

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA GORŠEK

**VPLIV BISFENOLA A IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA DIFERENCIACIJO
DENDRITIČNIH CELIC PRIPRAVLJENIH IZ ČLOVEŠKIH MONOCITOV**

**INFLUENCE OF BISPHENOL A AND ITS ANALOGUES ON
DIFFERENTIATION OF DENDRITIC CELLS PREPARED FROM HUMAN
MONOCYTES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, na Centru za tipizacijo tkiv, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za vso pomoč, posredovano znanje in usmerjanje pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorju, dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm., za koristne nasvete, pomoč pri izvajanju praktičnega dela in opravljanju meritev.

Posebna zahvala gre tudi mojim domačim za spodbujanje in potrpežljivost ter prijateljem za nepozabna doživetja skozi vsa študijska leta.

Hvala vsem!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom dr. Urbana Švajgerja, mag.farm.

Ljubljana, 2012

Katja Goršek

Sestava komisije:

Predsednica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag.farm.

Mentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Somentor: dr. Urban Švajger, mag. farm.

Član: doc. dr. Matjaž Jeras, mag.farm.

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
1. UVOD.....	1
1.1 Onesnaževala v okolju	1
1.1.1 Razdelitev onesnažil.....	2
1.2 Hormonski motilci	3
1.2.1 Okoljski (anti)estrogeni.....	3
1.2.2 Okoljski (anti)androgeni	4
1.2.3 Tiroidni hormoni	5
1.2.4 Glukokortikoidi	5
1.3 Učinek hormonskih motilcev	6
1.4 Bisfenol A	7
1.4.1 Metabolizem.....	10
1.4.2 Učinki bisfenola A	10
1.4.3 Bisfenol AF	12
1.4.4 Bisfenol F.....	13
1.5 Imunski sistem	13
1.5.1 Prepoznavanje antigenov.....	14
1.5.2 Spojine v okolju z delovanjem na imunski sistem	15
1.5.3 Modulacija imunskega sistema z naravnimi in sintezniimi hormoni	16

1.5.4	Ocena imunoloških lastnosti	17
1.5.5	Dendritične celice.....	19
2.	NAMEN DELA IN HIPOTEZA	21
3.	MATERIALI IN METODE	22
3.1	Priprava/izolacija celic iz levkocitnih koncentratov	22
3.2	Magnetna izolacija.....	23
3.3	Štetje celic.....	25
3.4	Priprava nezrelih dendritičnih celic (iDC).....	26
3.5	Priprava zrelih dendritičnih celic (mDC).....	27
3.6	Priprava/izolacija CD4 ⁺ limfocitov T	27
3.7	Analiza površinskih molekul na celicah (fenotip)	28
3.8	Mešana limfocitna reakcija (MLR).....	29
3.9	Apoptoza.....	29
3.10	Endocitoza	30
3.11	Statistične metode	30
4.	REZULTATI	31
4.1	Priprava dendritičnih celic	31
4.2	Obseg apoptoze.....	31
4.3	Izražanje značilnih površinskih molekul na dendritičnih celicah med diferenciacijo in zorenjem	34
4.4	Endocitoza	39
4.5	Mešana limfocitna reakcija (MLR) – proliferacijski odziv limfocitov T	40
5.	RAZPRAVA.....	43
6.	SKLEP	50
7.	LITERATURA	52

POVZETEK

Dandanes človek onesnažuje okolje s snovmi, katere niso naravno prisotne, vendar si večina ljudi ne predstavlja življenja brez njih. Med znanimi onesnaževali so tudi spojine, ki se odpuščajo iz plastičnih in podobnih materialov, ki dokazano vplivajo na zdravje ljudi in živali.

V diplomskem delu smo se ukvarjali z vplivom nekaterih najbolj znanih spojin iz te skupine (bisfenol A, bisfenol F, bisfenol AF) v primerjavi z estradiolom na imunski sistem, ki je eden izmed manj raziskanih področij delovanja prej omenjenih onesnaževal. Kot modelni sistem za ugotavljanje vpliva izbranih spojin na imunski sistem smo izbrali dendritične celice (DC), ki so profesionalne antigene predstavljajoče celice. Iz levkocitnih koncentratov smo izolirali monocite, katerim smo v različnih koncentracijah dodali spojine na začetku diferenciacije v DC. Nezrele dendritične celice, katere dobimo po petih dneh gojenja v prisotnosti GM-CSF in IL-4, imajo veliko sposobnost privzemanja antigenov iz okolja. Zrele DC, katere dobimo po dodatnih dveh dneh gojenja v prisotnosti GM-CSF, IL-4 in dodatno še lipopolisaharida, to sposobnost izgubijo, poveča se pa sposobnost predstavljanja antigenov na površini celic.

Med poskusi smo preverjali vpliv na živost in morfologijo celic. Preverjali smo sposobnost nezrelih celic, da privzamejo antigen (glavni funkcijski test nezrelih celic - sposobnost endocitoze). Tako nezrelim kot zrelim DC smo s pomočjo pretočne citometrije določili fenotip. Vpliv spojin smo preverjali tudi s funkcijskimi testi, in sicer z merjenjem proliferacije limfocitov T v mešani limfocitni reakciji (MLR) *in vitro*.

Ugotovili smo, da spojine v izbranih koncentracijah (10 in 50 μM bisfenol A in bisfenol F, 10 in 30 μM bisfenol AF oz. 10 in 50 nM estradiol) ne povzročajo povečane apoptoze modelnih celic. Bisfenol AF, ki je skozi vse izvedene poskuse kazal poseben oz. drugačen vpliv, je bil preveč toksičen (signifikantno povečana apoptoza) pri koncentraciji 50 μM , zato smo s to spojino izvajali poskuse pri nižji koncentraciji (30 μM). Čeprav celični fenotip ni kazal velikih vplivov spojin, so le-te signifikantno zmanjšale sposobnost endocitoze nezrelih DC. Kasneje se je ta vpliv opazil pri zorenju celic kot nepopolno izražanje kostimulacijskih molekul v primerjavi s kontrolnimi poskusi. Rezultati mešane limfocitne reakcije niso pokazali statistično signifikantnih razlik pri estradiolu, bisfenolu A

in bisfenolu F. Učinek je bil opazen le pri bisfenolu AF, tako pri nezrelih kot pri zrelih celicah in sicer je bila proliferacija limfocitov T manjša.

Diplomsko delo daje osnovo za nadaljnje raziskovanje delovanja bisfenola A in njegovih analogov na imunski sistem, še posebej bisfenola AF. Za celostno sliko bi morali oceniti tudi druge aspekte zorenja, kot sta npr. citokinski profil in sposobnost DC v smislu polarizacije limfocitov T v različne vrste efektorskih celic (Th1, Th2, Th17).

ABSTRACT

We are polluting the environment with not naturally occurring substances, but at the same time we cannot imagine our life without them. Among the well known pollutants are also substances that are being released from plastic and similar materials. These substances have an influence on the human and animal health.

The purpose of our work was to determine the effect of some of the best known compounds from this group (bisphenol A, bisphenol F, bisphenol AF), and comparing them to estradiol, on the immune system which is one of the least researched areas of effect of these substances. The dendritic cells (DC), which are professional antigen presenting cells, were chosen as a model system for determining the effects of these substances on the immune system. We have isolated monocytes from buffy coats. Monocytes were treated with chosen substances at the beginning of the differentiation into DC. We have obtained immature DC after five days of cultivation in the presence of GM-CSF and IL-4. They have a great ability to uptake antigens from the environment. Mature DC, which need additional two days of cultivation in the presence of GM-CSF, IL-4 and lipopolysaccharide, lose this ability and increase the ability of presenting antigens on the cell surface.

We have tested the influence of the chosen substances on viability and morphology of the cells. We have studied the ability of immature cells to adopt an antigen (the primary functional test of immature cells - endocytosis). We have determined phenotype of immature and mature DC with the help of flow cytometry. The effect of the substances was determined with functional tests. We have used mixed lymphocytes reaction (MLR) *in vitro* to measure the proliferation of lymphocytes T.

We have concluded that the substances at chosen concentrations (10 and 50 μM bisphenol A and bisphenol F, 10 and 30 μM bisphenol AF, 10 and 50 nM estradiol) do not increase apoptosis of the model cells. Bisphenol AF has shown very different effect during all of the conducted tests. It was too toxic at 50 μM (significantly increased apoptosis), so we have conducted the tests for this substance at a lower concentration (30 μM). Although cell phenotype didn't show large effects of tested substances, they have significantly lowered the ability to uptake antigens from the environment (endocytosis). Later on this effect was noted as an incomplete expression of costimulatory molecules during the maturation of the

cells compared to control experiments. The results of mixed lymphocyte reaction didn't show any significant effects of estradiol, bisphenol A and bisphenol F. The effect was noted on immature and mature cells only when they were exposed to bisphenol AF. The proliferation of lymphocytes was decreased.

This thesis is a basis for further studies of effects of bisphenol A and its analogues on the immune system (especially bisphenol AF). For the full determination of the effects we would need to study also other aspects of maturation, e.g. cytokine profile and the ability of DC to polarize lymphocytes T into different types of effector cells (Th1, Th2, Th17).

SEZNAM OKRAJŠAV

AV	Annexin V
APC	antigene predstavljajoče celice
BC	levkocitni koncentrat (ang. Buffy coat)
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPF	bisfenol F
CD	celični označevalec (ang. Cluster of Differentiation)
cpm	števki na minuto (ang. counts per minute)
DC	dendritične celice
DES	dietilstilbestrol
DMSO	dimetilsulfoksid
E ₂	estradiol
EDTA	Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force
FITC	fluorescein izotiocianat
FSC	ang. Forward Scatter
GM-CSF	granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (ang. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)
HLA-DR	molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II pri človeku (ang. Human Leukocytes Antigens)
IL	interlevkin
LPS	lipopolisaharid
MFI	srednja intenziteta fluorescence (ang. Mean Fluorescence Intensity)
MHC	poglobitni histokompatibilnostni kompleks
MLR	mešana limfocitna reakcija (ang. Mixed Lymphocyte Reaction)
MNC	mononuklearne celice
PI	propidijev jodid
SSC	ang. Side Scatter
TSH	ščitnico stimulirajoči hormon
Th	celice T pomagalke

US-EPA Ameriška agencija za varstvo okolja (ang. US Environmental Protection Agency)

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Strukturna formula bisfenola A</i>	8
Slika 2: <i>Strukturna formula bisfenola AF</i>	12
Slika 3: <i>Strukturna formula bisfenola F</i>	13
Slika 4: <i>Shema plasti v centrifugirkah pred in po centrifugiranju</i>	23
Slika 5: <i>Kolona LD</i>	24
Slika 6: <i>MidiMACS Separator</i>	25
Slika 7: <i>Delež apoptotičnih in mrtvih celic pri dveh koncentracijah izbranih preiskovanih spojin (E₂, BPA, BPF, BPAF)</i>	33
Slika 8: <i>Delež apoptotičnih in mrtvih celic pri dveh koncentracijah spojine BPAF</i>	34
Slika 9: <i>Histogrami celic po petih dneh diferenciacije (nezrele DC)</i>	35
Slika 10: <i>Grafični prikaz vplivov preizkušanih spojin na izražanje značilnih površinskih molekul nezrelih DC med diferenciacijo iz monocitov in vitro</i>	36
Slika 11: <i>Histogrami celic po sedmih dneh diferenciacije in zorenja (zrele DC)</i>	38
Slika 12: <i>Srednja vrednost flouescence in statistično pomembne razlike v primerjavi s kontrolnim vzorcem</i>	39
Slika 13: <i>Obseg proliferacije limfocitov T v kulturah MLR z nezrelimi (A) ali zreliimi (B) dendritičnimi celicami</i>	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: <i>Povzetek dnevne izpostavljenosti bisfenolu A štirih starostnih skupin.</i>	9
--	---

1. UVOD

1.1 Onesnaževala v okolju

Zaradi človekovega načina življenja je v okolju vedno več snovi, ki sicer niso naravno prisotne. V zadnjem času so še posebej zanimiva iz stališča onesnaževanja okolja zdravila ter ostale industrijske kemikalije, njihovi metaboliti oziroma spojine, ki izkazujejo vpliv na človekov organizem.

Vedno večjo skrb predstavljajo morebitni učinki nekaterih kemikalij na zdravje človeka (1). Variabilnost med posamezniki v absorpciji, metabolizmu in izločanju spojin je ogromna. Bolezni, ki se pojavijo zaradi kronične izpostavljenosti nizkim koncentracijam spojin, so lahko klinično opazne šele po daljšem času (2).

Izvor, emisije, prenos, usoda in učinek kemikalij so področja, ki nas zanimajo. Spojine, ki jih najdemo v okolju kot posledico našega onesnaževanja, so lahko težko razgradljive, se akumulirajo v okolju ali telesu in imajo lahko toksične učinke (1). Spojine se na različne načine sprostijo v okolje in se lahko prenašajo tudi na daljše razdalje preko vode, zraka ali zemlje. Od tam se lahko prenesejo v rastline ter akumulirajo v prehranski verigi. Zaradi številčnosti vseh spojin ni mogoče preučiti s študijami izpostavitve in se zato poslužujemo predvidevanj (3).

Ene izmed pomembnejših kemikalij v okolju so tudi spojine, ki se odpuščajo iz plastičnih materialov. Zaradi poceni surovine porabimo veliko plastičnih izdelkov za enkratno uporabo, s tem pa se količina in raznovrstnost spojin v okolju tudi povečuje (4). Med drugim se iz plastičnih ostankov izločajo poliklorirani bifenili, policiklični aromatski ogljikovodiki, polibromirani difeniletri, alkilfenoli in bisfenol A. Plastike torej ne smemo smatrati za biokemijsko inerten material. Spojine, ki se odpuščajo, lahko prehajajo v celice, interagirajo z biološko pomembnimi molekulami in vplivajo na endokrini sistem (5).

Med pomembnimi spojinami v okolju so tudi zdravila, ki so pomemben in nenadomestljiv del modernega življenja. Vendar se je do 90. let prejšnjega stoletja le malo opozarjalo na njihovo pojavljanje v okolju ob normalni uporabi (6). Veliko ton farmakološko aktivnih spojin se porabi za zdravljenje, preprečevanje nosečnosti ali za lažje soočanje s stresom, ki je v moderni družbi del vsakdanjika. Večina zdravil se izloči v odpadne vode – ali v

nespremenjeni obliki ali kot aktivni metaboliti. Izločanje zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov, skupaj z neprimernim odstranjevanjem neporabljenih ali pretečenih zdravil iz gospodinjstev, je vodilo do velikih koncentracij različnih učinkovin, metabolitov in tudi pomožnih snovi v kanalizaciji (7).

Posebno skrb zbuja tudi domneva, da prisotnost farmakološko aktivnih spojin v okolju lahko vodi v nerazpoznavne ali neizmerljive učinke, ki povzročijo ireverzibilno škodo na ekosistemu. To zahteva empirično raziskovanje, ki je usmerjeno na razumevanje učinkov teh biološko aktivnih spojin v nizkih koncentracijah, kot se pojavljajo v okolju (6). Koncentracije farmacevtskih sestavin v vodnem in kopenskem okolju so lahko nizke, vendar je učinek akumulacije majhnih koncentracij biološko aktivnih spojin v pitni vodi na človekovo zdravje še vedno neznan (7).

Kot primer navajamo Veliko Britanijo, kjer sicer niso namenjali veliko pozornosti raziskavam učinkovin v okolju, so pa izvajali raziskave na področju hormonskih motilcev in estrogenski aktivnosti naravnih steroidnih hormonov, vključno z 17α -etinilestradiolom, ki je prisoten v kontraceptivih. Naravni ženski hormoni (17β -estradiol, estron) in sintezni hormon 17α -etinilestradiol so bili prisotni v odpadnih vodah v območju nekaj ng/l (7).

1.1.1 Razdelitev onesnažil

Organska onesnažila v okolju lahko razdelimo v 4 skupine:

- a) inertne kemikalije,
- b) manj inertne kemikalije,
- c) reaktivne kemikalije in
- d) kemikalije s specifičnim delovanjem.

Spojinam v teh štirih skupinah lahko izračunamo ali pričakovano koncentracijo ali pričakovano območje koncentracij, pri katerih bodo imele učinek (8).

Inertne kemikalije so spojine, ki so nereaktivne pri upoštevanju celokupnih akutnih učinkov in ne reagirajo s specifičnimi receptorji v organizmu. Kot primer takšnih spojin lahko navedemo metanol, butanol, benzen, diklorometan, stiren, oktanon.

Manj inertne kemikalije so bolj toksične v primerjavi z inertnimi kemikalijami. Takšne spojine so na primer bisfenol A, anilini, krezol, fenol, 2,4-diklorofenol.

Reaktivne kemikalije kažejo povečano toksičnost in lahko neselektivno reagirajo z določenimi kemijskimi strukturami, ki so pogoste v bioloških molekulah ali pa se

metabolizirajo v bolj toksične spojine. Primeri spojin: akrilamid, dibutilftalat, benzaldehid, akrolein.

Kemikalije s specifičnim delovanjem izkazujejo toksičnost zaradi (specifičnih) interakcij z določenimi receptorskimi molekulami (specifična ali receptorska toksičnost). Primer takšnih spojin je permetrin (9).

1.2 Hormonski motilci

Vprašanje, ali imajo nekatere kemijske spojine (tako naravne kot sintezne) neželene učinke na endokrini sistem, postaja vse bolj pomembno tako v javnosti kot v znanstvenih krogih (10). Ameriška agencija za varstvo okolja (US-EPA *US Environmental Protection Agency*) je definirala hormonske motilce kot »eksogene spojine, ki se vpletajo v produkcijo, sproščanje, transport, metabolizem, vezavo, aktivnost ali izločanje naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za vzdrževanje homeostaze in urejanje razvojnih procesov«. Z uporabo *in vitro* in *in vivo* testov so določili večje število kemijskih spojin v okolju, ki delujejo kot hormonski motilci (11). Hormonski motilci tako vključujejo različne naravne in sintezne kemijske spojine, ki oponašajo ali zavirajo delovanje endokrinega sistema pri ljudeh in živalih. Najbolj znani lastnosti le-teh sta njihova vsesplošna prisotnost v nizkih koncentracijah in njihova raznovrstnost (12).

Med njimi so mnogi pesticidi, industrijske kemikalije, farmacevtske spojine in naravne spojine, ki delujejo npr. kot ligandi na estrogenskih, androgenskih in aril ogljikovodikovih receptorjih ali izkazujejo kombinirano delovanje (npr. estrogensko in antiandrogensko delovanje) (11). Znani so tudi hormonski motilci, ki vplivajo na funkcijo in fiziološko aktivnost nadledvične žleze, vendar so te raziskave še vedno maloštevilne (13). Poznamo tudi vpliv hormonskih motilcev na tiroidni sistem in sicer le-ti delujejo na funkcijo in homeostazo tiroidnih hormonov z inhibicijo sinteze, spreminjanjem serumskih transportnih proteinov ali s povečanjem katabolizma hormonov (14).

1.2.1 Okoljski (anti)estrogeni

Najbolj preučevan hormonski motilec je dietilstilbestrol (DES), sintezni estrogenski hormon, ki se je za preprečevanje splava uporabljal do 70. let prejšnjega stoletja. Vnos

DES med nosečnostjo je povzročil povečano pojavnost malformacij testisov, razvoj epididimalnih cist in zmanjšano kvaliteto sperme pri moških potomcih (11).

V zadnjem času je lahko vzrok za zaskrbljenost razširjena uporaba agonistov hormonskih receptorjev, kot je 17α -etinilestradiol v peroralnih kontraceptivih. Prosti 17α -etinilestradiol pride v površinske vode preko bakterijskega metabolizma 17α -etinilestradiol-glukuronidov v čistilnih napravah. V nasprotju z naravnim 17β -estadiolom, ki se inaktivira v 24. urah, ponovno aktiviran 17α -etinilestradiol počasi razpada v okolju in tako obdrži svojo estrogensko aktivnost še nekaj tednov (11).

Kot šibko estrogensko aktivna spojina se v okolju pojavlja tudi bisfenol A, ki se uporablja pri izdelavi polikarbonatnih plastičnih izdelkov, kot notranji sloj konzerv in kot aditiv v drugih izdelkih široke potrošnje. Čeprav je več kot 90 % študij, ki so bile podprte s strani državnih organov, dokazalo signifikantne učinke te spojine, kemijska industrija te trditve izpodbija s svojimi študijami, ki ne dokazujejo pomembnih učinkov bisfenola A pri nizkih koncentracijah (15).

V Nemčiji je bila opravljena raziskava, v kateri so preučevali prisotnost številnih estrogensko aktivnih spojin, vključno z estronom, 17β -estadiolom in 17α -etinilestradiolom, v površinski in pitni vodi. V vseh vzorcih rečnih voda so našli bisfenol A, 4-nonilfenol in steroide, ki imajo vsi estrogensko aktivnost. V pitni vodi so poleg prej naštetih spojin našli še 4-terc-oktilfenol. Zaključili so, da estrogeni niso popolnoma odstranjeni v čistilnih napravah in lahko prehajajo v vodno okolje. Niso izključili možnosti, da so te spojine lahko prisotne tudi v pitni vodi, kar potrjujejo tudi kasnejše raziskave (11).

Omeniti moramo tudi, da lahko na hormonski sistem vplivajo tudi naravno prisotne spojine. Kot primer lahko navedemo estrogene iz rastlinskih virov, ki jih poznamo pod imenom fitoestrogeni in vključujejo izoflavone, kumestane in lignane. Fitoestrogene najdemo tudi v prehranskih dopolnilih, ki jih priporočajo za lajšanje težav menopavze pri ženskah (16, 17).

1.2.2 Okoljski (anti)androgeni

Narašča tudi zaskrbljenost glede prisotnosti androgenih spojin v okolju. Poleg tega se nahajajo v okolju tudi spojine, ki izražajo antiandrogenski učinek (11). Te spojine lahko spodbudijo razvojne malformacije pri človeku in laboratorijskih živalih (18). K androgenom spadajo tudi anabolični steroidni hormoni, ki jih v naravi najdemo zaradi

nedovoljene rekreativne uporabe in tudi zaradi uporabe pri proizvodnji mesa, kar pa je v Evropski Uniji sicer prepovedano (19).

Zaradi številnih *in vivo* učinkov narašča skrb tudi zaradi razširjenosti uporabe gelov, ki vsebujejo androgene, ki se uporabljajo za urejanje koncentracije testosterona v serumu in za zmanjšanje simptomov pomanjkanja androgenov. Le majhen del zelo učinkovitih androgenov v teh gelih se absorbira skozi kožo, večina (do 90%) se pa izloči v površinske vode med tuširanjem. Okoljska izpostavljenost tem spojinam lahko stimulira razvoj določenih vrst rakov, ki so odvisni od androgenov (11).

1.2.3 Tiroidni hormoni

Homeostaza tiroidnih hormonov je pomembna za pravilen metabolizem, rast in razvoj. V okolje se sprošča veliko število kemikalij, med katerimi so tudi številne, za katere menijo, da se vpletajo v normalno funkcijo ščitnice. Za vzrok motnje ščitničnih hormonov predvidevajo mnogo mehanizmov, vključno s povečanim metabolizmom tiroksina z uridin difosfat glukuronil transferazami, preprečevanje signalov ščitničnih hormonov preko receptorjev in indukcija prehoda skozi mitohondrijsko membrano (20).

In vitro in *in vivo* študije so prav tako pokazale kot enega neželenih učinkov bisfenola A in sorodnih spojin vpliv na ščitnične hormone. Izpostavljenost bisfenolu A preko hrane pri podganah med nosečnostjo in dojenjem je zvišala serumske koncentracije tetrajodotironina. Bisfenol A in njegovi analogi bi naj delovali kot antagonisti, ki preprečujejo vezavo trijodotironina na receptorje (20).

1.2.4 Glukokortikoidi

Glukokortikoidi se uporabljajo pri zdravljenju številnih bolezni. Med njimi so vnetja, astma, infekcije, alergije, obolenja kože in revmatizem. Glukokortikoidi se lahko na več načinov vpletejo v vnetne procese in celične imunske odzive. Kot primer lahko navedemo, da zavirajo migracijo levkocitov na mesto vnetja, spreminjajo različne funkcijske in efektorske celice in zmanjšajo proizvodnjo vnetnih mediatorjev (21).

Zaradi kemijskih in biokemijskih lastnosti glukokortikoidov predvidevajo, da so pomembni tudi kot hormonski motilci. Okoljsko pomembnost uporabe teh steroidov pri zdravljenju zgoraj naštetih bolezni lahko predvidimo na podlagi ocene porabe. Na

Danskem je izračunana poraba 361 kg/leto, kar se lahko zdi pomembno v primerjavi z estradiolom (poraba 45 kg/leto) (19).

1.3 Učinek hormonskih motilcev

Že leta 1996 je Evropska komisija ugotovila, da v Evropski uniji obstaja nekaj primerov, kjer neželeni endokrini učinki ali reproduktivna toksičnost pri pticah in sesalcih sovpadata z visokimi koncentracijami antropogenih spojin, ki so se že izkazale kot hormonski motilci v nekaterih testnih sistemih (1).

Nekateri raziskovalci so predlagali, da je zmanjšanje števila spermijev pri človeku, povečana pojavnost določenih reproduktivnih nepravilnosti pri moških, kot na primer spermatogenetska disfunkcija, nepravilen spust testisov, malformacije penisa in rak mod, kot tudi rak dojke pri ženskah, lahko povezano z izpostavljenostjo nizkim koncentracijam spojin, ki posnemajo hormone (1).

V zadnjih letih so različne mednarodne skupine, nacionalne agencije in znanstvena združenja pregledala razpoložljive podatke in prišla do natančnih zaključkov. Kljub temu da se razlikujejo v podrobnostih, so splošni zaključki zelo podobni:

- interakcija z endokrinim sistemom je mehanizem za možne učinke, vendar ne neželeni učinek kot tak,
- interakcija med hormonskimi motilci pri koncentraciji v okolju in človekovim zdravjem ni dokazana,
- človekova izpostavljenost naravnim fitoestrogenom je večja v primerjavi s sintezni hormonskimi motilci,
- obstaja možnost za interakcijo med hormonskimi motilci v koncentraciji v okolju in učinki na razmnoževanje živali v okolju,
- obstaja dokaz za interakcijo med visokimi lokalnimi koncentracijami hormonskih motilcev in učinki na razmnoževanje živali v okolju,
- in predvsem, potrebno je nadaljnje znanstveno delo glede tega problema (10).

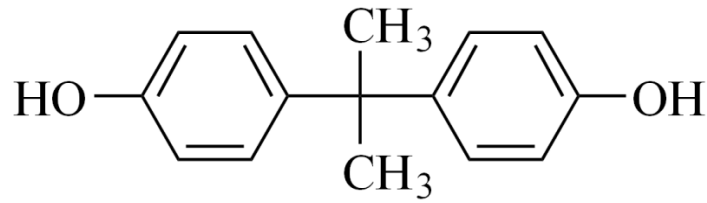
Glede na to, da so kemijske spojine (naravne in sintezne), ki bi jih želeli preučiti glede njihovega vpliva na endokrini sistem, številčne in da se med sabo lahko zelo razlikujejo, je OECD EDTA (EDTA – *Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force*) predlagala sistem testov, ki so razdeljeni v nivoje po naraščajoči metodološki kompleksnosti in moči dokazov za učinek. V osnovi je:

- nivo 1 – razvrstitev številnih naravnih in sinteznih kemikalij po pomembnosti z uporabo razpoložljivih informacij,
- nivo 2 – *in vitro* testi, vključno z upoštevanjem (kvantitativnih) razmerij med strukturo in aktivnostjo, ki lahko dajo tudi informacije o mehanizmu,
- nivo 3 – *in vivo* testi, za dokazovanje aktivnosti določenih endokrinih sistemov,
- nivo 4 – *in vivo* testi, za dokazovanje neželenih učinkov v številnih endokrinih sistemih,
- nivo 5 – najboljši *in vivo* testi za neželene učinke, ki jih lahko uporabimo za definitivno oceno tveganja (10).

OECD smernice s pomočjo *in vitro* testov in kratkotrajnih *in vivo* testov (nivoji 1, 2 in 3) določijo spojine, ki so primerne za dolgotrajne študije (nivoja 4 in 5) določanja neželenih učinkov, ki so osnova za oceno tveganja (10).

1.4 Bisfenol A

Bisfenol A je industrijska kemikalija, ki se uporablja predvsem pri izdelavi polikarbonatnih plastičnih materialov in epoksi smol. Polikarbonatno plastiko uporabljamo za izdelavo materialov, ki prihajajo v stik s hrano, kot na primer plastenke za otroško hrano, posoda za mikrovalovno pečico, posoda za shranjevanje hrane in plastenke za vodo. Epoksi smole nanašamo kot notranji zaščitni sloj v pločevinke za hrano in pijačo in kot premaz na kovinske pokrove za steklene kozarce in steklenice, vključno s hrano za otroke. Zaradi te razširjene uporabe, smo uporabniki bisfenolu A izpostavljeni vsakodnevno (22). Kljub številnim možnim neželenim učinkom, uradno stališče agencij ostaja nespremenjeno – če se bisfenol A uporablja v skladu z veljavno zakonodajo, ne predstavlja nobenega tveganja za zdravje pri uporabi materialov, ki prihajajo v stik s hrano (23). V Kanadi so ubrali bolj previdno pot in imajo že od leta 2010 zakonodajo, ki je prepovedala prodajo in oglaševanje polikarbonatnih otroških plasten, ki vsebujejo bisfenol A (24). V Evropski uniji smo takšen pristop sprejeli leta 2011 – 1. marca 2011 je pričela veljati prepoved proizvodnje takšnih plasten za otroke, od 1. junija pa je prepovedano dajanje na trg in uvažanje takšnih izdelkov (25).

Slika 1: *Strukturna formula bisfenola A*

V tabeli 1 prikazujemo dnevno izpostavljenost bisfenolu A štirih starostnih skupin. Na voljo je več možnih scenarijev, saj so lahko npr. dojenčki hranjeni samo z dojenjem, lahko je kombinacija dojenja in hrane za dojenčke ali pa so hranjeni samo s hrano za dojenčke. Hrana za dojenčke obstaja kot tekočina ali kot prašek, v steklenici ali pločevinki, poleg tega pa so novorojenčki lahko hranjeni iz steklenice ali iz plastenke. Starejši otroci se poleg omenjene hrane pričnejo hraniti še s trdno hrano, ki je večinoma pakirana v steklene kozarce s pokrovom, ki je premazan z epoksi smolo. Pri odraslih osebah je raznovrstnost prehranjevanja še večja, poleg naštetega se pridruži še uživanje kave, čaja in alkohola (22).

Preglednica I: *Povzetek dnevne izpostavljenosti bisfenolu A štirih starostnih skupin* (povzeto po Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A, Summary Report, Ottawa, Kanada, 1. – 5. nov. 2010.).

Populacija	Vir izpostavljenosti	Ocena dnevne izpostavljenosti s hrano ($\mu\text{g}/\text{kg}$ telesna teža/dan)
Novorojenčki, 0-6 mesecev	Izključno dojeni	0,3
	Polikarbonatne plastenke in formula ^a (prašek-tekočina)	2,0 - 2,4
	Formula, brez polikarbonatnih plasten ^a (prašek tekočina)	0,01 - 0,5
Dojenčki, 6-36 mesecev	Dojeni + trdna hrana (najboljši – najslabši primer) ^b	0,1
	Polikarbonatne plastenke in formula ^a + trdna hrana (najboljši – najslabši primer) ^b	0,5 - 0,6
	Formula, brez polikarbonatnih plasten ^a + trdna hrana (najboljši – najslabši primer) ^b	0,01 - 0,1
Otroci, 3+ leta	Sadje, sladice, zelenjava, meso, juhe, morska hrana, gazirane pijače (najboljši – najslabši primer) ^b	0,2 - 0,7
Odrasli	Sadje, sladice, semena, zelenjava, meso, juhe, morska hrana, gazirane pijače, čaj, kava, alkohol (najboljši – najslabši primer) ^b	0,4 - 1,4

^a Predvidena je bila samo formula, brez dojenja

^b Najslabši primer je predvidevanje, da je bil dnevni vir hrane 100% pakirana hrana in pijača in najboljši primer je predvidevanje, da je bil dnevni vir hrane 25% pakirana hrana in pijača.

V zbirki *in vitro* študij so prikazali najnižje koncentracije, pri katerih je viden učinek (LOEC, *lowest-observed-effect concentration*) bisfenola A. Če naštejemo nekaj primerov:

- modeli ženskih reproduktivnih tkiv: 0,0001 – 0,1 $\mu\text{mol/l}$,
- modeli raka na dojki: 0,0001 – 1 $\mu\text{mol/l}$,
- modeli moških reproduktivnih tkiv: 0,0001 – 150 $\mu\text{mol/l}$,
- modeli živčevja: $1 \cdot 10^{-7}$ – 2,5 $\mu\text{mol/l}$,
- modeli imunskega sistema: 0,0002 – 10 $\mu\text{mol/l}$,
- modeli hipofize: $1 \cdot 10^{-6}$ – 10 $\mu\text{mol/l}$ (26).

1.4.1 Metabolizem

Najpogosteje je človek izpostavljen bisfenolu A z uživanjem hrane iz omenjenih plastenk in pločevink. Študije na glodavcih, primatih in človeku so pokazale, da se spojina v veliki meri absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Podvržen je obsežnem predsistemskemu metabolizmu faze II v črevesju in jetrih, v glavnem do glukuronidnega derivata. Ta transformacija je ključna, saj se v nasprotju z aglikonom glukuronid ne veže na estrogenski receptor. Glede na toksikokinetične podatke se aglikon ne akumulira v telesu (22).

Tako naj bi bil bisfenol A po absorpciji podvržen hitremu metabolizmu in izločanju iz telesa z urinom, vendar podatki o tem niso skladni. Nakazujejo, da je razpolovni čas bifenola A daljši od pričakovanega in/ali da je shranjen v telesu in/ali da uživanje hrane ni edini vir vnosa. Možno je, da smo bisfenolu A izpostavljeni tudi preko zraka in z absorpcijo preko kože. Dodatne študije so dokazale bisfenol A tudi v prahu, površinski vodi in morskem okolju (27).

1.4.2 Učinki bisfenola A

Pri odraslih ljudeh so povišane koncentracije bisfenola A povezali s številnimi boleznimi, terapevtskimi izidi in zdravstvenimi stanji, kot npr. sladkorna bolezen, kardiovaskularne bolezni, spremenjeni jetrni encimi, splavi, prezgodnji porodi (27).

Za bisfenol A so najprej predvidevali, da deluje kot šibek okoljski estrogen z vezavno afiniteto 1000 – 10000-krat manjšo od estradiola. Vendar zadnji podatki kažejo, da lahko bisfenol A stimulira celične odzive že pri zelo nizkih koncentracijah, v nekaterih primerih primerljivo z estradiolom. Poleg tega predvidevajo, da so lahko nekateri metaboliti

močnejši estrogene kot osnovna spojina. V nasprotju z estradiolom, bisfenol A kaže omejeno vezavo na serumske proteine in ima zato večjo dostopnost do tkiv zarodka, ki so občutljiva na estrogen. Zgodnja izpostavljenost bi naj spremenila občutljivost za estrogen določenih tkiv še dolgo za prvotno izpostavljenostjo (27).

Bisfenol A bi naj vplival na embriogenezo in razvoj novorojenčka tudi preko vpletanja ali inhibicije signalnih poti tiroidnih hormonov. Lahko se veže na receptor in deluje kot antagonist ter tako inhibira transkripcijo, ki jo stimulira ščitnični hormon (trijodtironin). Vendar pa je za to delovanje potrebna večja koncentracija kot za vezavo na estrogenski receptor (27).

Predvidevajo tudi antagonistično delovanje na androgenske receptorje. Dokazali so tudi vezavo na aril ogljikovodikove receptorje, ki delujejo kot transkripcijski faktorji v mnogih tkivih. Na te receptorje se lahko vežejo mnoge spojine in lahko indirektno vplivajo na metabolizem ksenobiotikov kot tudi na sintezo in metabolizem steroidov, ter predvidevajo povezavo med aril ogljikovodikovimi, estrogenskimi in androgenskimi receptorji. Nazadnje bi naj bisfenol A inhibiral aromatazno aktivnost, kar bi povzročilo manjšo pretvorbo testosterona v estradiol (27).

Raziskave na miših so pokazale, da obstaja povezava med hormonskimi motilci in odpornostjo na inzulin. Dokazali so, da bisfenol A oponaša učinke estradiola na homeostazo glukoze v krvi preko dveh poti. Neklasična pot vodi do hitrega povečanja plazemskega inzulina in zmanjšanja glukoze v krvi. Drugi estrogenski in ksenoestrogenski učinki, ki se začnejo na ravni plazemske membrane, se odvijajo preko klasičnih estrogenskih receptorjev. Aktivacija teh receptorjev se zgodi že pri nizkih odmerkih bisfenola A in estradiola, ki pa postane signifikantna pri odmerku 10 µg/kg. Sklepamo lahko, da izpostavljenost abnormalnim koncentracijam endogenih estrogenov ali izpostavljenost estrogenom iz okolja poveča tveganje za sladkorno bolezen tipa 2 (28).

Predvidevajo, da ima bisfenol A učinek tudi na kardiovaskularni sistem, saj so s študijo NHANES v Združenih državah Amerike pokazali povezavo med višjimi koncentracijami bisfenola A v urinu in povečano prevalenco koronarne srčne bolezni. Potrebni je več raziskav, tako *in vitro* kot *in vivo*, da bi razumeli mehanizme delovanja povezave med izpostavljenostjo bisfenolu A in boleznimi srca (29).

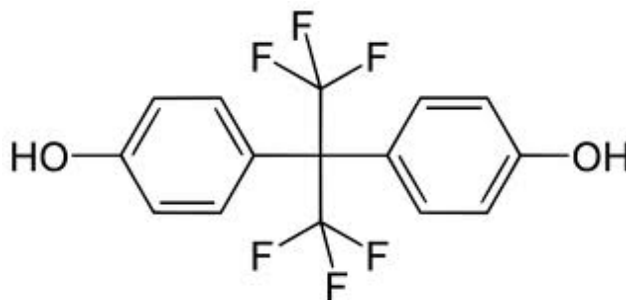
Raziskovanje vpliva bisfenola A na imunski odziv je še v zgodnjih fazah razvoja. Obstajajo študije na podganah, katere so pokazale, da izpostavljenost bisfenolu A lahko vpliva na homeostazo imunskega sistema (npr. vpliv na citokinsko aktivnost, izločanje

dejavnika tumorske nekroze alfa). Nadaljnje študije na morskih prašičkih in ljudeh (vključno z izpostavljenostjo pri delu) so zaključile, da lahko bisfenol A povzroči senzitivacijo kože. Ekspertna skupina Svetovne zdravstvene organizacije je leta 2010 zaključila, da so študije vpliva te spojine na imunski sistem potrebne in zanimive, vendar da do sedaj ni jasnih dokazov, da se bisfenol A vpleta v funkcijo imunskega sistema (22).

V okolju se pojavljajo tudi analogi bisfenola A. Te spojine so med sabo strukturno podobne in kot pričakovano imajo tudi podobne učinke. V sklopu diplomske naloge smo se poleg na bisfenol A osredotočili še na bisfenol AF in bisfenol F, ki sta od bisfenola A manj raziskana in morda toliko bolj zanimiva.

1.4.3 Bisfenol AF

Bisfenol AF je fluoriran analog bisfenola A, na kar kaže tudi črka 'F' v imenu. Uporaben je v proizvodnji polimerov, ki vsebujejo skupino CF_3 , z izboljšanimi kemijskimi, termičnimi in mehničnimi lastnostmi (npr. v elektronskih materialih, plastičnih optičnih vlaknih, valovodih). Kljub temu da se industrijska proizvodnja povečuje, ni znano, kolikšna je letna proizvodnja ali koncentracija bisfenola AF v okoljskih substratih (30).



Slika 2: Strukturna formula bisfenola AF

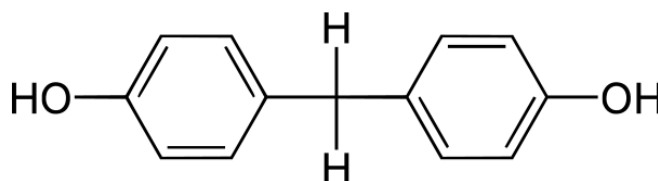
Nove laboratorijske študije na Japonskem kažejo, da ima bisfenol AF drugačno in celo močnejše delovanje v primerjavi z bisfenolom A. Medtem ko se bisfenol A veže predvsem na estrogenskim receptorjem sorodne receptorje gama (ang. *estrogen-related receptor gamma*), se bisfenol AF veže na estrogenske receptorje alfa in beta. Zaradi fluoridnih ionov se bisfenol AF veže na receptorje alfa 20-krat, na receptorje beta pa kar 50-krat močnejše od bisfenola A. Bisfenol AF z vezavo na receptorje alfa poveča njihovo aktivnost

(agonistično delovanje), z vezavo na receptorje beta pa samo zasede vezavno mesto in tako prepreči estrogenom, da bi se vezali (antagonistično delovanje). Estrogenski receptorji alfa pospešujejo razvoj rakavih obolenj na reproduktivnih organih, medtem ko estrogenski receptorji beta zavirajo razvoj takšnih obolenj. Z vezavo na te receptorje in učinke, ki jih ima na njih, lahko sklepamo, da je toksičnost bisfenola AF velika. Na nesrečo pa je do danes malo znanega o izpostavljenosti bisfenolu AF (30, 31).

1.4.4 Bisfenol F

Bisfenol F je analog bisfenola A. V svoji strukturi ima metilno skupino (v primerjavi z bisfenolom A, ki ima propilno skupino), kar mu daje večjo možnost rotacije (32).

Kot monomer se prav tako uporablja pri proizvodnji polikarbonatnih izdelkov in epoksi smol, premazi na izdelkih pa lahko vsebujejo tudi kombinacijo omenjenih bisfenolov. Podatkov o letni proizvodnji, koncentraciji v okolju in ekotoksičnosti bisfenola F je malo. Kot pri bisfenolu A je izpostavljenost bisfenolu F možna pri izpustu spojine v okolje ali pri uporabi končnih izdelkov. Zaradi podobnih kemijskih lastnosti sta distribucija in učinek bisfenola F podobna bisfenolu A (33).



Slika 3: Strukturna formula bisfenola F

1.5 Imunski sistem

Imunski sistem sestavljajo mnogi limfoidni organi in številne različne populacije celic z različnimi funkcijami. Kostni mozeg in timus štejemo k primarnim limfoidnim organom, saj v prvem nastajajo zrele celice B, v drugem pa zrele celice T. Poleg tega je kostni mozeg mesto nastanka pluripotentne matične celice, iz katere nastajajo druge krvne celice. Sekundarna limfoidna organa sta vranica in bezgavke, kjer se celice B in T prvič srečajo z antigenom (34).

Številne študije so že pokazale, da številni hormoni (npr. estrogeni, androgeni, tiroidi, glukokortikoidi) vplivajo na imunski sistem (35). Takšno delovanje ima tudi podskupina hormonskih motilcev, ki izkazujejo delovanje podobno estrogenom. V to skupino spadajo bisfenol A in njegovi analogi (npr. bisfenol AF in bisfenol F) (36).

1.5.1 Prepoznavanje antigenov

Imunost lahko razdelimo v dva funkcijska dela: prirojeno in pridobljeno imunost. Prva je nespecifična prva linija obrambe brez povezanega imunskega spomina; pridobljeno imunost pa okarakteriziramo z antigensko specifičnostjo in spominom. Primarna determinanta obeh tipov odziva je sposobnost komponent imunskega sistema, da prepoznajo tujek, ki mu pravimo antigen (tudi imunogen ali alergen). Antigeni so po navadi biološke molekule (proteini), ki se predelajo v peptide za prepoznavanje z imunskimi celicami (34).

Protitelesa (IgM, IgG, IgE, IgD, IgA) tvorijo celice B in so funkcionalno definirana z antigenom, s katerim reagirajo. Ker imunski sistem tvori protitelesa za tisoče antigenov, s katerimi bomo ali pa ne bomo prišli v stik, je splošno protitelo imenovano imunoglobulin, dokler ga ne moremo definirati s specifičnim antigenom. Imunoglobulini so sestavljeni iz težkih in lahkih verig ter iz stalnih in variabilnih delov. Slednji določijo specifičnost protitelesa in interakcijo z antigenom (34).

Da lahko imunski sistem odreagira na določen antigen, morajo le-tega pomožne celice pripraviti na prepoznavo limfocitov. Te celice imenujemo antigene predstavljajoče celice (APC) in vključujejo monocite/makrofage, dendritične celice, Langerhansove celice in celice B (34).

Interakcija APC in limfocitov je ključna za razvoj pridobljenega imunskega odziva. APC vključijo antigen s fagocitozo, pinocitozo ali endocitozo preko receptorjev. Celice nato antigene predelajo in nastali peptidi se nato vežejo v molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda II. Kompleksi MHC razreda II-peptid se nato transportirajo na površino celice in specifično interagirajo s T-celičnimi receptorji na limfocitih T. Procesirani znotrajcelični antigeni se izrazijo vezani na molekule MHC razreda I. Razlike med potmi MHC razreda I in razreda II so: antigeni, ki se izražajo na molekulah MHC razreda I niso omejeni na profesionalne APC, saj vse celice z jedri izražajo omenjene molekule. Mehanizmi, preko katerih poteka procesiranje in izražanje

antigenskih peptidov v okviru molekul MHC razreda I se razlikujejo od tistih, ki veljajo za molekule MHC razreda II. Antigenski peptidi, ki se lahko vežejo na MHC razreda I, so običajno manjši peptidi (8-10 aminokislin) in izvirajo iz ponavadi netipično izraženih proteinov, kot npr. proteini virusov ali mutirani proteini (34).

Po predelavi in prezentaciji antigena v okviru molekule MHC sledi njego prepoznavna s T-celičnimi receptorji na limfocitu T; sledi celična aktivacija in iniciacija znotrajceličnih signalnih kaskad, ki pripomorejo k proizvodnji in sproščanju citokinov in drugih celičnih mediatorjev, s čimer se sproži diferenciacija in proliferacija antigensko specifičnih limfocitov v efektorske in spominske celice (34).

1.5.2 Spojine v okolju z delovanjem na imunski sistem

Število znanih spojin, ki lahko vplivajo na imunski sistem, se nenehno povečuje. Mnogi ksenobiotiki delujejo kot imunosupresivi, ne smemo pa zanemariti spojin, ki delujejo kot modulatorji in lahko spodbudijo ali zavirajo delovanje imunskega sistema. Mehanizmi delovanja spojin so raznovrstni in lahko vključujejo številne proteine, receptorje ter signalne poti. Poleg tega je njihov učinek odvisen od koncentracije, kateri smo izpostavljeni in moči celične stimulacije. Nadalje lahko ugotovimo, da smo izpostavljeni ne samo eni spojini naenkrat, ampak številnim. Ne nazadnje pa je za sam učinek spojine pomembno stanje posameznikovega imunskega sistema (34, 37).

- Halogenirani aromatski ogljikovodiki

To je ena izmed najbolj preučevanih skupin ogljikovodikov. So hidrofobne narave in odporni na metabolizem, zato jih pogosto najdemo v maščobnem tkivu ljudi in živali. Obstaja precej dokazov, da je imunski sistem občutljiva tarča za te spojine. Njihovi učinki so atrofija timusa, pancitopenija, kaheksija, imunosupresija in razvoj tumorjev. Poleg imunitoksičnosti so spojinam dokazali karcinogenost in neželene učinke na razmnoževanje, razvoj in endokrino funkcijo. Primeri spojin: poliklorirani bifenili, dibenzodioksini, dibenzofurani ter polibromirani bifenili (34, 38).

- Policiklični aromatski ogljikovodiki

Spojine so lahko v naravi prisotne zaradi naravnih pojavov, kot so npr. gozdni požari ali propadanje organskih snovi, vendar je pojavljanje teh spojin v okolju največje zaradi izgorevanja fosilnih goriv (še posebej premoga) in izpušnih plinov.

Spojine so mutagene in karcinogene, poleg tega pa so študije pokazale tudi njihovo imunotoksičnost. Številne študije so pokazale supresijo humoralnega imunskega odziva, vpliv na razvoj imunskega sistema in odpornost posameznika po izpostavljenosti policikličnim aromatskim ogljikovodikom. Najbolj preučevani spojini sta benzopiren in 7,12-dimetilbenzantracen (34, 39).

- Pesticidi

To je široka skupina spojin (npr. organofosfati, organotini, karbamati), katerih specifična naloga je ubijanje drugih vrst živih bitij. Danes se zavedamo, da imajo te spojine vpliv tudi na imunski sistem. Veliko jih povzroči škodo na imunskem sistemu ali imunosupresijo tako humoralnega kot celičnega imunskega odziva (34, 40).

- Kovine

Kovine vplivajo na mnoge organske sisteme in tudi učinek na imunski sistem je že dobro dokumentiran. Za kovine je značilno, da pri višjih koncentracijah izkazujejo imunosupresivne učinke, medtem ko lahko pri nižjih koncentracijah opazimo stimulacijo imunskega sistema. Primeri kovin: svinec, arzen, živo srebro, kadmij (34).

- Topila in sorodne kemikalije

Sicer so na voljo le maloštevilni podatki, vendar ti nakazujejo, da organska topila in njim sorodne kemikalije povzročajo imunosupresijo. Primer teh spojin so aromatski ogljikovodiki (npr. benzen), halogenirani alkani in alkeni, glikoli in glikolni etri in nitrozamini (34).

- Naravni in sintezni hormoni

Na tem mestu le omenjamo, da na imunski sistem vplivajo tudi hormoni, saj jih podrobno opisujemo v naslednjem podpoglavju.

1.5.3 Modulacija imunskega sistema z naravnimi in sintezniimi hormoni

Znano je, da obstaja razlika v imunskem sistemu med spoloma. Ženske imajo višje koncentracije imunoglobulinov, večji odziv s protitelesi ter večjo pojavnost avtoimunskih bolezni. Moški naj bi bili bolj dojemljivi za razvoj sepse in smrtnost zaradi poškodb mehkih tkiv ter hemoragičnega šoka. Za to neskladje med spoloma naj bi bili krivi tudi spolni hormoni. Učinek estrogenov in androgenov na imunski sistem naj bi bil zelo ozko

nadzorovan v mejah fizioloških koncentracij in že majhne spremembe v koncentraciji hormonov lahko vodijo do velikih sprememb v imunski aktivnosti (34).

V okolju je mnogo ksenoestrogenov, ki lahko posnemajo delovanje estrogenov. Estrogenski receptorji lahko interagirajo z množico spojin, tudi s ksenoestrogeni in spodbudijo estrogenske učinke. Kot primer lahko navedemo bisfenol A, ki je *in vitro* lahko 1000- do 5000-krat manj učinkovit od 17β -estradiola, toda *in vivo* je sposoben stimulirati sproščanje prolaktina iz hipofize. Njegov učinek na proizvodnjo antigensko specifičnih protiteles in potek imunskih odzivov Th1/Th2 povzroči večjo proizvodnjo IL-4 v celicah $CD4^+T$ v odvisnosti od koncentracije. Druge študije nakazujejo, da ima bisfenol A učinek na modulacijo imunskega odziva, še posebej na odziv Th1 (41).

Testosteron je sposoben zavirati imunsko funkcijo, še posebej celični imunski odziv in aktivnost makrofagov. Terapija s spojinami, ki blokirajo receptorje za testosteron, lahko prepreči depresijo imunskega sistema zaradi travme ali krvavitev pri moških. Testosteron in drugi androgeni lahko vplivajo na obrambo s spreminjanjem prenosa limfocitov v telesu in sposobnosti makrofagov, da sodelujejo v imunskih odzivih (34).

Za ščitnične hormone pa je informacij glede učinka na imunski sistem zelo malo. Znano je, da ščitnico stimulirajoči hormon (TSH) lahko nastaja v različnih tipih celic izven hipofize, kot so limfociti T in B, vranične dendritične celice, krvotvorne matične celice kostnega mozga in intestinalne epitelne celice. Kljub temu, da je znano, da TSH nastaja v celicah imunskega sistema, ni jasno, kako ta TSH sodeluje v imunoregulatornih poteh pri zdravih osebah in bolnikih. Ena možnost je, da TSH neposredno vpliva na imunske celice, druga možnost pa je posredna pot preko s TSH induciranimi ščitničnimi hormoni (42).

1.5.4 Ocena imunskih lastnosti

Imunotoksikologija prispeva pomemben del varnostne ocene zdravil in kemikalij. Imunosupresija, (nespecifična) imunostimulacija, povečana senzitivnost in avtoimunost so štiri tipi neželenih učinkov, ki so povezani z imunskim sistemom. Na voljo je mnogo testov, npr. histološke preiskave timusa, vranice ali limfoidnih organov, analiza lastnosti limfocitov, določanje vrste in količine citokinov, ugotavljanje proliferacije limfocitov, funkcijski testi, če naštejemo le nekaj od njih (43). V nadaljevanju bomo omenili nekaj najpogostejših metod.

Pretočna citometrija

V splošnem pomenu je pretočna citometrija metoda, ki meri sipanje svetlobe, fluorescenco in absorbanco z namenom analiziranja velikega števila celic. Najbolj pogosto merimo fluorescenco s flouorofori označenih protiteles, ki so se vezala na določen protein na celicah. V imunotoksikologiji merimo specifične populacije levkocitov, npr. merimo površinske molekule limfocitov T. Ker pretočni citometri merijo več valovnih dolžin svetlobe, lahko naenkrat merimo več fluorokromov oz. določamo več proteinskih celičnih označevalcev v enem vzorcu (34).

Meritve citokinov in njihov profil

Razvoj, zorenje, diferenciacija in odziv imunskega sistema so odvisni od številnih majhnih proteinov, ki se imenujejo citokini. Razviti so bili številni testi, ki merijo citokine v telesnih tekočinah ali tkivih (43). Zaradi pomembnosti citokinov v regulaciji imunskega sistema, lahko ksenobiotiki, ki spremenijo proizvodnjo in sproščanje mediatorjev limfocitov T, zelo vplivajo na imunski sistem. Citokine lahko merimo s pomočjo pretočne citometrije, ki smo jo na kratko opisali zgoraj, lahko pa jih merimo tudi s testi ELISA (44). »Sendvič« metoda ali metoda z dvema protitelesoma se začne s protitelesom, ki je vezano na dno vdolbine mikrotitrne plošče in z antigenom, ki ga merimo. Drugo protitelo, ki je značilno za drug epitop in konjugirano z encimom, ki pretvori substrat v obarvan produkt, dodamo v vdolbino po reakciji antigena s primarnim protitelesom. Če se po dodatku substrata spremeni barva, nam to kaže na pozitiven izid testa (45).

Test proliferacije limfocitov / Mešana limfocitna reakcija

Imunski odziv je povezan s proliferacijo limfocitov, pri čemer je nezadostna proliferacija lahko kazalec imunosupresije. Limfociti se delijo v prisotnosti mitogenov, antigenov oz. alogenskih celic. Proliferacijo celic najpogosteje merimo z vgradnjo radioaktivno označenega timidina v celično DNK. Pri ljudeh se ta test izvaja na limfocitih, ki so izolirani iz periferne krvi. Rezultat je razlika v proliferaciji celic med limfociti, ki so gojeni z mitogeni, antigeni oz. alogenskimi celicami in kontrolnim vzorcem. Da ustavimo proliferacijo stimulacijskih celic, le-te pred inkubacijo z odzivnimi celicami obdelamo z mitomicinom C. Prednost metode je relativno nizka cena, material, ki je na voljo, in velika preizkušnost metode, saj je bila že mnogokrat omenjena v znanstveni literaturi. Najbolj očitna pomanjkljivost metode pa je uporaba radioaktivnih izotopov (45).

Imunotoksikologijo lahko uporabimo tudi na številnih živalskih modelih, vendar se v tej diplomski nalogi osredotočamo le na *in vitro* teste. Eden izmed takšnih modelnih sistemov so tudi dendritične celice.

1.5.5 Dendritične celice

Dendritične celice (DC) so profesionalne antigene predstavljajoče celice in predstavljajo posebno vlogo pri iniciaciji imunskega odziva zaradi predstavljanja antigenov limfocitom T (46). Odvisno od izvora, citokinskih aktivatorjev, površinskih molekul in funkcijske sposobnosti DC delijo v dve veliki populaciji – mieloidne in limfoidne DC. Mieloidne DC izvirajo iz predhodnikov iz kostnega mozga in nastanejo pod vplivom granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajočega dejavnika (GM-CSF), plazmocitoidne pa izvirajo iz limfoidnih celic. Mieloidne DC so prisotne v telesnih tkivih in pomembne v iniciaciji imunskega odziva celic T pomagalk 1 (Th-1), medtem ko so limfoidne celice redke v perifernih tkivih, pogoste pa v vnetih bezgavkah in mandljih in so pomembne za razvoj celic T pomagalk 2 (Th-2) (47).

Dendritične celice migrirajo do perifernih organov in pregledujejo ter vzorčijo svoje okolje. DC detektirajo molekule, ki so povezane s patogeni, kot na primer lipopolisaharidi (LPS), to pospeši njihovo zorenje in migracijo proti bezgavkam (46). Ločimo nezrele in zrele DC. Nezrele DC imajo veliko sposobnost za prepoznavanje in privzemanje antigenov in majhno sposobnost za stimulacijo celic T. So zelo učinkovite pri privzemanju antigenov z makropinocitozo, endocitozo in fagocitozo, kar je zelo pomembno pri njihovi kontrolni funkciji imunskega sistema. Zrele DC, ki izgubijo sposobnost privzemanja antigenov, pa imajo veliko sposobnost stimulacije celic T. Zorenje lahko povzročijo številni zunanji dejavniki, ki jih lahko sproščajo nekrotične celice, sestavine mikrobov, kot na primer LPS in aktivirane celice T (48). Nezrele in zrele DC razlikujemo s proučevanjem določenih površinskih molekul, saj nezrele izražajo drugačne površinske označevalce kot zrele DC. Tako nezrele DC prepoznamo npr. po izražanju molekul CD1a in DC-SIGN, medtem ko zrele izražajo molekule CD80, CD83 in CD86 (49). Kostimulacijske molekule iz družine B7, med katere sodita molekuli CD80 in CD86, imajo ključno vlogo pri aktiviranju limfocitov T, saj celicam zagotavljajo signal za izdelovanje IL-2, ki je ključen citokin pri vplivu na diferenciacijo limfocitov v smeri odziva Th1 ali Th2 (50).

Preučevanje odzivov DC je eden izmed načinov določanja imunotoksičnosti spojin. Po dodatku spojin v kulturo DC, lahko celicam določamo fenotip s pomočjo pretočne citometrije, kar nam pokaže stanje njihove zrelosti ali nezrelosti DC. Nadalje lahko s komercialno dostopnimi testi ELISA določamo prisotnost citokinov v kulturi. Zelo pomembne so tudi *in vitro* in *in vivo* študije funkcije DC. Primer takšne študije je mešana limfocitna reakcija (45).

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Bisfenol A (BPA) in njegovi analogi (bisfenol F, bisfenol AF) so spojine, katerih neželen učinek na endokrini sistem že mnogo let skrbi znanstvenike različnih področij in pod vplivom medijev tudi širšo javnost. Spojine so predmet vedno številčnejših preiskav, kot na primer študij vplivov na genotoksičnost, karcinogenost, nevrotoksičnost in neuroendokrini sistem.

Ker je dokazano, da estrogeni modulirajo delovanje imunskega sistema, smo želeli preučiti vpliv BPA in dveh njegovih analogov, bisfenola F in bisfenola AF, na imunski sistem, in sicer v primerjavi z endogenimi estrogeni. Študije, ki so na voljo, nakazujejo na potrebo po nadaljnjih raziskavah vpliva BPA z uporabo standardnih protokolov, ki bi omogočali širšo analizo potencialnih neželenih učinkov te spojine tudi na imunski sistem.

Dendritične celice predstavljajo enega izmed modelov vrednotenja vpliva spojin na imunski sistem. Dendritične celice, ki jih bomo pripravili iz človeških monocitov, bomo uporabili v testih proučevanja apoptoze, endocitoze, zorenja oz. diferenciacije (merjenje izražanja značilnih površinskih molekul na dendritičnih celicah) ter v mešanih limfocitnih reakcijah.

S temi poskusi bomo poskušali potrditi ali ovreči naslednje hipoteze:

- Predpostavljamo, da imajo omenjene spojine vpliv na diferenciacijo dendritičnih celic pri preiskovanih koncentracijah.
- Predpostavljamo, da imajo preiskovane spojine vpliv na fenotip po zorenju dendritičnih celic.
- Predpostavljamo, da lahko preiskovane spojine preko dendritičnih celic vplivajo na imunski odziv.

3. MATERIALI IN METODE

Opisane metode smo izvajali v komori z laminarnim pretokom zraka (Heraeus), v aseptičnih pogojih in pri sobni temperaturi. Za aseptično delo je pomembno, da so vsi predmeti, materiali in reagenti, ki jih uporabljamo, sterilni oz. aseptični. Pri našem delu smo uporabljali tudi inkubator za gojenje celičnih kultur (Heraeus; standardni pogoji inkubacije: temperatura 37°C, 5% CO₂).

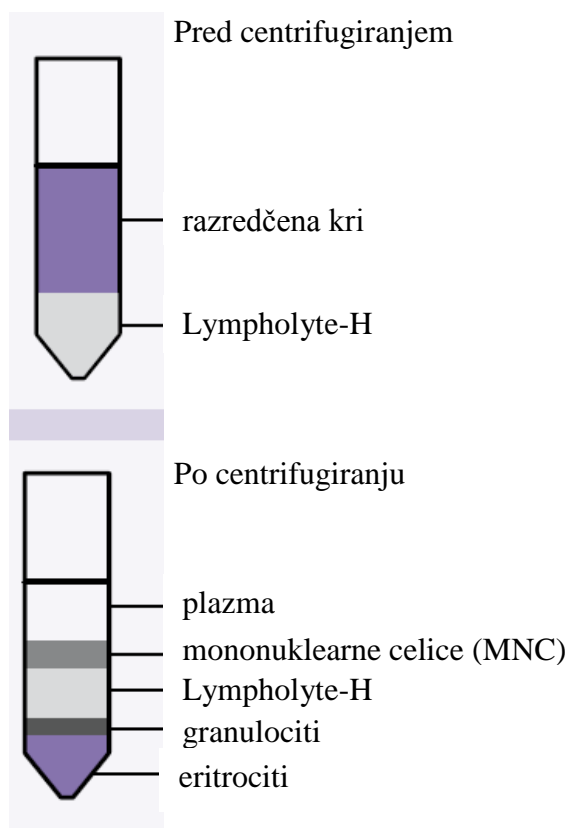
Preiskovane spojine, katerih vpliv nas zanima v tem diplomskem delu, so estradiol (E₂), bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) in bisfenol AF (BPAF) (Sigma-Aldrich, ZDA). Kontrolni vzorci so vsebovali vse reagente, medije in materiale, razen preiskovanih spojin.

3.1 Priprava/izolacija celic iz levkocitnih koncentratov

V prvem koraku smo morali iz levkocitnih koncentratov (ang. *Buffy coats*; BC) – pripravljeni na Zavodu RS za transfuzijsko medicino – osamiti mononuklearne celice (MNC), katere smo v nadaljevanju uporabili za izolacijo monocitov ter pripravo dendritičnih celic (DC). V tem koraku smo potrebovali naslednje reagente:

- fosfatni pufer PBS (Dulbecco's PBS (1x), without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija),
- gostotni gradientni separacijski medij Lympholyte-H (Cedarlane Laboratories, Ontario, Kanada).

Vrečko, v kateri smo dobili BC, smo temeljito očistili z razkužilom, da smo preprečili prenos morebitnih nečistot z vrečke v naše vzorce, ki bi lahko potencialno vplivale na rezultate. V komori z laminarnim pretokom zraka smo vsebino vrečke previdno izlili v plastični vsebnik s prostornino 200 ml in z navojnim zamaškom za enkratno uporabo (BD Falcon, ZDA) in jo razredčili s fosfatnim pufrom PBS do 150 ml. V izbrano število 50 ml centrifugirk (BD Falcon, ZDA) smo najprej dali 12 ml medija Lympholyte-H, 700 µl pufru PBS, nato pa nanj previdno nanесли 25 ml razredčenega BC. Centrifugirke smo zaprli, nato pa centrifugirali 15 min pri 2300 obratih/min, pri čemer smo pazili, da zaviranje ni bilo vključeno. Spodnja shema prikazuje stanje pred in po centrifugiranju.



Slika 4: Shema plasti v centrifugirkah pred in po centrifugiranju (51)

Po centrifugiranju smo plast MNC, ki je bila sestavljena pretežno iz limfocitov, monocitov ter tudi trombocitov, s pomočjo Pasteurjeve pipete prenesli v novo 50 ml centrifugirko, in sicer smo združevali plasti iz dveh v eno centrifugirko. S pufrom PBS smo dopolnili centrifugirke do 50 ml, nato pa ponovno centrifugirali 8 minut pri 1200 obratih/min. Zadnji korak smo ponovili trikrat; po vsakem centrifugiranju smo odlili supernatant ter celice resuspendirali v puftru PBS. S tem smo želeli dobiti čimbolj čist vzorec za nadaljnje delo (odstraniti smo želeli čimveč trombocitov ter ostankov plazme in medija Lympholyte-H).

3.2 Magnetna izolacija

V tem koraku smo želeli izolirati samo CD14-pozitivne celice – monocite, ki se lahko diferencirajo v dendritične celice (DC) – s pomočjo pozitivne selekcije, kar pomeni, da smo označili celice, ki jih želimo izolirati. Celotna magnetna izolacija poteka v hladnih pogojih (4 – 8°C).

Positivno imunomagnetno selekcijo smo izvedli skladno z navodili proizvajalca (Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija). Metoda uporablja imunomagnetne kroglice (MACS MicroBeads,

Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija), kolone (MACS Columns, Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija) ter magnetne ločevalce (MACS Separators, Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija). Izjemno majhne magnetne kroglice CD14 MicroBeads so prevlečene z anti-CD14 protitelesi, ki so specifični za monocite. Celice (monocite) inkubiramo s protitelesi in jih naneseemo na kolono, ki smo jo vstavili v ločevalec. Celice, ki so nase vezale protitelesa, so zaradi magnetnega polja ostale na koloni; ostale gredo skozi kolono. Celice večkrat speremo s pufrom, nato pa kolono odstranimo z magnetnega polja in s priloženim batom celice eluiramo iz kolone.

Reagenti, ki smo jih potrebovali:

- protitelesa CD14 (CD14 MicroBeads; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija),
- pufer: fosfatni pufer PBS z 0,5 % govejega seruma (v 20 ml pufru PBS smo dodali 100 μ l govejega seruma in postavili v hladilnik).

Celice, ki smo jih pripravili v prejšnjem koraku, resuspendiramo v puftru, ki smo ga pripravili sami ter dodamo označevalec (z magnetnimi kroglicami označena protitelesa CD14), premešamo ter postavimo v hladilnik (+ 4°C) za 20 minut. Nato s pufrom, ki je tudi bil ohlajen na +4°C, dopolnimo vzorce do 25 ml. Sledi centrifugiranje – 7 minut na 1400 obratih/min.

Hkrati smo pripravili za uporabo kolono LD (Slika 5), ki je primerna za odstranjevanje neželenih celic.



Slika 5: Kolona LD (52)

Kolono LD smo postavili v magnetno polje »MidiMACS Separator« (Slika 6),



Slika 6: *MidiMACS Separator* (53)

nato smo jo omočili z 2 ml pufra. Magnetno označenim celicam smo odlili supernatant, jih resuspendirali v 950 μ l pufra in jih nanесли na kolono. Kolono smo nato še dvakrat s pufrom napolnili do vrha. S tem smo iz kolone izprali neželene celice, magnetno označene zelene celice pa smo s pomočjo magnetnega polja zadržali na koloni.

Kolono smo nato odstranili z magneta, tako da smo lahko magnetno označene celice v novo centrifugirko dvakrat izprali s pufrom, s pomočjo bata, ki je priložen koloni. V centrifugirko smo dodali 10 ml pufra PBS, nato pa centrifugirali 7 minut pri 1400 obratih/min.

3.3 Štetje celic

Naslednji korak pri našem delu je vključeval štetje celic v vzorcu s pomočjo raztopine tripanskega modrila (Sigma-Aldrich, ZDA). Žive celice se ne obarvajo, barvilo vstopa izključno v mrtve celice.

Za vsako štetje smo rabili 20 μ l vzorca. Raztopino tripanskega modrila smo dodali v odvisnosti od gostote celic v vzorcu – tako smo uporabili razmerje 1:2 (20 μ l barvila), 1:5 (80 μ l barvila) ali 1:10 (180 μ l barvila).

Štetje celic je potekalo s pomočjo Bürker Türk komore (Brand, Nemčija), ki smo jo najprej temeljito očistili z razkužilom, nato nanjo položili krovno stekelce (na predel s števno mrežo) in previdno dodali obarvan vzorec. Pod svetlobnim mikroskopom smo prešteli celice v 25ih kvadratih mreže in uporabili naslednjo formulo:

$$N = n \cdot R \cdot V$$

N – število celic v suspenziji (v milijonih)

n – prešteto število celic

R – faktor redčenja z barvilom

V – celoten volumen vzorca

3.4 Priprava nezrelih dendritičnih celic (iDC)

Reagenti, ki smo jih potrebovali:

- medij RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija),
- spojine: estradiol (E₂), bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) in bisfenol AF (BPAF) (Sigma-Aldrich, ZDA),
- rHuGM-CSF –rekombinantni človeški GM-CSF v liofilizirani obliki (800 U/ml) (Peprotech EC, London, Velika Britanija),
- rHuIL-4 –rekombinantni človeški IL-4 v liofilizirani obliki (1000 U/ml) (Peprotech EC, London, Velika Britanija).

Za nadaljnje preizkuse smo uporabili sterilne plastične plošče s 6 ali 12 vdolbinami (BD Falcon, ZDA). Štetje celic nam je omogočilo, da smo lahko pripravili vzorce, ki so vsebovali 0,5 do 1 milijon celic v 1 ml. V vzorec (celice suspendirane v mediju RPMI 1640, kateremu smo dodali goveji serum) smo dodali preiskovane spojine (E₂, BPA, BPF, BPAF), raztopljene v DMSO (dimetilsulfoksid; Sigma-Aldrich, ZDA), tako da smo dobili koncentracijo spojin v vzorcu 1 μM, 10 μM ali 50 μM; v primeru E₂ smo uporabili 1000-krat manjše koncentracije (1 nM, 10 nM ali 50 nM). Pri BPAF smo zaradi signifikantno povečane apoptoze pri 50 μM kot najvišjo koncentracijo uporabili 30 μM. Za uspešno rast celic smo dodali še rastni faktor granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik (GM-CSF) in citokin interleukin-4 (IL-4) v koncentraciji 1 μl/ml.

Drugi dan smo morali zamenjati polovico medija, nadomestiti polovico spojin ter dodati začetne količine GM-CSF in IL-4.

Peti dan inkubacije celic pri standardnih pogojih smo celice zbrali, tako da smo jih prenesli v centrifugirko in centrifugirali 7 minut pri 1400 obratih/min. Supernatant smo odlili, nato pa resuspendirali v pufru PBS, ki smo mu dodali goveji serum, ter prešteli celice.

Celice smo nato ali pripravili na zorenje ali pa na preverjanje fenotipa s pomočjo pretočne citometrije (pretočni citometer FACS-Calibur, Becton Dickinson, Inc., ZDA).

3.5 Priprava zrelih dendritičnih celic (mDC)

Reagenti, ki smo jih potrebovali:

- LPS – lipopolisaharid (20 ng/ml) (Sigma-Aldrich, ZDA),
- rHuGM-CSF –rekombinantni človeški GM-CSF v liofilizirani obliki (800 U/ml) (Peptotech EC, London, Velika Britanija),
- rHuIL-4 –rekombinantni človeški IL-4 v liofilizirani obliki (1000 U/ml) (Peptotech EC, London, Velika Britanija).

Celice smo dozorevali v prisotnosti lipopolisaharida (LPS). Poleg tega smo pripravili tudi kontrolni vzorec z nezrelimi dendritičnimi celicami, ki smo mu dodali samo GM-CSF in IL-4. LPS, GM-CSF in IL-4 smo dodali v količini, ki je ustrezala koncentraciji 1 μ l/ml v končnem volumnu vzorca.

Zorenje je potekalo dva dni pri standardnih pogojih inkubacije, brez menjave medija. Nato smo celice pregledali pod svetlobnim mikroskopom in zbrali za nadaljnje poskuse.

3.6 Priprava/izolacija CD4⁺ limfocitov T

Iz levkocitnih koncentratov smo s pomočjo pozitivne selekcije izolirali CD4⁺ limfocite T, ki smo jih nato uporabili v funkcijskih testih.

Po že opisanem postopku smo najprej izolirali MNC, nato pa dodali magnetne kroglice CD4 (CD4 MicroBeads; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija). Sledila je inkubacija v hladnih pogojih (4-8°C, 15 minut). Celice smo nato izolirali s pomočjo kolone LS v magnetnem polju. Kolono smo najprej omočili s pufrom (2 ml), nato pa nanjo nanesli suspenzijo celic. Neželene celice smo odstranili s spiranjem s pufrom PBS, kar smo ponovili trikrat (kolono smo napolnili do vrha), zelene celice pa so vezale magnetne kroglice CD4 in so se tako zadržale na koloni. Po spiranju smo kolono odstranili iz magnetnega polja, jo napolnili do vrha s pufrom in s pomočjo priloženega bata celice sprali iz kolone.

Pri celotnem postopku smo natančno sledili protokolu proizvajalca Miltenyi Biotec (54).

3.7 Analiza površinskih molekul na celicah (fenotip)

S pomočjo pretočne citometrije smo določali fenotip celic oz. nivo membranskih markerjev. Fenotip smo določali tako nezrelim kot zrelim dendritičnim celicam.

Reagenti, ki smo jih potrebovali:

- fluorescentno označena protitelesa:
 - CD1a (Biolegend, ZDA),
 - CD14 (Miltenyi Biotec, Nemčija),
 - CD209 (DC-SIGN) (Biolegend, ZDA),
 - CD80 (Biolegend, ZDA),
 - CD83 (Biolegend, ZDA),
 - CD86 (Biolegend, ZDA),
 - HLA-DR (Biolegend, ZDA),
- fosfatni pufer PBS (Dulbecco's PBS (1x), without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija),
- 2% raztopina paraformaldehida (Sigma-Aldrich, ZDA).

Najprej smo pripravili epruvete z vzorci naših celic, in sicer smo potrebovali 0,5 milijona celic v posamezni epruveti za pretočno citometrijo. Sledilo je dodajanje specifičnih protiteles. Vzorce smo nato 15 min inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Celice smo sprali z 2 ml pufru PBS, nato pa fiksirali s 300 μ l 2 % raztopine paraformaldehida.

S pretočnim citometrom smo določili nivoje izražanja posameznih protiteles na površini celic. Po parametrih FSC (*ang. Forward Scatter*) in SSC (*ang. Side Scatter*), ki sta sorazmerna velikosti in granuliranosti celic, smo najprej analizirali vzorce. S pomočjo pridobljenih rezultatov smo lahko izbrali populacije celic, pri katerih smo lahko zanesljivo preučili intenziteto njihove fluorescence. Vrednotili smo povprečno intenziteto fluorescence celic – pridobili smo grafe, ki imajo na ordinatni osi število dogodkov in na abscisni osi intenziteto fluorescence.

3.8 Mešana limfocitna reakcija (MLR)

Pripravili smo ustrezne kombinacije alogenskih naivnih CD4⁺ limfocitov kot odzivnih in različno obdelanih in neobdelanih DC kot dražilnih celic. Potrebovali smo:

- fosfatni pufer PBS (Dulbecco's PBS (1x), without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija),
- mitomicin C (Sigma-Aldrich, ZDA),
- [³H]-timidin (Perkin Elmer, ZDA).

Celice smo dvakrat sprali s pufrom in 25 minut inkubirali z mitomicinom C (50 µg/ml), da smo preprečili nadaljnjo proliferacijo. Test smo izvajali na mikrotitrski plošči, kjer je bil celoten volumen vsakega vzorca 200 µl. Dražilne celice (pripravljene DC) smo dodali v koncentraciji 1 x 10⁴, medtem ko je bila koncentracija odzivnih celic (CD4⁺ limfociti) 1 x 10⁵. Po 4 dneh inkubacije v inkubatorju smo dodali 1 µCi [³H]-timidina v vsako vdolbinico. Sledilo je 18-urno inkubiranje, nato smo izmerili proliferacijo limfocitov T s pomočjo β scintilacijskega števca.

3.9 Apoptoza

V postopku preučevanja vpliva izbranih spojin smo morali preveriti tudi toksičnost spojin pri preiskovanih koncentracijah, da smo izločili možnost apoptoze celic že v samem začetku preizkusov. Celice (izhodni monociti) smo gojili v prisotnosti spojin (E₂, BPA, BPF ali BPAF) ter GM-CSF in IL-4. Po treh dneh gojenja smo celice zbrali, nato smo določili delež živih, apoptotičnih in mrtvih celic s pomočjo pretočne citometrije po predhodnem barvanju na Annexin V (AV) in s propidijevim jodidom (PI). AV prepozna celice, ki na površini izrazijo fosfatidilserin, saj se le-ta značilno pojavi na površini apoptotičnih celic. PI ne prehaja membrane živih celic, prehaja pa membrano mrtvih celic in jih s tem obarva, saj se veže na DNA. Pri izvajanju postopka smo sledili protokolu proizvajalca Invitrogen (55). V ustrezno označene epruvete smo dali 100 µl suspenzije celic, kar pomeni približno 1 x 10⁶ celic v posamezni epruveti, in dodali 5 µl AV (raztopljen v 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 0.1% govejega seruma – pripravljena raztopina) in 1 µl PI (100 µg/ml). Tako pripravljene vzorce smo pomerili na pretočnem citometru.

Pridobljene diagrame razdelimo na štiri kvadrante – celice v kvadrantu levo spodaj predstavljajo žive celice, kvadrant desno spodaj predstavlja apoptotične celice (obarvane z AV), kvadrant desno zgoraj (dvojno barvane – AV in PI) pa vsebuje mrtve celice.

3.10 Endocitoza

S preizkušanjem sposobnosti endocitoze smo želeli preveriti, kako uspešno nezrele dendritične celice privzemajo antigene iz okolja. Med zorenjem dendritične celice izgubljajo sposobnost endocitoze, hkrati pa se povečuje sposobnost predstavljanja antigenov na površini celic.

Sposobnost endocitoze se preverja tako, da celice (približno 1×10^5 celic) 1 uro inkubiramo z dekstranom (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, ZDA), ki je označen z barvilom fluorescein izotiocianat (FITC). Nato celice dvakrat speremo s pufrom PBS ter dodamo še 300 μ l 2 % raztopine paraformaldehida. Celice analiziramo s pomočjo pretočne citometrije.

3.11 Statistične metode

Rezultate smo statistično obdelali s programom SPSS, verzija 17.0 (SPSS Inc., Chicago, ZDA). Signifikanca je bila določena z uporabo Studentovega t testa in primerja označeno meritev s kontrolnim, netretiranim vzorcem (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n.s.: nesignifikantno).

4. REZULTATI

4.1 Priprava dendritičnih celic

Osamitev oz. izolacija mononuklearnih celic je potekala po postopku, opisanem v poglavju 3.1. Število zbranih monocitov se je razlikovalo med posameznimi poskusi – povprečno smo izolirali okoli 50×10^6 celic, kar je zadostovalo za nadaljnje poskuse. Potrebovali smo $0,5 \times 10^6$ celic za testiranje posamezne spojine, ki smo jih prenesli v vdolbino gojilne posode, dodali gojišče RPMI 1640 z dodanim govejim serumom (10 %), GM-CSF (800 U/ml) in IL-4 (1000 U/ml) ter tudi preiskovane spojine E_2 (10 in 50 nM), BPA (10 in 50 μ M), BPAF (10 in 30 μ M oz. 50 μ M pri prvem preverjanju apoptoze) in BPF (10 in 50 μ M). Drugi dan gojenja celic je bil namenjen menjavi medija, peti dan aktivaciji z LPS in sedmi dan označevanju z monoklonskimi protitelesi, s čimer smo preverjali izražanje nekaterih za dendritične celice značilnih površinskih molekul.

Med samim poskusom smo spremljali tudi morfologijo celic, ki smo jih opazovali pod svetlobnim mikroskopom. Celice so spreminjale svojo obliko in so postajale večje, nepritrjene v suspenziji in s številnimi, kratkimi izrastki, kar je bil med drugim naš pokazatelj, da je bil postopek zorenja uspešen in da so nastale dendritične celice. Živost celic pa smo preverjali s štetjem v Bürker Türkovi komori ob uporabi tripanskega modrila, saj barvilo obarva le mrtve celice, v žive celice pa ne vstopa.

4.2 Obseg apoptoze

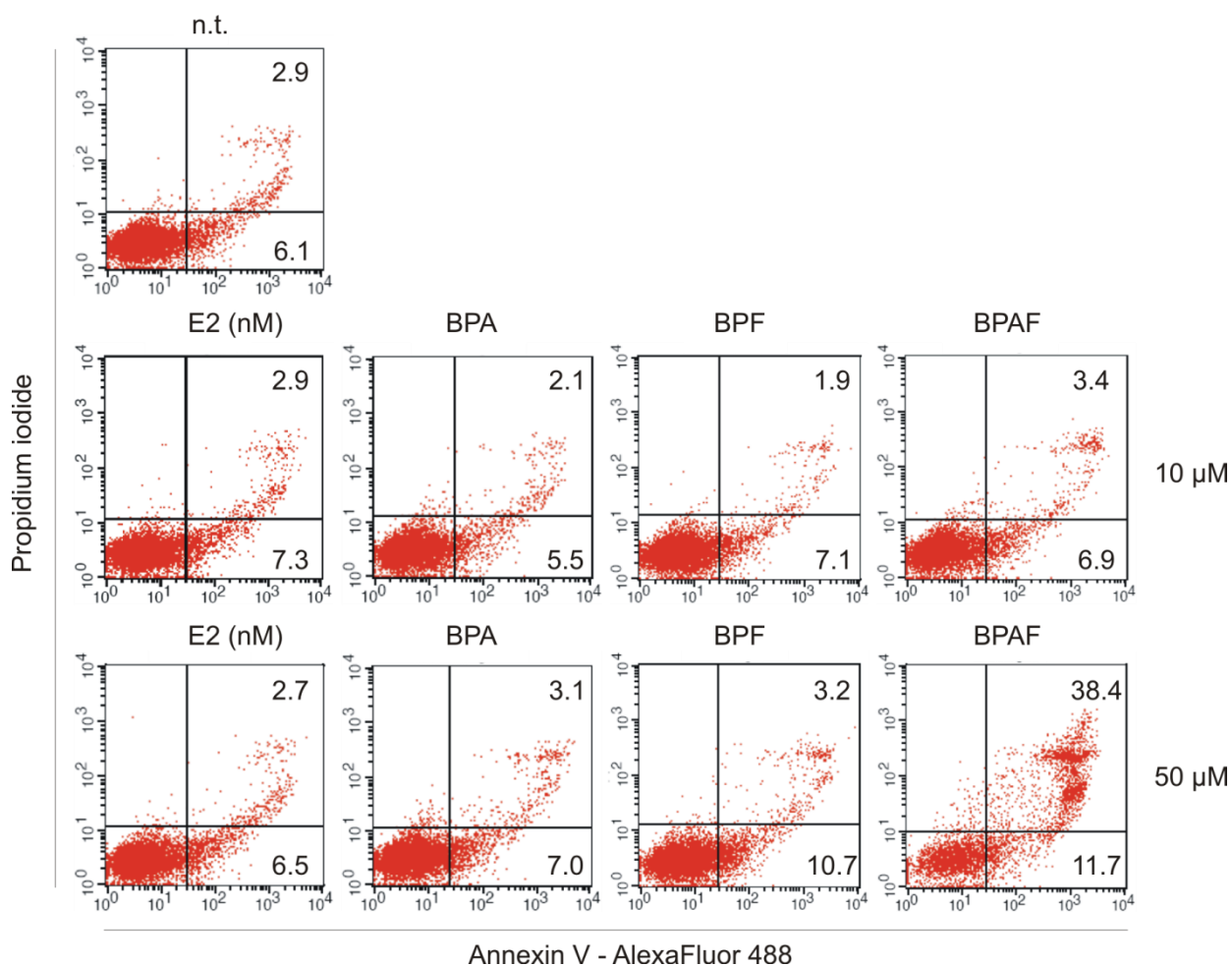
Z namenom, da ugotovimo, ali so spojine toksične pri izbranih koncentracijah, smo določili delež apoptotičnih in mrtvih celic s pomočjo pretočne citometrije, kar smo prikazali v točkovnih diagramih (Slika 7). Celice smo pred meritvijo po petih dneh diferenciacije gojili še nadaljnjih 72 ur, nato pa barvali na Annexin V (AV) in s propidijevim jodidom (PI). Meritve smo opravili pri dveh koncentracijah preizkušanih spojin (10 μ M in 50 μ M), v primeru E_2 smo uporabili nM koncentracije. Hkrati smo pomerili tudi kontrolni vzorec, ki nam je služil za primerjavo.

Diagrami se delijo na štiri kvadrante – celice v kvadrantu levo spodaj predstavljajo žive celice, kvadrant desno spodaj predstavlja apoptotične celice, kvadrant desno zgoraj pa

vsebuje mrtve celice. Kot smo pričakovali, je v povprečju višja koncentracija spojin imela tudi večji učinek na apoptozo; največji učinek smo opazili pri bisfenolu AF, in sicer pri koncentraciji 50 μM , ko je delež mrtvih celic skokovito narastel v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Delež mrtvih celic se med posameznimi spojinami ni bistveno razlikoval v primerjavi s kontrolnim vzorcem, razen kot že omenjeno pri višji koncentraciji BPAF. Deleži mrtvih celic so bili v primerjavi s kontrolnim vzorcem manjši pri spojinah BPA in BPF pri nižji koncentraciji ter večji pri višji koncentraciji. Estradiol kaže podobne rezultate tako pri nižji kot pri višji koncentraciji v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

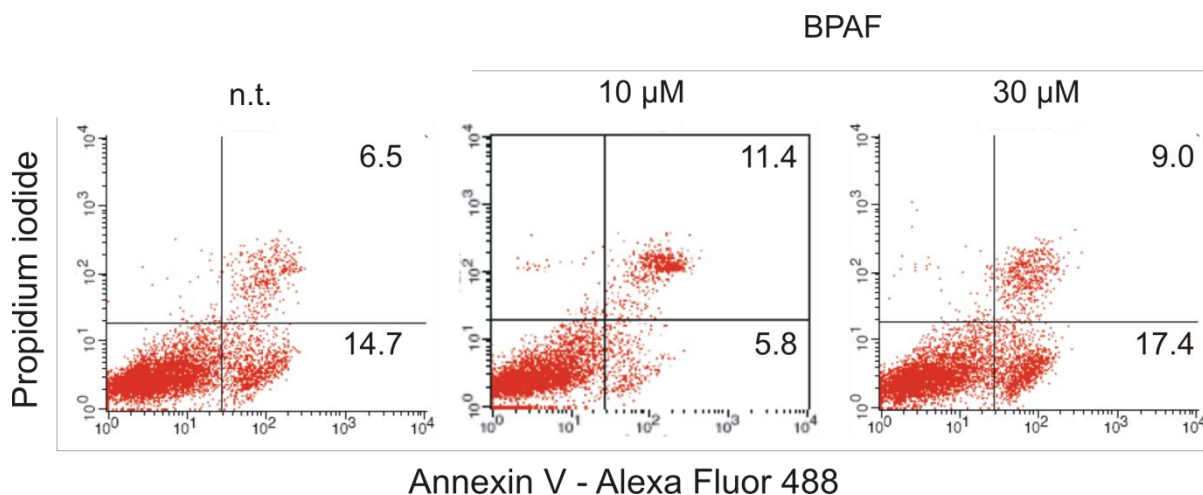
Podobno lahko ugotovimo tudi za deleže apoptotičnih celic. Tudi v tem primeru rezultati BPAF pri višji koncentraciji najbolj odstopajo v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Tudi pri nižji koncentraciji je delež višji, vendar je primerljiv z drugimi preiskovanimi spojinami. Večji obseg apoptoze opazimo tudi pri BPF pri višji koncentraciji, pri nižji pa je razlika s kontrolnim vzorcem manjša. Pri BPA opazimo manjše odstopanje v deležih apoptotičnih celic v primerjavi s kontrolnim vzorcem, in sicer manjši delež pri nižji koncentraciji in večjega pri višji koncentraciji. Pri estradiolu opazimo višji delež apoptotičnih celic pri nižji koncentraciji in nižji pri višji koncentraciji, če ju primerjamo s kontrolnim vzorcem.



Slika 7: Delež apoptotičnih in mrtvih celic pri dveh koncentracijah izbranih preiskovanih spojin (E_2 , BPA, BPF, BPAF). Celice smo analizirali s pomočjo pretočne citometrije.

n.t. – kontrolni vzorec

Ker je BPAF pri koncentraciji 50 μM povzročil preveliko apoptozo (vse ostale spojine so bile pri izbranih koncentracijah glede na število apoptotičnih celic primerljive s kontrolnim vzorcem), smo morali za nadaljnje poskuse določiti nižjo koncentracijo BPAF, ki še ne povzroča signifikantne celične smrtnosti. Tako pri barvanju s tripanskim modrilom kot pri pretočni citometriji je bilo število apoptotičnih celic primerljivo s kontrolnim vzorcem do koncentracije 30 μM BPAF. Slika 8 prikazuje delež apoptotičnih in mrtvih celic pri izpostavljenosti celic spojini BPAF. Opazimo lahko, da se tako pri višji kot pri nižji koncentraciji BPAF poveča delež mrtvih celic v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Delež apoptotičnih celic se zmanjša pri nižji in poveča pri višji koncentraciji v primerjavi s kontrolnim vzorcem, vendar vsi ti rezultati kažejo, da lahko za nadaljnje poskuse uporabimo koncentracijo 30 μM .



Slika 8: Delež apoptotičnih in mrtvih celic pri dveh koncentracijah spojine BPAF. Celice smo analizirali s pomočjo pretočne citometrije.

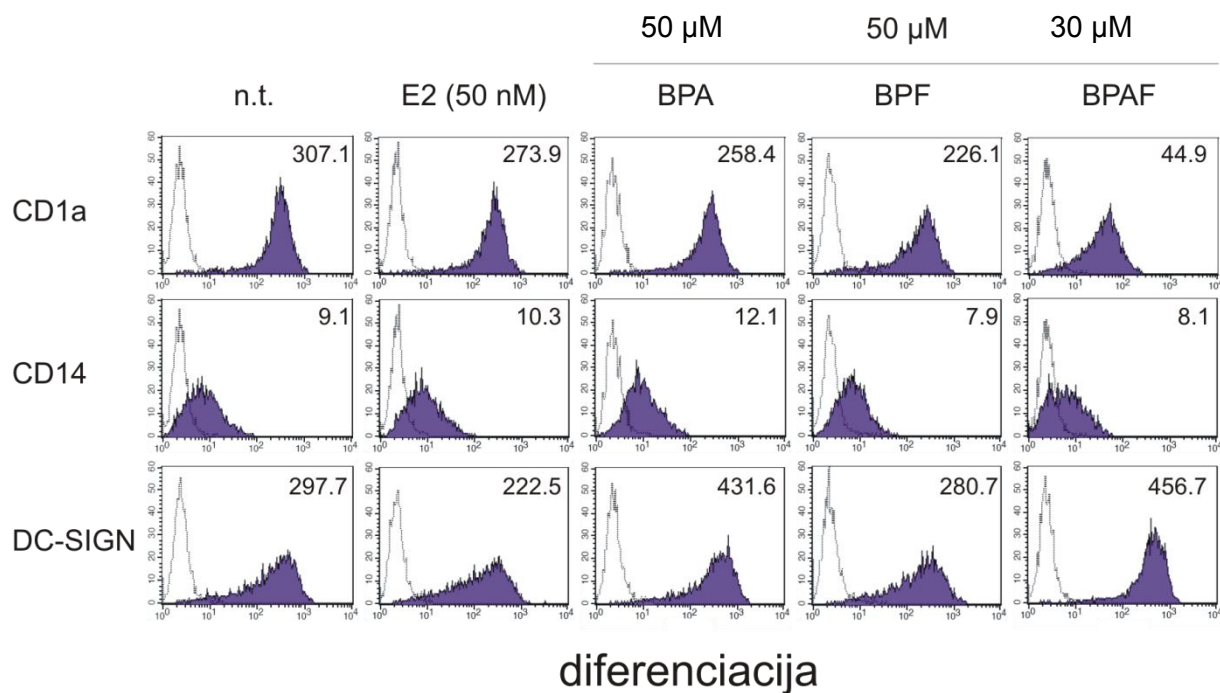
n.t. – kontrolni vzorec

4.3 Izražanje značilnih površinskih molekul na dendritičnih celicah med diferenciacijo in zorenjem

Izražanje kostimulacijskih molekul na DC je pomembno za aktivacijo imunskih celic. Te molekule smo določali tako na nezrelih kot na zrelih DC.

Diferenciacija – nezrele DC

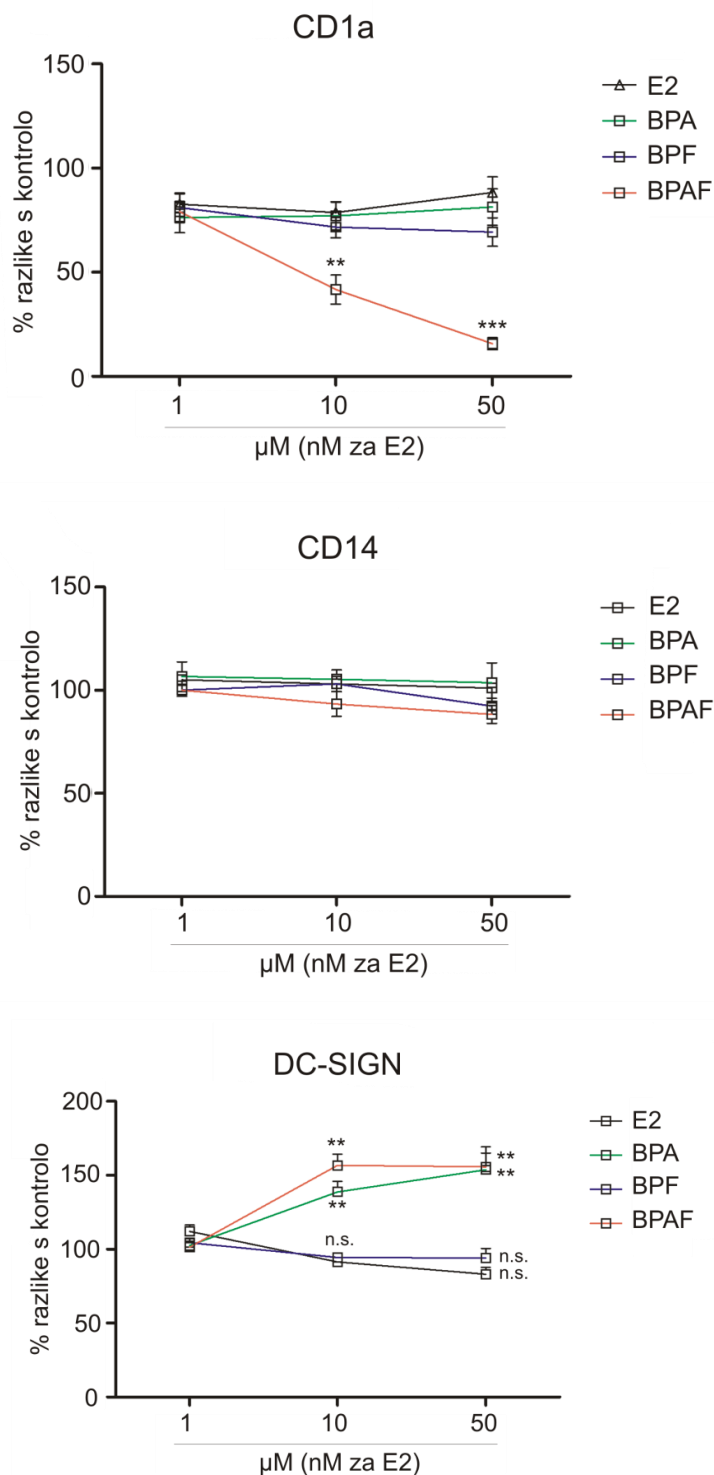
Diferenciacija iz monocitov do nezrelih DC poteka prvih pet dni, zato smo po petih dneh zbrali celice, ki smo jih gojili brez ali v prisotnosti izbranih spojin pri koncentraciji 50 µM (BPA in BPA), 30 µM (BPAF) oz. 50 nM (E₂). Dendritične celice iz posameznih kultur smo inkubirali v prisotnosti fluorescenčno označenih monoklonskih protiteles proti CD1a, CD14 in CD209 (DC-SIGN) ter nivo izražanja določili s pomočjo pretočne citometrije. Kostimulacijska molekula CD1a je značilna za nezrele dendritične celice, CD14 se močno izraža na monocitih, DC-SIGN pa je specifičen za DC in je pomemben v spodbujanju imunskega odziva. Rezultate, kako spojine vplivajo na diferenciacijo dendritičnih celic, smo prikazali grafično v obliki spremenjenega obsega izražanja merjenih površinskih molekul (Slika 9). Na abscisi se nahajajo vrednosti srednje intenzitete fluorescence (MFI, ang. *Mean Fluorescence Intensity*), na ordinati pa število celic, ki so vezale specifično protitelo. Vrednosti, ki so na histogramih zapisane desno zgoraj, so vrednosti MFI označenih celic.



Slika 9: Histogrami celic po petih dneh diferenciacije (nezrele DC). Celice smo gojili 5 dni v prisotnosti GM-CSF in IL-4 ter izbranih spojin (E₂, BPA, BPAF, BPF), nato pa označili s protitelesi (anti-CD1a, -CD14 in -CD209 (DC-SIGN)) in izmerili izražanje s pomočjo pretočne citometrije. n.t. – kontrolni vzorec

Glede na rezultate lahko ugotovimo, da je diferenciacija v kulturi celic brez dodanih spojin uspešno potekla, ostal je le majhen delež monocitov. Iz tega lahko sklepamo, da smo diferenciacijo ustrezno izvedli. Izmed vseh spojin ima spojina BPAF največji vpliv na diferenciacijo. Zmanjšala se je vrednost MFI za molekulo CD1a ter povečala za molekulo DC-SIGN. Tudi pri ostalih spojinah, E₂, BPA in BPF, se je izražanje CD1a zmanjšalo, vendar v nobenem primeru ni bilo tako očitno kot pri spojini BPAF. Izražanje DC-SIGN se je povečalo tudi v primeru BPA, zmanjšalo pa pri E₂ in BPF.

Slika 10 prikazuje grafični prikaz vplivov preizkušanih spojin na izražanje značilnih površinskih molekul nezrelih dendritičnih celic med diferenciacijo iz monocitov *in vitro* z označeno statistično signifikanco. Koncentracija spojin v vzorcu je bila 1 µM, 10 µM ali 50 µM; v primeru E₂ pa smo uporabili 1000-krat manjše koncentracije (1 nM, 10 nM ali 50 nM). Pri BPAF smo zaradi signifikantno povečane apoptoze pri 50 µM kot najvišjo koncentracijo uporabili 30 µM raztopino.



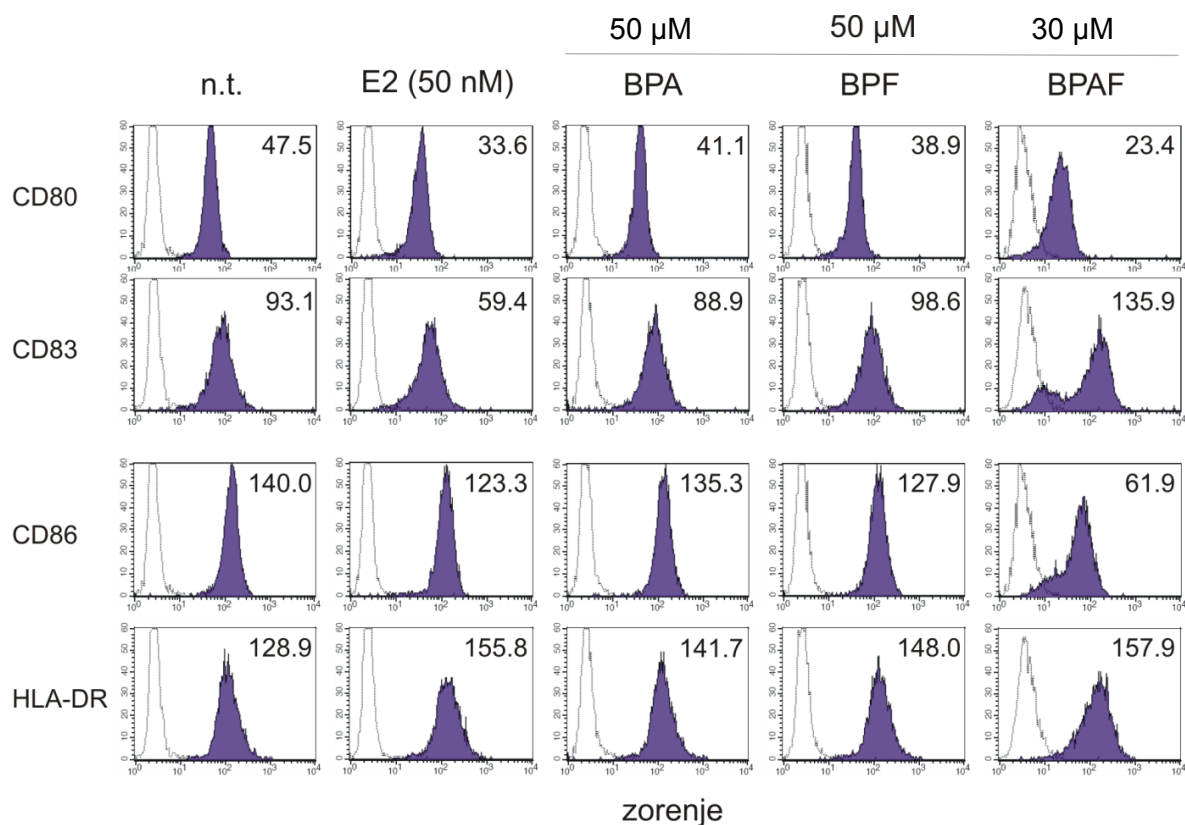
Slika 10: Grafični prikaz vplivov preizkušanih spojin na izražanje značilnih površinskih molekul nezrelih DC med diferenciacijo iz monocitov *in vitro*. Signifikanca je bila določena z uporabo neparnega Studentovega *t* testa in primerja označeno meritev s kontrolnim, netretiranim vzorcem, za katerega smo predpostavili vrednost 100%. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n.s.: nesignifikantno)

Signifikanten vpliv na izražanje CD1a je viden le pri spojini BPAF, in sicer pri koncentracijah 10 in 30 μM ; ostale preučevane spojine pa nimajo significantnega vpliva na izražanje CD1a. Vpliv preučevanih spojin na izražanje CD14 je bil v vseh primerih nesignifikanten. Izražanje DC-SIGN se je statistično značilno povečalo v primeru BPA in BPAF, in sicer pri koncentracijah 10 in 50 oz. 30 μM . Estradiol in BPF nista imela significantnega vpliva na izražanje DC-SIGN.

Zorenje – zrele DC

Podobno pot smo ubrali tudi za določanje fenotipa zrelih celic. Ker postopek do zrelih dendritičnih celic zahteva še dva dni inkubacije, smo dendritične celice namesto po petih dneh, kot pri določanju fenotipa nezrelih dendritičnih celic, zbrali po sedmih dneh. Koncentracije spojin, pri katerih smo, tako kot pri diferenciaciji, preverjali zorenje so bile: 50 μM za BPA in BPF, 30 μM za BPAF in 50 nM za E_2 . Zrele DC smo inkubirali v prisotnosti naslednjih protiteles: anti-CD80, -CD83, -CD86 in -HLA-DR. Kostimulacijski molekuli CD83 in CD86 sta značilni le za zrele dendritične celice; nezrele dendritične celice pa teh površinskih molekul ne izražajo. Tudi molekula CD80 je značilna bolj za zrele dendritične celice, nezrele pa jo izražajo bolj šibko. HLA-DR je površinska molekula poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda II.

Rezultate vplivov spojin na zorenje dendritičnih celic, smo prikazali grafično v obliki spremenjenega obsega izražanja merjenih površinskih molekul (Slika 11).



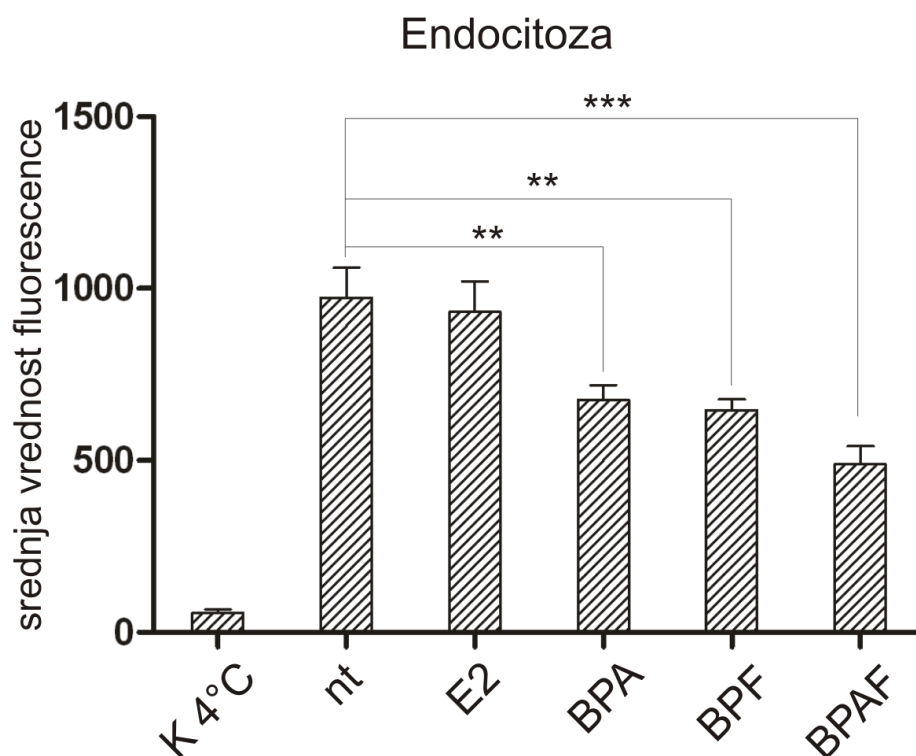
Slika 11: *Histogrami celic po sedmih dneh diferenciacije in zorenja (zrele DC). Celice smo gojili 7 dni v prisotnosti GM-CSF in IL-4 ter izbranih spojin (E₂, BPA, BPAF, BPF), nato pa označili s fluorofori konjugiranimi protitelesi (anti-CD80, -CD83, -CD86 in -HLA-DR) in izmerili izražanje s pomočjo pretočne citometrije. n.t. – kontrolni vzorec*

Histogrami predstavljajo reprezentativne rezultate treh neodvisnih poskusov. Estradiol je v primerjavi s kontrolnim vzorcem znižal izražanje površinskih molekul CD80, CD83 in CD86, povečal pa izražanje HLA-DR. BPA v primerjavi s kontrolnim vzorcem ni imel bistvenega vpliva na izražanje opazovanih molekul, le minimalno je zmanjšal izražanje CD80, CD83 in CD86 in povečal izražanje HLA-DR. BPF je v primerjavi s kontrolnim vzorcem zmanjšal izražanje površinskih molekul CD80 in CD86 ter povečal izražanje CD83 in HLA-DR. Največje spremembe so bile vidne pri BPAF, ki je zelo zmanjšal izražanje CD80 in CD86, izražanje CD83 in HLA-DR pa zelo povečal.

Če pa primerjamo spreminjanje izražanja posameznih molekul glede na preučevane spojine, lahko ugotovimo, da sta se CD80 in CD86 znižala v vseh primerih. Izražanje CD83 se je povečalo v primeru spojin BPF in BPAF, pri tem pa bolj opazno pri BPAF, znižalo pa pri spojinah E₂ in BPA, in sicer bolj v primeru E₂. Obseg izražanja HLA-DR se je povečal v vseh primerih.

4.4 Endocitoza

Antigene predstavljajoče celice (v našem primeru DC) morajo najprej preko endocitoze privzeti antigen, ki ga nato med procesom zorenja predstavijo na svojih površinah, vezanega na molekule MHC razreda II. Limfociti T nato kompleks MHC razreda II - antigen prepoznajo in z njim interagirajo ter se aktivirajo preko dodatnih signalov, ki jih zagotavljajo antigene predstavljajoče celice. V našem primeru smo DC dodali fluorescentno označen dekstran, ki so ga te privzele v stanju nezrelosti. Nato smo izmerili fluorescenco. Tako smo preverili kakovost nezrelih celic pripravljenih v prisotnosti preiskovanih spojin. Slika 12 prikazuje srednjo vrednost izmerjene fluorescence in statistično pomembne razlike med posameznimi pari spojin s kontrolnim vzorcem, kar smo določili s pomočjo Studentovega t-testa (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).



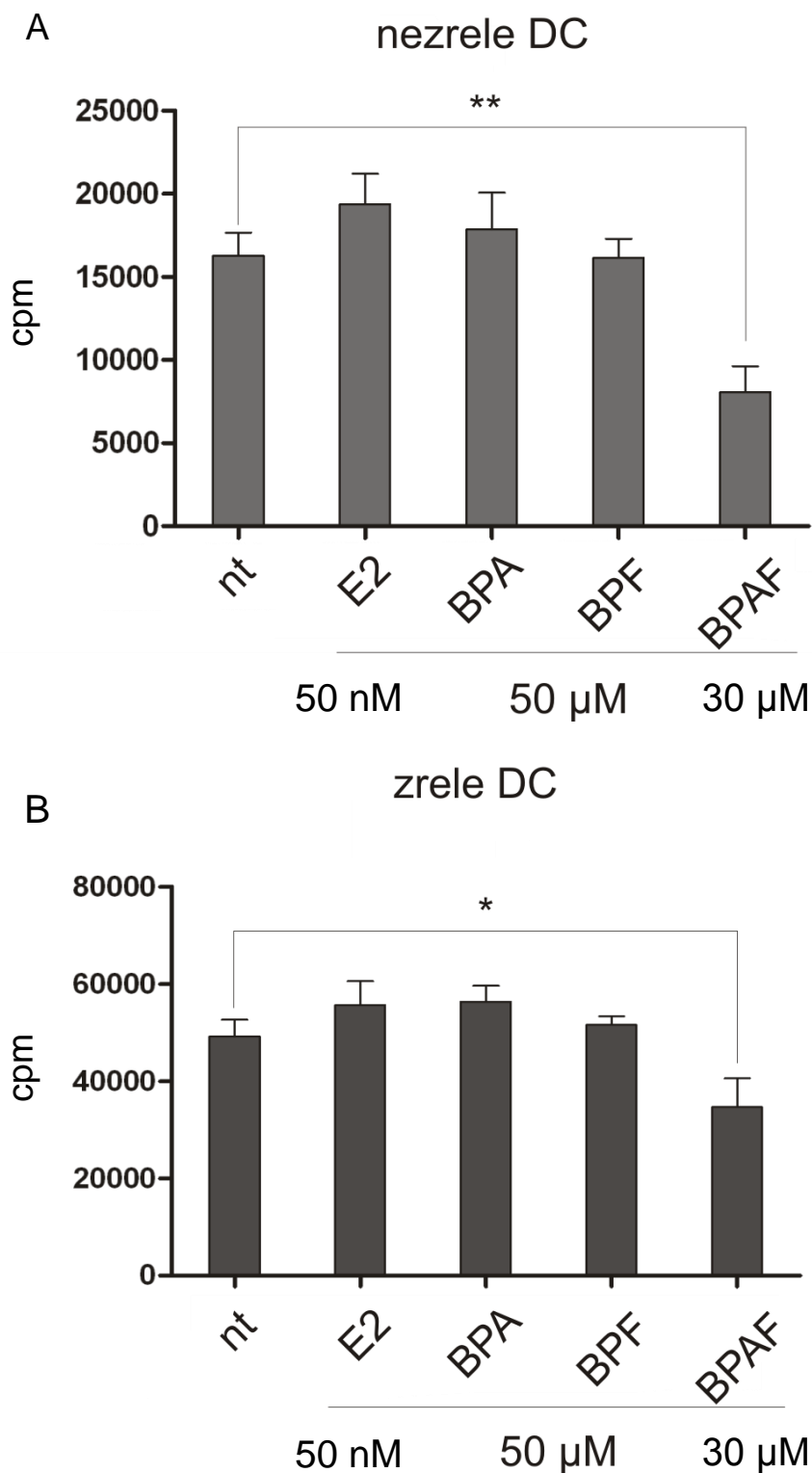
Slika 12: Srednja vrednost fluorescence in statistično pomembne razlike v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Vzorcem smo dodali fluorescentno označen dekstran, katerega fluorescenco smo pomerili in pri tem sklepali na uspešnost nezrelih DC, da privzamejo antigen iz okolja. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) n.t. – kontrolni vzorec

Opazili smo močno zmanjšanje fluorescence pri vseh bisfenolih (BPA, BPF in BPAF). Kot pri vseh ostalih preizkusih se je tudi v tem primeru nadaljeval trend, da spojina BPAF najbolj odstopa in izkazuje največji učinek v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Največja statistično pomembna razlika je bila med kontrolnim vzorcem in BPAF, in sicer z vrednostjo $p < 0,001$; sledita pa ji spojini BPA in BPF z vrednostjo $p < 0,01$.

4.5 Mešana limfocitna reakcija (MLR) – proliferacijski odziv limfocitov T

Dendritične celice (tako nezrele kot zrele), ki smo jih pripravili po postopku, opisanem v poglavju *Materiali in metode*, smo uporabili kot dražilne celice v mešani limfocitni reakciji. Nadaljnjo proliferacijo dražilnih celic smo preprečili z dodatkom mitomicina C. Odzivne celice so bili $CD4^+$ limfociti T, ki smo jih pripravili po postopku, ki je prav tako opisan v prej omenjenem poglavju.

Dražilne celice smo dodali v koncentraciji 1×10^4 , koncentracija odzivnih celic pa je bila 1×10^5 – torej smo uporabili razmerje 1:10. Kulturam smo četrty dan gojenja dodali [3H]-timidin, ki se v nadaljnjih 18 urah inkubacije vgradi v DNA delečih se odzivnih celic. Slika 13 prikazuje obseg proliferacije limfocitov T v posamezni kulturi (cpm, ang. *counts per minute*). Statistično pomembne razlike med posameznimi pari spojin s kontrolnim vzorcem smo določili s pomočjo Studentovega t-testa (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).



Slika 13: Obseg proliferacije limfocitov T v kulturah MLR z nezrelimi (A) ali zrelemi (B) dendritičnimi celicami. Dendritične celice smo gojili v prisotnosti $CD4^+$ limfocitov T pet dni, pri čemer smo četrti dan dodali še $[^3H]$ -timidin, katerega vgrajevanje v DNA delečih se celic smo merili z β scintilacijskim števcem. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)
n.t. – kontrolni vzorec

V primeru nezrelih DC, lahko ugotovimo, da so razlike v proliferacijskem odzivu med kontrolo ter z BPF, BPA in E₂ obdelanih celic razmeroma majhne (sicer je odziv večji od kontrole in narašča v zapisanem vrstnem redu). Še posebej je to izrazito v primerjavi z BPAF, kjer je sposobnost stimulacije limfocitov T približno za polovico manjša v primerjavi s kontrolo, pri čemer je razlika dosti večja v primerjavi z ostalimi spojinami.

Zrele DC izkazujejo veliko sposobnost spodbujanja proliferacije odzivnih limfocitov T. Dokazali smo, da lahko tudi tiste, ki smo jih izpostavili spojinam BPF, BPA in E₂ spodbudijo proliferacijo limfocitov T. Pri tem je bila opazna povečana alostimulacijska sposobnost, ki pa ni bila dovolj velika, da bi bila statistično signifikantna. BPAF v primerjavi z ostalimi spojinami in s kontrolnim vzorcem proliferacije ni spodbudil v enaki meri oz. jo je celo zelo zmanjšal.

Če med seboj primerjamo še grafa nezrelih in zrelih DC, vidimo, da je bil po pričakovanjih proliferacijski odziv limfocitov T večji pri uporabi zrelih celic. Najmanjši in tudi edino statistično značilni odziv v primerjavi s kontrolnim vzorcem sproži BPAF.

5. RAZPRAVA

Študije kažejo, da okolje vse bolj vpliva na zdravje človeka. Čeprav genetski dejavniki očitno predstavljajo osnovo za zdravje, pa kemijsko okolje, kateremu je organizem tekom življenja izpostavljen, pomembno vpliva na dejansko stanje organizma. Okolje je vir spojin, ki so pomembne za življenje, pa tudi takšnih, za katere bi bilo bolje, da jim ne bi bili izpostavljeni (npr. onesnaževala). Slednje vključujejo spojine, ki smo jih namerno proizvedli, včasih zato, da bi negativno vplivali na organizme drugih vrst, npr. pesticide, protimikrobne spojine. Določene spojine so tudi skriti stranski produkti proizvodnje, uporabe, metabolizma in okoljske transformacije industrijskih kemikalij. Tako je lahko v našem okolju na milijone različnih spojin (56).

Vedno večjo skrb glede možnega negativnega vpliva na javno zdravje zbuja okoljske kemikalije z estrogensko aktivnostjo, katerih možni učinki vključujejo rak dojke, zmanjšano število semenčic in raznovrstne reproduktivne napake. Bisfenol A je še posebej pomemben okoljski estrogen. Ne le da je razširjen v okolju, ampak ga tudi redno uživamo, saj se izloča iz polikarbonatnih plastik, premazov na kovinskih pokrovih za steklene kozarce in iz zobozdravstvenih materialov. Nahaja se tudi v vodi. Bisfenol A ima šibko estrogensko aktivnost *in vitro* in *in vivo*. Dokazi pa govore o tem, da je spojina sposobna interagirati z estrogenskim receptorjem alfa na poseben način, nekoliko drugače od estradiola (57).

Dandanes je že splošno znano, da naravni in sintezni hormoni ne vplivajo le na reproduktivni, ampak v veliki meri tudi na imunski sistem. V okolju se nahajajo tudi spojine, ki imajo estrogensko aktivnost (velika podskupina hormonskih motilcev) in delujejo tudi na imunski sistem. Spremembe lastnosti imunskega sistema, ki so posledica okoljskih estrogenov, lahko vplivajo na posameznikovo sposobnost, da ima dobro uravnan imunski odziv na mikrobiološke antigene, alergene, lastne in tumorske antigene (36).

Med najpomembnejše celice imunskega sistema sodijo limfociti T. Limfociti T za svojo aktivacijo potrebujejo pomoč antigene predstavljajočih celic, nato pa lahko pomagajo tudi pri aktivaciji in dozorevanju limfocitov B. Dendritične celice so profesionalne antigene predstavljajoče celice, ki lahko aktivirajo naivne limfocite T že ob njihovem prvem srečanju z antigenom (50).

V diplomskem delu smo se osredotočili na učinke estradiola, bisfenola A, bisfenola F in bisfenola AF na diferenciacijo, dozorevanje in funkcijske lastnosti dendritičnih celic, ki smo jih pripravili iz človeških monocitov *in vitro*. Model dendritičnih celic smo izbrali na podlagi dejstva, da je dobro opisan in preizkušen v številnih študijah ter je ustrezal želenim vrstam poskusov.

Vloga dendritičnih celic ni bila ustrezno vrednotena vse do leta 1973, ko sta jih Steinman in Cohn prvič identificirala kot močne stimulatorje primarnega imunskega odziva. Vendar pa je majhno število DC *in vivo* in označevalnih molekul, ki omogočajo njihovo razlikovanje od monocitov/makrofagov, ter težave pri njihovi izolaciji, onemogočalo hiter razvoj metod, ki bi zagotovile dodatno preučevanje njihove vloge v imunskem sistemu. Šele v 90ih letih 20. stoletja smo dočakali hiter razvoj področja z razvojem postopkov za izolacijo in pridobivanje DC iz krvi in kostnega mozga (58).

Monociti iz periferne krvi predstavljajo danes najpomembnejši vir za pripravo večjih količin DC *in vitro*. Z gojenjem monocitov *in vitro* v prisotnosti citokina IL-4 in ravnega dejavnika GM-CSF dobimo po petih dneh nezrele DC. Iz njih pa lahko po dodatnih dveh dneh gojenja v prisotnosti LPS pripravimo zrele DC (50).

S svetlobnim mikroskopom smo spremljali morfologijo celic med celotnim postopkom diferenciacije iz monocitov in zorenja tako pridobljenih nezrelih DC v kontrolnem vzorcu in v vzorcih z dodanimi spojinami. Morfološke lastnosti DC so pogosto med prvimi pokazatelji uspešnosti diferenciacije in zorenja. Pri opazovanju nezrelih DC po petih dneh gojenja smo opazili, da so te nepritrjene v suspenziji, nepravilnih oblik, večje od monocitov in še brez izrazitih izrastkov (dendritov). Zrele DC so kroglaste oblike s številnimi dendriti. Pri opazovanju nismo opazili večjih razlik med opazovanimi vzorci celic, saj smo pri vseh opazili uspešno diferenciacijo in zorenje.

Življenjska doba DC vpliva na njihovo sposobnost stimulacije limfocitov in zato tudi na aktivacijo limfocitov in imunske odzive (59). Najprej smo ugotavljali, ali preučevane spojine pri dveh izbranih koncentracijah vplivajo na DC v določenem časovnem obdobju, pri čemer smo spremljali apoptozo. Na te rezultate lahko poleg same morebitne toksičnosti uporabljenih spojin vplivajo tudi nekateri drugi dejavniki, vendar pa le v manjši meri, če so poskusi pravilno izvedeni. Tako ima lahko vpliv na število živih celic v vzorcih kakovost izhodnih levkocitnih koncentratov, kar je povezano z zdravstvenim stanjem darovalca pri

odvzemu krvi, individualne lastnosti darovalcev in tudi interindividualne razlike v občutljivosti krvnih celic med posameznimi darovalci. Tudi sam postopek poskusa lahko vpliva na preživetje celic, kjer lahko manj odporne celice propadejo. Kljub vsem naštetim možnim vplivom na celice, pa zasnova poskusa omogoča ustrezno primerjavo med posameznimi vzorci in oceno toksičnosti spojin.

Ugotovili smo, da ima višja koncentracija preizkušanih spojin večji vpliv na preživetje DC, razen v primeru estradiola, kjer velike razlike med uporabljenima koncentracijama nismo opazili, prav tako pa tudi ne med kontrolnim vzorcem in vzorcema z dodatkom estradiola. Pri bisfenolu A in bisfenolu F je bila razlika med višjo in nižjo koncentracijo majhna. Največjo razliko smo opazili pri bisfenolu AF, kjer je bil delež mrtvih celic pri koncentraciji 50 μM za približno 10-krat višji kot pri netretiranem kontrolnem vzorcu. Delež apoptotičnih celic je bil prav tako povečan, vendar pa ne tako drastično. Ugotovimo torej lahko, da je bisfenol AF bistveno bolj toksičen za tovrstne celice v primerjavi z ostalimi preizkušanimi spojinami. Zaradi tega smo v nadaljnjih poskusih uporabili koncentracijo 30 μM bisfenola AF, pri kateri je bilo število apoptotičnih celic primerljivo s kontrolnim vzorcem. Glede na to, da so bili deleži mrtvih in apoptotičnih celic prisotni tudi v kontrolnem vzorcu, lahko potrdimo prej navedene trditve, da na živost DC ne vplivajo le dodane spojine. Torej lahko sklepamo, da zaradi majhnih razlik med kontrolnim vzorcem in nižjimi koncentracijami spojin, slednje nimajo večjega vpliva na preživetje DC. Tudi pri višjih koncentracijah bisfenolov lahko ugotovimo podobno, z izjemo 50 μM koncentracije bisfenola AF, kjer je bila razlika v primerjavi s kontrolnim vzorcem očitna.

Nadalje smo opazovali izražanje površinskih molekul na DC, ki so pomembne za aktivacijo imunskih celic (limfocitov T). Molekulske označevalce diferenciacije smo določali na nezrelah DC, na zrelih DC pa kostimulacijske molekule.

Nezrele DC smo pridobili po petih dneh diferenciacije iz monocitov, nato pa preverjali izražanje molekul CD1a, CD14 in CD209 (DC-SIGN). CD1a sodi med membranske proteine vrste CD1 in se pogosto uporablja kot označevalec DC, ki so v zgodnji fazi razvoja (60). CD14 je površinska molekula, ki je značilna za monocite/makrofage (61). Velik obseg izražanja molekul DC-SIGN sovпада z diferenciacijo monocitov v nezrele DC *in vitro*, v prisotnosti GM-CSF in IL-4 (62).

Rezultat poskusa je pokazal, da je bila diferenciacija monocitov v nezrele DC uspešna, saj smo v kontrolnem vzorcu dokazali izražanje molekul CD1a in DC-SIGN, ki sta značilni za

nezrele DC, ter zmanjšanje izražanja molekul CD14, ki je značilna za monocite. Rezultati nam tudi kažejo, da je diferenciacija potekala v vseh vzorcih z dodanimi preiskovanimi spojinami. Dodatek estradiola, v primerjavi s kontrolnim vzorcem, v uporabljenih koncentracijah ni kazal bistvenega vpliva na diferenciacijo monocitov v DC. Enako lahko trdimo tudi za bisfenol F. Bisfenol A in bisfenol AF pa sta v primerjavi s kontrolnim vzorcem za približno tretjino povečala izražanje molekul DC-SIGN. Dodatno je bisfenol AF bistveno zmanjšal izražanje molekul CD1a, kar ponovno kaže na poseben vpliv te spojine v primerjavi z drugimi bisfenoli in estradiolom. DC-SIGN ima pomembno vlogo pri aktivaciji naivnih limfocitov T in posrednemu spodbujanju imunskega sistema (63).

Zrele DC smo pripravili iz nezrelih po 48 urah gojenja nezrelih DC v prisotnosti LPS. V tem primeru smo določali prisotnost molekul CD80, CD83, CD86 in HLA-DR. Kostimulacijski molekuli CD80 in CD86 sta izjemno pomembni za aktivacijo limfocitov T in tako igrata ključno vlogo pri sprožitvi imunskega odziva (64). Samo za zrele DC je značilno izražanje molekul CD83. HLA-DR spada med molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) razreda II. Za aktivacijo limfocitov sta potrebna dva signala: prvi je specifična vezava med antigensko specifičnimi receptorji na limfocitih T (T-celični receptorji) in kompleksi antigenskih peptidov ter molekul MHC, izraženimi na DC (APC). Drugi pa je vezava kostimulacijskih molekul (CD80, CD86) z ustreznimi ligandi na limfocitih T (CD28) (50).

Rezultati naših poskusov so pokazali, da je bilo izražanje molekul CD80 in CD86 v primerjavi s kontrolnim vzorcem manjše pod vplivom vseh preizkušanih spojin. Estradiol je zmanjšal tudi izražanje CD83, povečal pa je izražanje molekul HLA-DR. V nadaljevanju smo te rezultate primerjali tudi s funkcijskimi testi, ki kažejo, v kakšnem obsegu poteka aktivacija limfocitov T. Bisfenol A in bisfenol F sta imela podobne učinke, in sicer se je izražanje CD80 in CD86 zmanjšalo v primerjavi s kontrolnim vzorcem, vendar pa razlika ni bila velika (1,22-kratno zmanjšanje). Tudi izražanje molekul CD83 je bilo primerljivo s kontrolnim vzorcem. Spojini sta tudi povečali ekspresijo molekul HLA-DR. Če si ogledamo izražanje vseh molekul v prisotnosti teh dveh spojin, bi lahko sklepali, da bodo vplivi spojin imeli stimulacijski učinek na imunski sistem. Bisfenol AF je bila tista spojina, ki je povzročila največji odstop od rezultatov dobljenih z ostalimi preizkušanimi spojinami. Izražanje molekul CD83 se je v primerjavi s kontrolnim vzorcem zelo povečalo. Glede na to, da je bisfenol AF zavrnil izražanje CD80 in CD86 in povečal ekspresijo HLA-DR, lahko predvidevamo, da bo ta imel zaviralen učinek na imunski sistem.

Za DC so dolgo verjeli, da imajo nizko sposobnost endocitoze in fagocitoze. Ugotovili so, da je velika sposobnost privzemanja antigenov lastnost nezrelih DC. Med njihovim zorenjem pa se ta sposobnost zmanjša, s tem pa tudi raznovrstnost antigenov, ki bi jih zrele DC lahko predstavljale na površini po odhodu iz perifernih tkiv (65).

Nadaljnji pomemben poskus smo opravili prav na področju endocitoze. Vrednotili smo kakovost privzemanja antigenov iz okolja v stanju nezrelosti DC. Celicam smo dodali fluorescentno označeni dekstran in ugotovili, da se v primerjavi s kontrolnim vzorcem sposobnost endocitoze nezrelih DC zmanjša v prisotnosti vseh testiranih spojin. Največji vpliv ima bisfenol AF, kar je bilo tudi pričakovano glede na rezultate ostalih poskusov. Malo manjši vpliv sta izkazali spojini bisfenol A in bisfenol F, najmanjši efekt pa je imel estradiol, ki tudi edini ni kazal signifikantnega vpliva na endocitozo.

Vrednotili smo tudi vpliv testiranih spojin na sposobnost stimulacije limfocitov T v mešani limfocitni reakciji (MLR). Mehanizmi, ki regulirajo imunski odziv, so zelo kompleksni. Predpostavljane tipa imunskega odziva samo s pomočjo eksperimentalnega modela DC ni smiselno, saj je ta proces odvisen od številnih lastnosti tako antigene predstavljajočih celic (fenotip, citokinski profil), kot tudi od mikrookolja, v katerem poteka imunska reakcija ter vrste odzivnih in ostalih udeleženih celic. Aloreaktivnost je ena od najmočnejših imunskih reakcij in se pogosto uporablja z namenom ocene sposobnosti DC, da stimulirajo limfocite T.

V mešanih levkocitnih kulturah lahko kot dražilne celice uporabimo neobdelane ali obdelane DC, kot odzivne pa alogenske limfocite T (66). MLR je testni sistem *in vitro* za določanje obsega proliferacije limfocitov T v odziv na dražilne celice, v našem primeru torej različno obdelane DC (67). Medtem ko zrele DC izjemno učinkovito stimulirajo proliferacijo odzivnih limfocitov T (68), pa so nezrele precej manj učinkovite (69).

Največjo razliko v primerjavi s kontrolnim vzorcem smo opazili v primeru bisfenola AF. Z njim obdelane DC so znatno slabše spodbujale proliferacijo limfocitov T, zato lahko sklepamo, da ta spojina zaviralno vpliva na aktivacijo celičnih imunskih odzivov. Ta vpliv smo opazili tako pri nezrelih kot zrelih DC in v obeh primerih je bila razlika glede na kontrolni vzorec statistično značilna.

Estradiol je povečal sposobnost zrelih, ne pa tudi nezrelih DC, da spodbudijo proliferacijo limfocitov T (70). Z našimi poskusi smo sicer dokazali, da se alostimulacijska sposobnost DC obdelanih z estradiolom poveča, a ne toliko, da bi bilo to statistično signifikantno.

Sedaj še ni jasnih dokazov o tem, da bi bisfenol A lahko vplival na funkcijo imunskega sistema (22). MLR (in tudi ostali testi) je dokazal enako. Sicer je razlika tako pri nezrelih kot pri zrelih DC opazna, vendar ni statistično signifikantna pri preučevanih koncentracijah.

Podobno kot za estradiol in bisfenol A lahko ugotovimo tudi za bisfenol F. Razlika glede na kontrolni vzorec sicer obstaja, vendar je minimalna in zato statistično nepomembna.

Seveda nobenega uporabljenega testa ne smemo obravnavati kot samostojno celoto, saj moramo upoštevati, da lahko rezultati določenega poskusa posredno pokažejo možni vpliv posamezne preučevane spojine na stimulacijo imunskega sistema, kar pa lahko ostali poskusi ovržejo.

Glede na dobljene rezultate lahko za preučevane spojine ugotovimo naslednje:

- estradiol: spojina pri izbranih koncentracijah ni kazala vpliva na apoptozo in tudi njen vpliv na endocitozo DC je bil statistično nesignifikanten. Vplival je na diferenciacijo celic, in sicer jo je v našem eksperimentalnem modelu minimalno zavrl. Enak vpliv smo opazili tudi pri zorenju DC. V MLR je estradiol tako v primeru nezrelih kot zrelih DC vplival na stimulacijo proliferacije limfocitov T tako, da je aktiviral imunski odziv. Vendar pa je bila razlika v primerjavi s kontrolnim vzorcem statistično neznačilna.
- bisfenol A: pri preučevanih koncentracijah ni vplival na apoptozo celic, pač pa vpliva pa na sposobnost privzemanja antigenov z nezrelimi DC, kar je bilo statistično signifikantno ($p < 0,01$). Med diferenciacijo je povečal izražanje DC-SIGN, kar bi lahko pod določenimi pogoji botrovalo večji sposobnosti stimulacije limfocitov T. Zrele DC pa v njegovi prisotnosti niso povečale izražanja kostimulacijskih molekul. S testom MLR smo pokazali, da čeprav je bila sposobnost privzemanja antigenov z bisfenolom A obdelanih nezrelih DC okrnjena, so tako nezrele kot zrele DC stimulirale celični imunski odziv povsem minimalno v primerjavi s kontrolo.
- bisfenol F: spojina je pri višji koncentraciji vplivala na apoptozo celic v primerjavi s kontrolnim vzorcem in imela statistično signifikanten vpliv na endocitozo nezrelih DC. Na diferenciacijo in zorenje DC pa ni imela velikega vpliva. Prav tako v testu MLR ni vplivala statistično signifikantno na proliferacijo limfocitov T.

- bisfenol AF: ta spojina je imela največji vpliv na DC v vseh poskusih. Pri merjenju obsega apoptoze smo ugotovili, da je bisfenol AF toksičen pri prvotno izbrani višji koncentraciji (50 μ M), zato smo vse nadaljnje poskuse izvajali pri nižji koncentraciji 30 μ M. Njegov vpliv na endocitozo nezrelih DC je bil statistično značilen ($p < 0,001$), in sicer v tem smislu, da je zmanjšal njen obseg. Bisfenol AF je vplival tudi na diferenciacijo celic. Zmanjšal je izražanje CD1a in povečal ekspresijo DC-SIGN na nezrelih DC, vplival pa je tudi na zorenje celic. Kot edini med preučevanimi spojinami je povzročil statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim vzorcem v testu MLR. Z njim obdelane DC so imele manjšo sposobnost spodbujanja proliferacije limfocitov T.

Učinki estradiola in preiskovanih bisfenolov na imunski sistem so še dokaj neraziskani. Z diplomskim delom smo pridobili osnovne informacije o njihovem vplivu na antigene predstavljaljoče celice. Poleg učinkov na imunski sistem omenjene spojine vplivajo tudi na druge bistvene sisteme, ki so bolj ali manj raziskani. Bisfenoli naj bi imeli estrogenom podobno delovanje, zato smo za primerjavo uporabili estradiol, ki je naravni spolni hormon. Estradiol ima močnejše delovanje v telesu že v nanomolarnih koncentracijah (71), medtem ko smo pri preučevanih bisfenolih učinek opazili šele v mikromolarnih koncentracijah. Moramo pa tudi omeniti, da je dnevna izpostavljenost ljudi preiskovanim spojinam manjša od naših uporabljenih koncentracij, saj je vnos bisfenolov odvisen od njihovega odpuščanja iz plastičnih in drugih materialov ter seveda pogostosti uporabe takšnih materialov. Dokazali smo, da bi bile nadaljnje raziskave pomembne tudi za bisfenol AF, ki je fluoriran analog bisfenola A. Od vseh preiskovanih spojin je namreč izzval signifikantnejše učinke v uporabljenih eksperimentalnih modelih preučevanja njihovega delovanja na imunski sistem.

6. SKLEP

V diplomskem delu smo se osredotočili na vpliv estradiola (E_2) ter bisfenola A (BPA) in njegovih analogov, bisfenola F (BPF) in bisfenola AF (BPAF), na imunski sistem. Bisfenol A je hormonski motilec z delovanjem podobnim estradiolu oz. ostalim endogenim estrogenom. Z njim se dandanes pogosto srečujemo, saj se uporablja kot dodatek plastičnim materialom za izboljšanje njihovih lastnosti in se nahaja v premazih na kovinskih pokrovih steklenih kozarcev in na notranjih površinah pločevink.

Za preučevanje učinkov omenjenih spojin na imunski sistem smo izbrali dendritične celice (DC), ki so profesionalne antigene predstavljajoče celice. Ugotavljali smo vpliv estradiola in bisfenolov na apoptozo celic, njihovo sposobnost privzemanja antigenov iz okolja v nezrelem stanju (endocitoza), izražanje diferenciacijskih označevalnih molekul na nezrelih in kostimulacijskih molekul na zrelih DC ter njihov vpliv na sposobnost DC, da spodbudijo proliferacijo limfocitov T.

Na osnovi izsledkov naših poskusov lahko zaključimo naslednje:

- Le bisfenol AF je imel vpliv na živost celic pri preizkušanih koncentracijah in še to le pri višji ($50 \mu\text{M}$). Ostale spojine niso vplivale na preživetje celic pri obeh testiranih koncentracijah (10 in $50 \mu\text{M}$ za BPA in BPF oz. 10 in 50nM za estradiol).
- Vpliv izbranih koncentracij preučevanih spojin ($50 \mu\text{M}$ za BPA in BPF, $30 \mu\text{M}$ za BPAF) na sposobnost nezrelih DC, da privzemajo antigene iz okolja, je bil statistično signifikanten, in sicer je bila endocitoza manjša v primerjavi s kontrolo. Dendritične celice, ki smo jih izpostavili estradiolu (koncentracija 50nM), pa niso imele zmanjšane endocitoze.
- Spojine so pokazale tudi zanimiv vpliv na diferenciacijo monocitov v nezrele DC. Majhen in nesiginifikanten inhibitorni vpliv smo opazili pri estradiolu in pri bisfenolu F. Bisfenol A in bisfenol AF pa sta zmanjšala izražanje CD1a ter povečala ekspresijo DC-SIGN, ki sta značilna za nezrele DC. Vpliv bisfenola AF je

bil še posebej izrazit. Omenjeni rezultati veljajo za uporabljene koncentracije (50 μ M za BPA in BPF, 30 μ M za BPAF, 50 nM za E₂).

- Estradiol je vplival na zorenje DC, pri čemer je zmanjšal obseg izražanja za zrele celice značilnih molekul CD80, CD83 in CD86, povečal pa izražanje HLA-DR. Bisfenol A in bisfenol F nista vplivala na zorenje DC. Tako kot v vseh poskusih je imel tudi v tem primeru bisfenol AF največji vpliv in je zmanjšal ekspresijo CD80 in CD86, povečal pa izražanje CD83 in HLA-DR.
- Rezultati alogenskih mešanih limfocitnih reakcij niso pokazali statistično signifikantnih razlik v primerih uporabe estradiola, bisfenola A in bisfenola F. Le bisfenol AF je tako v primeru nezrelih kot zrelih DC zmanjšal proliferacijo limfocitov T.
- Bisfenol A ni pokazal statistično signifikantnega vpliva na DC, medtem ko je bisfenol AF pri izbranih koncentracijah povzročil zaviralen učinek na dozorevanje DC in na njihovo sposobnost stimulacije alogenskih limfocitov T *in vitro*.

Na področju vpliva bisfenolov na imunski sistem so potrebne še nadaljnje raziskave. Pri ocenjevanju vplivov bisfenolov na zorenje DC, na primer bi morali za bolj natančno opredelitev oceniti tudi druge aspekte zorenja, kot sta citokinski profil in sposobnost DC za polarizacijo limfocitov T v različne vrste efektorskih celic (Th1, Th2, Th17). Kot posebej zanimiv se je pokazal bisfenol AF, ki je manj raziskana spojina in izkazuje zanimive učinke na DC. Zavedati pa se moramo, da so preiskovane spojine povzročile opisane učinke pri dokaj visokih koncentracijah, ki bi jim bili zaradi nizkih dnevnih vnosov lahko le izjemoma izpostavljeni.

7. LITERATURA

- (1) Vallack HW et al: Controlling persistent organic pollutants—what next? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1998; 6: 143–175.
- (2) Staessen JA et al: Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet* 2001; 357: 1660–69.
- (3) Dai HL, Zhang KL, XU XL, Yu HY: Evaluation on the Effects of Deicing Chemicals on Soil and Water Environment. *Procedia Environmental Sciences* 2011; 8: 2122-2130.
- (4) Rios LM, Moore C, Jones PR: Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin* 2007; 54: 1230–1237.
- (5) Teuten EL et al: Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2009; 364: 2027-2045.
- (6) Dietrich DR, Webb SF, Petry T: Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicology Letters* 2002; 131: 1–3.
- (7) Sebastine IM, Wakeman RJ: Consumption and environmental hazards of pharmaceutical substances in the UK. *Trans IChemE* 2003; 81: 229-235.
- (8) Verhaar HJM, van Leeuwen CJ, Hermens JLM: Classifying environmental pollutants. *Chemosphere* 1992; 25: 471-491.
- (9) Verhaar HJM, Solbe J, Speksnijder J, van Leeuwen CJ, Hermens JLM: Classifying environmental pollutants: Part 3. External validation of the classification system. *Chemosphere* 2000; 40: 875-883.
- (10) Gelbke HP, Kayser M, Poole A: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 2004; 205: 17–25.
- (11) Eertmans F, Dhooge W, Stuyvaert S, Comhaire F: Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 515–524.
- (12) Chang HS, Choo KH, Lee B, Choi SJ: The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172: 1-12.

- (13) Hinson JP, Raven PW: Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 20: 111-120.
- (14) DeVito M et al: Screening Methods for Thyroid Hormone Disruptors. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 407-415.
- (15) vom Saal FS, Hughes C: An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 926–933.
- (16) Morton MS et al: Phytoestrogen Concentrations in Serum from Japanese Men and Women over Forty Years of Age. *J. Nutr.* 2002; 132: 3168–3171.
- (17) Snyder SA, Westerhoff P, Yoon Y, Sedlak DL: Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry. *Environ Eng Sci* 2003; 20: 449-469.
- (18) Gray LE et al: Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human Reproduction Update* 2001; 7: 248-264.
- (19) Ingerslev F, Vaclavik E, Halling-Sorensen B: Topic 2.4 Pharmaceuticals and personal care products: A source of endocrine disruption in the environment? *Pure Appl. Chem.* 2003; 75: 1881–1893.
- (20) Kashiwagi K et al: Disruption of thyroid hormone function by environmental pollutants. *Journal of Health Science* 2009; 55: 147-160.
- (21) Burmester GR, Pezzutto A: *Color Atlas of Immunology*, Thieme, Stuttgart, 2003: 254-255.
- (22) Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A, Summary Report, Ottawa, Kanada, 1. – 5. nov. 2010.
- (23) Maia J, Cruz JM, Sendón R, Bustos J, Sanchez JJ, Paseiro P: Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International* 2009; 42: 1410–1414.
- (24) <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2010/2010-03-31/html/sor-dors53-eng.html>
(Dostop: marec 2012)
- (25) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:sl:PDF>
(Dostop: marec 2012)
- (26) Wetherill YB et al: In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology* 2007; 24: 178–198.

- (27) Rubin BS: Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011; doi:10.1016/j.jsbmb.2011.05.002.
- (28) Alonso-Magdalena P et al: The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic β -Cell Function In Vivo and Induces Insulin Resistance. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 106–112.
- (29) Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS: Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS ONE* 2010; 5(1): e8673. doi:10.1371/journal.pone.0008673
- (30) Matsushima A et al: Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α but a Highly Specific Antagonist for ER β . *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1267–1272.
- (31) Raloff J: Another plastics ingredient raises safety concerns, *Science News*, 2010; 177: 14
- (32) Gao J, Xia L, Liu Y: Structure of a boron-containing bisphenol-F formaldehyde resin and kinetics of its thermal degradation. *Polymer Degradation and Stability* 2004; 83: 71-77.
- (33) Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research* 2002; 36: 1429-1438.
- (34) Klaassen CD: Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, 7th Ed., 2008.
- (35) Davis SL: Environmental Modulation of the Immune System via the Endocrine System. *Domestic Animal Endocrinology* 1998; 15: 283-289.
- (36) Ahmed SA: The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology* 2000; 150: 191–206.
- (37) Gleichman E, Kimber I, Purchase IFH: Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on immune system. *Arch Toxicol* 1989; 63: 257-273.
- (38) Van Den Berg M et al: Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 775-792.
- (39) White KL, Lysy HH, Holsapple MP: Immunosuppression by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Structure-Activity Relationship in B6C3F1 and DBA/2 Mice. *Immunopharmacology* 1985; 9: 155-164.

- (40) Banerjee BD: The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals. *Toxicology Letters* 1999; 107: 21-31.
- (41) Inadera H: The immune system as a target for environmental chemicals: Xenoestrogens and other compounds. *Toxicology Letters* 2006; 164: 191–206.
- (42) Walker SE, Jara LJ: *Endocrine Manifestations of Systemic Autoimmune Diseases, Volume 9 (Handbook of Systemic Autoimmune Diseases)*. Elsevier Science; 1st Ed., 2008.
- (43) Descotes J: Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006; 2: 249-259.
- (44) O'Mahony L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TPJ, Mealy K: Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 213-219.
- (45) Dietert RR, *Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2010, 259-302, 401-423.
- (46) Gatti E, Pierre P: Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 468–473.
- (47) Soruri A, Zwirner J: Dendritic cells: limited potential in immunotherapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 241–245.
- (48) Celia M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 10-16.
- (49) Švjager U, Vidmar A, Jeras M: Nifumic acid renders dendritic cells tollerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4. *International Immunopharmacology* 2008; 8: 997-1005.
- (50) Repnik U, Bergant M, Jeras M: Lastnosti in možnosti uporabe dendritičnih celic, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 69-72.
- (51) http://www.miltenyibiotec.com/download/protocols_sample_preparation_en/1396/SP_MC_PB_density_gradient.pdf (Dostop: december 2011)
- (52) http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_1065_167_LD_Columns.aspx (Dostop: december 2011)
- (53) http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_1109_182_MidiMACS_Separator.aspx (Dostop: december 2011)
- (54) http://www.miltenyibiotec.com/download/protocols_cellsep_special_en/509/SP_CD4.pdf (Dostop: december 2011)

- (55) <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13242.pdf> (Dostop: december 2011)
- (56) Daughton CG: Emerging Pollutants, and Communicating the Science of Environmental Chemistry and Mass Spectrometry: Pharmaceuticals in the Environment. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001; 12: 1067–1076.
- (57) Farabollini F, Porrini S, Dessi-Fulgheri F: Perinatal Exposure to the Estrogenic Pollutant Bisphenol A Affects Behavior in Male and Female Rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 64: 687–694.
- (58) Merad M, Manz MG: Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009; 113: 3418-3427.
- (59) Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J: Regulation of the Lifespan in Dendritic Cell Subsets. *Mol Immunol* 2007; 44: 2558–2565.
- (60) Gogolak P et al: Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . *Blood* 2007; 109: 643-652.
- (61) Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1988; 392: 245-252.
- (62) Geijtenbeek TBH et al: Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 2000; 100: 575–585.
- (63) Zhou T et al: DC-SIGN and Immunoregulation. *Cellular & Molecular Immunology* 2006; 3: 279-283.
- (64) Ichim TE, Zhong R, Min WP: Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003; 11: 295-306.
- (65) Guermonprez P et al: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 621–67.
- (66) Jeras M, Bergant M, Repnik U: In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells—potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. *Transplant Immunology* 2005; 14: 231-244.
- (67) Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA: *Kuby Immunology*, W. H. Freeman & Company, New York, 2006: 185-199.
- (68) Švajger U, Obermajer N, Jeras M: Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tollerogenic properties upon activation. *Immunology* 2010; 129: 525-35.

- (69) Matasić R, Dietz AB, Vuk-Pavlović S: Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. *Immunology* 2000; 101: 53-60.
- (70) Bengtsson AK et al: 17β -Estradiol (E2) modulated cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2004; 104: 1404-1410.
- (71) Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y: Effects of Sex Hormones on Production of Interleukin-1 by Human Peripheral Monocytes. *Journal of Periodontology* 1999; 70: 757-760.