

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA SLABE

**VREDNOTENJE METABOLIZMA, ENDOKRINIH UČINKOV IN  
REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI IZBRANIH DERIVATOV BENZOFENONA  
*IN SILICO***

***IN SILICO* EVALUATION OF METABOLISM, ENDOCRINE EFFECTS AND  
REPRODUCTIVE TOXICITY OF SELECTED BENZOPHENONE DERIVATIVES**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

#### ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. za strokovno pomoč in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem bližnjim, ki so verjeli vame, za vse spodbudne besede v času študija.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Tanja Slabe

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | UVOD.....   | 1  |
| 1.1   | KOZMETIČNI IZDELKI ZA ZAŠČITO PRED SONCEM.....                      | 1  |
| 1.2   | DERIVATI BENZOFENONA KOT UV FILTRI.....                             | 3  |
| 1.2.1 | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI DERIVATOV BENZOFENONA..                | 4  |
| 1.2.2 | ABSORPCIJA DERIVATOV BENZOFENONA .....                              | 4  |
| 1.2.3 | IZPOSTAVLJENOST DERIVATOM BENZOFENONA .....                         | 5  |
| 1.2.4 | TOKSIČNI UČINKI DERIVATOV BENZOFENONA.....                          | 6  |
| 1.3   | ENDOKRINI SISTEM .....  | 7  |
| 1.3.1 | RECEPTORJI.....   | 7  |
| 1.3.2 | HORMONSKI MOTILCI .....   | 9  |
| 1.4   | REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST.....                                       | 9  |
| 1.5   | IN SILICO METODE.....   | 10 |
| 1.5.1 | (Q)SAR IN EKSPERTNI SISTEMI .....                                   | 11 |
| 1.5.2 | <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA.....                     | 12 |
| 1.5.3 | <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE ENDOKRINIH UČINKOV.....              | 12 |
| 1.5.4 | <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI ...        | 13 |
| 2     | NAČRT ZA DELO.....  | 14 |
| 3     | METODE IN MATERIALI .....   | 15 |
| 3.1   | IZBRANI DERIVATI BENZOFENONA.....                                   | 15 |
| 3.2   | NEGATIVNA IN POZITIVNA KONTROLA .....                               | 16 |
| 3.3   | UPORABLJENI RAČUNALNIŠKI PROGRAMI IN SPECIFIKACIJA NASTAVITEV ..... | 17 |
| 3.3.1 | PROGRAM ZA NAPOVED METABOLIZMA .....                                | 17 |
| 3.3.2 | PROGRAMA ZA NAPOVED ENDOKRINIH UČINKOV.....                         | 18 |
| 3.3.3 | PROGRAMI ZA NAPOVED REPRUDUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....                  | 20 |
| 4     | REZULTATI IN RAZPRAVA .....   | 23 |
| 4.1   | METABOLIZEM IZBRANIH DERIVATOV BENZOFENONA .....                    | 23 |
| 4.1.1 | BENZOFENON-2 .....  | 23 |
| 4.1.2 | BENZOFENON-3 .....  | 24 |
| 4.1.3 | BENZOFENON-4 .....  | 34 |
| 4.1.4 | BENZOFENON-6 .....  | 44 |
| 4.1.5 | RAZPRAVA.....   | 49 |
| 4.2   | ZBRANI METABOLITI .....   | 52 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.3   | NAPOVED ENDOKRINEGA DELOVANJA .....                          | 56 |
| 4.3.1 | REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM VEGA QSAR.....            | 56 |
| 4.3.2 | REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM ENDOCRINE DISRUPTOME..... | 58 |
| 4.3.3 | RAZPRAVA.....  | 61 |
| 4.4   | NAPOVED REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....                       | 67 |
| 4.4.1 | REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM DEREK NEXUS.....          | 67 |
| 4.4.2 | REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM VEGA QSAR.....            | 67 |
| 4.4.3 | REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM TEST.....                 | 68 |
| 4.4.4 | RAZPRAVA.....  | 70 |
| 5     | SKLEP.....   | 73 |
| 6     | VIRI IN LITERATURA.....                                      | 74 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|  |    |
|--|----|
| <b>Preglednica I:</b> Izbrani derivati benzofenona, ki so dovoljeni v različnih državah, ter njihova maksimalna koncentracija .....  | 3  |
| <b>Preglednica II:</b> Receptorji, ki jih bomo uporabili pri našem delu, njihovi ligandi ter njihova funkcija .....  | 8  |
| <b>Preglednica III:</b> Izbrani derivati benzofenona, njihova struktturna formula, INN ter IUPAC ime, CAS številka in koda SMILES.....   | 15 |
| <b>Preglednica IV:</b> Izbrani kontroli, njuna struktturna formula, CAS številka in koda SMILES.   |    |
| .....  | 16 |
| <b>Preglednica V:</b> Zbrani metaboliti izbranih derivatov benzofenona za nadaljnjo raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti .....  | 52 |
| <b>Preglednica VI:</b> Rezultati napovedi aktivnosti na ER s programom VEGA QSAR za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona .....                                       | 56 |
| <b>Preglednica VII:</b> Rezultati napovedi aktivnosti na ER s programom VEGA QSAR za izbrane metabolite derivatov benzofenona.....   | 57 |
| <b>Preglednica VIII:</b> Rezultati napovedi verjetnosti vezave na hormonske receptorje s programom Endocrine Disruptome za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona..... | 59 |
| <b>Preglednica IX:</b> Rezultati napovedi verjetnosti vezave na hormonske receptorje s programom Endocrine Disruptome za izbrane metabolite derivatov benzofenona .....                          | 60 |
| <b>Preglednica X:</b> Rezultati napovedi reproduktivne toksičnosti s programi Derek Nexus, VEGA QSAR in TEST za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona.                |    |
| .....  | 69 |
| <b>Preglednica XI:</b> Rezultati napovedi reproduktivne toksičnosti s programi Derek Nexus, VEGA QSAR in TEST za izbrane metabolite derivatov benzofenona .....                                  | 69 |

## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| <b>Slika 1:</b> Napovedna shema metabolizma BF-2 .....                                    | 23 |
| <b>Slika 2:</b> Napovedna shema metabolizma spojine A1 .....                              | 24 |
| <b>Slika 3:</b> Napovedna shema metabolizma BF-3 .....                                    | 25 |
| <b>Slika 4:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B1 .....                              | 26 |
| <b>Slika 5:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B2 .....                              | 27 |
| <b>Slika 6:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B2.5. ....                            | 28 |
| <b>Slika 7:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B3 .....                              | 29 |
| <b>Slika 8:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B3.5. ....                            | 30 |
| <b>Slika 9:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B3.6. ....                            | 31 |
| <b>Slika 10:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B4 .....                             | 32 |
| <b>Slika 11:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B4.5. ....                           | 33 |
| <b>Slika 12:</b> Napovedna shema metabolizma spojine B4.6. ....                           | 34 |
| <b>Slika 13:</b> Napovedna shema metabolizma BF-4 .....                                   | 35 |
| <b>Slika 14:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C1 .....                             | 36 |
| <b>Slika 15:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C2 .....                             | 37 |
| <b>Slika 16:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C2.5 .....                           | 38 |
| <b>Slika 17:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C3 .....                             | 39 |
| <b>Slika 18:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C3.5 .....                           | 40 |
| <b>Slika 19:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C3.6 .....                           | 41 |
| <b>Slika 20:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C4 .....                             | 42 |
| <b>Slika 21:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C4.5 .....                           | 43 |
| <b>Slika 22:</b> Napovedna shema metabolizma spojine C4.6 .....                           | 44 |
| <b>Slika 23:</b> Napovedna shema metabolizma BF-6 .....                                   | 45 |
| <b>Slika 24:</b> Napovedna shema metabolizma spojine D1 .....                             | 46 |
| <b>Slika 25:</b> Napovedna shema metabolizma spojine D2.....                              | 47 |
| <b>Slika 26:</b> Napovedna shema metabolizma spojine D2.8.....                            | 48 |
| <b>Slika 27:</b> BF-3 in metaboliti, ki so jih zaznali v in vitro/in vivo raziskavah..... | 50 |
| <b>Slika 28:</b> Metaboliti BF-3, ki kažejo najmočnejše delovanje na ER. ....             | 62 |
| <b>Slika 29:</b> Struktura formula 17 $\beta$ -estradiola (E2).....                       | 63 |
| <b>Slika 30:</b> Struktura formula testosterona.....                                      | 64 |
| <b>Slika 31:</b> Struktura formula kortizola.....   | 66 |

## **POVZETEK**

Z naraščanjem ozaveščenosti o nevarnostih, ki jih prinaša pretirano izpostavljanje UV sevanju, narašča tudi uporaba kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem. Aktivne sestavine teh izdelkov so UV filtri, ki jih najdemo tudi v drugih izdelkih, saj se s tem podaljša njihov rok uporabnosti. Zaradi vse večje uporabe ne čudi dejstvo, da so jih našli tudi v odpadnih vodah, rekah in podtalnicah. Vprašanje, ki se poraja, je ali so te spojine res varne za zdravje ljudi. Namen naše magistrske naloge je bil, da z *in silico* metodami preučimo endokrine učinke in reproduktivno toksičnost izbranih derivatov benzofenona in njihovih metabolitov ter dobljene rezultate primerjamo z že obstoječimi študijami *in vitro/in vivo*. Dva izmed izbranih derivatov benzofenona, benzofenon-3 in benzofenon-4, sta kot UV filtra dovoljena tako v Evropski uniji kot na ameriškem trgu. Prvega v izdelkih za zaščito pred soncem najdemo predvsem na ameriškem trgu, medtem ko se pri nas v izdelkih bolj pogosto pojavi benzofenon-4, ki se večinoma uporablja v nižjih koncentracijah in le kot zaščita drugih sestavin izdelka pred svetlobo. V raziskovanje smo vključili še benzofenon-2 in benzofenon-6, ki v Evropski uniji sicer nista dovoljena kot UV filtra in se redkeje pojavljata v izdelkih. Preučevanja smo se lotili s pomočjo *in silico* metodologije. Pri preučevanju metabolizma s programom Meteor Nexus smo dobili rezultate, ki so bili dokaj primerljivi z rezultati obstoječih raziskav, vendar pa se je še vedno pojavljalo nekaj neujemanja. Nato smo izbrane derivate benzofenona in njihove metabolite preučili s pomočjo računalniških programov za preučevanje endokrinskih učinkov (Vega QSAR, Endocrine Disruptome) ter reproduktivne toksičnosti (Derek Nexus, Vega QSAR, TEST). Z njimi smo določili, da se benzofenon-2 in benzofenon-3 z veliko verjetnostjo vežeta kot agonista na estrogenski receptor ter kot antagonista na androgenSKI receptor. Benzofenon-4 izkazuje šibkejše delovanje na endokrini sistem, medtem ko benzofenon-6 izkazuje neaktivnost na vse receptorje. Opazili smo, da so metaboliti lahko celo bolj toksični od izhodnih spojin. Primer je benzofenon-3, katerega metaboliti lahko izkazujejo celo močnejšo vezavo na estrogenSKI receptor. Reproduktivno toksičnost izkazujejo vsi izbrani derivati benzofenona ter nekateri njihovi metaboliti. Za benzofenon-2, benzofenon-3 in določene metabolite to potrjujejo tudi obstoječe študije, medtem ko za druge le-teh primanjkuje. *In silico* metode so zaenkrat še premalo zanesljive, da bi lahko pri preučevanju metabolizma in toksičnih učinkov derivatov benzofenona, nadomestile validirane *in vitro/in vivo* metode. Potrebne so nadaljnje nadgradnje podatkovnih baz in zmogljivosti modelov ter strokovna presoja dobljenih rezultatov.

**KLJUČNE BESEDE:** derivati benzofenona, in silico metode, metabolizem, endokrina toksičnost, reproduktivna toksičnost

## ABSTRACT

With increasing awareness of the dangers caused by excessive exposure to UV radiation, the use of sunscreens has also increased. Active ingredients of these products are UV filters that are also found in other products, as this prolongs their shelf life. Due to its growing use, it is not surprising that they were found in wastewaters, rivers and groundwater. The question is whether these compounds pose any risk to health. The purpose of our work was to study the endocrine effects and the reproductive toxicity of the selected benzophenone derivatives and their metabolites using *in silico* methodology and to compare the results with the already existing *in vitro/in vivo* studies. Two of the selected benzophenone derivatives, benzophenone-3 and benzophenone-4, are permitted in the European Union as well as the American market as UV filters. Benzophenone-3 is found in sunscreens present mainly on the American market while in our market benzophenone-4 can be found more often, which is also used at lower concentrations as protection of other components from light. We have also evaluated benzophenone-2 and benzophenone-6, which are not permitted as UV filters in European Union and are rarely found in products. We used *in silico* methodology. The results for the metabolism of selected benzophenone derivatives predicted with Meteor Nexus were similar to those obtained by *in vitro/in vivo* studies, but there is still some discrepancy. In the next step, we evaluated the selected derivatives of benzophenone and their metabolites by different types of software for potential effects on endocrine system (Vega QSAR, Endocrine Disruptome) and for reproductive toxicity (Derek Nexus, Vega QSAR, TEST). We established that benzophenone-2 and benzophenone-3 bind to the estrogen receptor as an agonist and to the androgen receptor as an antagonist with high probability. Benzophenone-4 exhibits weaker activity on the endocrine system, while benzophenone-6 is devoid of any binding capacity to all of the receptors. We have predicted that metabolites can sometimes be even more toxic than their parent compounds in terms of endocrine activity. For example, benzophenone-3 metabolites have shown stronger binding affinity to the estrogen receptor than the parent compound. All selected benzophenone derivatives and some of their metabolites exhibit reproductive toxicity. This is also in line with the results of existing *in vitro/in vivo* studies in cases of benzophenone-2, benzophenone-3 and certain metabolites, while there is a lack of studies for others. *In silico* methods are not yet sufficiently reliable to replace validate *in vitro/in vivo* methodology in the study of metabolism and toxic effects of benzophenone derivatives. Further upgrading

of databases and better performance of models is needed, as well as an expert judgement of obtained results.

**KEYWORDS:** benzophenone derivatives, in silico methodology, metabolism, endocrine toxicity, reproductive toxicity

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

|  |  |
|--|--|
| 17 $\beta$ -HSD                        | 17 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza  |
| ADH                                    | alkohol-dehidrogenaza  |
| AR                                     | androgenski receptor   |
| BF-2                                   | benzofenon-2   |
| BF-3                                   | benzofenon-3   |
| BF-4                                   | benzofenon-4   |
| BF-6                                   | benzofenon-6   |
| BPA                                    | bisfenol A   |
| CYP450                                 | citokrom P450  |
| E2                                     | 17 $\beta$ -estradiol  |
| EC50                                   | koncentracija snovi, ki povzroči 50 % maksimalnega odziva  |
| ER ( $\alpha$ , $\beta$ )              | estrogenski receptor alfa, beta  |
| ES                                     | ekspertni sistem   |
| EU                                     | Evropska unija   |
| FDA                                    | Food and Drug Administration (Agencija za hrano in zdravila)   |
| GR                                     | glukokortikoidni receptor  |
| HM                                     | hormonski motilec  |
| IC50                                   | koncentracija snovi, ki povzroči 50 % zaviranje odziva   |
| IGF1                                   | insulin-like growth factor 1 (inzulinu podoben rastni faktor 1)  |
| LXR ( $\alpha$ , $\beta$ )             | jetrni X receptor alfa, beta   |
| NADPH                                  | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  |
| PAINS                                  | Pan Assay Interference Compounds   |
| PPAR ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) | s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor alfa, beta, gama   |
| PVC                                    | polivinilklorid  |
| QSAR                                   | (Quantitative) Structure – Activity Relationship ((kvantitativno) razmerje med strukturo in delovanjem)                                  |
| REACH                                  | Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals<br>(registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij) |
| REC20                                  | koncentracija snovi, ki povzroči 20 % maksimalnega odziva  |
| RXR $\alpha$                           | retinoidni X receptor alfa   |
| SMILES                                 | Simplified Molecular Input Line Entry Specification  |
| SPF                                    | Sun Protection Factor (faktor zaščite proti soncu)   |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| SULT                      | sulfotransferaza   |
| T3                        | trijodtironin  |
| T4                        | tiroksin   |
| TEST                      | Toxicity Estimation Software Tool  |
| TPO                       | tiroidna peroksidaza   |
| TR ( $\alpha$ , $\beta$ ) | tiroidni receptor alfa, beta   |
| TSH                       | tirotropin   |
| UGT                       | uridindifosfat – glukuronoziltransferaza   |
| US EPA                    | United States Environmental Protection Agency (Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike) |
| UV                        | ultravijoličen   |
| ZDA                       | Združene države Amerike  |

# 1 UVOD

## 1.1 KOZMETIČNI IZDELKI ZA ZAŠČITO PRED SONCEM

Sončna svetloba je glavni vir energije na našem planetu. Ključna je pri procesu fotosinteze, nastajanju toplote in vida ter tako posledično za preživetje vseh živih bitij. Pa vendar prav ultravijolična svetloba (UV svetloba) velja za eno največjih nevarnosti za človeško kožo (1). Razdelimo jo lahko v tri skupine. UVC svetloba ima najkrajšo valovno dolžino (100-280 nm) in zaradi popolne absorpcije v ozonskem plašču sploh ne doseže zemeljskega površja. Sončna svetloba v naši okolini je pretežno sestavljena iz UVA svetlobe (90-95 %) in UVB svetlobe. UVA svetloba je tista z najdaljšo valovno dolžino (315-400 nm), in ki v koži prodre najgloblje (2). Vsaka komponenta UV sevanja lahko povzroči različne škodljive učinke na tkiva, celice in molekule, zato je zelo pomembno, da kožo zaščitimo. Kratka izpostavljenost soncu (5-10 minut) ima sicer res terapevtske učinke, saj poveča proizvodnjo vitamina D in s tem olajša absorpcijo kalcija, ki je pomemben za zdrave kosti, pa vendar daljše izpostavljanje soncu lahko povzroči hude poškodbe kože, opeklne, staranje kože in kožnega raka (3). Predvsem UVB žarki, občasna intenzivna izpostavljenost soncu ter sončne opeklne so tisti dejavniki, ki prispevajo k nastanku melanoma (4). Med belo raso je možnost za razvoj te vrste raka kar 2,4 % (5). Število odraslih, ki se zdravijo za kožnim rakom, pa iz leta v leto narašča. V Združenih državah Amerike (ZDA) se je med leti 2002 in 2006 za kožnim rakom zdravilo 3,4 milijonov ljudi, medtem ko se je v naslednjih 5 letih število bolnikov povečalo za kar 1,5 milijona (6). Negativne učinke sončnih žarkov lahko preprečimo ali zmanjšamo z upoštevanjem zaščitnih ukrepov, med katere sodi tudi uporaba kozmetičnih izdelkov za zaščito pred sončnimi žarki. Aktivne učinkovine v teh pripravkih so UV filtri, ki varujejo kožo pred UV sevanjem (7). Glede na kemično sestavo jih lahko delimo na organske in anorganske. Organski UV filtri so večinoma aromatske spojine, ki absorbirajo UV svetlobo, medtem ko so anorganski UV filtri minerali, ki lahko UV svetlobo absorbirajo, razpršijo ali odbijejo. Obe skupini imata tako svoje prednosti kot tudi svoje slabosti. Anorganski UV filtri povzročajo manj alergijskih reakcij in so bolj stabilni, vendar pa niso tako primerni za uporabo v kozmetičnih izdelkih, saj se slabše vpijajo in lahko na koži pustijo belo sled (8). Kljub vsem pozitivnim učinkom UV filtrov pa se v zadnjem času vse več govori tudi o njihovi morebitni nevarnosti za okolje in zdravje ljudi. Zaradi vse večje ozaveščenosti o negativnih vidikih sončenja se je v zadnjih letih poraba kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem močno povečala. Prav tako pa se UV filtri vse več dodajajo tudi plastičnim masam,

barvam, lepilom in gumam kot zaščita sestavin pred svetlobo. Vse to je privelo do tega, da vse več UV filtrov pristane v odpadnih vodah in zaradi neučinkovitih čistilnih naprav posledično tudi v rekah, podtalnicah ali celo pitni vodi (7).

V Evropski uniji (EU) je zakonodaja kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem usklajena in regulirana kot kozmetika s strani Evropskega združenja kozmetične industrije (Cosmetics Europe), medtem ko se v ZDA tovrstni izdelki smatrajo kot zdravilo brez recepta in jih zato regulira Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration (FDA)). Prav zaradi tega UV filtri, prisotni na trgu ZDA, potrebujejo veliko več varnostnih testiranj in kliničnih študij, kar je vodilo do slabše razvitosti ameriškega trga kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem v primerjavi z evropskim (9). Medtem ko ameriška FDA dovoljuje le 16 UV filtrov za uporabo v izdelkih za zaščito pred soncem, pa znanstveni odbor EU trenutno dovoljuje kar 27 spojin (10, 11).

Faktor zaščite proti soncu (SPF) nam pove sposobnost zaščite kozmetičnega izdelka pred rdečico, ki nastane kot posledica izpostavljanja UVB žarkom. Izračunamo ga s pomočjo minimalne količine UV žarkov, ki povzroči nastanek rdečine (*minimum erythema dose* (MED)) na koži zaščiteni s sončno kremo in na tisti brez zaščite.

$$SPF = \frac{MED \text{ zaščitena koža}}{MED \text{ nezaščitena koža}}$$

Odstotek filtriranega sevanja naraste iz 0 % pri izdelkih brez UV zaščite na 90 % pri izdelkih s SPF 10, in se poveča le za 3 % med izdelkom s SPF 30 in tistim s SPF 100. Ker tako izdelki z višjo vrednostjo SPF ne nudijo občutno boljše zaščite se v EU lahko označujejo kozmetični izdelki s SPF več kot 50 z oznako SPF 50+, v Avstraliji pa je ta lestvica celo omejena z oznako SPF 30 (9).

## 1.2 DERIVATI BENZOFENONA KOT UV FILTRI

Med najpogosteje uporabljene organske UV filtre spadajo derivati kafre, cimetne ali salicilne kisline, *p*-aminobenzojska kislina in njeni derivati ter derivati benzofenona. Pri našem delu smo se osredotočili na štiri derivate benzofenona. Med najbolj uporabljenimi sta benzofenon-3 (BF-3) in benzofenon-4 (BF-4), ki sta dovoljena tako v EU kot tudi druge po svetu. V EU je sicer nujno, da je na izdelku prisotno opozorilo, da le-ta vsebuje BF-3 (11, 12). Benzofenon-2 (BF-2) in benzofenon-6 (BF-6) pa sta dovoljena samo na Japonskem in v Južni Afriki (3). V preglednici I smo zbrali maksimalne dovoljene koncentracije izbranih derivatov benzofenona v nekaterih državah sveta.

*Preglednica I: Izbrani derivati benzofenona, ki so dovoljeni v različnih državah, ter njihova maksimalna koncentracija.*

| INCI ime                             | IUPAC ime   | Maksimalna koncentracija v kozmetičnih izdelkih   |
|--------------------------------------|---|---|
| benzofenon-3<br>(oksiobenzon)        | (2-hidroksi-4-metoksifenil)fenilmethan                | EU: 6 % in ne več kot 0,5 % za zaščito izdelka<br>ZDA: 6 %<br>Japonska: 5 %<br>Avstralija, Južna Afrika: 10 % |
| benzofenon-4 oz. 5<br>(sulizobenzon) | 5-benzoil-4-hidroksi-2-metoksibenzensulfonska kislina | EU: 5 % (kot kislina)<br>ZDA: 10 %<br>Avstralija, Japonska: 10 %<br>Južna Afrika, Indija: 5 %                 |
| benzofenon-2                         | bis(2,4-dihidroksifenil)metan                         | EU in ZDA: /<br>Japonska in Južna Afrika: 10 %  |
| benzofenon-6                         | bis(2-hidroksi-4-metoksifenil)metan                   | EU in ZDA: /<br>Japonska in Južna Afrika: 10 %  |

### **1.2.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI DERIVATOV BENZOFENONA**

Derivati benzofenona so skupina organskih spojin s sposobnostjo absorpcije UVA in UVB dela spektra svetlobe. Imajo relativno nizko molekulsko maso, saj temeljijo na osnovni strukturi benzofenona, ki vsebuje dva benzenska obroča, prečno povezana s karbonilno skupino. Različni derivati imajo dodane substituente na specifičnih mestih osnovnega benzofenonskega skeleta (13). Večina derivatov benzofenona je pri sobni temperaturi v trdnem stanju, topni pa so v organskih topilih in netopni v vodi (14). Izjema je BF-4 in njegova natrijeva sol (BF-5), ki sta zaradi prisotne sulfonske skupine dobro topna v vodi (7). Derivati benzofenona so planarne molekule, ki so zmožne fotoabsorpcije in resonančne stabilizacije ter s tem zaščite človeške kože in drugih izdelkov pred poškodbami s strani UV sevanja (15). Najbolj pogosto uporabljen derivat benzofenona, BF-3, je fotostabilen, lipofilen in potencialno bioakumulativna spojina, saj se lahko hitro absorbira *per os* ali preko kože (16). Predviden razpolovni čas BF-3 v površinskih vodah v poletnih mesecih je nekaj tednov, medtem ko se v zimskih mesecih lahko poveča celo za 7-9 krat (17).

### **1.2.2 ABSORPCIJA DERIVATOV BENZOFENONA**

V prizadevanju, da bi sredstva za zaščito pred soncem ostala čim dlje na koži, jih proizvajalci poskušajo narediti čim bolj lipofilne, kar pa lahko privede do povečane absorpcije skozi kožo (18). Pomembna je tudi podlaga izdelka, ki lahko vpliva na penetracijo UV filtra. V primeru BF-3 se je izkazalo, da je najboljša penetracija iz vazelina, medtem ko je pri hidrofilnem BF-4 najučinkovitejša iz hidroksietilceluloznega gela. V izogib absorpciji skozi kožo in hkrati sprejemljivosti kozmetičnega proizvoda je za derivate benzofenona idealna oblika emulzija olje v vodi (19). Daltonovo pravilo pravi, da spojine z molekulsko maso nižjo od 500 Da lahko prehajajo kožo in so tako nezaželene v kozmetičnih izdelkih, v to skupino pa spadajo tudi derivati benzofenona (20). Vendar je potrebno pri vrednotenju absorpcije upoštevati površino telesa, pogostost nanašanja pripravkov za zaščito pred soncem, in sicer predvsem poleti, ko jih nanašamo tudi večkrat dnevno več let zapored (21). Študija na 11 prostovoljceih po enkratnem nanosu sončne kreme s 4 % BF-3 po celiem telesu je pokazala, da se z urinom izloči 0,5 % aplicirane količine BF-3. Ameriška raziskava pa je raziskovala vpliv večkratne aplikacije. Pokazalo se je, da večkratna aplikacija povzroči večje izločanje BF-3 v povprečni koncentraciji 3,7 %. Kar je pri tem presenetljivo, je dejstvo, da se je v obeh raziskavah BF-3 izločal iz telesa še do 48 ur oz. 5 dni po zadnji aplikaciji (18, 22).

### **1.2.3 IZPOSTAVLJENOST DERIVATOM BENZOFENONA**

Derivate benzofenona uporabljajo tudi za druge namene in ne samo v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem. V embalaži za živila ščitijo tako embalažo kot tudi hrano pred UV žarki. Uporabljajo se tudi v barvah in lakah ter v izdelkih iz plastične mase, ki se uporabljajo na prostem. Najpogosteje uporabljeni BF-3 so zaznali v kar 96 % vzorcev urina v ZDA, ter v 13 % vzorcev mleka doječih mater v Švici. V dansi raziskavi so zaznali prisotnost BF-3 v vseh 129 vzorcih urina otrok, in to v zimskih mesecih, kar priča o tem, da obstaja tudi drug vir slednjega in ne le izdelki za zaščito pred soncem (23). Med preiskovanimi UV filtri so v rekah najpogosteje prisotni prav derivati benzofenona. Zaradi največje polarnosti in topnosti v vodi so pričakovano najvišjo vrednost zaznali pri BF-4 (0,3 mg/l). V nižjih koncentracijah so številne zaznali tudi v jezerih in morjih, predvsem BF-3 in BF-4 pa tudi v pitni vodi in podtalnici (do koncentracije 450 ng/l). Izjema je manj uporabljeni BF-6, ki so ga našli le v usedlinah in tleh (7). Da je razširjenost derivatov benzofenona resnično velika, kaže tudi dejstvo, da so jih leta 2014 zaznali celo na Arktiki (24). UV filtri pa ne povzročajo škodljivih učinkov le na ljudi, ampak tudi na okolje. Študija iz leta 2008 je ugotovila, da s spodbujanjem virusnih okužb igrajo pomembno vlogo pri beljenju koral tudi, če so prisotni v zelo nizkih koncentracijah. Ocenjuje se, da se na območje koralnih grebenov letno izloči od štiri do šest tisoč ton kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem, kar pa z leti le še narašča (25). To je bil tudi razlog, da so leta 2017 na Havajih prepovedali uporabo BF-3 v vseh izdelkih za potrošnike, predvsem če je predvidena uporaba blizu plaž ali pa se vsaj zahteva opozorila na embalaži, da je kemikalija škodljiva za korale in vodno okolje. UV filtri v okolje pridejo s spiranjem s kože ob uporabi izdelkov za osebo nego in preko odpadnih voda. V Švici so na primer ocenili, da se v čistilne naprave izloči povprečno 69 g BF-3/deset tisoč ljudi/dan (26). Med pregledom izdelkov na slovenskem tržišču smo našli kar nekaj takšnih, ki vsebujejo derivate benzofenona. V izdelkih je bil najpogosteje prisoten BF-4, ki smo ga našli v produktih za nego telesa tudi nekaterih znanih proizvajalcev, kot na primer gel za prhanje Palmolive Gourmet Strawberry Touch, tekoče milo FA Hygiene & Frische in lak za lase Taft Power Cashmere Touch. V teh izdelkih se sicer ne uporablja kot UV filter za zaščito pred soncem, ampak je dodan z razlogom, da se podaljša življenska doba izdelka s tem, da se zmanjša fotodegradacija ostalih sestavin (27). V izdelkih namenjenih za zaščito pred sočnimi žarki smo našli samo BF-3. Na slovenskem tržišču ga vsebujejo le nekatere linije kot na primer Hawaiian Tropic in Olival. Slednja vsebuje izdelke z BF-3 celo za otroke (mleko za sončenje za otroke Olival SPF 30). Za razliko pa na ameriškem trgu opazimo

znatno večjo uporabo BF-3 kot UV filtra kot posledico strožje regulative in s tem manj izbire pri uporabi filtrov, predvsem tistih z UVA zaščito. V bazi kozmetičnih izdelkov Skin Deep ameriške okoljevarstvene organizacije (Environmental Working Group (EWG)) smo našli preko 500 različnih izdelkov za zaščito pred soncem, ki so vsebovali BF-3 ter še skoraj toliko drugih izdelkov, namenjenih osebni negi. Pogosto uporabo tega filtra potrjuje tudi raziskava iz leta 2011, ko so izmed 201 pregledanih izdelkov za zaščito pred soncem na ameriškem trgu našli BF-3 v kar 68 % izdelkov (28). Tudi na ameriškem trgu niso prisotni izdelki za zaščito pred soncem z BF-4 kot UV filtrom, vendar pa se slednji prav tako pogosto nahaja v različnih drugih izdelkih, predvsem v izdelkih na nego las, tekočih milih in gelih za tuširanje. Medtem ko smo na ameriškem trgu našli 18 lakov za nohte, ki so vsebovali BF-2, pa nismo našli nobenega izdelka, ki bi vseboval BF-6 (29).

#### **1.2.4 TOKSIČNI UČINKI DERIVATOV BENZOFENONA**

Dva izmed izbranih derivatov benzofenona (BF-2 in BF-3) sta razvrščena na seznam SIN (Substitute It Now!), ki ga sestavlja kemikalije, ki jih nevladna organizacija ChemSec identificira kot Seznam snovi, ki zbujo veliko zaskrbljenost (Substance of very high concern (SVHC)) na podlagi merit določenih v uredbi EU za registracijo, evalvacijo, avtorizacijo in omejevanje kemikalij (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)) (30). Raziskovalci Danskega centra za endokrine motilce (Center for Hormonforstyrrende Stoffer (CEHOS)) so na podlagi tega seznama izdelali oceno nevarnosti, ki je temeljila na rezultatih študij učinkov derivatov benzofenona na zdravje ljudi, *in vitro/vivo* študij in študij vpliva na okolje. BF-3 so razvrstili kot potencialni hormonski motilec, BF-2 pa kot hormonski motilec (31). Prav tako pa je bil BF-3 uvrščen na seznam Tekoči akcijski načrt Skupnosti (The Community Rolling Action Plan (CoRAP)), ki deluje na podlagi uredbe REACH in združuje seznam snovi, ki so ali bodo ocenjene v prihodnjih letih s strani določene države članice EU (32). V različnih *in vitro* in *in vivo* raziskavah je več derivatov benzofenona izkazalo učinke hormonskih motilcev, in sicer z delovanjem na estrogenske (ER), androgenske (AR), progesteronske (PR) in druge jedrne receptorje. Poleg tega pa je dokumentiran tudi njihov vpliv na povzročanje škodljivih kožnih reakcij, predvsem alergij in fotoalergijskih reakcij. Retrospektivna študija je pokazala, da so v primeru alergij, ki jih povzročajo pripravki za sončenje, pozitivni rezultati epikutanih testov v kar 70,2 % posledica BF-3 (33). Leta 2014 so bili derivati benzofenona izbrani s strani ameriškega Združenja za kontaktni dermatitis (American Contact Dermatitis Society (ACDS)) kot alergen leta, v želji po večji prepoznavnosti teh alergenov in njihovih

učinkov na telo (15). Pri uporabi pripravkov, ki vsebujejo derivate benzofenona, je potrebna posebna pozornost predvsem pri mlajših otrocih, pri katerih sposobnost konjugacije, kot glavne poti izločanja še ni v popolnosti razvita in je posledično izločanje teh snovi počasnejše (18).

### **1.3 ENDOKRINI SISTEM**

Endokrini sistem je eden izmed glavnih sistemov v telesu, ki omogoča, da se notranje ravnovesje ne spremeni kljub nenehno spreminjajočem se okolju. Deluje v sodelovanju z živčnim sistemom, vendar počasneje in trajnejše kot ta. Uravnava različne procese kot so rast kosti, spanje, menstrualni cikel pri ženskah, proliferacija celic in psihosocialno vedenje (34). Sistem nadzorovanja telesnih funkcij je kompleksen in sestavljen iz številnih medsebojno povezanih sistemov. Glavni del endokrinega sistema so žleze z notranjim izločanjem (endokrine žleze) in hormoni, ki jih te žleze izločajo. Hormoni so kemični signali, ki potujejo po krvi in v oddaljenih tkivih sprožijo ali zavrejo fiziološko aktivnost. Glede na kemijsko strukturo jih lahko razdelimo na proteine, steroide in derivate aminokislin (35).

#### **1.3.1 RECEPTORJI**

Prvi korak, da lahko hormoni vplivajo na tkiva, je vezava na specifične receptorje v ciljani celici. Te lahko najdemo na celični membrani, v citoplazmi ali jedru. So veliki proteini, ki so običajno specifični za en hormon ali skupino hormonov. Njihovo število se spreminja v odvisnosti od intenzivnosti in pogostosti stimulacije s hormoni (36). Receptorje lahko razdelimo v pet skupin. Jedrne receptorje lahko opišemo tudi kot z ligandi regulirane transkripcijske faktorje. Nahajajo se znotraj celice, zato morajo biti njihovi ligandi topni v maščobah, da lahko prečkajo celično membrano. Ostale štiri skupine receptorjev se nahajajo na membrani celice. Mednje štejemo receptorje sklopljene z encimom (s tirozin kinazo), receptorje sklopljene s proteinom G in ionske kanalčke. Številni receptorji obstajajo v več oblikah kot na primer  $\alpha$  in  $\beta$  estrogenski receptorji, ki so običajno specifični za različna tkiva. V preglednici II so našteti receptorji, ki jih bomo uporabili pri našem delu. Našteti so njihovi ligandi ter opisana njihova funkcija (37).

Preglednica II: Receptorji, ki jih bomo uporabili pri našem delu, njihovi ligandi ter njihova funkcija.

| <b>RECEPTOR</b>   | <b>LIGAND</b>   | <b>FUNKCIJA</b>   |
|---|---|---|
| androgenSKI receptor (AR)   | dihidrotestosteron, testosteron   | androgena aktivnost                                       |
| estrogenSKI receptor $\alpha$ (ER $\alpha$ )                                  | estradiol   | estrogena aktivnost                                       |
| estrogenSKI receptor $\beta$ (ER $\beta$ )                                    | E2, fitoestrogeni, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ diol           | estrogena aktivnost                                       |
| glukokortikoidni receptor (GR)  | kortizol  | glukokortikoidna aktivnost                                |
| jetrni X receptor $\alpha$ in $\beta$ (LXR $\alpha$ in $\beta$ )              | oksisteroli   | metabolizem holesterola                                   |
| s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ) | večkrat nenasičene maščobne kisline, eikozanoidi                              | metabolizem maščobnih kislin, zaviranje vnetja            |
| s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor $\beta$ (PPAR $\beta$ )   | neznan  | implementacija posteljice, decidualizacija                |
| s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) | prostaglandin J2, večkrat nenasičene maščobne kisline, lizofosfatidna kislina | adipogeneza   |
| retinoidni X receptor $\alpha$ (RXR $\alpha$ )                                | 9-cis-retinojska kislina, dokozaheksanojska kislina                           | pogost partner pri dimerizaciji receptorjev, embriogeneza |
| tiroidni receptor $\alpha$ in $\beta$ (TR $\alpha$ in $\beta$ )               | trijodotironin (T3)   | aktivnost ščitničnih hormonov                             |

### **1.3.2 HORMONSKI MOTILCI**

Hormonski motilci (HM) so kemikalije ali mešanice kemikalij, ki motijo naravno delovanje hormonov v telesu, bodisi s poseganjem v sintezo, vezavo, prenašanje ali izločanje hormonov iz telesa (38). Ena izmed prvih snovi, za katero so ugotovili vpliv na endokrini sistem je bil DDT (dikloro-difenil-trikloroetan) leta 1949. Gre za včasih množično uporabljen pesticid, a so dokazi na laboratorijskih živalih jasno pokazali estrogeno delovanje (39). Poleg pesticidov pa HM najdemo tudi v različnih produktih od elektronike in oblačil do izdelkov za osebno nego ter embalažnega materiala (38). Tako ni čudno, da se izpostavljenost tem kemikalijam začne že v maternici in se nadaljuje v ključnih stopnjah razvoja ter v vsej odrasli dobi. Glavna pot prehajanja HM v telo je preko kože z nanašanjem raznih izdelkov za osebno nego, možna pa je tudi izpostavljenost preko pljuč z vdihavanjem ob uporabi lakov za lase in dišav ali pa z zaužitjem v primeru mazil za ustnice. Zaradi vse večje prisotnosti v okolju lahko HM v telo vnesemo tudi s hrano in vodo (40). Tako kot hormoni tudi te kemikalije delujejo pri zelo nizkih koncentracijah in njihovih učinkov v nizki koncentraciji pogosto ni mogoče ekstrapolirati na visoke odmerke. Več različnih HM lahko deluje sinergistično in se tako učinek še poveča. Ključen parameter je tudi čas izpostavljenosti. Predvsem izpostavljenost med razvojem lahko povzroči nepopravljive posledice, medtem ko učinki pri odraslih pogosto izginejo z odstranitvijo HM (41).

Ameriška agencija za varstvo okolja (United States Environmental Protection Agency (US EPA)) je razvila program za odkrivanje HM (The Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)), ki z uporabo validiranih metod preiskuje pesticide, komercialno dostopne kemikalije in kemikalije v okolju ter ugotavlja njihovo delovanje na endokrini sistem (42). Tudi EU je v želji po odpravi prisotnosti HM v vodi, industrijskih kemikalijah, fitofarmacevtskih sredstvih in biocidih uvedla različne zakonodajne obveznosti. Ena izmed njih je uredba REACH, ki skrbi za varovanje ljudi in okolja pred tveganji, ki jih lahko predstavljajo kemikalije (43).

## **1.4 REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST**

Pod reproduktivno toksičnost štejemo škodljive učinke na spremembo ženske in moške razmnoževalne funkcije, ki zajema učinke kot so na primer vpliv na menstrualni cikel pri ženskah, na pojav pubertete pri najstnikih ali na proizvodnjo in prenos gamet kot tudi učinki na plodnost, porod in izid nosečnosti. Poleg tega med reproduktivno toksičnost spada tudi razvojna toksičnost, ki v najširšem smislu vključuje kakršen koli vpliv na normalen razvoj

pred ali po rojstvu, in ki izhaja iz izpostavljenosti staršev pred spočetjem, med nosečnostjo ali izpostavljenost postnatalno vse do spolne dozoritve. Učinki razvojne toksičnosti se lahko pokažejo v različnih obdobjih razvoja kot smrt ploda v maternici, strukturne okvare, spremembe v rasti ali funkcionalne pomanjkljivosti. V posebno skupino reproduktivne toksičnosti spadajo tudi učinki, ki so posledica izpostavljenosti matere kemikaliji med dojenjem (44). Za oceno tveganja za reproduktivno toksičnost so najboljši podatki, ki izhajajo iz epidemioloških študij. Vendar pa je teh podatkov premalo, zato velja predpostavka, da sredstvo, ki povzroča škodljiv reproduktiven učinek pri eksperimentalnih študijah na živalih, predstavlja potencialno reproduktivno grožnjo tudi za človeka (45). Kljub temu da obstaja težja po zmanjševanju testiranj na živalih, pa v primeru reproduktivne toksičnosti Evropska agencija za kemikalije (The European Chemicals Agency (ECHA)) priznava, da metode *in vitro* in (Q)SAR ne morejo nadomestiti poskusov na živalih (46). To je predvsem posledica kompleksnosti razmnoževalnega sistema pri sesalcih, in ker je posledično nemogoče preiskovati celoten cikel v enem samem *in vitro* sistemu. Tako se cikel običajno razdeli na različne biološke komponente, ki jih je mogoče raziskovati (47). Najpogosteje uporabljene *in vitro* študije so študije s človeškimi ali živalskimi celicami ter celičnimi linijami kot na primer zarodne matične celice (Embryonic Stem Cell Test (EST)) ali različni živalski modeli (npr. na ribah cebricah) (48). Tudi računalniški modeli in s tem *in silico* študije čedalje bolj kažejo potencialno uporabnost (49). V EU so reproduktivno toksične snovi razvrščene kot snovi CMR (rakotvorne, mutagene ali strupene za razmnoževanje) v 1A, 1B ali 2 kategorijo. Ker pa nevarna lastnost snovi ne pomeni nujno tveganja za zdravje ljudi, se te snovi lahko uporabljajo v kozmetičnih izdelkih pod posebnimi pogoji ali če jih Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)) EU glede na izpostavljenost in koncentracijo oceni kot varne za uporabo (11).

## 1.5 IN SILICO METODE

Skupaj z uredbo REACH je prišla težnja po zmanjševanju poskusov na živalih in s tem vse večje zanimanje za uporabo računalniških metod. Termin *in silico* se nanaša na računalniški poskus, matematični izračun ali organizacijo podatkov, povezanih s spojino s pomočjo računalniške analize. Obstajajo različna računalniško podprta orodja za analizo podatkov, ki omogočajo načrtovanje novih zdravilnih učinkovin, napoved farmakokinetičnih lastnosti ali različnih vidikov toksičnosti (50). Kljub temu da farmacevtska industrija že desetletja

uporablja ta način raziskovanja predvsem kot pomoč pri iskanju novih zdravilnih učinkovin, pa se z vse hitrejšim razvijanjem te metodologije razširja tudi njen spekter uporabe. Velika prednost teh metod je, da so hitrejše in cenejše od *in vitro* ali *in vivo* poskusov in je zato možno oceniti veliko število spojin v relativno kratkem času (51). Edinstvena prednost je tudi v tem, da je mogoče spojino oceniti še preden jo sintetiziramo. S pomočjo *in silico* metod bi lahko pomembno zmanjšali potrebo po poskusih na živalih (52). Obstaja več vrst *in silico* modelov, ki lahko obravnavajo celo telo, posebne organe in biološke procese ali pa so usmerjeni v biokemični mehanizem, kot je vezava na receptor. Med najpogosteje uporabljenimi najdemo različne metode kvantitativnih modelov odnosa med strukturo in delovanjem ((Q)SAR), ekspertne sisteme, molekulsко modeliranje, podatkovno rudarjenje, kinetične modele in različna računalniška orodja za analizo podatkov (53, 54). Splošno sprejeto dejstvo pravi, da je uspešnost računalniških metod odvisna od izbire in kakovosti vhodnih podatkov (55). Izbira primerne podatkovne baze je zato eden izmed ključnih parametrov razvoja uspešnih *in silico* modelov. Poznamo različne podatkovne zbirke, ki so uporabne za napovedovanje kinetičnih lastnosti spojin (ADME Database (56), Metabase (57), DrugBank (58)) ali pa vsebujejo informacije o toksičnosti. Med slednjimi najdemo na primer podatkovne baze, ki vsebujejo informacije o HM (EDCs DataBase (59), EDKB Database (60)), o estrogenem delovanju (EADB (61)) ali o reproduktivni toksičnosti (Toxnet DART (62)).

### **1.5.1 (Q)SAR IN EKSPERTNI SISTEMI**

Najbolj poznane *in silico* metode so modeli, ki podajo kvantitativno razmerje med strukturo in delovanjem ((Quantitative) Structure – Activity Relationship ((Q)SAR)) in temeljijo na trditvi, da je struktura molekule odgovorna za delovanje spojine. Razmerje med strukturo in njenim delovanjem se opiše s pomočjo molekulskih deskriptorjev, kot so logP in površina molekule, ki so v bistvu intrinzične lastnosti posamezne molekule. Modeliranje s pomočjo (Q)SAR na splošno vključuje tri korake. V prvem koraku se zbere nabor spojin, v drugem pa deskriptorji, ki povezujejo kemično strukturo z določeno aktivnostjo. V zadnjem koraku se uporabijo statistične metode, ki povezujejo spremembe v strukturi s spremembami v aktivnosti. (Q)SAR modeli obstajajo za različne biološke in toksikološke končne točke. Obstaja več kot 30 različnih končnih točk, ki pokrivajo vse od rakotvornosti, mutagenosti do preobčutljivosti na koži in draženje oči (63).

Čedalje bolj uporabljeni *in silico* metoda so tudi ekspertni sistemi (ES) – računalniški programi, ki uporabljajo tako razpoložljive informacije kot tudi logično sklepanje za

reševanje določenih zastavljenih problemov. V splošnem so sestavljeni iz baze podatkov in pravil, sistema sklepanja in generatorja pravil. Prednosti ES so v hitrosti in relativno dobri primerljivosti z *in vitro/in vivo* študijami ter njihovi transparentnosti in prilagodljivosti, medtem ko so pomanjkljivosti predvsem v pravilni oceni toksičnosti s strani strokovnjaka ter omejenosti trenutnega znanja (64). Vsi ES temeljijo na eksperimentalnih podatkih in/ali pravilih, ki izhajajo iz takih podatkov. Lahko jih razdelimo glede na to ali temeljijo na obstoječem strokovnem znanju in pravilih (knowledge/rule-based ES) ali pa na tiste, ki uporabljajo statistični pristop in temeljijo na (Q)SAR zakonostih. Pri prvih strokovnjaki ustvarijo pravila, ki temeljijo na seznamu strukturnih značilnosti, ki so povezane z določeno toksičnostjo ali aktivnostjo (63).

### **1.5.2 IN SILICO NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA**

Preučevanje metabolizma spojin je pomembno, ker se v velikih primerih izkaže, da je prava posredno ali neposredno kriv za toksične učinke. V zadnjih letih se kot način za raziskovanje metabolizma vse pogosteje pojavljajo prav *in silico* metode. Metabolizem neke spojine se preučuje z različnih vidikov, kot na primer napoved mesta presnove, napovedovanje potencialnih metabolitov in njihovih kemijskih struktur ter napoved učinkov snovi na presnovne encime (65). Cilj je predvideti vse pričakovane metabolite I. in II. faze, jih organizirati v metabolno drevo ter oceniti verjetnost njihovega nastanka. Kljub temu da je razvoj na tem področju hiter, pa se še vedno pojavljajo nekatere ovire, saj manjka zanesljivih metod za kvantitativno oceno količine nastalega metabolita ter napovedovanje razlik v metabolizmu na podlagi vrste, starosti, spola, prehranskih in bolezenskih stanj ter zaradi genetskih razlik (66). Trenutno so na voljo metode, ki vključujejo modele (Q)SAR, ekspertni sistemi, sidranje protein – ligand, algoritmi na osnovi farmakoforja, simulacije molekularne dinamike in druge (67). Najdemo jih pod imeni MetaSite (68), StarDrop (69), Meteor Nexus (70).

### **1.5.3 IN SILICO NAPOVEDOVANJE ENDOKRINIH UČINKOV**

Najpogostejši neželeni učinek HM je estrogeno delovanje, ki je tudi najbolj intenzivno preučevano poleg androgenega. Razlog je tudi v raznolikosti in zapletenosti mehanizmov delovanja HM ter omejenih podatkih, ki so na voljo za *in silico* testiranje drugih vidikov endokrine toksičnosti. Modeli, ki se uporabljajo, vključujejo (Q)SAR modele, stimulacijo molekulske dinamike, sidranje in modeliranje na osnovi farmakoforjev. Večina teh računalniških orodij omogoča le razvrščanje spojin med tiste, ki se vežejo na receptor in tiste, ki se ne. Le nekatere omogočajo kvantitativno oceno relativne vezavne afinitete (71).

Primeri metod so Derek Nexus (72), Endocrine Disruptor Knowledge Base (73), VirtualToxLab (74).

#### **1.5.4 IN SILICO NAPOVEDOVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI**

Mehanizmi povzročanja reproduktivne toksičnosti so raznoliki, mnogi neznani ali le delno raziskani na celičnem in molekularnem nivoju. Razlog za pomanjkanje raziskav na tem področju je v tem, da so študije ene izmed dražjih in časovno najbolj zahtevnih poleg tega pa je tudi število zahtevanih živali za *in vivo* študije veliko večje od vseh ostalih študij toksičnosti. Obstaja velika težnja po raziskovanju na *in silico* nivoju vendar trenutno obstaja relativno malo modelov za raziskovanje reproduktivne toksičnosti, obstoječi pa imajo omejeno področje uporabe. Večina modelov, ki so na voljo, uporabljajo (Q)SAR metode in sorodne metode, kot je metoda odločitvenega drevesa ali ekspertni sistemi (75). Poznamo metode kot so CAESAR (76) in TEST (Toxicity Estimation Software Tool) (77).

## 2 NAČRT ZA DELO

Derivati benzofenona se pogosto uporabljajo v različnih izdelkih, zato njihova prisotnost v okolju narašča. Vprašanje, ki se ob tem poraja, je kakšen je vpliv izpostavljenosti tem kemikalijam na zdravje ljudi. Derivate benzofenona se povezuje predvsem z vplivom na endokrini ter reproduktivni sistem. To področje je še relativno slabo raziskano, zato bomo za izbrane štiri derivate benzofenona in njihove metabolite s pomočjo *in silico* metod napovedali endokrine učinke in reproduktivno toksičnost.

Najprej bomo s pomočjo računalniškega programa **Meteor Nexus** napovedali metabolizem štirih izbranih derivatov benzofenona (BF-2, BF-3, BF-4 in BF-6).

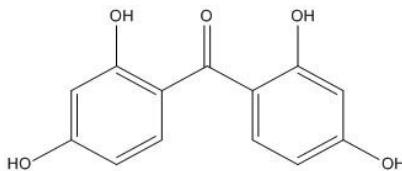
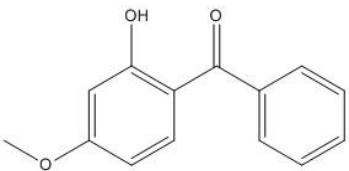
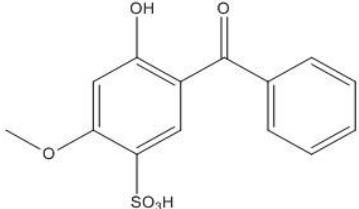
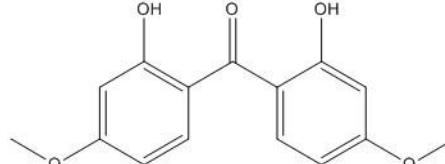
1. Med dobljenimi metaboliti bomo izbrali metabolite I. faze biotransformacije in jih uporabili za nadaljnjo analizo.
2. S pomočjo računalniškega programa **Vega QSAR - Estrogen Receptor Relative Binding Affinity Model in Endocrine Disruptome** bomo napovedali endokrino toksičnost izbranih derivatov benzofenona in njihovih metabolitov.
3. Za napoved reproduktivne toksičnosti izbranih derivatov benzofenona in njihovih metabolitov bomo uporabili računalniške programe **Derek Nexus, Toxicity Estimation Software Tool (TEST), Vega QSAR - Developmental Toxicity Classification Model in Vega QSAR - Developmental/Reproductive Toxicity library**.
4. Vse dobljene rezultate bomo ovrednotili in primerjali z rezultati do sedaj opravljenih *in vitro* in *in vivo* raziskav.

### 3 METODE IN MATERIALI

#### 3.1 IZBRANI DERIVATI BENZOFENONA

Za preučevanje metabolizma, endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti smo izbrali štiri derivate benzofenona, BF-2, BF-3, BF-4 in BF-6, ki so dostopni v izdelkih na trgih EU, ZDA, Avstralije, Azije, in Južne Afrike. V EU sta le BF-3 in BF-4 dovoljena kot organska UV filtra v pripravkih za zaščito pred soncem. Za prvega je od lanskega leta naprej maksimalna dovoljena koncentracija 6 %, za drugega pa 5 % (11, 12). Ameriška FDA pa dovoljuje BF-3 v enaki koncentraciji (6 %), medtem ko dovoljuje BF-4 v koncentraciji do 10 % (78). Za preučevanje smo izbrali še BF-2 in BF-6, ki sta dovoljena le na Japonskem in v Južni Afriki. Vse štiri izbrane derivate benzofenona smo prikazali v preglednici III.

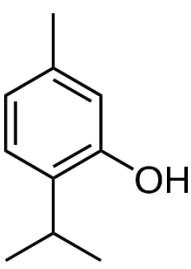
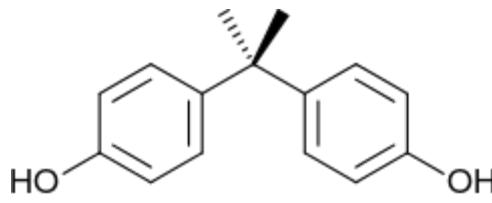
Preglednica III: Izbrani derivati benzofenona, njihova struktturna formula, INN ter IUPAC ime, CAS številka in koda SMILES.

| BENZOFENON-2  | BENZOFENON-3   |
|---|--|
|  <p>INN: /<br/>IUPAC: bis(2,4-dihidroksifenil)metanon<br/>CAS: 131-55-5<br/>SMILES:<br/><chem>c1(c(cc(c1)O)C(=O)c1c(cc(c1)O)O)O</chem></p>  |  <p>INN: oksibenzon<br/>IUPAC: (2-hidroksi-4-metoksifenil)fenilmetonan<br/>CAS: 131-57-7<br/>SMILES:<br/><chem>c1(c(cc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p> |
|  <p>INN: sulizobenzon<br/>IUPAC: 5-benzoil-4-hidroksi-2-metoksibenzensulfonska kislina<br/>CAS: 4065-45-6<br/>SMILES:<br/><chem>c1(c(cc(c1)OC)S(=O)(=O)O)C(=O)c1ccccc1O</chem></p> |  <p>INN: /<br/>IUPAC: bis(2-hidroksi-4-metoksifenil)metanon<br/>CAS: 131-54-4<br/>SMILES:<br/><chem>c1(c(cc(c1)OC)C(=O)c1c(cc(c1)OC)O)O</chem></p>     |

### 3.2 NEGATIVNA IN POZITIVNA KONTROLA

Timol (2-izopropil-5-metilfenol), ki se v naravi nahaja v eteričnih oljih rastlin iz družine *Lamiaceae*, kot so materina dušica, navadna bazilika in navadna dobra misel, smo izbrali kot negativno kontrolo (79). Ameriška FDA ga je namreč uvrstila na seznam EAFUS (Everything Added to Food in the United States), kar pomeni, da je razvrščen kot snov, ki je odobrena kot aditiv v živilih, poleg tega pa je timijan, ki tudi vsebuje timol, splošno priznan kot varen in uvrščen na seznam GRAS (Generally Recognized As Safe) (80). Raziskave, ki so jih opravili do sedaj, niso pokazale endokrine ali reproduktivne toksičnosti timola (81). Kot pozitivno kontrolo smo izbrali bisfenol A (BPA), ki so ga načrtovali kot učinkovino z estrogenim delovanjem, kasneje pa se je z uporabo pri izdelavi raznih izdelkov za potrošnike, kot na primer plastike, PVC in embalaže za hrano, hitro razširil po vsem svetu (82). Dokazali so, da se primarno veže na estrogenska receptorja ER  $\alpha$  in ER  $\beta$ , poleg tega pa je za endokrine učinke najverjetnejše kriva še vezava na receptorje AR, ER  $\gamma$ , PPAR  $\gamma$ , TR in PXR (83). Skupina ameriških raziskovalcev je na osnovi pregleda literature objavljene med letom 2007 in 2013 na temo BPA in njegovega vpliva na razmnoževalni sistem pri ljudeh in živalih zaključila, da je BPA reproduktivno toksičen (84). V preglednici IV sta prikazani obe kontroli ter njuni CAS številki in kodi SIMLES.

Preglednica IV: Izbrani kontroli, njuna struktura formula, CAS številka in koda SMILES.

| TIMOL  | BISFENOL A  |
|--|---|
| <br>CAS: 89-83-8<br>SMILES: c1(ccc(c(c1)O)C(C)C)C | <br>CAS: 80-05-7<br>SMILES: c1c(ccc(c1)O)C(c1ccc(cc1)O)(C)C |

### 3.3 UPORABLJENI RAČUNALNIŠKI PROGRAMI IN SPECIFIKACIJA NASTAVITEV

#### 3.3.1 PROGRAM ZA NAPOVED METABOLIZMA

##### METEOR NEXUS

**Uporabljen program:** Meteor Nexus, Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK

**Različica:** Meteor: 1.0.0; Meteor Nexus: 2.1.0; Nexus: 2.0.0.

**Dostop:** plačljiv program na računalniku Fakultete za farmacijo v Ljubljani

**Uporabljene nastavitev:** Species: *Mammals*; Processing direction: *Breadth first*; Phase constraints: *Don't grow from phase II products*; Max. Depth: 3; Max. Metabolites: 1000; Min. Likelihood: *EQUIVOCAL*; Apply relative reasoning: *no*; Level cutoff: 2

Meteor Nexus je programsko orodje, ki ga je razvila neprofitna organizacija Lhasa Limited (85). Program uporablja obširno strokovno bazo znanja za predvidevanje metabolizma spojin ter zajema reakcije metabolizma faze I in II. Predvidevanje poteka na osnovi treh korakov. Najprej se vnesena struktura formula primerja s certificirano bazo podatkov Meteor in njenim slovarjem biotransformacij. Na ta način program ugotovi ali spojina vsebuje podskupine, ki so podvržene metabolizmu in v drugem koraku napove verjetnost nastanka posameznih metabolitov prve generacije z uporabo ene od treh metod. Metoda absolutnega/relativnega sklepanja temelji na pravilih, ki jih določijo strokovnjaki, medtem ko metoda statičnega ocenjevanja in metoda ocenjevanja na osnovi mesta metabolizma temeljita na eksperimentalnih podatkih. Vsak metabolit se nato še dodatno analizira, da se napove njegov nadaljnji metabolizem. Rezultati so prikazani v interaktivnem drevesnem diagramu skupaj s podanimi razlogi za vsako dano napoved, podrobnostmi o biotransformaciji (encimi, ki nastopajo v reakciji) in potmi metabolizma (86, 87). Program določi absolutno verjetnost nastanka posameznega metabolita, med drugim tudi na osnovi logP vrednosti spojine. Manjša je lipofilnost spojine, manjša je njena sposobnost, da prehaja celične membrane in s tem možnost za biotransformacijo. Verjetnost reakcije program opiše z eno od petih ravni: *probable* (verjetno), *plausible* (mogoče), *equivocal* (dvoumno), *doubted* (dvomljivo) in *improbable* (malo verjetno) (85, 86). Predvidevanje se konča, ko program napove, da je molekula postala dovolj vodotopna, da se lahko izloči iz telesa. Kljub temu da so rezultati podprtji z znanstvenimi raziskavami, avtorji opozarjajo, da program še

vedno ustvarja velik obseg lažno pozitivnih rezultatov zato so nujne nadaljnje *in vivo/ex vivo* raziskave metabolizma (65).

### 3.3.2 PROGRAMA ZA NAPOVED ENDOKRINIH UČINKOV

#### VEGA QSAR

**Uporabljen program:** Vega QSAR, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri Milano

**Različica:** 1.1.3.

**Dostop:** program je na voljo za prenos na spletni strani <https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/>

**Uporabljene nastavitev:** Model: *Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model (IRFMN) 1.0.1*

Vega QSAR je računalniška platforma, ki s pomočjo različnih modelov omogoča napovedovanje različnih vidikov toksičnosti. Je rezultat sodelovanja različnih inštitutov in evropskih ter ameriških regulatornih organov. Začetni modeli izhajajo predvsem iz modelov CAESAR, kasneje pa so dodali še mnogo drugih modelov, ki so jih razvili partnerji projekta (88). Program je prosti dostopen na spletu in ga lahko namestimo na naš računalnik. Deluje s pomočjo tehnologije Java. Molekulske formule spojin, ki jih želimo analizirati, vnesemo v obliki kode SMILES, seznama kod SMILES ali v obliki sdf datoteke. Modeli so organizirani v štiri razrede: toksičnost (mutagenost, karcinogenost, ...), ekotoksičnost (akutna toksičnost pri ribah, čebelah, ...), okoljski vplivi in fizikalno-kemijske lastnosti ( $\log P$ ). Rezultate program poda v obliki pdf datoteke, ki vsebuje kompletne informacije tudi o sorodnih molekulah in o razlogih za strukturna opozorila ali v obliki csv datoteke, ki vsebuje le najbolj nujne podatke in je uporabna takrat, ko imamo opravka z veliko bazo spojin (89). Za napovedovanje endokrinih učinkov naših preiskovanih spojin smo uporabili **Estrogen Receptor Relative Binding Affinity Model**. Ta model omogoča kvalitativno napoved relativne afinitete vezave na estrogenski receptor. Kot rezultat program napove ali je spojina aktivna ali neaktivna in s številom zvezdic oceni, kako zanesljiva je ta napoved. Poleg tega pa nam izriše še šest podobnih spojin, ki imajo predvidene in eksperimentalne vrednosti ter utemelji rezultate (90).

## ENDOCRINE DISRUPTOME

**Uporabljen program:** Endocrine Disruptome, avtorja: Katra Kolšek in Samo Turk, podprt s stani Fakultete za farmacijo, Univerza v Ljubljani in Kemijskega inštituta Slovenija

**Dostop:** na spletni strani <http://endocrinedisruptome.ki.si/prediction.html>

**Uporabljene nastavitev:** /

Endocrine Disruptome je prosto dostopna spletna storitev, ki omogoča odkrivjanje potencialnih endokrinskih motilcev tako, da predvidi njihovo vezavo na 14 različnih jedrnih receptorjev. Med te receptorje spadajo androgenski receptor (AR), estrogenski receptor  $\alpha$  in  $\beta$  (ER  $\alpha$  in  $\beta$ ), glukokortikoidni receptor (GR), jetrni X receptor  $\alpha$  in  $\beta$  (LXR  $\alpha$  in  $\beta$ ), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  (PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$ ), retinoidni X receptor  $\alpha$  (PXR  $\alpha$ ) ter tiroidni receptor  $\alpha$  in  $\beta$  (TR  $\alpha$  in  $\beta$ ). Pri širih receptorjih je vključena tudi njihova antagonistična konformacija (AR *an*, ER  $\alpha$  *an*, ER  $\beta$  *an* in GR *an*). Program deluje na platformi imenovani Docking Interface for Target Systems (DoTS), ki uporablja prosto dostopen program za izvajanje molekulskega sidranja AutoDock Vina. Uporaba je enostavna. Molekulsko formulo spojine narišemo s pomočjo programa ChemDoodle 2D Sketcher ali pa jo vnesemo v obliki kode SMILES. Odpre se novo okno, ki pokaže struktorno formulo spojine ter njene izračunane lastnosti, kot sta molekulska masa in logP. Končne rezultate sidranja dobimo v nekaj minutah, odvisno od kompleksnosti spojine. Rezultati so podani v barvni tabeli, v kateri vsaka celica predstavlja en receptor označen s kratico. Dodana je številčna vrednost, ki pove izračunano prosto energijo vezave spojine na receptor (v kcal/mol). Nižja kot je ta vrednost, večja je možnost vezave. Dobljene rezultate izračunanih energij vezave nato uporabi, da spojine klasificira v 4 razrede glede na verjetnost vezave in jih označi z ustrezno barvo. Rdeča barva predstavlja največjo verjetnost vezave, oranžna veliko verjetnost, rumena srednjo verjetnost in zelena majhno verjetnost vezave (91). Kljub temu da je program zelo uporaben pri iskanju potencialnih tarč preiskovanih spojin, pa ne upošteva nobenega od farmakokinetičnih parametrov, previdnost pri interpretaciji rezultatov pa je potrebna tudi, ker so validacijo naredili z močnimi ligandi. Predvsem pri šibkih ligandih se zato lahko zgodi, da program ne bo predvidel vezave na receptorje kljub temu, da so ti lahko problematični predvsem pri kronični izpostavljenosti. Kot varovalo so avtorji dodali filter PAINS, ki opozori uporabnika na potencialno problematičen značaj spojine (92).

### 3.3.3 PROGRAMI ZA NAPOVED REPRUDUKTIVNE TOKSIČNOSTI

#### DEREK NEXUS

**Uporabljen program:** Derek Nexus, Lhasa Limited, Yorkshire, UK

**Različica:** Derek Nexus: 4.1.0; Nexus: 2.0.0

**Dostop:** plačljiv program na računalniku Fakultete za farmacijo v Ljubljani

**Uporabljene nastavitev:** Selected species: *mammal*; Reasoning Level: *at least EQUIVOCAL*; Perceive tautomers: *yes*; Perceive mixtures: *yes*; Match alerts without rules: *no*; Show open likelihood: *no*; show negative predictions: *yes*; Show rapid prototypes: *yes*; Endpoints: *reproductive toxicity*

Derek Nexus je na znanju temelječ ekspertni sistem, ki nam omogoča hitro *in silico* predvidevanje toksičnosti spojin. Po vnosu strukturne formule preiskovane spojine v obliki različnih formatov ali z narisano strukturo se ta standardizira in nato primerja s certificirano bazo podatkov Lhasa. Napoved se ustvari tako, da se primerja strukturne značilnosti dane spojine s strukturnimi opozorili v bazi podatkov, upošteva vrsto živega bitja ter nekaj izračunanih fizikalno-kemijskih parametrov. S tem se čim bolj približajo odločanju na podlagi človeške logike. Kot rezultat dobimo podatek, kakšna je verjetnost za toksičnost ter podrobne informacije o razlogih za takšno odločitev. Verjetnost se lahko opiše kot *probable* (**verjetno**), *plausible* (**mogoče**), *equivocal* (**dvoumno**), *doubted* (**dvomljivo**) in *improbable* (**malo verjetno**). V primeru, ko program v bazi podatkov ne najde ničesar, na čemer bi lahko temeljila njegova napoved, pokaže opozorilo »Nothing to report« - nič za poročanje, kar pa ne pomeni neaktivnosti spojine. Možna je izbira med različnimi vidiki toksičnosti kot so karcinogenost, mutagenost, hepatotoksičnost ali za nas najbolj relevantna reproduktivna toksičnost. Slednjo program nadalje razdeli na razvojno toksičnost, teratogenost in testikularno toksičnost (85, 93, 94).

## VEGA QSAR

**Uporabljen program:** Vega QSAR, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri Milano, Italy

**Različica:** 1.1.3.

**Dostop:** program je na voljo za prenos na spletni strani <https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/>

**Uporabljene nastavitev:** Model: *Developmental Toxicity Classification Model version 2.1.7* in *Developmental/Reproductive Toxicity library version 1.0.0*

Pri modelu »**Developmental Toxicity Classification Model**« kvalitativna napoved razvojne toksičnosti spojin temelji na binarni klasifikaciji FDA, ki razvršča spojine v kategorije A in B, ki se štejejo za netoksične ter C, D in X, ki so označene kot toksične (95). Model izhaja iz projekta CAESAR, ki ga financira Evropska komisija, in je namenjen razvijanju *in silico* modelov, ki so specifično zasnovani za uredbo REACH, ki opredeljuje ravnanje s kemikalijami v celotni EU (96). Drugi uporabljeni model »**Developmental/Reproductive Toxicity library**« omogoča kvalitativno napoved razvojne in reproduktivne toksičnosti, ki prav tako temelji na binarni klasifikaciji in je izведен znotraj platforme VEGA. Model uporablja virtualno knjižnico toksičnih spojin, ki so jo prvič opisali v študiji podjetja Procter & Gamble. V tej študiji so identificirali 25 kategorij toksičnih spojin in za vsako kategorijo izdelali razširjen seznam spojin. Model poskuša najti natančno ujemanje med dano spojino in katero izmed spojin v knjižnici. Če najde povezavo, se poda napoved, da je spojina toksična, v nasprotnem primeru pa da ni (97). Poleg tega, da se rezultat v obeh primerih poda kvalitativno, se s številom obarvanih zvezdic oceni tudi stopnja zanesljivosti napovedi. Ena obarvana zvezdica (\*\*\*) pomeni, da je zanesljivost nizka, ker se spojina nahaja izven območja uporabnosti modela, pri dveh obarvanih zvezdicah (\*\*\*\*) se spojina lahko nahaja izven območja uporabnosti modela in je zato napoved dvomljiva. Pri treh obarvanih zvezdicah (\*\*\*\*\*) je napoved zanesljiva, saj se spojina nahaja znotraj uporabnosti modela (95).

## TEST

**Uporabljen program:** Toxicity Estimation Software Tool (TEST), US EPA

**Različica:** 4.2.1

**Dostop:** program je na voljo za prenos na spletni strani <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>

**Uporabljene nastavitev:** Endpoint: *Developmental toxicity*; Method: *Consensus*

S pomočjo prosto dostopnega programa TEST lahko enostavno ocenimo toksičnost kemikalij na podlagi (Q)SAR modelov. Gre za različne matematične modele, ki napovedo toksičnost na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti spojine. Možna je izbira med različnimi metodami. Pri našem delu smo uporabili metodo s konsenzom, ki poda rezultat kot povprečje vseh ostalih metod. Ta metoda ima najvišjo natančnost napovedi in najširše področje uporabnosti, saj ima vsaka metoda malo drugačno domeno uporabnosti. Programska oprema vsebuje različne modele za različne končne točke. Poleg razvojne toksičnosti je na voljo tudi izračun LD50 (odmerek, ki povzroči smrt pri 50 % izpostavljenih osebkih) pri podganah, mutagenost, biokoncentracijski faktor (BCF) in drugo. Poleg tega program omogoča tudi izračun nekaterih fizikalno-kemijskih parametrov, kot so na primer temperatura vrelišča, gostota in površinska napetost. Preiskovano spojino lahko v programu narišemo, vnesemo v obliki kode SMILES, formata mol ali pa jo najdemo v podatkovni bazi programa (98). Podatkovno bazo, ki jo uporablja program, so ustvarili z združevanjem podatkov iz TERIS (Teratogen Information System) in smernic FDA in vsebuje 285 kemikalij. Ko program izračuna oceno toksičnosti, se pokažejo rezultati na novo ustvarjeni spletni strani (99).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 METABOLIZEM IZBRANIH DERIVATOV BENZOFENONA

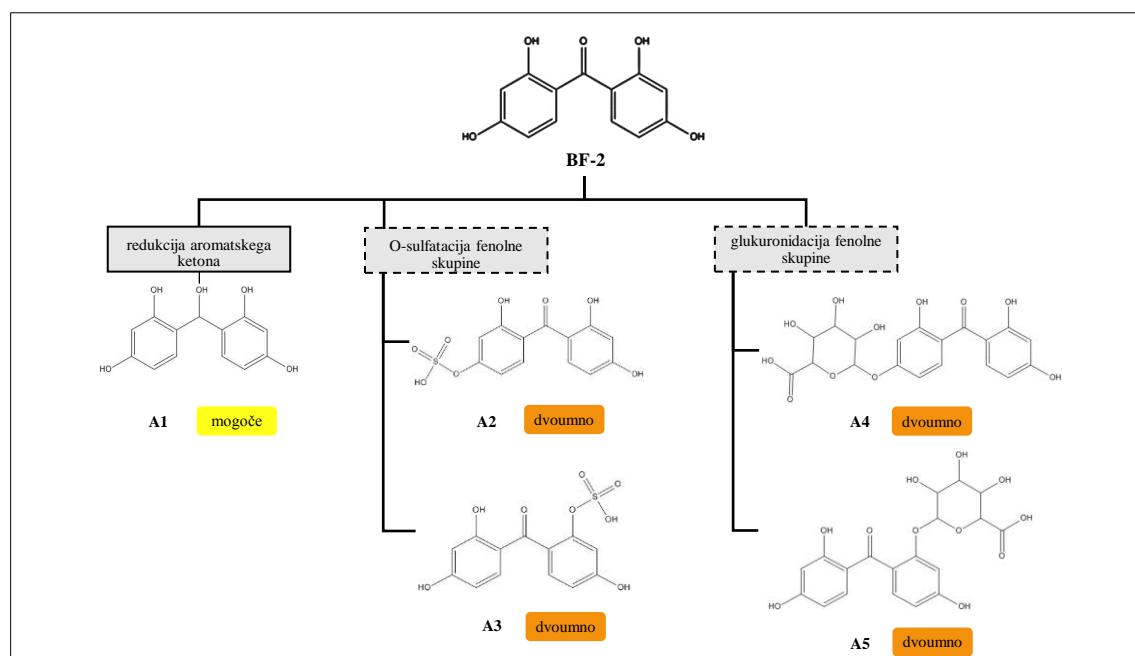
Za ugotavljanje metabolizma štirih izbranih derivatov benzofenona smo uporabili program Meteor Nexus. Dobljeni rezultati so zajemali reakcije metabolizma in encime, ki sodelujejo pri posamezni reakciji. V našem primeru so to bili: alkohol-dehidrogenaza (ADH), citokrom P450 (CYP450), uridindifosfat – glukuronoziltransferaza (UGT) in sulfotransferaza (SULT). Program je napovedal tudi stopnjo verjetnosti nastanka posameznega metabolita. Mi smo izbrali tiste s stopnjami: *probable* – verjetno, *plausible* – mogoče in *equivocal* – dvoumno. Iz dobljenim rezultatom smo zaradi večje preglednosti izdelali napovedne sheme metabolizma.

#### 4.1.1 BENZOFENON-2

Program nam v prvi stopnji poda tri različne poti metabolizma:

##### 1. stopnja

- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **A1** (mogoče)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **A2** in **A3** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **A4** in **A5** (dvoumno)



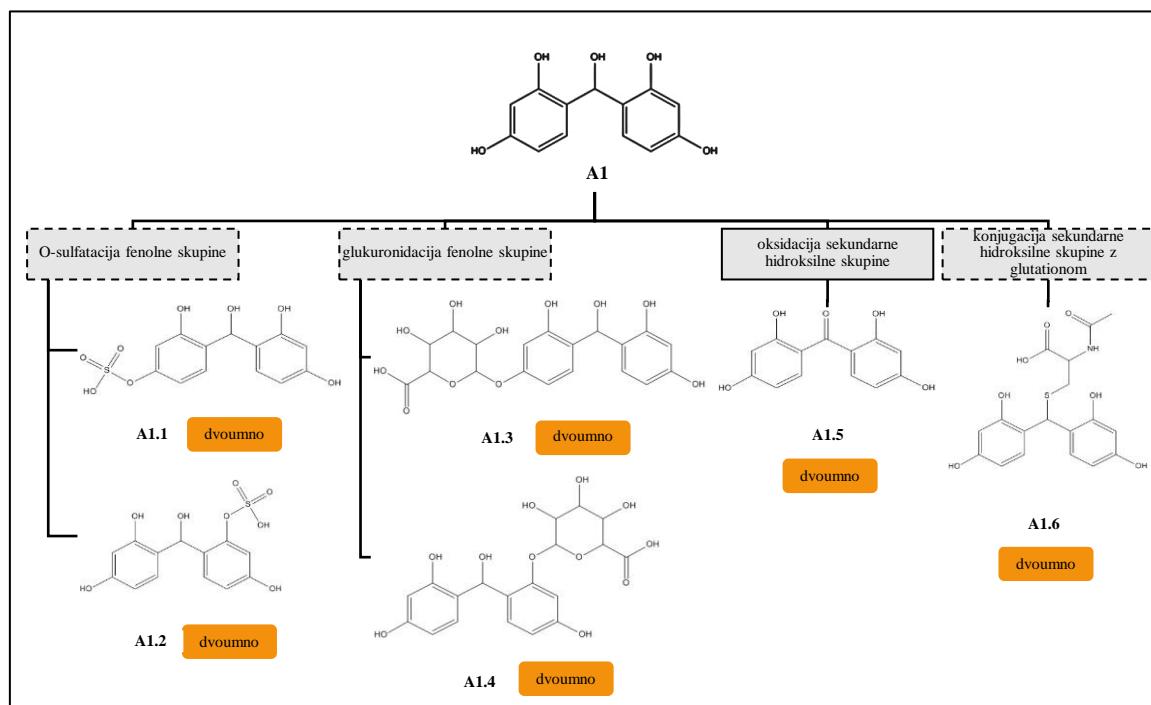
Slika 1: Napovedna shema metabolizma BF-2; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

Za produkt **A1** program napove nadaljnji metabolizem:

## 2. stopnja

### 1. Napoved nadalnjega metabolizma produkta **A1**

- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **A1.1** in **A1.2** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **A1.3** in **A1.4** (dvoumno)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **A1.5**, ki je enak izhodnemu benzofenonu-2 (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **A1.6** (dvoumno)



Slika 2: Napovedna shema metabolizma spojine A1; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

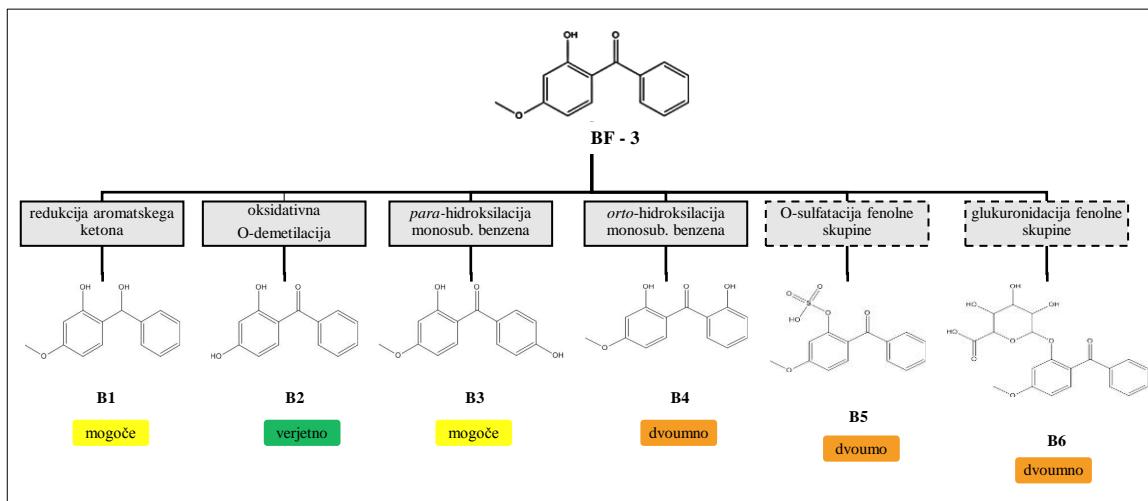
### 4.1.2 BENZOFENON-3

Program nam v prvi stopnji poda šest različnih poti metabolizma:

## 1. stopnja

- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **B1** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetylacija do produkta **B2** (verjetno)
- S CYP450 katalizirana *para*-hidroksilacija na monosubstituiranem benzenu do produkta **B3** (mogoče)

- S CYP450 katalizirana *ortho*-hidroksilacija na monosubstituiranem benzenu do produkta **B4** (dvoumno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produkta **B5** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produkta **B6** (dvoumno)



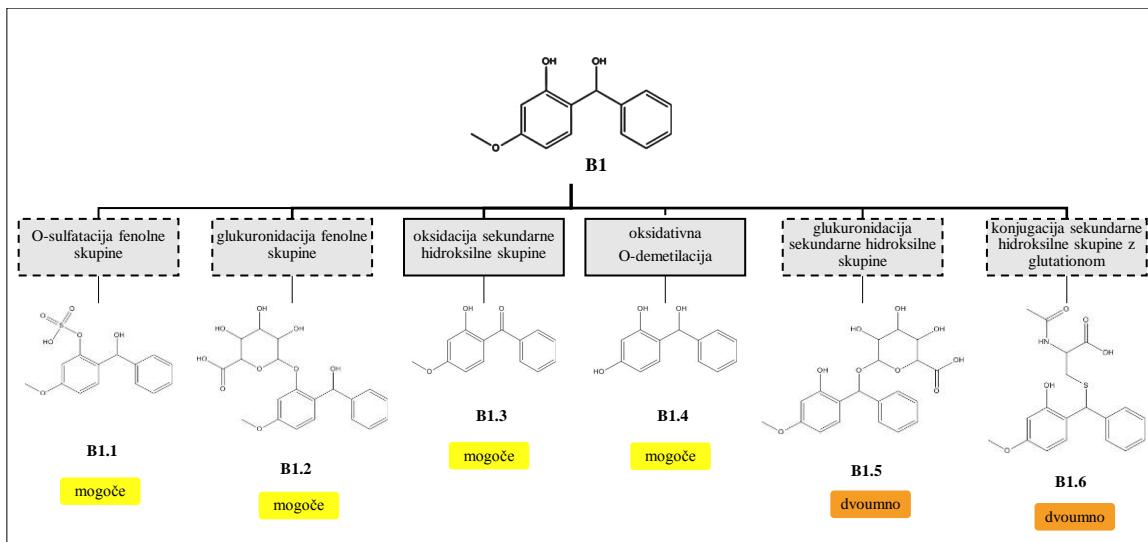
Slika 3: Napovedna shema metabolizma BF-3; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

Za produkte **B1**, **B2**, **B3** in **B4** program napove nadaljnji metabolizem:

## 2. stopnja

### 1. Napoved nadalnjega metabolizma produkta **B1**

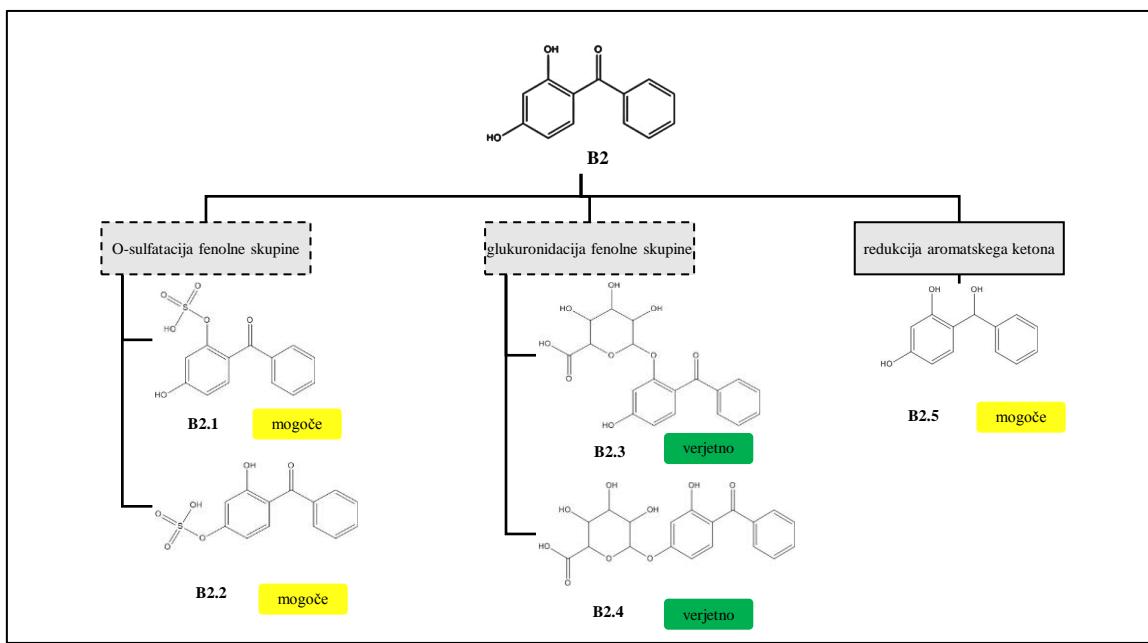
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produkta **B1.1** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produkta **B1.2** (mogoče)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B1.3**, ki je enak izhodnemu benzofenonu-3 (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetylacija do produkta **B1.4**, ki je enak produktu B2.5, pri katerem je tudi napovedan nadaljni metabolizem (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B1.5** (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **B1.6** (dvoumno)



Slika 4: Napovedna shema metabolizma spojine B1; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 2. Napoved nadaljnega metabolizma produkta B2

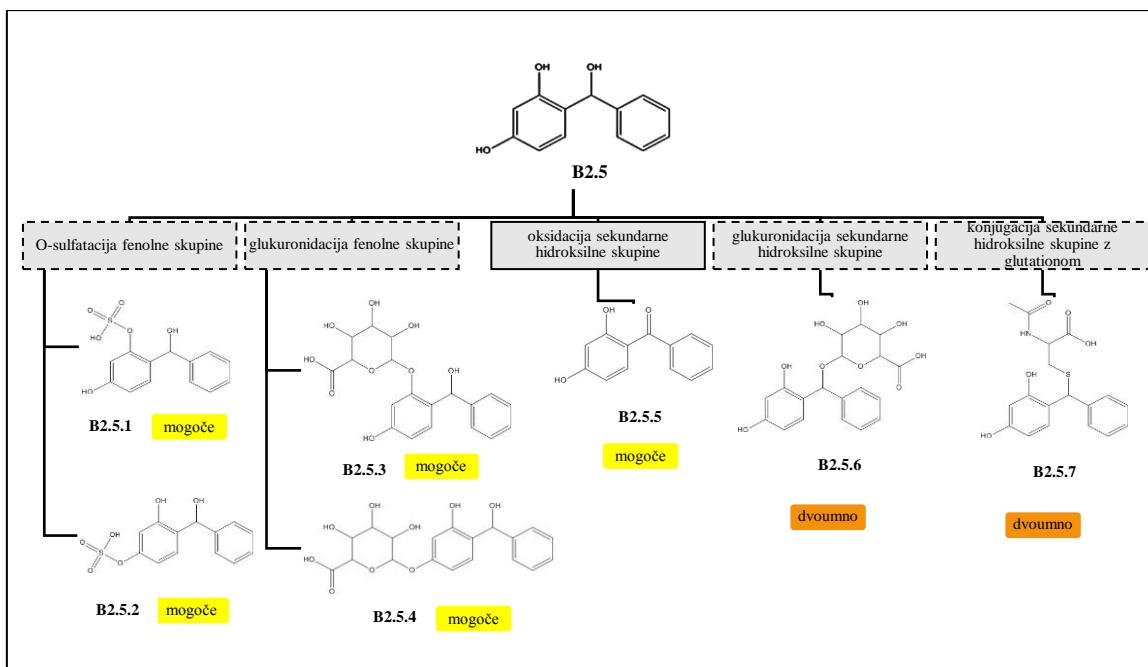
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B2.1** in **B2.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B2.3** in **B2.4** (verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **B2.5**, ki je enak produktu B1.4 (mogoče)



Slika 5: Napovedna shema metabolizma spojine B2; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

#### Napoved nadaljnega metabolizma produkta B2.5

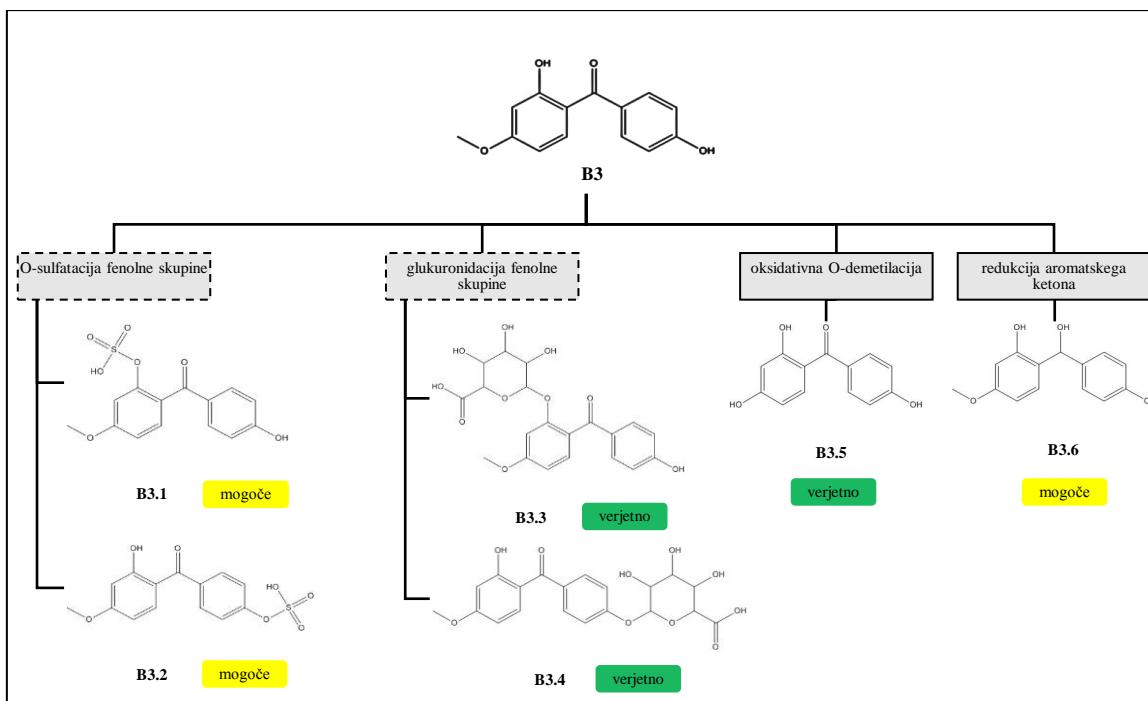
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B2.5.1** in **B2.5.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B2.5.3** in **B2.5.4** (mogoče)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B2.5.5**, ki je enak produktu B2 (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B2.5.6** (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **B2.5.7** (dvoumno)



Slika 6: Napovedna shema metabolizma spojine B2.5; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

### 3. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **B3**

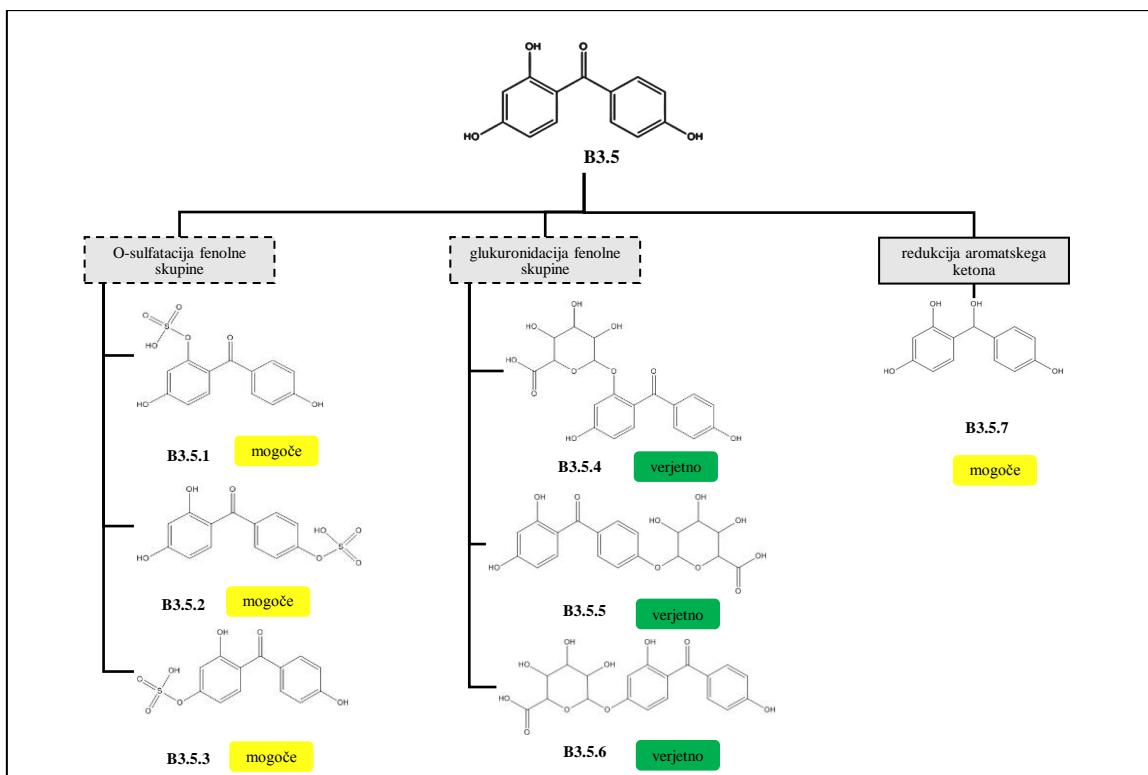
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B3.1** in **B3.2** (**mogoče**)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B3.3** in **B3.4** (**verjetno**)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **B3.5** (**verjetno**)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **B3.6** (**mogoče**)



Slika 7: Napovedna shema metabolizma spojine B3; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

#### 4. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **B3.5**

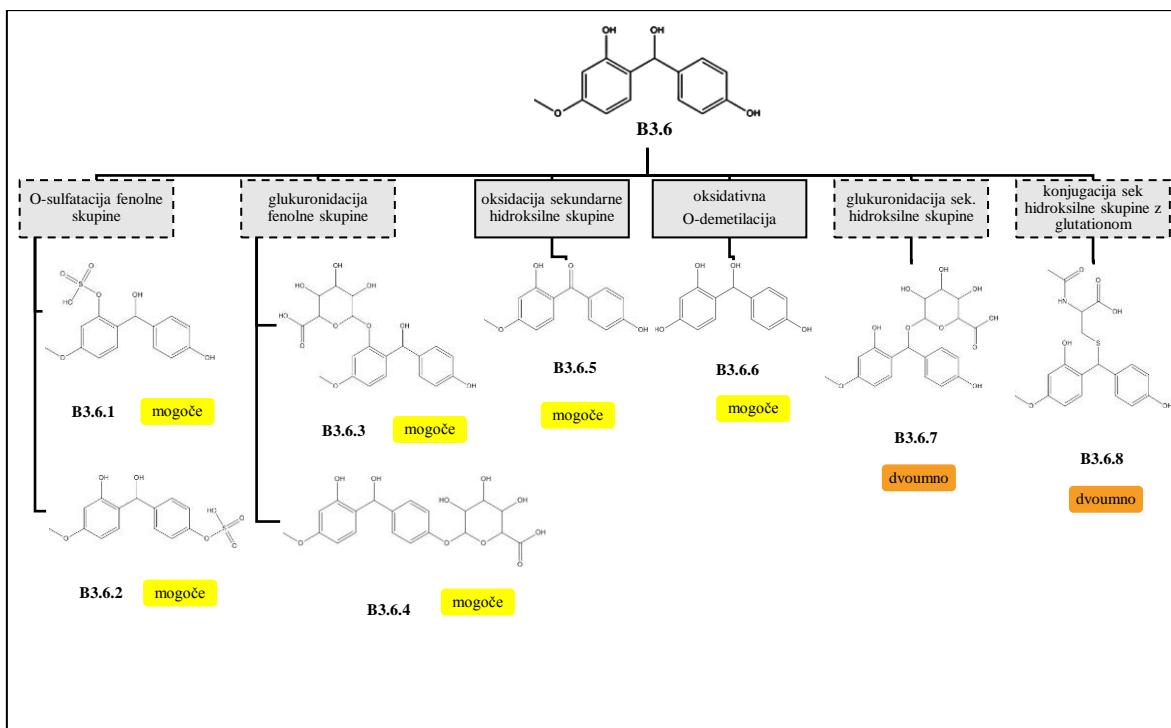
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B3.5.1**, **B3.5.2** in **B3.5.3** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B3.5.4**, **B3.5.5** in **B3.5.6** (verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **B3.5.7** (mogoče)



Slika 8: Napovedna shema metabolizma spojine B3.5; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 5. Napoved nadaljnega metabolizma produkta B3.6

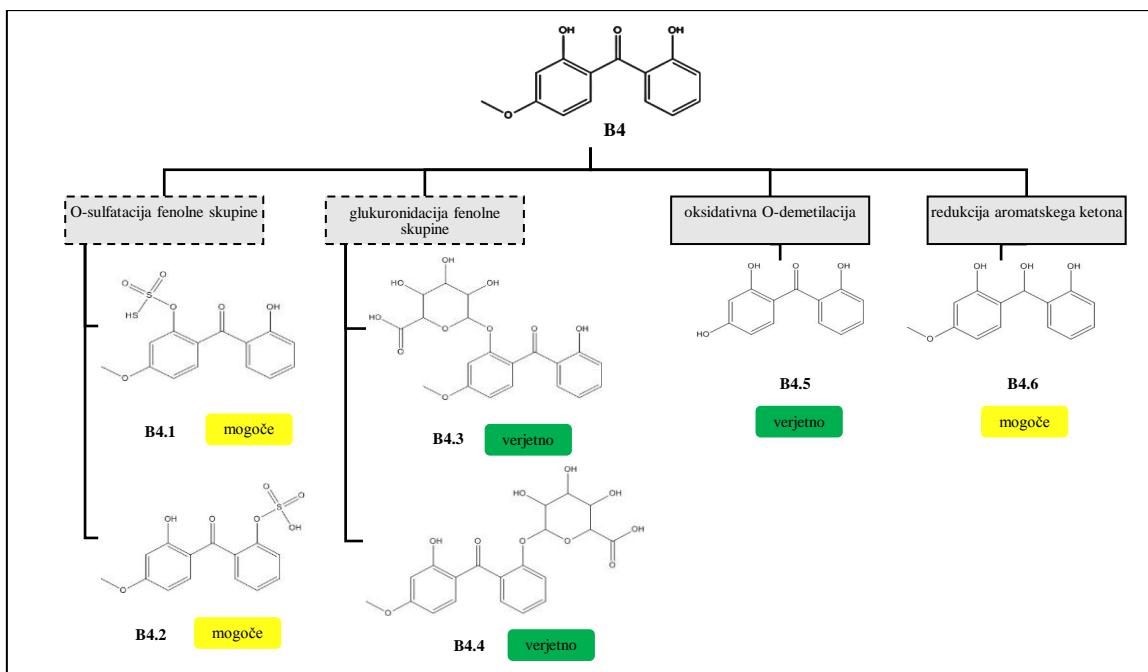
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B3.6.1** in **B3.6.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B3.6.3** in **B3.6.4** (mogoče)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B3.6.5**, ki je enak produktu B3 (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **B3.6.6**, ki je enak produktu B3.5.7 (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B3.6.7** (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **B3.6.8** (dvoumno)



Slika 9: Napovedna shema metabolizma spojine B3.6; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 6. Napoved nadaljnega metabolizma produkta B4

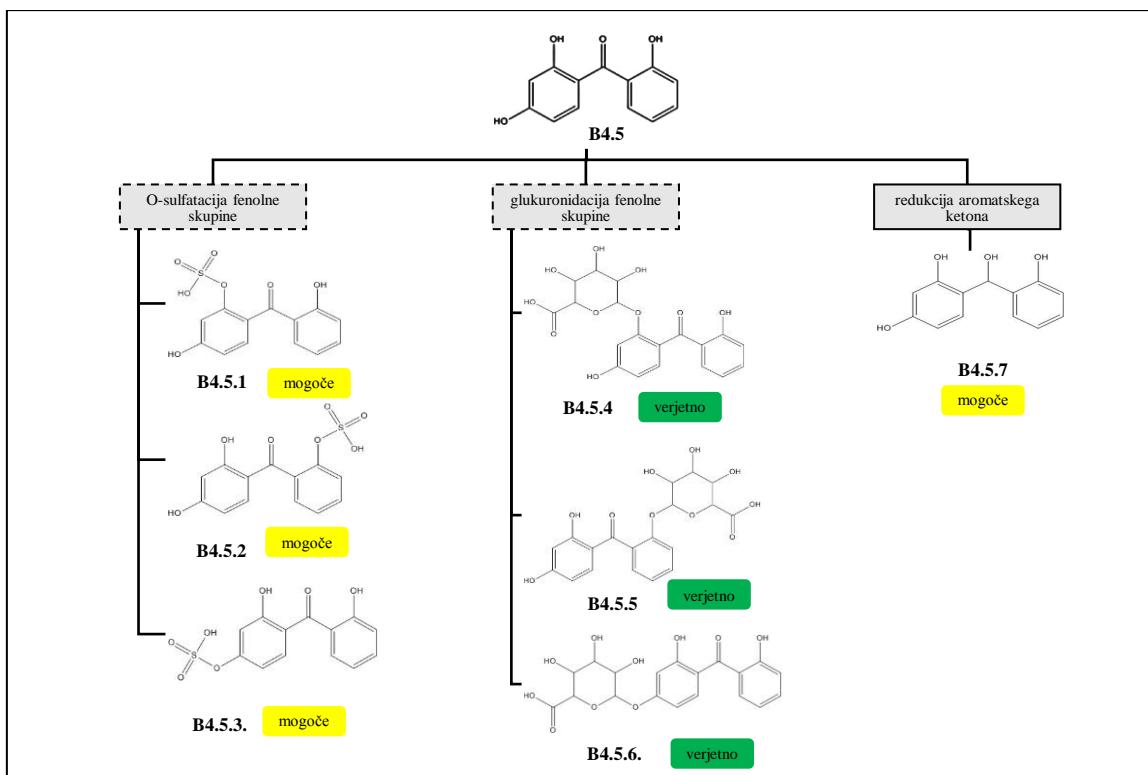
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B4.1** in **B4.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B4.3** in **B4.4** (verjetno)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **B4.5** (verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **B4.6** (mogoče)



Slika 10: Napovedna shema metabolizma spojine B4; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 7. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **B4.5**

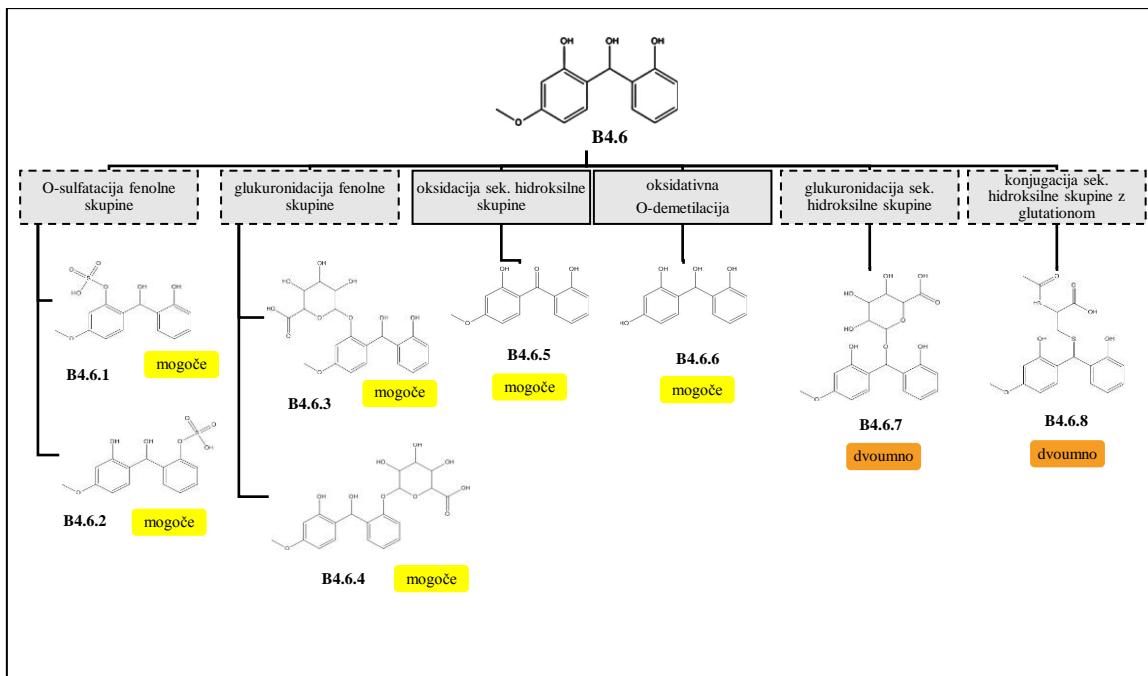
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B4.5.1**, **B4.5.2** in **B4.5.3** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B4.5.4**, **B4.5.5** in **B4.5.6** (verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **B4.5.7** (mogoče)



Slika 11: Napovedna shema metabolizma spojine B4.5; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 8. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **B4.6**

- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **B4.6.1** in **B4.6.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **B4.6.3** in **B4.6.4** (mogoče)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B4.6.5**, ki je enak produktu B4 (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **B4.6.6**, ki je enak produktu B4.5.7 (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **B4.6.7** (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **B4.6.8** (dvoumno)

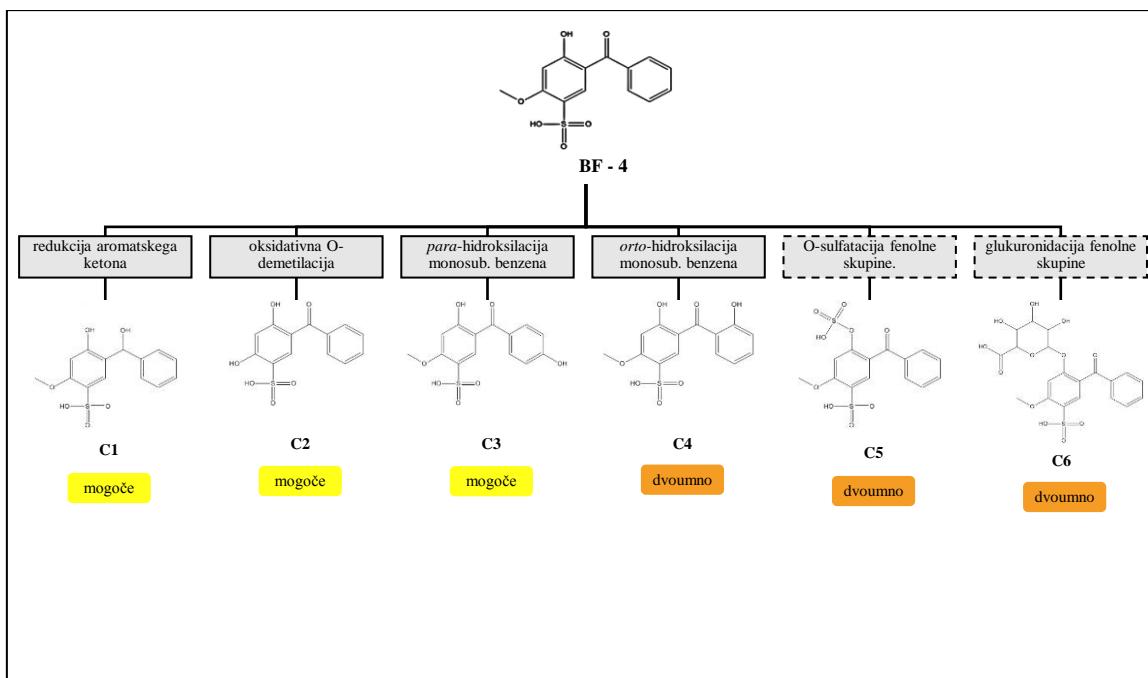


#### 4.1.3 BENZOFENON-4

Program nam v prvi stopnji poda šest različnih poti metabolizma:

##### 1. stopnja

- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **C1** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **C2** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana *para*-hidroksilacija na monosubstituiranem benzenu do produkta **C3** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana *ortho*-hidroksilacija na monosubstituiranem benzenu do produkta **C4** (dvoumno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produkta **C5** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produkta **C6** (dvoumno)



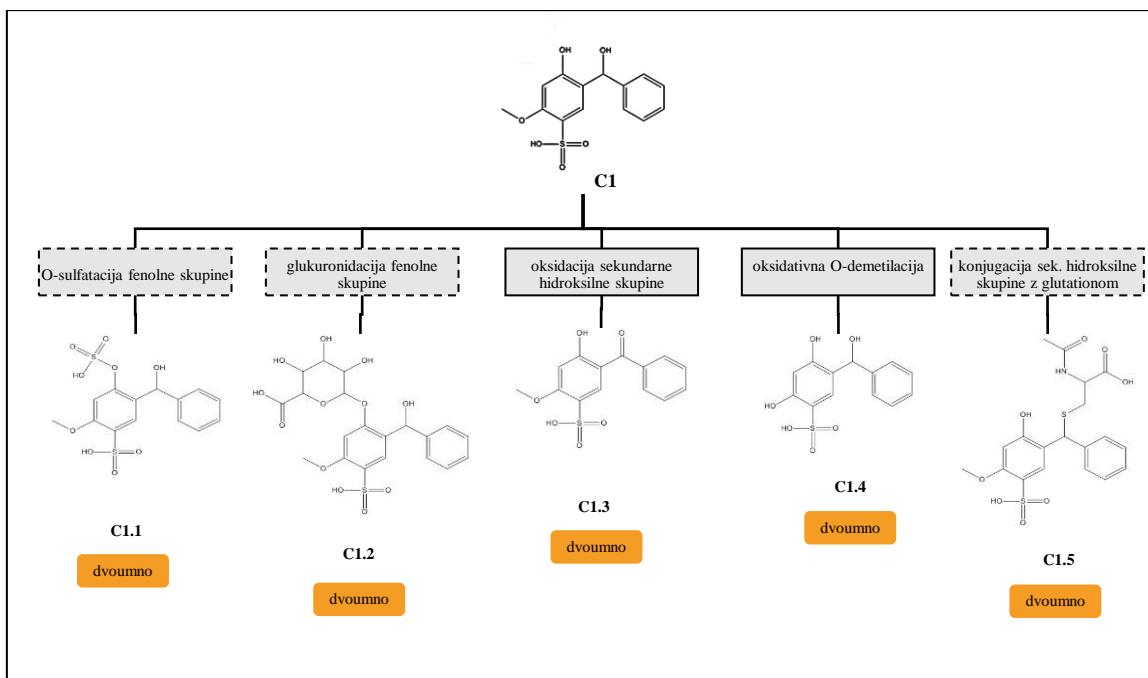
Slika 13: Napovedna shema metabolizma BF-4; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

Za produkte **C1**, **C2**, **C3** in **C4** program napove nadaljnji metabolizem:

## 2. stopnja

### 1. Napoved nadalnjega metabolizma produkta **C1**

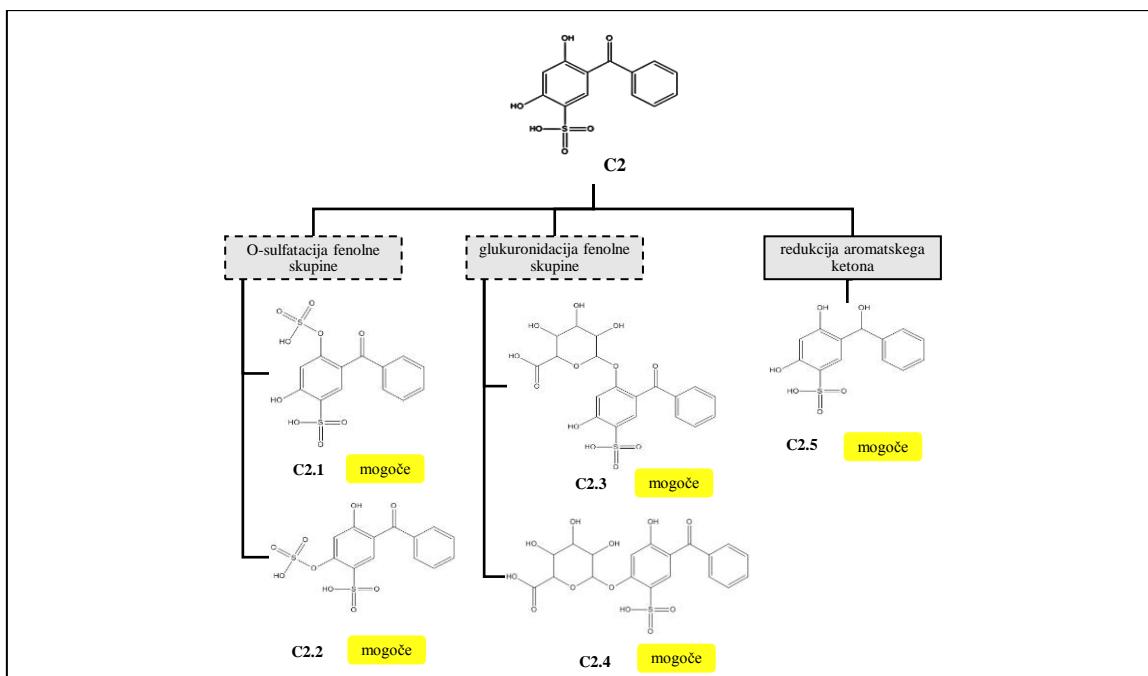
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produkta **C1.1** (dvouumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produkta **C1.2** (dvouumno)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **C1.3**, ki je enak izhodnemu benzofenonu-4 (dvouumno)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetylacija do produkta **C1.4**, ki je enak produktu C2.5 pri katerem je tudi napovedan nadaljnji metabolizem (dvouumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **C1.5** (dvouumno)



Slika 14: Napovedna shema metabolizma spojine C1; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 2. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **C2**

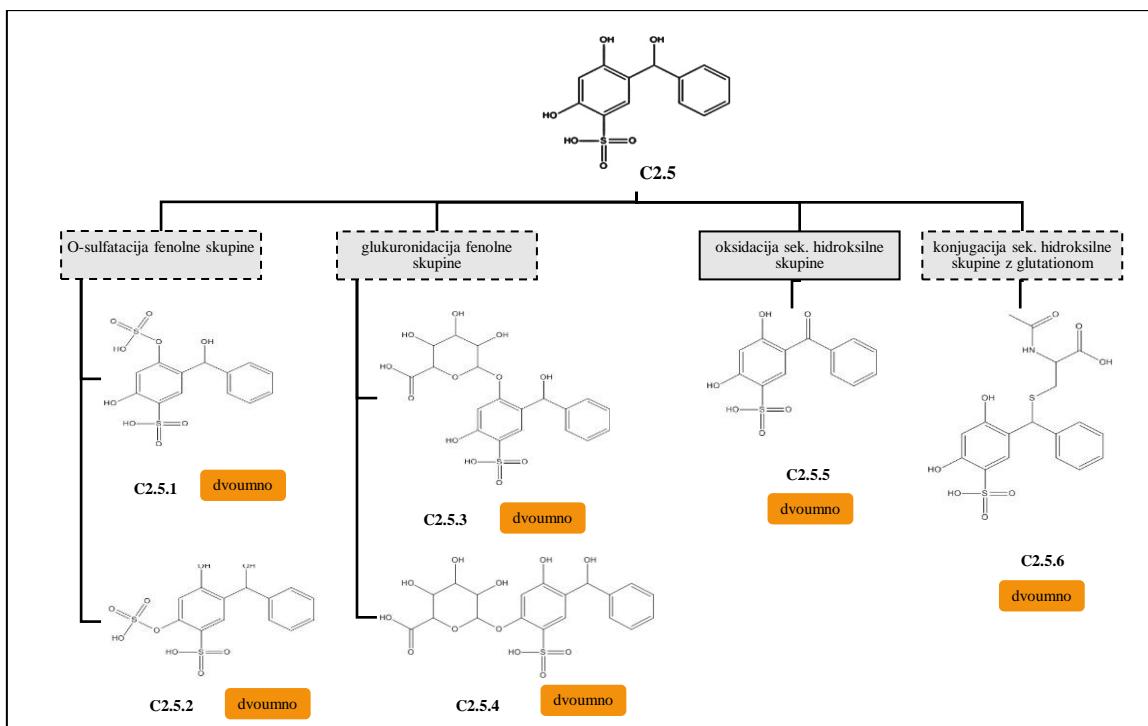
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C2.1** in **C2.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C2.3** in **C2.4** (mogoče)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **C2.5**, ki je enak produktu C1.4 (mogoče)



Slika 15: Napovedna shema metabolizma spojine C2; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

### 3. Napoved nadaljnega metabolizma produkta C2.5

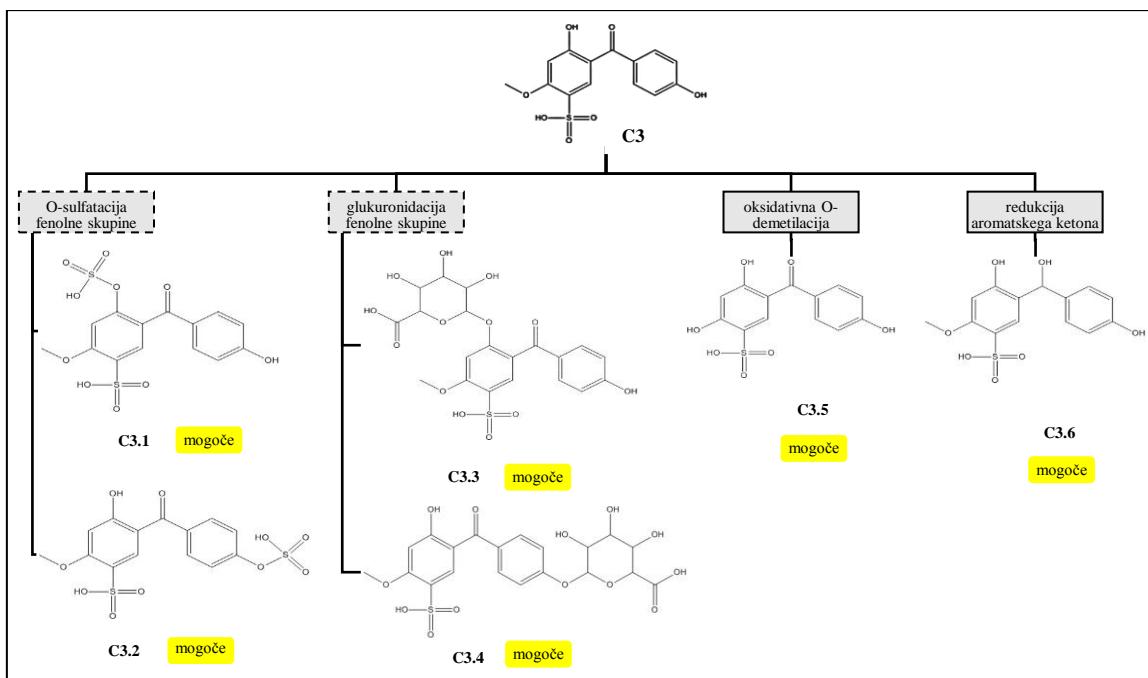
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C2.5.1** in **C2.5.2** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C2.5.3** in **C2.5.4** (dvoumno)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **C2.5.5**, ki je enak produktu C2 (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **C2.5.6** (dvoumno)



Slika 16: Napovedna shema metabolizma spojine C2.5; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

#### 4. Napoved nadaljnega metabolizma produkta C3

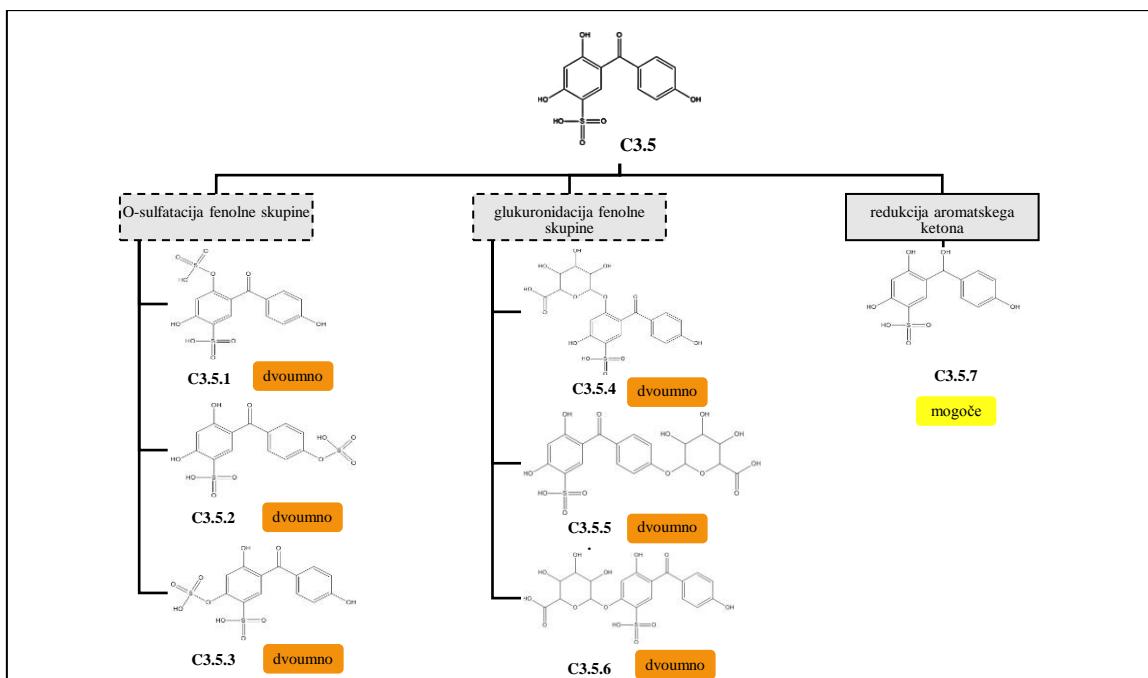
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C3.1** in **C3.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C3.3** in **C3.4** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **C3.5** (mogoče)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **C3.6** (mogoče)



Slika 17: Napovedna shema metabolizma spojine C3; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 5. Napoved nadaljnega metabolizma produkta C3.5

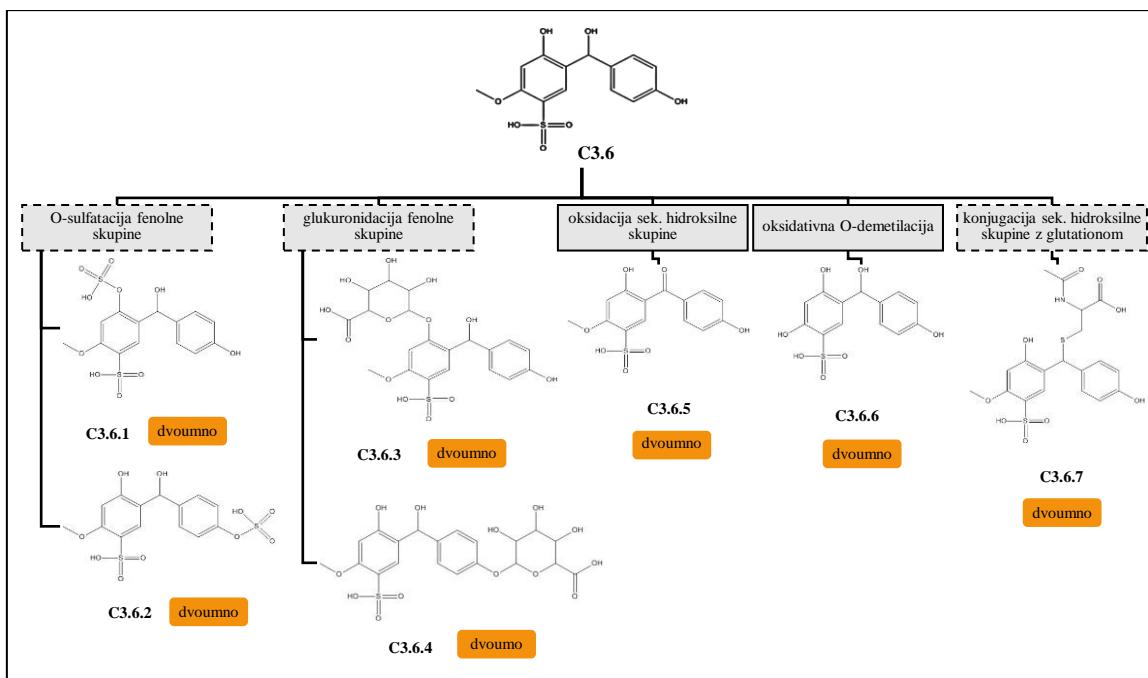
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C3.5.1**, **C3.5.2** in **C3.5.3** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C3.5.4**, **C3.5.5** in **C3.5.6** (dvoumno)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **C3.5.7** (mogoče)



Slika 18: Napovedna shema metabolizma spojine C3.5; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 6. Napoved nadalnjega metabolizma produkta C3.6

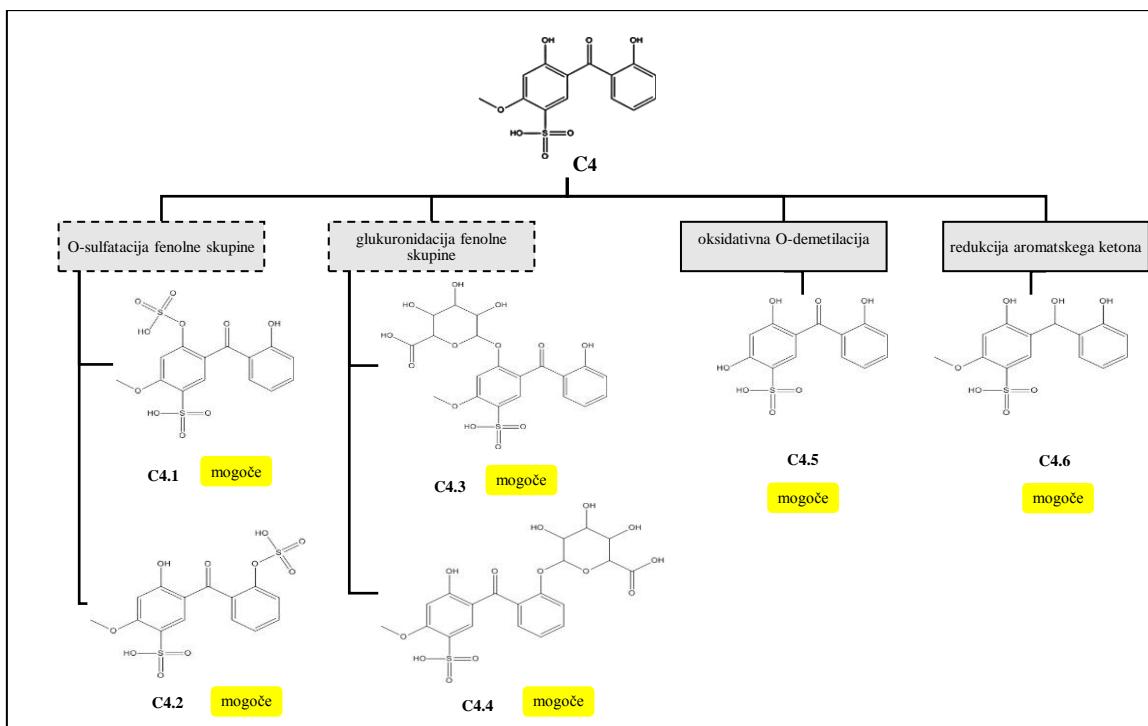
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C3.6.1** in **C3.6.2** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C3.6.3** in **C3.6.4** (dvoumno)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **C3.6.5**, ki je enak produktu C3 (dvoumno)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **C3.6.6**, ki je enak produktu C3.5.7 (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **C3.6.7** (dvoumno)



Slika 19: Napovedna shema metabolizma spojine C3.6; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 7. Napoved nadaljnega metabolizma produkta C4

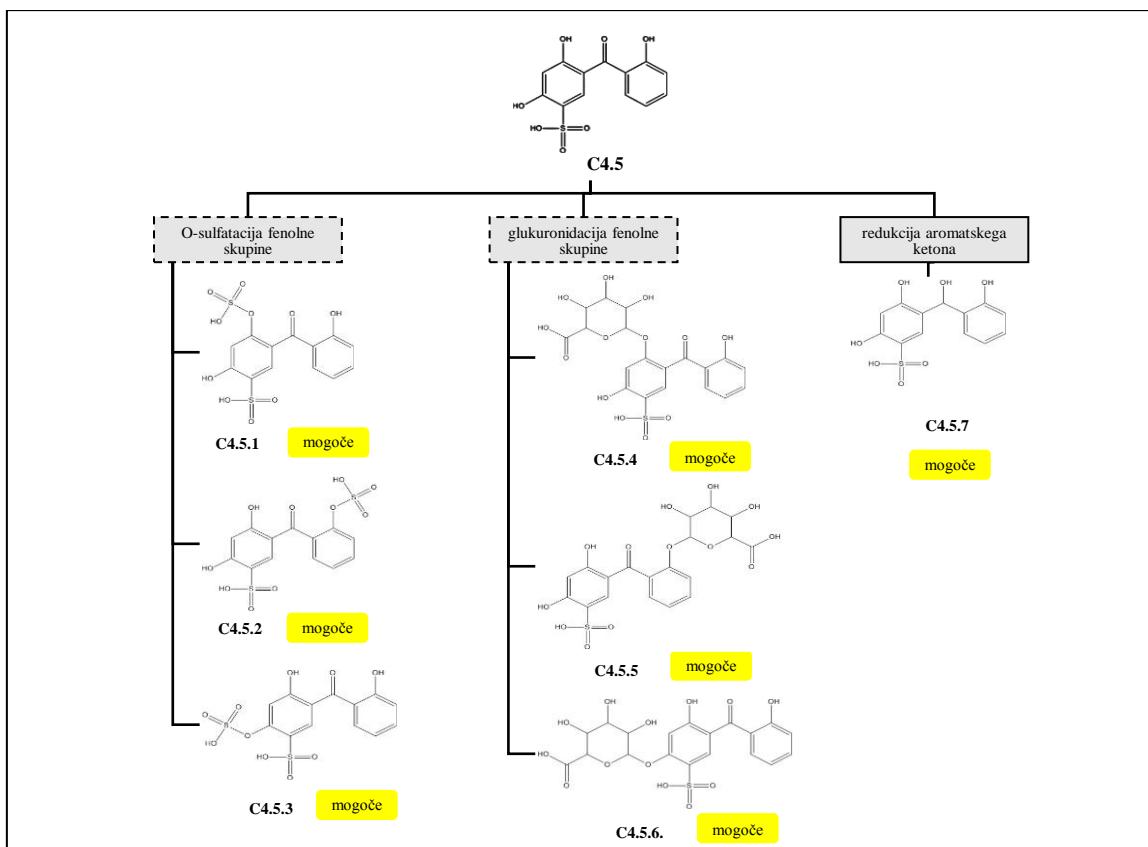
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C4.1** in **C4.2** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C4.3** in **C4.4** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **C4.5** (mogoče)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **C4.6** (mogoče)



Slika 20: Napovedna shema metabolizma spojine C4; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

#### 8. Napoved nadaljnega metabolizma produkta C4.5

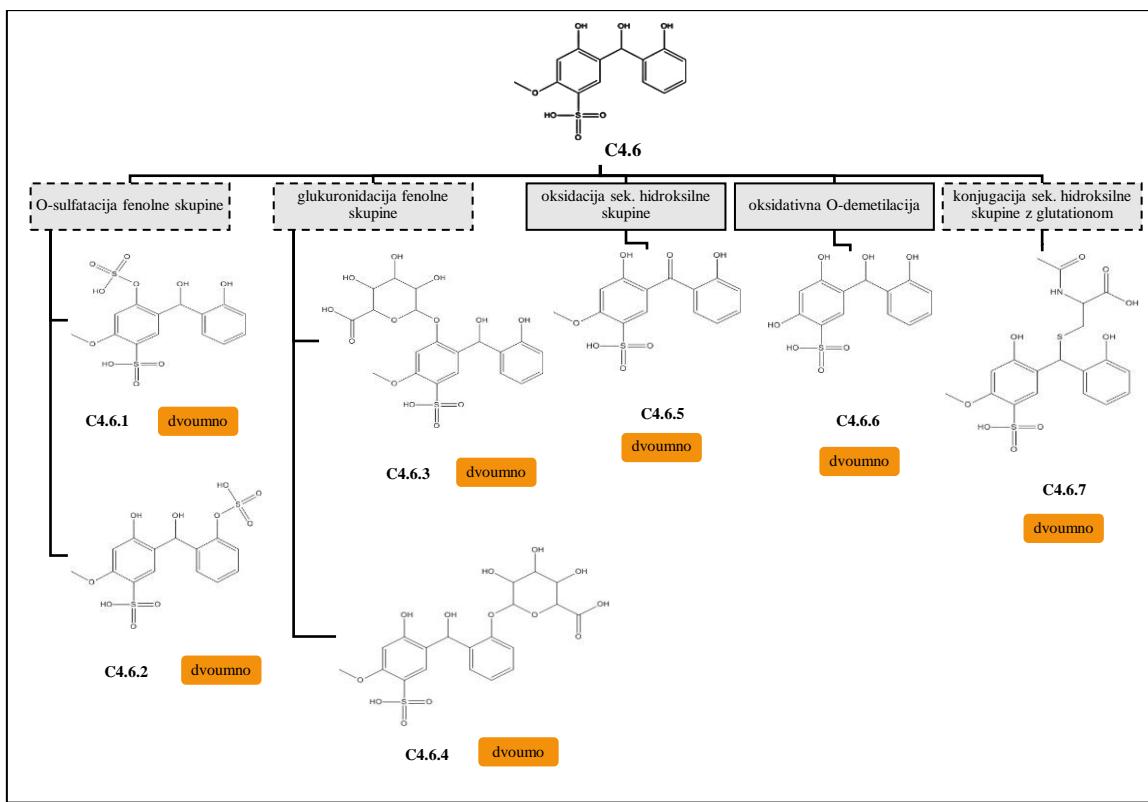
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C4.5.1, C4.5.2** in **C4.5.3 (mogoče)**
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C4.5.4, C4.5.5** in **C4.5.6 (mogoče)**
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **C4.5.7 (mogoče)**



Slika 21: Napovedna shema metabolizma spojine C4.5; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 9. Napoved nadaljnega metabolizma produkta C4.6

- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **C4.6.1** in **C4.6.2** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **C4.6.3** in **C4.6.4** (dvoumno)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **C4.6.5**, ki je enak produktu C4 (dvoumno)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetylacija do produkta **C4.6.6**, ki je enak produktu C4.5.7 (dvoumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **C4.6.7** (dvoumno)



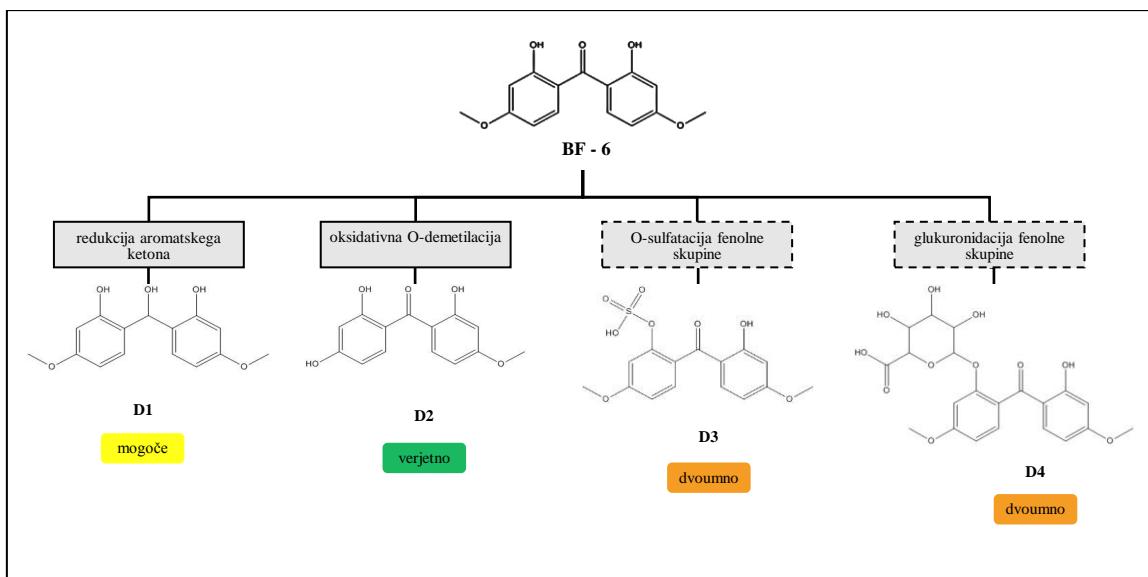
Slika 22: Napovedna shema metabolizma spojine C4.6; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

#### 4.1.4 BENZOFENON-6

Program nam v prvi stopnji poda štiri različne poti metabolizma:

##### 1. stopnja

- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **D1** (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **D2** (verjetno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produkta **D3** (dvoumno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produkta **D4** (dvoumno)



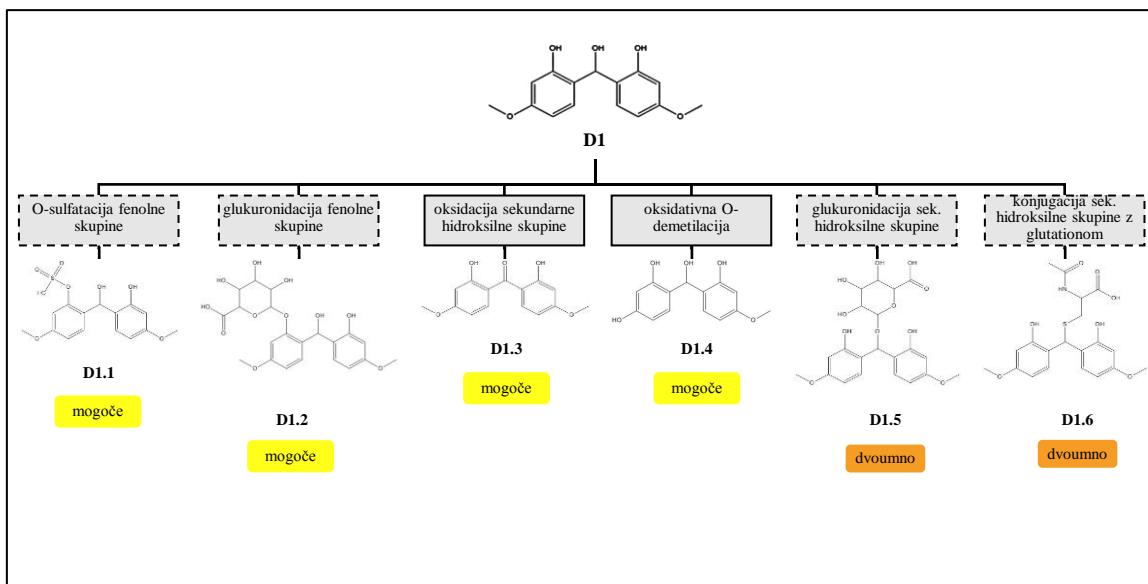
Slika 23: Napovedna shema metabolizma BF-6; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

Za produkta **D1** in **D2** program napove nadaljnji metabolizem:

## 2. stopnja

### 1. Napoved nadalnjega metabolizma produkta **D1**

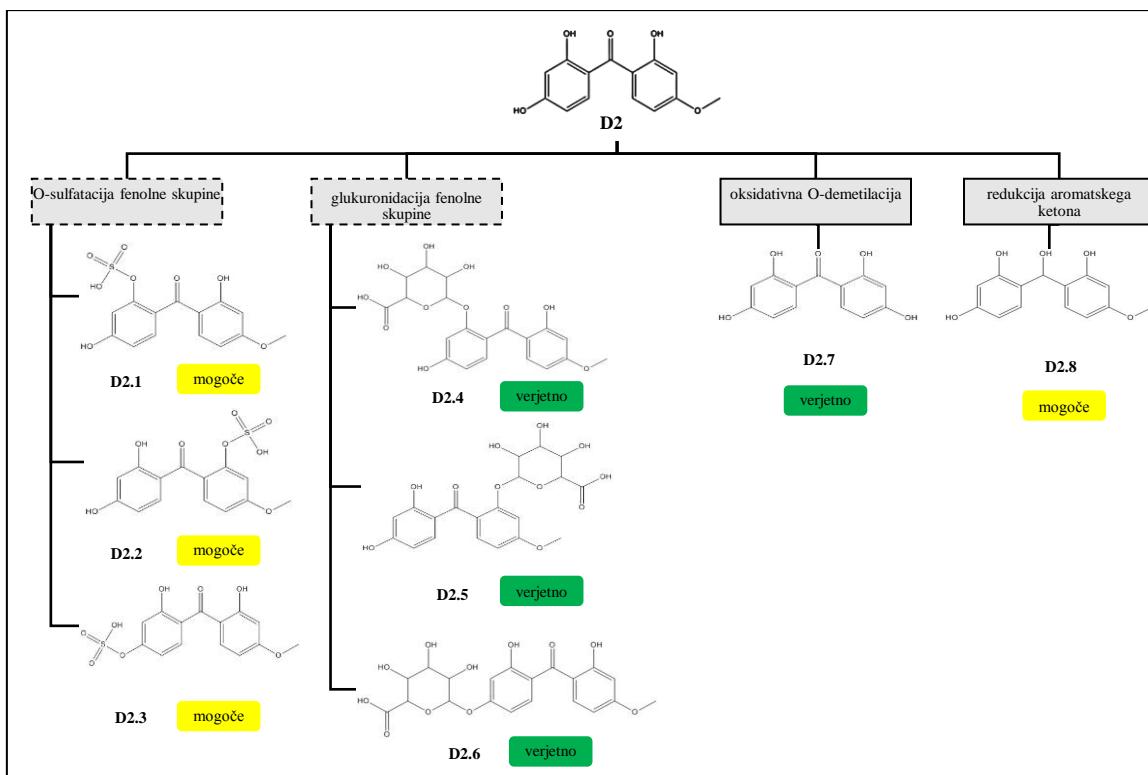
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produkta **D1.1** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produkta **D1.2** (mogoče)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **D1.3**, ki je enak izhodnemu benzofenonu-6 (mogoče)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **D1.4**, ki je enak produktu D2.8. pri katerem je tudi napovedan nadaljni metabolizem (mogoče)
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **D1.5** (dvouumno)
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **D1.6** (dvouumno)



Slika 24: Napovedna shema metabolizma spojine D1; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

## 2. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **D2**

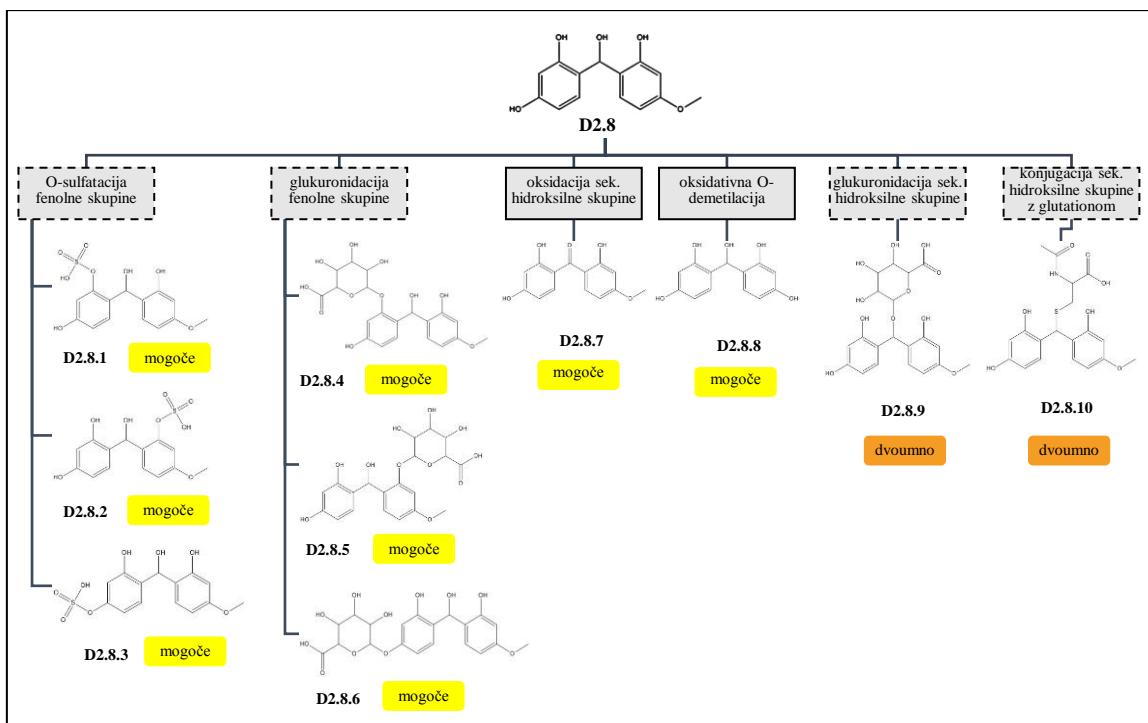
- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **D2.1**, **D2.2** in **D2.3** (mogoče)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **D2.4**, **D2.5** in **D2.6** (verjetno)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **D2.7**, ki je enak BF-2 pri katerem je tudi napovedan nadaljnji metabolizem (verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija aromatskega ketona do produkta **D2.8**, ki je enak produktu D1.4 (mogoče)



Slika 25: Napovedna shema metabolizma spojine D2; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

### 3. Napoved nadaljnega metabolizma produkta **D2.8**

- S SULT katalizirana O-sulfatacija fenolne skupine do produktov **D2.8.1**, **D2.8.2** in **D2.8.3 (mogoče)**
- Z UGT katalizirana glukuronidacija fenolne skupine do produktov **D2.8.4**, **D2.8.5** in **D2.8.6 (mogoče)**
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **D2.8.7**, ki je enak produktu D2 (**mogoče**)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **D2.8.8**, ki je enak produktu A1 pri katerem je tudi napovedan nadaljnji metabolizem (**mogoče**)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija sekundarne hidroksilne skupine do produkta **D2.8.9 (dvoumno)**
- Konjugacija sekundarne hidroksilne skupine z glutationom do produkta **D2.8.10 (dvoumno)**



Slika 26: Napovedna shema metabolizma spojine D2.8; legenda: polna črta okvirja – reakcija metabolizma I. faze, prekinjena črta okvirja – reakcija metabolizma II. faze.

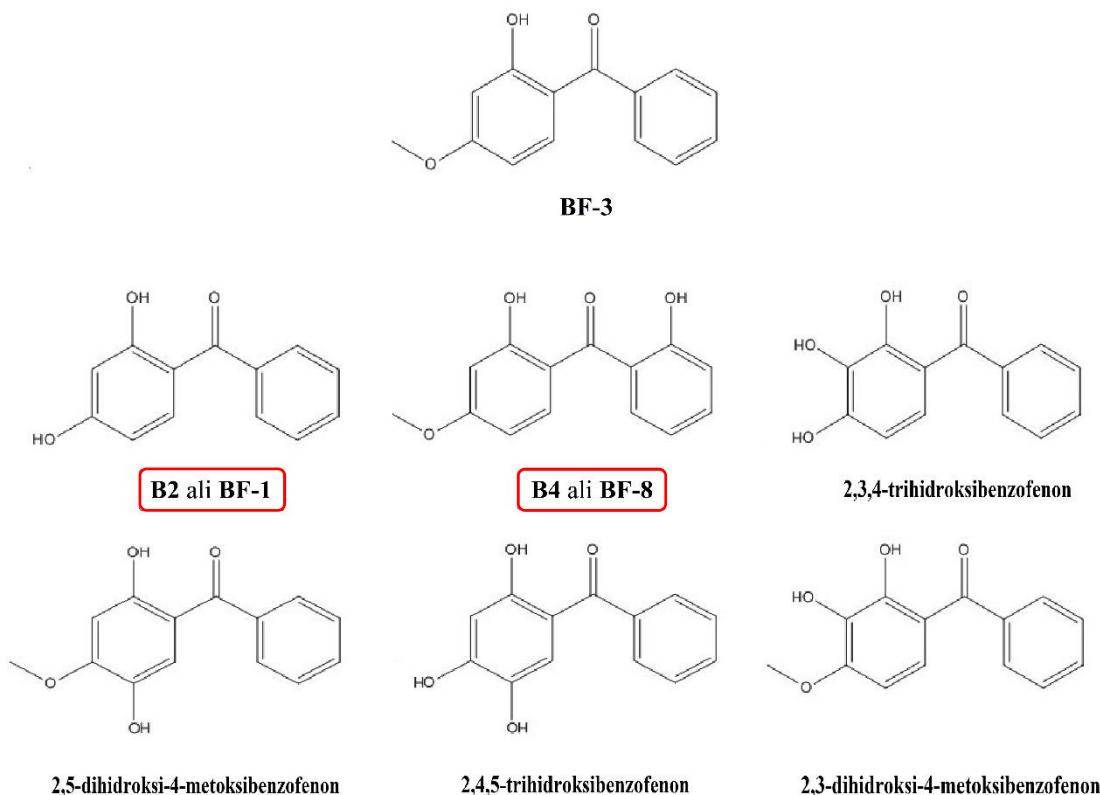
#### 4.1.5 RAZPRAVA

Računalniški program Meteor Nexus je kot najverjetnejšo reakcijo v prvi stopnji metabolizma derivatov benzofenona s prisotno metoksi skupino (**BF-3**, **BF-4** in **BF-6**), napovedal demetilacijo, ki ji v drugi stopnji sledi glukuronidacija ali v primeru **BF-6** tudi druga demetilacija. Kot mogoči reakciji prve stopnje je program pri vseh preučevanih derivatih benzofenona najpogosteje napovedal še redukcijo ketona in *para*-hidroksilacijo. Pri demetiliranem metabolitu **BF-3** in **BF-6** je najbolj verjetna reakcija napovedana glukuronidacija, medtem ko je sulfatacijo označil le kot mogočo.

Z *in vivo* raziskavo farmakokinetike in metabolizma **BF-2** na podganah so v njihovi krvi po peroralnem dajanju različnih odmerkov ugotovili prisotnost in identiteto metabolitov. Prevladujeta reakcija sulfatacije, katere produkt ustreza tudi našemu metabolitu **A2** in reakcija glukuronidacije, katere produkt ustreza našemu metabolitu **A4**. Naš program je reakcije sulfatacije in glukuronidacije napovedal kot dvoumne, medtem ko je kot mogočo reakcijo napovedal redukcijo ketona, ki vodi do metabolita **A1**, ki pa ga v omenjeni raziskavi niso zasledili (100).

Z raziskavo in analizo plazme podgan po peroralni aplikaciji **BF-3** so ugotovili prisotnost treh metabolitov. Glavna metabolita sta bila 2,4-dihidroksibenzofenon in 2,2'-dihidroksi-4-metoksibenzofenon. Prvi nastane z O-demetilacijo in ustreza našemu metabolitu **B2**, v literaturi pa ga imenujejo tudi **BF-1**, medtem ko drugi nastane z *ortho*-hidroksilacijo in ustreza našemu metabolitu **B4**, znan pa je tudi kot **BF-8**. Prvega je naš program napovedal kot verjetnega, medtem ko je nastanek drugega označil kot dvoumnega. V sledovih pa so v tej raziskavi zaznali še **2,3,4-trihidroksibenzofenon**, katerega naš program ni napovedal (glej Sliko 27) (101). Enake tri metabolite **BF-3** so dokazale tudi nekatere druge raziskave, in sicer po topikalnem nanosu na kožo podgan kot tudi *ex vivo* raziskava na podganjih hepatocitih (16, 102, 103). V raziskavi na ljudeh so na kožo aplicirali komercialno dostopno kremo za sončenje in zbirali vzorce urina v katerih so zaznali le **BF-3** in njegov metabolit **BF-1** (spojina **B2**) (104). V novejši *in vitro* raziskavi so inkubirali podganje in človeške jetrne mikrosome ob prisotnosti NADPH in **BF-3** ter določali najpogostejše metabolite. V nasprotju s prejšnjimi raziskavami so v tej kot glavni metabolit identificirali 5-hidroksi-substituiran derivat **2,5-dihidroksi-4-metoksibenzofenon** poleg že znanega 2,4-dihidroksibenzofenona (**B2** oz. **BF-1**) (glej Sliko 27). Naš program tega metabolita ni

napovedal (105). Kot možna razlaga nastanka 5-hidroksi derivata **BF-3** se navaja to, da je mesto 5 relativno elektronsko bogato in je zaradi tega lahka tarča citokromov P450. V zadnjem času pa so odkrili s pomočjo podganjih in človeških mikrosomov še dva nova metabolita, in sicer **2,4,5-trihidroksibenzofenon** in **2,3-dihidroksi-4-metoksibenzofenon**, katerih nastanek naš program ni napovedal (glej Sliko 27) (106).



Slika 27: BF-3 in metaboliti, ki so jih zaznali v *in vitro/in vivo* raziskavah; z rdečo sta obrobljena metabolita, ki smo ju napovedali tudi z *in silico* metodo.

Program je za **BF-4** kot mogočo reakcijo metabolizma napovedal bodisi redukcijo ketona, demetilacijo ali *para*-hidroksilacijo. Kot mogoče je označil tudi potek nadaljnega metabolizma demetiliranega in *para*-hidroksiliranega metabolita v smeri sulfatacije, glukuronidacije, redukcije ali tudi demetilacije v primeru *para*-hidroksiliranega metabolita. V primeru **BF-6** pa je program kot najbolj verjetno napovedal reakcijo demetilacije, ki ji sledi glukuronidacija ali druga demetilacija, ki ji nato prav tako sledi glukuronidacija. Kot mogočo je označil tudi reakcijo redukcije z možnostjo nadaljevanja metabolizma v smeri sulfatacije, glukuronidacije ali demetilacije.

Za zadnja dva derivata benzofenona je metabolizem z *in vitro* in *in vivo* raziskavami sicer še slabo raziskan. Na osnovi ugotovitev, ki smo jih dobili pri **BF-2** in **BF-3**, lahko sklepamo, da je tudi v primeru teh dveh derivatov benzofenona najverjetnejša reakcija metabolizma O-

demetilacija. V primeru **BF-4** sklepamo tudi na možnost *para*- ali *ortho*-hidroksilacije, pri **BF-6** pa na drugo O-demetilacijo. Tem reakcijam metabolizma domnevno sledi še reakcija glukuronidacije ali O-sulfatacije.

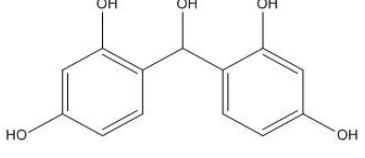
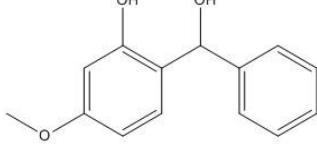
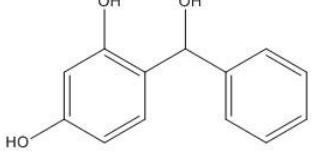
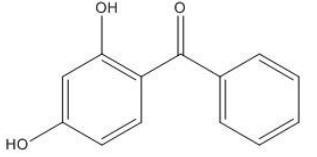
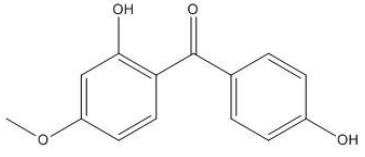
Kljub pomembnosti raziskav, ki vključujejo derivate benzofenona, ki so komercialno dostopni v raznih kozmetičnih in drugih izdelkih, je pomembno tudi, da se vprašamo ali imajo vpliv na človeško telo tudi njihovi metaboliti. V *in vivo* raziskavi so pokazali, da se koncentracija glavnih metabolitov v krvi podgan zmanjšuje počasneje od koncentracije **BF-3**, kar lahko nakazuje na to, da imajo lahko metaboliti na dolgi rok pomembnejšo vlogo pri nastanku neželenih učinkov kot izhodne spojine in jih zato pri študijah varnosti ne smemo zanemariti (101).

Izkazalo se je, da je program Meteor Nexus napovedal le nekatere metabolite, ki so jih identificirali v *in vitro* in *in vivo* študijah. V primeru **BF-3** ni napovedal *meta*-hidroksilacije kljub temu, da se ti metaboliti pogosto pojavljajo v študijah metabolizma. Poleg tega pa tudi verjetnost napovedi posameznih metabolitov pogosto ni primerljiva s tistimi, dobljenimi v literaturi. Program sicer pokaže širok razpon možnih metabolitov, vendar pa je še vedno potrebna primerjava z rezultati že obstoječih študij ali nove *in vitro/in vivo* študije, da se ovrednoti in potrdi dobljene rezultate.

## 4.2 ZBRANI METABOLITI

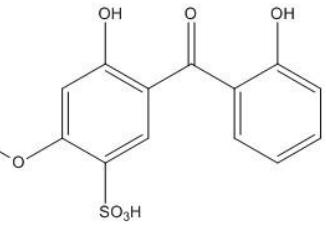
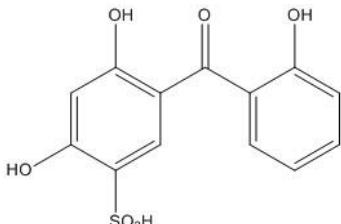
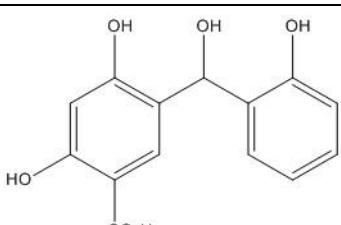
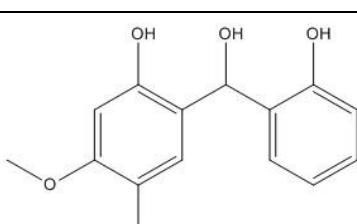
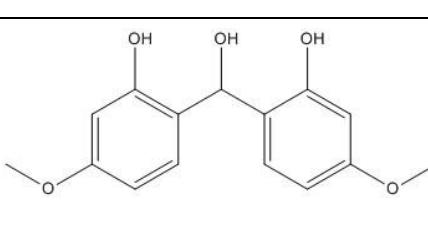
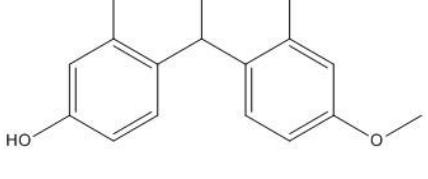
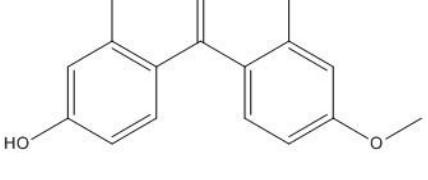
Za nadaljnjo raziskavo endokrini učinkov in reproduktivne toksičnosti izbranih derivatov benzofenona smo izbrali 26 metabolitov I. faze biotransformacije, ki jih je napovedal program Meteor Nexus. Razlog, da nismo vključili tudi metabolitov II. faze je v tem, da ti metaboliti zaradi konjugacije večinoma izgubijo aktivnost in se zaradi povečane vodotopnosti hitro izločijo iz telesa. Izbrani metaboliti so predstavljeni v preglednici V s pripadajočo struktorno formulo, kodo SMILES in vrednostjo logP.

Preglednica V: Zbrani metaboliti izbranih derivatov benzofenona za nadaljno raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti; legenda: metaboliti reakcij prve stopnje so podprtani, vsi ostali pa so metaboliti reakcij druge stopnje.

| Številčna oznaka                    | Metabolit izbranega derivata benzofenona  | Koda SMILES                        | Izhodni derivat benzofenona | logP  |
|-------------------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------|-------|
| <b>1</b><br><b>(A1,<br/>D2.8.8)</b> |    | c1(c(ccc(c1)O)C(=O)c1cc(O)c(O)c1)O | <b>BF-2</b>                 | -0,32 |
| <b>2</b><br><b>(B1)</b>             |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(c1cccc1)O)O       | <b>BF-3</b>                 | 1,83  |
| <b>3</b><br><b>(B1.4,<br/>B2.5)</b> |  | c1(c(ccc(c1)O)C(=O)c1cccc1)O       | <b>BF-3</b>                 | 1,07  |
| <b>4</b><br><b>(B2,<br/>B2.5.5)</b> |  | c1(c(ccc(c1)O)C(=O)c1cccc1)O       | <b>BF-3</b>                 | 3,01  |
| <b>5</b><br><b>(B3,<br/>B3.6.5)</b> |  | c1(c(ccc(c1)OC(=O)c1ccc(cc1)O)O)O  | <b>BF-3</b>                 | 3,03  |

|  |  |  |             |       |
|--|--|--|-------------|-------|
| <b>6</b><br><b>(B3.5)</b>                |  | c1(c(ccc(c1)O)C(=O)c1ccc(cc1)O)O         | <b>BF-3</b> | 2,39  |
| <b>7</b><br><b>(B3.5.7,<br/>B3.6.6)</b>  |  | c1(c(ccc(c1)O)C(c1ccc(cc1)O)O)O          | <b>BF-3</b> | 0,40  |
| <b>8</b><br><b>(B3.6)</b>                |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(c1ccc(cc1)O)O)O         | <b>BF-3</b> | 1,17  |
| <b>9</b><br><b>(B4,<br/>B4.6.5)</b>      |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1c(cccc1)O)O        | <b>BF-3</b> | 3,49  |
| <b>10</b><br><b>(B4.5)</b>               |  | c1(c(ccc(c1)O)C(=O)c1c(cccc1)O)O         | <b>BF-3</b> | 2,85  |
| <b>11</b><br><b>(B4.5.7,<br/>B4.6.6)</b> |  | c1(c(ccc(c1)O)C(c1c(cccc1)O)O)O          | <b>BF-3</b> | 0,35  |
| <b>12</b><br><b>(B4.6)</b>               |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(c1c(cccc1)O)O)O         | <b>BF-3</b> | 1,12  |
| <b>13</b><br><b>(C1)</b>                 |  | c1(c(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)O)C(c1cccc1)O)O | <b>BF-4</b> | -0,95 |

|  |  |   |             |       |
|--|--|---|-------------|-------|
| <b>14</b><br><b>(C1.4,<br/>C2.5)</b>     |  | c1(c(cc(c(c1)O)S(=O)(=O)O)C(c1cccc1)O)O       | <b>BF-4</b> | -1,72 |
| <b>15</b><br><b>(C2,<br/>C2.5.5)</b>     |  | c1(c(cc(c(c1)O)S(=O)(=O)O)C(=O)c1cccc1)O      | <b>BF-4</b> | 0,22  |
| <b>16</b><br><b>(C3,<br/>C3.6.5)</b>     |  | c1(c(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)O)C(=O)c1ccc(cc1)O)O | <b>BF-4</b> | 0,24  |
| <b>17</b><br><b>(C3.5)</b>               |  | c1(c(cc(c(c1)O)S(=O)(=O)O)C(=O)c1ccc(cc1)O)O  | <b>BF-4</b> | -0,40 |
| <b>18</b><br><b>(C3.6)</b>               |  | c1(c(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)O)C(c1ccc(cc1)O)O)O  | <b>BF-4</b> | -1,62 |
| <b>19</b><br><b>(C3.5.7,<br/>C3.6.6)</b> |  | c1(c(cc(c(c1)O)S(=O)(=O)O)C(c1cccc1)O)O       | <b>BF-4</b> | -2,39 |

|  |   |   |             |       |
|--|---|---|-------------|-------|
| <b>20</b><br><b>(C4,<br/>C4.6.5)</b>     |    | c1(c(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)O)C(=O)c1c(cccc1)O)O | <b>BF-4</b> | 0,70  |
| <b>21</b><br><b>(C4.5)</b>               |    | c1(c(cc(c(c1)O)S(=O)(=O)O)C(=O)c1c(cccc1)O)O  | <b>BF-4</b> | 0,06  |
| <b>22</b><br><b>(C4.5.7,<br/>C4.6.6)</b> |    | c1(c(cc(c(c1)O)S(=O)(=O)O)C(=O)c1c(cccc1)O)O  | <b>BF-4</b> | -2,44 |
| <b>23</b><br><b>(C4.6)</b>               |  | c1(c(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)O)C(=O)c1c(cccc1)O)O | <b>BF-4</b> | -1,67 |
| <b>24</b><br><b>(D1)</b>                 |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(c1c(cc(c1)OC)O)O)O           | <b>BF-6</b> | 1,22  |
| <b>25</b><br><b>(D1.4,<br/>D2.8)</b>     |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(c1c(cc(c1)OC)O)O)O           | <b>BF-6</b> | 0,45  |
| <b>26</b><br><b>(D2,<br/>D2.8.7)</b>     |  | c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1c(cc(c1)OC)O)O          | <b>BF-6</b> | 2,85  |

## 4.3 NAPOVED ENDOKRINEGA DELOVANJA

### 4.3.1 REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM VEGA QSAR

Za napovedovanje endokrine toksičnosti kot posledico vezave derivatov benzofenona in njihovih metabolitov na ER smo uporabili program VEGA QSAR in izbrali **Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model** (IRFMN; v. 1.0.1.). Poleg aktivnosti oz. neaktivnosti nam je program podal še stopnjo zanesljivosti napovedi kot nizko (\*), srednjo (\*\*) ali visoko zanesljivost (\*\*\*)�.

Rezultati verjetnosti vezave na ER za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona so predstavljeni v preglednici VI:

- Za **negativno kontrolo – timol**, je program predvidel, da ni aktivен na ER, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela, zaradi česar je zanesljivost napovedi visoka.
- Za **pozitivno kontrolo – BPA**, je program predvidel, da je aktivna na ER, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela. zaradi česar je zanesljivost napovedi visoka.
- Za **BF-2** je program predvidel, da ni aktiven na ER, medtem ko eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela kažejo, da je aktiven na ER. Zaradi tega je zanesljivost napovedi nizka.
- Za **BF-3** in **BF-4** je program s srednjo oziroma nizko zanesljivostjo napovedal, da sta aktivna na ER.
- Za **BF-6** je program z nizko zanesljivostjo napovedal, da ni aktivnen na ER.

*Preglednica VI: Rezultati napovedi aktivnosti na ER s programom VEGA QSAR za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona; legenda: \*\*\* – visoka zanesljivost, \*\* – srednja zanesljivost, \* – nizka zanesljivost; rdeče – spojina je aktivna na ER z veliko zanesljivostjo, svetlo rdeče – spojina je aktivna na ER, ampak obstaja možnost, da se nahaja izven območja uporabnosti modela, zeleno – spojina ni aktivna na ER z veliko zanesljivostjo, svetlo zeleno – spojina ni aktivna na ER, ampak obstaja možnost, da se nahaja izven območja uporabnosti modela; dodatna oznaka E – v podatkovni bazi modela ostajajo eksperimentalni podatki o tej spojni.*

| SPOJINA                   | REZULTAT |
|---------------------------|----------|
| <b>timol (- kontrola)</b> | *** (E)  |
| <b>BPA (+ kontrola)</b>   | *** (E)  |
| <b>BF-2</b>               | * (E)    |
| <b>BF-3</b>               | **       |
| <b>BF-4</b>               | *        |
| <b>BF-6</b>               | *        |

Rezultati verjetnosti vezave na ER za izbrane metabolite derivatov benzofenona so predstavljeni v preglednici VII:

- Za reducirani metabolit **BF-2** (1) je program z nizko zanesljivostjo napovedal, da ni aktivni na ER.
- Za metabolite **BF-3**, ki nastanejo po demetilaciji (3, 4, 6, 7) ali redukciji (2) je program napovedal, da so aktivni na ER, in sicer za metabolita 2 in 3 z nizko oziroma srednjo zanesljivostjo, za metabolite 4, 6 in 7 pa z visoko zanesljivostjo. Za metabolita 4 in 6 aktivnost na ER potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela in je zato zanesljivost napovedi visoka.
- Za *para*-hidroksiliran metabolit **BF-3** (5) in njegov reducirani metabolit (8) je program s srednjo oziroma visoko zanesljivostjo napovedal, da nista aktivna na ER.
- Za *erto*-hidroksilirane metabolite **BF-3** (9-12) je program napovedal, da niso aktivni na ER. Za metabolita 9 in 12 je zanesljivost napovedi visoka za ostala dva pa nizka. Pri metabolitu 9 neaktivnost na ER potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela, kar poveča zanesljivost napovedi.
- Za vse metabolite **BF-4** (13-23) je program z nizko zanesljivostjo napovedal, da so aktivni na ER.
- Za vse metabolite **BF-6** (24-26) je program napovedal, da niso aktivni na ER in sicer za reducirani metabolit (24) z visoko zanesljivostjo, za ostala dva pa z nizko zanesljivostjo.

*Preglednica VII: Rezultati napovedi aktivnosti na ER s programom VEGA QSAR za izbrane metabolite derivatov benzofenona; legenda: \*\*\* – visoka zanesljivost, \*\* – srednja zanesljivost, \* – nizka zanesljivost; rdeče – spojina je aktivna na ER z veliko zanesljivostjo, svetlo rdeče – spojina je aktivna na ER, ampak obstaja možnost, da se nahaja izven območja uporabnosti modela, zeleno – spojina ni aktivna na ER z veliko zanesljivostjo, svetlo zeleno – spojina ni aktivna na ER, ampak obstaja možnost, da se nahaja izven območja uporabnosti modela; dodatna oznaka E – v podatkovni bazi modela ostajajo eksperimentalni podatki o tej spojini.*

| METABOLIT | REZULTAT |
|-----------|----------|
| <b>1</b>  | *        |
| <b>2</b>  | *        |
| <b>3</b>  | **       |
| <b>4</b>  | *** (E)  |
| <b>5</b>  | **       |
| <b>6</b>  | *** (E)  |
| <b>7</b>  | ***      |
| <b>8</b>  | ***      |
| <b>9</b>  | *** (E)  |

|           |     |
|-----------|-----|
| <b>10</b> | *   |
| <b>11</b> | *   |
| <b>12</b> | *** |
| <b>13</b> | *   |
| <b>14</b> | *   |
| <b>15</b> | *   |
| <b>16</b> | *   |
| <b>17</b> | *   |
| <b>18</b> | *   |
| <b>19</b> | *   |
| <b>20</b> | *   |
| <b>21</b> | *   |
| <b>22</b> | *   |
| <b>23</b> | *   |
| <b>24</b> | *** |
| <b>25</b> | *   |
| <b>26</b> | *   |

#### 4.3.2 REZULTATI, PRIDOBLEDJENI S PROGRAMOM ENDOCRINE DISRUPTOME

S pomočjo programa Endocrine Disruptome smo napovedali vezavo izbranih štirih derivatov benzofenona ter njihovih metabolitov na 12 hormonskih receptorjev. Za štiri receptorje smo napovedali tudi vezavo na njihove antagonistične konformacije (oznaka: *an*). Rezultate smo podali v preglednicah (preglednica VIII in IX) v obliki številčnih vrednosti in jih obarvali glede na stopnjo verjetnosti vezave na receptor: rdeča – največja, oranžna – velika, rumena – srednja in zelena – majhna verjetnost vezave.

Rezultati verjetnosti vezave na hormonske receptorje za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona so predstavljeni v preglednici VIII:

- Za **negativno kontrolo – timol**, je program napovedal srednjo verjetnost vezave na *AR an* receptor in majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **pozitivno kontrolo – BPA**, je program napovedal največjo verjetnost vezave na *AR an* receptor, veliko verjetnost vezave na *AR* receptor, srednjo verjetnost vezave na *ER α*, *ER β*, *GR*, *TR α* in *TR β* ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **BF-2** in **BF-3** je program napovedal veliko verjetnost vezave na *AR an* receptor, srednjo verjetnost vezave na *AR*, *GR*, *TR α* in *TR β* ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **BF-4** je program napovedal srednjo verjetnost vezave na *AR*, *AR an*, *GR*, *TR α* in *TR β* ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.

- ZA **BF-6** je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave na ***AR an***, ***GR*** in ***TR α*** ter **majhno verjetnost** vezave na ostale receptorje.

Preglednica VIII: Rezultati napovedi verjetnosti vezave na hormonske receptorje s programom Endocrine Disruptome za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona: legenda: rdeče – največja verjetnost vezave, oranžna – velika verjetnost vezave, rumena – srednja verjetnost vezave, zelena – majhna verjetnost vezave.

| SPOJINA                      | <i>AR</i> | <i>AR an</i> | <i>ER α</i> | <i>ER α an</i> | <i>ER β</i> | <i>ER β an</i> | <i>GR</i> | <i>GR an</i> | <i>LXR α</i> | <i>LXR β</i> | <i>PPAR α</i> | <i>PPAR β</i> | <i>PPAR γ</i> | <i>RXR α</i> | <i>TR α</i> | <i>TR β</i> |
|------------------------------|-----------|--------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| <b>timol</b><br>(- kontrola) | -7,1      | -6,8         | -6,1        | -5,9           | -6,0        | -6,0           | -6,3      | -5,9         | -6,8         | -6,8         | -6,2          | -6,3          | -6,1          | -6,2         | -6,9        | -6,7        |
| <b>BPA</b><br>(+ kontrola)   | -8,6      | -8,6         | -8,3        | -8,5           | -8,4        | -8,2           | -7,8      | -7,4         | -8,6         | -8,1         | -7,8          | -7,9          | -7,5          | -7,9         | -8,6        | -8,7        |
| <b>BF-2</b>                  | -8,1      | -8,0         | -8,1        | -8,0           | -7,9        | -7,8           | -8,0      | -7,2         | -7,9         | -8,0         | -7,6          | -7,4          | -7,1          | -7,3         | -7,8        | -8,2        |
| <b>BF-3</b>                  | -7,6      | -7,7         | -7,6        | -7,5           | -7,3        | -7,3           | -7,6      | -6,9         | -8,3         | -8,2         | -7,6          | -7,9          | -8,3          | -7,9         | -8,1        | -8,1        |
| <b>BF-4</b>                  | -7,5      | -7,5         | -7,5        | -7,8           | -7,4        | -7,0           | -8,5      | -7,3         | -8,6         | -8,7         | -7,7          | -7,6          | -6,9          | -8,5         | -8,0        | -8,2        |
| <b>BF-6</b>                  | -6,3      | -6,1         | -6,8        | -6,9           | -6,1        | -7,0           | -8,2      | -7,0         | -8,2         | -8,2         | -7,3          | -7,4          | -7,0          | -7,6         | -7,8        | -7,7        |

Rezultati verjetnosti vezave na hormonske receptorje za izbrane metabolite derivatov benzofenona so predstavljeni v preglednici IX:

- receptor ***AR***: program je napovedal **veliko verjetnost** vezave za metabolite **4, 6, 10, 14, 15, 17 in 22**. Za te metabolite je skupno, da nastanejo z demetilacijo in imajo zato prosto hidroksilno skupino na mestu 4. **Srednjo verjetnost** vezave je napovedal za metabolite **1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 16, 19, 21, 25 in 26**. Za ostalih šest metabolitov pa je napovedal **majhno verjetnost** vezave.
- receptor ***AR an***: program je napovedal **največjo verjetnost** vezave za metabolit **17**, ki nastane po *para*-hidroksilaciji benzenovega obroča ter demetilaciji. **Veliko verjetnost** vezave je napovedal za metabolite **1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 21, 22, 25 in 26** ter **srednjo verjetnost** vezave za vse ostale metabolite.
- receptor ***ER α***: program je napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolit **10**, ki nastane po *erto*-hidroksilaciji benzenovega obroča in demetilaciji. Za vse ostale metabolite je program napovedal **majhno verjetnost** vezave.
- receptor ***ER α an***: program je napovedal **majhno verjetnost** vezave za vse metabolite.
- receptor ***ER β***: program je napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolite **10, 15, 17 in 22**, katerim je skupna prosta hidroksilna skupina na mestu 4. Nastanejo direktno po demetilaciji v primeru metabolita **15** ali posredno preko *erto*- ali *para*-

hidroksilacije, ki ji sledi demetilacija in v primeru metabolita **22** tudi redukcija. Za vse ostale metabolite je program napovedal **majhno verjetnost** vezave.

- receptor ***ER β an***: program je napovedal **majhno verjetnost** vezave za vse metabolite.
- receptor ***GR***: program je napovedal **srednjo verjetnost** vezave za vse metabolite razen za metabolite **3, 19** in **22**, za katere je napovedal **majhno verjetnost** vezave.
- receptorji ***GR α, LXR α, LXR β, PPAR α, PPAR β, PPAR γ*** in ***RXR α***: program je napovedal **majhno verjetnost** vezave za vse metabolite.
- receptor ***TR α***: program je napovedal **srednjo verjetnost** vezave za vse metabolite.
- receptor ***TR β***: program je napovedal **srednjo verjetnost** vezave za vse metabolite razen za metabolite **12, 18, 19, 20, 23** in **24** za katere je napovedal **majhno verjetnost** vezave.

Program je za metabolite derivatov benzofenona napovedal **veliko verjetnost** vezave na androgenske receptorje. Za glukokortikoidne in tiroidne receptorje je za večino metabolitov napovedal **srednjo verjetnost** vezave, medtem ko je za vse ostale receptorje napovedal **majhno verjetnost** vezave.

Preglednica IX: Rezultati napovedi verjetnosti vezave na hormonske receptorje s programom Endocrine Disruptome za izbrane metabolite derivatov benzofenona: legenda: rdeče – največja verjetnost vezave, oranžna – velika verjetnost vezave, rumena – srednja verjetnost vezave, zelena – majhna verjetnost vezave.

| METABOLIT | AR   | AR an | ER α | ER α an | ER β | ER β an | GR   | GR an | LXR α | LXR β | PPAR α | PPAR β | PPAR γ | RXR α | TR α | TR β |
|-----------|------|-------|------|---------|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|------|------|
| <b>1</b>  | -8,1 | -7,9  | -7,9 | -7,5    | -7,9 | -7,5    | -7,5 | -7,0  | -7,7  | -7,8  | -7,8   | -7,9   | -6,6   | -7,2  | -7,7 | -7,9 |
| <b>2</b>  | -7,7 | -7,9  | -7,4 | -7,1    | -7,4 | -7,5    | -7,5 | -7,2  | -8,0  | -8,3  | -7,6   | -7,6   | -7,8   | -7,9  | -7,6 | -8,1 |
| <b>3</b>  | -7,5 | -7,5  | -7,9 | -7,6    | -7,7 | -7,5    | -7,3 | -7,2  | -8,1  | -8,3  | -7,2   | -7,5   | -7,2   | -7,7  | -8,0 | -8,1 |
| <b>4</b>  | -8,2 | -8,0  | -8,2 | -7,8    | -7,8 | -7,6    | -7,6 | -7,2  | -8,2  | -8,3  | -7,5   | -7,7   | -8,0   | -7,8  | -8,3 | -8,2 |
| <b>5</b>  | -8,0 | -7,8  | -7,8 | -7,7    | -7,3 | -7,7    | -8,0 | -7,1  | -8,4  | -8,5  | -7,6   | -7,9   | -7,8   | -8,0  | -8,2 | -8,2 |
| <b>6</b>  | -8,5 | -8,3  | -8,1 | -8,0    | -7,8 | -7,7    | -7,9 | -7,2  | -8,2  | -8,4  | -7,6   | -8,1   | -7,7   | -7,8  | -8,4 | -8,1 |
| <b>7</b>  | -8,0 | -7,9  | -7,7 | -7,6    | -7,8 | -7,5    | -7,8 | -6,8  | -8,0  | -7,9  | -7,7   | -7,7   | -7,6   | -7,3  | -7,8 | -7,9 |
| <b>8</b>  | -7,4 | -7,5  | -7,7 | -7,6    | -7,3 | -7,7    | -7,7 | -6,9  | -8,1  | -8,3  | -7,8   | -7,5   | -7,8   | -7,6  | -7,8 | -8,2 |
| <b>9</b>  | -7,5 | -7,5  | -7,4 | -7,4    | -7,3 | -7,2    | -8,0 | -7,7  | -8,3  | -8,5  | -7,4   | -7,7   | -7,9   | -7,5  | -7,9 | -8,1 |
| <b>10</b> | -8,4 | -8,1  | -8,3 | -7,8    | -8,2 | -7,7    | -8,0 | -7,2  | -8,4  | -8,5  | -7,5   | -7,6   | -7,4   | -7,5  | -8,2 | -8,3 |
| <b>11</b> | -7,6 | -7,7  | -7,7 | -7,5    | -7,9 | -7,4    | -7,5 | -7,6  | -8,4  | -7,9  | -7,2   | -7,3   | -7,8   | -7,8  | -8,1 | -7,9 |
| <b>12</b> | -7,8 | -8,3  | -7,4 | -7,3    | -7,3 | -7,7    | -7,5 | -7,6  | -8,2  | -8,2  | -7,3   | -7,6   | -8,2   | -8,0  | -7,8 | -7,8 |
| <b>13</b> | -7,3 | -7,6  | -7,7 | -7,5    | -7,2 | -6,8    | -7,6 | -7,1  | -7,9  | -8,1  | -7,4   | -7,6   | -6,9   | -7,9  | -8,1 | -7,9 |
| <b>14</b> | -8,4 | -8,3  | -7,9 | -7,7    | -7,2 | -7,3    | -7,5 | -7,1  | -8,5  | -8,0  | -7,8   | -7,5   | -7,3   | -8,1  | -8,4 | -7,9 |
| <b>15</b> | -8,2 | -7,9  | -8,1 | -7,8    | -8,2 | -7,5    | -8,3 | -7,2  | -8,6  | -9,0  | -7,8   | -8,4   | -8,4   | -8,3  | -8,2 | -8,2 |
| <b>16</b> | -7,7 | -7,6  | -7,7 | -7,9    | -73  | -7,3    | -8,8 | -7,1  | -8,7  | -8,8  | -7,6   | -7,7   | -7,0   | -8,4  | -8,3 | -7,9 |
| <b>17</b> | -8,4 | -8,5  | -8,2 | -8,0    | -8,2 | -7,9    | -8,7 | -7,6  | -8,6  | -8,8  | -8,0   | -8,3   | -8,4   | -8,3  | -8,3 | -8,6 |

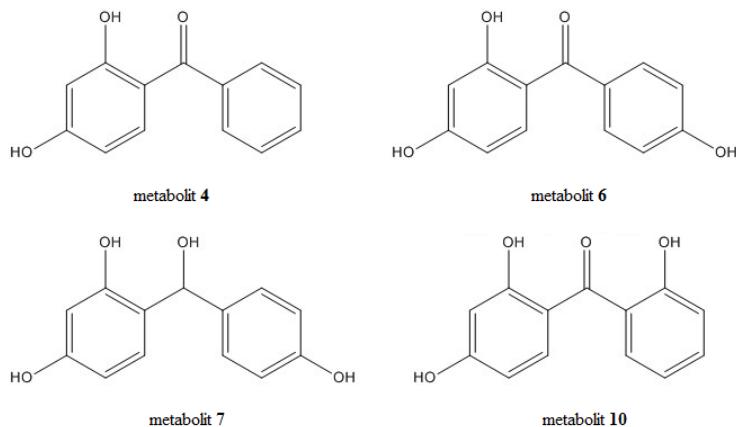
|           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>18</b> | -7,4 | -8,2 | -7,7 | -7,6 | -7,1 | -7,5 | -7,6 | -7,1 | -8,0 | -7,9 | -7,8 | -7,1 | -6,9 | -8,3 | -8,1 | -7,8 |
| <b>19</b> | -7,8 | -8,4 | -7,5 | -8,0 | -7,6 | -7,6 | -7,3 | -7,4 | -8,3 | -8,0 | -7,6 | -7,9 | -8,3 | -8,1 | -8,5 | -7,7 |
| <b>20</b> | -7,4 | -7,4 | -7,3 | -7,5 | -7,1 | -7,2 | -7,6 | -7,2 | -8,8 | -8,7 | -7,5 | -8,1 | -6,8 | -8,1 | -8,0 | -7,7 |
| <b>21</b> | -7,6 | -7,9 | -8,0 | -7,7 | -7,8 | -7,2 | -7,7 | -7,2 | -9,0 | -8,6 | -8,2 | -8,0 | -7,3 | -8,0 | -7,9 | -8,4 |
| <b>22</b> | -8,3 | -8,3 | 7,8  | -7,9 | -8,1 | -7,3 | -7,3 | -7,1 | -8,8 | -8,3 | -8,4 | -7,4 | -7,3 | -7,7 | -7,9 | -8,1 |
| <b>23</b> | -7,2 | -7,4 | -7,4 | -7,5 | -7,4 | -7,4 | -7,4 | -7,3 | -8,2 | -8,4 | -7,4 | -7,5 | -6,7 | -7,9 | -7,9 | -7,2 |
| <b>24</b> | -6,6 | -6,8 | -7,0 | -6,8 | -6,0 | -6,9 | -7,8 | -6,6 | -8,0 | -7,8 | -6,9 | -7,3 | -6,5 | -7,5 | -7,6 | -7,5 |
| <b>25</b> | -7,5 | -7,7 | -7,1 | -7,2 | -7,1 | -7,5 | -7,5 | -7,3 | -8,0 | -8,0 | -7,6 | -7,9 | -6,7 | -7,5 | -7,6 | -8,0 |
| <b>26</b> | -7,7 | -7,7 | -7,3 | -7,8 | -7,5 | -7,7 | -8,2 | -7,5 | -8,1 | -7,9 | -7,4 | -7,6 | -7,4 | -7,4 | -8,0 | -8,2 |

#### 4.3.3 RAZPRAVA

S programoma VEGA QSAR in Endocrine Disruptome smo napovedali vezavo na **estrogenske receptorje** za štiri izbrane derivate benzofenona ter njihove metabolite. Program VEGA QSAR je z nizko do srednjo zanesljivostjo napovedal vezavo na ER za **BF-2**, **BF-3** in **BF-4**, medtem ko je Endocrine Disruptome za vse izbrane derivate benzofenona napovedal majhno verjetnost vezave. Program VEGA QSAR je z visoko zanesljivostjo napovedal vezavo na ER za metabolite **4**, **6** in **7** (glej Sliko 28) ter neaktivnost metabolitov **8**, **9**, **12** in **24**.

Estrogeno delovanje je najbolj raziskano za izbrane štiri osnovne derivate benzofenona in za nekatere njihove metabolite, katerih nastanek smo predvideli tudi sami s programom Meteor Nexus (metaboliti **4**, **6**, **9** ter **10**). Slednji izhajajo iz **BF-3**. V *in vitro* raziskavi na celični liniji adenokarcinoma dojke MCF-7 so proučevali estrogeno delovanje derivatov benzofenona. Največjo aktivnost so opazili pri metabolitu **6** z izmerjeno vrednostjo EC50 0,1 µM, ki mu sledijo **BF-2** (EC50 0,3 µM), metabolit **4** (EC50 1,26 µM) in **BF-3** (EC50 19,5 µM). Prvim trem spojinam sta skupni dve hidroksilni skupini na mestih 2 in 4. Ostali preiskovani derivati benzofenona **BF-4**, **BF-6** in metabolit **9**, ki imajo na mestu 4 metoksi skupino, pa v tej raziskavi niso pokazali delovanja na ER (EC50 > 100µM) (106). V *in vitro* raziskavi na estrogensko odzivni celični liniji iz ovarijskih celic kitajskega hrčka, so testirali 14 različnih metabolitov **BF-3** in merili koncentracijo pri kateri dosežejo 20 % agonističnega učinka 17β-estradiola (E2) (REC20). Ugotovili so, da ima metabolit **6** z dodatno hidroksilno skupino na mestu 4' kar za dva velikostna razreda večjo aktivnost na ER α (REC20 0,0038 µM) kot metabolit **4**, ki te skupine nima (REC20 0,099 µM). Kljub temu, da smo mi s pomočjo programa Meteor Nexus napovedali metabolit **6** kot verjeten, ga v študiji na podganjih in človeških jetrnih mikrosomih kot metabolit **BF-3** niso zaznali. Predvideva se, da je estrogeno delovanje **BF-3** predvsem posledica njegovega glavnega metabolita **4**, vendar pa se zaradi močnega estrogenega delovanja ne more izključiti prispevka metabolita

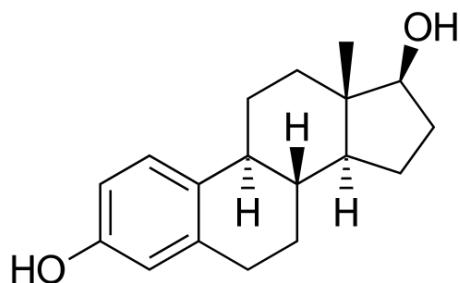
**6** kot stranskega presnovka, ki se pojavlja pod mejo detekcije uporabljene metode. Tudi za metabolit **10**, ki ima prav tako kot metabolit **6** tri proste hidroksilne skupine (glej Sliko 28), so dokazali večjo aktivnost na ER  $\alpha$  (REC20 0,68  $\mu\text{M}$ ) kot za **BF-3** (REC20 2,2  $\mu\text{M}$ ), vendar pa manjšo kot za metabolit **4** (REC20 0,099  $\mu\text{M}$ ) (107).



Slika 28: Metaboliti BF-3, ki kažejo najmočnejše delovanje na ER.

V *in vivo* raziskavi endokrine aktivnosti na podganah z odstranjenimi jajčniki so merili ekspresijo genov po petdnevni peroralni aplikaciji **BF-2** v dveh različnih odmerkih. Na večih organih so opazili učinek, sorazmeren z odmerkom, podoben kot ga ima E2, endogeni agonist, in sicer v maternici (povečana teža), vagini (povečanje izražanja IGF1), hipofizi (zmanjšana sinteza luteinizirajočega hormona), jetrih (povečana izražanje IGF1) in pri nekaterih lipidnih parametrih (zmanjšanje). Delovanje, ki ni podobno E2, so opazili le pri tiroidnih hormonih (T4 in T3), katerih vrednosti so se bistveno zmanjšale (108). Druga *in vivo* raziskava na podganah je dokazala tudi antiosteoporotični učinek **BF-2** tri mesece po peroralni aplikaciji. Dokazali so podoben učinek kot ga ima E2 na osteokalcin (serumski kazalec aktivnosti osteoblastov) in podganji CrossLaps (serumski kazalec aktivnosti osteoklastov) (109). Pri uterotrofičnem testu so ugotovili, da **BF-2**, **BF-3** in metabolit **4** povečajo težo maternice podgan (110). V ameriški študiji so iskali povezavo med koncentracijo derivatov benzofenona v urinu žensk in pojavnostjo endometrioze. Izkazalo se je, da je večja izpostavljenost metabolitu **4** lahko povezana z nastankom te estrogensko odvisne bolezni, medtem ko pri drugih derivatih tega niso mogli potrditi (111).

Naši rezultati pridobljeni *in silico* so z visoko zanesljivostjo napovedali vezavo na ER le za metabolite **4**, **6** in **7**. Delovanje metabolita **7** kot tudi ostalih metabolitov z reducirano karbonilno skupino je sicer le malo raziskano. Za prva dva pa se je v večih raziskavah izkazalo, da sta najbolj aktivna izmed preiskovanih derivatov benzofenona. Skupna jima je hidroksilna skupina na *ortho* in *para* mestu ter nereducirana karbonilna skupina. Če temu dodamo še **BF-2**, katerega delovanje je potrjeno tudi z eksperimentalnimi podatki v podatkovnimi pazi modela VEGA QSAR, lahko povzamemo, da je za estrogeno delovanje ključna prosta hidroksilna skupina. Vendar pa se je izkazalo, da število hidroksilnih skupin in njihova pozicija močno vpliva na aktivnost. Najvišjo aktivnost tako kaže trihidrosiliran metabolit **6**. Za hidroksilno skupino na *para* mestu (mesto 4) se predvideva, da je nujna za vezavo na ER, saj ima podobno vlogo kot 3-hidroksilna skupina pri E2 (glej Sliko 29). Poleg tega sta za vezavo pomembni še prosti hidroksilni skupini na mestu 4' in 2, ki sta na primer prisotni pri metabolitu **6**. Hidroksilna skupina na mestu 4' je pomembna kot donor vodikove vezi, ki se v vezavno mesto veže tako kot 17 $\beta$ -hidroksilna skupina E2. Pomembna je tudi razdalja med 4'- in 4-hidroksilno skupino, ki idealno znaša med 9,7 in 12,3 Å. V tem lahko najdemo razlog za večjo aktivnost 4'-hidrosiliranih derivatov od 2'-hidrosiliranih. Razdalja pri prvih pade v predlagano območje, pri drugih pa ne. To kažejo tudi naši rezultati dobljeni s programom VEGA QSAR. Program namreč z nizko do visoko zanesljivostjo napove neaktivnost 2'-hidrosiliranih metabolitov **BF-2 (9-12)**. Za aktivnost na ER je pomembna tudi primerna molekuljska masa, ki naj bi bila med 140 in 250 Da. Opazili so tudi, da imajo simetrični derivati benzofenona močnejše estrogeno delovanje kot nesimetrični (106, 112, 113).

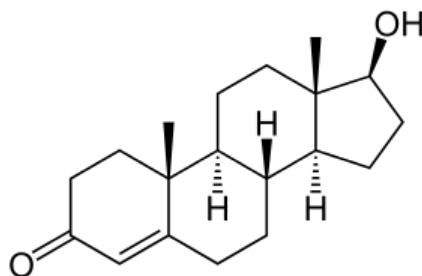


Slika 29: Struktorna formula 17 $\beta$ -estradiola (E2).

Program VEGA QSAR je z visoko zanesljivostjo napovedal, da se metaboliti **8**, **9**, **12** in **24** ne vežejo na ER. Za metabolit **9** so to potrdili tudi z raziskavami, za ostale metabolite pa je področje še neraziskano.

**Androgenski receptor** se je izmed vseh receptorjev izkazal kot najbolj verjetna tarča za vezavo izbranih derivatov benzofenonona in njihovih metabolitov. Program Endocrine Disruptome je s srednjo verjetnostjo napovedal vezavo **BF-2**, **BF-3** in **BF-4** na agonistično konformacijo AR in z majhno verjetnostjo vezavo **BF-6**. Po drugi strani pa smo vezavo na antagonistično konformacijo AR receptorja napovedali z veliko verjetnostjo za **BF-2** in **BF-3** ter s srednjo verjetnostjo za **BF-4** in **BF-6**.

Program je za 27 % metabolitov izbranih derivatov benzofenona napovedal vezavo na agonistično konformacijo z visoko verjetnostjo ter za 65 % metabolitov vezavo na antagonistično konformacijo. Program je z največjo verjetnostjo napovedal vezavo na antagonistično konformacijo AR le za *para*-hidroksiliran in demetiliran metabolit **BF-4** (metabolit **17**). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je prav tako kot za estrogeno delovanje tudi za vezavo na AR ključna prosta para hidroksilna skupina. Poleg tega pa je aktivnost večja, če je prisotna tudi nereducirana karbonilna skupina ali hidroksilna skupina na *ortho*-mestu. Ti rezultati so dokaj pričakovani, saj tudi endogeni agonist receptorja AR, testosteron, v svoji strukturi vsebuje hidroksilno in karbonilno skupino (glej Sliko 30).



Slika 30: Strukturna formula testosterona.

Aktivnost derivatov benzofenona na AR so raziskovali *in vitro*, na NIH-3T3 celični liniji podganjih fibroblastov ter ugotovili, da ima najmočnejše antiandrogeno delovanje metabolit **6** ( $IC_{50}$  0,3  $\mu M$ ), kar so potrdili tudi *in vivo* s Hershbergerjevim testom na podghanah po subkutanem apliciraju. Po moči antiandrogenega delovanja mu sledijo **BF-2** ( $IC_{50}$  1,5  $\mu M$ ), metabolit **4** ( $IC_{50}$  10,0  $\mu M$ ) in **BF-6** ( $IC_{50}$  13,0  $\mu M$ ), medtem ko metabolit **9**, **BF-3** in **BF-4** v tej raziskavi kažejo šibko aktivnost ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) (106). *In vitro* študija na celični liniji MDA-kb2, pridobljeni iz človeških celic raka dojke, ki močno izraža AR, je pokazala, da tudi **BF-3** deluje kot antagonist na AR, medtem ko za **BF-4** tega niso mogli potrditi (114). Izmed preiskovanih metabolitov **BF-3** so vsi kazali šibko antiandrogeno delovanje podobno kot **BF-3**. Izbjema je le metabolit **6**, ki kaže močno antiandrogeno delovanje in predstavlja potencialno nevarnost za zdravje ljudi (107). Za metabolit **4** so v raziskavi dokazali, da inhibira od  $17\beta$ -HSD-3 odvisno nastajanje testosterona v celični liniji HEK-293, kar so

potrdili tudi *ex vivo* v izoliranih mišjih in podganjih testisih (115). V *in vitro* raziskavah na različnih celičnih linijah noben izmed preiskovanih derivatov benzofenona in njihovih metabolitov ni kazal agonističnega učinka na AR (106, 114, 115).

Medtem ko raziskave nakazujejo, da je antiandrogeno delovanje najmočnejše pri metabolitu **6**, pa so naši rezultati nakazali še na nekatere druge metabolite, ki bi prav tako lahko izkazovali potencialno nevarnost, vendar njihovega (anti)androgenega delovanja še niso raziskali. V primeru preučevanja agonističnega delovanja na AR se naši *in silico* rezultati niso izkazali za primerljive obstoječim *in vitro* raziskavam, saj so predvideli, da se nekateri metaboliti (**4**, **6**, **10**, **14**, **15**, **17**, **22**) z veliko verjetnostjo vežejo na agonistično konformacijo AR, česar v *in vitro* študijah niso dokazali.

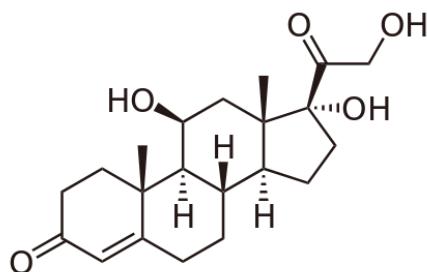
**Vezavo na TR** smo s programom Endocrine Disruptome napovedali s srednjo verjetnostjo za vse izbrane derive benzofenona tako na obliko TR  $\alpha$  kot tudi na TR  $\beta$ . Izjema je le **BF-6**, za katerega se je vezava na TR  $\beta$  izkazala za malo verjetno. S srednjo verjetnost smo napovedali vezavo vseh metabolitov izbranih derivatov benzofenona na TR  $\alpha$  in za 77 % metabolitov na TR  $\beta$ .

Kljud temu da je *in vitro* raziskava pokazala agonistično delovanje **BF-2** in **BF-3** na TR, pa v raziskavi opozarjajo, da so ti rezultati lahko pozitivni zaradi uporabe relativno visokih koncentracij v primerjavi z endogenim agonistom T3, zato so nujne nadaljnje raziskave za potrditev teh rezultatov. Hormonski motilci delujejo kompleksno in poleg delovanja na TR v literaturi zasledimo veliko bolj raziskano delovanje na nekatere drugih mestih homeostaze tiroidnih hormonov (116). V *in vitro* raziskavi na tumorski celični liniji FTC-238 so ugotovili, da izmed več različnih hormonskih motilcev, med katerimi sta tudi 4-metilbenziliden kafra in oktil 4-metoksicinamat, prav **BF-2** najmočneje inhibira tiroidno peroksidazo (TPO), ki igra glavno vlogo pri sintezi ščitničnih hormonov. **BF-2** je izkazal inhibicijo v veliko nižji koncentraciji (IC<sub>50</sub> 0,45  $\mu$ M) kot sta tisti pri metamizolu (IC<sub>50</sub> 9,2  $\mu$ M) in propiltiouracilu (IC<sub>50</sub> 125  $\mu$ M), znanih antitiroidnih učinkovinah z inhibitornim delovanjem na TPO. V *in vivo* študiji na podganah so že po 5 dneh aplikacije **BF-2** opazili hormonske spremembe značilne za hipotiroidno stanje. Spremembe so bile vidne predvsem v povečanju serumskih koncentracij T4 in zmanjšanju serumskih koncentracij TSH. V raziskavi so tudi ugotovili, da je učinek na tiroidni sistem še bolj izražen ob odsotnosti jodida, kar kaže na povečano nevarnost v delih sveta, kjer je pomanjkanje joda še vedno

prisotno ter pri posameznikih, pri katerih so potrebe po njem višje (otroci, mladostniki, doječe matere) (117).

V tem trenutku občutno primanjkuje raziskav o učinku derivatov benzofenona na tiroidne receptorje. Naši rezultati so napovedali, da se večina derivatov benzofenona in njihovih metabolitov s srednjo verjetnostjo lahko vežejo na te receptorje. Za **BF-2** in **BF-3** to potrjujejo tudi eksperimentalno pridobljeni podatki, medtem ko so za ostale potrebne nadaljnje raziskave.

Za izbrane deriveate benzofenona in za večino njihovih metabolitov smo napovedali srednjo verjetnost **vezave na agonistično konformacijo GR**. Rezultati so pričakovani, glede na strukturno podobnost z endogenimi agonisti GR, glukokortikoidi. Eden najbolj znanih je kortizol, ki ima na steroidnem skeletu pripeto hidroksilno in karbonilno skupino (glej Sliko 31). Rezultati naše *in silico* raziskave kažejo majhno verjetnost vezave izbranih derivatov benzofenona in njihovih metabolitov na **LXR**, **PPAR** in **RXR**. Delovanje na te receptorje pa je prav tako manj raziskano tudi z *in vitro* ter *in vivo* študijami.



Slika 31: Struktura formula kortizola.

Pri raziskovanju estrogenega delovanja izbranih hormonskih motilcev je pomembno, da v raziskavah upoštevamo tudi metabolite teh spojin. Kot se je izkazalo v primeru **BF-3**, imajo lahko ti celo večjo aktivnost na receptorje kljub temu, da nastajajo v telesu v manjših količinah. Proizvajalci pogosto želijo narediti pripravek za zaščito pred soncem, ki bi obvaroval kožo pred širokim spektrom UV sevanja. Tako se pogosto zgodi, da se v enem pripravku nahaja več različnih UV filterov. Kombinacija je pomembna z vidika sinergizma, saj se je izkazalo, da se učinki potencirajo tudi če se posamezen filter nahaja v zelo nizkih koncentracijah. Zato je zelo pomembno, da razumemo tudi učinke v zelo nizkih koncentracijah ter da se preiskuje tudi njihov skupni učinek (118). Kljub temu da število raziskav narašča, pa še vedno primanjkuje predvsem tistih, ki bi povezovale prisotnost derivatov benzofenona v urinu z določenimi boleznimi ali spremljale učinke na daljši časovni rok.

## **4.4 NAPOVED REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI**

S pomočjo računalniških programov Derek Nexus, VEGA QSAR in TEST smo napovedali reproduktivno toksičnost štirih izbranih derivatov benzofenona ter njihovih metabolitov. Rezultate smo združili v dve preglednici in s tem omogočili večjo preglednost rezultatov (preglednici X in XI).

### **4.4.1 REZULTATI, PRIDOBLEDJENI S PROGRAMOM DEREK NEXUS**

Računalniški program Derek Nexus nam je podal informacijo o verjetnosti za razvojno toksičnost, teratogenost in testikularno toksičnost. Program za določeno toksičnost poda verjetnost v treh stopnjah: **verjetno** (*probable*), **mogoče** (*plausible*) in **dvoumno** (*equivocal*).

- Za **negativno kontrolo (timol)** program ni izdal opozorila o toksičnosti, medtem ko je za **pozitivno kontrolo (BPA)** izdal opozorilo o dvoumni toksičnosti za testikularno toksičnost. Ti rezultati so pričakovani in kažejo na izbiro primerne kontrole ter izbiro primernih parametrov programa.
- Za izbrane štiri derive benzofenona ter vse njihove metabolite program ni napovedal toksičnosti.

### **4.4.2 REZULTATI, PRIDOBLEDJENI S PROGRAMOM VEGA QSAR**

Za napovedovanje razvojne/reprodukтивne toksičnosti smo uporabili program VEGA QSAR. Uporabili smo dva različna modela, in sicer Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0 in Developmental Toxicity Classification Model (CAESAR) 2.1.7.. Poleg reproduktivne toksičnosti nam je program podal še oceno zanesljivosti napovedi, ki je označena s številom zvezdic: nizka (\*), srednja (\*\*) ali visoka (\*\*\*) . Če je bilo v poročilu programa zapisano, da se spojina nahajala izven območja uporabnosti modela, smo takšen primer označili s svetlo rumeno.

#### Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0

S pomočjo modela Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0 smo predvideli razvojno in reproduktivno toksičnost. Za negativno in pozitivno kontrolo, izbrane štiri derive benzofenona ter njihove metabolite smo dobili naslednje rezultate, ki so predstavljeni v preglednicah X in XI:

- Za **negativno kontrolo, timol**, se je izkazalo, da se nahaja izven območja uporabnosti modela, zato rezultati niso zanesljivi.
- Za visoko zanesljivostjo je program napovedal razvojno/reprodukтивno toksičnost za **pozitivno kontrolo, BPA**.

- Za vse štiri izbrane derivate benzofenona (**BF-2**, **BF-3**, **BF-4** in **BF-6**) in vse njihove metabolite se je izkazalo, da se nahajajo izven območja uporabnosti modela. Rezultati so zato nezanesljivi in jih ne moremo uporabiti pri nadalnjem delu.

#### Developmental Toxicity Classification Model (CAESAR) 2.1.7

S pomočjo modela Developmental Toxicity Classification Model (CAESAR) 2.1.7 smo predvideli razvojno toksičnost. Za negativno in pozitivno kontrolo, izbrane štiri derivate benzofenona ter njihove metabolite smo dobili naslednje rezultate, ki so predstavljeni v preglednicah X in XI:

- Z visoko zanesljivostjo je program napovedal razvojno toksičnost za **negativno kontrolo timol** in za **pozitivno kontrolo BPA**.
- Z visoko zanesljivostjo je program napovedal razvojno toksičnost za **BF-2** in **BF-3**, medtem ko se **BF-4** in **BF-6** nahajata izven območja uporabnosti in zato njuni rezultati niso zanesljivi.
- Z visoko zanesljivostjo je program napovedal razvojno toksičnost za metabolite **4 (BF-1)**, **5, 6, 9 (BF-8)** in **10**. Ti metaboliti imajo v svoji strukturi nereducirano karbonilno skupino in vsaj dve hidroksilni skupini. Vsi ostali metaboliti pa se nahajajo oziroma se lahko nahajajo izven območja uporabnosti modela in njihovi rezultati zaradi nezanesljivosti niso uporabni. Med te metabolite spadajo vsi metaboliti **BF-2**, **BF-4** in **BF-6** ter metaboliti **BF-2**, ki imajo reducirano karbonilno skupino. Iz tega zato lahko zaključimo, da razvojno toksičnost izkazujejo derivati benzofenona s prisotno karbonilno skupino ter dvema prostima hidroksilnima skupinama, medtem ko za ostale toksičnosti s tem modelom ne moremo napovedati.

#### **4.4.3 REZULTATI, PRIDOBLEDENI S PROGRAMOM TEST**

Naslednji program, ki smo ga uporabili pri napovedovanju razvojne toksičnosti, je bil TEST. Dobljeni rezultati so podani v obliki številčne vrednosti od 0 do 1, ki nam kaže verjetnost, da je spojina razvojno toksična. Program je za spojine, katerih vrednosti so bile nad 0,5, napovedal, da so razvojno toksične. Za spojine z vrednostmi nižjimi od 0,5 pa da niso. Rezultati so predstavljeni v preglednici X in XI.

- Razvojno toksičnost smo napovedali tako za **negativno kontrolo, timol**, z vrednostjo 0,99 kot tudi za **pozitivno kontrolo, BPA**, z vrednostjo 0,68. Ti rezultati kažejo na majhno zanesljivost programa.

- Razvojno toksičnost smo napovedali za vse štiri derivate benzofenona. Za **BF -2** in **BF-3** smo dobili vrednost večjo od 0,7, za **BF-4** in **BF-6** pa celo večjo od 0,95.
- Za večino metabolitov smo napovedali razvojno toksičnost. Izjema je le metabolit **1**, za katerega je program podal, da ni razvojno toksičen, saj je verjetnost za to manjša od 0,5.

*Preglednica X: Rezultati napovedi reproduktivne toksičnosti s programi Derek Nexus, VEGA QSAR in TEST za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrane derivate benzofenona; legenda: negativni znak ( - ) – ni podatka o razvojni toksičnosti; \*\*\* – visoka zanesljivost, \*\* – srednja zanesljivost, \* – nizka zanesljivost; rdeče – spojina je razvojno toksična, zeleno – spojina ni razvojno toksična, rumeno – spojina se nahaja ali se lahko nahaja izven območja uporabnosti modela.*

| SPOJINA                      | DEREK NEXUS                | VEGA QSAR – Developmental/ Reproductive Toxicity library (PG) – v. 1.0.0 | VEGA QSAR – Developmental Toxicity Classification Model (CAESAR) – v. 2.1.7 | TEST |
|------------------------------|----------------------------|--|---|------|
| <b>timol</b><br>(- kontrola) | -                          | *  | ***   | 0,99 |
| <b>BPA</b><br>(+ kontrola)   | Mogoča razvojna toksičnost | ***  | ***   | 0,68 |
| <b>BF-2</b>                  | -                          | *  | ***   | 0,76 |
| <b>BF-3</b>                  | -                          | *  | ***   | 0,75 |
| <b>BF-4</b>                  | -                          | *  | *   | 0,99 |
| <b>BF-6</b>                  | -                          | *  | *   | 0,95 |

*Preglednica XI: Rezultati napovedi reproduktivne toksičnosti s programi Derek Nexus, VEGA QSAR in TEST za izbrane metabolite derivatov benzofenona; legenda: negativni znak ( - ) – ni podatka o razvojni toksičnosti; \*\*\* – visoka zanesljivost, \*\* – srednja zanesljivost, \* – nizka zanesljivost; rdeče – spojina je razvojno toksična, zeleno – spojina ni razvojno toksična, rumeno – spojina se nahaja ali se lahko nahaja izven območja uporabnosti modela.*

| METABOLIT | DEREK NEXUS | VEGA QSAR – Developmental / Reproductive Toxicity library (PG) – v. 1.0.0 | VEGA QSAR – Developmental Classification Toxicity Model (CAESAR) – v. 2.1.7 | TEST |
|-----------|-------------|---|---|------|
| <b>1</b>  | -           | *   | *   | 0,38 |
| <b>2</b>  | -           | *   | **  | 0,77 |
| <b>3</b>  | -           | *   | *   | 0,57 |
| <b>4</b>  | -           | *   | ***   | 0,68 |
| <b>5</b>  | -           | *   | ***   | 0,71 |
| <b>6</b>  | -           | *   | ***   | 0,57 |
| <b>7</b>  | -           | *   | *   | 0,62 |
| <b>8</b>  | -           | *   | *   | 0,81 |

|           |   |   |     |      |
|-----------|---|---|-----|------|
| <b>9</b>  | - | * | *** | 0,85 |
| <b>10</b> | - | * | *** | 0,83 |
| <b>11</b> | - | * | *   | 0,59 |
| <b>12</b> | - | * | *   | 0,73 |
| <b>13</b> | - | * | *   | 0,94 |
| <b>14</b> | - | * | *   | 0,82 |
| <b>15</b> | - | * | *   | 0,91 |
| <b>16</b> | - | * | *   | 1,03 |
| <b>17</b> | - | * | *   | 0,91 |
| <b>18</b> | - | * | *   | 0,88 |
| <b>19</b> | - | * | *   | 0,90 |
| <b>20</b> | - | * | *   | 1,01 |
| <b>21</b> | - | * | *   | 0,99 |
| <b>22</b> | - | * | *   | 0,83 |
| <b>23</b> | - | * | *   | 0,81 |
| <b>24</b> | - | * | *   | 0,84 |
| <b>25</b> | - | * | *   | 0,55 |
| <b>26</b> | - | * | *   | 0,87 |

#### 4.4.4 RAZPRAVA

Že dolgo časa je znano, da se derivati benzofenona lahko vpletajo v delovanje endokrinega sistema kot hormonski motilci, v zadnjem času pa se vedno bolj raziskuje tudi njihov vpliv na reproduktivni sistem in vpliv na razvoj organizma. Zaradi njihove množične uporabe in posledično prisotnosti v okolju so jih našli v urinu in krvi ljudi po vsem svetu, nekatere pa tudi v placenti, mleku ter semenski tekočini (119).

Placenta je organ, ki omogoča izmenjavo snovi med materjo in plodom, in je zato odličen pripomoček pri raziskovanju prisotnosti kemikalij med razvojem. V placenti sicer niso odkrili **BF-3** so pa našli njegov metabolit **4**. Poleg **BF-2** in **BF-6** se je v placenti v kar 75 % vzorcev pojavljal tudi **BF-4**, kar je presenetljivo zaradi njegove hidrofilne narave (120, 121). Razvijajoči se plod je bolj občutljiv na vpliv kemikalij, zato je še toliko bolj pomembno razumevanje nevarnosti, ki jih lahko povzroči izpostavljenost tem kemikalijam med nosečnostjo (119). V kohortni raziskavi, v katero je bilo vključenih 404 ameriških nosečnic v tretjem trimesečju, so merili povezavo med koncentracijo različnih fenolov in ftalatov v urinu s porodno težo novorojenčkov. Izkazalo se je, da je višja izpostavljenost **BF-3** pri materi povezana z nižjo porodno maso deklic, a višjo pri dečkih (122). V drugih raziskavah so našli povezavo tudi z znižano gestacijsko starostjo ter nižjim deležem maščob pri deklicah v starosti od 4 do 9 let. Vendar pa so za potrditev teh rezultatov potrebne nadaljnje raziskave (123, 124). **BF-2**, ki so ga našli v urinu staršev, so povezali z večjim deležem rojstev deklic,

medtem ko prisotnost **BF-3** v urinu otrok povezujejo z zakasnjeno puberteto, merjeno glede na razvoj dojk (125, 126). Raziskava primerov s kontrolami je iskala vzrok za nastanek Hirschsprungove bolezni (HB) pri izpostavljenosti **BF-3** med nosečnostjo. Gre za prirojeno bolezen, za katero je značilna odsotnost ganglijskih celic v steni debelega črevesja, zaradi česar lahko pri novorojenčkih pride do obstrukcije črevesja in kroničnega zaprtja. Raziskava je pokazala, da je pri ženskah, pri katerih so v urinu našli višjo koncentracijo **BF-3**, večja verjetnost, da so rodile otroka z diagnozo HB. Za pomembno se izkaže predvsem materina izpostavljenost **BF-3** med kritičnim obdobjem fetalnega razvoja živčevja med 5 in 12 tednom nosečnosti (127, 128). S pomočjo vzorcev urina ter semenske tekočine 413 moških so ugotovili, da so nekateri derivati benzofenona lahko povezani tudi s spremembami v semenski tekočini kot so znižana koncentracija semenčic, njihova hitrost ali nepravilnosti v razvoju. Izkazalo se je, da imata največji vpliv na zmanjšanje plodnosti pri moških **BF-2** in metabolit **9**, medtem ko za metabolit **4** in **BF-3** te povezave niso mogli potrditi (129, 130). Poleg reproduktivne toksičnosti pri ljudeh so odkrili, da tako **BF-2** kot tudi **BF-3** vplivata tudi na razmnoževanje rib. Čeprav so koncentracije v površinskih vodah precej nižje od uporabljenih v teh raziskavah, se vseeno kot zmersko lipofilne spojine lahko kopičijo v organizmu. Poleg tega pa lahko derivati benzofenona prispevajo k učinkom na razmnoževanje rib drugih estrogenih spojin, ki so tudi prisotne v okolju (131, 132).

Ker v podatkovnih bazah modelov VEGA QSAR ni eksperimentalnih vrednosti, se predvidevanje o toksičnosti izvede na osnovi primerjanja s podobnimi spojinami v podatkovni bazi modela. V primeru naše negativne kontrole timola se izkaže, da se kljub visokemu indeksu uporabnosti modela predlagane spojine precej razlikujejo. Enaka težava se pojavi pri programu TEST, zato je napoved o toksičnosti timola lahko lažno pozitivna, kar kažejo podatki iz literature. Pri uporabi programov je zato potrebna strokovna presoja o dobljenih rezultatih (94).

Naši uporabljeni programi niso pokazali želene primerljivosti. Program Derek Nexus in *Developmental/Reproductive Toxicity Library Model* programa VEGA QSAR nista dala uporabnih rezultatov, saj so se vsi izbrani derivati benzofenona in njihovi metaboliti nahajali izven območja uporabnosti modela. *Developmental Toxicity Classification Model* programa VEGA QSAR je z visoko zanesljivostjo napovedal toksičnost za **BF-2** in **BF-3** ter nekatere metabolite **BF-3**. Te rezultate smo potrdili tudi s programom TEST ter že obstoječimi raziskavami teh dveh derivatov benzofenona. Medtem ko se **BF-2** večinoma uporablja le v

izdelkih, pri uporabi katerih absorpcija v sistemski krvni obtok ni verjetna (laki za nohte), pa večjo skrb vzbuja **BF-3**. Predvsem na tujih trgih je slednji še vedno močno razširjen UV filter, in se nahaja tudi v koncentracijah do 6 %. Posledica množične uporabe je tudi njegova prisotnost v okolju in s tem v hrani ljudi.

Med metaboliti so se v območje uporabnosti modela razvrstili le nekateri metaboliti **BF-3**. Strukturno gledano jim je skupna nereducirana karbonilna skupina in hidroksilna skupina, pripeta na mestu 2. Med metabolite, ki so v naši *in silico* raziskavi pokazali reproduktivno toksičnost z visoko zanesljivostjo, spada tudi metabolit **9**, katerega vpliv na plodnost so potrdili tudi z že obstoječimi študijami. Vendar pa študij še vedno primanjuje kljub temu, da je vpliv metabolitov pomemben za razumevanje načina delovanja izbranega derivata benzofenona.

Za **BF-4** in **BF-6** je samo program TEST izkazoval ustrezne pogoje in predvidel njihovo reproduktivno toksičnost. Ta naj bi bila celo višja kot pri prvih dveh proučevanih derivatih benzofenona. Visoko toksičnost so pokazali tudi vsi metaboliti **BF-4**. Predvsem uporaba slednjega v kozmetičnih izdelkih narašča, saj se je pokazal kot dobra zamenjava za **BF-3**. V nasprotju z ostalimi derivati benzofenona je namreč ta vodotopen in tako omogoča bolj lahkostrukturo kozmetičnih izdelkov (120). Kljub temu da razširjenost narašča, pa primanjuje študij o njegovih vplivih na zdravje ljudi, predvsem o reproduktivni toksičnosti, ki jo kažejo naši rezultati. Večina raziskav se osredotoča na učinke po aplikaciji na kožo, primanjuje pa raziskav o morebitnih škodljivih učinkih po vdihavanju izdelkov za osebno nego, kot so na primer laki za lase in o vplivu ob daljši vsakodnevni izpostavljenosti.

Izkazalo se je, da so *in silico* metode uporabne kot izhodišče za nadaljnje raziskave, in ko želimo pregledati veliko bazo spojin. Zaradi omejenega števila snovi z eksperimentalnimi vrednostmi in posledično nepopolnimi bazami podatkov ter omejene zmogljivosti modelov pa ti žal še niso primerni za nadomeščanje *in vitro* ali *in vivo* študij. Uporaba *in silico* metod je daleč od tega, da bi rezultate zgolj prepisali. Potrebno je razumevanje algoritmov, ki stojijo za posameznimi programi ter strokovna presoja razlogov, ki jih navede program za njegovo odločitev. Program Vega QSAR tako na primer poleg rezultatov poda tudi nekatere iztočnice, ki potrebujejo preverjanje, kot na primer to, da so bile v podatkovni bazi modela najdene le zmerno podobne spojine ali pa, da je za te spojine natančnost napovedi nizka. Priporoča se uporaba več različnih *in silico* modelov ter vpogled v literurne podatke.

## 5 SKLEP

- S pomočjo računalniškega programa Meteor Nexus smo predvideli nekatere metabolite izbranih derivatov benzofenona, ki so jih identificirali tudi v *in vitro* in *in vivo* raziskavah. Kljub temu so v drugih raziskavah zaznali tudi nekaj metabolitov, ki jih s pomočjo *in silico* metode nismo uspeli napovedati ali pa je verjetnost njihovega nastanka majhna. Kot najbolj verjetna metabolita **BF-3**, ki smo ju predvideli tudi v naši *in silico* raziskavi, sta se izkazala metabolita **4** in **9**.
- V naši *in silico* raziskavi smo potrdili rezultate že obstoječih študij o estrogenem delovanju **BF-2** in **BF-3** ter neaktivnosti **BF-6**. V primeru **BF-4** se naši rezultati in rezultati obstoječih študij razlikujejo. Antagonistično delovanje na AR najmočneje izkazujeta **BF-2** in **BF-3**. Vezava derivatov benzofenona na ostale preučevane receptorje je trenutno manj raziskana, zato so nujne nadaljnje raziskave, predvsem v smeri preučevanja vezave na TR in GR, za katere naši rezultati kažejo možnost vezave.
- Pri preučevanju endokrinih učinkov smo opazili, da imajo metaboliti lahko večjo aktivnost kot izhodna spojina. V primeru **BF-3** se je namreč izkazalo, da večjo aktivnost na ER izkazujejo metaboliti **4**, **6** in **7**, na AR pa kar večina njegovih metabolitov. V nadalnjih raziskavah endokrinih učinkov priporočamo, da se vključijo tudi metaboliti derivatov benzofenona.
- Pri *in silico* raziskavi reproduktivne toksičnosti smo ugotovili, da **BF-2** in **BF-3** kažeta na razvojno toksičnost, kar potrjujejo tudi podatki iz literature. V primeru **BF-4** in **BF-6** naši rezultati prav tako kažejo na morebitno toksičnost vendar primanjkuje raziskav, s katerimi bi te rezultate lahko potrdili.
- *In silico* metode so zaenkrat še premalo zanesljive, da bi pri preučevanju metabolizma in toksičnosti derivatov benzofenona lahko nadomestile *in vitro* ali *in vivo* raziskave. Potrebne so nadgradnje podatkovnih baz in večja zmogljivost modelov, saj se je v našem primeru pokazalo, da se preiskovane spojine večkrat nahajajo izven območja uporabnosti modela. Kljub temu pa so te metode uporabne za hiter pregled baze spojin in usmeritev v nadaljnje raziskave. Pri uporabi *in silico* metod je pomembno, da razumemo delovanje modelov, uporabimo več različnih metod in dobljene rezultate strokovno ovrednotimo s primerjanjem tistih iz literature.

## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Osmola-Mańkowska A, Silny W, Dańczak-Pazdrowska A, Olek-Hrab K, Mańkowski B, Osmola K, Hojan-Jezierska D, Kubisz L: The sun--our friend or foe? Ann Agric Environ Med 2012; 19: 805-809.
2. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T: UV Radiation and the Skin. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 12222-12248.
3. Sánchez-Quiles D, Tovar-Sánchez A: Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? Environ Int 2015; 83: 158–170.
4. Kožni rak, Onkološki inštitut Ljubljana, dostopno na: [https://www.onko.si/za\\_javnost\\_in\\_bolnike/vrste\\_raka/kozni\\_rak/](https://www.onko.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/kozni_rak/) (dostop januar 2018)
5. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D: Epidemiological trends in skin cancer. Dermatol Pract Concept. 2017; 7 (2): 1.
6. Guy GP, Machlin SR, Ekwueme DU, Yabroff KR: Prevalence and Costs of Skin Cancer Treatment in the U.S., 2002–2006 and 2007–2011. Am J of Prev Med 2015; 48: 183-187.
7. Ramos S, Homem V, Alves A, Santos L: Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — A review. Sci. Total Environ 2015; 526: 278-311.
8. Mancebo SE, Hu JY, Wang SQ: Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. Dermatol Clin 2014; 32: 427–438.
9. Bens G: Sunscreens. Adv Exp Med Biol 2008; 624: 137-161.
10. Wang J, Pan L, Wu S, Lu L, Xu Y, Zhu Y, Guo M, Zhuang S: Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters. Int J Environ Res Public Health 2016; 13: 782
11. 11 Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih.
12. Uredba komisije (EU) 2017/238 z dne 10. februarja 2017 o spremembji Priloge VI k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih.
13. Kerdivel G, Le Guevel R, Habauzit D, Brion F, Ait-Aissa S, Pakdel F: Estrogenic potency of benzophenone UV filters in breast cancer cells: proliferative and transcriptional activity substantiated by docking analysis. PLoS One 2013; 8: e60567.

14. Cosmetic Ingredient Review: Final Report on the Safety Assessment of Benzophenones-1, -3, -4, -5, -9, and -11. *J Am Coll Toxicol* 1983; 2: 35-77.
15. Heurung AR, Raju SI, Warshaw EM: Benzophenones. *Dermatitis* 2014; 25: 3-10.
16. Kim S, Choi K: Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environ Int* 2014; 70: 143-157.
17. Vione D, Caringella R, De Laurentiis E, Pazzi M, Minero C: Phototransformation of the sunlight filter benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone) under conditions relevant to surface waters. *Sci Total Environ* 2013; 463-464: 243-251.
18. Gustavsson-Gonzalez H, Farbrot A, Larko O: Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 691-694.
19. Kurul E, Hekimoğlu S: Skin permeation of two different benzophenone derivatives from various vehicles. *Int J Cosmet Sci* 2001; 23: 211-218.
20. Lim HW, Höningmann H, Hawk JLM: Photodermatology. Informa Healthcare, New York, 2007: 288.
21. Klimová Z, Hojerová J, Beránková M: Skin absorption and human exposure estimation of three widely discussed UV filters in sunscreens – In vitro study mimicking real-life consumer habits. *Food Chem Toxicol* 2015; 83: 237-250.
22. Gonzalez H, Farbrot A, Larko O, Wennberg AM: Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Br J Dermatol* 2006; 154: 337-340.
23. Krause M, Klit A, Blomberg Jensen M, Søeborg T, Frederiksen H, Schlumpf M, Lichtensteiger W, Skakkebaek NE, Drzewiecki KT: Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *Int J Androl* 2012; 35: 424-436.
24. Tsui MM, Leung HW, Wai TC, Yamashita N, Taniyasu S, Liu W, Lam PK, Murphy MB: Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Res* 2014; 67: 55-65.
25. Danovaro R, Bongiorni L, Corinaldesi C, Giovannelli D, Damiani E, Astolfi P, Greci L, Pusceddu A: Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 441-447.

26. DiNardo JC, Downs CA: Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3. *J Cosmet Dermatol* 2018; 17: 15-19.
27. Hughes TM, Stone NM: Benzophenone 4: an emerging allergen in cosmetics and toiletries? *Contact Dermatitis* 2007; 56: 153-156.
28. Scheman A, Jacob S, Katta R, Nedostost S, Warshaw E, Zirwas M, Selbo N: Part 4 of a 4-part series Miscellaneous Products: Trends and Alternatives in Deodorants, Antiperspirants, Sunblocks, Shaving Products, Powders, and Wipes: Data from the American Contact Alternatives Group. *J Clin Aesthet Dermatol* 2011; 4: 35-39.
29. EWG's Skin Deep database, dostopno na: <https://www.ewg.org/skindeep/#.WogJd67ibIU> (dostop februar 2018)
30. SIN list, dostopno na: <http://sinlist.chemsec.org/search/search?query=benzophenone> (dostop februar 2018)
31. Hass U, Christiansen S, Petersen MA, Boberg J, Andersson A-M, Skakkebæk NE, Bay K, Holbeck H, Lund Kinnberg K, Bjerregaard P: Evaluation of 22 SIN List 2.0 substances according to the Danish proposal on criteria for endocrine disrupters. DTU Food 2012.
32. Evalvacija snovi - tekoči akcijski načrt Skupnosti (CoRAP), dostopno na: <https://echa.europa.eu/sl/information-on-chemicals/evaluation/community-rolling-action-plan/corap-table/-/dislist/details/0b0236e1806e6bdd> (dostop januar 2018)
33. Warshaw EM, Wang MZ, Maibach HI, Belsito DV, Zug KA, Taylor JS, Mathias CG, Sasseyville D, Zirwas MJ, Fowler JF Jr, DeKoven JG, Fransway AF, DeLeo VA, Marks JG Jr, Pratt MD, Storrs FJ: Patch test reactions associated with sunscreen products and the importance of testing to an expanded series: retrospective analysis of North American Contact Dermatitis Group data, 2001 to 2010. *Dermatitis* 2013; 24: 176-182.
34. Marty MS, Carney EW, Rowlands JC: Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci* 2011; 120: S93-S108.
35. McDowell J: Encyclopedia of Human Body System, Greenwood, Santa Barbara, 2011: 155-157.
36. Guyton AC, Hall JE: Textbook of medical physiology. 11th ed, Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2006: 910.

37. Bolander FF: Molecular Endocrinology. 3th ed, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, 2004: 103-213.
38. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I: A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ Toxicol Pharmacol 2015; 40: 241-258.
39. Amaral Mendes JJ: The endocrine disrupters: a major medical challenge. Food Chem Toxicol 2002; 40: 781-788.
40. Nicolopoulou-Stamati P, Hens L, Sasco AJ: Cosmetics as endocrine disruptors: are they a health risk? Rev Endocr Metab Disord 2015; 16: 373-383.
41. Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT: State of the science of endocrine disrupting chemicals – 2012, An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and World Health Organization (WHO), Geneva 2013.
42. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Overview, dostopno na: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-overview> (dostop januar 2018)
43. Endocrine Disruptors, dostopno na: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm) (dostop januar 2018)
44. Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/ 548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006.
45. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. EPA/630/R96/009, USEPA, 1996, dostopno na: <http://www.epa.gov/raf/publications/guidelines-reproductive-tox-riskassessment.htm> (dostop januar 2018)
46. Scialli AR, Guikema AJ: REACH and reproductive and developmental toxicology: still questions. Syst Biol Reprod Med 2012; 58: 63-69.
47. Spielmann H: Predicting the risk of developmental toxicity from in vitro assays. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 207: 375-380.
48. Brown ES, Jacobs A, Fitzpatrick S: Reproductive and developmental toxicity testing: from in vivo to in vitro. ALTEX. 2012; 29: 333-339.
49. Leist M, Hasiwa N, Rovida C, Daneshian M, Basketter D, Kimber I, Clewell H, Gocht T, Goldberg A, Busquet F, Rossi AM, Schwarz M, Stephens M, Taalman R,

- Knudsen TB, McKim J, Harris G, Pamies D, Hartung T: Consensus report on the future of animal-free systemic toxicity testing. ALTEX 2014; 31: 341-356.
50. Valerio LG Jr: In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 24: 356-370.
51. Roncaglioni A, Toropov AA, Toropova AP, Benfenati E: In silico methods to predict drug toxicity. Curr Opin Pharmacol 2013; 13: 802-806.
52. Raies AB, Bajic VB: In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci 2016; 6: 147-172.
53. Raunio H: In silico toxicology - non-testing methods. Front Pharmacol 2011; 2: 33.
54. Hartung T, Hoffmann S: Food for thought ... on in silico methods in toxicology. ALTEX 2009; 26:155-166.
55. Vuorinen A, Odermatt A, Schuster D: In silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals. J Steroid Biochem Mol Biol 2013; 137: 18-26.
56. ADME Database, dostopno na: [http://www.fujitsu.com/jp/group/kyushu/en/solutions/industry/lifescience/admedata\\_base/](http://www.fujitsu.com/jp/group/kyushu/en/solutions/industry/lifescience/admedata_base/) (dostop januar 2018)
57. Metabase, dostopno na: <https://www.metabase.com/> (dostop januar 2018)
58. DrugBank, dostopno na: <https://www.drugbank.ca/> (dostop januar 2018)
59. EDCs DataBank, dostopno na: <http://edcs.unicartagena.edu.co/> (dostop januar 2018)
60. EDKB Database, dostopno na: <https://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/ucm135074.htm> (dostop januar 2018)
61. Estrogenic Activity Database (EADB), dostopno na: <https://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EstrogenicActivityData/EADB/default.htm> (dostop januar 2018)
62. Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART), dostopno na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm> (dostop januar 2018)
63. Vogel HG, Hock FJ, Maas J, Mayer D: Drug discovery and evaluation : safety and pharmacokinetic assays. 2th ed, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013, 1273-1296.
64. Benfenati E, Gini G: Computational predictive programs (expert systems) in toxicology. Toxicology 1997; 119: 213-225.

65. Kirchmair J, Williamson MJ, Tyzack JD, Tan L, Bond PJ, Bender A, Glen RC: Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms. *J Chem Inf Model* 2012; 52: 617-648.
66. Long A: Drug metabolism in silico - the knowledge-based expert system approach. Historical perspectives and current strategies. *Drug Discov Today Technol* 2013; 10: e147-e153.
67. Nowak P, Woźniakiewicz M, Kościelniak P: Simulation of drug metabolism. *TrAC-Trend Anal Chem* 2014; 59: 42-49.
68. MetaSite, dostopno na: <http://www.moldiscovery.com/software/metaside/> (dostop januar 2018)
69. StarDrop's P450 metabolism models, dostopno na: <https://www.optibrium.com/stardrop/stardrop-p450-models.php> (dostop januar 2018)
70. Meteor Nexus, dostopno na: <https://www.lhasalimited.org/products/meteor-nexus.htm> (dostop januar 2018)
71. Zhang L, Sedykh A, Tripathi A, Zhu H, Afantitis A, Mouchlis VD, Melagraki G, Rusyn I, Tropsha A: Identification of putative estrogen receptor-mediated endocrine disrupting chemicals using QSAR- and structure-based virtual screening approaches. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272: 67-76.
72. Derek Nexus, dostopno na: <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm> (dostop januar 2018)
73. Endocrine Disruptor Knowledge Base, dostopno na: <https://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/default.htm> (dostop januar 2018)
74. VirtualToxLab, dostopno na: <http://www.biograf.ch/data/projects/OpenVirtualToxLab.php> (dostop januar 2018)
75. Lo Piparo E, Worth A: Review of QSAR models and software tools for predicting developmental and reproductive toxicity. *JRC Scientific and Technical Reports*, EUR 24522 EN, Luxemburg 2010: 1-24.
76. CAESAR, dostopno na: <http://www.caesar-project.eu/> (dostop januar 2018)
77. Toxicity Estimation Software Tool (TEST), dostopno na: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (dostop januar 2018)

78. Title 21--Food and Drugs Chapter I--Food and Drug Administration Department of Health and Human Services Subchapter D--Drugs for Human Use, Part 352: Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Dostopno na: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=352&showFR=1> (dostopno januar 2018)
79. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R1, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi M, Nabavi SM: Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem* 2016; 210: 402-414.
80. Everything Added to Food in the United States (EAFUS), dostopno na: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredient/ucm115326.htm> (dostopno januar 2018)
81. Thymol, Toxicity to reproduction, Evropska agencija za kemikalije (ECHA), dostopno na: <https://echa.europa.eu/sl/registration-dossier/-/registered-dossier/11030/7/9/2> (dostopno januar 2018)
82. Rochester JR: Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 2013; 42: 132-155.
83. Delfosse V, Grimaldi M, le Maire A, Bourguet W, Balaguer P: Nuclear receptor profiling of bisphenol-A and its halogenated analogues. *Vitam Horm* 2014; 94: 229-251.
84. Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R, Padmanabhan V, Taylor HS, Swan SH, VandeVoort CA, Flaws JA: Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environ Health Perspect* 2014; 122: 775-786.
85. Marchant CA, Briggs KA, Long A: In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: Derek for windows, Meteor, and Vitic. *Toxicol Mech Methods* 2008; 18: 177-187.
86. T'jollyn H, Boussery K, Mortishire-Smith RJ, Coe K, De Boeck B, Van Bocxlaer JF, Mannens G: Evaluation of three state-of-the-art metabolite prediction software packages (Meteor, MetaSite, and StarDrop) through independent and synergistic use. *Drug 7etab Dispos* 2011; 39: 2066-2075.
87. Meteor Nexus, Reasoning Methodologies, dostopno na: <https://www.lhasalimited.org/products/meteor-reasoning-methodologies.htm> (dostopno januar 2018)

88. Benfenati E, Manganaro A, Gini G: VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology, Proceedings of Workshop PAI, Turin 2013; 1-2.
89. Vega QSAR, dostopno na: <https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/> (dostop januar 2018)
90. Vega Guide to Relative Binding Affinity Model version 1.0.0, navodila vključuje program, ki je prosto dostopen na spletni strani: <https://www.vegahub.eu/download/> (dostop januar 2018).
91. Frequently Asked Questions, Endocrine Disruptome, dostopno na: <http://endocrinedisruptome.ki.si/FAQ.html> (dostop januar 2018)
92. Kolšek K, Mavri J, Sollner Dolenc M, Gobec S, Turk S: Endocrine disruptome--an open source prediction tool for assessing endocrine disruption potential through nuclear receptor binding. *J Chem Inf Model* 2014; 54: 1254-1267.
93. Derek Nexus Brochure, dostopno na: <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Derek%20Nexus.pdf> (dostop januar 2018)
94. Benfenati E: In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity. Springer Science+Business Media, New York, 2016: 475-510.
95. Guide to Developmental Toxicity Classification Model version 2.1.7, navodila vključuje program, ki je prosto dostopen na spletni strani: : <https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/> (dostop januar 2018).
96. Benfenati E: The CAESAR project for in silico models for the REACH legislation. *Chem Cent J* 2010; 4: I1.
97. Guide to Developmental/Reproductive Toxicity virtual library version 1.0.0, navodila vključuje program, ki je prosto dostopen na spletni strani: : <https://www.vegahub.eu/download/> (dostop januar 2018).
98. QSAR Methodologies, Toxicity Estimation Software Tool (TEST), dostopno na: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test#methodologies> (dostop januar 2018)
99. User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool), navodila vključuje računalniški program, ki je prosto dostopen na spletni strani: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test#install> (dostop januar 2018)

100. Schlecht C, Klammer H, Frauendorf H, Wuttke W, Jarry H: Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat. *Toxicology* 2008;245: 11-17.
101. Jeon HK, Sarma SN, Kim YJ, Ryu JC: Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats. *Toxicology* 2008; 248: 89-95.
102. Okereke CS, Abdel-Rhaman MS, Friedman MA: Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. *Toxicol Lett* 1994; 73: 113-122.
103. Nakagawa Y, Suzuki T: Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2002; 139: 115-128.
104. Felix T, Hall BJ, Brodbelt JS: Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. *Anal Chim Acta* 1998; 371: 195-203.
105. Kamikyouden N, Sugihara K, Watanabe Y, Uramaru N, Murahashi T, Kuroyanagi M, Sanoh S, Ohta S, Kitamura S: 2,5-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone: a novel major in vitro metabolite of benzophenone-3 formed by rat and human liver microsomes. *Xenobiotica* 2013; 43: 514-519.
106. Suzuki T, Kitamura S, Khota R, Sugihara K, Fujimoto N, Ohta S: Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 203: 9-17.
107. Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sanoh S, Sugihara K, Kitamura S, Ohta S: Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 282: 119-128.
108. Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Koch L, Wuttke W: Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment. *Toxicology* 2004; 205: 87-93.
109. Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W: Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology* 2004; 205: 103-112.
110. Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger W: Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. *Toxicology* 2004; 205: 113-122.

111. Kunisue T, Chen Z, Buck Louis GM, Sundaram R, Hediger ML, Sun L, Kannan K: Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 4624-4632.
112. Miller D, Wheals BB, Beresford N, Sumpter JP: Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 133-138.
113. Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM: Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 280-294.
114. Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M: UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicol Sci* 2003; 74: 43-50.
115. Nashev LG, Schuster D, Laggner C, Sodha S, Langer T, Wolber G, Odermatt A: The UV-filter benzophenone-1 inhibits 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3: Virtual screening as a strategy to identify potential endocrine disrupting chemicals. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 1189-1199.
116. Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P, Grüters A, Malendowicz LK, Christoffel J, Jarry H, Seidlovà-Wuttke D, Wuttke W, Köhrle J: Endocrine disruptors and the thyroid gland--a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 77-83.
117. Schmutzler C, Bacinski A, Gotthardt I, Huhne K, Ambrugger P, Klammer H, Schlecht C, Hoang-Vu C, Grüters A, Wuttke W, Jarry H, Köhrle J: The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 2007; 148: 2835-2844.
118. Kunz PY, Fent K: Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 217: 86-99.
119. Zhang T, Sun H, Qin X, Wu Q, Zhang Y, Ma J, Kannan K: Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. *Sci Total Environ* 2013; 461-462: 49-55.

120. Valle-Sistac J, Molins-Delgado D, Díaz M, Ibáñez L, Barceló D, Silvia Díaz-Cruz M: Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4. Environ Int 2016; 88: 243-249.
121. Vela-Soria F, Jiménez-Díaz I, Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A, Vilchez JL, Fernández MF, Olea N: Determination of benzophenones in human placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta 2011; 85: 1848-1855.
122. Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS, Ye X, Silva MJ, Zhu C, Wetmur J, Calafat AM: Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. Environ Health Perspect 2008; 116: 1092-1097.
123. Tang R, Chen MJ, Ding GD, Chen XJ, Han XM, Zhou K, Chen LM, Xia YK, Tian Y, Wang XR: Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes. Environ Pollut 2013; 178: 115-120.
124. Buckley JP, Herring AH, Wolff MS, Calafat AM, Engel SM: Prenatal exposure to environmental phenols and childhood fat mass in the Mount Sinai Children's Environmental Health Study. Environ Int 2016; 91: 350-356.
125. Wolff MS, Teitelbaum SL, McGovern K, Pinney SM, Windham GC, Galvez M, Pajak A, Rybak M, Calafat AM, Kushi LH, Biro FM: Environmental phenols and pubertal development in girls. Environ Int 2015; 84: 174-180.
126. Bae J, Kim S, Kannan K, Buck Louis GM: Couples' urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet filters and the secondary sex ratio. Sci Total Environ 2016; 543: 28-36.
127. Huo W, Cai P, Chen M, Li H, Tang J, Xu C, Zhu D, Tang W, Xia Y: The relationship between prenatal exposure to BP-3 and Hirschsprung's disease. Chemosphere 2016; 144: 1091-1097.
128. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R: Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. J Med Genet 2008; 45: 1-14.

129. Buck Louis GM, Chen Z, Kim S, Sapra KJ, Bae J, Kannan K: Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet light filters and semen quality. *Fertil Steril* 2015; 104: 989-996.
130. Buck Louis GM, Kannan K, Sapra KJ, Maisog J, Sundaram R: Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet radiation filters and couples' fecundity. *Am J Epidemiol* 2014; 180: 1168-1175.
131. Weisbrod CJ, Kunz PY, Zenker AK, Fent K: Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 225: 255-266.
132. Kim S, Jung D, Kho Y, Choi K: Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)--a two generation exposure study. *Aquat Toxicol* 2014; 155: 244-252.