin (opisujemo jih v poglavju 4.3) potrjenih kot HM, je primerjava z rezultati programa ED o verjetnosti vezave na testirane jedrne receptorje težka. Med barvili, ki jih ED uvrsti v rdeči razred pa je vendarle tudi dvoje barvil v podatkovni bazi TEDX definiranih kot HM, kar v določeni meri potrjuje ustrezno napovednost programa ED.

#### **4.2 Spojine, za katere ED ne napove nobenih interakcij z jedrnimi receptorji (uvrstitev v zeleni razred)**

Med spojinami barvil, pri katerih smo ugotavljali verjetnost vezave na testirane jedrne receptorje s programom ED, 15 spojin ni pokazalo afinitete za vezavo na nobenega od testiranih jedrnih receptorjev. Te spojine so prikazane v Preglednici 3.

Dvoje spojin v tej preglednici samo deloma predstavlja celotno barvilo iz uredbe. Barvilo s številko barvnega indeksa CI 75120 in referenčno št. 109 je namreč sestavljeno iz anato- $\beta$ -norbiksina in anato- $\alpha$ -norbiksina. Anato- $\alpha$ -norbiksin na GR in GR an. receptor kaže afiniteto vezave, ki jo program ED uvršča v rumeni razred, na vseh ostali jedrnih receptorjih ga ED uvršča v zeleni razred. Tudi kapsantin je le del zmesi v barvili, ki je v uredbi pod referenčno številko 147. Dopoljuje ga kapsorubin, ki na GR receptor kaže afiniteto vezave, ki jo program ED uvršča v rumeni razred, na vseh ostalih jedrnih receptorjih pa v zeleni razred.

*Preglednica 3. Seznam spojin, za katere program ED ne napove interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji.*

Številka barvnega indeksa/ Ime skupnih sestavin kot v glosarju	Kemijsko ime
CI 40850	Kantaksantin
CI 45100	hidrogen-3,6-bis(dietilamino)-9-(2,4-disulfonatofenil)ksantilij, natrijeva sol
CI 45380	dinatrijev 2-(2,4,5,7-tetrabromo-6-oksido-3-oksoksanthen-9-il)benzoat in njegova netopna barijeva, stroncijeva in cirkonijeva karminsko rdeča barvila, soli in pigmenti
CI 59040	trinatrijev 8-hidroksipiren-1,3,6-trisulfonat
CI 75120	anato-β-Norbixin
CI 75125	Likopen
CI 75135	(3R)-beta-4-karoten-3-ol
CI 75170	2-amino-1,7-dihidro-6H-purin-6-on
CI 75810	trinatrijev (2S-trans)-[18-karboksi-20-(karboksimetil)-13-etil-2,3-dihidro-3,7,12,17-tetrametil-8- vinil-21H,23H-porfin-2-propionato(5-)-N21,N22,N23,N24]kuprat(3-) (klorofili)
CI 77266	saje
CI 77400	baker
CI 77489	železov oksid
CI 77947	cinkov oksid
Izvleček paprike, kapsantin, kapsorubin	kapsantin
Bromocresol green	fenol, 4,4'-(3H-2,1-benzoksatiol-3-iliden)bis[2,6-dibromo-3-metil-, S, S-dioksid

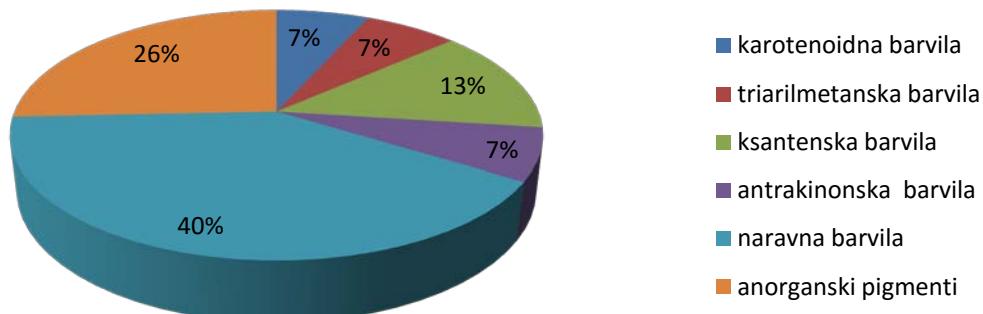
Spojine, za katere program ED napove, da nimajo vezave na proučevane jedrne receptorje, imajo različno kemijsko strukturo. Razvrstitev v posamezne skupine barvil glede na kemijsko strukturo v skladu z mednarodno referenčno bazo podatkov o barvilih Colour Index International (69) prikazuje Preglednica 4.

*Preglednica 4. Prikaz spojin po kemijskih skupinah, za katere program ED ne napove interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji.*

Kemijska skupina barvil	Številka barvnega indeksa/ Ime skupnih sestavin kot v glosarju
karotenoidi	CI 40850
triarilmetri	Bromocresol green
ksanteni	CI 45100, CI 45380
antrakinoni	CI 59040
naravna barvila	CI 75120(anato-β-norbixin), CI 75125, CI 75135, CI 75170, CI 75810, kapsantin
anorganski pigmenti	CI 77266, CI 77400, CI 77489, CI 77947

Prikaz spojin, ki jih glede na afiniteto vezave na testirane jedrne receptorje program ED uvršča v zeleni razred po kemijskih skupinah, prikazano v odstotkih, kaže Slika 14. Iz

slike je razvidno, da je največ spojin, ki jih ED razvršča v zeleni razred na vseh testiranih receptorjih, iz skupine naravnih barvil (40 %). Druge skupine barvil glede na njihovo kemijsko strukturo so zastopane v naslednjih deležih izraženih v odstotkih: anorganski pigmenti (26 %), ksantenska barvila (13 %), karotenoidna barvila (7 %), triarilmetsanska barvila (7 %) in antrakinonska barvila (7 %).



*Slika 14. Prikaz spojin po kemijskih skupinah, za katere program ED ne napove interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji izražen v odstotkih.*

### **Toksikološki podatki za barvila, ki jih program ED uvršča v zeleni razred za vse testirane jedrne receptorje in primerjava o njihovem vplivu na endokrini sistem po bazi podatkov TEDX**

Nobeno od teh barvil v podatkovni bazi TEDX ni navedeno kot HM.

Barvilo **CI 40850** z generičnim imenom CI Food Orange 8 glede na kemijsko strukturo sodi v skupino karotenoidov. Je temno vijoličen kristaliničen prah. Povzroča oranžno obarvanost. Za to barvilo veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 161g) (5). SCCS ni podal o njem nobenega mnenja. Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni. Pri miših je podana LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): 10000 mg/kg, za človeka pa je najnižji LD<sub>50</sub> (človek, peroralno): 86 mg/kg (85). Lahko povzroča spremembe na očeh, retinitis (86).

Barvilo **CI 45100** z generičnim imenom Acid Red 52 glede na kemijsko strukturo sodi v skupino ksantenov. Je temno rdeč do svetlo rjav prah (87). Obarva rdeče. Uporablja se le za izdelke, ki se izperejo (88). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni. Pri miših je podana LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): 10300 mg/kg (89). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (88).

Barvilo **CI 45380** z generičnim imenom Acid Red 87 glede na kemijsko strukturo sodi v skupino ksantenov. Je rdeč kristaliničen prah (51). Obarva rdeče (90). Pri podganah je podana LD<sub>50</sub> (podgana, peroralno): > 2000 mg/kg (51). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni.

Barvilo **CI 59040** z generičnim imenom Solvent green 7 glede na kemijsko strukturo sodi v skupino antrakinonskih barvil. Obarva zeleno. Ne uporablja se v izdelkih, ki se nanašajo na sluznice. SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (91). Pri miših je podana LD<sub>50</sub> (miš, intravenozno): 1050 mg/kg. Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni (92).

Barvilo **CI 75120** s kemijskim imenom anato je sestavljeno iz dveh komponent, iz anato-β-norbiksina in anato-α-norbiksin, ki na GR in GR an. receptor kaže afiniteto vezave, ki jo program ED uvršča v rumeni razred. Anato-β-norbiksin s CAS št. 542-40-5 sodi v skupino naravnih barvil. Je temno rdeče rjav do vijoličasto rdeč prah. Obarva oranžno. Za barvilo veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 160b). (90). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (93). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni. Naveden je podatek LD<sub>50</sub> (miš, intraperitonealno): 700 mg/kg (94).

Barvilo **CI 75125** z generičnim imenom Natural Yellow 27 sodi v skupino naravnih barvil. Je rdeč kristalinični prah (95). Obarva rumeno. Za barvilo veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 160d) (90). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (96). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni. Podan je podatek LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): > 3000 mg/kg (95).

Barvilo **CI 75135** sodi v skupino naravnih barvil. Je v obliki igličastih kristalov, obarvanih rdečev oranžno, ki imajo kovinski sijaj. Obarva rumeno (51). Naveden je podatek LD<sub>50</sub> (podgana): 285 mg/kg (51). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (97).

Barvilo **CI 75170** z generičnim imenom Natural white 1 sodi v skupino naravnih barvil. Obarva belo. Barvilo pridobivajo iz ribjih lusk (98). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (99). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni. Navedena sta podatka LD (miš, intraperitonealno): > 1000 mg/kg, LD (miš, peroralno): > 3333 mg/kg (100).

Barvilo **CI 75810** z generičnim imenom Natural Green 3 glede na kemijsko strukturo sodi v skupino naravnih barvil. Obarva zeleno. SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (101). Uredba navaja, da za to barvilo veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 140, E 141) (90). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista ugotovljeni. Navedena sta podatka LD<sub>50</sub> (miš, intraperitonealno): > 190 mg/kg, LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): 7000 mg/kg (102).

Barvilo **CI 77266** barvilo ima v uredbi ime saje, (Carbon black), njegovo generično ime je Pigment Black 6 oz. Pigment Black 7 (103). Glede na kemijsko strukturo sodi v skupino anorganskih pigmentov. Obarva črno. SCCS je na osnovi dostopnih dokazov sklenila, da uporaba Carbon black CI 77266 v nano obliki z velikostjo 20 nm ali več pri koncentracijah do 10 % kot barvilo v KI ne predstavlja nobene nevarnosti za škodljive učinke pri ljudeh pri nanosu na zdravo kožo. To ne velja za inhalacijo nanodelcev tega barvila, ki ovirajo dihalne poti. Glede na podatke pridobljene s proučevanjem raka na živalih v zvezi z uporabo nano delcev Carbon black v obliki sprejev, SCCS odsvetuje uporabo (vdihovanje tega barvila) pri ljudeh (104). Navedeni so podatki o peroralni toksičnosti pri podganah LD<sub>50</sub> (podgana, peroralno): > 15400 mg/kg in dermalni toksičnosti na koži zajca LD<sub>50</sub> (zajec, dermalno): > 3000 mg/kg. (105). Barvilo lahko povzroča somnolenco (105).

Barvilo **CI 77400** s kemijskim imenom baker in generičnim imenom Pigment metal 2 se glede na kemijsko strukturo uvršča v skupino anorganskih pigmentov. Obarva rjavo. SCCS ni izdal nobenega mnenja o tem barvili (106). Inhalacijska toksičnost ni ugotovljena. Navedeni so podatki o najnižji toksični dozi pri človeku po peroralni aplikaciji TD (človek, peroralno): 120 µg/kg. Zaužitje lahko povzroča navzejo ali bruhanje. Naveden je podatek o intraperitonealni toksičnosti pri miših LD<sub>50</sub> (miš, intraperitonealno): 3500 µg/kg in najnižji dermalni letalni dozi pri zajcih LD (zajec, dermalno): 375 mg/kg (107).

Barvilo **CI 77489** z generičnim imenom Orange Iron Oxide glede na kemijsko strukturo spada v skupino anorganskih pigmentov. Je v obliki črnih kockastih kristalov. Obarva oranžno. Uporablja se le zunanje. SCCS o tem barvili ni izdal nobenega mnenja (108). Peroralna, parenteralna, dermalna in inhalacijska toksičnost niso bile ugotovljene (109).

Barvilo **CI 77947** z generičnim imenom Pigment white 4 glede na svojo kemijsko strukturo sodi v v skupino anorganskih pigmentov. Je amorfen prah, ki je lahko bele ali rumeno bele barve (51). Obarva belo. O toksičnosti so navedeni naslednji podatki: dermalne toksičnosti niso ugotovili, pač pa peroralno toksičnost pri podganah LD (podgana, peroralno): >8737 mg/kg, miših LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): 7950 mg/kg in pri človeku LD<sub>50</sub> (človek,peroralno): 500 mg/kg, intraperitonealno in intratrahealno pri podganah LD<sub>50</sub> (podgana, intraperitonealno): 240 mg/kg, LD (podgana, intratrahealno): > 4979 µg/kg; inhalacijsko toksičnost pri miših LC<sub>50</sub> (miš, inhalacijsko): 2500 mg/m<sup>3</sup> in pri ljudeh TC (človek, inhalacijsko): 600 mg/m<sup>3</sup> (110). Povzroča kašelj, dispnejo (110).

Izvleček paprike, barvilo **kapsantin** glede na kemijsko strukturo sodi med naravna barvila. Obarva oranžno. SCCS o tem barvilu ni izdal nobenega mnenja (111). Za to barvilo veljajo kriteriji čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E160c) (111) . Ni podatkov o peroralni, parenteralni, dermalni in inhalacijski toksičnosti (112).

Barvilo **Bromocresol green** glede na kemijsko strukturo sodi v triarilmetsansko (trifenilmetsansko) skupino barvil. Uporablja se le v izdelkih, ki se izperejo. SCCS ni o tem barvilu izdal nobenega mnenja (113). O toksičnosti so navedeni naslednji podatki: je toksičen pri intraperitonealni in subkutani aplikaciji pri podganah, LD (podgana, intraperitonealno): > 1600 mg/kg, LD (podgana, subkutano) : > 1600 mg/kg. O inhalacijski toksičnosti ni podatkov (114). Za barvilo Bromocresol green veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 160c) (113).

Nobene od spojin, ki pripadajo barvilom, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, za katera program ED napove, da nimajo afinitete za vezavo na jedrne receptorje in jih uvršča v zeleni razred, podatkovna baza TEDX ne uvršča med HM. To potrjuje določeno skladnost rezultatov programa ED s podatkovno bazo TEDX. Ker podatkovna baza TEDX uvršča med HM samo 6 barvil, ki so dovoljena v KI v EU, je to premalo za popolno oceno napovednosti programa.

#### 4.3 Skladnost uvrščanja preiskovanih barvil med HM z ED in bazoTEDX

Po preverjanju vseh barvil, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, z bazo podatkov TEDX, smo našli naslednjih šest barvil, ki so potencialni HM. V nadaljevanju sledi opis njihovih lastnosti, toksičnosti, rezultatov napovedi interakcije s proučevanimi jedrnimi receptorji s programom ED in podatkov o vplivu na endokrini sistem iz baze TEDX.

Barvilo **CI 15985** z generičnim imenom Food Yellow 3 glede na kemijsko strukturo sodi med monoazo barvila. Je oranžnordeč prah, obarva oranžnorumeno (51). Za to barvilo veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 110). SCCS ni izdal nobenega mnenja (115). Ugotovljena je peroralna in intraperitonealna toksičnost pri podganah in miših, LD<sub>50</sub> (podgana, peroralno): > 10000 mg/kg, LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): > 6000 mg/kg, LD<sub>50</sub> (podgana, intraperitonealno): 3800 mg/kg, LD<sub>50</sub> (miš, intraperitonealno): 4600 mg/kg. Dermalna in inhalacijska toksičnost nista navedeni (116). Rezultati napovedi programa ED o afiniteti vezave barvila na testirane jedrne receptorje so sledeči: na jedrne receptorje GR, GR an.in LXR β so rezultati vezave uvrščeni v rumeni razred, na jedrni receptor LXR α v oranžni razred, na ostale testirane jedrne receptorje v zeleni razred. TEDX baza podatkov ga navaja kot potencialni HM, ker pri testnih živalih zavira celični imunski odgovor pri odmerkih, ki so 10 x večje od spremenljivega dnevnega odmerka (117). Učinek na endokrini sistem je povezan z vplivom na timus, saj se ob izpostavitvi temu barviliu zmanjša njegova masa in posledično ustrezno proliferacija in predvsem diferenciacija limfocitov T. Vpliv na endokrini organ ima v tem primeru vpliv na delovanje imunskega sistema kot navaja M. Hasem s sodelavci (117). Sama primerjava informacij podatkovne baze TEDX za barvilo CI 15985 z rezultati napovedi s programom ED ni možna, ker ED navaja verjetnost vezave na testirane jedrne receptorje in s tem v povezavi napoveduje potencialne HM. Slika 15 prikazuje napoved programa ED za barvilo CI 15985.

Spojina	CI 15985
	dinatrijev 6-hidroksi-5-[(4-sulfonatofenil)azo]naftalen-2-sulfonat in njegova netopna barijeva, stroncijeva in cirkonijeva karminsko rdeča barvila, soli in pigmenti
AR	AR : 5.5
AR an.	AR an.: 7.2
ER $\alpha$	ER $\alpha$ : -6.3
ER $\alpha$ an.	ER $\alpha$ an.: -7.5
ER $\beta$	ER $\beta$ : 3.7
ER $\beta$ an.	ER $\beta$ an.: -6.7
GR	GR: -9.6
GR an.	GR an.: -7.8
LXR $\alpha$	LXR $\alpha$ : -11.0
LXR $\beta$	LXR $\beta$ : -10.7
PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ : -7.6
PPAR $\beta$	PPAR $\beta$ : -8.8
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ : -8.1
RXR $\alpha$	RXR $\alpha$ : -9.0
TR $\alpha$	TR $\alpha$ : -4.9
TR $\beta$	CI 15985

Slika 15. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za CI 15985.

Barvilo **CI 40800** z generičnim imenom Natural yellow 26 glede na svojo kemijsko strukturo sodi v skupino karotenoidov. Je rdeče rjav kristaliničen prah, obarva oranžno (51). Za barvilo veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 160a). SCCS za njega ni izdal nobenega mnenja (118). Za barvilo niso ugotovljene ne peroralna, ne parenteralna, ne dermalna in ne inhalacijska toksičnost (119). Program ED napoveduje interakcijo barvila CI 40800 z jedrnim receptorjem GR an. in jo uvršča v rumeni razred. Na preostalih jedrnih receptorjih uvršča verjetnost vezave v zeleni razred. TEDX baza podatkov ga navaja kot potencialni HM, ker je znanstvenica Rosenberg s sodelavci v študiji o modulaciji androgenih in progesteronskih receptorjev na celičnih linijah T-47D in BT-474 dokazala, da se tudi barvilo CI 40800 veže na jedrne receptorje in ima antiandrogeno in antiprogesteronsko delovanje (120). Ker omenjena študija navaja delovanje na jedrne receptorje, podatke lahko primerjamo z rezultati programa ED o vezavi na jedrne receptorje. A program ED za CI 40800 napoveduje le verjetnost vezave na GR receptorju in jo uvršča v rumeni razred. Torej se podatki o potencialni hormonski motnji glede na posamezne jedrne receptorje med podatkovno bazo TEDX in rezultati napovedi ED ne skladajo. Slika 16 prikazuje napoved programa ED za barvilo CI 40800.

Spojina	CI 40800
	beta karoten
AR	AR : 50.2
AR an.	AR : 33.2
ER $\alpha$	ER $\alpha$ : -5.0
ER $\alpha$ an.	ER $\alpha$ : 10.7
ER $\beta$	ER $\beta$ : 39.3
ER $\beta$ an.	ER $\beta$ : -6.2
GR	GR: -3.9
GR an.	GR: -7.5
LXR $\alpha$	LXR $\alpha$ : 11.9
LXR $\beta$	LXR $\beta$ : 7.4
PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ : -8.9
PPAR $\beta$	PPAR $\beta$ : -2.4
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ : 4.1
RXR $\alpha$	RXR $\alpha$ : 23.2
TR $\alpha$	TR $\alpha$ : 6.6
TR $\beta$	TR $\beta$ : 13.8

Slika 16. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 40800.

Barvilo **CI 42053** z generičnim imenom Food Green 3 glede na kemijsko strukturo sodi med trifenilmetanska barvila (triarilmetsanska) barvila. Je kostanjevo do temno rjave barve v trdnem stanju, raztopljen pa daje smaragdno zeleno barvo. V EU je prepovedano za uporabo v prehrani. Najpogosteje se uporablja v naslednjih KI: v tekočih milih za telo, v balzamih in šamponih za lase, v KI, ki vsebujejo sredstva proti izpadanju las, v milih in losjonih za telo (121). Pri poskusih na živalih je bilo ugotovljeno, da ima tumorogene učinke, prav tako pa tudi mutagene učinke pri živalih in ljudeh (122). SCCS ni izdal o njem nobenega mnenja (123). Ugotovljena je bila peroralna toksičnost pri podganah, LD<sub>50</sub> (podgana, peroralno): > 2000 mg/kg. Dermalna in inhalacijska toksičnost nista bili ugotovljeni (124). ED je za barvilo CI 42053 napovedal veliko verjetnost vezave (rdeči razred) za naslednje jedrne receptorje: ER  $\beta$  an., GR an., PPAR  $\gamma$ . Na jedrnem receptorju ER  $\alpha$  an. je verjetnost vezave uvrščena v rumeni razred, na drugih jedrnih receptorjih pa v zeleni razred. Baza podatkov organizacije TEDX ga navaja, da je potencialni HM, ker vpliva na delovanje centralnega živčnega sistema preko modulacije izločanja nevrotransmiterjev, ki naj bi vplivali tudi na delovanje nevroendokrinega sistema kot navaja van Hooft s sodelavci (125). Informacij podatkovne baze TEDX o barvilu CI 42053 kot potencialnem HM ne meremo primerjati z rezultati napovedi programa ED, ker članek, ki ga TEDX navaja kot dokaz, da je CI 42053 potencialni motilec (125), ne navaja povezave z motnjo hormonskega sistema oziroma interakcij barvila CI 42053 z jedrnimi receptorji. Slika 17 prikazuje napoved programa ED za barvilo CI 42053.

	CI 42053 benzenmetanamonij, N-etyl-N-(4-(4-(etil((3-sulfofenil)metil)amino)fenil)(4-hidroksi-2-sulfophenyl)methilen)-2,5-cikloheksadien-1-iliden)-3-sulfo-, hidroksid, notranja sol, dinatrijeva sol
AR	AR : 22.5
AR an.	AR : 20.9
ER $\alpha$	ER $\alpha$ : -7.0
ER $\alpha$ an.	ER $\alpha$ : -8.7
ER $\beta$	ER $\beta$ : 13.3
ER $\beta$ an.	ER $\beta$ : -9.3
GR	GR: -1.5
GR an.	GR: -11.3
LXR $\alpha$	LXR $\alpha$ : -6.2
LXR $\beta$	LXR $\beta$ : -0.6
PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ : -6.9
PPAR $\beta$	PPAR $\beta$ : -8.4
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ : -7.9
RXR $\alpha$	RXR $\alpha$ : -4.2
TR $\alpha$	TR $\alpha$ : 19.5
TR $\beta$	TR $\beta$ : 17.5

Slika 17. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 42053.

Barvilo **CI 45430** z generičnim imenom Acid Red 51, eritrozin glede na kemijsko strukturo sodi med ksantenska barvila. Je rjavorožnat amorfni prah, ki obarva rdeče (51). Za njega veljajo merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 127). SCCS meni, da je kot barvilo v zobnih pastah varno v koncentraciji 0.0025 % (126). Ugotovljena je bila peroralna, intraperitonealna in intravenozna toksičnost pri laboratorijskih živalih, LD<sub>50</sub> (podgana, peroralno): 1840 mg/kg, LD<sub>50</sub> (miš, peroralno): 1264 mg/kg, LD<sub>50</sub> (miš, intravenozno): 370 mg/kg, LD<sub>50</sub> (zajec, intravenozno): 200 mg/kg, LD<sub>50</sub> (podgana, intraperitonealno): 300 mg/kg, LD<sub>50</sub> (podgana, intravenozno): 200 mg/kg (127). Dermalna in inhalacijska toksičnost nista bili ugotovljeni (127). Baza podatkov organizacije TEDX navaja, da je HM, na osnovi izsledkov dveh znanstvenih člankov. Eden od njiju je povzetek študije znanstvenika Borzelleca s sodelavci, ki navaja, da barvilo eritrozin poveča ščitnico (adenomi) pri poskusnih živalih (128). Drugi pa je članek avtorja Dalala in sodelavcev, ki poroča o pojavu visoke plazemske koncentracije kortikosterona in aktivaciji metabolizma serotoninina v možganih v povezavi z motorično hiperaktivnostjo, ki nastopi pri dolgotrajni izpostavitvi eritozinu pri testnih živalih. (129). Nevrobiokemijski mehanizem ni definiran (129). Program ED nam zaradi molske mase, ki presega 800 g/mol, za to barvilo ne da rezultatov napovedi vezave na jdrne receptorje, zato primerjava z informacijami podatkovne baze TEDX ni mogoča.

Barvilo **CI 58000** z generičnim imenom Pigment red 83/alizarin glede na kemijsko strukturo sodi med antrakinonska barvila. Obarva rdeče. SCCS o tem barvili ni izdal nobenega mnenja (130). Ugotovljena je peroralna toksičnost pri ptičih, LD<sub>50</sub> (divji ptič, peroralno): 316 mg/kg, dermalna in inhalacijska toksičnost nista bili ugotovljeni (131). Program ED je za barvilo CI 58000 napovedal verjetnost vezave na več jedrni receptorje. Verjetnost vezave na jedrna receptorja AR, AR an. je uvrstil v rdeči razred, na jedrna receptorja ER β, ER β an. v oranžni razred in na jedrne receptorje ER α, ER α an., GR, GR an., TR α, TR β v rumeni razred. Na druge testirane jedrne receptorje program ED uvršča verjetnost vezave v zeleni razred. V TEDX bazi je naveden kot HM, glede na poročilo raziskav znanstvenika Matsuda in sodelavcev (132). V članku poroča o estrogenski aktivnosti barvila alizarin (CI 58000), saj poveča proliferacijo celic na MCF-7, na estrogen občutljivi celični liniji. Primerjava informacij podatkovne baze TEDX in rezultatov programa ED za vezavo na jedrne receptorje kaže veliko skladnost, saj program ED napove verjetnost vezave na receptorja ER α, ER β. Slika 18 prikazuje napoved programa ED za barvilo CI 58000.

Spojina	CI 58000
	1,2-dihidroksiantrakinon
AR	AR : -9.3
AR an.	AR an.: -8.8
ER α	ER α: -8.6
ER α an.	ER α an.: -8.4
ER β	ER β: -9.0
ER β an.	ER β an.: -8.8
GR	GR: -8.5
GR an.	GR an.: -8.0
LXR α	LXR α: -9.0
LXR β	LXR β: -9.8
PPAR α	PPAR α: -8.2
PPAR β	PPAR β: -8.4
PPAR γ	PPAR γ: -8.5
RXR α	RXR α: -8.6
TR α	TR α: -8.4
TR β	TR β: -8.4

Slika 18. Napoved programa ED za vezavo z jedrnimi receptorji za barvilo CI 58000.

Barvilo **CI 77000** z generičnim imenom Pigment metal 1 (aluminij) glede na svojo kemijsko strukturo sodi med anorganske pigmente. Je srebrn prašek, ki obarva belo (133). Peroralna, pareneteralna, dermalna in inhalacijska toksičnost niso bile ugotovljene (133). Za to barvilo veljajo merila čistosti merila čistosti, kot so določena v Direktivi Komisije 95/45/ES (E 173) (134). Mnenje SCCS je, da je aluminij v visokih dozah toksičen, za nizke doze pa je premalo podatkov, ki bi zagotovo dokazali njegovo toksičnost (135). TEDX

podatkovna baza uvršča barvilo CI 77000 (aluminij) med HM, ker inhibira gensko ekspresijo paratiroidnega hormona s postranskripcijskim mehanizmom, kot navaja Gonzalez-Suarez s sodelavci (136). Sama primerjava z rezultati napovedi programa ED ni možna, ker ED ne da rezultatov o verjetnosti vezave na testirane jedrne receptorje za to barvilo. Tudi sicer receptorja za paratiroidni hormon ni med testiranimi jedrnimi receptorji programa ED.

TEDX podatkovna baza nam med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, navaja 6 spojin kot potencialne HM. Program ED nam za 4 od teh (CI 15985, CI 40800, CI 42053, CI 58000) daje rezultate o vezavi na jedrne receptorje, za dvoje barvil ne (CI 45430, CI 77000). Vse štiri napovedi programa ED kažejo verjetnost za vezavo omenjenih barvil na enega ali več jadrnih receptorjev in jih uvršča v rdeči, oranžni in rumeni razred. Primerjava rezultatov programa ED s podatkovno bazo TEDX kaže največjo ujemanje pri barvili CI 58000, pri drugih primerjava pravzaprav ni možna, ker podatki niso istovrstni. Program ED nam daje rezultate za verjetnost vezave le na testirane jedrne receptorje AR (agonistična in antagonistična oblika), ER  $\alpha$  in  $\beta$  (agonistična in antagonistična oblika), GR (agonistična in antagonistična oblika), LXR  $\alpha$  in  $\beta$ , PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  in  $\gamma$ , RXR  $\alpha$  in TR  $\alpha$  in  $\beta$ . Podatkovna baza TEDX pa za uvrstitev spojine med HM zajema podatke o delovanju spojin tudi na druge jadrne receptorje in druge mehanizme, ki vplivajo na motnje hormonskega sistema, ne le preko vezave na jadrne receptorje, pač pa kot možne HM obravnava tudi kemikalije, ki povzročajo motnje hormonskega ravovesja preko delovanja na druge organske sisteme v organizmu.

## 5 ZAKLJUČEK

Za namen diplomske naloge smo testirali 176 spojin, ki pripadajo 153 barvilom (nekatera barvila so sestavljena iz več spojin), ki so dovoljena za uporabo v KI v EU. Pridobili smo 135 rezultatov napovedi za verjetnost vezave teh kemijskih spojin na testirane receptorje s programom ED. Za 26 barvil nismo dobili napovedi, za eno barvilo delno napoved (barvilo CI 77004 je sestavljeno iz 3 spojin: aluminijev silikat, bentonit, kaolin; program ED da napoved samo za spojino bentonit). Glede na rezultate, ki smo jih pridobili s programom ED, smo prišli do naslednjih zaključkov:

Med 153 barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, 36 spojin kaže na zelo veliko jakost vezave na testirane jedrne receptorje in jih program ED uvršča v rdeči razred. S tem smo potrdili 1. hipotezo, da so med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI, spojine z zelo veliko afiniteto vezave na testirane jedrne receptorje glede na rezultate dobljene s programom ED in tako obstaja možnost, da so HM.

Med spojinami, ki pripadajo barvilom, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, 15 spojin ne kaže nobene afinitete vezave na testirane jedrne receptorje in jih program ED uvršča za vse jedrne receptorje v zeleni razred. S tem smo potrdili 2. hipotezo, da so med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI, spojine, ki ne kažejo verjetnosti vezave na testirane jedrne receptorje glede na rezultate dobljene s programom ED.

Med spojinami, ki pripadajo barvilom, dovoljenim za uporabo v KI, podatkovna baza TEDX navaja 6 spojin, ki so potencialni HM. Glede na rezultate programa ED ni nobene od teh spojin v zelenem razredu. To potrjuje določeno skladnost rezultatov programa ED s podatkovno bazo TEDX. Ker podatkovna baza TEDX uvršča med HM samo 6 barvil, ki so dovoljena v KI v EU, ne moremo ustrezno oceniti napovednosti programa ED.

TEDX podatkovna baza nam med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, kot potencialne HM navaja 6 spojin. Program ED nam za 4 od teh (CI 15985, CI 40800, CI 42053, CI 58000) daje rezulte o vezavi na jedrne receptorje, za dvoje barvil pa ne (CI 45430, CI 77000). Vse štiri napovedi programa ED kažejo verjetnost za vezavo omenjenih barvil na enega ali več jedrnih receptorjev in jih ED uvršča glede na afiniteto vezave na te receptorje v rdeči, oranžni in rumeni razred. Primerjava rezultatov programa ED s podatkovno bazo TEDX kaže največje ujemanje pri barvili CI 58000. Pri drugih barvilih

primerjava pravzaprav ni možna, ker podatki niso istovrstni. Program ED nam daje rezultate za verjetnost vezave le na testirane jedrne receptorje AR (agonistična in antagonistična oblika), ER  $\alpha$  in  $\beta$  (agonistična in antagonistična oblika), GR (agonistična in antagonistična oblika), LXR  $\alpha$  in  $\beta$ , PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  in  $\gamma$ , RXR  $\alpha$  in TR  $\alpha$  in  $\beta$ , podatkovna baza TEDX pa obravnava za napoved, ali je spojina HM, tudi druge jedrne receptorje in druge mehanizme, preko katerih spojine povzročajo motnje hormonskega sistema.

Glede na primerjavo rezultatov programa ED o verjetnosti vezave barvil dovoljenih za uporabo v KI v EU na testirane jedrne receptorje s podatki o potencialnih HM podatkovne baze TEDX ne moremo v celoti potrditi 3. hipoteze, da se napovednost ED o interakciji barvil z jedrnimi receptorji sklada s podatki podatkovne baze TEDX. Podatkov je premalo in niso istovrstni, da bi lahko ocenili napovednost programa ED. Ta metoda *in silico* pa nam lahko pomaga pri hitri oceni, ali so med barvili, ki so dovoljena za uporabo v KI v EU, tudi potencialni HM.

## 6 LITERATURA

1. UNEP and WHO: United Nations Environment Programme and the World Health Organization, State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/> dostopno 10.5.2016
2. National Institute of Environmental Health Science: Endocrine disruptors fact sheet: <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/> dostopno 10.5.2016
3. Veerasingam SA, Ali MM: Assessment of endocrine disruptors – DDTs and DEHP (plasticizer) in source water: a case study from Selangor, Malaysia. *J. WaterHealth* 2013; 11 (2): 311–323.
4. [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-13-677\\_sl.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-677_sl.htm) dostopno 13.7.2016
5. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2009:342:FULL&from=SL> dostopno 13.7.2016
6. [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/datoteke/drugi\\_kongres\\_slovenskega\\_toksikoloskega\\_drustva.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/datoteke/drugi_kongres_slovenskega_toksikoloskega_drustva.pdf) dostopno 13.7.2016
7. Guyton A C, Hall J E: Introduction to Endocrinology. In: *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006: 909.
8. Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT: State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012, An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization, UNEP in WHO, 2013.
9. Goodman H M: Basic Medical Endocrinology, Fourth Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam etc, 2009: 1–26.
10. Robinson-Rechavi M, Garcia H E, Laudet V: The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* 2003; 116 (4): 585–6.
11. Gao W, Bohl C E, Dalton J T: Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chemical reviews* 2005; 105 (9): 3352–70.
12. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua S A, Jordan V C, Katzenellenbogen J A, Korach K S, Maggi A, Muramatsu M, Parker M G, Gustafsson J A: International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58 (4): 773–781.

13. Raj Kumar E, Brad T: Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2005; 94 (5): 383–94.
14. Patološka fiziologija: Učbenik za študente farmacije/urednik Sergej Pirkmajer, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2015: 337–43.
15. Brent G A: Mechanisms of disease: The molecular basis of thyroid hormone action. *New Eng J Med* 1994; 331 (13): 847–53.
16. Flamant F, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TS, Vennstrom B, Samarat J: International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58 (4): 705–11.
17. McDowell J: Encyclopedia of Human Body Systems, Greenwood, Santa Barbara, 2011: 151–207.
18. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al: Research needs for the assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect* 1996; 104 (4): 715–40.
19. Grün F, Blumberg B: Endocrine disrupters as obesogens. *Molecular and cellular endocrinology* 2009; 304 (1): 19–29.
20. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, et al.: Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev* 2009; 30 (4): 293–342.
21. Caliman FA, Gavrilescu M: Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment – a review. *Clean – Soil Air Water* 2009; 37 (4–5): 277–303.
22. Matthiessen P: Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure Appl Chem* 2003; 75 (11–12): 2197–206.
23. Yeo MK: A study of effects and control policy of endocrine disruptors, Korean Institute of Criminology, Seoul, 2002.
24. David A, Fenet H, Gomez E: Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations. *Mar Pollut Bull* 2009; 58 (7): 953–60.

25. European Commission: Ban of phthalates in childcare articles and toys: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-99-829\\_en.htm?locale=en](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-99-829_en.htm?locale=en) dostopno 13.7.2016
26. International Food Safety Authorities Network: BISPHENOL A(BPA) – Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov\\_09\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov_09_en.pdf) dostopno 13.7.2016
27. Cristina P, Maria CU, Carmen V: Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. *Environ. Eng. Manage. J* 2012; 11 (9): 1697–706.
28. Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, et al: Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environ. Health Perspect* 2009; 117 (10): 1549–55.
29. Kidd KA, Becher G, Bergman A, Muir DCG, Woodruff TJ: Human and wildlife exposures to EDC's. Chapter 3. State of the science of endocrine-disrupting chemicals. UNEP, 2012: 189–250.
30. Erjavec B, Hudoklin P, Perc K, Tišler T, Sollner Dolenc M, Pintar A: Glass fiber-supported TiO<sub>2</sub> photocatalyst: efficient mineralization and removal of toxicity/estrogenicity of bisphenol A and its analogs. *Applied catalysis. B, Environmental*, ISSN 0926-3373. [Print ed.], Apr. 2016, vol. 183, str. 149–158: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337315302137,doi:10.1016/j.apcatb.2015.10.033> dostopno 18.6.2016.
31. Yang, O, et al: Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis. *Journal of cancer prevention* 2015; 20 (1): 12–24.
32. Westerhoff P, Yoon Y, Snyder S, Wert E: Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinkingwater treatment processes. *Environ Sci Technol* 2005; 39 (17): 6649–63.
33. Stumm-Zollinger E, Fair GM: Biodegradation of steroid hormones. *J Water Pollut Control Fed* 1965; 37 (11): 1506–10.
34. Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 1998; 36 (2): 357–93.
35. Watson PH, Pon RT, Shiu RP: Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51 (15): 3996–4000.

36. Kortenkamp A, Altenburger R: Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. *SciTotal Environ* 1998; 221 (1): 59–73.
37. Shudong S, Jingyun H, Changsheng Z: Polymeric particles for the removal of endocrine disruptors. *Sep Purif Rev* 2011; 40 (4): 312–37.
38. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P: Cancer incidence in five continents, Volume IX. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2007.
39. Patrick L: Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health. *Altern Med Rev* 2009; 14 (4): 326–46.
40. Mellanen P, Petanen T, Lehtimaki J, Makela S, Bylund G, Holmbom B, et al: Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136 (2): 381–8.
41. Costa EMF, Spritzer PM, Hohl A, Bachega TASS: Effects of endocrinodisruptors in the development of the female reproductive tract. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2014; 58 (2): 153–61.
42. Santodonato J: Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of poly-cyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 1997; 34 (4): 835–48.
43. Fechner P, Damdimopoulou P, Gauglitz G: Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogen receptor alpha. *PloS one* 2011; 6 (8): e23048.
44. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota\\_edc\\_final\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf) dostopno 14.7.2016
45. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_190.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf) dostopno 4.7.2016
46. <http://www.reach-info.de/dokumente/ENV-JM-MONO.pdf> dostopno 3.7.2016
47. Raunio H: *In silico* toxicology–non-testing methods. *Frontiers in pharmacology* 2011; 2: 33.
48. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0849:sl:PDF> dostopno 5.7.2016
49. <http://colour-index.com/about> dostopno 7.7.2016
50. Jeler S, Golob V: Barvila-barvanje, scripta, Tehniška fakulteta, Maribor, 1991.

51. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu. Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2015:  
[http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Pomozne\\_snovi.pdf](http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Pomozne_snovi.pdf)  
dostopno 29.7.2016
52. Baumgartner S, Zvonar A: Kozmetični izdelki I: vaje in teoretične osnove. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013:  
<http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Kozmeticniizdelki1.pdf>  
dostopno 24.7.2016
53. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R1120&qid=1474635154410&from=EN> dostopno 24.7.2016
54. Colour Index 3rd Edition in 5 volumes, The Society of Dyers and Colourists, American Association of textile chemists and colorists, 1971.
55. Mednarodna referenčna baza podatkov o barvilih Color Index International:  
<http://www.colour-index.com/cicn-explained> dostopno 29.10.2015
56. <http://www.cas.org/about-cas/faqs#casrn> dostopno 29.7.2016
57. Formularium Slovenicum 2.4: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji (FS 2.4): četrto dopolnilo k drugi izdaji. Ministrstvo za zdravje, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil, Ljubljana, 2009.
58. Kolšek K, Mavri J, Sollner Dolenc M, Gobec S, Turk S: Endocrine disruptome-an open source prediction tool for assessing endocrine disruption potential through nuclear receptor binding. *J Chem Inf Model* 2014; 54 (4): 1254–67.
59. Kotnik M., Oblak M, Perdih A, Šolmajer T: Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farmacevtski vestnik* 2010; 61 (4): 195-202.
60. <http://endocrinedisruptome.ki.si/prediction.html> dostopno 13.7.2016
61. <http://endocrinedisruptome.ki.si/FAQ.html> dostopno 3.8.2016
62. [https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing\\_en](https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing_en) dostopno 5.7. 2016
63. <http://www.thegoodscentscompany.com/>. dostopno 29.6.2016
64. [http://www.cambridgesoft.com/Ensemble\\_for\\_Chemistry/ChemOffice/ChemOffice Professional/](http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemOffice/ChemOffice Professional/) dostopno 27.8.2016

65. <http://www.chemspider.com/> dostopno 8.11.2014
66. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/about.html> dostopno 13.7.2016
67. <http://endocrinedisruption.org/> dostopno 2.9.2016
68. <http://endocrinedisruption.org/endocrine-disruption/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/chemicalsearch> dostopno 2.9.2016
69. <http://www.colour-index.com/cicn-groups-sub-groups> dostopno 15.7.2016
70. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=32704&back=1](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=32704&back=1) dostopno 15.7.2016
71. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1365011.html> dostopno 15.7.2016
72. <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details&id=30396&back=1> dostopno 13.7.2016
73. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1365021.html> dostopno 15.7.2016
74. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1365081.html#tophys> dostopno 13.7.2016
75. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=32716](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=32716) dostopno 13.7.2016
76. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1279911.html> dostopno 27.8.2016
77. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30487](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30487) dostopno 27.8.2016
78. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30442](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30442) dostopno 27.8.2016
79. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1355881.html> dostopno 27.8.2016
80. <http://www.worlddyeveristy.com/acid-dyes/acid-green-9.html> dostopno 27.8.2016
81. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30459](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30459) dostopno 27.8.2016
82. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1365321.html> dostopno 27.8.2016
83. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1352841.html> dostopno 27.8.2016
84. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30501](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30501) dostopno 27.8.2016
85. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1365301.html> dostopno 27.8.2016
86. Medical Journal of Australia 1985; 143: 622.
87. <http://www.worlddyeveristy.com/acid-dyes/acid-red-52.html> dostopno 27.8.2016

88. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30470](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30470) dostopno 27.8.2016
89. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1285081.html> dostopno 27.8.2016
90. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2009:342:FULL&from=SL> dostopno 27.8.2016
91. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30493](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30493) dostopno 29.8.2016
92. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1013901.html#tosafy> dostopno 29.8.2016
93. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30519](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30519) dostopno 30.8.2016
94. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/ex1606911.html#tosafy> dostopno 30.8.2016
95. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1030761.html> dostopno 30.8.2016
96. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30520](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30520) dostopno 31.8.2016
97. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30522](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30522) dostopno 31.8.2016
98. [http://www.artiscreation.com/white.html#natural\\_pigments](http://www.artiscreation.com/white.html#natural_pigments) dostopno 31.8.2016
99. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30523](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30523) dostopno 31.8.2016
100. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1248891.html> dostopno 1.9.2016
101. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30526](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30526) dostopno 1.9.2016
102. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1229011.html> dostopno 1.9.2016
103. <http://www.chemnet.com/resource/colour/supplier.cgi?exact=dict&f=plist&l=en&terms=1333-86-4&id=176> dostopno 1.9.2016
104. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30536](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30536) dostopno 2.9.2016
105. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1310431.html> dostopno 2.9.2016
106. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30540](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30540) dostopno 2.9.2016

107. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1298781.html#tosynm>  
dostopno 2.9.2016
108. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30542](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30542) dostopno 2.9.2016
109. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1252071.html#tosynm>  
dostopno 2.9.2016
110. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1100231.html#tosafy>  
dostopno 2.9.2016
111. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=31188](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=31188) dostopno 3.9.2016
112. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1401091.html> dostopno 3.9.2016
113. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=31193](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=31193) dostopno 3.9.2016
114. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1225601.html#tosynm>  
dostopno 3.9.2016
115. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30421](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30421) dostopno 3.9.2016
116. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1131841.html#tosynm>  
dostopno 3.9.2016
117. Hashem MM, Atta AH, Arbid MS, Nada SA, Asaad GF: Immunological studies on Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food colouring agents in albino rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (6): 1581–6.
118. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30449](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30449) dostopno 3.9.2016
119. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1105911.html> dostopno 4.9.2016
120. Rosenberg RS, et al: Modulation of androgen and progesterone receptors by phytochemicals in breast cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 248.3: 935–9.
121. [https://www.ewg.org/skindeep/ingredient/702417/FD%26C\\_GREEN\\_3/#](https://www.ewg.org/skindeep/ingredient/702417/FD%26C_GREEN_3/#)  
dostopno 4.9.2016
122. <http://fscimage.fishersci.com/msds/60270.htm> dostopno 4.9.2016
123. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30456](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30456) dostopno 4.9.2016

124. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1246791.html> dostopno 4.9.2016
125. van Hooft JA: Fast Green FCF (Food Green 3) inhibits synaptic activity in rat hippocampal interneurons. *Neurosci Lett* 2002; 318 (3):163–5.
126. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_030.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_030.pdf) dostopno 4.9.2016
127. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1131811.html> dostopno 4.9.2016
128. Borzelleca JF, Capen C C, Hallagan JB: Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD & C Red No. 3 (erythrosine) in rats. *Food and chemical toxicology* 1987; 25 (10): 723–33.
129. Dalal A, Mrinal KP: Involvement of high plasma corticosterone status and activation of brain regional serotonin metabolism in long-term erythrosine-induced rearing motor hyper activity in young adult male rats. *Toxicology mechanisms and methods* 2010; 20 (6): 287–97.
130. [http://ec.europa.eu/growth/toolsdatabases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30492](http://ec.europa.eu/growth/toolsdatabases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30492) dostopno 4.9.2016
131. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1216581.html> dostopno 4.9.2016
132. Matsuda H, et al<: Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2001; 11 (14): 1839–42.
133. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1219031.html> dostopno 4.9.2016
134. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details\\_v2&id=30527](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=30527) dostopno 4.9.2016
135. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_153.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_153.pdf) dostopno 4.9.2016
136. Gonzalez-Suarez I, et al: Aluminum posttranscriptional regulation of parathyroid hormone synthesis: a role for the calcium-sensing receptor. *Kidney international* 2005; 68 (6): 2484–96.

## 7 Priloge

### PRILOGA I. Rezultati napovedi ED za barvila.

Rezultati napovedi ED za barvila iz seznama dovoljenih barvil v KI iz Priloge IV Uredbe št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih.

Pri vsaki spojini je v stolpcu navedena najprej referenčna številka barvila iz Priloge IV Uredbe št. 1223/2009, sledi številka barvnega indeksa CI oziroma ime skupnih sestavin kot v glosarju in kemijsko ime, nato je napoved programa ED po posameznih testiranih jedrni receptorjih.

	1 CI 10006	2 trinatrijev tris[5,6-dihidro-5-(hidroksiimino)-6-oksidonataLEN-2-sulfonato(2-)-N5,O6]ferat(3-)	3 CI 10316	4 dinatrijev 5,7-dinitro-8-oksidonataLEN-2-sulfonato(2-)-barvjava, stroncjeva in cirkonjeva karminsko rdeča barvila, soli in pigmenti	5 CI 11680	6 2-[(4-metil-2-nitrofenil)azo]-3-okso-N-fenilbutiramid	7 CI 11725	CI 11920 4-(fenilazo)rezorcinal
Spojina	natrijev tris(1,2-naftokinon 1-oksimato-O,O')ferat (1-)							
AR	AR : -7.3	AR : -7.8	AR : -6.4	AR : -6.0	AR : -6.4	AR : -5.4	AR : -8.4	
AR an.	AR an.: -6.9	AR an.: -7.7	AR an.: -7.3	AR an.: -8.4	AR an.: -7.8	AR an.: -5.8	AR an.: -8.3	
ER α	ER α: -6.7	ER α: -7.4	ER α: -7.2	ER α: -9.1	ER α: -7.8	ER α: -7.4	ER α: -8.1	
ER α an.	ER α an.: -6.8	ER α an.: -7.5	ER α an.: -6.8	ER α an.: -8.3	ER α an.: -8.2	ER α an.: -7.9	ER α an.: -7.8	
ER β	ER β: -6.7	ER β: -7.6	ER β: -7.1	ER β: -8.1	ER β: -6.4	ER β: -8.1	ER β: -7.9	
ER β an.	ER β an.: -6.7	ER β an.: -7.2	ER β an.: -6.6	ER β an.: -7.9	ER β an.: -7.4	ER β an.: -7.8	ER β an.: -7.9	
GR	GR: -6.6	GR: -7.6	GR: -7.6	GR: -8.8	GR: -8.8	GR: -8.7	GR: -7.5	
GR an.	GR an.: -6.4	GR an.: -6.7	GR an.: -6.5	GR an.: -8.1	GR an.: -7.6	GR an.: -8.2	GR an.: -6.8	
LXR α	LXR α: -7.2	LXR α: -8.1	LXR α: -8.3	LXR α: -10.1	LXR α: -9.3	LXR α: -9.5	LXR α: -7.8	
LXR β	LXR β: -7.8	LXR β: -8.4	LXR β: -7.9	LXR β: -9.7	LXR β: -9.2	LXR β: -9.6	LXR β: -8.0	
PPAR α	PPAR α: -6.4	PPAR α: -6.9	PPAR α: -6.8	PPAR α: -8.0	PPAR α: -7.6	PPAR α: -7.4	PPAR α: -7.6	
PPAR β	PPAR β: -7.1	PPAR β: -7.6	PPAR β: -7.3	PPAR β: -8.4	PPAR β: -7.5	PPAR β: -8.2	PPAR β: -7.5	
PPAR γ	PPAR γ: -6.3	PPAR γ: -6.9	PPAR γ: -7.3	PPAR γ: -8.3	PPAR γ: -8.1	PPAR γ: -8.6	PPAR γ: -7.9	
RXR α	RXR α: -6.9	RXR α: -7.8	RXR α: -7.9	RXR α: -9.5	RXR α: -8.9	RXR α: -9.1	RXR α: -8.4	
TR α	TR α: -7.7	TR α: -7.9	TR α: -7.0	TR α: -7.7	TR α: -7.3	TR α: -7.1	TR α: -8.5	
TR β	TR β: -7.1	TR β: -7.6	TR β: -7.7	TR β: -8.9	TR β: -8.7	TR β: -8.1	TR β: -8.0	

	8 CI 12010	9 CI 12085	10 CI 12120	11 CI 12370	12 CI 12420	13 CI 12480	14 CI 12490
Spojina	4-[(4-ektosifenil)azo]naftol	1-[(2-kloro-4-nitrofenil)azo]-2-naftol	1-[4-metil-2-nitrofenil)azo]-2-naftol	3-hidroksi-N-(o-tolil)-4-[(2,4,5-triklorofenil)azo]naftalen-2-karboksamid	N-(4-kloro-2-metilfenil)-4-[(2,5-dimoksinfenil)azo]-N-(2,5-dimetoksifenil)-3-hidroksinaftalen-2-karboksamid	4-[(2,5-diklorofenil)azo]-N-(5-dimetoksifenil)-4-[(5-(diethylamino)sulfoni)-2-metoksifenil]azosulfonat	N-(5-kloro-2,4-dimetoksifenil)-4-[(5-(diethylamino)sulfoni)-2-metoksifenil]azosulfonat
AR	AR : -6.9	AR : -6.4	AR : -8.0	AR : 9.9	AR : 8.4	AR : 8.0	AR : 7.0
AR an.	AR an.: -6.2	AR an.: -5.3	AR an.: -8.1	AR an.: 3.6	AR an.: 0.0	AR an.: 0.8	AR an.: 9.5
ER α	ER α: -7.9	ER α: -6.6	ER α: -8.2	ER α: -6.6	ER α: -7.2	ER α: -6.0	ER α: -5.6
ER α an.	ER α an.: -7.5	ER α an.: -7.3	ER α an.: -8.3	ER α an.: -9.3	ER α an.: -8.6	ER α an.: -7.3	ER α an.: -6.6
ER β	ER β: -5.7	ER β: -7.1	ER β: -8.3	ER β: 3.2	ER β: 1.8	ER β: 1.4	ER β: 5.7
ER β an.	ER β an.: -7.8	ER β an.: -8.1	ER β an.: -8.3	ER β an.: -8.2	ER β an.: -8.4	ER β an.: -7.4	ER β an.: -6.7
GR	GR: -9.1	GR: -9.1	GR: -9.3	GR: -8.9	GR: -9.3	GR: -8.8	GR: -8.0
GR an.	GR an.: -7.9	GR an.: -8.1	GR an.: -8.0	GR an.: -9.8	GR an.: -9.9	GR an.: -9.0	GR an.: -8.4
LXR α	LXR α: -9.6	LXR α: -10.2	LXR α: -9.7	LXR α: -10.2	LXR α: -11.1	LXR α: -10.0	LXR α: -7.9
LXR β	LXR β: -9.8	LXR β: -9.9	LXR β: -10.4	LXR β: -11.2	LXR β: -11.6	LXR β: -10.0	LXR β: -7.1
PPAR α	PPAR α: -7.7	PPAR α: -7.9	PPAR α: -8.6	PPAR α: -9.5	PPAR α: -8.5	PPAR α: -9.4	PPAR α: -7.5
PPAR β	PPAR β: -8.4	PPAR β: -8.6	PPAR β: -8.8	PPAR β: -11.8	PPAR β: -11.1	PPAR β: -10.4	PPAR β: -8.1
PPAR γ	PPAR γ: -8.0	PPAR γ: -8.3	PPAR γ: -8.0	PPAR γ: -9.6	PPAR γ: -10.0	PPAR γ: -8.3	PPAR γ: -7.8
RXR α	RXR α: -9.0	RXR α: -9.7	RXR α: -9.2	RXR α: -9.4	RXR α: -8.9	RXR α: -8.2	RXR α: -4.4
TR α	TR α: -8.1	TR α: -8.4	TR α: -8.8	TR α: -9.2	TR α: -9.1	TR α: -8.8	TR α: 3.8
TR β	TR β: -8.8	TR β: -8.0	TR β: -8.5	TR β: -7.4	TR β: -7.2	TR β: -6.9	TR β: 0.1











	149-1 antocianini cianidin	149-2 antocianini peonidin	149-3 antocianini malividin	149-4 antocianini delfinidin	149-5 antocianini petunidin	149-6 antocianini pelargonidin	151 Bromothymol blue fenol, 4,4'-(3H-2,1- benzoksatol-3- iliden)bis[2-bromo-3-metil- 6-)1-metilet]], S,S- dioksid
AR	AR: -9.1	AR: -8.4	AR: -5.3	AR: -8.8	AR: -8.1	AR: -8.9	AR: 18.0
AR an.	AR an.: -8.7	AR an.: -8.2	AR an.: -6.1	AR an.: -8.7	AR an.: -8.3	AR an.: -8.5	AR an.: 7.2
ER $\alpha$	ER $\alpha$ : -8.2	ER $\alpha$ : -7.2	ER $\alpha$ : -6.8	ER $\alpha$ : -7.9	ER $\alpha$ : -7.2	ER $\alpha$ : -8.3	ER $\alpha$ : -4.3
ER $\alpha$ an.	ER $\alpha$ an.: -8.7	ER $\alpha$ an.: -8.0	ER $\alpha$ an.: -6.8	ER $\alpha$ an.: -8.3	ER $\alpha$ an.: -7.4	ER $\alpha$ an.: -8.5	ER $\alpha$ an.: -8.0
ER $\beta$	ER $\beta$ : -7.4	ER $\beta$ : -6.2	ER $\beta$ : -4.6	ER $\beta$ : -7.0	ER $\beta$ : -5.2	ER $\beta$ : -7.8	ER $\beta$ : 6.2
ER $\beta$ an.	ER $\beta$ an.: -8.6	ER $\beta$ an.: -7.7	ER $\beta$ an.: -6.9	ER $\beta$ an.: -8.1	ER $\beta$ an.: -7.8	ER $\beta$ an.: -9.1	ER $\beta$ an.: -6.6
GR	GR: -9.7	GR: -8.5	GR: -8.0	GR: -9.2	GR: -8.9	GR: -9.2	GR: 0.2
GR an.	GR an.: -8.1	GR an.: -8.2	GR an.: -7.4	GR an.: -8.1	GR an.: -8.1	GR an.: -8.0	GR an.: -8.6
LXR $\alpha$	LXR $\alpha$ : -8.9	LXR $\alpha$ : -8.9	LXR $\alpha$ : -8.6	LXR $\alpha$ : -9.0	LXR $\alpha$ : -9.0	LXR $\alpha$ : -8.7	LXR $\alpha$ : -4.3
LXR $\beta$	LXR $\beta$ : -9.2	LXR $\beta$ : -9.3	LXR $\beta$ : -9.0	LXR $\beta$ : -9.1	LXR $\beta$ : -9.1	LXR $\beta$ : -9.2	LXR $\beta$ : -1.1
PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ : -7.8	PPAR $\alpha$ : -7.7	PPAR $\alpha$ : -8.0	PPAR $\alpha$ : -7.8	PPAR $\alpha$ : -7.9	PPAR $\alpha$ : -7.8	PPAR $\alpha$ : -5.5
PPAR $\beta$	PPAR $\beta$ : -8.8	PPAR $\beta$ : -8.6	PPAR $\beta$ : -8.1	PPAR $\beta$ : -8.8	PPAR $\beta$ : -9.0	PPAR $\beta$ : -8.6	PPAR $\beta$ : -5.6
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ : -9.0	PPAR $\gamma$ : -8.4	PPAR $\gamma$ : -7.6	PPAR $\gamma$ : -7.7	PPAR $\gamma$ : -7.8	PPAR $\gamma$ : -9.1	PPAR $\gamma$ : -6.7
RXR $\alpha$	RXR $\alpha$ : -8.7	RXR $\alpha$ : -8.6	RXR $\alpha$ : -8.4	RXR $\alpha$ : -8.2	RXR $\alpha$ : -7.8	RXR $\alpha$ : -8.7	RXR $\alpha$ : -7.1
TR $\alpha$	TR $\alpha$ : -9.3	TR $\alpha$ : -8.3	TR $\alpha$ : -6.7	TR $\alpha$ : -9.4	TR $\alpha$ : -8.6	TR $\alpha$ : -9.4	TR $\alpha$ : 8.7
TR $\beta$	TR $\beta$ : -8.9	TR $\beta$ : -9.1	TR $\beta$ : -7.0	TR $\beta$ : -8.9	TR $\beta$ : -8.9	TR $\beta$ : -9.0	TR $\beta$ : 4.8

	152 Bromocresol green	153 Acid Red 195
	natrijev 4-[4,5-dihidro-3- benzoksatol-3- iliden]bis[2,6-dibromo-3- metil-, 5,S-dioksid	natrijev 4-[4,5-dihidro-3- metil-5-okso-1-fenil-1H- pirazol-4-il]azol]-3- hidroksinatafelen-1- sulfonat
AR	AR: 17.7	AR: 8.9
AR an.	AR an.: 6.7	AR an.: 12.2
ER $\alpha$	ER $\alpha$ : -4.3	ER $\alpha$ : -5.7
ER $\alpha$ an.	ER $\alpha$ an.: -7.5	ER $\alpha$ an.: -7.6
ER $\beta$	ER $\beta$ : 3.7	ER $\beta$ : 5.0
ER $\beta$ an.	ER $\beta$ an.: -5.7	ER $\beta$ an.: -7.6
GR	GR: -0.4	GR: -10.1
GR an.	GR an.: -8.4	GR an.: -8.9
LXR $\alpha$	LXR $\alpha$ : -5.4	LXR $\alpha$ : -9.8
LXR $\beta$	LXR $\beta$ : -2.3	LXR $\beta$ : -11.0
PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ : -3.5	PPAR $\alpha$ : -8.3
PPAR $\beta$	PPAR $\beta$ : -6.2	PPAR $\beta$ : -8.9
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ : -8.3	PPAR $\gamma$ : -9.5
RXR $\alpha$	RXR $\alpha$ : -7.2	RXR $\alpha$ : -6.8
TR $\alpha$	TR $\alpha$ : 11.2	TR $\alpha$ : -8.4
TR $\beta$	TR $\beta$ : 6.0	TR $\beta$ : -7.5