

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA TROGAR
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA TROGAR

**PROUČEVANJE UČINKOV MEŠANIC BISFENOLOV A, F IN AF NA
ESTROGENSKO AKTIVNOST**

**STUDYING THE EFFECTS OF MIXTURES OF BISPHENOLS A, F AND AF ON
ESTROGENIC ACTIVITY**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Raziskovalno delo za magistrsko nalogo sem opravila na Kemijskem inštitutu v Odseku za okoljske vede in inženirstvo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom dr. Tatjane Tišler.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag.farm. za vso pomoč, usmerjanje in nasvete pri pisanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi dr. Tatjani Tišler za pomoč in nasvete pri izvedbi praktičnega dela magistrske naloge ter ostalim sodelavcem Odseka za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in sošolcem za vso pomoč in vzpodbudne besede.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag.farm., in somentorstvom dr. Tatjane Tišler.

Ljubljana, 2017

Urška Trogar

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	ii
KAZALO SLIK	iv
KAZALO TABEL	v
POVZETEK	vi
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV	x
1 UVOD	1
1.1 HORMONSKI SISTEM	1
1.2 HORMONSKI MOTILCI	1
1.2.1 VRSTE HORMONSKIH MOTILCEV	2
1.3 BISFENOLI	3
1.3.1 BISFENOL A	3
1.3.2 BISFENOL F	10
1.3.3 BISFENOL AF	12
1.4 MEŠANICE KEMIČALI	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI	18
3.2. METODE	18
3.2.1. BIOLOŠKI TEST YES (YEAST ESTROGEN SCREEN)	18
3.2.2. IZVEDBA YES testa	19
3.2.3. PRIPRAVA RAZTOPIN	22
3.2.4. POTEK YES TESTA	25
3.2.5. IZRAČUNI POTREBNI ZA VREDNOTENJE YES TESTA	28
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1 ESTROGENOST NARAVNEGA LIGANDA	30

4.2 ESTROGENSKA AKTIVNOST BPA, BPF IN BPAF.....	32
4.3 CITOTOKSIČNOST POSAMEZNIH BISFENOLOV.....	38
4.4 CITOTOKSIČNOST MEŠANIC BISFENOLOV	40
4.5 ESTROGENSKA AKTIVNOST MEŠANIC BPA, BPF IN BPAF.....	41
5 SKLEP	45
6 LITERATURA	47
7 PRILOGE	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema hormonskega sistema: tkiva, organi, organski sistemi in žleze.....	1
Slika 2: Splošna strukturna formula bisfenolov	3
Slika 3: Strukturna formula bisfenola A.....	3
Slika 4: Strukturna formula bisfenola F	10
Slika 5: Strukturna formula BPAF	12
Slika 6: Shematski prikaz ekspresijskega sistema v kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in aktivacija sistema z estrogenom	19
Slika 7: Priprava redčitvene vrste na mikrotitrski plošči.....	25
Slika 8: Primer mikrotitrške plošče 1	26
Slika 9: Primer mikrotitrške plošče 2	27
Slika 10: Slika 17 β -estradiola.....	30
Slika 11: Interakcije E2 z aminokislinami in vodo z vezavnim mestom na estrogenskem receptorju	31
Slika 12: Primerjava 3D farmakoforov 17 β -estradiola (E2) in BPA	32
Slika 13: Odvisnost aktivnosti β -galaktozidaze od koncentracije BPA, BPAF, BPF ter E2 in P.....	33
Slika 14: 3D strukture: BPA, BPF, E2 in BPAF	35
Slika 15: Indukcija bioluminiscence (% E2max) v odvisnosti od koncentracije posameznega bisfenola	37
Slika 16: Relativna estrogenska aktivnost BPA, BPF in BPAF	38
Slika 17: Koncentracije BPA, BPF, BPAF in P padajo od leve proti desni.....	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razpolovni čas bisfenola A v okolju.....	4
Preglednica II: Razpolovni čas BPF v okolju.....	11
Preglednica III: Razpolovni čas BPAF v okolju	12
Preglednica IV: Preiskovane spojine	18
Preglednica V: Masa spojin za pripravo raztopine z molsko koncentracijo $17,52 \times 10^{-5}$ mol/L	23
Preglednica VI: Masa spojin za pripravo mešanic za posamezne EC pred redčenjem.	24
Preglednica VII: EC ₅₀ BPA, BPAF, BPF in E2	33
Preglednica VIII: EC ₅₀ določene za posamezne bisfenole in E2 določene v celični liniji raka dojke MCF-7.....	34
Preglednica IX: Estrogenska jakost BPAF in BPF.....	35
Preglednica X: Primerjava EC ₅₀ BPA, BPAF, BPF in E2 med BLYES, Xenoscreen XL YES/YAS in YES testom.	36
Preglednica XI: Zaviranje rasti kvasovk po izpostavitvi različnim koncentracijam BPA, BPAF in BPF.	39
Preglednica XII: Zaviranje rasti pri EC ₁₀	40
Preglednica XIII: Zaviranje rasti pri EC ₂₀	40
Preglednica XIV: Zaviranje rasti pri EC ₃₀	41
Preglednica XV: EC ₁₀ , EC ₂₀ in EC ₃₀ za posamezne bisfenole. EC(x) predstavlja estrogensko aktivnost pri 10 %, 20 % in 30 % maksimalne estrogene aktivnosti za posamezni bisfenol.	42
Preglednica XVI: Relativna estrogenska aktivnost mešanic pri EC ₁₀	42
Preglednica XVII: Relativna estrogenska aktivnost mešanic pri EC ₂₀	42
Preglednica XVIII: Relativna estrogenska aktivnost mešanic pri EC ₃₀	43

POVZETEK

Kontaminacija hrane, vode in okolja postaja vse večji svetovni problem zaradi vedno hitrejša globalne industrializacije. Za industrijsko najbolj razširjeno kemikalijo velja bisfenol A (BPA), ki je praktično prisoten že na vsakem koraku, saj je sestavni del številnih plastičnih materialov, med katerimi je pomembna tudi embalaža za hrano. Spada v skupino hormonskih motilcev in tako lahko škodljivo vpliva na hormonski sistem človeka in živali. Poznanih je že veliko škodljivih učinkov te kemikalije, predvsem je dolgo poznan vpliv BPA na estrogenski sistem. Zaradi škodljiv učinkov bisfenola A so bili razviti njegovi nalogi (npr. bisfenol F in bisfenol AF), za katere pa se v zadnjem času ugotavlja, da naj bi imeli podobne učinke kot njihova starševska spojina. Hkrati pa se moramo zavedati, da v realnem svetu nikakor nismo izpostavljeni le eni kemikaliji, temveč gre najpogosteje za kompleksne mešanice spojin, ki imajo lahko zelo nepredvidljive učinke.

V magistrski nalogi smo proučevali vpliv posameznih bisfenolov (BPA, BPAF, BPF) in njihovih mešanic na estrogensko delovanje z uporabo YES testa (test določanja estrogenske aktivnosti z gensko spremenjenimi kvasovkami). YES test velja za test z dobro ponovljivostjo, zanesljivostjo, občutljivostjo in je cenovno ugoden za izvajanje. Gensko spremenjena kvasovka vsebuje namreč v svojem genomu zapis za humani estrogenski receptor, kar nam omogoča proučevanje estrogenskega učinka kemikalij. Poleg tega zapisa vsebuje še ekspresijski plazmid, ki vsebuje reporterski gen lac-Z. Ta kodira zapis za encim β -galaktozidazo, ki pod vplivom estrogensko aktivne spojine pretvori kromogen substrat klorofenol rdeče β -D-galaktopiranozid (CPRG) v klorofenol rdeče, kar zaznamo kot spremembo barve iz rumene v vijolično. Nastalemu vijoličnemu produktu lahko izmerimo absorbanco pri 575 nm. Ta test omogoča proučevati vpliv posameznih kemikalij in njihovih mešanic v poljubnem razmerju in pri različnih koncentracijah, ki niso citotoksične za kvasovke. Najprej smo ovrednotili citotoksičnost posameznih bisfenolov in kasneje njihovih mešanic z meritvijo absorbance ravnega medija s kvasovkami in CPRG-jem pri 620 nm. Nato smo za vsak posamezen bisfenol izvedli test na estrogensko aktivnost. Iz dobljenih krivulj, ki prikazujejo odvisnost aktivnosti β -galaktozidaze od koncentracije posameznega bisfenola, smo določili koncentracije pri EC₁₀, EC₂₀ in EC₃₀, s katerimi smo nadalje pripravili različne mešanice v enakem volumsko volumskem razmerju in ugotavljali učinke le-teh.

Rezultati testa so pokazali, da vsi bisfenoli izkazujejo estrogenski učinek. Na jakost estrogenskega učinka in citotoksičnost vpliva sama struktura bisfenol. BPAF z izračunanim EC_{50} 2,13 μM izkazuje najmočnejše agonistično estrogensko delovanje, s šibkejšim delovanjem mu sledita BPF z EC_{50} vrednostjo 13,35 μM in BPA z EC_{50} vrednostjo 14,69 μM . Za najbolj citotoksičnega velja BPAF, sledita mu BPA in BPF. Pri proučevanju učinkov mešanic smo ugotovili, da se učinki pri binarnih mešanicah seštevajo, medtem ko smo pri mešanicah treh bisfenolov zaznali učinek, ki je manjši od vsote učinkov posameznih spojin v mešanici. Same citotoksičnosti bisfenolov tudi pri mešanicah nismo zaznali. Pri EC_{10} in EC_{20} smo opazili celo minimalno spodbujanje rasti kvasovk.

Ključne besede:

hormonski motilci,

bisfenoli A, F, AF,

estrogenska aktivnost,

citotoksičnost,

učinki mešanic

ABSTRACT

The contamination of food, water and the environment is becoming a growing global problem due to faster global industrialization. The most common industrial chemical is considered to be bisphenol A (BPA), which is practically present on every step, as it is an integral part of many plastic materials, among which is also important food packaging. It belongs to a group of endocrine disrupting compounds and so could harmfully effect hormonal system of man and animals. There are already a lot of the harmful effects of these chemicals, especially well known impact of BPA on estrogenic system. Due to the harmful effects of bisphenol A its analogs (e.g. bisphenol F and bisphenol AF) have been developed and have recently shown similar effects as their parental compound. At the same time we must be aware of exposure not only to just one chemical, but also to complex mixtures of compounds that are more likely to appear and could have very unpredictable effects.

In our master's work we studied the impact of individual bisphenols (BPA, BPAF, BPF) and their mixtures on the estrogenic activity by using the YES test (test of determination estrogenic activity with genetically modified yeast). YES test is considered as a test with good repeatability, reliability, sensitivity and its inexpensive implement. Genetically modified yeast contains in genome the record for human estrogenic receptor, which allows us to study the estrogenic activity of chemicals. In addition this yeast also includes expressive plasmid, which contains the reporter gene lac-Z. This encodes the record for the enzyme β -galactosidase. Under the influence of estrogenic active compound β -galactosidase converts chromogenic substrate chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) in the chlorophenol red. This reaction we detect as a change of colour from yellow to purple. We can measure absorbance to the purple product at 575 nm. The test makes it possible to study the impact of individual chemicals and its mixtures in any proportion and at different concentrations, which are not cytotoxic for yeast. Firstly, we evaluated the cytotoxicity of individual bisphenols and later their mixtures by the measurements of absorbance to growth medium with yeast and CPRG at 620 nm. We performed the test of the estrogenic activity for each bisphenol's solution. From the obtained curves, which show the dependence of the activity of the β -galactosidase from the concentration of the individual bisphenol, we have defined the concentration at the EC₁₀, EC₂₀ and EC₃₀, with which we further prepared different mixtures in the same volume volume relationship and investigated the effects of its mixtures.

The test results showed that all bisphenols exhibit estrogenic activity. The intensity of the estrogenic activity and cytotoxicity itself influenced by the structure of bisphenol. BPAF with the calculated EC50 2,13 μM shows the strongest agonistic estrogenic activity, with the weaker activity followed by BPF with the EC50 value of 13,35 μM and a BPA with the EC50 value 14,69 μM . For the most cytotoxic is considered BPAF, followed by BPA and BPF. When studying the effects of mixtures, we found that effects in binary mixtures were added together, while in mixtures of the three bisphenols we notice the effect, which is smaller to the sum of effects of individual compounds. The cytotoxicity of bisphenols in mixtures was also not detected at the EC10 and EC20, we even noticed the minimal promote growth of yeasts.

Key words:

endocrine disrupting compounds,

bisphenols A, F, AF,

estrogenic activity,

cytotoxicity,

effects of mixtures

SEZNAM OKRAJŠAV

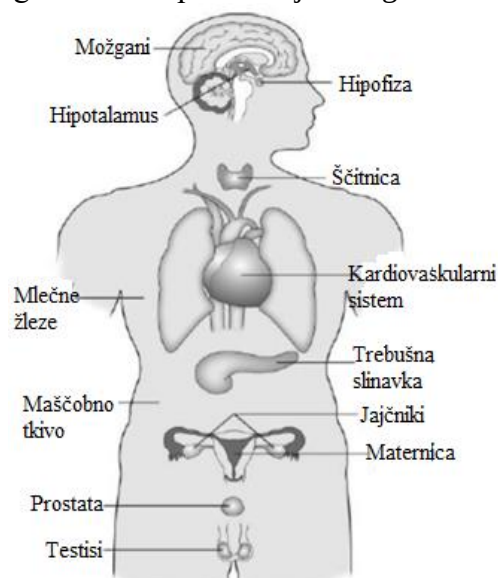
A	absorbanca
B	slepa kontrola
BLYES	Bioluminiscenčni estrogenski test na kvasovkah
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPF	bisfenol F
CF ₃	trifluorometilna skupina
CH ₃	metilna skupina
CPR	klorofenol rdeče
CPRG	klorofenol rdeče β -D-galaktopiranozid
DDT	1,1,1-trikloro-2,2-di(<i>p</i> -klorofenil)etan
DES	dietilstilbestrol
DMSO	dimetilsulfoksid
E2	17 β -estradiol
EA	estrogenska aktivnost
EC ₁₀	koncentracija agonista, ki izzove učinek enak 10 % maksimalnega učinka
EC ₂₀	koncentracija agonista, ki izzove učinek enak 20 % maksimalnega učinka
EC ₃₀	koncentracija agonista, ki izzove učinek enak 30 % maksimalnega učinka
EC ₅₀	koncentracija agonista, ki izzove učinek enak polovici maksimalnega učinka
EFSA	Evropska agencija za varno hrano
ER	estrogenski receptor
ERE	na estrogene odzivni element

ERR γ	estrogenskemu podoben γ -receptor
ES	endokrini sistem
hER	humani estrogenski receptor
HS	hormonski sistem
K _{CPRG}	kontrola CPRG-ja
K _G	kontrola gojišča
n	nano
NOAEL	najvišji testni odmerek, pri katerem ni opaziti nobenega neželenega učinka
OD	optična gostota
p	piko
P	progesteron
REA	relativna estrogenska aktivnost
RPF	faktor relativne jakosti
SCF	Znanstveni svet za hrano
T3	trijodtironin
T4	tiroksin
UV	ultravijolična svetloba
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija
YAS	test določanja androgene aktivnosti s kvasovkami
YES	test določanja estrogenske aktivnosti s kvasovkami
ZDA	Združene države Amerike

1 UVOD

1.1 HORMONSKI SISTEM

Živimo v svetu, v katerem smo nenehno izpostavljeni različnim škodljivim dejavnikom, med katere spadajo tudi kemikalije. Določene kemikalije lahko pomembno vplivajo na delovanje organizmov. Predvsem je lahko problematičen njihov vpliv na hormonski (HS) oz. endokrini sistem (ES) človeka ter živali. ES poleg živčnega sistema predstavlja enega izmed najpomembnejših sistemov za ohranjanje notranjega ravnovesja človeka, t.j. homeostaze. HS sestavljajo žleze z notranjim izločanjem, hormoni, hormonski receptorji, tarčne celice, organi in organski sistemi (Slika 1). Žleze z notranjim izločanjem vršijo sintezo in izločanje kemijskih snovi-hormonov neposredno v kri ter na ta način omogočajo, da hormon doseže vsako tarčno celico v organizmu. Hormon posreduje učinke preko signalnih poti, ki v večini primerov vključujejo t.i. hormonske receptorje, ki so locirani v celični membrani, jedru oziroma v citoplazmi celice. Pri človeku je poznanih več



Slika 1: Shema hormonskega sistema: tkiva, organi, organski sistemi in žleze (prirejeno po 1)

kot 50 različnih hormonov in hormonom podobnih substanc. Ti nadzorujejo in ohranjajo številne fiziološke procese organizma, organov in tkiv skozi njegovo celotno življenjsko dobo (1, 2).

1.2 HORMONSKI MOTILCI

Številne kemikalije, ki smo jim izpostavljeni, lahko motijo delovanje HS preko motenja sinteze, transporta, vezave in eliminacije naravno prisotnih hormonov v telesu, odgovornih za vzdrževanje homeostaze, reprodukcije, razvoja ter obnašanja. Preučevanje vpliva teh kemikalij na delovanje organizmov je zato zadnjih nekaj let predmet številnih študij. Pomemben mejnik v proučevanju endokrinih motilcev predstavlja srečanje v Wisconsinu julija 1991 pod vodstvom Thea Colborna in sodelavcev (1). Poznanih je že več sto kemikalij, za katere velja oz. se domneva, da motijo ES tako, da posnemajo naravno prisotne hormone ali pa delujejo kot antagonisti ter na ta način interagirajo s hormonskimi receptorji, ali pa vplivajo na sintezo, sekrecijo, transport in eliminacijo naravnih hormonov v telesu (2, 3, 4).

Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je hormonski motilec eksogena snov ali zmes snovi, ki spremeni delovanje endokrinega sistema in posledično povzroči škodljiv odgovor v organizmu, njegovih potomcih ali (sub)populacijah (3). Pri izpostavljenosti hormonskim motilcem so zelo pomembni faktorji, kot so koncentracija motilca, trajanje izpostavitve in obdobje izpostavljenosti, saj le ti določajo jakost vpliva hormonskega motilca na delovanje organizma. Največji vpliv imajo hormonski motilci na organizem v fazi razvoja. Tako so najbolj občutljivi zarodki v maternici, dojenčki in otroci v dobi razvoja, saj se takrat organi in tkiva najbolj razvijajo. Čeprav okvare organizma na takšen način nastanejo v fazi razvoja, so pogosto škodljivi vplivi hormonskih motilcev vidni šele čez desetletja, torej pri odraslem organizmu (2, 5).

1.2.1 VRSTE HORMONSKIH MOTILCEV

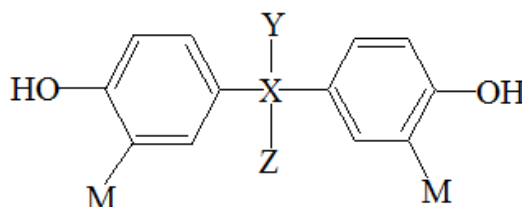
Hormonski motilci predstavljajo veliko skupino kemikalij različnega izvora. Zaradi vsesplošne onesnaženosti je večina že prisotnih v okolju in lahko škodljivo vplivajo na ljudi in živali preko delovanja na njihov ES (1, 6).

Razdelimo jih v več skupin:

- naravno prisotne snovi v hrani (fitoestrogeni),
- mehčala,
- kemikalije, ki se uporabljajo pri izdelavi plastike kot monomerne enote (bisfenol A (BPA)),
- nekateri pesticidi (1,1,1-trikloro-2,2-di(*p*-klorofenil)etan (DDT)),
- nekateri fungicidi (vinklozolin),
- naravni in sintezni hormoni (fitoestrogeni, hormonska kontracepcija, zdravila za ščitnico, dietilstilbestrol (DES)),
- učinkovine s hormonskimi neželenimi učinki (naproksen, metoprolol, klofibrat),
- industrijske kemikalije in kemikalije, ki se uporabljajo v gospodinjstvu (ftalati, alkilfenol etoksilatni detergenti, topila, 1,4-diklorobenzen, poliklorirani bisfenoli),
- stranski produkti industrije (policiklični aromatski ogljikovodiki, pentakloro benzen) in
- kozmetični izdelki (parabeni) (1, 6).

1.3 BISFENOLI

Bisfenoli spadajo v skupino sintetičnih kemikalij. So spojine, sestavljene iz dveh fenolnih obročev, povezanih z mostnim atomom, ki je v večini primerov ogljikov atom. Za industrijsko uporabo je trenutno poznanih 16 analogov BPA (Slika 2) (7).



Slika 2: Splošna strukturna formula bisfenolov

(X= C, S; Y/Z= H, O, CH₃, C₂H₅, CF₃, C₆H₅; M= H, CH₃, (CH₃)₂CH, C₆H₅)

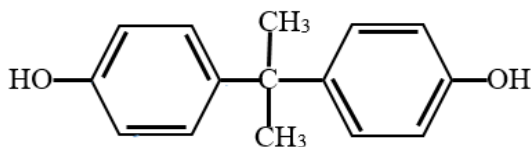
(prirejeno po 7)

Najbolj znan endokrini motilec iz te skupine je BPA. BPA se zaradi številnih slabosti nadomešča z njegovimi analogi, katerih proizvodnja in uporaba naraščata. Predpostavlja se, da bodo analogi BPA v prihodnosti postali zelo razširjena okoljska in prehranska onesnažila takoj za BPA, zato se vse več raziskav posveča raziskavam njihove potencialne toksičnosti, še posebej pa estrogenske aktivnosti. Analogi so zaradi zamenjave z BPA posledično prisotni že v hrani, vodi, izdelkih za osebno nego, termičnem papirju in ostalih proizvodih (7, 8).

1.3.1 BISFENOL A

1.3.1.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI

Bisfenol A (BPA, 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) je sintetična kemikalija z molekulsko formulo C₁₅H₁₆O₂ in molekulsko maso 228,29 g/mol (9, 10). Sinteza bisfenola A poteka s kondenzacijo dveh fenolov in acetona v prisotnosti kisline kot katalizatorja (11). Strukturno je predstavljen z dvema fenolnima obročema, povezanima z metilenskim mostom, na katerega sta pripeti dve metilni skupini (Slika 3) (10).



Slika 3: Strukturna formula bisfenola A

(prirejeno po 10)

Bisfenol A je trdna snov bele ali krem barve, prisotna v obliki kristalov ali kosmičev z blagim vonjem po fenolih (9). V vodi je srednje topen, njegova topnost pri 25 °C je od 120 mg/L do 300 mg/L, bolje pa se topi v alkalnih raztopinah, etanolu in acetonu. NOAEL, določen na podganah, znaša 5 mg BPA na kilogram telesne mase na dan (4, 9, 12). Ima visoko temperaturo vrelišča (360,5 °C) in tališča (153 °C) ter nizek parni tlak ($4,0 \times 10^{-8}$ mm Hg pri 25 °C). Zaradi visoke temperature vrelišča, zmerne topnosti in nizkega parnega tlaka zelo počasi izhlapeva. V atmosferi hitro razpade pod vplivom fotooksidacije, kar je razlog za njegovo kratko razpolovno dobo v zraku (9). Pod aerobnimi pogoji se razgradi s številnimi mikroorganizmi, medtem ko je biorazgradnja pod anaerobnimi pogoji močno podaljšana in se zato posledično akumulira v okolju, najpogosteje v sedimentih (7, 13). Razpolovni čas BPA v okolju predstavlja Preglednica I.

Preglednica I: Razpolovni čas bisfenola A v okolju (9).

Vir nahajanja	Razpolovni čas (dnevi)
voda	38
zemlja	75
sedimenti	340
zrak	< 0,2

1.3.1.2 PROIZVODNJA IN UPORABA

Bisfenol A je najbolj razširjena kemikalija na svetu. Njegova proizvodnja narašča in je ocenjena na okoli 6,8 milijonov ton v letu 2013, pri čemer se ga letno sprosti v okolje preko 100 ton (10, 14). Je prvi ksenoestrogen brez steroidnega obroča (3). Njegova prva epoksi smola je bila sintetizirana v 40. letih prejšnjega stoletja, kmalu zatem pa se je začela komercialna proizvodnja, najprej v Združenih državah Amerike (ZDA) in kasneje v Evropi (3, 9). Največji proizvajalci BPA so postale ZDA (22,9 % globalne proizvodnje), sledijo Tajvan (13,1 %), Japonska (13 %) ter Kitajska (3,6 %), od tega se ga 9 % porabi za proizvodnjo materialov za premaz pločevink (15). V 60. letih je bila odobrena uporaba za embalažo za hrano, vendar pa se takrat niso zavedali, da zaradi nepopolne polimerizacije pri proizvodnji materialov monomer prehaja v hrano (16).

Bisfenol A se uporablja kot monomer pri proizvodnji polikarbonatov in epoksidnih smol ter kot dodatek pri drugih polimernih materialih, kot so poliakrilati in poliestri. Epoksidne smole se uporabljajo kot zaščitni premaz v pločevinkah za hrano in pijačo, saj preprečujejo kontaminacijo vsebine s kovino ter ščitijo kovino pred korozijo. BPA omogoča

polikarbonatnim materialom in epoksidnim smolam trdnost, lahkost in odpornost na temperaturo. Najdemo ga tudi v barvah na osnovi epoksidnih smol, medicinskih napravah, lečah za očala, igračah, zobnih materialih, barvah za tiskanje, zaviralcih gorenja, termičnem papirju, recikliranem papirju ter v ostalih plastičnih proizvodih (3, 4, 17, 18).

1.3.1.3 BIOLOŠKI UČINKI BPA

BPA je znan kot šibek estrogen. Veže se na ER α in ER β , pri čemer ima 10-krat večjo afiniteto do ER β , lahko pa stimulira celični odziv pri zelo nizkih koncentracijah, nižjih od teh, ki so pričakovane za vezavo na klasične jedrne receptorje (14). BPA izkazuje agonističen in antagonističen učinek na ER α , na ER β pa deluje samo antagonistično (19). Raziskave so pokazale vrsto poti, preko katerih BPA spodbuja celični odgovor tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Na jedrne receptorje se veže v nizkih koncentracijah, kot so piko (p) in nano (n) molarne (20). Poleg estrogenskega receptorja se lahko veže tudi na estrogenskemu podoben γ -receptor (ERR γ), arilne ogljikovodikove receptorje, androgene receptorje, glukokortikoidne receptorje, tiroidne receptorje, pregnanski-X receptor in s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama (3, 14, 21).

1.3.1.4 VIRI IZPOSTAVITVE BISFENOLU A

BPA je kemikalija, ki se ji težko izognemo v vsakdanjem življenju, saj smo ji izpostavljeni preko različnih poti izpostavitve. Največji vir izpostavitve predstavljata hrana (srednja koncentracija v hrani 3,00 ng/g (22)) in pijača, sledijo termični papir, prah, zobni materiali, medicinski pripomočki, kozmetični izdelki, igrače in izdelki za otroke (14). Koncentracije BPA v hrani in okolju so predstavljene v Prilogi A.

Čeprav je Evropska agencija za varno hrano (EFSA) leta 2015 v zadnjem znanstvenem mnenju napisala, da izpostavitve bisfenolu A ne predstavlja tveganja za zdravje pri trenutnih ravneh izpostavitve za celotno populacijo, so otroci in najstniki najbolj izpostavljeni BPA. Največjo izpostavitve pri celotni populaciji predstavlja hrana. Doprinos preko hrane je ocenjen od 0,4 do 1,4 μ g BPA na kilogram telesne mase na dan. Preko hrane imajo otroci od 6 mesecev do 10 let višjo izpostavitve kot ostali zaradi neugodnega razmerja med izpostavljenostjo in telesno maso. Glede na to, da materino mleko vsebuje BPA, so z materinim mlekom hranjeni otroci bolj izpostavljeni od otrok, hranjenih s prilagojenim mlekom iz stekleničk brez polikarbonatov (18, 23). V ta namen so leta 2010 prepovedali BPA za uporabo v stekleničkah za dojenčke (sprva v Kanadi in leto kasneje v Evropi, nato še v ZDA) (7). Francija pa je leta 2015 popolnoma prepovedala uporabo BPA v embalaži za

hrano in pijačo (14). Uporaba BPA v materialih, ki se uporabljajo kot embalaža za hrano, je regulirana na nivoju Evropske unije. Prvič je bil BPA evalviran leta 1986 s strani Znanstvenega sveta za hrano (SCF) za proizvodnjo plastičnih materialov, ki so namenjeni za ovojnino za hrano. Sprva je bil določen dnevno sprejemljiv vnos 50 µg BPA na kilogram telesne mase na dan, leta 2015 pa je EFSA znižala dnevno sprejemljiv vnos na 4 µg BPA na kilogram telesne mase na dan (18). Največji delež vnosa BPA v telo, ki znaša do 40 %, prispeva hrana iz pločevink. BPA ni bil najden samo v hrani iz pločevink in plastike, ampak tudi v hrani, ki je bila shranjena v kartonskih škatlah. Pomembna pa je tudi priprava in vrsta hrane ter temperatura. Pri segrevanju pločevink med sterilizacijo ali pripravo hrane se namreč sprošča BPA iz epoksi premaza v vsebino pločevinke. Na ta način lahko preide skoraj celotni nepolimeriziran BPA v vsebino hrane. Glede na to, da je bisfenol lipofilna molekula, vsebuje hrana z večjo vsebnostjo maščob in nižjim pH več BPA (kisel pH povzroči hidrolizo estrske vezi). Študija, kjer so uporabili 3 % očetno kislino kot simulacijo za hrano, poroča, da je sproščanje BPA še vedno pod sprejemljivo mejo. Čeprav je pod tipičnimi pogoji (sobna temperatura) uporabe prenos BPA iz materialov, ki vsebujejo polikarbonatne plastike, nizek, lahko polikarbonatne steklenice za vodo odpuščajo večje količine BPA, sploh če jih pustimo na toplem (14, 15, 18, 23). Pomemben vir je tudi pitna voda. Bisfenoli namreč zaradi konstantnega vnosa v okolje in relativno dolgega razpolovnega časa prehajajo tudi v podtalnico in na ta način v pitno vodo (24, 25). Pri proučevanju vode iz pip je bilo ugotovljeno, da je koncentracija BPA odvisna od vrste cevi in od časa, ko voda stoji v ceveh. Namreč, če hladna voda stoji v ceveh več ur, se koncentracija BPA poveča za 1,1 do 43-krat, vroča voda pa izluži še več BPA (26). Zaenkrat še ni enotnih omejitev koncentracije BPA v pitni vodi za vse države, imajo pa nekatere to določeno. V Franciji je referenčna vrednost 100 ng/L, v Nemčiji je zgornja meja 30 µg/L in na Japonskem 100 µg/L (26). Na splošno pa je koncentracija BPA v rekah še nizka, medtem ko so višje vrednosti beležene v bližini odlagališč nevarnih odpadkov in v odpadnih vodah, kjer lahko koncentracija BPA doseže tudi do 370 µg/L (24, 27).

1.3.1.5 BIOMONITORING

Biomonitoring je učinkovit način za pridobitev osnovnih informacij o stopnji izpostavljenosti okoljskim kontaminantom in predstavlja pomemben dejavnik za oceno tveganja zdravja na človeka (8). Čeprav se od 84 do 97 % BPA izloči v prvih 5-7 urah po zaužitju, imamo v krvi lahko konstantno koncentracijo BPA zaradi dolgoročnega vnosa te kemikalije v telo. BPA je bil določen v številnih telesnih tekočinah (v krvnem serumu

človeka, urinu, amnijski in placentni tekočini, popkovnični krvi, materinem mleku, urinu dojenčkov), laseh, možganih, jetrih in maščobnem tkivu (Priloga B) (9, 14, 28).

Zelo pogosto se določa koncentracijo v urinu. Metabolit BPA-glukoronid je namreč stabilen in topen v vodi, in služi kot označevalec izpostavljenosti BPA preko vseh virov izpostavitve. Poleg BPA-glukoronida se izloči še v obliki BPA-sulfata in manj kot 1 % v obliki aglikona (14, 18). Leta 2013 je Y. Yang s sodelavci izvedel prvo študijo določanja koncentracije analogov bisfenola A v urinu 94 prostovoljcev, ki živijo v bližini industrijskih območij BPAF v Južni Kitajski. BPA je bil zaznan pri večini vzorcev, kvantitativno določen pa je bil pri več kot 70 % vzorcih s koncentracijami do 4,38 µg/L. Koncentracijo BPA so določali še v različnih drugih študijah, koncentracije pa so se gibale tudi do nekaj µg/L, pri delavcih v tovarnah epoksi smol pa tudi do nekaj 100 µg/L. Prisotnost BPA so ugotovili tudi v urinu blagajnikov in sicer 2-3 krat višje koncentracije v primerjavi s splošno populacijo. Različne koncentracije v različnih študijah lahko pripišemo različni geografski legi, načinu življenja, prehranjevalnim navadam, virom izpostavitve, trajanju izpostavitve, stopnji metabolizma in ne nazadnje tudi uporabljenim analiznim metodam (7, 10, 29, 30). Prisotnost BPA so ugotovili tudi v urinu dojenčkov in nedonošenčkov. Bisfenolu so otroci izpostavljeni že preko placent in kasneje preko materinega mleka, še posebej pa so izpostavljeni BPA-ju nedonošenčki. Pri njih so zaradi intenzivne terapijske oskrbe (uporaba medicinske opreme, medicinskih cevk in steklenic) zaznali višje koncentracije v urinu (do 30,3 µg/L) (14, 28). Ugotovljeno je bilo tudi, da so otroci, hranjeni s prilagojenim mlekom preko stekleničk, ki ne vsebujejo polikarbonatnih plastik, manj izpostavljeni BPA napram dojenim; BPA je bil zaznan pri 90 % vzorcih mleka francoskih mater (18, 31). Koncentracije BPA v krvi so zelo nizke, saj se po zaužitju hitro izloči preko urina. Višje koncentracije so bile opazne pri pacientih s kronično ledvično odpovedjo, saj se BPA sprosti iz parno steriliziranih polisulfonatnih dializatorjev s polikarbonatnim ogrodjem in pri nosečnicah zaradi spremenjene farmakokinetike med nosečnostjo (17, 32). Na grški populaciji je bila izvedena tudi raziskava določanja BPA v laseh, kar kaže na veliko in dolgotrajno izpostavljenost bisfenolu A, pri čemer je bilo ugotovljeno, da je 41,2 % vzorcev mestnih ljudi pozitivnih na BPA in le 14,8 % vzorcev prebivalcev s podeželja (33).

1.3.1.6 POSLEDICE IZPOSTAVITVE

Številni učinki BPA so posledica dejstva, da se lahko BPA veže na različne receptorje in povzroča za organizem škodljive učinke na različnih organskih sistemih. Vpliva na živčni,

srčnožilni, endokrini, imunski, reproduktivni in respiratorni sistem. Estrogenska aktivnost BPA je bila prvič odkrita leta 1936. V zadnjih nekaj letih pa se poroča o škodljivih učinkih te kemikalije, še posebej v imunskem sistemu in pri razvoju zarodkov. BPA lahko spremeni število limfocitov B in inhibira aktivacijo limfocitov T. Pri piščančjih zarodkih je bilo ugotovljeno, da izpostavljenost že nizkim koncentracijam povzroči neposreden zaviralni učinek na razvoj organov imunskega sistema (34). BPA in analoga BPA (bisfenol F (BPF) in bisfenol AF (BPAF)) povzročijo apoptozo limfocitov in monocitov *in vitro*. Nastanejo biokemične in morfološke spremembe kot posledica tvorbe radikalov. BPAF najmočneje izzove lipidno peroksidacijo, medtem ko BPA povzroči največjo škodo na proteinih. BPA in njegovi analogi so sposobni sprožiti tudi oksidativni stres in poškodbe na teh celicah že pri koncentracijah, ki smo jim izpostavljeni v okolju (10, 35). BPA, BPF in BPAF povzročajo tudi spremembe na eritrocitih že pri koncentracijah, ki smo jim izpostavljeni pri poklicni izpostavitvi ali subakutni zastrupitvi s temi kemikalijami, kar lahko vodi v anemijo in posledično do zdravstvenih težav povezanih z njo, še posebej so izpostavljeni blagajniki in delavci v tovarnah. Največji vpliv ima BPAF (25). BPA se močno veže na ER γ receptorje, ki se v večji meri izražajo v plodovih možganih in placenti (3, 23). Plodovi možgani so zato bolj občutljivi na BPA, saj imajo nezrel sistem za metabolizem ksenobiotikov in relativno prepustno krvnomožgansko bariero (14). Višje koncentracije v placenti so povezane z nizko porodno težo in nižjim gestacijskim časom (36). Preučevali so tudi vpliv BPA na ščitnico zarodkov brejih podgan. Podgane so od 1. do 20. gestacijskega dne hranili z 20 ali 40 μ g BPA na kilogram telesne mase. Pri samicah in tudi zarodkih so ugotovili zmanjšano serumsko koncentracijo tiroksina (T4) in trijodtironina (T3) ter povišano koncentracijo TSH (37). Pri otrocih od 3. do 5. razreda osnovne šole pa je bilo ugotovljeno, da je koncentracija BPA obratno sorazmerno povezana z volumnom ščitnice (38). Raziskave otrok so pokazale, da je BPA lahko vključen tudi v nastanek sindroma motnje pozornosti pri otrocih, avtizma, anksioznosti, Parkinsonove bolezni in depresije (3, 23, 39, 40). Študije na miših nakazujejo, da prenatalna izpostavljenost BPA-ju spremeni izražanje genov, ki kodirajo zapis za estrogenske receptorje ER α , ER β in estrogenskim podobne receptorje γ , s spremembo v njihovi metilaciji v korteksu in hipotalamusu (40). Višje urinarne koncentracije pri otrocih imajo povezavo z astmo in alergijskim rinitisom, povišana je tudi raven IgE (29).

Vdihovanje BPA pri višjih koncentracijah povzroči kašelj, bronhospazem, konjunktivitis in rdečino kože (17). Izpostavljenost BPA je lahko vzrok za prezgodnjo puberteto. Prenatalna izpostavljenost BPA podganam 2 µg na kilogram telesne mase na dan namreč pospeši puberteto (15).

Zaradi vezave na estrogenske receptorje BPA povzroči številne reprodukativne težave. Disfunkcija ženskega reprodukativnega sistema se pokaže v številnih nepravilnostih, med katere spadajo motnje menstrualnega cikla, endometrioza, spontani splav, razvoj sindroma policističnih jajčnikov, okvarjen razvoj oocitov, prezgodnji porod in neplodnost (5, 15, 23, 41). Ugotovili so, da BPA povzroči epigenetske spremembe na reprodukativnem traktu, ki so lahko dedne. Na odraslih podganah so preučevali vpliv BPA na jajčnike pri koncentracijah 0,001 in 0,1 mg na kilogram telesne mase. Znižala se je raven E2, proteina StAR in aromataze P450. Te spremembe so povezane s folikularno artrezijsko, kar lahko vodi do neplodnosti, sindroma policističnih jajčnikov in endometrioze (20). Glede na to, da je BPA šibek estrogen, se domneva, da naj bi izpostavljenost BPA-ju inhibitorno vplivala na laktacijo pri doječih materah (estrogen inhibira laktacijo z zmanjšanjem nivoja prolaktina, odgovornega za izločanje mleka). Pri 216 mehiških materah je bilo ugotovljeno, da imajo tiste, ki ne dojijo, višje urinarne koncentracije BPA (41). BPA ima tudi potencialno vlogo pri patogenezi raka dojke. Raziskava *in vitro* na celični liniji raka dojke je pokazala, da izpostavljenost BPA-ju poveča njegovo proliferacijo in poveča oksidativni stres (15). Prevelika ekspresija HOXB9 gena povzroči pri tumorju dojke razrast metastaz in progresijo bolezni. Tretirane ER-pozitivne MCF7 celice raka dojke z 100 nM BPA namreč povečajo ekspresijo tega gena za skoraj 10-krat (42).

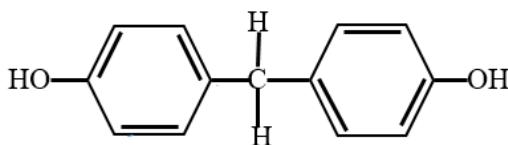
BPA lahko vpliva tudi na razvoj raka prostate. Pacienti z rakom na prostati imajo višje urinarne koncentracije BPA. Raziskave *in vitro* kažejo, da BPA inducira proliferacijo na androgen občutljive celice raka prostate, izpostavljenost *in utero* pa prispeva k povečanju prostate pri moških potomcih (15). Zmanjša se tudi produkcija semenčic in gibljivost le-teh, vpliva pa tudi na spremembo razmerja spolnih hormonov (3). Izpostavljenost BPA mišjih samcev CD-1 BPA je imela neposreden vpliv na funkcijo bariere med testisi in krvjo. Poročali so o povečani apoptozi v celicah v testisih, zmanjšani relativni masi testisev, spremembah v spermatogenezi, poškodovanih tesnih stikih, zadebeljeni bazalni lamini semniferolijevih tubulov, prisotna je bila tudi indukcija apoptoze primarnih in sekundarnih spermatocitov kot tudi spermatid in zmanjšana ekspresija androgen-vezavnega proteina (34).

BPA predstavlja tudi tveganje za številne spremembe v telesu, kot so razvoj debelosti, povišan krvni tlak, hiperholesterolemija in rezistenca na inzulin. BPA namreč poveča ekspresijo dveh genov (FABP4 in CD36), vključenih v metabolizem lipidov in zmanjša ekspresijo gena (PCSK), ki je vključen v proizvodnjo inzulina. *In vitro* v kulturi humanih adipocitov so ugotovili, da nizki odmerki BPA (1 in 10 nmol/L) zavirajo izločanje adiponektina in spodbujajo izločanje vnetnih adipokinov, kot je IL-6 in TNF α (23). BPA ima torej velik vpliv na razvoj debelosti in metabolizem lipidov. Izpostavljenost mišim 10 mg BPA na kilogram telesne mase na dan ima za posledico višje koncentracije plazemskih trigliceridov (15). BPA z aktivacijo glukokortikoidnih receptorjev v celični liniji 3T3-L1 spodbuja adipogenezo (3). Zadnje raziskave kažejo, da BPA zavira adiponektin, ki je odgovoren za inzulinsko občutljivost. Nivo tega hormona se zmanjša pred razvojem sladkorne bolezni tipa 2, kar povezujejo z razvojem tega obolenja (43).

Povišane koncentracije BPA v urinu nakazujejo na razvoj kardiovaskularnih bolezni. Asano et al. predvidevajo, da BPA lahko aktivira visoko prevodne napetostno odvisne K⁺ kanalčke v gladkih mišicah koronarnih žil, zaradi česar se spremeni delovanje srca. Vpleten naj bi bil tudi v vaskularno disfunkcijo, oksidativni stres, lipidno peroksidacijo, indukcijo vnetja in v epigenetske spremembe (19, 23). Pri podganah, hranjenih s 100 mg na kilogram telesne mase na dan 30 dni, je bil opažen upad srčne funkcije, pojavila se je interstinalna fibroza, proliferacija fibroblastov, povečala se je produkcija kolagena in fosforilacija ERK1/2. Tako naj bi BPA imel pomembno vlogo pri proliferativnih procesih in produkciji kolagena preko aktivacije ERK1/2 in estrogenskega receptorja (44).

1.3.2 BISFENOL F

Bisfenol F (4,4-metilendifenol; BPF) je analog bisfenola A z molekulsko formulo C₁₃H₁₂O₂ in molsko maso 200,23 g/mol, pri čemer sta dva fenilna obroča povezana preko metilenskega mostu (Slika 4) (3, 10, 45).



Slika 4: Strukturna formula bisfenola F
(prirejeno po 10)

BPF je v obliki belo-roza kristalov. Temperatura tališča je 162-164 °C in temperatura vrelišča 352 °C. Dobro je topen v etanolu, dimetilsulfoksidu (DMSO) in etru, slabše pa se topi v vodi. Njegov parni tlak znaša $3,7 \times 10^{-7}$ mm Hg pri 25 °C. Je manj lipofilen kot BPA ($\log P = 2,91$) in se v okolju hitreje razgradi kot BPA (Preglednica II) (45, 46, 47).

Preglednica II: Razpolovni čas BPF v okolju (46).

Vir nahajanja	Razpolovni čas (dnevi)
voda	15
zemlja	30
sedimenti	140
zrak	< 0,2

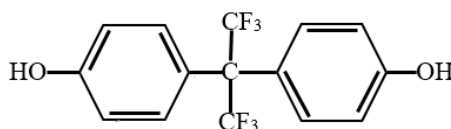
BPF ima široko področje uporabe. Prav tako kot BPA se BPF uporablja pri proizvodnji polikarbonatov in epoksidnih smol. Prisoten je tudi v lakih, lepilih, loščilih, adhezivih, vodnih ceveh, zobnih materialih, različnih protezah, tkivnih nadomestkih in v vsebnikih za hrano (3, 7, 48). Zaradi nizke viskoznosti in boljše odpornosti na topila se vedno bolj uporablja kot nadomestek BPA v izdelkih iz epoksidnih smol (49). Monomeri BPF lahko prehajajo v hrano in okolje. Odkrili so ga v hrani (s srednjo koncentracijo 0,929 ng/g (22)), zraku, prahu, zemlji, blatu iz čistilnih naprav, sedimentih in v ostalih produktih (Priloga C). V primerjavi z BPA smo mu manj izpostavljeni. Na to nakazuje dejstvo, da je bil zaznan v urinu v bistveno nižjih koncentracijah in z nižjo frekvenco kot BPA. Analiza urina, ki je bila izvedena pri Američanih med leti 2000 in 2014 je pokazala, da so ga določili v 42-88 % preiskovanih vzorcev s koncentracijami od 0,15 do 0,54 µg/L, medtem ko je bil pri vzorcih iz Brazilije prisoten le pri 2 % (4, 11).

BPF je hormonski motilec, ki poleg estrogenskega delovanja izkazuje tudi antiandrogeno (50). Glede na študije *in vitro* izkazuje različno estrogensko delovanje, v nekaterih naj bi imel celo močnejše delovanje (50, 51, 52). BPF učinkuje tudi na krvne celice. Povzroča biokemične in morfološke spremembe na levkocitih preko poškodbe celične membrane in tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti, kar lahko vodi do indukcije lipidne peroksidacije in apoptoze celic, pri eritrocitih pa zato povzroči tudi hitrejše odstranjevanje iz krvnega obtoka (10, 25, 35). Pri preučevanju antiandrogenega učinka je bilo ugotovljeno, da pri kultiviranih celicah testisov človeških zarodkov zniža sekrecijo testosterona, medtem ko so pri podganah ugotovili, da vpliva tudi na nevrotoksičnost preko znižanja ravni izoencima 5- α reduktaze 3 in spremenjenega izražanja genov za metabolizem encimov v dopaminskem in serotoninemskem sistemu (3, 53). Endokrini učinek je izražen tudi z vplivom na žlezo ščitnico. BPF vpliva na pretvorbo T₄ v T₃ ter s tem na spremembo koncentracije ščitničnih hormonov. Pri zarodkih rib *Danio rerio* se je izkazalo, da spremeni sekrecijo, transport, sintezo in

metabolizem ščitničnih hormonov preko povečane transkripcije genov, ki so vključeni v te procese (3, 50).

1.3.3 BISFENOL AF

Bisfenol AF (1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis-(4-hidroksifenil)propan; BPAF) je fluoriran derivat BPA (Slika 5) (10, 54).



Slika 5: Strukturna formula BPAF

(prirejeno po 10)

BPAF je bel do siv prašek z molekulsko formulo $C_{15}H_{10}F_6O_2$ in molekulsko maso 336,23 g/mol. Ima visoko temperaturo vrelišča (400 °C) in tališča (159-162 °C) ter nizek parni tlak ($5,4 \times 10^{-7}$ mm Hg pri 25 °C). V okolju se izmed vseh treh bisfenolov najdlje razgrajuje, kar predstavlja veliko tveganje za akumulacijo in s tem toksičnost (Preglednica III) (46, 55).

Preglednica III: Razpolovni čas BPAF v okolju (46).

Vir nahajanja	Razpolovni čas (dnevi)
voda	180
zemlja	360
sedimenti	1600
zrak	< 0,2

Uporablja se pri proizvodnji polimerov, kot so fluoropolimeri, fluoroelastomeri, poliestri, poliamidi, poliimidi in polikarbonati. Pri fluoroelastomerih ima vlogo premreževalca. Prisoten je tudi v elektronskih napravah in optičnih vlaknih kot visoko zmogljiv monomer za izdelavo polimerov. V Združenih državah Amerike se ga letno proizvede od 4500 do 227000 kilogramov (7, 12, 54). Fluoroelastomeri imajo pomembno vlogo v vulkanizerstvu zaradi dobre stabilnosti (56). BPAF izkazuje večjo citotoksičnost kot ostali bisfenoli, saj je CF_3 veliko bolj elektronegativna in reaktivna skupina kot metilna pri BPA. Njegov logP znaša 4,47, kar pomeni veliko afiniteto do membranskih lipidov in lažje prehajanje v celico (35, 55).

V hrani (srednja koncentracija 0,012 ng/g (22)), vodi in okolju je prisoten v bistveno nižjih koncentracijah kot BPA (Priloga D). Višjim vrednostim so lahko izpostavljeni prebivalci v industrijskih območjih, kjer so v urinskih vzorcih zaznali tudi do nekaj $\mu g/L$ BPAF (54, 57). Na splošno pa so koncentracije tega bisfenola v urinu nizke. Analiza urinskih vzorcev Američanov, odvzetih med leti 2000 in 2014 je pokazala, da je bil zaznan pri manj kot 3 %

s koncentracijami do 0,12 µg/L (48). Prav tako je bil zaznan le pri 4 % urinskih vzorcev Brazilcev (4).

BPAF prav tako spada v skupino hormonskih motilcev. Veže se na estrogenske kot tudi na androgene receptorje. V primerjavi z BPA se na ER α veže močnejše in ima večjo afiniteto za ER α kot ER β . Na ER α deluje agonistično, medtem ko na ER β antagonistično (3, 7, 14). Podatki o toksičnosti BPAF so še vedno zelo omejeni. Nevrotoksičnost so ugotavljali na celični liniji HT-22 in na primarnih nevronskih celicah miši, pri čemer je bil BPAF sposoben sprožiti apoptozo teh celic (58). Vpliva tudi na kri, pri čemer povzroči apoptozo in nekrozo levkocitov, medtem ko pri eritrocitih povzroči njihovo hemolizo (10, 35, 59). Preko vezave na androgene receptorje povzroča učinke na moškem reproduktivnem traktu. Kitamura in sodelavci so prišli do spoznanja, da BPAF poseduje zaviralni učinek na aktivnost 5 α -dihidrotestosteron pri celični liniji mišjih fibroblastov (35). BPAF vodi tudi do spremenjenih koncentracij progesterona in testosterona v celični liniji H295R (22). BPAF pri ženskah spodbuja proliferacijo celic raka dojke. Študije *in vitro* so pokazale, da BPAF deluje na ER α pozitivne rakave celice dojke, ne pa tudi na ER α negativne. Že 1 µM BPAF v celični liniji T47D povzroči up-regulacijo in povečano sekrecijo C-X-C kemokinskega liganda 12, ki je med drugimi vključen v rast tumorja in metastaz (60). BPAF vpliva tudi na ščitnico. Pri zarodkih rib *Danio rerio* je pri višjih koncentracijah znižal koncentracije ščitničnih hormonov preko spremembe transkripcije genov, ki so vključeni v os hipotalamus-hipofiza-ščitnica, medtem ko pri koncentracijah, ki smo jim izpostavljeni vsakodnevno, naj ne bi imel vpliva (54).

1.4 MEŠANICE KEMIČNIH

V realnem svetu smo izpostavljeni različnim mešanicam kemikalij, ki so v večini primerov kompleksne, njihova sestava pa se konstantno spreminja. Zaradi številnih učinkov na organizem bo v prihodnosti zato potrebno nameniti skrb ugotavljanju učinkov za različne mešanice, prav tako bodo potrebne še dodatne raziskave, saj zakonodaja o toksičnosti kemikalij trenutno pretežno temelji na učinkih posameznih spojin (61, 62).

Mešanica kemikalij je po definiciji vsaka kombinacija kemičnih substanc, ki so lahko identificirane ali pa tudi ne, vsekakor pa lahko prispevajo k toksičnosti v tarčni populaciji. Komponenta, ki je sama po sebi bolj toksična, prispeva večji delež k skupni toksičnosti mešanice, se pa nivo posameznih komponent v mešanici spreminja glede na čas in pogoje v okolju. Z vidika mešanice poznamo dva aspekta preučevanja učinkov. Preučujemo lahko

učinek celotne mešanice npr. cigaretni dim ali pa učinke posameznih komponent. Določevanje učinka celotne mešanice lahko uporabimo pri mešanicah, kjer so slabo karakterizirane posamezne komponente oz. ne poznamo vseh komponent, njihova mešanica pa mora biti stabilna. Poleg celotne mešanice lahko preučujemo tudi samo njen del in določimo toksičnost le-te. Pri preučevanju učinka posameznih komponent mešanice moramo za vsako komponento poznati način oz. mehanizem delovanja komponente, pri čemer si lahko pomagamo s QSAR-metodami (61, 62).

Že pred več kot petdesetimi leti so bili definirani trije osnovni tipi delovanja kombinacij kemikalij. Kemikalije v mešanici imajo lahko tako enako delovanje oz. podoben mehanizem delovanja, drugačen mehanizem delovanja ali pa med njimi prevladajo interakcije. Učinek mešanice, ki vsebuje kemikalije z enakim mehanizmom delovanja, je enak vsoti učinkov posameznih kemikalij v mešanici (angl. dose/concentration addition). Poleg enakega mehanizma in vezave na enak receptor oz. isto vezavno mesto imajo kemikalije pri tem tipu delovanja različno jakost in ne vplivajo ena na drugo. Odmerek ene komponente se s tega vidika lahko nadomesti z drugo komponento. Za določevanje tega tipa je na voljo veliko metod, ki se razlikujejo po zahtevanem znanju o delovanju in toksični podobnosti posameznih komponent. Učinek mešanice lahko predstavimo s tem, da se količine oz. koncentracije seštevajo, pri čemer je vsaka koncentracija kemikalije utežena s faktorjem, ki odraža jakost vsake izmed kemikalij (Enačba 1) (61, 62).

$$D_{\text{mix}} = \sum aD_i ; \text{ pri čemer je } aD_1 = D_1 \times \text{RPF} \quad (\text{Enačba 1})$$

D_{mix} je koncentracija mešanice, D_1 koncentracija posamezne kemikalije in RPF (a) faktor relativne jakosti kemikalije.

Neodvisno delovanje kemikalij (angl. independent action, response addition, effect addition) se pojavi, ko kemikalije v mešanici delujejo neodvisno ena od druge, običajno po drugačnem mehanizmu delovanja.

V primeru interakcij (angl. interaction). med kemikalijami pričakujemo močnejši (sinergizem) ali šibkejši (antagonizem) odziv v primerjavi z aditivnim učinkom. V primeru sinergizma so potrebni nižji odmerki posamezne komponente v mešanici za dosego enakega učinka kot pri učinku posamezne komponente, antagonizem pa za razliko od sinergizma zahteva višje odmerke posamezne komponente. Poznani sta dve vrsti interakcij: toksikokinetične in toksikodinamične. Najpogostejše odstopanja od aditivnosti povzročajo

toksikokinetčne interakcije. Pri tej vrsti interakcij kemikalije spremenijo absorpcijo drugih kemikalij (ojačevalci penetracije v kozmetičnih izdelkih), bodisi tekmujejo za privzem ali očistek kemikalije (61, 62).

Po izsledkih številnih raziskav *in vitro* se je izkazalo, da je za opis mešanice najbolj primeren in uporaben koncept aditivnosti koncentracij, ki ga predlaga tudi EFSA. Ima namreč dobro napovedno moč. Kljub temu pa nekaj študij dokazuje kar nekaj odstopanj od tega koncepta, kar je v večini primerov odvisno od tipa kemikalij, števila in razmerja komponent, vrste testa in načrta mešanice (61, 63). Pri načrtu ali sestavi mešanice se lahko poslužujemo uravnoveženega ali neuravnoveženega načina priprave mešanice. Za uravnovežen način velja, da vsaka komponenta v mešanici prispeva enak delež učinka k celotnemu učinku mešanice. Z drugimi besedami povedano, koncentracije za posamezne komponente dajejo enak učinek npr. pri mešanici dveh komponent s koncentracijo EC_{10} velja, da imata ti dve komponenti enak učinek, torej EC_{10} , vendar pri različnih koncentracijah. Učinek mešanice lahko predvidimo, če poznamo relativno razmerje kemikalije v mešanici ter odnos med koncentracijo in odzivom za vsako komponento posebej. Vsaka komponenta prispeva k učinku mešanice v sorazmerju z njeno efektivno koncentracijo (63, 64). Pri neuravnoveženem načinu imamo komponente v mešanici v takšnem razmerju, kot bi potencialno naj bile v naših tkivih, kar predstavlja bolj realno sliko učinkov mešanice (63).

Učinek mešanic kemikalij se lahko ovrednoti z grafično metodo isobolov. S to metodo lahko vrednotimo le mešanice iz dveh komponent, medtem ko z računsko metodo toksičnih enot lahko vrednotimo mešanice, ki so sestavljene iz več spojin. Grafično metodo predstavlja graf, pri katerem sta na x in y osi koncentraciji spojine v linearni skali. Krivulja na grafu pa povezuje točke z enakim učinkom. Iz oblike krivulje se da napovedati, kako se obnaša mešanica spojin. Ravna premica z negativnim naklonom nam pove, da gre za aditiven učinek, konkavna krivulja za antagonističen in konveksna za sinergističen učinek (61, 63, 64).

2 NAMEN DELA

Kontaminacija hrane in okolja postaja vse večji globalni problem zaradi velike uporabe industrijskih in kmetijskih onesnaževalcev. Tako smo zaradi hitrega tempa življenja nenehno prisiljeni uporabljati vse več konvencionalno pridelane hrane, hrane v pločevinkah in v različnih plastičnih vsebnikih. Poleg hrane in pijače prihajamo v stik z različnimi kontaminanti preko različnih snovi in izdelkov, ki jih sestavljajo, in ki jih uporabljamo v vsakdanjem življenju. Ti so se sposobni vezati na številne hormonske receptorje v organizmu in na ta način lahko motijo homeostazo celotnega organizma. Bisfenoli veljajo za najbolj uporabljane spojine v industriji. Za pionirja bisfenolov velja BPA, ki je dandanes ena najbolj razširjenih kemikalij in zaradi njegove velike porabe prisotna v našem okolju že na skoraj vsakem koraku. Vse več pa se zaradi znanih učinkov BPA le-ta nadomešča z analogi, za katere pa se zaradi strukturne podobnosti ugotavlja, da imajo podobne učinke kot BPA. Bisfenoli so znani hormonski motilci. V našem telesu se vežejo na številne receptorje, med katerimi so najpogostejši jedrni receptorji in s tem vplivajo na delovanje endokrinega sistema.

V magistrski nalogi bomo z YES testom ugotavljali, kakšne estrogenske učinke imajo posamezni bisfenoli (BPA, BPF in BPAF) in različne mešanice teh treh bisfenolov. YES test uvrščamo med najbolj pogoste *in vitro* biološke teste. Na splošno se ta metoda uporablja za vrednotenje estrogenske aktivnosti različnih kemikalij, saj z njo dobimo podatke o tem, katere kemikalije se vežejo na estrogenski receptor. Gensko spremenjena kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* ima v svoj genom namreč vnešen zapis za humani estrogenski receptor in ekspresijski plazmid, ki vsebuje reporterski gen lac-Z. Poleg tega nam omogoča določanje estrogenske aktivnosti tudi različnih mešanic. Ta metoda je po svojih lastnostih robustna, ponovljiva, zanesljiva, občutljiva in cenovno ugodna za izvajanje (61, 65).

V nalogi bomo najprej določili estrogensko aktivnost posameznim bisfenolom. Iz dobljenega grafa estrogenske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije posameznega bisfenola bomo določili koncentracije pri 10 %, 20 %, 30 % in 50 % odzivu estrogenske aktivnosti za vsak posamezni bisfenol. Nato bomo iz teh ekviefektivnih koncentracij (EC₁₀, EC₂₀ in EC₃₀) generirali različne mešanice dveh ali treh komponent v enakem koncentracijskem razmerju. Na osnovi pridobljenih rezultatov bomo izračunali odstotek zaviranja rasti kvasovk, estrogensko aktivnost, estrogensko jakost, relativno estrogensko

aktivnost za posamezne bisfenole in mešanice pri različnih EC. Učinke mešanic bomo vrednotili z izračunom relativne estrogenske aktivnosti mešanice.

V magistrski nalogi bomo preverili naslednje hipoteze:

- struktura BPA, BPF in BPAF vpliva na njihovo citotoksičnost na testirane organizme,
- struktura BPA, BPF in BPAF vpliva na njihovo estrogensko aktivnost,
- pri mešanicah dveh bisfenolov pričakujemo aditiven učinek pri vseh treh EC.

3 MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Preglednica IV: Preiskovane spojine.

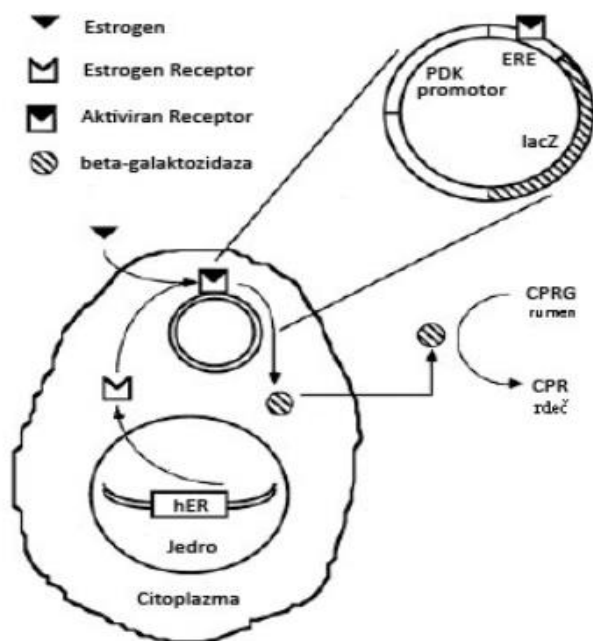
Spojina	Proizvajalec	CAS številka	Molska masa (g/mol)	Čistost (%)
BPA	Sigma-Aldrich, Nemčija	80-05-7	228,29	≥ 99
BPF	Sigma-Aldrich, Nemčija	620-92-8	200,23	98
BPAF	Sigma-Aldrich, Nemčija	1478-61-1	336,23	97

Ostali materiali so navedeni pri metodah v poglavju 3.2.

3.2. METODE

3.2.1. BIOLOŠKI TEST YES (YEAST ESTROGEN SCREEN)

Eden izmed bioloških testov, ki se uporablja za določanje estrogenske aktivnosti spojin, je tudi YES test. Razvit je bil na oddelku za genetiko v Glaxu (UK) pod vodstvom prof. dr. Sumpterja. Vsebuje gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki ima v svoj genom vnešen zapis za humani estrogenski receptor (hER) in ekspresijski plazmid, ki vsebuje reporterski gen lac-Z, ki kodira zapis za encim β -galaktozidazo. Kompleks estrogen oz. estrogensko aktivna snov in estrogenski receptor se kot dimer veže na estrogen odzivni element (ERE). ERE in gen za lac-Z sta pod vplivom istega promotorja. Torej, če se dimer veže na ERE, se hkrati sproži prepisovanje gena za lac-Z. To v končni fazi vodi do sinteze encima β -galaktozidaze, ki se sprosti v medij, ki mu je predhodno dodan kromogen substrat klorofenol rdeče β -D-galaktopiranozid (CPRG). β -galaktozidaza razgradi CPRG do galaktoze in klorofenol rdečega, pri čemer zaznamo spremembo barve iz rumene (CPRG) v vijolično (klorofenol rdeče). To prikazuje Slika 6. Nastalemu vijoličnemu produktu izmerimo absorbanco (A) pri 575 nm (66).



Slika 6: Shematski prikaz ekspresijskega sistema v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in aktivacija sistema z estrogenom (prirejeno po 66)

3.2.2. IZVEDBA YES TESTA

3.2.2.1. TESTNI ORGANIZEM

Za testni organizem smo uporabljali gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki so bile razvite v Glaxu (UK) pod vodstvom prof. dr. Sumpsterja.

3.2.2.2. PRIPRAVA MINIMALNEGA MEDIJA

Za pripravo minimalnega gojišča s pH 7,1 smo najprej v 1000 mL bučko dali ultra čisto vodo do polovice in nato na analitski tehtnici (Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica) zatehtali naslednje reagente, katerih čistota je bila $\geq 98\%$, razen pri KOH, kjer je znašala $\geq 90\%$:

13,61 g KH_2PO_4 (Merck, Nemčija)

1,98 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Kemična tovarna Podnart, Slovenija)

4,2 g KOH (Merck, Nemčija)

0,41 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija)

50 mg Leu (Sigma-Aldrich, Japonska)

50 mg His (Sigma-Aldrich, USA)

50 mg adenina (Sigma-Aldrich, Kitajska)

20 mg Arg-HCl (Sigma-Aldrich, Japonska)

20 mg Met (Sigma-Aldrich, Japonska)

30 mg Tyr (Sigma-Aldrich, USA)

30 mg Ile (Sigma-Aldrich, USA)

30 mg Lys-HCl (Sigma-Aldrich, Indija)

25 mg Phe (Sigma-Aldrich, USA)

100 mg Glu (Sigma-Aldrich, Francija)

150 mg Val (Sigma-Aldrich, USA)

375 mg Ser (Sigma-Aldrich, USA)

ter dodali 1 mL raztopine $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (52,6 mg/50 mL ultra čiste vode) (Merck KGA, Nemčija). Nastalo raztopino smo z ultra čisto vodo dopolnili do končnega volumna 1000 mL in mešali na magnetnem mešalu (Ika, model C-MAG HS 7 IKAMAG[®], Nemčija) pri 55 °C do 6 ur. Minimalni medij smo nato razdelili po 45 mL v 200 mL erlenmajerice in ga avtoklavirali 20 minut pri 121 °C ter 1,1 baru (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija). Erlenmajerice z minimalnim gojiščem smo shranili v hladilnici pri 4 °C.

3.2.2.3. PRIPRAVA RASTNEGA MEDIJA

Za rastno gojišče smo uporabili naslednje raztopine, tako da smo jih sterilno ob ognju dodali v 45 mL minimalnega medija:

- 5 mL raztopine glukoze (20 g/100 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 1,25 mL raztopine aspartatne kisline (200 mg/50 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 0,5 mL vitaminske raztopine (sestava opisana v nadaljevanju)
- 0,4 mL raztopine treonina (1200 mg/50 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 125 µL raztopine bakrovega (II) sulfata (249,7 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /50 mL ultra čiste vode) (Carlo Erba, Italija).

Raztopino glukoze, aspartatne kisline in treonina smo avtoklavirali 20 minut (121 °C, 1,1 bara) (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija). Vitaminsko raztopino in raztopino CuSO_4 smo sterilno filtrirali čez filter s porami premera 0,22 µm (PES membrana, TPP, Švica). Raztopino glukoze, aspartatne kisline in CuSO_4 smo shranjevali pri sobni temperaturi, raztopino treonina in vitaminsko raztopino pa v hladilniku pri 4 °C.

Priprava vitaminske raztopine:

Vitaminsko raztopino smo pripravili tako, da smo v 200 mL bučko zatehtali:

- 8 mg tiamina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 8 mg piridoksina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 8 mg pantotenske kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 40 mg inozitola (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija)

in dodali 20 mL biotinske raztopine (2 mg/100 mL ultra čiste vode) (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija) ter dopolnili z ultra čisto vodo do končnega volumna 200 mL. Tako kot vitaminsko, smo tudi biotinsko raztopino shranjevali pri 4 °C.

3.2.2.4. PRIPRAVA TRDNEGA GOJIŠČA

Gojišče za kvasovke predstavlja trdno agarско gojišče, ki smo ga pripravili po naslednjem postopku: v 90 mL minimalnega gojišča smo zatehtali 1,5 g agarja (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija) ter vse skupaj avtoklavirali 20 minut (121 °C, 1,1 bara) (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija) in počakali, da se vsebina malo ohladi ter sterilno ob ognju dodali:

- 10 mL raztopine glukoze
- 2,5 mL aspartatne raztopine
- 1 mL vitaminske raztopine
- 0,8 mL treoninske raztopine
- 0,25 mL raztopine CuSO₄.

Nato smo vsebino prelili v petrijevke in jih pustili delno odprte, da se je agar strdil (45 min). Ko se je agar strdil, smo petrijevke pokrili in ovili s paro-nepropustnim filmom (Parafilm[®]M) ter jih shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.5. OHRANJEVANJE KULTURE KVASOVK

Enkrat mesečno smo kvasovke sterilno ob ognju precepili na novo trdno gojišče. S sterilno cepilno zanko smo iz starega trdnega gojišča na novo prenesli eno jasno ločeno kolonijo. Petrijevke smo nato za pet dni dali v inkubator (WTW, T5606/2-i, Weilheim) na 28 °C. Ko so zrasle nove kolonije, smo petrijevke ovili s paro-nepropustnim filmom (Parafilm[®]M) in jih shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.6. PRIPRAVA INDIKATORJA

Za pripravo 10 mg/mL raztopine klorofenol rdeče β -D-galaktopiranozida (CPRG) (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 90\%$) smo v sterilno epico zatehtali 10 mg klorofenol rdeče β -D-galaktopiranozida ter sterilno ob ognju dodali 1 mL sterilne ultra čiste vode. Nastalo raztopino smo razdelili v 5 sterilnih epic po 200 μ L in jih zaščitili z aluminijasto folijo. Tako zaščitene epice smo shranjevali v hladilniku, CPRG pa smo shranjevali v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.7. PRIPRAVA TEKOČE KULTURE KVASOVK

S sterilno cepilno zanko smo sterilno ob ognju prenesli kolonijo kvasovk iz trdnega gojišča v rastni medij in ga gojili na ogrevanem stresalniku (Promax 1020 in inkubator 1000, Heidolph, Nemčija) pri 100 rpm in $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ do optične gostote (OD) 1. S tem so kvasovke dosegle logaritemsko fazo rasti. Optično gostoto smo pomerili pri 620 nm na spektrofotometru (Perkin-Elmer, Lambda 20, ZDA). Za izvedbo YES testa smo nato 2 mL kulture kvasovk z optično gostoto 1 pri 620 nm nacepili v novo rastno gojišče. V primeru, da je bila optična gostota večja ali manjša od 1, smo ustrezen volumen izračunali po naslednji enačbi:

$$V = 1 \cdot 2 \text{ mL} / (\text{izmerjena OD}_{620})$$

Pri tem je V volumen kulture, ki jo dodamo v gojišče za izvedbo YES testa; 1 pomeni optično gostoto, ki bi jo morali izmeriti pri valovni dolžini 620 nm; 2 mL pomeni volumen, ki se ga doda pri $\text{OD}_{620}=1$; izmerjena OD_{620} pa je optična gostota kulture, ki jo dodajamo v rastno gojišče za izvedbo YES testa.

3.2.3. PRIPRAVA RAZTOPIN

3.2.3.1 PRIPRAVA VZORCEV BISFENOLOV

Za poskus YES testa smo pripravili ekvimolarne raztopine posameznih bisfenolov: BPA, BPF in BPAF z molsko koncentracijo $17,52 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Le na takšen način smo namreč lahko določili EC_{10} , EC_{20} in EC_{30} za vsakega posebej, kar nam je služilo kot osnova za mešanice bisfenolov. Pri pripravi raztopin smo morali upoštevati še faktor redčitve 20, saj se pri dodatku 200 μ L ravnega medija in CPRG-ja na drugo mikrotitrsko ploščo, na katero predhodno prenesemo 10 μ L raztopine iz prve mikrotitrsko plošče, koncentracija zmanjša za 20-krat. Tako smo torej v bučki pripravili 20-krat višjo koncentracijo, kot je bila kasneje na drugi plošči. Na analitski tehtnici (Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica) smo natančno

natehtali ustrezno količino bisfenola (Preglednica V) in ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko ter raztopili v absolutnem etanolu (Sigma-Aldrich, Nemčija, $\geq 99,8\%$). Tako pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica V: Masa spojin za pripravo raztopine z molsko koncentracijo $17,52 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Spojina	Masa v 25 mL raztopine (mg)
BPA	20,00
BPF	17,54
BPAF	29,45

Za pripravo mešanic bisfenolov pri posameznih EC smo v računalniškem programu OriginPro8 najprej iz krivulje estrogenske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije bisfenola določili koncentracijo posameznega bisfenola pri EC_{10} , EC_{20} in EC_{30} . Raztopine posameznih bisfenolov pri določenih EC smo pripravili v epicah s faktorjem redčenja 100 ali 1000. Raztopine BPAF smo pri vseh EC pripravili s faktorjem redčenja 1000, medtem ko pri raztopini BPF le za EC_{10} 50 % v/v. Pri ostalih pa smo uporabili faktor redčenja 100. 50 % v/v v našem primeru pomeni, da smo iz epice po redčenju v prvo vdolbinico na prvo mikrotitrsko ploščo pri binarnih mešanicah dali 75 μL raztopine enega bisfenola (s koncentracijo, opisano v nadaljevanju) in 75 μL raztopine drugega bisfenola (s koncentracijo opisano v nadaljevanju). 33,33 % v/v v našem primeru pomeni, da smo iz epice po redčenju v prvo vdolbinico na prvo mikrotitrsko ploščo dali 50 μL raztopine BPA (s koncentracijo opisano v nadaljevanju), 50 μL raztopine BPF (s koncentracijo opisano v nadaljevanju) in 50 μL raztopine BPAF (s koncentracijo opisano v nadaljevanju). Za vsak posamezen EC smo naredili 4 kombinacije bisfenolov in sicer: 50 % v/v BPA + BPF, 50 % v/v BPF + BPAF, 50 % v/v BPA + BPAF, 33,33 % v/v BPA + BPF + BPAF. Izhodne koncentracije bisfenola so pri določenem EC v epici po razredčitvi v primeru mešanice dveh bisfenolov 40-krat višje zaradi faktorja redčitve 20 po nanosu na drugo ploščo in faktorja redčitve 2 zaradi volumskega odstotka. Pri mešanici treh bisfenolov pa mora biti koncentracija posameznega bisfenola v epici po razredčitvi pri določenem EC 60-krat višja zaradi faktorja redčitve 20 po nanosu na drugo ploščo in faktorja redčitve 3 zaradi volumskega odstotka (Preglednica VI). V prvi vdolbinici na drugi mikrotitrski plošči po dodatku 200 μL rastnega medija in CPRG-ja je pri mešanici 50 % v/v raztopine BPA in BPF pri EC_{10} , koncentracija

BPA enaka koncentraciji EC₁₀ za BPA in koncentracija BPF enaka koncentraciji EC₁₀ za BPF. Analogno velja za ostali dve kombinaciji in za kombinacije pri EC₂₀ in EC₃₀. Pri mešanici treh bisfenolov 33,33 % v/v (BPA + BPF + BPAF) so v prvi vdolbinici na drugi mikrotitrski plošči po dodatku 200 µL rastnega medija in CPRG-ja pri EC₁₀ koncentracije BPA, BPF in BPAF enake EC₁₀ za posamezen bisfenol. Enako velja za mešanice pri EC₂₀ in EC₃₀.

Preglednica VI: Masa spojin za pripravo mešanic za posamezne EC pred redčenjem.

EC	Volumski delež (% v/v)	Natehte v 1. epici (mg)		
		BPA	BPF	BPAF
EC ₁₀	50	5,51	34,59	10,52
	33,33	8,26	5,19	15,79
EC ₂₀	50	7,65	4,95	15,06
	33,33	11,48	7,43	22,60
EC ₃₀	50	9,29	6,71	19,32
	33,33	13,93	10,06	28,99

3.2.3.2. PRIPRAVA VZORCEV POZITIVNE IN NEGATIVNE KONTROLE

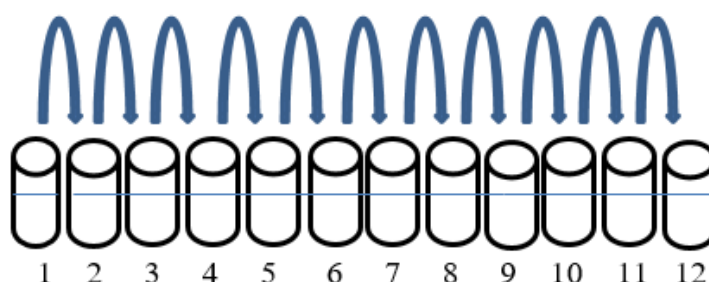
Pozitivno kontrolo v našem primeru predstavlja naravni hormon E2 (Sigma-Aldrich, Nemčija, ≥ 98 %), negativno pa progesteron (P) (Sigma-Aldrich, Nemčija ≥ 99 %). E2 ima največjo estrogensko aktivnost, kar je bila osnova za standardno krivuljo, iz katere smo izračunali relativno estrogensko aktivnost (REA) posameznih vzorcev. E2 se veže na estrogenski receptor in sproži odziv, ki vodi do sinteze β-galaktozidaze in posledično razgradnjo CPRG-ja v vijolično obarvan produkt. Pripravili smo raztopino E2 s koncentracijo 27,2 µg/L oz. 0,1 µmol/L tako, da smo v prvo epico natehtali 5 mg E2, dodali 1 mL absolutnega etanola in redčili do želene koncentracije. Za raztopino progesterona smo prav tako natehtali 5 mg progesterona in jo redčili z absolutnim etanolom do koncentracije 31,4 µg/L oz. 0,1 µmol/L. Progesteron kot negativna kontrola pri kvasovkah ne sproži odziva, saj nima estrogenskega učinka. Tako progesteron kot E2 smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.4. POTEK YES TESTA

Test smo izvajali pod aseptičnimi pogoji v komori z laminarnim pretokom zraka (Thermo electron corporation, Holten laminair, ZDA). Površino komore smo pred izvedbo testa razkužili s 70 % etanolom (Carlo Erba, Francija) in dezinfekcijskim sredstvom (Asepsol®, Pliva, Hrvaška). Po razkužitvi smo za 15 minut prižgali UV luč, nato pa pustili kroženje zraka še 15 minut. Zrak smo pustili krožiti tudi skozi celotno izvedbo testa. Za izvedbo testa smo uporabili sterilne mikrotitrne plošče z 96 vdolbinicami, nastavke za pipete pa smo predhodno 20 minut sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 1,1 bara) (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija). Pri izvedbi testa smo ves čas uporabljali rokavice.

3.2.4.1. TEST ZA POSAMEZNE BISFENOLE

Za vsak bisfenol smo naredili po tri ponovitve testa. Za eno ponovitev smo uporabili dve mikrotitrski plošči, saj smo na prvi pripravili redčitveno vrsto za E2, progesteron in vzorce s faktorjem redčenja 2. Redčili smo z absolutnim etanolom (Sigma-Aldrich, Nemčija, $\geq 99,8\%$) in pripravili 12 redčitev (Slika 7).



Slika 7: Priprava redčitvene vrste na prvi mikrotitrski plošči. V prvi vdolbinici je 150 μL vzorca (E2, P, BPA, BPAF, BPF). V vsaki naslednji pa 75 μL iz prejšnje vdolbinice in 75 μL absolutnega etanola

Iz prve plošče smo nato prenesli po 10 μL iz vsake vdolbinice na drugo mikrotitrsko ploščo. Nanašali smo v dveh paralelah. Plošče smo pustili odprte, da je etanol izhlapel. Medtem smo pripravili rastni medij s kvasovkami in CPRG-jem. Rastnemu mediju smo dodali 2 mL kvasovk z $\text{OD}_{620}=1$ in 200 μL substrata klorofenol rdeče β -D-galaktopiranozid. Tako pripravljen medij smo nanesli v vsako vdolbinico po 200 μL . Na drugo mikrotitrsko ploščo smo nanesli tudi 3 kontrole (kontrola gojišča, kontrola CPRG-ja, slepa kontrola), s katerimi

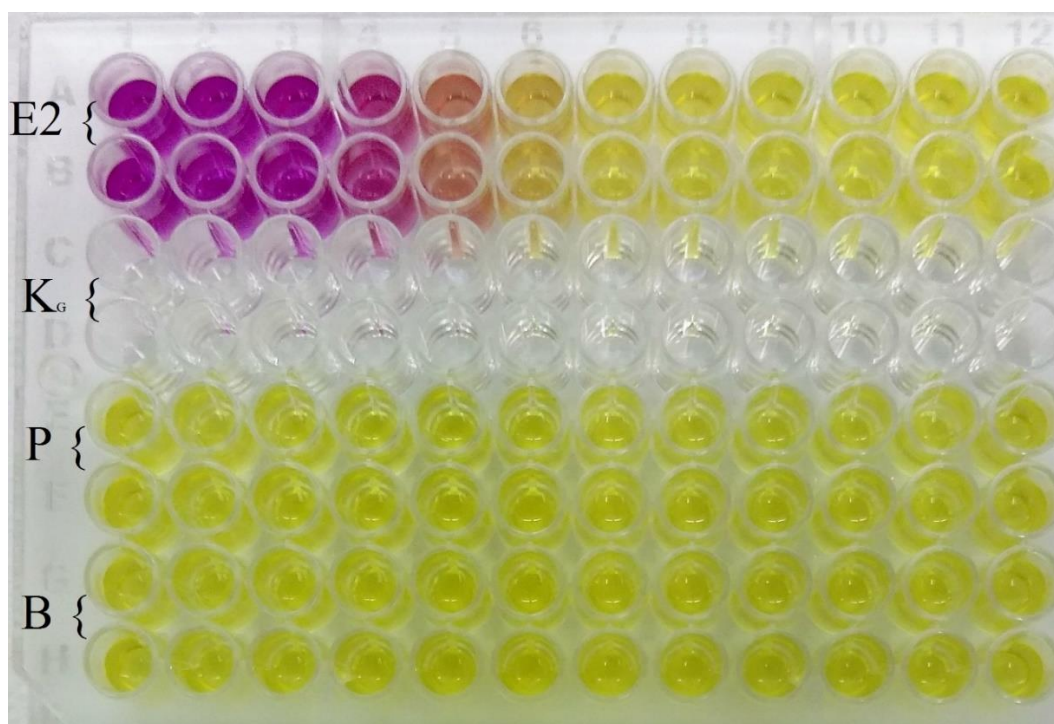
smo preverili ustreznost gojišča, kvasovk in CPRG-ja. Nato smo mikrotitrsko ploščo stresli in dali v inkubator na 34 °C za 48-72 ur.

Kontrolo gojišča (K_G) predstavlja rastni medij s kvasovkami brez CPRG-ja. S kontrolo smo preverili, ali je gojišče primerno za rast kvasovk ter se prepričali, da ni prisotnih snovi, ki bi potencialno lahko dale lažno pozitiven rezultat.

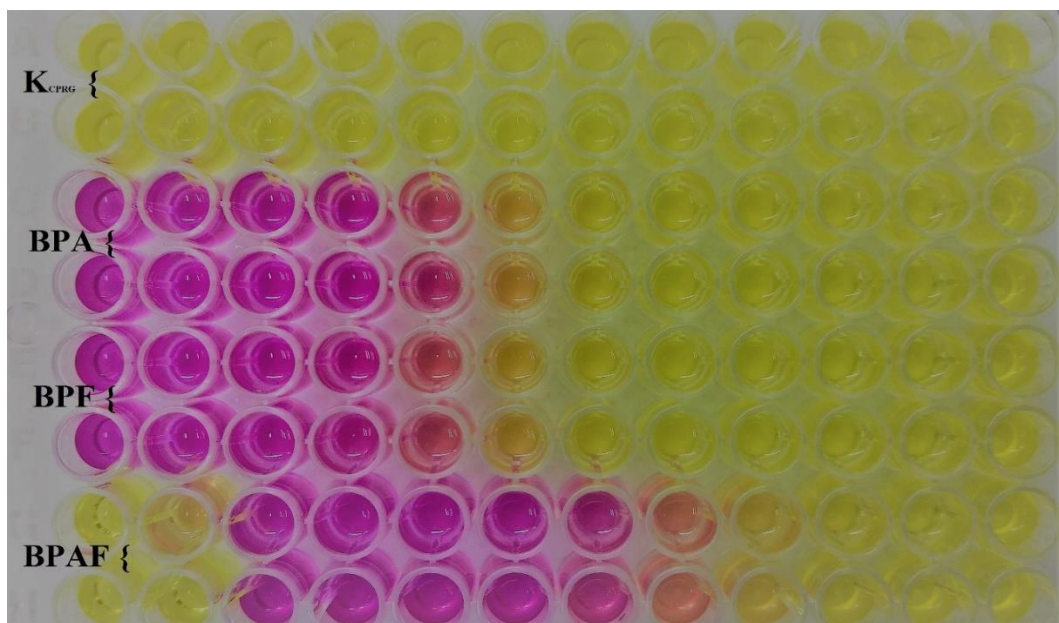
Kontrola CPRG-ja (K_{CPRG}) vsebuje rastni medij s CPRG-jem, brez kvasovk. Z njo smo preverili ali so v gojišču snovi, ki reagirajo s CPRG-jem in dajejo lažno pozitiven rezultat oz. če se CPRG razgrajuje sam po sebi ter tako daje lažno pozitiven rezultat.

Slepa kontrola (B) predstavlja rastno gojišče s kvasovkami in CPRG-jem. S slepo kontrolo smo preverili ali kvasovke same po sebi reagirajo s CPRG-jem in bi lahko pri poskusu dobili lažno pozitiven rezultat. Slepa kontrola nam je tudi služila kot dokaz, da kultura kvasovk ni bila okužena oz. se estrogenski receptor ni nepravilno izrazil.

Nanos vzorcev in kontrol na mikrotitrsko ploščo je predstavljen na Sliki 8 in 9.



Slika 8: Primer mikrotitrsko plošče 1 (nanos pozitivne in negativne kontrole, kontrole gojišča in slepe kontrole v dveh paralelah)



Slika 9: Primer mikrotitrne plošče 2 (nanos kontrole CPRG-ja, vzorcev BPA, BPF in BPAF v dveh paralelah s faktorjem redčenja 2)

Merjenje absorbance:

Kot optimalen čas inkubacije smo določili čas, ko je bil dosežen plato estrogenske aktivnosti za E2. Absorbanco smo merili na mikročitalcu (EPOCH, Biotek Instruments, USA, programska oprema: Gen5 2.07) pri 575 nm in 620 nm. Absorbanca, izmerjena pri 575 nm, predstavlja intenzivnost barve nastalega produkta, z določanjem absorbance pri 620 nm pa ugotavljamo stopnjo rasti kvasovk.

3.2.4.2. TEST ZA MEŠANICE BISFENOLOV

Za vsako mešanico bisfenolov smo naredili po tri ponovitve testa. Za eno ponovitev smo uporabili dve mikrotitrski plošči, saj smo na prvi pripravili redčitveno vrsto za E2, progesteron in mešanice vzorcev s faktorjem redčenja 2. Redčili smo z absolutnim etanolom (Sigma-Aldrich, Nemčija, $\geq 99,8\%$). Tako kot za posamezne bisfenole, smo tudi pri tem testu pripravili 12 redčitev. Iz prve plošče smo nato 10 μL po enakem postopku (kot za posamezne bisfenole) prenesli na drugo ploščo ter nadaljevali z dodajanjem rastnega medija s kvasovkami in CPRG-jem. Sledila je inkubacija pri 34 °C in na koncu merjenje absorbance pri 575 nm in 620 nm.

3.2.5. IZRAČUNI POTREBNI ZA VREDNOTENJE YES TESTA

3.2.5.1. Izračun zaviranja rasti kvasovk (Enačba 2)

Bisfenoli so v višjih koncentracijah za kvasovke strupeni. Zaviranje rasti kvasovk smo izračunali po enačbi:

$$\text{Zaviranje rasti kvasovk (\%)} = 100 \times (1 - A_{620\text{nm}}/K), \quad (\text{Enačba 2})$$

$A_{620\text{nm}}$ je absorbanca vzorca pri valovni dolžini 620 nm, K pa absorbanca povprečnih vrednosti negativne kontrole pri 620 nm (67).

3.2.5.2. Izračun estrogenske aktivnosti (EA) oz. aktivnosti β -galaktozidaze (Enačba 3)

$$EA = A_{575\text{nm}}(\text{vzorec}) - (A_{620\text{nm}}(\text{vzorec}) - A_{620\text{nm}}(\text{slepa})), \quad (\text{Enačba 3})$$

$A_{575\text{nm}}(\text{vzorec})$ je absorbanca vzorca merjena pri 575 nm, $A_{620\text{nm}}(\text{vzorec})$ absorbanca vzorca merjena pri 620 nm, $A_{620\text{nm}}(\text{slepa})$ pa povprečna vrednost slepega vzorca pri 620 nm (68).

3.2.5.3. Izračun relativne estrogenske aktivnosti (REA) (Enačba 4)

$$REA = (EA_{\text{vzorec}} - EA_{\text{slepa}})/\Delta \cdot 100, \quad (\text{Enačba 4})$$

EA_{vzorec} je estrogena aktivnost vzorca, izračunana po Enačbi 2, EA_{slepa} povprečje estrogenih aktivnosti slepih kontrol, Δ pa predstavlja interval estrogenosti z začetno točko pri najvišji vrednosti estrogenske aktivnosti E2 in končno točko pri najnižji vrednosti estrogenske aktivnosti E2 (68).

3.2.5.4. Izračun relativne estrogenske aktivnosti za mešanice pri posameznih EC (Enačba 5)

$$REA = EA_{\text{mešanice}} / (\text{vsota komponent v mešanici } EA_{\text{BPX plato}}) \cdot 100, \quad (\text{Enačba 5})$$

$$X = A, F, AF$$

$EA_{\text{mešanice}}$ je estrogenska aktivnost mešanice dveh oz. treh bisfenolov, $EA_{\text{BPA plato}}$ estrogenska aktivnost BPA v najvišji točki, $EA_{\text{BPF plato}}$ estrogenska aktivnost BPF v najvišji točki, $EA_{\text{BPAF plato}}$ estrogenska aktivnost BPAF v najvišji točki.

3.2.5.5. Izračun estrogenske jakosti (Enačba 6)

$$\text{Potenca} = EC_{50} \text{ BPA} / EC_{50} \text{ BPX}; \quad (\text{Enačba 6})$$

$$X = F, AF$$

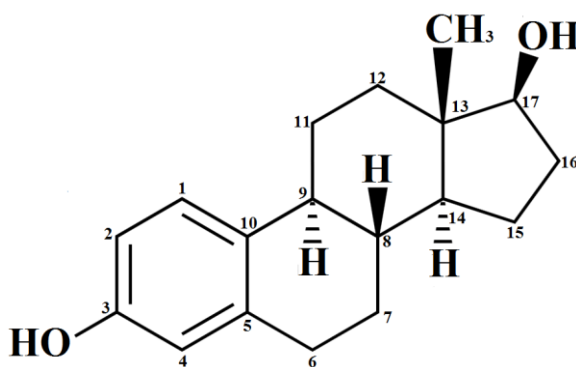
Analog BPX ima večjo estrogensko jakost kot BPA, če je razmerje EC_{50} BPA napram BPX večje od 1, razmerje manjše od 1 pa nakazuje na manjši potencial (7).

Podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom OriginPro 8 in Microsoft Excel.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

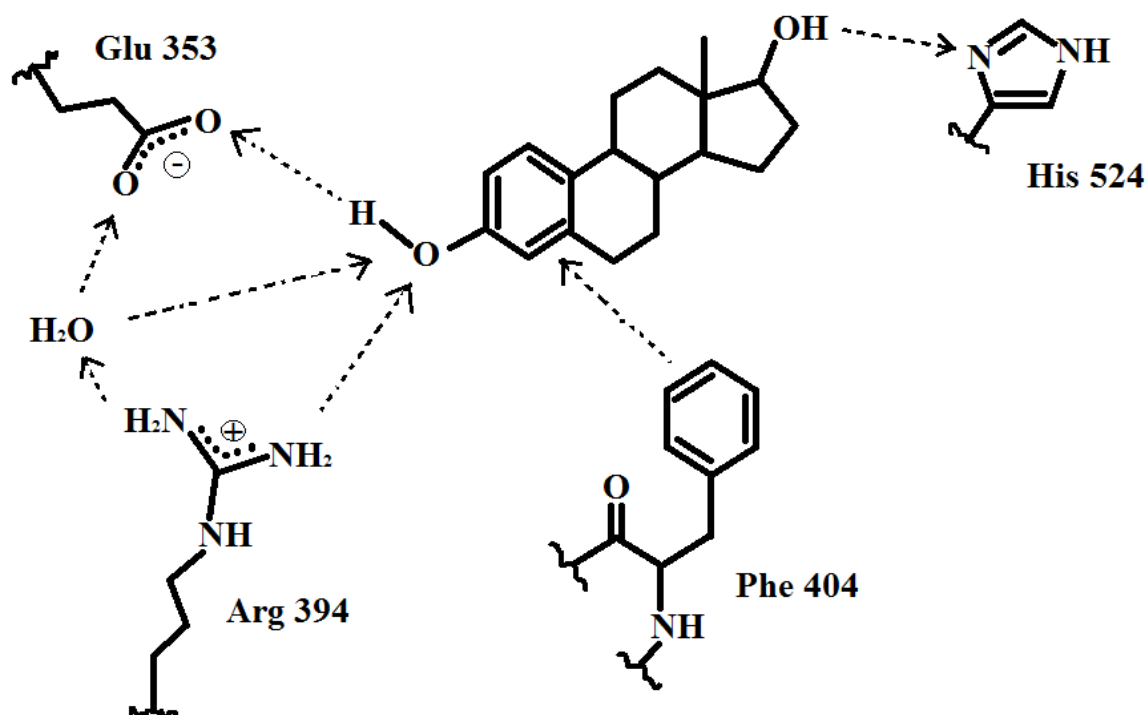
4.1 ESTROGENOST NARAVNEGA LIGANDA

Številne kemikalije lahko delujejo na endogene receptorje, med katerimi je tudi estrogenski receptor in na tak način posredujejo učinke, podobne naravnemu ligandu 17β -estradiolu (E2). V žep na estrogenski receptor se ne more vezati vsaka molekula, temveč morajo zadostiti določenim strukturnim zahtevam. Njihova struktura mora biti čim bolj podobna 17β -estradiolu (Slika 10). Za estrogene učinek so potrebni dve OH skupini na določeni razdalji, obročna struktura (aromatski obroč) ter sterični hidrofojni center (69).



Slika 10: Slika 17β -estradiola (prirejeno po 69)

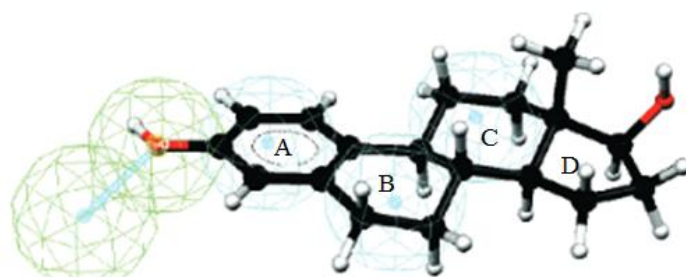
Naravni ligand E2 je najmočnejši estrogen. Njegova relativna vezavna afiniteta do estrogenskega receptorja je 100 %. Iz kristalne strukture je bilo ugotovljeno, da 3-OH skupina preko vodikove vezi tvori interakcijo z Glu 353, Arg 394 in eno molekulo vode, medtem ko 17β -OH vez tvori eno vodikovo vez s His 524 (Slika 11). Pomembne so tudi π - π interakcije. Te interakcije tvori aromatski obroč fenilalanina z aromatskim obročem 17β -estradiola. Za učinek je pomembna tudi razdalja (d_{O-O}) med 3- in 17-OH skupinama kot tudi njuna usmerjenost v prostoru. 17α -OH E2 ima namreč 33-krat nižjo relativno afiniteto do receptorja v primerjavi z E2 zaradi spremenjene konformacije. Poziciji 7α in 11β na steroidnem obroču sta pomembni za povečanje ali zmanjšanje estrogenske aktivnosti. Tako lahko ti dve mesti nosita velike substituentne, ki zmanjšajo estrogensko aktivnost, mali substituenti na teh dveh mestih pa na splošno povečajo aktivnost (69).



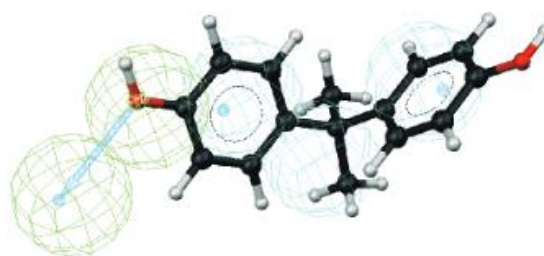
Slika 11: Interakcije E2 z aminokislinami in vodo z vezavnim mestom na estrogenem receptorju (prirejeno po 69)

Bisfenol A, AF in F sodijo v skupino difenilmetanov, pri čemer sta dva benzenova obroča povezana z enim sp^3 hibridiziranim C atomom. Bistvena za vezavo na estrogeni receptor je fenolna 4-OH skupina, brez te namreč ni učinka. Na relativno vezavno afiniteto močno vpliva tudi dolžina verige, ki je pripeta na mostni C atom. Daljše verige na tem atomu povečajo afiniteto, krajše pa zmanjšajo. Tako ima BPF nižjo afiniteto kot BPA (69).

Čeprav se E2 dobro prilega v žep, je še veliko praznega prostora na poziciji 7α in 11β in prav ti dve poziciji sta pomembni pri ksenoestrogenih za prileganje v žep. Primerjava farmakoforov prikazuje, da je optimalna superpozicija med E2 in BPA takšna, da sta benzenova obroča BPA v takšni legi, kot sta A in C obroča pri E2, mostni ogljik BPA pa je v legi kot je B obroč E2, učinek steričnih substituentov na mostnem atomu je analogen substituentom na 7α E2 (Slika 12) (69).



E2



BPA

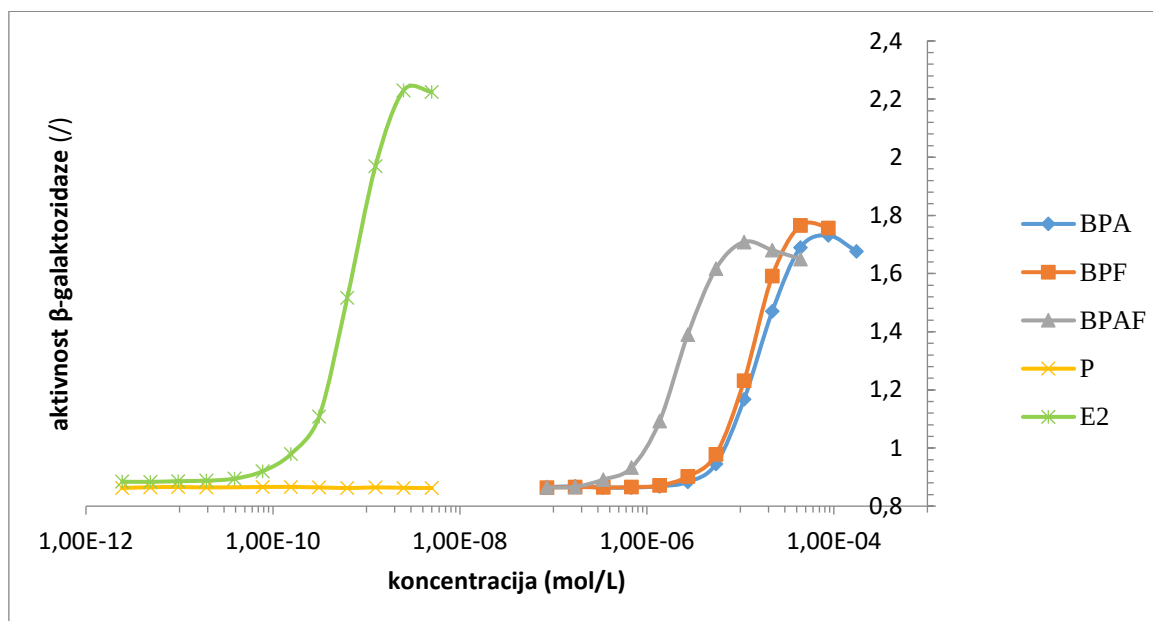
Slika 12: Primerjava 3D farmakoforov 17β -estradiola (E2) in BPA (prirejeno po 69)

Estrogensko delovanje bisfenola A in njegovih analogov je bila preučevana tako *in vivo* kot tudi *in vitro*, pri čemer so bile ugotovljene različne estrogenske aktivnosti na različnih preučevanih celicah (51, 52, 70). Pogoj za estrogensko delovanje je 4-hidroksi skupina na A in B fenilnem obroču, na estrogensko aktivnost pa pomembno vpliva tudi alkilni most med fenilnima obročema ter substituenti na 3 in 5 mestih aromatskega obroča. Po analogiji za endogeni ligand 17β -estradiol (E2) lahko sklepamo, da 4-hidroksi skupini bisfenolov interagirata z istimi aminokislinami (52).

4.2 ESTROGENSKA AKTIVNOST BPA, BPF IN BPAF

V našem raziskovalnem delu smo z YES testom določevali estrogensko aktivnost tako posameznih bisfenolov (BPA, BPAF, BPF) kot tudi njihovih mešanic pri EC_{10} , EC_{20} in EC_{30} . Pri izvedbi testa smo morali biti zelo pozorni in natančni, saj je delo poteka v sterilnih pogojih. V nasprotnem primeru bi prišlo do okužbe kvasovk in s tem do neveljavnosti oziroma lažnih rezultatov testa. Estrogensko in relativno estrogensko aktivnost smo izračunali s pomočjo Enačb 3 in 4, z upoštevanjem izmerjenih absorbanc vzorcev pri YES testu. Delež zaviranja rasti kvasovk smo izračunali s pomočjo Enačbe 2. Odvisnost

aktivnosti β -galaktozidaze od koncentracije bisfenolov, E2 in progesterona prikazuje Slika 13.



Slika 13: Odvisnost aktivnosti β -galaktozidaze od koncentracije BPA, BPAF, BPF ter E2 in P

Iz Slike 13 je razvidno, da ima naravni ligand E2 signifikantno najvišjo estrogensko aktivnost pri zelo nizkih koncentracijah v primerjavi z bisfenoli. Bisfenoli veljajo za šibke estrogene, vezavna afiniteta BPA do klasičnih jedrnih receptorjev $ER\alpha$ in $ER\beta$ je 10,000-100,000-krat nižja od 17β -estradiola (27).

EC_{50} koncentracije določene na Sliki 13 predstavlja Preglednica VII.

Preglednica VII: EC_{50} BPA, BPAF, BPF in E2.

	BPA	BPAF	BPF	E2
EC_{50} (μ M)	14,69	2,13	13,35	$6,76 \times 10^{-4}$

Iz primerjave EC_{50} vidimo, da ima najnižji EC_{50} E2 z doseženim platojem estrogenske aktivnosti 2,23. E2 ima torej najmočnejše estrogensko delovanje, kar je v skladu s teoretično predpostavko, saj je naravno prisoten v telesu in odgovoren za estrogenske učinke. Dobljene vrednosti EC_{50} se v našem primeru razlikujejo od vrednosti pridobljenih na celični liniji raka dojke MCF-7, XenoScreen XL YES/YAS testu in bioluminiscenčnem yeast estrogen screen testu (BLYES). Estrogenska aktivnost je torej odvisna od tega, kakšen test uporabimo in od

vrste uporabljenih celic, kar je razvidno iz naslednjih podatkov. Za estrogensko aktivnost BPA, BPF in BPAF v celični liniji raka dojke MCF-7 je bilo ugotovljeno, da aktivnost pada po vrstnem redu E2 > BPAF > BPA > BPF. EC₅₀ koncentracije, določene v celični liniji MCF-7 za posamezne bisfenole in E2, prikazuje Preglednica VIII (51, 52, 70).

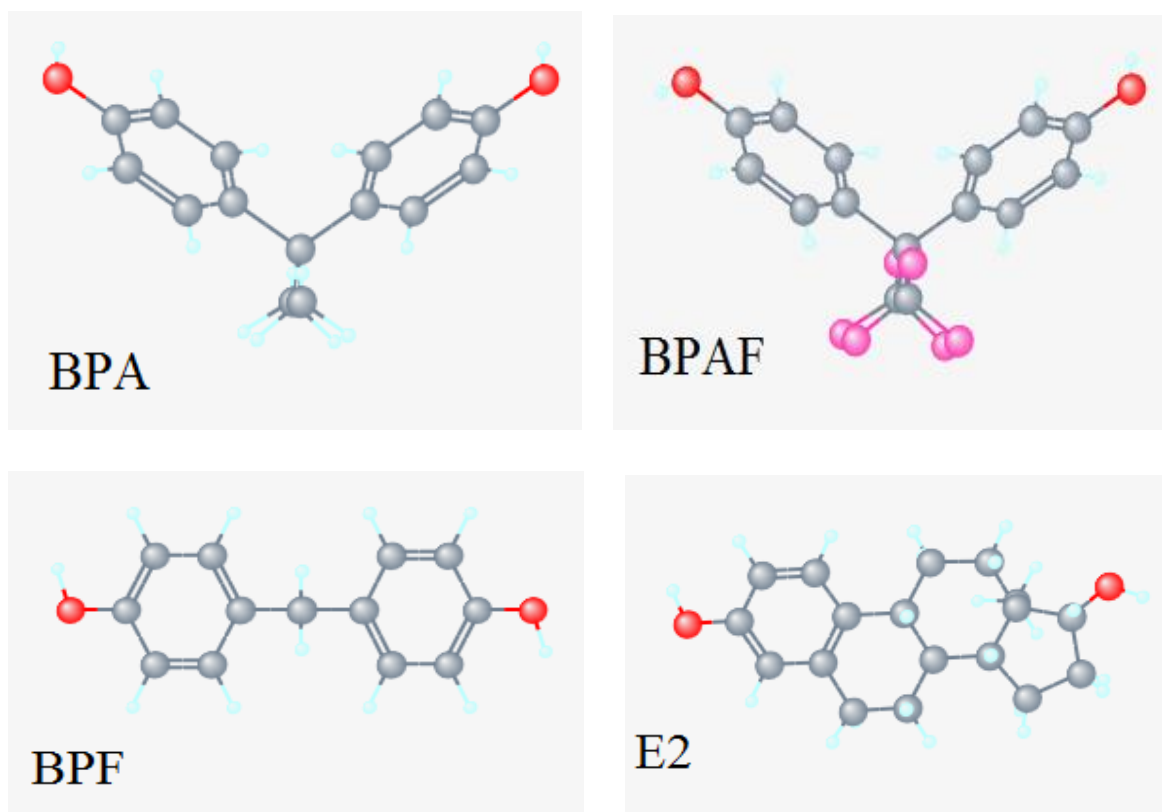
Preglednica VIII: EC₅₀ določene za posamezne bisfenole in E2 določene v celični liniji raka dojke MCF-7 (52).

	BPA	BPAF	BPF	E2
EC ₅₀ (μM)	0,63	0,05	1,0	8,6×10 ⁻⁶

V našem primeru, ko smo uporabili gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je EC₅₀ E2 stokrat višji kot določen v MCF-7 celični liniji, kar kaže na dejstvo, da so različne celice različno občutljive na spojine z estrogenskim delovanjem. Estrogenost na tej liniji je bila določena še drugim analogom in bilo je ugotovljeno, da substituiran propanski most BPA s hidrofilno skupino zmanjša estrogensko aktivnost, medtem ko jo substituiran s hidrofobno skupino poveča. To je posledica dejstva, da se pri hidrofilnih skupinah zmanjša intenzivnost interakcij s hidrofobnimi aminokislinami v estrogenskem receptorju na tem mestu. Če primerjamo BPA in BPAF, lahko sklepamo, da CF₃ poveča hidrofobnost in ima zato večjo estrogensko aktivnost od BPA. Analogno bi moral imeti tudi BPA večjo estrogensko aktivnost od BPF, saj ima dve CH₃ skupini na mostnem ogljiku v primerjavi z BPF (sami vodiki na mostnem ogljiku), ampak v našem primeru pride do odstopanj, saj smo za BPF izmerili oz. s testi določili višjo estrogensko aktivnost in nižji EC₅₀ (52).

Primerjava EC₅₀ bisfenolov naše raziskave pove, da ima BPA 10 % višjo vrednost EC₅₀ od BPF. Plato aktivnosti določen preko β-galaktozidaze je za BPF 1,76 in za BPA 1,73. BPF ima torej nižjo vrednost EC₅₀ od BPA in za 2 % višji plato aktivnosti β-galaktozidaze od BPA. Če primerjamo EC₅₀ BPF in BPA določeni na celični liniji raka dojke MCF-7 z našo raziskavo, vidimo, da so v našem primeru višje vrednosti tega parametra, in sicer je EC₅₀ za BPA 14,69 μM in EC₅₀ za BPF 13,35 μM, medtem ko je pri prej omenjeni celični liniji EC₅₀ za BPA 0,63 μM in EC₅₀ za BPF 1,0 μM. Izmed vseh treh bisfenolov ima BPAF najnižjo vrednost EC₅₀ in najnižji plato. Pri višjih koncentracijah namreč postane BPAF citotoksičen in kvasovke odmrejo. Veliko citotoksičnost BPAF pripisujemo dejstvu, da vsebuje dve CF₃

skupini, ki sta bolj elektronegativni in hidrofobni skupini in se zato močneje veže v žep na estrogenskem receptorju, pa tudi ker velika skupina pomeni manjšo možnost rotacije in tako lažje prileganje v žep na estrogenskem receptorju (Slika 14). V primerjavi s celično linijo raka dojke MCF-7 ima BPAF v našem primeru višjo vrednost EC_{50} . V našem primeru EC_{50} BPAF znaša $2,13 \mu M$ in EC_{50} BPAF določen na celični liniji MCF-7 $0,05 \mu M$ (51, 52, 70).



Slika 14: 3D strukture: BPA, BPF, E2 in BPAF (prirejeno po 45, 55, 71, 72)

Iz struktur BPA, BPF, E2 in BPAF (Slika 14) je razvidno, da ima BPF največjo možno rotacijo, saj ima na mostnem ogljiku vezane samo vodike, medtem ko ima BPA CH_3 skupini, BPAF pa CF_3 , kar zmanjša možnost rotacije molekule in s tem omogoči boljše prileganje v žep na estrogenskem receptorju. Prav tako je vidno, da gre pri E2 za togo strukturo, saj obročni sistem onemogoča prosto rotacijo.

Estrogensko jakost smo uvedli z namenom ugotovitve, kako močno estrogensko delovanje imata BPF in BPAF napram BPA. Izračunali smo jo s pomočjo Enačbe 5 (Preglednica IX).

Preglednica IX: Estrogenska jakost BPAF in BPF.

	BPAF	BPF
Estrogenska jakost	6,91	1,10

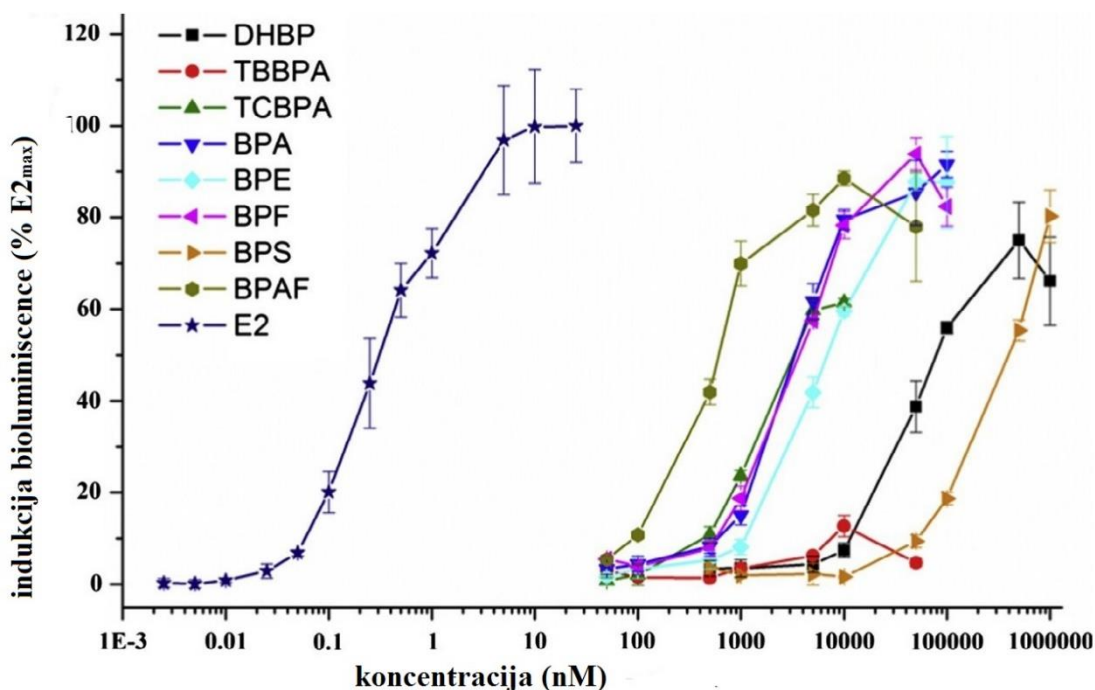
Glede na vrednosti estrogenske jakosti je razvidno, da ima tako BPF kot BPAF večjo estrogensko aktivnost napram BPA. Literaturni podatki v različnih študijah in rezultati, pridobljeni z različnimi testi oz. celičnimi linijami navajajo različno estrogensko aktivnost za BPA in BPF, medtem ko ima BPAF večjo aktivnost od BPA in BPF v vseh testih. Estrogenske jakosti v študijah, z različnimi uporabljenimi celicami oz. testi, varirajo od 2,81 do 12,6 (srednja vrednost 6,67) za BPAF in od 0,10 do 4,83 (srednja vrednost 0,62) za BPF. V našem primeru se je estrogenska jakost BPAF približala literaturni srednji vrednosti 6,67. Ta vrednost je bila določena pri celični liniji PRL-HeLa, višja vrednost (12,6) je bila določena pri celični liniji MCF-7, nižja (2,81) pa pri celični liniji raka jeter HepG2. Estrogenska jakost BPF je v našem primeru znašala 1,10, kar je nad literaturno povprečno vrednostjo (0,62). Najvišjo jakost za BPF (2,67) so določili pri testu Yeast 2-hybrid, najnižjo (0,10) pa pri celični liniji BG1Luc4E₂ (7).

Pri vrednotenju estrogenske aktivnosti iz blata čistilnih naprav na Kitajskem, kjer je bil uporabljen BLYES test, so dobili podobne rezultate kot v našem primeru. Estrogenska aktivnost bisfenolov pada v enakem vrstnem redu kot pri našem testu (51). V Sloveniji pa je bila izvedena raziskava, kjer so ugotavljali estrogensko in androgeno aktivnost zaviralcev gorenja in izbranih bisfenolov z uporabo XenoScreen XL YES/YAS testa, ugotovljeno je bilo, da ima BPA večjo estrogensko aktivnost od BPF. Primerjava EC₅₀ bisfenolov in E2 BLYES, Xenoscreen XL YES testa in našega testa prikazuje Preglednica X (51, 70).

Preglednica X: Primerjava EC₅₀ BPA, BPAF, BPF in E2 med BLYES, Xenoscreen XL YES/YAS in YES testom.

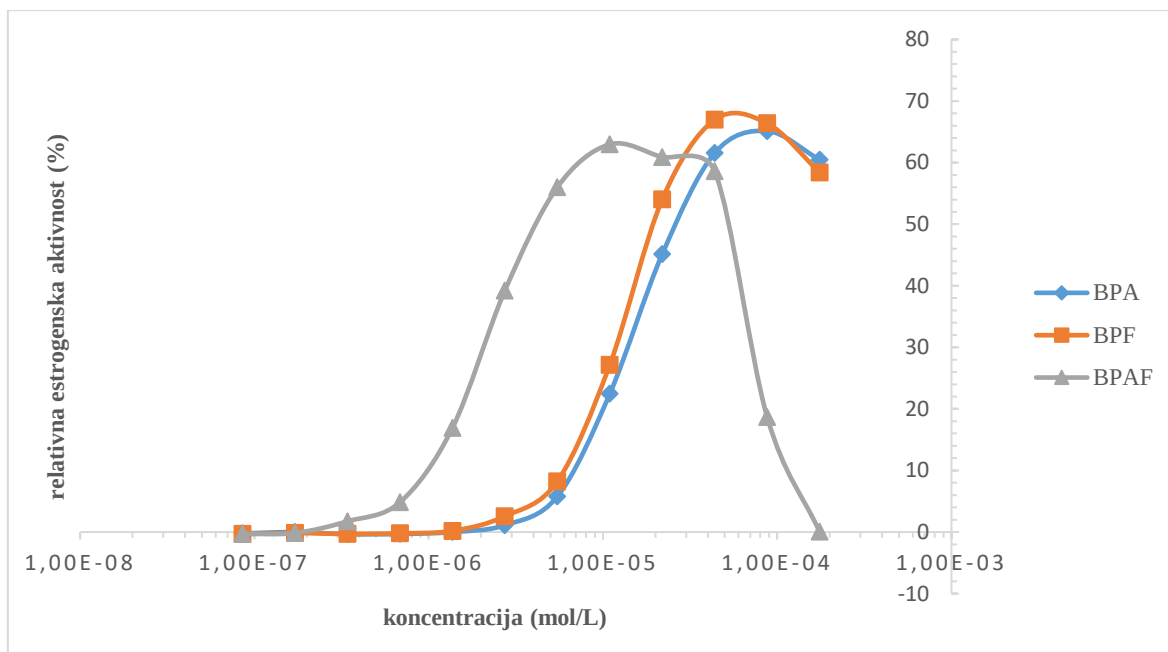
Test	EC ₅₀ (μM)			
	BPA	BPAF	BPF	E2
BLYES	4,1	0,6	4,0	4,4×10 ⁻⁴
YES (naš primer)	14,69	2,13	13,35	6,76×10 ⁻⁴
Xenoscreen XL YES/YAS	3,60	0,39	4,67	2,0×10 ⁻⁴

Čeprav so bile v obeh testih in tudi v našem primeru uporabljene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, vidimo, da se rezultati razlikujejo. V našem primeru smo dobili višje rezultate EC_{50} za vse štiri analite. Pri BLYES in našem testu platoji estrogene aktivnosti in EC_{50} E2, BPA, BPF in BPAF padajo v enakem vrstnem redu (Sliki 13 in 15, Preglednica X) (51).



Slika 15: Indukcija bioluminiscence (% E2max) v odvisnosti od koncentracije posameznega bisfenola (prirejeno po 51)

Za posamezne bisfenole smo pri vseh koncentracijah izračunali tudi relativno estrogensko aktivnost (REA) po Enačbi 4, ki nam pove, kakšen delež estrogene aktivnosti E2 predstavlja posamezen bisfenol (Slika 16).



Slika 16: Relativna estrogenska aktivnost BPA, BPF in BPAF

Relativna estrogenska aktivnost pada pri različnih bisfenolih različno hitro. Pri višjih koncentracijah BPAF vidimo nižje vrednosti na račun zaviranja rasti kvasovk (83 %, 60 %, 24 %) in posledično se estrogenska aktivnost ne more izraziti. Iz Slike 16 je razvidno, da relativna estrogenska aktivnost pri BPAF najpočasneje pada in je velika še pri nizkih koncentracijah. Če primerjamo točke pri koncentraciji $1,09 \times 10^{-5}$ mol/L, vidimo, da je relativna estrogenska aktivnost pri BPAF še 63 %, medtem ko znaša pri BPF 27 % in pri BPA le 22 %. BPF doseže najvišjo relativno estrogensko aktivnost (67 %), ampak pride do hitrega padca. Plato BPA je dosežen pri višji koncentraciji in znaša 65 % relativne estrogenske aktivnosti, kar pomeni, da imata BPF in BPA podobno relativno aktivnost.

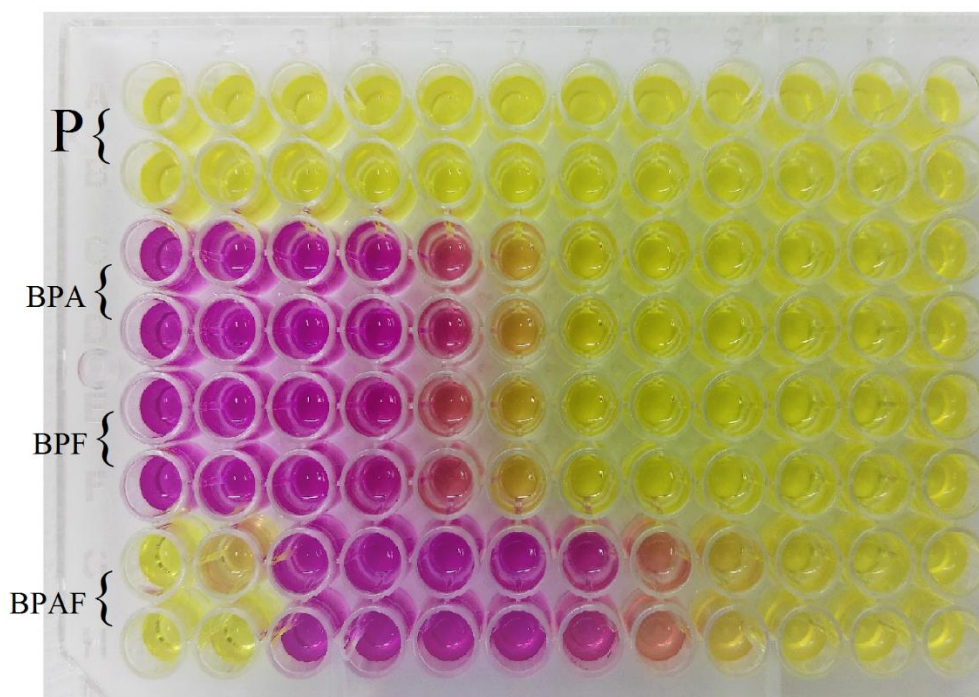
4.3 CITOTOKSIČNOST POSAMEZNIH BISFENOLOV

Citotoksičnost je opredeljena kot procent zaviranja rasti kvasovk. Določili smo jo z meritvijo absorbance pri 620 nm vzorca v primerjavi s slepim vzorcem (Preglednica XI).

Preglednica XI: Zaviranje rasti kvasovk po izpostavitvi različnim koncentracijam BPA, BPAF in BPF.

Koncentracija (mol/L)	Zaviranje rasti (%)		
	BPA	BPF	BPAF
$1,75 \cdot 10^{-4}$	21	20	83
$8,76 \cdot 10^{-5}$	15	16	60
$4,38 \cdot 10^{-5}$	6	7	24
$2,19 \cdot 10^{-5}$	8	12	13
$1,10 \cdot 10^{-5}$	6	8	4

Najbolj citotoksičen je BPAF. Pri najvišji koncentraciji pride do 83 % zaviranja rasti, medtem ko imata BPA in BPF podobno citotoksičnost. Na mikrotitrski plošči je pri dveh najvišjih koncentracijah BPAF razvidno, da reakcija ne poteče, saj je preveliko zaviranje rasti in posledično vdolbinice ostanejo rumeno obarvane, pri ostalih dveh bisfenolih pa se tudi pri najvišjih koncentracijah obarvajo vijolično (Slika 17).



Slika 17: Koncentracije BPA, BPF, BPAF in P padajo od leve proti desni

Veliko citotoksičnost BPAF pripisujemo dejstvu, da je spojina bolj lipofilna ($\text{LogP}=4,47$), kar ji omogoča večjo afiniteto do membranskih lipidov in lažje prehajanje v celice. CF_3 skupina pa je že sama po sebi bolj reaktivna in povzroča toksičnost. BPA samo za 1 % bolj zavira rast kvasovk napram BPF. Citotoksičnost z nižanjem koncentracije pada, pri čemer je opazno majhno odstopanje za BPF pri koncentraciji $2,19 \times 10^{-5}$ mol/L.

Saccharomyces cerevisiae je pogosto uporabljen organizem za določanje estrogenske aktivnosti bisfenolov. Vsebuje podoben genom kot človek. V študiji, kjer je bila uporabljena *S.cerevisiae* BY4742 na odziv BPA do 50 mg/L, ni bilo nobenega učinka na rast celic. Pri 50 mg/L ($2,19 \times 10^{-4}$ mol/L) je bilo manj kot 10 % (5,2 %) zaviranje rasti, pri koncentraciji 300 mg/L ($13,14 \times 10^{-4}$ mol/L) pa več kot 70 % (71,5 %) zaviranje rasti. Če primerjamo našo najvišjo koncentracijo BPA ($1,75 \times 10^{-4}$ mol/L), pri kateri pride do 21 % zaviranja rasti z literaturno (5,2 %), pridobljeno na *S.cerevisiae* BY4742 po izpostavitvi $2,19 \times 10^{-4}$ mol/L BPA, tako vidimo, da smo dobili višje vrednosti zaviranja rasti, kar pomeni, da so najverjetneje kvasovke z različnim genotipom različno občutljive na izpostavitve bisfenolu A. BPA pri višjih koncentracijah izkazuje večjo citotoksičnost, pri najvišji koncentraciji ($13,14 \times 10^{-4}$ mol/L), uporabljeni v študiji, pride do 71,5 % zaviranja rasti, kar pa je vseeno manj, kot pri nižji koncentraciji BPAF $1,75 \times 10^{-4}$ mol/L (83 %) v našem primeru (24).

4.4 CITOTOKSIČNOST MEŠANIC BISFENOLOV

Mešanice kombinacij bisfenolov pri EC_{10} in EC_{20} ne zavirajo rasti kvasovk. Pri teh kombinacijah smo po Enačbi 2 dobili negativen predznak, kar pomeni, da je prišlo do povečanja rasti kvasovk (Preglednica XII, XIII, XIV). To lahko pripišemo temu, da je v vdolbinici na mikrotitrski plošči kjer je mešanica bisfenolov večje število kvasovk in je zato posledično bila malenkost višja rast kot pri negativni kontroli, lahko pa da ima BPA pri nižjih koncentracijah zaščitno vlogo (58). Minimalno zaviranje rasti pa opazimo pri EC_{30} pri vseh kombinacijah bisfenolov.

Preglednica XII: Zaviranje rasti kvasovk pri EC_{10} .

EC(x) x=10	Zaviranje rasti (%)
BPF+BPA	-1
BPF+BPAF	-1
BPA+BPAF	-1
BPF+BPA+BPAF	-1

Preglednica XIII: Zaviranje rasti kvasovk pri EC₂₀.

EC(x) x=20	Zaviranje rasti (%)
BPF+BPA	-3
BPF+BPAF	-4
BPA+BPAF	-6
BPF+BPA+BPAF	-5

Preglednica XIV: Zaviranje rasti kvasovk pri EC₃₀.

EC(x) x=30	Zaviranje rasti (%)
BPF+BPA	4
BPF+BPAF	3
BPA+BPAF	3
BPF+BPA+BPAF	2

4.5 ESTROGENSKA AKTIVNOST MEŠANIC BPA, BPF IN BPAF

Vsi testirani bisfenoli imajo zmožnost vezave na estrogenski receptor. Prav tako imajo enak mehanizem delovanja in zato lahko pričakujemo model aditivnosti koncentracij, ki jih testiramo v mešanicah.

Iz Slike 13 smo za posamezne bisfenole najprej določili koncentracije posameznih bisfenolov pri EC₁₀, EC₂₀ in EC₃₀ (Preglednica XV). Nato smo iz določenih koncentracij pripravili mešanice z enakim volumskim deležem posameznega bisfenola v vdolbinici z enakim koncentracijsko koncentracijskim razmerjem (Priprava raztopin mešanic je opisana v poglavju 3.2.3.1.).

Preglednica XV: EC₁₀, EC₂₀ in EC₃₀ za posamezne bisfenole. EC(x) predstavlja estrogensko aktivnost pri 10 %, 20 % in 30 % maksimalne estrogenske aktivnosti za posamezni bisfenol.

	BPA	BPF	BPAF
EC(x) x=10	0,95	0,95	0,95
koncentracija (mol/L)	$6,03 \times 10^{-6}$	$4,32 \times 10^{-6}$	$7,82 \times 10^{-7}$
EC(x) x=20	1,04	1,04	1,03
koncentracija (mol/L)	$8,38 \times 10^{-6}$	$6,18 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-6}$
EC(x) x=30	1,12	1,13	1,12
koncentracija (mol/L)	$1,02 \times 10^{-5}$	$8,38 \times 10^{-6}$	$1,44 \times 10^{-6}$

Estrogensko aktivnost mešanic smo ugotavljali tudi z gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Kot rezultat estrogenske aktivnosti mešanic smo podali relativno estrogensko aktivnost glede na plato estrogenske aktivnosti bisfenolov prisotnih v posamezni mešanici. Rezultate za EC₁₀ prikazuje Preglednica XVI, za EC₂₀ Preglednica XVII in za EC₃₀ Preglednica XVIII.

Preglednica XVI: Relativna estrogenska aktivnost mešanic pri EC₁₀.

EC(x) x=10	Relativna estrogenska aktivnost (%)
BPF+BPA	27,6
BPF+BPAF	35,0
BPA+BPAF	32,6
BPF+BPA+BPAF	22,8

Preglednica XVII: Relativna estrogenska aktivnost mešanic pri EC₂₀.

EC(x) x=20	Relativna estrogenska aktivnost (%)
BPF+BPA	41,4
BPF+BPAF	41,9
BPA+BPAF	40,8
BPF+BPA+BPAF	28,7

Preglednica XVIII: Relativna estrogenska aktivnost mešanic pri EC₃₀.

EC(x) x=30	Relativna estrogenska aktivnost (%)
BPF+BPA	53,5
BPF+BPAF	57,9
BPA+BPAF	56,8
BPF+BPA+BPAF	39,6

Iz pridobljenih rezultatov sklepamo, da gre za aditiven učinek pri binarnih mešanicah in antagonističen učinek pri mešanicah iz treh komponent. Pri EC₁₀ vsaka komponenta prispeva 10 % k skupni relativni estrogensi aktivnosti. V primeru dveh komponent vidimo majhno odstopanje navzgor, vendar bi ta številka morala biti občutno višja v primeru sinergističnega učinka. Pri mešanici treh komponent gre za antagonistični učinek, saj imamo tri komponente, relativna estrogenska aktivnost pa je le 22,83 %, morala bi biti pa 3-krat po 10 %. Rezultati nam povedo, da gre podobno kot pri EC₁₀ tudi pri EC₂₀ in EC₃₀ pri binarnih mešanicah za aditiven učinek, saj vsaka komponenta prispeva približno 20 % in 30 % k relativni estrogensi aktivnosti. Pri mešanici treh komponent pa takega obnašanja spojin ne zasledimo in lahko predvidimo antagonističen učinek. Če bi vsaka komponenta prispevala 20 % in 30 % in bi morala biti skupna relativna estrogenska aktivnost 60 % in 90 %. Tako bi šlo za aditivni učinek, ki pa je v našem primeru le približno polovico te vrednosti.

V raziskavi, v kateri so proučevali estrogen učinek binarne mešanice BPA, genisteina in trenbolona z YES testom je bilo prav tako ugotovljeno, da učinkovine z enakim mehanizmom delovanja delujejo pretežno po principu aditivnosti pri nižjih koncentracijah, medtem ko je pri višjih ($\geq 1 \times 10^{-5}$ mol/L vsake komponente) bil opazen antagonizem. Antagonistični učinek lahko pojasnimo z dejstvom, da pride do saturacije receptorjev, lahko pa se bisfenoli vežejo tudi na antagonistično mesto na receptorju (61). V študiji, kjer so proučevali binarni mešanici BPA in E2 ter E2 in BPAF, ter mešanico treh komponent E2, BPA in BPAF so prav tako ugotovili aditiven učinek pri koncentracijah bisfenola od 3 nmol/L do 1 μ mol/L (73).

Koncentracije BPA, BPF in BPAF, ki so bile določene *in vivo* v različnih telesnih tekočinah človeka, v pitni vodi in v hrani (le hrana iz pločevink vsebuje koncentracije BPA podobne koncentracijam pri EC₂₀) so nižje od koncentracije, ki smo jo v YES testu določili za koncentracijo EC₁₀ in neposredno iz naših eksperimentalnih rezultatov ne moremo zanesljivo trditi ali bi šlo tudi pri teh koncentracijah do seštevanja estrogenskega učinka ali

ne. Pri našem testu smo namreč pri mešanicah uporabili koncentracijo posameznega bisfenola pri določeni koncentraciji EC, ampak v realnem svetu ni nujno, da so koncentracije posameznega bisfenola ravno v takšnem koncentracijskem razmerju. Potrebno bi bilo določiti koncentracije vseh treh bisfenolov hkrati in v istem biološkem vzorcu ter s temi koncentracijami izvesti test.

Koncentracije BPA v rekah blizu industrijskih območij se približajo koncentracijam pri EC₁₀, kar pomeni, da so vodni organizmi najbolj izpostavljeni hormonskim motilcem in pri teh so se najprej začeli kazati škodljivi učinki teh kemikalij. Višje koncentracije bisfenolov so bile določene v sedimentih in v blatu iz odpadnih voda, ampak človek tem vrednostim neposredno ni izpostavljen, izpostavljeni pa so mikroorganizmi in rastline, ki nenazadnje lahko pridejo v prehranjevalno verigo. Lahko pa bisfenoli preko sedimentov in blata iz odpadnih voda prehajajo v podtalnico in s tem v pitno vodo. Zaradi vse večje porabe teh kemikalij se bodo v prihodnosti najverjetneje koncentracije teh snovi v telesnih tekočinah človeka povečevale, še posebej BPF in BPAF in bo zato potrebno nadaljnje spremljanje učinkov teh snovi.

5 SKLEP

Na podlagi rezultatov našega eksperimentalnega dela glede preiskovanih spojin in njihovih mešanic lahko povzamemo naslednje zaključke:

Ugotovitve o citotoksičnosti posameznih bisfenolov in njihovih mešanic:

- Izhodiščne raztopine bisfenolov ($1,75 \cdot 10^{-4}$ mol/L) BPA, BPF in BPAF so bile citotoksične za gensko spremenjene kvasovke. Pri BPAF pride do 83 % zaviranja rasti kvasovk, sledita BPA z 21 % in BPF z 20 % zaviranjem rasti.
- Z razredčitveno vrsto citotoksičnost BPA in BPF hitro pade, medtem ko je pri BPAF po 4-kratni razredčitvi ($4,38 \cdot 10^{-5}$ mol/L) prisotno še 24 % zaviranje rasti kvasovk.
- Pri mešanicah bisfenolov BPA, BPF in BPAF nismo opazili zaviranja rasti oz. je bilo manj kot 5 % zaviranje rasti pri EC_{30} ; pri EC_{10} in EC_{20} pa smo opazili minimalno spodbujanje rasti (do 6 %).

Ugotovitve o estrogenski aktivnosti posameznih bisfenolov in njihovih mešanic:

- Izhodiščne raztopine BPA, BPF in BPAF ($1,75 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $8,76 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $4,38 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $2,19 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $1,10 \cdot 10^{-5}$ mol/L) so bile estrogensko aktivne v YES testu.
- Estrogenska aktivnost BPA, BPF in BPAF pada v vrstnem redu: BPAF > BPF > BPA.
- Relativna estrogenska aktivnost BPAF v odvisnosti od koncentracije pada počasneje kot pri BPA in BPF; in je visoka še pri nizkih koncentracijah ($5,47 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $2,74 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $1,37 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v primerjavi z ostalima dvema bisfenoloma.
- Estrogenski učinek mešanic dveh bisfenolov je približno enak seštevku estrogenskih aktivnosti obeh bisfenolov pri vseh treh izbranih EC.
- Pri proučevanju estrogenskega učinka mešanic treh komponent smo ugotovili, da takšne mešanice najverjetneje zaradi nasičenja receptorjev ali vezave na

antagonistično mesto izkazujejo učinek, manjši od seštevka (antagonističen) učinkov posameznih bisfenolov pri vseh treh EC.

Na podlagi teh ugotovitev lahko:

- delno potrdimo hipotezo, da struktura BPA, BPF in BPAF vpliva na njihovo estrogensko aktivnost (BPAF izkazuje najmočnejše estrogensko aktivnost, kar je v skladu s pričakovanji. BPA pa bi glede na teoretično predpostavko o strukturi in estrogenskem delovanju moral izražati višjo estrogensko aktivnost kot BPF, vendar v našem poizkusu pride do odstopanj. BPF v našem primeru na gensko spremenjenih kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* izkazuje višjo estrogensko aktivnost kot BPA).
- delno potrdimo hipotezo, da struktura BPA, BPF in BPAF vpliva na njihovo citotoksičnost (BPAF izkazuje največje zaviranje rasti kvasovk, medtem ko imata BPA in BPF podobno zaviranje rasti).
- potrdimo hipotezo, da pri mešanicah dveh bisfenolov pričakujemo aditiven učinek pri vseh treh EC.

6 LITERATURA

1. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I: A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 40(1): 241–58.
2. Bergman A, Heindel J, S Jobling, Kidd KA, Zoeller RT. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012 Summary for Decision-Makers: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf?ua=1 Dostop: 4.10.2016.
3. Usman A, Ahmad M: From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere* 2016; 158: 131-42.
4. Alves B, Ruiz B, Cristina N, Albuquerque P De, Rodrigo A, Oliveira M De, et al.: A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2016; 154: 511–9.
5. Hewlett M, Chow E, Aschengrau A, Mahalingaiah S: Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors : A Developmental Etiology for Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive Sciences* 1-9 2016;
6. Kiyama R, Wada-kiyama Y: Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int* 2015;83:11–40.
7. Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng Y, Wu Y, Widelka M: Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 5438-53.
8. Yang Y, Guan J, Yin J, Shao B, Li H: Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere* 2014;112:481–6.
9. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al: Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-response: An international Journal* 2015; (September): 1–29.
10. Mokra K, Kocia M, Micha J: Bisphenol A and its analogs exhibit different apoptotic

potential in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology* 2015; 84: 79–88.

11. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L: Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol* 2016; 47: 182-99.
12. Tišler T, Krel A, Gerželj U, Erjavec B, Sollner Dolenc M, Pintar A: Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms. *Environ Poll* 2016; 212: 472–9.
13. Broniatowski M, Sobolewska K: Studies on the interactions of bisphenols with anionic phospholipids of decomposer membranes in model systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016; 1858: 756–66.
14. Inadera H: Neurological Effects of Bisphenol A and its Analogues. *Int. J. Med. Sci.* 2015; 12: 926-36.
15. Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D: Health risk of exposure to bisphenol A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig* 2015; 66(1): 5–11.
16. Hartle JC, Navas-acien A, Lawrence RS: The consumption of canned food and beverages and urinary Bisphenol A concentrations in NHANES 2003 – 2008. *Environ Res* 2016; 150: 375–82.
17. González-parra E, Herrero JA, Elewa U, Bosch RJ, Arduán AO, Egido J: Bisphenol A in Chronic Kidney Disease. *International Journal of Nephrology* 2013; 2013: 437857.
18. Ćwiek-ludwicka K: Bisphenol A (BPA) in food contact materials - new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2015; 66(4): 299–307.
19. Han C, Hong Y: Bisphenol A, Hypertension, and Cardiovascular Diseases: Epidemiological, Laboratory, and Clinical Trial Evidence. *Curr Hypertens Rep* 2016; 18: 11.
20. Santangeli S, Maradonna F, Olivotto I, Carla C, Gioacchini G, Carnevali O: Effects of BPA on female reproductive function: The involvement of epigenetic mechanism. *Gen Comp Endocrinol* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.08.010> Dostop:

18.11.2016.

21. Acconcia F, Pallottini V, Marino M: Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose-response: An international Journal 2015;(December):1–9.
22. Feng Y, Jiao Z, Shi J, Li M, Guo Q, Shao B: Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. Chemosphere 2016; 147: 9–19.
23. Giulivo M, Lopez M, Alda D, Capri E, Barceló D: Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. Environ Res 2016; 151: 251–64.
24. Bereketoglu C, Arga KY, Eraslan S, Mertoglu B: Analysis of transcriptional profiles of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to bisphenol A. Curr Genet 2016; <http://link.springer.com/10.1007/s00294-016-0633-z> Dostop: 18.11.2016.
25. Ma A, Cyrkler M, Michałowicz J: Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (in vitro study). Journal of Hazardous Materials 2016; 307: 328–35.
26. Pernica M, Kuta J: Drinking water contaminants from epoxy resin-coated pipes: A field study. Water Research 2016; 103: 133-40.
27. Zhang Y, Yuan C, Gao J, Liu Y, Wang Z: Testicular transcript responses in rare minnow *Gobiocypris rarus* following different concentrations bisphenol A exposure. Chemosphere 2016; 156: 357–66.
28. Andra SS, Austin C, Yang J, Patel D, Arora M: Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. Sci Total Environ 2016; 572: 770-81.
29. Wang I, Chen C, Bornehag C: Bisphenol A exposure may increase the risk of development of atopic disorders in children. Int J Hyg Environ Health 2016; 219(3): 311–6.
30. Ndaw S, Remy A, Jargot D, Robert A: Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper : urinary biomonitoring study. Int Arch Occup Environ Health 2016; 89(6): 935–46.

31. Deceuninck Y, Bichon E, Antignac JP, Bizec B Le: Determination of bisphenol A and related substitutes/analogues in human breast milk using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407: 2485–97.
32. Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Doerge DR: Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem Toxicol* 2016; 92: 129-42.
33. Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kavvalakis MP, Barmpas M, Kokkinakis EN, Xenos K, et al.: Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population. *Chemosphere* 2015; 118: 336–41.
34. Tian J, Ding Y, She R, Ma L, Du F, Xia K, et al: Histologic study of testis injury after bisphenol A exposure in mice: Direct evidence for impairment of the genital system by endocrine disruptors. *Toxicol Ind Health* 1-10 2016.
35. Michałowicz J, Mokra K, Ba A: Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Toxicology in Vitro* 2015; 29: 1464–72.
36. Troisi J, Mikelson C, Richards S, Symes S, Adair D, Zullo F, et al: Placental concentrations of bisphenol A and birth weight from births in the Southeastern U. S. *Placenta* 2014; 35(11): 947–52.
37. Ahmed RG: Maternal bisphenol A alters fetal endocrine system: Thyroid adipokine dysfunction. *Food and Chemical Toxicology* 2016; 95: 168-74.
38. Wang N, Zhou Y, Fu C, Wang H, Huang P, Wang B, et al: Influence of Bisphenol A on Thyroid Volume and Structure Independent of Iodine in School Children. *PloS ONE* 10(10): e0141248.
39. Tewar S, Auinger P, Braun JM, Lanphear B, Yolton K, Epstein JN, et al: Association of Bisphenol A exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a national sample of U. S. children. *Environ Res* 2016; 150: 112–8.
40. Perera F, Roen EL, Wang Y, Margolis AE, Calafat AM, Wang S, et al: Bisphenol A exposure and symptoms of anxiety and depression among inner city children at 10 – 12 years of age. *Environ Res* 2016; 151: 195-202.

41. Kasper N, Peterson KE, Zhang Z, Ferguson KK, S?nchez BN, Cantoral A, et al: Association of Bisphenol A Exposure with Breastfeeding and Perceived Insufficient Milk Supply in Mexican Women. *Matern Child Health J.* 2016; 20(8): 1713–9.
42. Deb P, Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SA, Pandita TK, et al: Endocrine disrupting chemical, bisphenol-A, induces breast cancer associated gene HOXB9 expression in vitro and in vivo. *Gene* 2016; 590(2): 234–43.
43. Sowlat MH, Lotfi S, Yunesian M: The association between bisphenol A exposure and type-2 diabetes : a world systematic review. *Environ Sci Pollut Res* 2016; 23(21): 21125-40.
44. Hu Y, Zhang L, Wu X, Hou L, Li Z, Ju J, et al: Bisphenol A, an environmental estrogen-like toxic chemical, induces cardiac fibrosis by activating the ERK1/2 pathway. *Toxicol Lett* 2016; 250–251: 1–9.
45. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=12111, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12111> Dostop: 30.10.2016.
46. Program NT. Chemical Information Profile for Bisphenol AF. 2008; (1478): https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bisphenolaf_093008_508.pdf Dostop: 30.10.2016.
47. <http://www.trc-canada.com/product-detail/?CatNum=B519555>. Dostop: 18.11.2016.
48. Ye X, Wong L, Kramer J, Zhou X, Jia T, Calafat AM: Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000 – 2014. *Environ. Sci. Technol.* 2015; 49(19): 11834-39.
49. Liao C, Kannan K: A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food Additives & Contaminants Part A* 2014; 49 (September 2016).
50. Huang G, Tian X, Fang X, Ji F: Waterborne exposure to bisphenol F causes thyroid endocrine disruption in zebra fi sh larvae. *Chemosphere* 2016; 147: 188–94.
51. Ruan T, Liang D, Song S, Song M, Wang H, Jiang G: Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic

- contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere* 2015; 124: 150–5.
52. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K: Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences* 2005; 84(2): 249–59.
 53. Castro B, Sánchez P, Torres JM, Ortega E: Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5 α -reductase expression and dopamine – serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats. *Environ Res* 2015; 142: 281–7.
 54. Tang T, Yang Y, Chen Y, Tang W, Wang F: Thyroid Disruption in Zebrafish Larvae by Short-Term Exposure to Bisphenol AF. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, 12, 13069–84.
 55. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=73864, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864> Dostop: 30.10.2016.
 56. Yang Y, Yin J, Yang Y, Zhou N, Zhang J, Shao B, et al: Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012; 901: 93–7.
 57. Song S, Ruan T, Wang T, Liu R, Jiang G: Distribution and Preliminary Exposure Assessment of Bisphenol AF (BPAF) in Various Environmental Matrices around a Manufacturing Plant in China. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 13136-43.
 58. Lee S, Kyeong Y, Shin KT, Kim S: Neurotoxic Effects of Bisphenol AF on Calcium-Induced ROS and MAPKs. *Neurotox Res* 2013; 23: 249–59.
 59. Ma A, Micha J: Comparative study of the effect of BPA and its selected analogues on hemoglobin oxidation, morphological alterations and hemolytic changes in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 2015; 77: 62–70.
 60. Li M, Han X, Gao W, Chen F, Shao B: Bisphenol AF stimulates transcription and secretion of C-X-C chemokine ligand 12 to promote proliferation of cultured T47D breast cancer cells. *Toxicology* 2015; 338: 30–6.
 61. Ramirez T, Buechse A, Dammann M, Melching-kollmuß S, Woitkowiak C,

- Ravenzwaay B Van: Effect of estrogenic binary mixtures in the yeast estrogen screen (YES). *Regul Toxicol Pharmacol* 2014; 70(1): 286–96.
62. Scientific Committee on Health and Environmental Risks SCHER Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR Scientific Committee on Consumer Safety SCCS Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. 2011;(November):1–50: http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf Dostop:18.11.2016.
 63. Evans RM, Scholze M, Kortenkamp A: Additive Mixture Effects of Estrogenic Chemicals in Human Cell-Based Assays Can Be Influenced by Inclusion of Chemicals with Differing Effect Profiles. 2012, *PloS ONE* 7(8): e43606.
 64. Christen V, Crettaz P, Oberli-schrämmli A, Fent K: Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: Validity of concentration addition. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 259(2): 169–76.
 65. Dias ACV, Gomes FW, Bila DM, Sant’Anna GL, Dezotti M: Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015; 120: 41-7.
 66. Routledge EJ, Sumpter JP: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1996; 15(3): 241–8.
 67. Podgorelec M: Ugotavljanje prisotnosti estrogeno aktivnih snovi v odpadnih vodah z biotestom, Magistrsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani; Biotehniška fakulteta, 2010: 38, 51.
 68. Bistan M, Podgorelec M: Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technol. Biotechnol.* 2012; 50(4): 427–33.
 69. Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, et al: Structure - Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; 14: 280–94.

70. Gramec D, Mašić LP, Fic A, Žeruga B: Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES / YAS assay. *Chemosphere* 2014; 112: 362–9.
71. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6623, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623> Dostop: 30.10.2016.
72. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5757, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757> Dostop: 30.10.2016.
73. Bermudez DS, Gray LE, Wilson VS: Modeling the Interaction of Binary and Ternary Mixtures of Estradiol with Bisphenol A and Bisphenol AF in an In Vitro Estrogen-Mediated Transcriptional Activation Assay (T47D-KBluc). *Toxicological Sciences* 2010; 116(2): 477–87.
74. Andra SS, Charisiadis P, Arora M, Vliet-ostaptchouk JV Van, Makris KC: Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int* 2015; 85: 352–79.
75. Lunar L, Rubio S: Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Anal Chim Acta* 2016; 908: 22–53.
76. Angubua S, Rumbeiha WK: Bisphenol A and food safety: Lessons from developed to developing countries. *Food Chem Toxicol* 2016; 92: 58–63.
77. Zhang Y, Cheng M, Wu L, Zhang G, Wang Z: Bisphenol A induces spermatocyte apoptosis in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Aquat Toxicol* 2016; 179: 18–26.
78. Liao C, Liu F, Guo Y, Moon H, Nakata H, Wu Q, et al: Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 9138-45.
79. Sudji J, Curi N: Estimation of in vivo and in vitro exposure to bisphenol A as food contaminant. *Food and Chemical Toxicology* 2015; 83: 268–74.
80. Pivnenko K, Pedersen GA, Eriksson E, Astrup TF: Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manag* 2015; 44: 39–47.

81. Gallo P, Di I, Pisciotano M, Esposito F, Fasano E, Scognamiglio G, et al: Determination of BPA , BPB , BPF , BADGE and BFDGE in canned energy drinks by molecularly imprinted polymer cleaning up and UPLC with fluorescence detection. *Food Chem* 2017; 220: 406–12.
82. Heath D, Heath E: Determination of Bisphenols and Related Compounds in Honey and Their Migration from Selected Food Contact Materials. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 8866-75.
83. Yu X, Xue J, Yao H, Wu Q, Venkatesan AK, Halden RU, et al: Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U. S. EPA targeted national sewage sludge survey. *J Hazard Mater* 2015; 299: 733–9.
84. Hope E, Reed DR, Moilanen LH. Potential confounders of bisphenol-a analysis in dental materials. *Dent Mater* 2016; 32(8): 961–7.
85. Shekhar S, Sood S, Showkat S, Lite C, Chandrasekhar A, Vairamani M, et al: Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *Gen Comp Endocrinol* 2017; 241: 100-7.
86. Gao C, Liu L, Ma W, Zhu N, Jiang L: Bisphenol A in Urine of Chinese Young Adults: Concentrations and Sources of Exposure. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2016; 96(2): 162–7.
87. Park J, Hwang M, Ko A, Jeong D, Lee J, Moon G, et al: Risk assessment based on urinary bisphenol A levels in the general Korean population. *Environ Res* 2016; 150: 606–15.
88. Hines EP, Mendola P, Ehrenstein OS Von, Ye X, Calafat AM, Fenton SE: Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. *Reprod Toxicol* 2015; 54: 120–8.

7 PRILOGE

Priloga A: Koncentracija bisfenola A v okolju

vir izpostavitve	enote	C (BPA)	literatura
sediment	ng/g	0,37-13370	(7, 9, 74, 75)
voda iz pipe	ng/L	<0,002-23500	(9, 25, 49, 76)
pitna voda	ng/L	do 128	(74, 75)
voda iz grelnika za vodo	µg/L	0,11	(18)
voda iz filtra za vodo	µg/L	0,04	(18)
reke	µg/L	0,0005-370	(7, 9, 25, 74, 76, 77)
prah	ng/g	0,63-39100	(7, 15, 18, 75, 78)
zrak	pg/m ³	200-17400	(9, 18, 25)
maščobe in olja	ng/g	1,9	(7)
ribe in morska hrana	ng/g	0,327-42,1	(7, 49)
sadje	ng/g	<0,01-132	(7, 49)
zelenjava	ng/g	0,22-59,6	(7, 49)
hrana v pločevinkah	ng/g	do 1858	(7, 49)
termični papir	µg/g	0,003-17600	(7, 80)
energijske pijače	µg/L	0,5-3,3	(81)
brezalkoholne pijače	ng/L	do 607	(7)
med	ng/g	do 107	(82)
zemlja	ng/g	0,35-325	(9)
blato iz odpadnih vod	ng/g	4-100000	(7, 9, 25, 74, 75, 83)
žitarice	ng/g	0,38-130	(7, 49)
meso	ng/g	0,1-7,08	(7, 49)
jajca	ng/g	<0,01-10,5	(49)
mlečni izdelki	ng/g	<0,01- 10,8	(7, 49)
sredstva za osebno nego	ng/g	0,51-88,3	(7, 18, 75)
Bis-GMA	ng/g	7,2	(84)

Priloga B: Koncentracija BPA v telesnih tekočinah

telesna tekočina	enote	C (BPA)	literatura
serum nosečnic	µg/L	0,25-52	(32, 85)
urin nosečnic	µg/L	0,52-13,9	(3, 32)
urin odraslega	µg/L	0,19-149	(4, 8, 14, 22, 30, 74, 75, 86, 87)
serum odraslega	µg/L	do 1,49	(14, 75)
lasje	pg/mg	13,1-192,8	(33)
placenta	ng/g	5,7-273,9	(9, 36, 74, 75)
materino mleko	µg/kg	<0,010-3,29	(31, 74, 75, 88)
amnjska tekočina	µg/L	0,36-8,3	(9, 14, 85)
popkovnična kri	ng/g	0,14-9,2	(9)
jetra zarodkov	ng/g	1,3-50,5	(9)
urin dojenčkov, nedonošenčkov	µg/L	2,6-30,3	(14)
možgani	ng/g	do 2,36	(9)
jetra	ng/g	0,9-2,77	(9)
maščobno tkivo	ng/g	1,12-12,28	(9, 74, 75)
slina (cucelj po 24 urnem kontaktu)	µg/L	0,11-14	(15)

Priloga C: Koncentracija BPF v okolju

vir izpostavitve	enote	C (BPF)	literatura
sediment	ng/g	do 9650	(7, 50)
voda	ng/L	do 277	(7, 50)
reke	ng/L	2850	(7)
prah	ng/g	0,1-110000	(7, 22, 50, 78)
maščobe in olja	ng/g	0,26	(7)
ribe in morska hrana	ng/g	do 11,8	(7, 49)
sadje	ng/g	0,03	(7)
zelenjava	ng/g	0,03-1	(7)
brezalkoholne pijače	µg/L	0,218	(7)
termični papir	µg/g	<4	(7, 80)
energijske pijače	µg/L	0,5-1,3	(81)
med	ng/g	do 31,6	(82)
blato iz odpadnih vod	ng/g	do 249	(7, 50, 83)
žitarice	ng/g	do 1,34	(7, 49)
meso	ng/g	0,03-4,45	(7, 49)
jajca	ng/g	do 0,53	(7, 49)
mlečni izdelki	ng/g	do 2,37	(7, 49)
gorčica	µg/g	5-10	(7)
sredstva za osebno nego	ng/g	do 0,99	(7)

Priloga D: Koncentracija BPAF v okolju

vir izpostavitve	enote	C (BPAF)	literatura
sediment	ng/g	0,18-2010	(7, 54, 57)
reke	µg/L	0,0009-15,3	(7, 57)
prah	ng/g	0,001-739	(7, 54, 57, 78)
maščobe in olja	ng/g	<0,01	(7)
ribe in morska hrana	ng/g	do 0,759	(7, 49)
sadje	ng/g	do 0,023	(7, 49)
zelenjava	ng/g	do 0,505	(7, 49)
med	ng/g	do 53,5	(82)
zemlja	ng/g	0,35-331	(7, 54, 57)
blato iz odpadnih vod	ng/g	<72,2	(7, 83)
žitarice	ng/g	<0,01-0,016	(7, 49)
meso	ng/g	do 0,097	(7, 49)
jajca	ng/g	<0,01-0,117	(7, 49)
mlečni izdelki	ng/g	<0,01	(7, 49)
sredstva za osebno nego	ng/g	0,07-0,21	(7)