

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KAVČIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KAVČIČ

***IN VITRO* PREUČEVANJE CITOTOKSIČNOSTI, ESTROGENOSTI IN TVORBE
REAKTIVNIH METABOLITOV BISFENOL A-GLICIDIL METAKRILATA**

***IN VITRO* EVALUATION OF CYTOTOXICITY, ESTROGENICITY AND
REACTIVE METABOLITES FORMATION OF BISPHENOL A-DIGLYCIDYL
METHACRYLATE**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. Meritve metabolitov z metodo LC-MS/MS je izvedel asist. dr. Jurij Trontelj, mag. farm. s Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentoriciizr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm. za pomoč, usmerjanje in strokovne nasvete pri laboratorijskem delu ter pisanju diplomske naloge ter asist. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. za opravljene meritve. Za pomoč pri diplomskem delu in nasvete se zahvaljujem tudi Anji Fic, mag. farm., ter Darji Grahek, mag. farm.

Največja zahvala gre moji družini, ki me je tekom študija podpirala in spodbujala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Mateja Kavčič

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
KAZALO SLIK.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO GRAFOV	VII
1 UVOD	1
1.1 CELIČNA LINIJA BG1Luc4E2	3
1.1.1 Razvoj celične linije	3
1.2 CITOTOKSIČNOST	4
1.3 HORMONSKI MOTILCI	5
1.3.1 Estrogenski receptor (ER) in endogeni hormoni	7
1.3.2 Ksenoestrogeni	8
1.4 METABOLIZEM	9
1.4.1 Reaktivni metaboliti.....	11
1.5 BISFENOL A-GLICIDIL METAKRILAT (BIS-GMA)	12
1.5.1 Fizikalno-kemijske lastnosti	12
1.5.2 Zgodovina in sinteza	12
1.5.3 Uporaba.....	13
1.5.4 Toksičnost	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 CELIČNA KULTURA.....	19
3.2.1 Priprava medijev in raztopin.....	20
3.2.2 Odmrzovanje celic.....	20
3.2.3 Presajanje celic v mediju RPMI	20
3.2.4 Presajanje celic v medij brez estrogena in vzdrževanje celičnih kultur.....	22
3.2.5 Štetje celic.....	22

3.3 TESTI VIABILNOSTI <i>IN VITRO</i>	23
3.3.1 Test MTS	24
3.4 METODE ZA DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i>	26
3.4.1 Metoda LUMI-CELL [®] ER.....	27
3.5 PREUČEVANJE METABOLIZMA IN NASTANKA REAKTIVNIH METABOLITOV <i>IN VITRO</i>	32
3.5.1 Metoda z uporabo humanih jetrnih mikrosomskih frakcij <i>in vitro</i>	33
3.5.2 Napoved metaboličnih reakcij Bis-GMA s programskim orodjem Meteor Nexus <i>in silico</i>	36
4 REZULTATI	38
4.1 TEST MTS	38
4.2 METODA LUMI-CELL [®] ER.....	40
4.2.1 Test iskanja območja koncentracij	40
4.2.2 Celostni test	42
4.3 REAKTIVNI METABOLITI BIS-GMA	44
4.3.1 Metoda z uporabo humanih jetrnih mikrosomskih frakcij <i>in vitro</i>	44
4.3.2 Napoved metaboličnih reakcij Bis-GMA s programom Meteor Nexus.....	50
5 RAZPRAVA.....	53
5.1 VREDNOTENJE REZULTATOV TESTA MTS	53
5.2 VREDNOTENJE REZULTATOV METODE LUMI-CELL [®] ER.....	54
5.3 VREDNOTENJE REAKTIVNIH METABOLITOV BIS-GMA.....	57
6 SKLEP	60
LITERATURA	61

POVZETEK

Bisfenol A-glicidil metakrilat (Bis-GMA) je derivat bisfenola A, ki je znan hormonski motilec. Kot monomer se uporablja predvsem v ortopediji za izdelavo kostnega cementa in v zobozdravstvu pri izdelavi kompozitnih zalivk, iz katerih pa se nepolimeriziran lahko sprošča in povzroča neželene učinke v organizmu. V diplomski nalogi smo z uporabo različnih metod *in vitro* preučevali citotoksičnost, estrogenost in nastanek reaktivnih metabolitov Bis-GMA. Citotoksičnost smo določali s testom MTS na celični liniji humanih celic rakavega jajčnika z genom za sintezo luciferaze (BG1Luc4E2), ki se inducira pod vplivom estrogenov. Na isti celični liniji smo nato pri necitotoksičnih koncentracijah preučili še agonistično estrogeno aktivnost z validirano metodo LUMI-CELL[®] ER *in vitro*. Rezultati testiranja niso potrdili agonistične estrogene aktivnosti, kar je v skladu z našimi pričakovanji, saj Bis-GMA v svoji strukturi nima prostih fenolnih skupin, ki so nujne za tako delovanje. Za potrditev te domneve predlagamo nadaljnje testiranje estrogenosti Bis-GMA z metodo LUMI-CELL[®] ER pri nizki pasaži celic oziroma z drugimi metodami *in vitro*. S študijo metabolizma *in vitro* so ugotovili, da bisfenol A in njegovi metaboliti lahko tvorijo konjugate z glutationom, zato smo preučili tudi metabolizem Bis-GMA. Za preučevanje nastanka reaktivnih metabolitov smo uporabili humane jetrne mikrosome, v katerih smo v prisotnosti NADPH in glutationa kot nukleofila z uporabo metode LC-MS/MS analizirali nastale konjugate z glutationom. Pri danih pogojih inkubacije, konjugatov ali drugih metabolitov nismo zaznali, kar bi lahko bila posledica nepopolne ionizacije oziroma neustreznih pogojev meritev pri iskanju prekuzorskega iona. S programom za napovedovanje mest metabolizma v molekulah, Meteor Nexus, smo namreč ugotovili, da ima spojina pri najstrožjih kriterijih 4 možne metabolite, med katerimi sta tudi konjugat Bis-GMA z glutationom ter metabolit z oksidirano hidroksilno skupino, ki smo ju želeli detektirati v našem poskusu. Bis-GMA torej verjetno tvori konjugat z glutationom in se veže na celične makromolekule v organizmu. Potrebne so nadaljnje študije metabolizma Bis-GMA, kjer bi odpravili razloge za neuspešno detekcijo njegovih metabolitov, da bomo lahko potrdili nastanek konjugata. Rezultati te naloge so torej dobra podlaga za nadaljnje raziskave nastanka reaktivnih metabolitov Bis-GMA.

KLJUČNE BESEDE: bisfenol A-glicidil metakrilat, estrogenost, reaktivni metaboliti, luciferaza, bisfenol A

ABSTRACT

Bisphenol A-diglycidyl methacrylate (Bis-GMA) is a derivative of bisphenol A, which is a known endocrine-disrupting chemical. As a monomer it is mostly used as bone cement in orthopedy and in dentistry for composite dental fillings, from which unpolymerized monomer can release and cause unwanted side effects in the organism. Using *in vitro* methods we studied cytotoxicity, estrogenic activity and formation of reactive metabolites of Bis-GMA. We studied cytotoxicity with the MTS assay on the ovarian carcinoma cell line, which has an estrogen receptor responsive luciferase reporter gene (BG1Luc4E2). Later on, we tested estrogen agonistic activity at noncytotoxic concentrations with a validated *in vitro* LUMI-CELL[®] ER method on the same cell line. The results did not confirm the presence of estrogen agonistic activity, which is in compliance with the structure of Bis-GMA, as it does not have free phenolic hydroxyl groups, needed for agonistic activity. We recommend further testing for estrogenic activity of Bis-GMA with LUMI-CELL[®] ER methods at low passage number of cells or with other *in vitro* methods to confirm our assumption. An *in vitro* study of metabolism shows, that bisphenol A and its metabolites can form glutathione conjugates, for this reason we also studied metabolism of Bis-GMA. For investigating formation of reactive metabolites we used human liver microsomes in presence of NADPH and GSH as a nucleophilic trapping agent, where conjugates were analyzed with the LC-MS/MS method. We did not detect any conjugates with GSH or other metabolite at given conditions, which could be a consequence of incomplete fragmentation and unsuitable scanning of precursor ion, because we could still find four probable metabolites at highest criteria with Meteor Nexus program, tool for the prediction of metabolic fate. Among the four metabolites there are also a conjugate of Bis-GMA with GSH and a metabolite with one oxidized hydroxylic group that could occur in our system. Bis-GMA can therefore probably form glutathione conjugates and bonds with cellular macromolecules in the organism. We recommend further studies of metabolism, so that reasons for unsuccessful detection of its metabolites would be removed and formation of the glutathione conjugate could be confirmed. The results of this work give a good foundation for further investigations of reactive metabolite formation of Bis-GMA.

KEY WORDS: bisphenol A-diglycidyl methacrylate, estrogenicity, reactive metabolites, luciferase, bisphenol A

SEZNAM OKRAJŠAV

Bis-GMA	bisfenol A-glicidil metakrilat
DMEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija
DMEM+	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija z dodanimi reagenti
DMSO	dimetilsulfoksid
DPBS	Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufri
E2	17 β -estradiol
ER	estrogenski receptor
ERE	estrogenski odzivni element (angl: estrogen response element)
GSH	L-glutation reduciran
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolijeva sol
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
RLU	relativna svetlobna enota (angl: relative light unit)
RPMI	medij inštituta Roswell Park Memorial
SD	standardna deviacija
T25	plastenka za gojenje celic v velikosti 25 cm ²
T75	plastenka za gojenje celic v velikosti 75 cm ²
T150	plastenka za gojenje celic v velikosti 150 cm ²

KAZALO SLIK

SLIKA 1: PLAZMID PGUDLUC7.ERE.	3
SLIKA 2: SPLOŠNE STRUKTURE FTALATOV, POLIKLORIRANIH IN POLIBROMIRANIH BIFENILOV TER NONILFENOLA, BISFENOLA A, DIETILSTILBESTROLA, DIKLORODIFENILTRIKLOROETANA, GENISTEINA IN KOUDESTROLA.	6
SLIKA 3: STRUKTURA 17 β -ESTRADIOLA Z AROMATSKIM OBROČEM A IN PROSTIMA HIDROKSILNIMA SKUPINAMA NA MESTU 3B IN 17 β	8
SLIKA 4: STRUKTURA GLUTATIONA.	10
SLIKA 5: STRUKTURA BIS-GMA.	12
SLIKA 6: PRETVORBA REAGENTA MTS V FORMAZAN POD VPLIVOM DEHIDROGENAZ V ŽIVIH CELICAH.	25
SLIKA 7: ANALIZA RAZTOPINE BIS-GMA S PRISOTNIMA GSH IN NADPH V HUMANIH JETRNIM MIKROSOMIH Z METODO LC-MS/MS. (A) IONSKI KROMATOGRAM PO SNEMANJU CELOTNEGA SPEKTRA. (B) IONSKI KROMATOGRAM EKSTRAHIRANEGA FRAGMENTA m/z 272, Z VRHOM PRI ČASU 2.642 MINUT. (C) MASNI SPEKTER PRI ČASU 2.642 MINUT.	44
SLIKA 8: ANALIZA RAZTOPINE BIS-GMA S PRISOTNIMA GSH IN NADPH V HUMANIH JETRNIM MIKROSOMIH Z METODO LC-MS/MS. (A) IONSKI KROMATOGRAM ISKANJA PREKURZORSKEGA IONA FRAGMENTA m/z 272. (B) PRIPADAJOČI MASNI SPEKTER VRHA OB ČASU 2.651 MINUT.	45
SLIKA 9: ANALIZA RAZTOPINE BIS-GMA S PRISOTNIM GSH IN BREZ NADPH V HUMANIH JETRNIM MIKROSOMIH Z METODO LC-MS/MS. (A) IONSKI KROMATOGRAM PO SNEMANJU CELOTNEGA SPEKTRA. (B) IONSKI KROMATOGRAM EKSTRAHIRANEGA FRAGMENTA m/z 272, Z VRHOM PRI ČASU 2.650 MINUT. (C) PRIPADAJOČI MASNI SPEKTER VRHA OB ČASU 2.642 MINUT.	46
SLIKA 10: ANALIZA RAZTOPINE BIS-GMA S PRISOTNIM NADPH IN BREZ GSH V HUMANIH JETRNIM MIKROSOMIH Z METODO LC-MS/MS. (A) IONSKI KROMATOGRAM PO SNEMANJU CELOTNEGA SPEKTRA. (B) IONSKI KROMATOGRAM EKSTRAHIRANEGA FRAGMENTA m/z 272.	47
SLIKA 11: ANALIZA RAZTOPINE BIS-GMA BREZ NADPH IN GSH V HUMANIH JETRNIM MIKROSOMIH Z METODO LC-MS/MS. (A) IONSKI KROMATOGRAM PO SNEMANJU CELOTNEGA SPEKTRA. (B) IONSKI KROMATOGRAM EKSTRAHIRANEGA FRAGMENTA m/z 272. (C) MASNI SPEKTER VRHA OB ČASU 1.202 MINUT.	48
SLIKA 12: ANALIZA RAZTOPINE BIS-GMA V FOSFATNEM PUFRU Z METODO LC-MS/MS. (A) IONSKI KROMATOGRAM PO SNEMANJU CELOTNEGA SPEKTRA. (B) IONSKI KROMATOGRAM EKSTRAHIRANEGA FRAGMENTA m/z 513. (C) MASNI SPEKTER VRHA OB ČASU 1.508.	49
SLIKA 13: ANALIZA STANDARDNE RAZTOPINE BIS-GMA V 50 % ACETONITRILU Z METODO LC-MS/MS V POZITIVNI IONIZACIJI. (A) IONSKI KROMATOGRAM PO SNEMANJU CELOTNEGA SPEKTRA Z VRHOM PRI ČASU 2.691. (B) MASNI SPEKTER VRHA OB ČASU 2.698.	50
SLIKA 14: S PROGRAMOM METEOR NEXUS PREDVIDENE METABOLNE PRETVORBE, KI LAHKO POTEČEJO NA MOLEKULI BIS-GMA.	51

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: VOLUMNI DODANIH SNOVI PRI RAZLIČNIH VELIKOSTIH PLASTENK, UPORABLJENIH ZA PRESAJANJE CELIC.....	21
PREGLEDNICA II: OCENA VIABILNOSTI CELIC PO TRETIRANJU Z BIS-GMA.	32
PREGLEDNICA III: NATEHTANE MASE SNOVI IN USTREZNI VOLUMNI TOPIL ZA PRIPRAVO REAGENTOV ZA IZVEDBO METODE MERJENJA REAKTIVNIH METABOLITOV BIS-GMA.....	34
PREGLEDNICA IV: VOLUMNI 10 MM RAZTOPINE BIS-GMA, 25 MM RAZTOPINE GSH, 5 MM RAZTOPINE NADPH IN SUSPENZIJE HUMANIH JETRNIH MIKROSOMOV V POSAMEZNI MIKROEPRUVETI.	35
PREGLEDNICA V: REZULTATI NAPOVEDI METABOLIČNIH REAKCIJ BIS-GMA S PROGRAMOM METEOR NEXUS OB NASTAVITVI PRIKAZA NAJVERJETNEJŠIH METABOLITOV V PRVEM NIVOJU.....	51
PREGLEDNICA VI: STRUKTURE NAJVERJETNEJŠIH METABOLITOV BIS-GMA.....	52

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: PRIKAZ 1. IZVEDBE TESTA MTS Z BIS-GMA. PRIKAZANI SO ODSOTKI \pm SD PREŽIVELIH CELIC V 8. PASAŽI CELIČNE LINIJE BG1LUC4E2, IN SICER PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI 11 RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM BIS- GMA IN PRIMERJAVA S KONTROLO, V KATERI CELICE NISO BILE IZPOSTAVLJENE DELOVANJU PREISKOVANE SPOJINE.	39
GRAF 2: PRIKAZ 2. IZVEDBE TESTA MTS Z BIS-GMA. PRIKAZANI SO ODSOTKI \pm SD PREŽIVELIH CELIC V 11. PASAŽI CELIČNE LINIJE BG1LUC4E2, IN SICER PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI 11 RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM BIS- GMA IN PRIMERJAVA S KONTROLO, V KATERI CELICE NISO BILE IZPOSTAVLJENE DELOVANJU PREISKOVANE SPOJINE.	40
GRAF 3: PRIKAZ NORMALIZIRANIH VREDNOSTI RLU PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI 18. PASAŽE CELIČNE LINIJE BG1LUC4E2 7 RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM BIS-GMA IN 4 RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM REFERENČNEGA STANDARDA E2. PRIKAZANA JE PRIMERJAVA VREDNOSTI Z MEJO INDUKCIJE, KI JO PREDSTAVLJA POVPREČNA VREDNOST KONTROLE DMSO, POVEČANA ZA 3-KRATNO VREDNOST SD (MODRA ČRTA).	41
GRAF 4: PRIKAZ NORMALIZIRANIH VREDNOSTI RLU PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI 10. PASAŽE CELIČNE LINIJE BG1LUC4E2 11 RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM BIS-GMA, 11 RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM REFERENČNEGA STANDARDA E2 IN POZITIVNI KONTROLI, GLEDE NA PRIMERJALNO VREDNOST Z MEJO INDUKCIJE, KI JO PREDSTAVLJA POVPREČNA VREDNOST KONTROLE DMSO, POVEČANA ZA 3-KRATNO VREDNOST SD (MODRA ČRTA).....	43

1 UVOD

Toksikologija je veda, ki preučuje škodljive učinke kemijskih spojin v živih organizmih (1). Njeni začetki segajo v 16. stoletje, ko je živel Paracelsus (1493–1541), ki je poudaril, da so vse kemikalije strupene in da jih med strupom in zdravilom loči le pravi odmerek. Danes je toksikologija interdisciplinarno področje in povezuje področja patologije, fiziologije, farmakologije, biokemije in kemije. Za preučevanje kemikalij v toksikologiji uporabljamo zelo občutljive in specifične analizne metode, ki se povezujejo z molekularno biologijo. Rezultate toksikoloških študij moramo primerno ovrednotiti in iz njih izluščiti mehanizem toksičnosti določene spojine, da lažje ocenimo stopnjo tveganja pri izpostavljenosti le-tej. Toksičnost spojine lahko ovrednotimo na tri načine:

- z opazovanjem človeške, živalske ali rastlinske populacije, ki je izpostavljena kemikaliji (epidemiologija);
- na način, da živalim ali rastlinam odmerimo določeno količino kemikalije in pod kontroliranimi pogoji opazujemo njene učinke (*in vivo*);
- z uporabo celičnih linij, subceličnih frakcij ali enoceličnih organizmov, izpostavljenih določeni kemikaliji (*in vitro*) (1).

Epidemiološke študije so časovno in finančno potratne, uporaba živih živali za testiranje *in vivo* pa se vedno bolj omejuje, saj so take raziskave zelo drage, v očeh javnosti pa tudi etično sporne. Zato se vedno bolj uveljavljajo alternativne metode, kjer žrtev živali ni potrebna. Ena od alternativ so metode *in vitro*, ki nadomestijo rabo živali z uporabo plesni, bakterijskih ali sesalskih celic. Prednosti metod *in vitro* so: občutljivost pri nizkih koncentracijah, specifičnost odziva, nizka cena, majhne količine uporabljenega materiala, možnost avtomatizacije in obsežnega rešetanja spojin ter združevanje z modeli QSAR (1, 2).

Da bi ugotovili, ali so alternativne metode zanesljive in primerljive s klasičnimi, so v Združenih državah Amerike (ZDA) ustanovili Medagencijski usklajevalni odbor za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) in Nacionalni toksikološki program (NTP) Medagencijskega centra za oceno alternativnih toksikoloških metod (NICEATM). Odbor po svojih kriterijih in zahtevah regulatornih organov oceni in validira nove alternativne metode, ki jih nato implementirajo v zakonodajo. V Evropi so v ta namen ustanovili Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), ki sodeluje z omenjenim

odborom v ZDA z namenom hitre izmenjave informacij o validaciji metod, medsebojnega priznavanja, odobravanja s strani regulatornih organov in izvajanja znanstveno potrjenih preskusnih alternativnih metod, ki zmanjšajo, izboljšajo in nadomestijo uporabo živali za testiranje spojin. Skupaj želijo optimizirati celoten postopek, s katerim si Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) prizadeva znanstveni skupnosti zagotoviti usklajene protokole in pospeševanje sprejemanja potrjenih alternativnih metod na mednarodni ravni (3).

Regulatorni organi sprejmejo novo alternativno metodo na podlagi naslednjih kriterijev:

- uporaba nove metode mora omogočati pridobitev podatkov, ki zadostno napovejo končno točko toksikološkega preskušanja, pri čemer mora biti vidna povezava z že obstoječo metodo ali z učinki v tarčnem organizmu;
- pridobljene podatke lahko uporabimo pri oceni tveganja in so enako ali uporabnejši od tistih, ki smo jih pridobili z že obstoječimi metodami;
- obstajati morajo zadostni podatki testiranj za tiste kemikalije in njihove produkte, ki jih je izdal regulatorni organ ali agencija (pesticidi, kozmetika);
- test mora biti robusten, prenosljiv in se da lahko standardizirati;
- test mora biti stroškovno učinkovit in normalno izvedljiv;
- nova metoda mora upravičiti znanstveno, etično in ekonomsko uporabo v primerjavi z že obstoječimi, pri tem pa je treba vzeti v premislek blaginjo živali ter preskušanje na njih nadomestiti, zmanjšati ali vsaj izboljšati (4).

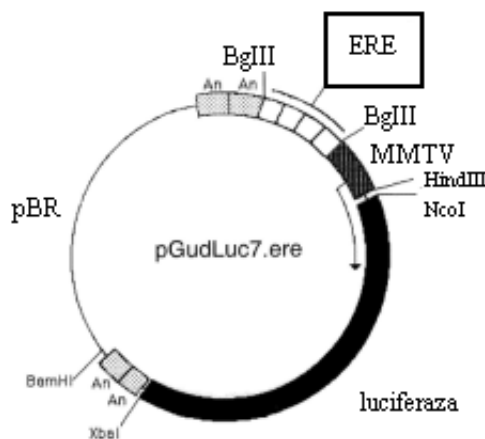
V diplomski nalogi smo za testiranje estrogenosti bisfenol A-glicidil metakrilata (Bis-GMA) uporabili metodo LUMI-CELL[®] ER, ki jo je za identifikacijo spojin z agonistično ali antagonistično aktivnostjo na estrogenskem receptorju validiral Nacionalni toksikološki program (NTP) Medagencijskega centra za oceno alternativnih toksikoloških metod (NICEATM). Medagencijski usklajevalni odbor za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) je izdal tudi priporočene protokole, po katerih smo testirali agonistično estrogeno aktivnost Bis-GMA. Leta 2012 je bila metoda LUMI-CELL[®] ER sprejeta s strani Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) za merjenje agonistične in antagonistične estrogene aktivnosti (5).

1.1 CELIČNA LINIJA BG1Luc4E2

Celična linija BG1Luc4E2 je bila razvita iz nesmrtnih celic adenokarcinoma jajčnika BG-1. Slednje endogeno izražajo obe obliki estrogenskega receptorja (ER), pri čemer je njegova alfa oblika (ER α) prisotna v višjih koncentracijah (90 %) kot beta (ER β) (10 %). Morfološko imajo celice poleg enega jedra malo do zmerno velik volumen citoplazme in izrazito mejo med sosednjimi celicami. V platenkah za gojenje rastejo v enojnem sloju in so poligonalne oblike (2, 6).

1.1.1 Razvoj celične linije

BG1Luc4E2 je linija humanih rakavih celic jajčnika, ki sta jo razvila Jane M. Rogers in Michael S. Denison leta 2000, z namenom odkrivanja spojin *in vitro*, ki motijo hormonsko ravnovesje v telesu in s tem reproduktivno zmožnost organizma. V rekombinantno celično linijo humanega rakastega jajčnika (BG-1) so s transfekcijo stabilno prenesli reporterski plazmid pGudLuc7.ERE (Slika 1) s štirimi kopijami sintetičnih oligonukleotidov, ki imajo poleg promotorja še estrogenski odzivni element (ERE) in luciferazni gen kresničke. Gen za sintezo luciferaze se inducira pod vplivom estrogenov, kar po dodatku luciferaznega substrata zaznamo v obliki emisije svetlobe (6).



Slika 1: Plazmid pGudLuc7.ERE.

Ekspresijski vektor pGudLuc7.0 je sestavljen iz fragmenta BgIII-HindIII, ki vsebuje promotor onkogenega virusa mišje mlečne žleze (MMTV) in vektor pGL3. Ta vsebuje gena za izražanje β -laktamaze (*AmpR*) in za encim luciferazo (*luc*) (Slika 1). V regiji BgIII so spojeni oligomeri 4 oligonukleotidov DNK, ki so odzivni na estrogen (ERE). Rekombinante plazmida, ki izražajo β -laktamazo in s tem odpornost na ampicilin, so izolirali v koloniji *Escherichia Coli* DH5. Stabilno transfekcijo pa so dosegli s

kotransfekcijo celic s plazmidom pSV2neo. Ta je selektivni označevalec za odpornost na gentamicinijev sulfat (G418), ki je sicer toksičen. Proliferirajo le tiste celice, ki imajo v svoj genom vgrajen označevalni gen za odpornost (6).

Celična linija BG1Luc4E2 daje pri preskušanju že znanih estrogenov (fitoestrogeni, alkilfenoli) primerljive rezultate kot druge metode *in vitro*, zato je primerna za identifikacijo novih spojin z estrogenim delovanjem ter njihovo karakterizacijo, pri čemer lahko ločimo agoniste in antagonist ER. Zaradi stabilne transfekcije lahko linijo uporabljamo za testiranje v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami, kar omogoča hitro preskušanje spojin (6).

1.2 CITOTOKSIČNOST

Citotoksičnost je zmožnost kemikalij, ki ne izvirajo iz določenih celic, da le-te poškodujejo ali povzročijo njihovo smrt. Takšne kemikalije lahko tvori imunski sistem ali pa jih vnesemo v organizem (7). Spojine lahko spremenijo samo celično strukturo in funkcijo, in sicer z vplivi na: jedro, proliferacijo, membrano, transport, mitohondrije, energijsko homeostazo, lizosome, kalcijev regulatorni sistem, tvorbo reaktivnih metabolitov in oksidativni stres ter imunski odziv (8).

Celična proliferacija je odvisna od intaktne strukture in funkcije vseh vitalnih celičnih procesov, zato je v primeru toksičnosti preskušane spojine najprej prizadeta. Morfološke spremembe na **jedru** se zgodijo zgodaj in vključujejo njegovo kondenzacijo, skrčenje in fragmentacijo. Zaviralci celičnega cikla pa lahko povzročijo nabreklost jedra ter nesorazmernost jedra in citoplazme. Preskušana spojina lahko moti energijo in ionsko ravnovesje, kar ogrozi integriteto **celične membrane**. Zaradi izgube barierne funkcije membrane, lahko celica v zunajcelični prostor spusti svojo vsebino ali pa vase sprejme snovi iz svojega okolja, kar smo izkoristili pri šteju živih celic z metodo izključitve barvila (8).

Mitohondriji so vključeni v homeostazo energije in kalcija, biosintezo, oksidativni stres in apoptozo, zato so pogosto tarča toksičnih spojin. Nepravilno delovanje mitohondrijev se odraža v spremembi potenciala mitohondrijske membrane in aktivnosti encimov oksidoreduktaz, kar smo izkoristili pri določanju obsega citotoksičnosti Bis-GMA z uporabo tetrazolijevih soli. **Oksidativni stres** je za celico škodljiv zaradi redukcije kisika v reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, zmanjšanja zalog glutationa in bioaktivacije spojin v

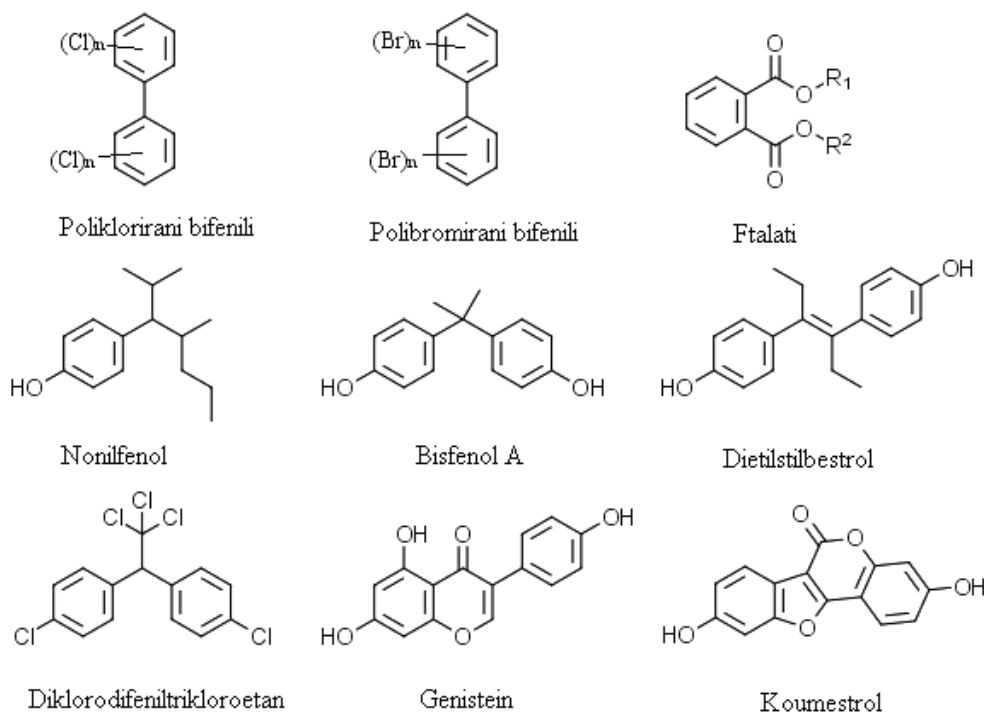
elektrofilne metabolite, ki se vežejo na celične makromolekule. Oksidativni stres je sicer posledica normalnega metabolizma in razstrupljanja spojin, zanj pa ima celica razvito antioksidantno zaščito (8).

Kationske amfifilne spojine lahko reagirajo s fosfolipazami ali fosfolipidi tako, da preprečijo njihov katabolizem v **lizosomih**, zato se fosfolipidi akumulirajo v tkivih. Organske baze pa povzročijo nabrekanje lizosomov. **Kalcij** je udeležen v uravnavanju sekrecije, krčenja, metabolizma, genske transkripcije, apoptoze in celične smrti. Motnja ravnotežja kalcijevih ionov v zunajceličnem in znotrajceličnem prostoru vodi v nepravilno delovanje prej naštetih funkcij, aktivacijo degenerativnih encimov in do celične izgube. Različne spojine lahko motijo koncentracijo kalcija tudi preko interakcije s kalcijevimi kanali in črpalkami (8).

Toksični učinki lahko povzročijo tudi celično smrt, ki poteče po mehanizmu apoptoze ali nekroze. Apoptoza je programirana celična smrt, ki je med normalnim razvojem in delovanjem organizma odgovorna za odstranitev neželenih oziroma odvečnih in neuporabnih celic. Pojavi se tudi v primeru nepovratno poškodovanih celic, okuženih z virusi ali pod vplivom stresnih dejavnikov. Nekroza je alternativni mehanizem celične smrti, ki se izvaja po okužbi, izpostavitvi strupom ali travmi (9).

1.3 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci so eksogene snovi, ki povzročajo neželene učinke v organizmu, saj lahko motijo reproduktivni razvoj in funkcijo, stimulirajo rast rakavih celic ter povzročijo nepravilno delovanje živčnega in imunskega sistema (10). Sodelujejo tudi pri samem nastanku raka, diabetesa, debelosti, metaboličnega sindroma in neplodnosti. Mednje sodijo tako sintezne kemikalije, kot so poliklorirani in polibromirani bifenili, ftalati, alkilfenoli (nonilfenol), bisfenol A, dietilstilbestrol, pesticidi (diklorodifeniltrikloroetan) kot naravne spojine (genistein in koumestrol) (Slika 2). Hormonski motilci so prisotni tudi v nekaterih topilih, čistilnih sredstvih, osveževalcih zraka, barvah za lase, kozmetičnih proizvodih in kremah za sončenje (UV filtri) (10, 11).



Slika 2: Splošne strukture ftalatov, polikloriranih in polibromiranih bifenilov ter nonilfenola, bisfenola A, dietilstilbestrola, diklorodifeniltrikloroetana, genisteina in koumestrola.

Delujejo lahko estrogeno, antiestrogeno, androgeno, antiandrogeno, motijo delovanje ščitnice in kortikoidnega sistema ter metabolizem. Njihovo delovanje lahko poteka preko:

- klasičnih jedrnih receptorjev (genomska pot);
- nejedrnih steroidnih receptorjev (negenomska pot);
- nesteroidnih receptorjev (receptorji nevrotansmitorjev);
- receptorjev z neznanimi endogenimi ligandi;
- interakcij z encimi, ki so vključeni v sintezo in metabolizem endogenih hormonov;
- interakcij s tarčami v citosolu;
- vpliva na povezave med signalnimi potmi (angl: cross talk) med genomsko in negenomsko potjo ter med receptorjem (na katerega se vežejo) in ER;
- motnje povratne regulacije in neuroendokrinih celic;
- motnje v delovanju delitvenega vretena;
- spremembe v metilaciji DNK in zgradbi histonov (11).

Hormonsko aktivnost motijo najpogosteje preko vezave na receptor, kjer delujejo agonistično ali antagonistično. Agonisti hormonskih receptorjev so spojine, ki se vežejo nanje in jih aktivirajo, antagonisti pa po vezavi njihovo aktivnost zavirajo, ker preprečujejo vezavo endogenih hormonov. Ksenogeni agonisti so strukturno podobni endogenim

hormonom, zato se lahko vežejo na določen hormonski receptor. Večina se jih veže na jedrne receptorje, med katere spadajo estrogenski, progesteronski, androgenski in tiroidni (7, 10).

1.3.1 Estrogenski receptor (ER) in endogeni hormoni

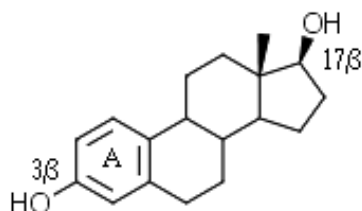
Med fiziološkimi estrogeni, ki se vežejo na ER, najdemo 17β -estradiol (E2), estron (E1), estriol (E3), ki se večinoma sintetizirajo v jajčniku in modih in so odgovorni za reproduktivni sistem, metabolizem, strukturo kosti, kardiovaskularne funkcije, obnašanje ter normalno funkcijo in biosintezo živčnih celic. Estron je pri ženskah povišan v obdobju po menopavzi. Med nosečnostjo pa najdemo povišane koncentracije estriola in tudi estetrola (E4), ki se sintetizira v jetrih zarodka. Estrogeni lahko vplivajo tudi na obzobna tkiva, saj naj bi bilo med nosečnostjo vnetje obzobnih tkiv bolj pogosto in resno, pogostejše pa naj bi bile tudi krvavitve pri ščetkanju zob. Povečano delovanje estrogenov lahko vodi v nastanek raka v tkivih, odzivnih na estrogene (npr. rak na dojkah in maternici) (12, 13, 14).

E2 je glavni steroidni hormon, ki uravnava razvoj in funkcijo reproduktivnih organov, razvoj sekundarnih spolnih znakov, spolno obnašanje, strukturo kosti, kostno remodelacijo, delovanje kardiovaskularnega sistema, vnetje, regulacijo ekspresije hipotalamusa in sproščanje gonadoliberina pri sesalcih. Gonadoliberin nadzoruje sproščanje luteinizirajočega hormona (LH) in folikle spodbujajočega hormona (FSH), ki sta odgovorna za sintezo in izločanje estrogena. Visoka koncentracija estrogena v krvi zmanjša sproščanje gonadoliberina iz hipotalamusa, kar predstavlja negativno povratno zvezo. Estrogen se pri ženskah v glavnem tvori v jajčnem foliklu, jajčniku in posteljici, v manjši meri pa tudi v jetrih, adrenalnih in mlečnih žlezah. Pri moških pa E2 prispeva k diferenciaciji in funkciji Leydigovih celic ter razvoju mod (10).

E2 uravnava celične funkcije preko specifičnih znotrajceličnih odzivov. Največkrat se veže na jedrni (genomska pot) ali membranski ER (negenomska pot). Ločimo dve vrsti ER, in sicer $ER\alpha$ in $ER\beta$, ki sta različno porazdeljena po tkivih. Prvi je v najvišji koncentraciji prisoten v maternici in mlečnih žlezah, drugi pa v jajčniku in prostati. Po vezavi ligandov lahko različno vplivata na transkripcijo določenega gena. Jedrni ER ($ER\alpha$ in $ER\beta$) se nahajajo v znotrajceličnem prostoru, membranski ($mER\alpha$, $mER\beta$ in GPR30) pa v membrani celice. Po vezavi E2 na jedrni ER pride do spremembe konformacije. Tvorijo se dimeri ER, ki se nato vežejo s kofaktorji, koaktivatorji in korepresorji, ti kompleksi pa nato

reagirajo z *ERE* v regiji promotorja, kar sproži ali zavre izražanje tarčnih genov. Membranski ER so pomembni za modulacijo celične funkcije preko negenomskih poti, pri čemer se aktivirajo sekundarni prenašalci, ki signal prenesejo naprej in aktivirajo transkripcijo. Jedrni ER potrebuje po vezavi liganda za transkripcijsko aktivacijo nekaj ur, membranski pa le nekaj minut (10).

Za vezavo na ER in estrogeno delovanje sta ključna aromatski obroč A in hidroksilna skupina C3, k aktivnosti pa prispevajo tudi prosta hidroksilna skupina 17 β , razdalja med hidroksilnima skupinama C3 in C17 ter prisotnost planarnega hidrofobnega skeleta. E2 je aromatski steroid z 18 ogljikovimi atomi, ki vsebuje na mestih 3 β in 17 β prosti hidroksilni skupini (Slika 3) (15).



Slika 3: Struktura 17 β -estradiola z aromatskim obročem A in prostima hidroksilnima skupinama na mestu 3 β in 17 β .

1.3.2 Ksenoestrogeni

Ksenoestrogeni so spojine, ki preko različnih signalnih mehanizmov oponašajo ali pa preprečujejo učinke endogenih estrogenov. Estrogenu aktivnost take spojine večinoma dosežejo z vezavo na jedrne in membranske ER. Ksenoestrogeni po vezavi na ER delujejo agonistično (estrogeno) ali antagonistično (antiestrogeno) ter tako spremenijo transkripcijske signalne poti, to pa povzroči spremembe v hormonskem ravnovesju, delovanju reproduktivnega sistema ter druge fiziološke ali patološke učinke. Z raziskavami so namreč ugotovili, da lahko povzročijo pospešen razvoj spolnih znakov, izpad ovulacije, zmanjšano stimulacijo izločanja luteinizirajočega hormona, feminizacijo, spremenijo lahko hormonske cikle in inducirajo nastanek in razvoj raka dojke. Estrogene spojine se lahko vežejo tudi na receptorje, ki so sorodni ER (ERR α , ERR β in ERR γ). Ti sicer nimajo endogenega liganda (estrogen), a se kljub temu vežejo na *ERE*. Estrogenu delovanje spojin lahko poteče tudi po drugih mehanizmih (glej poglavje 1.3), ki vodijo v spremenjeno gensko ekspresijo ali pa vplivajo na koncentracije encimov, ki so udeleženi v sintezi steroidnih hormonov (7, 11, 12).

Med steroidnimi receptorji je ER najbolj dovzeten za agonistično delovanje hormonskih motilcev. Agonisti ER so si po strukturi dokaj različni, a morajo za delovanje imeti določeno strukturo, ki lahko sede v žep ER in se nanj veže. Študije odnosa med strukturo in delovanjem na ER kažejo, da morajo ksenoestrogeni za selektivno in visoko afinitetno vezavo imeti fenolni obroč A ter na določeni razdalji še drugo hidroksilno skupino. Bisfenol A je tipičen primer spojine z dvema fenolnima obročema, ki deluje estrogeno. Sprememba v konformaciji receptorja je odvisna od funkcije liganda, kar vpliva na različno gensko ekspresijo. Endogeni ligandi imajo po vezavi na receptor lahko drugačen vpliv na gensko ekspresijo kot ksenobiotiki. Veliko estrogenih snovi se na ER veže s 1000-krat manjšo afiniteto kot estrogen, kljub temu pa lahko povzročajo neželene učinke tudi pri zelo nizkih koncentracijah (7, 11, 13).

1.4 METABOLIZEM

Fiziološka vloga metabolizma je presnova lipofilnih, telesu nelastnih snovi, v bolj vodotopne derivate, ki so manj toksični in se hitreje izločijo iz organizma. Glavno mesto metabolizma so jetra, ki so izpostavljena raznim spojinam takoj po njihovi absorpciji iz gastrointestinalnega trakta. Metabolizem spojin katalizirajo številni encimi, ki so lahko specifični za določen endogeni substrat, niso pa vedno specifični za tuje spojine. Encimi, ki so vključeni v biotransformacijo spojin, se v najvišjih koncentracijah v celicah nahajajo v endoplazmatskem retikulumu, prisotni pa so tudi v citosolu in mitohondrijih. Metabolizem povzroči fizikalno-kemijske in biološke spremembe spojin, skrajša njihovo biološko razpolovno dobo in čas izpostavitve, prepreči njihovo akumulacijo, spremeni pa lahko tudi njihove biološke aktivnosti. V kateri smeri in v kakšnem obsegu bo metabolizem potekal, je najbolj odvisno od strukture in fizikalno-kemijskih lastnosti spojine ter encimov, ki so prisotni v njeni bližnji okolici. Metabolizem običajno poteka v dveh fazah. V prvi se najprej tvori nova funkcionalna skupina, v drugi pa se nanjo ali pa na predhodno že obstoječo skupino konjugira endogeno prisotna spojina (1, 16).

Faza I

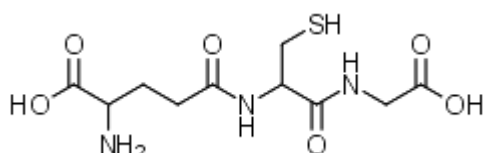
V prvi fazi se spojinu doda funkcionalna skupina, v kolikor ta še ni prisotna. Glavne vrste reakcij, ki tu potekajo, so oksidacije, redukcije in hidrolize. Oksidacija lahko poteče v prisotnosti encimov iz družine citokrom P450, alkoholne dehidrogenaze, ksantinske oksidaze, mikrosomske aminske oksidaze, aminske in diaminske oksidaze ter peroksidaze.

Večino oksidativnih reakcij katalizirajo mikrosomski encimi citokrom P450 monooksidaze, ki so večinoma v jetrih, kjer so za potek oksidacije potrebni NADPH, kisik, magnezij in NADPH citokromna P450 reduktaza. Slednja na monooksidazo prenese 2 elektrona. Monooksidaze najlažje metabolizirajo bolj lipofilne snovi. Mikrosomski encimi katalizirajo aromatsko in alifatsko hidroksilacijo, N-, S- in O-dealkiliranje, N-oksidacijo in hidroksilacijo, S-oksidacijo, desulfatiranje, deaminiranje in dehalogeniranje (1, 16).

Encimi reduktaze, ki reducirajo azo in nitro spojine, so prisotni v mikrosomski in topni celični frakciji. Najpomembnejše so citokrom P450 in citokromne P450 NADPH reduktaze. Pomembno vlogo pri redukcijah imajo tudi encimi gastrointestinalnih bakterij. Redukcije potekajo tudi na aldehydih in keto skupinah, epoksidih ter dvojnih vezeh. Hidroliza lahko poteče na estrih, amidih, hidrazidih in karbamatih, in sicer v prisotnosti esteraz ali amidaz, ki se ponavadi nahajajo v citosolu celic, v manjši meri pa v mikrosomski frakciji in v plazmi (1).

Faza II

Pri reakcijah konjugacije se na funkcionalno skupino metabolizirane molekule veže endogeno prisotna snov, ki je navadno polarna. Konjugirajo se lahko metilne in acetilne skupine, glukuronska kislina, aminokislina, sulfat in glutation (GSH). Z izjemo metilacije in acetilacije, konjugacija poveča hidrofilnost molekule, kar pospeši izločanje spojine iz organizma. Glutation je tripeptid, ki ga sestavljajo glutaminska kislina, cistein in glicin (Slika 4). V telesu je prisoten v visokih koncentracijah, največ pa ga je v jetrih. Najdemo ga v citosolu, mitohondrijih in v celičnih jedrih. Je ena izmed najpomembnejših molekul pri razstrupljanju spojin, saj ima reaktivno nukleofilno sulfhidrilno skupino, ki reagira z elektrofilnimi skupinami spojine, z njenimi reaktivnimi metaboliti ali z radikali. Substrati so navadno aromatske ali heterociklične spojine, aliciklični in alifatski epoksidi, aromatski halogeni ter nitro in nenasičene alifatske spojine (1).



Slika 4: Struktura glutationa.

1.4.1 Reaktivni metaboliti

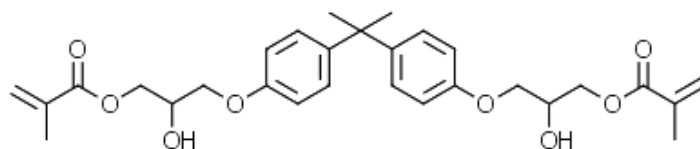
Med metabolizmom se spojina navadno razstrupi in izgubi farmakološke ter biološke učinke. Včasih pa se spojine v procesu bioaktivacije pretvorijo v toksične reaktivne metabolite, ki z vezavo na celične makromolekule (proteini, lipidi in nukleinske kisline) povzročijo nepravilno delovanje proteinov in mitohondrijev, lipidno peroksidacijo, poškodbe DNK in oksidativni stres. Vse to lahko vodi v celično smrt in celo odpoved jeter. Pretvorba neaktivnih kemikalij v reaktivne metabolite se imenuje metabolna aktivacija ali bioaktivacija. Najpogosteje so v tvorbo reaktivnih metabolitov vpleteni encimi oksidacije, med katerimi so najaktivnejše citokromne P450 monooksidaze, manj pogosto pa peroksidaze, monoaminske oksidaze in flavinske monooksigenaze. Reaktivni metaboliti se po bioaktivaciji lahko kovalentno vežejo tudi na bioaktivacijski encim in ga tako inaktivirajo. Skupine, ki se pogosteje bioaktivirajo, so alkil halidi, arilamini, aromatske nitro spojine, hidrazini, kinoni, Michaelovi akceptorji, epoksidi, furani, tiofeni, izocianati, acetileni in metilendioksifeni (7, 17, 18).

Reaktivne metabolite delimo na elektrofile in radikale. Radikali, ki imajo nesparjen elektron, molekulam odvzamejo vodikov atom, kar ustvari nov radikal in začetek verižne reakcije. Tako škodijo membranam, DNK in drugim makromolekulam. Večina reaktivnih metabolitov je elektrofilov, ki reagirajo z nukleofili. Elektrofilni so reaktivni, saj vsebujejo en elektron premalo in imajo v elektrofilnem centru bodisi visoko (trdi elektrofilni) ali nizko gostoto pozitivnega naboja (mehki elektrofilni). Med mehke elektrofile spadajo kinoni, Michaelovi akceptorji, epoksidi, aren oksidi, nitrenijevi ioni in alkil halidi, ki lahko reagirajo z mehкими nukleofili, kot so npr. sulfhidrilne skupine cisteinskih ostankov na proteinih. Trdi elektrofilni so imini in aldehidi, ki lažje reagirajo s trdimi nukleofili (DNK). Elektrofilni metaboliti se lahko tvorijo v obeh fazah metabolizma, po vezavi na nukleofilna mesta celičnih makromolekul (proteini, polipeptidi, RNK in DNK) pa lahko povzročijo mutagenozo, karcinogenozo ali celično nekrozo (7, 17, 18).

1.5 BISFENOL A-GLICIDIL METAKRILAT (BIS-GMA)

1.5.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Bisfenol A-glicidil metakrilat (Bis-GMA) (Slika 5) je gosta, lepljiva umetna smola v barvi zob. Strukturno je monomer z molekulsko maso 512.6 g/mol in formulo $C_{29}H_{36}O_8$. Njegovo IUPAC ime je [2-hidroksi-3-[4-[2-[4-[2-hidroksi-3-(2-metilprop-2-enoiloksi)propoksi]fenil]propan-2-il]fenoksi]propil]2-metilprop-2-enoat. Je zelo lipofilna spojina z vrednostjo logP 5.1. Zgrajen je iz dveh benzenovih obročev, ki sta ločena s centralnim ogljikovim atomom in imata na para mestih hidroksilni skupini, ki sta zaetreni z glicidil metakrilatom. Slednji vsebuje estrsko skupino in dvojno vez (19).



Slika 5: Struktura Bis-GMA.

Bis-GMA ima pri sobni temperaturi visoko dinamično viskoznost (od 700 do 1300 Pa·s). Ta je posledica razmeroma močnih vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami, ki pa so samo medmolekulske zaradi togosti aromatske strukture v centru molekule. Bis-GMA lahko tvori polimere, in sicer se tekom polimerizacije tvorijo reakcije na dvojnih vezeh v obeh metakrilatnih skupinah bifunkcionalnega Bis-GMA, kar omogoča dodatno premreženje monomera. Stopnja pretvorbe pomeni število dvojnih vezi, ki sodelujejo pri polimerizaciji. Pri dimetakrilatih je stopnja pretvorbe od 55 % do 75 %. Ker so monomeri bifunkcionalni, pa 75 % pretvorba ne pomeni, da ostane 25 % monomera nezreagirane, ampak je približno 94 % monomerov polimeriziranih vsaj z eno funkcionalno skupino (20, 21, 22).

1.5.2 Zgodovina in sinteza

Bis-GMA je prvi sintetiziral Rafael L. Bowen zaradi slabe izbire materialov za izdelavo zobnih zalivk. Z novim materialom je želel doseči njegovo manjšo topnost v ustni slini, majhno krčljivost, boljšo stabilnost, stisljivost in trdoto. Bis-GMA je monomer, ki pod vplivom ultravijoličnih žarkov polimerizira in med seboj poveže obdelane silikonske delce v želen zobni material. V materialu je masni delež polimeriziranega Bis-GMA navadno 30 %. Bowen je v patentu, objavljenem leta 1962, navedel tri možne poti sinteze Bis-GMA. Pri prvi metakrilna kislina ali akrilna kislina reagira z diglicidiletrom bisfenola v

prisotnosti terciarnega amina, ki je katalizator reakcije. Reakcija se vzdržuje pri 60 °C do porabe reagentov. Kot drugo možno sintezo Bowen predlaga kondenzacijo natrijeve soli bisfenola A z ekvivalentno količino produkta med glicidil metakrilatom ali glicidil akrilatom in brezvodno klorovodikovo kislino, kjer se na koncu s čiščenjem produkta odstrani natrijev klorid. Tretja možnost sinteze je, da glicidil metakrilat reagira z bisfenolom A v prisotnosti terciarnega amina, ki katalizira reakcijo med hidroksilnimi skupinami fenola in epoksidnimi skupinami. Med reakcijo je potrebno mešanje pri 60 °C v dušikovi atmosferi. Slabost druge in tretje sinteze je, da v primeru nedokončane reakcije bisfenol A ostane v produktu kot nečistota (23).

Bisfenol A

Kot smo že omenili, je Bis-GMA derivat bisfenola A, ki je del dveh možnih sinteznih poti. Bisfenol A se uporablja kot plastifikator pri izdelavi epoksi smol in polikarbonatne plastike. Deluje šibko estrogeno, zato je bila z evropsko direktivo leta 2011 prepovedana njegova uporaba pri izdelavi stekleničk za dojenčke. Izpostavljenost bisfenolu A med perinatalnim obdobjem lahko povzroči nerazvitost moških ali ženskih genitalij, zmanjšano plodnost ter pojav raka na dojkah, jajčnikih in prostati. Promovira tudi celično proliferacijo, spreminja koncentracijo prolaktina ter poveča težo maternice pri glodalcih. Preko placentne in popkovnične krvi pa se lahko prenese do zarodka in spremeni postnatalni razvoj ter spolno dozorelost že pri nizkih koncentracijah. Njegova vezavna afiniteta za ER je 1.000-krat manjša od 17β -estradiolove. S študijo njegovega metabolizma *in vitro* so ugotovili, da tvori reaktivne metabolite. Po inkubaciji z mikrosomi namreč nastanejo konjugat z GSH, hidroksilirani metaboliti in drugi elektrofilni, ki se konjugirajo z GSH (10, 24).

1.5.3 Uporaba

Zobozdravstvo

Bis-GMA je po izgledu podobne barve kot zob, zato je zaradi estetskih razlogov zelo zaželen zobozdravstveni material. Kompoziti z Bis-GMA se uporabljajo za izdelavo zalivk sprednjih in zadnjih zob, začasnih kron in mostičkov, za polnjenje brazd na žvečni ploskvi zoba, obnovo zobne krone, za pritrjanje fiksne ortodontske aparata in kot polnilo koreninskega kanala pri zdravljenju korenine zoba. Omogoča izdelavo kompozitnih zalivk brez živega srebra, vendar so te dražje in manj obstojne od amalgamskih. Sestavljene so iz organskega matriksa, ustreznega katalizatorja, anorganskih polnil (zdrobljeni delci

kremena, borovega silikata ali amorfnega SiO₂) in spojivene snovi (silani). Organski matriks sestavljajo monomeri (Bis-GMA), komonomeri, ki zmanjšajo viskoznost matriksa, iniciatorji, ki sprožijo strjevanje, ter stabilizatorji in drugi dodatki (pigmenti, protimikrobna sredstva). Polimerizacija poteče pod vplivom svetlobe v prisotnosti fotoiniciatorja in alifatskega amina (21).

Ortopedija

Bis-GMA so po uspešni rabi v zobozdravstvu začeli uvajati tudi v ortopedijo. Kompoziti iz Bis-GMA se uporabljajo kot kostni cement za polnjenje špranj v kostnini, pri rekonstrukciji lobanje, za popravila defektov čelnice, pri stabilizaciji prostetikov, kot pritrjevalci za vijake in ploščice v osteoporotično kost, za biomimetično mineralizacijo in 3D tiskanje kompozitnega skeleta ter pri vertebralni avgmentaciji. Kompoziti Bis-GMA so v ortopediji cenjeni zaradi manj proizvedene toplote med njihovo polimerizacijo, večje moči, boljše vezave na kost (boljša biokompatibilnost) ter večje kemijske odpornosti, v primerjavi s prej uporabljenimi materiali. Tudi tu dodajajo komonomere in silikatne delce za ustrežnejšo viskoznost, dodajajo pa še steklokeramične delce, ki omogočajo boljšo adhezijo na kost ter barijevo boroaluminosilikatno steklo za moč in nepropustnost za rentgenske žarke (22, 25, 26, 27).

Kozmetična industrija

Kompoziti z uretanskimi derivati Bis-GMA se uporabljajo v kozmetični industriji, in sicer za izdelavo konic umetnih nohtov in laka za nohte, ki le-te podaljša, okrepi in zaščiti. Pri postopku izdelave pod vplivom ultravijolične svetlobe poteče fotopolimerizacija. Z dodatnimi polimeri in fotoiniciatorji pa dosežejo ustrezno visoko viskoznost za lažji nanos (28).

1.5.4 Toksičnost

Toksičnost Bis-GMA lahko izhaja že iz izbrane sintezne poti. Pri prej omenjeni prvi sintezni poti lahko ostanki diglicidiletra bisfenola povzročajo alergične reakcije. Pri drugi in tretji poti pa lahko zaostali bisfenol A deluje estrogeno, glicidil metakrilat pa povzroča alergije. Količina bisfenola A, ki se lahko pojavi kot nečistota v posamezni zalivki, je sicer večinoma prenizka, da bi povzročala neželene učinke v reproduktivnem traktu, vendar so za potrditev tega potrebne dolgoročne študije. Tudi Bis-GMA lahko deluje alergeno, saj so znani primeri anafilaktičnega šoka, urtikarije, kožnih izpuščajev, astme, otekanja zgornje ustnice, srbenja in težav s požiranjem. Do alergijskih reakcij prihaja tudi med

zobozdravstvenim osebjem, ki morajo zato namesto rokavic iz lateksa nositi neoprenske rokavice (21, 29).

Raziskave kažejo, da se lahko nepolimerizirani monomeri sproščajo iz smolnatih kompozitov, če jih izpostavimo hidrofilnemu (fiziološka raztopina), hidrofobnemu (etanol, DMSO) ali mešanemu mediju (75 % etanola in 25 % vode). Bis-GMA se v vodnem mediju sprosti v obsegu od 0.03 % do 0.07 % glede na originalno težo, v organskem topilu (etanol) pa od 0.4 % do 1.5 %. Sproščena spojina lahko po absorpciji neposredno povzroča neželene učinke v organizmu. Dimetakrilati, njihovi izvlečki iz kompozitov in eluati iz materialov z zmanjšano stopnjo pretvorbe so namreč znani po svoji citotoksičnosti. Količina Bis-GMA, ki se sicer prenese iz gastrointestinalnega trakta do mesta delovanja, pa ni znana (13, 21).

Citotoksičnost Bis-GMA so določali tudi na drugih celičnih linijah. Yoshii je na celični liniji HeLa S3 (klonirani derivati rakavih celic materničnega vratu) s testom MTS po 24-urni izpostavitvi določal citotoksičnost monomerov, ki se uporabljajo v kompozitnih zalivkah. Pri tem je Bis-GMA izkazal najnižjo koncentracijo, ki povzroči 50 % zaviranje danega parametra, npr. celične rasti (IC_{50} 0.03 mM), in je bil v primerjavi z drugimi monomeri najbolj citotoksičen, kar naj bi bilo povezano z njegovo visoko lipofilnostjo (30). Možen mehanizem citotoksičnosti zaradi visoke lipofilnosti bi bila lahko sprememba lipidnega dvosloja v celični membrani, kar vpliva na njeno prepustnost (31). Yano in sodelavci so testirali citotoksičnost Bis-GMA na celicah LSC2 (humane celice zobne pulpe), in sicer pri koncentracijah 0.01, 0.02, 0.03, in 0.04 mM po 48-urni izpostavitvi. Pri tem je Bis-GMA po barvanju celic s Hoechstovim barvilom razen pri prvi koncentraciji izkazal statistično značilno zmanjšanje deleža preživelih celic. Pri koncentraciji 0.04 mM pa je izzval tudi fragmentacijo jedra in apoptozo celic (32). Engelmann in sodelavci so poleg citotoksičnosti določali tudi vpliv Bis-GMA na znotrajcelične koncentracije GSH in obseg apoptoze v humanih gingivalnih fibroblastih. Preskušali so koncentracije od 0.001 do 0.25 mM. Po 24-urni inkubaciji pri koncentracijah od 0.001 do 0.025 mM ni značilno zmanjšal števila celic, pri 0,05 mM (89 %) ter 0.1 in 0.25 mM (50 %) pa je bil citotoksičen. Pri koncentracijah od 0.001 do 0.05 mM ni povzročil apoptoze celic, pri koncentraciji 0.1 mM pa je že povečal delež apoptotičnih celic na 50 %. Pri koncentracijah 0.1 in 0.25 mM je statistično značilno znižal tudi znotrajcelične koncentracije GSH (33).

2 NAMEN DELA

Bisfenol A-glicidil metakrilat (Bis-GMA) je monomer, ki se največ uporablja v zobozdravstvu za tvorbo polimeriziranega matriksa pri izdelavi kompozitnih zalivk. Raziskave kažejo, da se lahko v obliki nepolimeriziranega monomera sprošča iz kompozita in povzroča neželene učinke v organizmu. Uporablja se tudi v ortopediji, kjer prihaja v stik s kostmi. V tej diplomski nalogi se bomo osredotočili predvsem na toksikološki vidik varnosti Bis-GMA, ki jo bomo opredelili s študijami citotoksičnosti, estrogenosti in reaktivnih metabolitov.

Najprej bomo preučili citotoksičnost s testom MTS na celični liniji BG1Luc4E2 *in vitro*, s čimer bomo določili citotoksične koncentracije, ki jih bomo izločili iz analize rezultatov po testiranju estrogenosti Bis-GMA. Celice bomo v ta namen za 24 ur izpostavili enajstim različnim koncentracijam testirane spojine, dodali reagent MTS in z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbanco barvila, ki nastane le v metabolično aktivnih celicah.

Na isti celični liniji bomo pri necitotoksičnih koncentracijah Bis-GMA preučili potencialno estrogeno aktivnost s testno metodo LUMI-CELL[®] ER in ugotavljali, ali spojina kot derivat bisfenola A izkazuje agonistično estrogeno aktivnost. BG1Luc4E2 je namreč linija humanih celic rakavega jajčnika, ki vsebuje plazmid z reporterskim genom (*luc*). Ta v primeru estrogenosti preskušane spojine sproži nastajanje encima luciferaza. Aktivnost nastalega encima se po dodatku luciferaznega reagenta odraža z emisijo svetlobe, ki jo bomo izmerili z luminometrom.

Z metodo *in vitro* z uporabo humanih jetrnih mikrosomov pa bomo preučili, ali po inkubaciji Bis-GMA z glutationom v prisotnosti NADPH le-ta tvori reaktivne metabolite oziroma konjugate z glutationom, ki jih bomo analizirali z metodo LC-MS/MS. Rezultate bomo primerjali z metaboliti, ki jih bomo predvideli *in silico*, s programom Meteor Nexus.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Reagenti

- 17 β -estradiol (E2), Sigma;
- acetonitril za HPLC, Merck;
- bidestilirana voda (Milli-Q voda), proizvedena z Milli Q in Q-POD, Millipore;
- bisfenol A-glicidil metakrilat, Sigma Aldrich;
- celice BG1Luc4E2, Michael S. Denison, Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis;
- Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija (DMEM), Gibco;
- dimetilsulfoksid (DMSO) 100 %, Sigma;
- Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (DPBS), Gibco;
- fetusni goveji serum (FBS), Gibco;
- fetusni goveji serum z nizko vsebnostjo hormonov (FBS-CS), Biological industries;
- gentamicinjev sulfat (G418), Biological industries;
- L-glutation reduciran, Sigma-Aldrich;
- Hanksova uravnotežena raztopina soli (HBSS) 1x, Gibco;
- humani jetrni mikrosomi, Sigma;
- KH₂PO₄, Merck;
- L-glutamin, Sigma;
- liofiliziran luciferazni substrat, Promega;
- luciferazni pufer, Promega;
- MgCl₂, Sigma-Aldrich;
- metoksiklor, Sigma;
- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), Sigma Aldrich;
- NaOH, Merck;
- natrijev piruvat, Invitrogen;
- penicilin 5000 I.U. streptomycin 5 mg/mL raztopina, Sigma;
- reagent 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (MTS), Promega;
- reporter lizirajoči pufer 5x, Promega;

- medij inštituta Roswell Park Memorial (RPMI) 1640, Sigma;
- raztopina tripsanskega modrega 0.4 %, Life Technologies;
- tripsin 10x, Gibco.

Oprema

- Večkanalna pipeta e300 10-300 μ L, Biohit;
- pipete 2-20 μ L, 100-1000 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L, GILSON;
- pipete 0.5-10 μ L, 100-1000 μ L, Biohit;
- centrifugirke 15 in 50 mL, TPP;
- serološke pipete 5, 10, 25 in 50 mL, TPP;
- mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami, TPP;
- platenka za gojenje celic v velikosti 25 cm², 75 cm² in 150 cm² (T25, T75, T150), TPP;
- velika pipeta Midiplus, Biohit;
- viala, Agilent Technologies;
- mikropruvete LPE 200 μ L in epruvetke LPE 1.5 mL, Plastibrand.

Aparature

- Komora LAF, Iskra Pio;
- inkubator Incusafe, Sanyo;
- invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41, Olympus;
- hemocitometer;
- vibracijski stresalnik Combi spin, Biosan;
- vibracijski stresalnik Vibromix 10, Tehnica;
- centrifuga;
- analitska tehtnica, Mettler Toledo;
- hladilnik, Gorenje;
- zamrzovalnik, Gorenje;
- spektrofotometer Safire², TECAN;
- program Magellan, TECAN;
- luminometer Synergy N4 Hybrid Reader, Biotek;
- avtomatični števec celic Countess automated cell counter, Invitrogen;
- centrifuga Centrifuge 5415 R, Eppendorf;

- stresalnik VORTEMP 56, Labnet;
- program Meteor Nexus 1.5.1, Lhasa;
- trojni kvadrupolni masni spektrometer Agilent 6460, sklopljen z UPLC Agilent 1290 Infinity, program MassHunter Workstation B.03.01, Agilent Technologies.

3.2 CELIČNA KULTURA

BG1Luc4E2 je linija humanih celic rakavega jajčnika, ki vsebujejo plazmid z reporterskim genom (*luc*). V primeru estrogenosti testirane spojine ta gen omogoča nastajanje encima luciferaza. Ta celična linija je najbolj uporabna na začetku testiranja spojin, saj hitro opredeli snov glede na njeno estrogenost. Dopuščala naj bi možnost 30 pasaž, ne da bi se zmanjšala njena aktivnost (5). Pasaža celic pomeni presaditev celic iz ene celične kulture v drugo in omogoča njihovo rast v določenih pogojih gojenja skozi daljša obdobja. Celice BG-1 rastejo v enojnem sloju v platenkah za gojenje pri $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $90\% \pm 5\%$ vlažnosti in $5\% \pm 1\%$ atmosferi CO_2 (standardni pogoji gojenja).

Princip gojenja celic

Celice BG1Luc4E2 smo dobili shranjene v 2 mL kriovialah v tekočem dušiku. Začetno kulturo smo ob prejetju celic označili s +1, po vsakem presajanju pa smo številko pasaže povečali za 1. Celice smo gojili v aseptičnem okolju, za to smo pri delu z njimi ter pripravljanju medijev in raztopin uporabljali brezprašno komoro z laminarnim pretokom zraka (komora LAF), rokavice ter sterilizirano opremo. Celice smo najprej odmrznili, jih odpipetirali v hranilni medij RPMI z dodanimi rastnimi dejavniki in prenesli v plastenko T25. Celične kulture smo prenesli v inkubator s 37 °C in $5\% \text{ CO}_2$ v zraku, jih inkubirali 48-72 ur vse do 80% preraščenosti, nato pa jih odlepili z gojitvene površine s tripsinizacijo. Tako dobljeno celično suspenzijo smo prenesli v večje platenke (T75 in T150), dokler nismo pridobili ustreznega števila celic. Celice smo presadili vsaj dvakrat, preden smo jih prenesli v medij brez estrogena. V plastenko za gojenje smo 48-72 ur po drugem presajanju celic dodali tripsin in celice centrifugirali. Medij RPMI smo odpipetirali, celično usedlino pa resuspendirali v mediju brez estrogena in jo prenesli v novo plastenko ter dodali gentamicinijev sulfat (G418). Ta je povzročil smrt tistih celic, ki niso vsebovale plazmida z genom za odpornost nanj. Ko so celice dosegle 80% preraščenost, smo jih ponovno tripsinizirali, prešteli in prenesli v vdolbinice mikrotitrskeske plošče za testiranje.

3.2.1 Priprava medijev in raztopin

Priprava medijev RPMI in DMEM+: Za pripravo hranilnega medija RPMI smo v vsebnik z 250 mL RPMI 1640 dodali 22 mL fetalnega govejega seruma (angl: fetal bovine serum) ter 2.5 mL raztopine penicilina in streptomocina. Za pripravo DMEM+ smo v vsebnik z 250 mL DMEM odpipetirali 2.5 mL natrijevega piruvata, 12 mL fetalnega seruma goveda z nizko vsebnostjo hormonov (angl: fetal bovine serum, charcoal stripped), 5 mL L-glutamina in 2.5 mL raztopine penicilina in streptomocina. Fetusni goveji serum ter raztopino penicilina in streptomocina smo predhodno vzeli iz zamrzovalnika in v vodni kopeli ogreli na sobno temperaturo. Pripravljena medija smo razdelili v 50 mL centrifugirke in jih prenesli v hladilnik. Deset minut pred uporabo pa smo nato ustrezno količino medija segreli na sobno temperaturo v vodni kopeli. Oba medija smo delali sproti, da sta bila sveža.

Priprava raztopine tripsina 1x: Tripsin 10x smo vzeli iz zamrzovalnika (-20 °C) in ga v vodni kopeli ogreli na sobno temperaturo. Želena raztopina smo pripravili z redčenjem raztopine tripsina 10x s HBSS 1x v razmerju 1 : 10. Pripravljeno delovno raztopino tripsina 1x smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

Priprava DPBS 1x: DPBS 1x smo pripravili z redčenjem DPBS 10x s sterilizirano vodo. V 50 mL stožčasto centrifugirko smo odpipetirali 5 mL DPBS 10x in 45 mL sterilizirane vode.

3.2.2 Odmrzovanje celic

Zamrznjene celice v krioviali smo vzeli iz vsebnika s tekočim dušikom in jih odmrznili s toploto rok. Odmrznjene celice smo prenesli v 50 mL centrifugirko, kriovialo pa še dvakrat sprali z DPBS 1x in to dodali k ostalim celicam. Celični suspenziji smo dodali še 20 mL medija RPMI in centrifugirali 8 minut pri 2.400 obratov/minuto. Centrifugiranje smo izvedli zato, da smo odstranili DMSO, ki je v visoki koncentraciji citotoksičen. Usedlino celic smo po odstranitvi supernatanta suspendirali v 5 mL RPMI in jo s serološko pipeto redispergirali. Nato smo celice v mediju prenesli v plastenko T25 in jo prenesli v inkubator (37 °C, 5 % CO₂), dokler celice niso dosegle 80 % preraščenost.

3.2.3 Presajanje celic v mediju RPMI

Celice smo presajali pri 80 % do 90 % preraščenosti, ki so jo v kulturi dosegle v 2-3 dneh. Medij smo menjali na 24 ur, včasih pa tudi na 48 ur, če celice niso dosegle zelene

preraščenosti. Iz plastenke T25 smo celice presajali v večje, T75 in nato po potrebi še v večje, T150, in sicer po enakem postopku. Plastenko za gojenje s celicami smo vzeli iz inkubatorja in jo najprej pregledali pod invertnim mikroskopom, da smo ocenili preraščenost ter število mrtvih celic. Nato smo s spodnjega desnega kota navpično postavljene plastenke aseptično odstranili medij RPMI. Ob strani smo s pipeto dodali 5 mL DPBS 1x, z njim previdno sprali celice in ga odpipetirali. Celicam smo dodali določen volumen raztopine tripsina 1x, ga enakomerno porazdelili po celotni površini kulture in plastenko s celicami postavili v inkubator za 5 do 10 minut. Postopek odlepljanja celic smo pospešili z udarjanjem plastenke ob dlan. Tripsin namreč ne sme delovati predolgo, saj lahko poškoduje receptorje na površini celic. Ko se je večina celic odlepila z raste površine, smo ob zgornjem desnem kotu plastenke dodali 5 mL DPBS 1x. Celično suspenzijo smo odpipetirali in z njo še enkrat sprali rastno površino plastenke, da smo s površine odlepili še ostale celice. Celično suspenzijo smo prenesli v 50 mL centrifugirko, kamor smo predhodno odpipetirali medij RPMI (minimalni dodatek gojišča k tripsinu za centrifugiranje), ki ustavi delovanje tripsina. Suspenzijo smo centrifugirali pri 2.400 obratov/minuto 8 minut. Supernatant smo previdno odpipetirali, da ne bi odstranili tudi celic. V centrifugirko s celično usedlino smo nato dodali 5 mL medija RPMI in celice resuspendirali. Nato smo jih prešteli v hemocitometru, da smo ugotovili, kakšen volumen končne celične suspenzije moramo prenesti v plastenke za gojenje. Celice smo med presajanju šteli tudi zato, da smo ugotovili, kakšna je hitrost njihove rasti. To nam je omogočilo lažje načrtovanje presajanja, menjave medija, dejanskega testiranja spojin ter tudi hitrejše odkrivanje neustrezne celične rasti, ki bi bila lahko posledica neustreznih pogojev ali pa okuženosti kultur. Volumni dodanih snovi pri presajanju celic so podani v Preglednici I.

Preglednica I: Volumni dodanih snovi pri različnih velikostih plastenke, uporabljenih za presajanje celic.

Tip plastenke za gojenje celic	Volumen medija [mL]	Volumen DPBS [mL]	Volumen tripsina 1x [mL]	Minimalni dodatek gojišča k tripsinu za centrifugiranje [mL]
T25	5	5	1.5	3
T75	10	5	2.5	5
T150	20	5	4	8

3.2.4 Presajanje celic v medij brez estrogena in vzdrževanje celičnih kultur

Celice smo morali vsaj enkrat pred nasajanjem presaditi iz medija RPMI, ki vsebuje pH indikator fenol rdeče s šibkim estrogenskim delovanjem, v medij DMEM+, ki nima omenjenega indikatorja. Indikator bi namreč lahko povzročil lažno pozitiven rezultat za estrogeno aktivnost. Postopek vzdrževanja celic v kulturi z dodatkom raztopine gentamicinijevega sulfata smo pred naseljevanjem celic izvedli le enkrat, navadno ob zamenjavi medija RPMI z DMEM+. Tako smo zagotovili, da so bili vsi testi izvedeni le s tistimi celicami, ki so vsebovale plazmid z reporterskim genom.

Postopek presajanja v medij DMEM+ brez estrogena je bil enak kot pri postopku presajanja v mediju RPMI do točke prenosa celic v centrifugirko. Ko smo celično suspenzijo prenesli v 50 mL centrifugirko, za zaustavitev delovanja tripsina nismo dodali medija RPMI, pač pa DMEM+. Centrifugiranje je potekalo pri enakih pogojih kot prej. Po odstranitvi supernatanta smo celično suspenzijo resuspendirali s pipetiranjem 5 mL DMEM+. Nato smo navadno dodali še 150 μ L raztopine gentamicinijevega sulfata za dve platenki T150. Plavajoče mrtve celice smo odstranili 24 ur po omenjenem tretiranju ob menjavi medija. Ko so celice v kulturi dosegle 80 % preraščenost, smo jih najprej še enkrat presadili v medij DMEM+, preden smo jih prenesli v vdolbinice mikrotitrne plošče.

3.2.5 Štetje celic

Celice smo med presajanjem prešteli v hemocitometru, pred prenosom v vdolbinice mikrotitrne plošče pa z avtomatskim števcem. Štetje v hemocitometru smo izvedli tako, da smo po centrifugiranju in resuspendiranju usedline dobljeno celično suspenzijo dobro premešali s pipeto in jo 10 μ L odpipetirali v 200 μ L mikroepruveto s 40 μ L tripanskega modrila. Vsebino smo premešali s pipeto, odpipetirali 10 μ L suspenzije z barvilom in to nanесли na hemocitometer. Ta je sestavljen iz 9 kvadratov, v katerih preštejemo svetle celice, ki so v zgornjem levem, zgornjem desnem, spodnjem levem in spodnjem desnem kvadratu. Število celic v 1 mL suspenzije izračunamo tako, da povprečno število celic v kvadratih pomnožimo s 5 (redčenje celic v tripanskem modrem) in delimo z 10^{-4} , kar je volumen posameznega kvadratka v mL.

Pred prenosom celic v vdolbinice mikrotitrne plošče smo za njihovo štetje uporabili avtomatski števec celic (angl: Countess automated cell counter). Celično suspenzijo smo dobro premešali s pipeto in jo 10 μ L odpipetirali v 200 μ L mikroepruveto z 10 μ L tripanskega modrila. Vsebino smo premešali s pipeto, odpipetirali 10 μ L in jih nanесли na

ploščico za štetje celic. Števec je poleg števila živih celic v mililitru suspenzije ($C_{\text{začetna}}$) izmeril tudi celotno število celic in ocenil njihovo preživetje. Nato smo z enačbo (1) izračunali začetni volumen celične suspenzije ($V_{\text{začetni}}$) za vsak posamezen test. To je volumen celične suspenzije z začetno koncentracijo ($C_{\text{začetna}}$), ki jo moramo razredčiti z medijem, da dobimo delovno koncentracijo s končnim volumnom ($V_{\text{končni}}$), s katerim napolnimo vse potrebne vdolbinice. Volumen medija DMEM+, s katerim redčimo celično suspenzijo, dobimo z odštevanjem začetnega volumna od končnega.

(1)

Za test MTS smo potrebovali po 10.000 celic v vsaki vdolbinici, za metodo LUMI-CELL[®] ER pa po 40.000. Pri obeh testih smo v vdolbinice mikrotitrne plošče z večkanalno pipeto prenesli po 200 μL celične suspenzije na vdolbinico s končno koncentracijo ($C_{\text{končna}}$) 50.000 celic/mL za test MTS in 200.000 celic/mL za metodo LUMI-CELL[®] ER.

3.3 TESTI VIABILNOSTI *IN VITRO*

Viabilnost oziroma živost celic je merilo za delež živih, metabolično aktivnih celic v kulturi. Izmerimo jo lahko z indikatorjem metabolizma celic ali s testom, ki zazna njihovo specifično metabolično funkcijo. Indeks viabilnosti izrazimo v odstotkih in ga izračunamo z deljenjem števila živih celic s številom vseh celic, kar pomnožimo s 100. Metode za določanje citotoksičnosti morajo imeti linearno razmerje med odzivom testa in številom živih celic. Viabilnost lahko merimo z metodo izključitve barvila, metodo tetrazolijevih soli, metodo tvorbe kolonij, laktatno dehidrogenazno (LDH) metodo, z znotrajceličnim energijskim nabojem in s hitrostjo sinteze proteinov (34).

Pri **izključitvi barvila** največkrat uporabljamo tripansko modro. Viabilne celice imajo nepoškodovano membrano, ki ne dopušča prehajanja barvila v njihovo notranjost. V mrtve in poškodovane celice pa barvilo brez težav prodre in jih tako obarva modro. Po barvanju celično suspenzijo pregledamo pod mikroskopom in žive celice preštujemo v hemocitometru ali pa z avtomatskim števcem. Žive celice so neobarvane in svetle, mrtve pa so obarvane modro. Po štetju izračunamo celotno število celic in delež viabilnih celic v kulturi. Poleg tripanskega modrega uporabljamo lahko še eritrozín B, nigrozín in fluoresceín diacetat (9, 34).

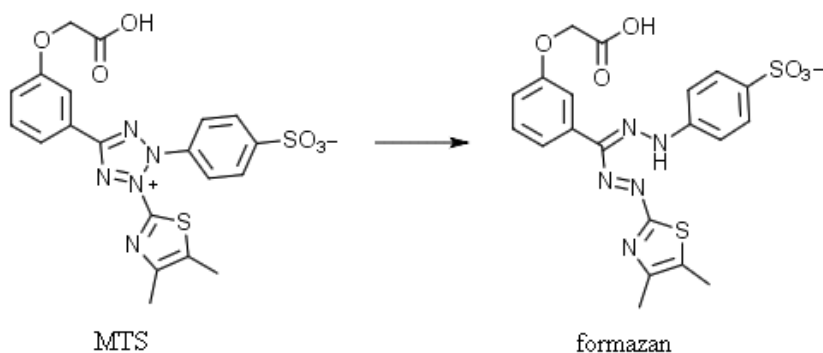
Metoda s **tetrazolijevimi solmi** je kolorimetrična. Z njo merimo oksidativni metabolizem celic. V metabolično aktivnih (živih) celicah se tetrazolijeva sol pod vplivom dehidrogenaz v mitohondriju pretvori v vijoličen produkt formazan, njegovo količino pa izmerimo spektrofotometrično. Količina formazana je proporcionalna številu živih celic v kulturi (9, 34).

Pri preučevanju **tvorbe kolonij** neposredno merimo zmožnost rasti celic, kjer najprej v kulturo naselimo na gojišče znano količino celic v nizki gostoti, nato pa preštujemo število nastalih kolonij. **Laktatna dehidrogenaza** je encim, ki se sprosti iz celic s poškodovanimi membranami v medij. Povečano aktivnost tega encima v prisotnosti piruvata in ob oksidaciji NADH izmerimo s spektrofotometrom. Pri zmanjšani celični viabilnosti izmerimo padec absorbance pri 340 nm. Z metodo **znotrajceličnega energijskega naboja** izmerimo znotrajcelične koncentracije adenzin monofosfata (AMP), adenzin difosfata (ADP) in adenzin trifosfata (ATP), s katerimi ob uporabi posebne enačbe izračunamo energijski naboj. V živih celicah je vrednost naboja od 0.7 do 0.9, pri izgubi celične viabilnosti pa se močno zniža. **Hitrost sinteze proteinov** v živih celicah izmerimo po njihovi inkubaciji v standardnem mediju, ki vsebuje radioaktivno označene aminokisljine. Največ se uporabljata aminokisljini ^3H -levcin in ^{35}S -metionin (34).

3.3.1 Test MTS

Metoda s tetrazolijevimi solmi je kolorimetrična in omogoča meritve obsega oksidativnega metabolizma celic, ki je proporcionalen številu živih celic. Najbolj znana tetrazolijeva sol je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT), ki je topen v vodi in rumeno obarvan. V metabolično aktivnih celicah pa se pod vplivom mitohondrijskih dehidrogenaz pretvori v netopen vijoličen produkt formazan, ki ga moramo najprej raztopiti v organskem topilu, nato pa spektrofotometrično izmerimo njegovo količino. Vedno bolj pa se uporabljajo tudi druge tetrazolijeve soli, kot naprimer 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid) (XTT) in 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (MTS). Uporabljata se v prisotnosti fenazin etosulfata (PES), reagenta za sklopitev elektronov (prejemnik elektronov). Njuna prednost je, da tvorita vodotopen produkt in zato dodaten korak raztapljanja v organskem topilu ni potreben. Zato lahko test izvajamo na mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami, kar omogoča testiranje več različnih snovi oziroma njihovih različnih koncentracij hkrati (9, 34).

MTS, ki je rumene barve, se v metabolično aktivnih celicah pod vplivom dehidrogenaz reducira v vodotopen vijoličen formazan (Slika 6). Količino tega izmerimo z absorbanco pri 490 nm, ta pa je proporcionalna številu živih celic v kulturi.



Slika 6: Pretvorba reagenta MTS v formazan pod vplivom dehidrogenaz v živih celicah.

Priprava raztopin za test MTS

Priprava 11 različnih koncentracij Bis-GMA: Najprej smo pripravili osnovno raztopino Bis-GMA s koncentracijo 10 mg/mL v 100 % DMSO. To raztopino smo v 200 μ L mikroeprevetah redčili s 100 % DMSO desetkrat zapored v razmerju 1 : 2. Vsebino osnovne raztopine in desetih 200 μ L mikroeprevet smo nadalje redčili v 1.5 mL epruvtkah z medijem DMEM+, zaporedoma v razmerju 1 : 100, tako da smo dobili zelene koncentracije 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 in 0.01 μ g/mL, od katerih je vsaka vsebovala le 1 % DMSO.

Priprava 1 % raztopine DMSO v mediju DMEM+: To raztopino smo uporabili za kontrolni in slepi vzorec. V 2 mL epruvtko smo odpipetirali 20 μ L DMSO in 1.980 μ L DMEM+ ter vsebino dobro premešali na vibracijskem stresalniku.

Tretiranje celic z Bis-GMA

Za izvedbo testa MTS smo potrebovali 10.000 celic na vdolbinico. Ker smo v vdolbinice odpipetirali po 200 μ L celične suspenzije, smo potrebovali izhodno koncentracijo 50.000 celic/mL. S pomočjo enačbe 1 smo izračunali potreben volumen celične suspenzije in nato še količino medija DMEM+, ki smo ju morali združiti, da smo dobili zeleno izhodno koncentracijo celic. Celic nismo prenesli v tiste vdolbinice, ki so bile namenjene slepemu vzorcu. Ko smo jih v vdolbinice raztočili z večkanalno pipeto, smo mikrotitrsko ploščo za 24 ur dali v inkubator, da so celice prerastle dno vdolbinic.

Po inkubaciji smo mikrotitrsko ploščo vzeli iz inkubatorja in z invertnim mikroskopom pregledali enakomernost preraščenosti s celicami v posameznih vdolbinicah. Celicam smo spodaj ob robu vdolbinic z reverznim pipetiranjem odstranili medij. V 5 vdolbinic za slepi in 5 za kontrolni vzorec smo ob levem robu dodali po 100 μ L 1 % raztopine DMSO v mediju DMEM+. Potem smo nanесли po 100 μ L vsake posamezne koncentracije spojine v 5 vdolbinic. Mikrotitrsko ploščo smo prenesli v inkubator za 24 ur. Po inkubaciji smo najprej vizualno ocenili živost celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Nato smo ugasnili luči in reagent MTS odvili iz aluminijaste folije. V vsako vdolbinico smo dodali po 20 μ L reagenta MTS, mikrotitrsko ploščo pokrili z aluminijasto folijo in jo vrnili v inkubator. Po dveh urah inkubacije smo s spektrofotometrom pri 490 nm izmerili absorbanco v vsaki vdolbinici.

3.4 METODE ZA DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI *IN VITRO*

Za določanje estrogenosti spojin so danes znane številne metode *in vitro*, med katerimi lahko uporabimo predvsem naslednje: kompetitivno vezavo liganda na ER, metodo celične proliferacije ter reportersko metodo z reporterskim genom v začasno ali stabilno transfeciranih celicah. Z metodo **kompetitivne vezave liganda na ER** ocenimo zmožnost spojine, da tekmuje s 17 β -estradiolom za vezavo na receptor. Celice ali celični lizati, ki vsebujejo ER, inkubiramo s testno spojino in radioaktivno označenim E2 kot kontrolo. S to metodo ne moremo razbrati, ali spojina povzroči ali inhibira gensko transkripcijo, saj se estrogeni in antiestrogeni na ER zelo podobno vežejo. **Metoda celične proliferacije** omogoča preučevanje estrogenosti snovi, ki je vzrok za pospešitev rasti in delitve celične linije raka dojke (MCF-7). Na ta način lahko ločimo med agonisti in antagonisti ER, vendar pa je metoda premalo specifična, saj na proliferacijo poleg estrogenov vplivajo tudi druge snovi (35, 36).

Pri **reporterski metodi z reporterskim genom** uporabljamo reporterske proteine (kloramfenikol acetiltransferaza, β -galaktozidaza ali luciferaza) in opazujemo transkripcijsko aktivacijo (agonisti) ali inhibicijo te aktivnosti (antagonisti) v nesmrtnih celičnih linijah ali plesnih. Začasna transfekcija reporterskega gena v sesalske celice je dolgotrajna, zahteva veliko dela, rezultati pa so variabilnejši kot v primeru stabilne transfekcije. V primerjavi z drugimi metodami *in vitro* je stabilna transfekcija

reporterskega gena najbolj specifična, odzivna in razmeroma hitra za določanje agonistične in antagonistične estrogene aktivnosti preiskovanih spojin (35, 36).

3.4.1 Metoda LUMI-CELL[®] ER

Testna metoda LUMI-CELL[®] ER je ena izmed metod z reporterskim genom v stabilno transfeciranih celicah, ki jo je za identifikacijo spojin z agonistično ali antagonistično aktivnostjo na ER *in vitro* validiral Nacionalni toksikološki program (NTP) Medagencijskega centra za oceno alternativnih toksikoloških metod (NICEATM), v sodelovanju s centri za validacijo alternativnih metod v Evropi in na Japonskem. Leta 2012 je bila sprejeta tudi s strani Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), kjer so do tedaj (2009) sprejeli le eno metodo ER *in vitro* s transkripcijsko aktivacijo, pri kateri se uporabljajo stabilno transfecirani humani ER- α , in sicer za odkrivanje agonistične estrogene aktivnosti na humani celični liniji HeLa-9903 (rakave celice materničnega vratu). Testna metoda LUMI-CELL[®] ER je tej metodi enakovredna, v nekaterih pogledih pa celo boljša (5, 37).

Metoda LUMI-CELL[®] ER uporablja celično linijo BG1Luc4E2 za identifikacijo spojin z agonistično ali antagonistično aktivnostjo tako na ER α kot ER β . BG1Luc4E2 je linija humanih celic rakavega jajčnika, ki vsebuje plazmid z reporterskim genom (*luc*). Ta v primeru estrogenosti testirane spojine omogoča nastajanje encima luciferaza. Optimalni indukcijski čas po dodatku 1 nM estradiola ali testirane spojine je 24 ur, saj je takrat aktivnost luciferaze najvišja. Aktivnost encima po dodatku luciferaznega reagenta izmerimo v obliki emitirane svetlobe, ki jo izmerimo z luminometrom. Izmerjeno svetlobo v vsaki vdolbinici mikrotitrne plošče izrazimo v relativnih svetlobnih enotah (RLU). V programu Excel smo najvišjo vrednost referenčnega standarda dogovorno normalizirali na vrednost 10.000 RLU in nato temu ustrezno prilagodili vse ostale meritve RLU. Pri interpretaciji rezultatov smo si pomagali s koncentracijsko krivuljo in kriteriji, ki so potrebni za pozitivno ali negativno ovrednotenje agonističnega delovanja spojine na ER. Če je spojina pozitivna za agonistično delovanje na ER, zanjo izračunamo EC₅₀ (efektivna koncentracija, ki izzove 50 % maksimalnega učinka).

Najprej smo izvedli test iskanja območja koncentracij (angl: range finder), nato pa še celostni test (angl: comprehensive test). Smisel prvega testa je, da določimo začetno koncentracijo in režim redčenja, s čimer zajamemo pravo območje testiranja estrogene

aktivnosti pri celostnem testu. Začetna koncentracija testirane spojine mora biti popolnoma topna v DMSO in necitotoksična. Za določitev citotoksičnih koncentracij smo uporabili vizualno oceno viabilnosti in tudi rezultate testa MTS. Pri analizi rezultatov smo uporabili le tiste koncentracije, pri katerih je bila živost celic nad 80 %. Možna načina redčenja sta lahko 1 : 2, kar zajame 3.5 logaritmskih razredov, ali pa 1 : 5, ki obsega 7.5 logaritmskih razredov. Prvi režim uporabimo v primeru negativnih odzivov za agonistično aktivnost ali pa v primeru tistih pozitivnih odzivov, pri katerih s tremi velikostnimi redi zajamemo celotno območje odzivov. Redčenje v razmerju 1 : 5 pa uporabimo takrat, ko z redčenjem 1 : 2 ne zajamemo vseh možnih odzivov. Odziv za agonistično aktivnost pri določeni koncentraciji preskušane spojine je pozitiven, kadar je izmerjena povprečna prilagojena vrednost RLU nad povprečno vrednostjo kontrole topila, ki ji prištejemo 3-kratno vrednost standardne deviacije (SD).

Pri testu iskanja območja koncentracij celice tretiramo s testno spojino, kontrolo topila in referenčnim standardom E2. Pri celostnem testu pa dodatno uporabimo še pozitivno kontrolo. Kontrola topila je bila 1 % raztopina DMSO v mediju brez estrogena in je predstavljala merilo obsega transkripcijske aktivnosti, ki poteče v odsotnosti referenčnega standarda, pozitivne kontrole ali testnih spojin. Postopali smo tako, da smo izračunali povprečje vrednosti RLU za kontrolo topila in jo odšteli od izmerjenih vrednosti RLU za testno spojino, referenčni standard in pozitivno kontrolo. Kot referenčni estrogen smo uporabili 17 β -estradiol (E2), ki služi kot pokazatelj ustreznosti testne metode tako, da inducira transkripcijsko aktivnost. Metoksiklor je pesticid, ki deluje šibko estrogeno in se veže na ER α in ER β . Zato smo ga uporabili kot šibko pozitivno kontrolo. Test agonistične aktivnosti preskušane spojine je sprejemljiv, če vrednosti referenčnega standarda, pozitivne kontrole in kontrole topila ustrezajo kriterijem, ki so navedeni v protokolu metode.

Priprava osnovnih raztopin

Priprava raztopine za liziranje celic 1x: Pripravili smo jo z redčenjem raztopine za liziranje 5x, ki smo jo najprej odmrznili in jo v vodni kopeli ogreli na sobno temperaturo. Nato smo 6 mL te raztopine prenesli v 50 mL centrifugirko in jim dodali še 24 mL deionizirane vode ter dobro premešali. Po vsaki uporabi smo pripravljeno raztopino dali v zamrzovalnik na -20 °C.

Priprava luciferaznega reagenta: Pripravili smo ga iz luciferaznega pufra in liofiliziranega luciferaznega substrata. Najprej smo obe komponenti vzeli iz zamrzovalnika (-70 °C), ju

zavili v aluminijasto folijo in pustili v temi, da sta se ogreli na sobno temperaturo. Nato smo ugasnili luči in v vsebnik z liofiliziranim luciferaznim substratom dodali 10 mL luciferaznega pufra in raztopino previdno premešali. Do nanašanja na mikrotitrsko ploščo smo reagent ovili v aluminijasto folijo in postavili v omaro, da ni bil izpostavljen svetlobi. Pripravljeni luciferazni reagent smo po uporabi hranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava raztopine metoksiklora s koncentracijo $3.13\text{ }\mu\text{g/mL}$ za celostni test: Natehtano količino metoksiklora smo raztopili v DMSO v 2 mL epruvetki tako, da smo dobili koncentracijo 10 mg/mL , $94\text{ }\mu\text{L}$ te raztopine smo nato odpipetirali v epruvetko, ki je že vsebovala 2.906 mL DMSO, in raztopino premešali. Tako smo dobili raztopino metoksiklora s koncentracijo $313\text{ }\mu\text{g/mL}$, $10\text{ }\mu\text{L}$ te raztopine smo nato dodali $990\text{ }\mu\text{L}$ DMEM+ in vsebino v mikroepruveti dobro premešali.

Priprava raztopine E2 s koncentracijo $1.0 \times 10^{-2}\text{ }\mu\text{g/mL}$: Najprej smo pripravili raztopino E2 (10 mg/mL) v 100% DMSO. To smo nato trikrat redčili v razmerju $1 : 100$ s 100% DMSO in dobili raztopino E2 s koncentracijo $1.0 \times 10^{-2}\text{ }\mu\text{g/mL}$. Po vsaki redčitvi smo dobljene raztopine dobro premešali.

Priprava kontrole DMSO: V 2 mL epruvetko smo prenesli $10\text{ }\mu\text{L}$ 100% DMSO in $990\text{ }\mu\text{L}$ DMEM+ in premešali z vibracijskim stresalnikom. Tako smo dobili 1% DMSO raztopljen v mediju. Vse končne raztopine preiskovane spojine, E2 in pozitivne kontrole so vsebovale največ 1% DMSO, saj višja koncentracija ni dovoljena zaradi njegove citotoksičnosti.

Priprava raztopine Bis-GMA: Bis-GMA je smolnata spojina, ki jo hranimo v hladilniku, zato smo ga pred pripravo raztopin ogreli na sobno temperaturo. Najprej smo preverili njegovo topnost v 100% DMSO, saj se mora v topilu popolnoma raztopiti, da ga lahko uporabimo za testiranje. Pripravili smo raztopino s koncentracijo 10 mg/mL , v kateri je bil Bis-GMA popolnoma raztopljen.

Priprava 4 koncentracij referenčnega standarda E2 za test iskanja območja koncentracij: Raztopino E2 s koncentracijo $1.0 \times 10^{-2}\text{ }\mu\text{g/mL}$ smo v $200\text{ }\mu\text{L}$ mikroepruvetah redčili s 100% DMSO, in sicer enkrat v razmerju $1 : 2$, nato pa nadaljevali z redčenjem v razmerju $1 : 4$, kar smo naredili trikrat. Vsebinsko iz štirih $200\text{ }\mu\text{L}$ mikroepruvet smo nadalje redčili v 1.5 mL epruvetkah z medijem DMEM+ v razmerju $1 : 100$ tako, da smo dobili koncentracije 5.00×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 3.13×10^{-6} in $7.83 \times 10^{-7}\text{ }\mu\text{g/mL}$, jih dobro premešali in prenesli v

vdolbinice mikrotitrne plošče za izvedbo testa iskanja območja koncentracij. Vsaka raztopina je po redčenju vsebovala 1 % DMSO.

Priprava 7 koncentracij raztopine Bis-GMA za test iskanja območja koncentracij: Raztopino Bis-GMA (10 mg/mL) smo v 200 μ L mikroprugetah redčili s 100 % DMSO šestkrat zapored v razmerju 1 : 10 do sedme koncentracije. Nato smo vsebino izhodne raztopine Bis-GMA (10 mg/mL) in ostalih šestih v 200 μ L mikroprugetah nadalje redčili v 1.5 mL eprugetkah z medijem DMEM+, in sicer v razmerju 1 : 100, da smo dobili raztopine s koncentracijami 1.00×10^2 , 1.00×10^1 , 1.00×10^0 , 1.00×10^{-1} , 1.00×10^{-2} , 1.00×10^{-3} in 1.00×10^{-4} μ g/mL, pri čemer je vsaka vsebovala 1 % DMSO.

Priprava 11 koncentracij referenčnega standarda E2 za celostni test: Raztopino E2 s koncentracijo 1.0×10^{-2} μ g/mL smo v 200 μ L mikroprugetah redčili s 100 % DMSO desetkrat zapored v razmerju 1 : 2 do enajste koncentracije. Vsebinsko izhodne raztopine (1.0×10^{-2} μ g/mL) in ostalih desetih redčitev v 200 μ L mikroprugetah smo nadalje redčili v 1.5 mL eprugetkah, in sicer z medijem DMEM+ v razmerju 1 : 100 tako, da smo dobili raztopine s koncentracijami 1.00×10^{-4} , 5.00×10^{-5} , 2.50×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 6.25×10^{-6} , 3.13×10^{-6} , 1.56×10^{-6} , 7.83×10^{-7} , 3.92×10^{-7} , 1.95×10^{-7} , 9.78×10^{-8} μ g/mL, ki smo jih tik pred prenosom v vdolbinice mikrotitrne plošče premešali z vibracijskim stresalnikom. V vsaki od raztopin z različnimi koncentracijami E2 je bil 1 % DMSO.

Priprava 11 koncentracij raztopine Bis-GMA za celostni test: Pripravili smo 11 različno koncentriranih raztopin Bis-GMA v razmerju 1 : 5. Izhodno raztopino Bis-GMA (10 mg/mL) smo v 200 μ L mikroprugetah redčili s 100 % DMSO desetkrat zapored v razmerju 1 : 5. Vsebinsko izhodne raztopine (10 mg/mL) in ostalih desetih redčitev v 200 μ L mikroprugetah smo nadalje redčili v 1.5 mL eprugetkah z medijem DMEM+, in sicer v razmerju 1 : 100 tako, da smo dobili raztopine s koncentracijami 1.00×10^2 , 2.00×10^1 , 4.00×10^0 , 8.00×10^{-1} , 1.60×10^{-1} , 3.20×10^{-2} , 6.40×10^{-3} , 1.28×10^{-3} , 2.56×10^{-4} , 5.12×10^{-5} , 1.02×10^{-5} μ g/mL, od katerih je vsaka vsebovala 1 % DMSO.

Naseljevanje celic

Za izvedbo metode LUMI-CELL[®] ER smo potrebovali po 40.000 celic v vsaki vdolbinici. Zato smo najprej s pomočjo enačbe (1) (glej poglavje 3.2.5) izračunali volumen celične suspenzije ($V_{\text{začetni}}$), ki smo ga morali redčiti z medijem DMEM+, da smo dobili želeno delovno koncentracijo celic. Volumen medija smo izračunali tako, da smo odšteli začetni

volumen od končnega. Število živih celic v mililitru suspenzije ($C_{\text{začetna}}$) smo določili z avtomatskim števcem. V vdolbinice mikrotitrne plošče smo z večkanalno pipeto nasajali po 200 μL celične suspenzije na vdolbinico s končno koncentracijo 200.000 celic/mL. Nato smo mikrotitrsko ploščo prestavili v inkubator za 24 ur.

Tretiranje celic in vizualna ocena njihove viabilnosti

Mikrotitrsko ploščo s celičnimi kulturami smo po 24 urah vzeli iz inkubatorja in pod invertnim svetlobnim mikroskopom ocenili enakomernost gostote oziroma preraščenosti celic v posameznih vdolbinicah in morebitno prisotnost mrtvih celic. Za test iskanja območja koncentracij smo v vdolbinice mikrotitrne plošče v dvojnikih odpipetirali 4 koncentracije referenčnega standarda E2 (5.00×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 3.13×10^{-6} in 7.83×10^{-7} $\mu\text{g/mL}$) ter nato še kontrolo DMSO v 4 vdolbinice. V preostale vdolbinice smo v dvojnikih nanesti tudi 7 različnih koncentracij Bis-GMA (zaporedoma redčenih v razmerju 1 : 10).

Pri celostnem testu smo v vdolbinice mikrotitrne plošče v dvojnikih nanesti 11 različnih koncentracij E2 (1.00×10^{-4} , 5.00×10^{-5} , 2.50×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 6.25×10^{-6} , 3.13×10^{-6} , 1.56×10^{-6} , 7.83×10^{-7} , 3.92×10^{-7} , 1.95×10^{-7} , 9.78×10^{-8} $\mu\text{g/mL}$) in po štirikrat kontrolo DMSO in metoksiklor. Preostale vdolbinice smo uporabili za testiranje spojine, pri čemer smo celice izpostavili 11 različnim koncentracijam Bis-GMA, in sicer v triplicatih. Ploščo za test iskanja območja koncentracij in celostni test smo postavili v inkubator za 24 ur, da smo zagotovili popolno indukcijo luciferaze.

Po 24-urni inkubaciji smo iz vseh celičnih mikrokultur odpipetirali medij ter v vsaki vdolbinici celice sprali s po 50 μL DPBS 1x in ga odstranili. Nato smo z invertnim svetlobnim mikroskopom pregledali celice in ocenili njihovo živost z ocenami od 1 do 4 ter z oznako P, ki so razložene v Preglednici II. Za Bis-GMA smo ocenili, da je živost celic pri koncentraciji 1.00×10^2 $\mu\text{g/mL}$ ustrezala oceni 4, pri nižjih koncentracijah pa 1. Precipitacije nismo opazili.

Preglednica II: Ocena viabilnosti celic po tretiranju z Bis-GMA.

Ocena viabilnosti	Kratek opis celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom
1	Normalna celična morfologija in gostota (vsaj 80 % viabilnost)
2	Spremenjena celična morfologija in zmanjšana gostota (60-80 % viabilnost)
3	Spremenjena celična morfologija in zelo zmanjšana gostota (40-60 % viabilnost)
4	Zelo malo ali nič celic (do 40 % viabilnost)
P	Znaki precipitacije

Nanos luciferaznega reagenta

Po mikroskopskem pregledu smo na spodnjo stran mikrotitrne plošče nalepili odseven bel trak za povečanje učinkovitosti luminometra. V vsako vdolbinico smo nato z večkanalno pipeto dali po 50 μ L raztopine za celično liziranje 1x in mikrotitrsko ploščo v krožnih gibih stresali vsaj 1 minuto. Sledil je dodatek luciferaznega reagenta. V sobi z luminometrom smo ugasnili luči in pripravili luciferazni reagent, ki smo ga predhodno zaščitili pred svetlobo. V vsako vdolbinico smo ga dodali po 50 μ L in ploščo vstavili v luminometer za merjenje luminiscence. To smo merili pri občutljivosti 180, čas stresa je bil 5 sekund, intervalni čas pa 1 sekunda. Rezultate meritev smo vstavili v pripravljeno Excelovo predlogo, v list z neobdelanimi podatki (angl: RAW DATA sheet), kjer smo najvišjo vrednost referenčnega standarda E2 normalizirali na vrednost 10.000 RLU.

3.5 PREUČEVANJE METABOLIZMA IN NASTANKA REAKTIVNIH METABOLITOV *IN VITRO*

Za preučevanje metabolizma spojin *in vitro* se največkrat uporabljajo eksperimentalni modeli na človeških tkivih, ki imajo boljšo napovedno vrednost kot poskusi na živalih in so etično manj sporni, saj se v ta namen uporabi odvečno tkivo namenjeno transplantaciji. Modele delimo na subcelične (mikrosomi, jetrni homogenizat, frakcija S9, citosol, rekombinantni encimi, mitohondriji, lizosomi in jedrne frakcije), celične (izolirani in kultivirani hepatociti, nesmrtni celične linije), tkivne (izolirano vitalno tkivo) in organske (perfundirana jetra) (37). Za določanje reaktivnih metabolitov lahko uporabimo naslednje metode *in vitro*: kvalitativno in kvantitativno metodo zajetja elektrofilov, kovalentno vezavo na proteine, časovno in kofaktorsko odvisnost inhibicije citokroma P450 ali pa izvedemo druge študije z necitokromnimi encimi (17, 18).

Kvalitativna metoda zajetja elektrofilov je najbolj uporabljena metoda za odkrivanje bioaktivacije spojin v elektrofilne reaktivne metabolite. Preiskovane spojine inkubiramo v humanih jetrnih mikrosomih, kamor dodamo še reducirani GSH in NADPH, ki obnavlja aktivnost citokromnih encimov. GSH vsebuje nukleofilno sulfhidrilno skupino, ki se konjugira z elektrofilno skupino testirane spojine. **S kvantitativnimi metodami** detektirajo tudi spojine z nižjimi koncentracijami konjugata. V ta namen uporabljajo radiometrične, fluorometrične in masne spektroskopske metode. Za konjugacijo pa se uporabljajo analogi GSH s kvaterno amonijevo skupino, danzil GSH, radioaktivno označen GSH, cianid in semikarbazid (17).

Pri **kovalentni vezavi na proteine** radioaktivno označeno spojino inkubiramo z encimi (jetrni mikrosomi) in njihovimi kofaktorji. Inkubacijo nato prekinemo z oboritvijo proteinov, ki jih operemo, da odstranimo nekonjugiran radioaktivni del. Stopnjo kovalentne vezave ocenimo s količino radioaktivnih snovi v proteinski usedlini, ki se niso ekstrahirale. Pri metodi **inhibicije citokroma P450** inkubiramo humane jetrne mikrosome s preiskovano spojino in substratom, ki je specifičen za določen citokromski izoencim. Če citokromski encim aktivira spojino, se ta ireverzibilno veže na njegov aktivni center in mu zmanjša aktivnost, to pa se odraža v zmanjšanem metabolizmu substrata (17, 18).

3.5.1 Metoda z uporabo humanih jetrnih mikrosomskih frakcij *in vitro*

Mikrosomi predstavljajo glavni sistem *in vitro* za začetne faze preučevanja metabolizma spojin. Z njimi lahko napovedujemo metabolne poti učinkovine ter identificiramo in pridobivamo standarde metabolitov. Mikrosomi so majhni, znotrajcelični membranski vezikli velikosti od 20 do 200 nm. Izoliramo jih po homogenizaciji tkiva in diferencialnem ultracentrifugiranju. V njih so prisotni encimi 1. in tudi nekateri encimi 2. faze presnove, saj vsebujejo citokrome P450, flavinske monooksigenaze (FMO), esteraze, amidaze, epoksidne hidrolaze, uridindifosfat glukuronozil transferaze (UGT), glutationske-S-transferaze (GST) in metiltransferaze. Omogočajo precej ponovljive rezultate tudi po večkratnem zamrzovanju in odtajevanju, imajo visoko vsebnost metabolnih encimov in izkazujejo relativno majhno nespecifično vezavo preskušanih učinkovin (38).

Kvalitativno metodo zajetja elektrofilov uporabljamo za odkrivanje bioaktivacije spojin v elektrofilne reaktivne metabolite. Testne spojine inkubiramo v humanih jetrnih mikrosomih v prisotnosti NADPH, ki obnavlja aktivnost citokromskih encimov, in reduciranega GSH, čigar nukleofilna sulfhidrilna skupina se konjugira z elektrofilno

skupino spojine. GSH je mehki nukleofil in reagira le z mehкими elektrofilimi, zato z njim ne detektiramo trdih elektrofilov, ki se lažje konjugirajo s cianidnim ionom, metoksilaminom ali semikarbazidom. GSH lahko reagira z elektrofilimi po mehanizmu nukleofilne substitucije na oksiranskem obroču in nasičenih aromatskih ogljikih, z Michaelovo adicijo in adicijami nitrozo in karbokationov (17, 18, 39).

Inkubirane raztopine po prekinitvi reakcije analiziramo s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) v negativni ionizaciji, kjer imajo pri analizi prekursorskega iona vsi konjugati z GSH skupen fragment m/z 272 (deprotoniran glutamil-dehidroalanil-glicin). Ta nastane z odcepitvijo H_2S od GSH. Prednost zajetja elektrofilov z GSH je, da so njegovi konjugati bolj polarni, amfoterni in nehlapljivi, kar olajša izolacijo, ekstrakcijo in določitev strukture posameznih reaktivnih metabolitov. Zmožnost detekcije je odvisna od ionizacije konjugatov z GSH in hitrosti njihove tvorbe (17, 18, 39).

Priprava osnovnih raztopin

Za pripravo 100 mL 50 mM fosfatnega pufera s 5 mM $MgCl_2$ in pH 7.4 smo natehtali 680.5 mg KH_2PO_4 in 47.6 mg $MgCl_2$ in ju raztopili v približno 50 mL bidestilirane vode v 100 mL merilni bučki. Za pripravo 10 mL 2 M NaOH smo zatehtali 0.8 g NaOH in ga raztopili v 10 mL bidestilirane vode. Z 2 M NaOH smo uravnali pH omenjenega pufera ter bučko dopolnili z bidestilirano vodo do oznake 100 mL. Puffer smo nato filtrirali s podtlakom in ga dali v hladilnik. Pripravili smo tudi 10 mM raztopino Bis-GMA v DMSO, 25 mM raztopino GSH v bidestilirani vodi ter 5 mM raztopino NADPH v bidestilirani vodi. Natehtane mase in volumni topil za te raztopine so podani v Preglednici III.

Preglednica III: Natehtane mase snovi in ustrezni volumni topil za pripravo reagentov za izvedbo metode merjenja reaktivnih metabolitov Bis-GMA.

	Molska masa	Natehtana masa	Volumen topila	Molarna koncentracija
Bis-GMA	512.6 g/mol	7.5 mg	1.463 mL	10 mM
GSH	307.3 g/mol	1.2 mg	156 μ L	25 mM
NADPH	1142.1 g/mol	0.57 mg	99.8 μ L	5.0 mM

Priprava testnih mikroeprevet

Pripravili smo pet mikroeprevet, ki so se razlikovale po količini in kvaliteti dodanih snovi. Prva mikroepreveta je vsebovala vse navedene raztopine in je služila testiranju

metabolizma preiskovane spojine. V drugi mikroepreveti smo ocenili kemijske reakcije z Bis-GMA v prisotnosti GSH brez NADPH. Tretja mikroepreveta je vsebovala NADPH brez GSH, zato smo z njo lahko določili samo aktivnost P450. V četrti mikroepreveti smo ocenili kemijske reakcije v odsotnosti NADPH in GSH. V peti mikroepreveti pa sta bila prisotna le fosfatni pufer in raztopina Bis-GMA, da bi preverili samo stabilnost spojine in ugotovili ali v odsotnosti GSH in NADPH potekajo kakšne kemijske pretvorbe (npr. hidroliza). V ustrezne mikroeprevete smo dodali fosfatni pufer, 10 mM raztopino Bis-GMA, 25 mM GSH in humane jetrne mikrosome, ki smo jih predhodno odtajali. Volumni vseh omenjenih raztopin in 5 mM raztopine NADPH za 5 mikroeprevet so podani v Preglednici IV. Za umerjanje inštrumenta smo pripravili še standardno raztopino Bis-GMA v 50 % acetonitrilu tako, da smo v mikroepreveto odpipetirali 50 μ L bidestilirane vode, 50 μ L acetonitrila za HPLC in nato še 1 μ L 10 mM raztopine Bis-GMA.

Preglednica IV: Volumni 10 mM raztopine Bis-GMA, 25 mM raztopine GSH, 5 mM raztopine NADPH in suspenzije humanih jetrnih mikrosomov v posamezni mikroepreveti.

	Volumen fosfatnega pufra [μ L]	Volumen Bis-GMA [μ L]	Volumen GSH [μ L]	Volumen NADPH [μ L]	Volumen mikrosomov [μ L]
Mikroepreveta 1	55	1	20	20	5
Mikroepreveta 2	75	1	20	/	5
Mikroepreveta 3	75	1	/	20	5
Mikroepreveta 4	95	1	/	/	5
Mikroepreveta 5	100	1	/	/	/

Vsebine v vseh mikroeprevetah smo nato premešali z vibracijskim stresalnikom in jih postavili v stresalnik za 5 minut pri 20 obratov/minuto in 37 °C. Nato smo v 1. in 3. mikroepreveto dodali še 5 mM raztopino NADPH in ju še enkrat dali v stresalnik za 60 minut. Končna molarna koncentracija Bis-GMA v mikroeprevetah je bila 100 μ M, GSH 5 mM in NADPH 1 mM. Po pretečeni uri smo mikroeprevete vzeli iz stresalnika in v vsako dodali po 25 μ L acetonitrila za HPLC, da smo prekinili potek reakcije in jih nato prenesli v zamrzovalnik (-20 °C). Približno 20 ur kasneje smo jih odmrznili in centrifugirali 60 minut pri 4 °C in 1.300 g. Nato smo mikroeprevete vzeli iz centrifuge, supernatante odpipetirali v ustrezno označene viala in jih zamrznili do analize z metodo LC-MS/MS.

Merjenje metabolitov z metodo LC-MS/MS

Za analizo LC-MS/MS možnih metabolitov v supernatantu smo uporabili trojni kvadrupolni masni spektrometer Agilent 6460, ki je sklopljen z UPLC Agilent 1290 Infinity in opremljen z ionskim izvorom JetStream™. Kromatografsko ločitev smo izvedli na koloni Kinetex 50 x 2.1 mm C18 (2.6 µm delci), ščiteno s 4 x 2.0 mm kartušno kolono C18 (Phenomenex, USA) pri 50 °C. Volumen injiciranja je bil 1 µL. Mobilna faza A je bila sestavljena iz 0.1 % mravljične kisline v vodi Milli-Q (pri opazovanju izbranih reakcij prehoda smo uporabili samo vodo Milli-Q), mobilna faza B pa iz 98 % acetonitrila. Hitrost pretoka je bila 0.5 mL/min, z naslednjimi intervali gradienta (čas [min], % B): 0, 10 %; 0.25, 20 %; 0.5, 35 %; 5, 95 %.

Parametri za vir ionov so bili sledeči: temperatura sušilnega plina – 275 °C, njegov pretok – 5 L/min, pritisk razpršilnega plina – 45 PSI (3.1 x 10⁵ Pa), temperatura plaščnega plina – 320 °C, pretok plaščnega plina – 11 L/min, vhodna napetost kapilare – 3.500 V, napetost na šobi – 500 V ter fragmentor – 135 V.

Pri snemanju celotnega spektra (angl: full scan) je bilo območje iskanja od m/z 100 do 1.000 znotraj 500 ms v pozitivni in negativni ionizaciji. Prisotnost konjugatov z GSH smo ugotavljali z iskanjem prekursorskega iona v negativni ionizaciji, kjer smo skušali najti prekursorje fragmenta 272 m/z , ki je tipični fragmentni ion za konjugate z GSH. Območje iskanja je bilo v tem primeru od 100 (MS1) do 850 (MS2) znotraj 500 ms, energija kolizije pa 12 eV. Za točno in občutljivo kvantifikacijo metabolitov smo uporabili način opazovanja izbranih reakcij prehoda (angl: multiple reaction monitoring, MRM), kjer smo v negativni ionizaciji iskali prekursorski ion pri m/z 784 (MS1) in produktni ion pri m/z 272 (MS2). Energija kolizije je bila 14 eV. Za kontrolo inštrumenta, pridobitev rezultatov in kvantifikacijo smo uporabili program MassHunter Workstation B.03.01.

3.5.2 Napoved metaboličnih reakcij Bis-GMA s programskim orodjem Meteor Nexus *in silico*

Meteor Nexus 1.5.1 (Lhasa, VB) je empirično programsko orodje za napovedovanje poteka metabolizma, ki temelji na obstoječem znanju o metabolizmu in strukturah preiskovanih spojin in analizira možnost določene napovedi metabolizma glede na lipofilnost posamezne spojine. Program predvidi reakcije citokroma P450, necitokromne reakcije prve in druge faze metabolizma. Pri napovedi metabolizma ne upošteva oblike molekule, zato daje prevelik poudarek preprostim oksidacijskim reakcijam (40).

Možne metabolne pretvorbe določi v treh korakih. Najprej v svoji bazi preveri, ali struktura spojine vsebuje podskupine, ki so lahko podvržene metabolizmu. Nato oceni absolutno verjetnost posameznega metabolita, in sicer s petimi različnimi ocenami: najverjetneje (angl: probable), verjetno (angl: plausible), negotovo (angl: equivocal), dvomljivo (angl: doubted) in neverjetno (angl: improbable). Ocena je odvisna od lipofilnosti spojine oziroma njenega metabolita. V tretjem koraku program na osnovi relativne ocene izbere tisto pretvorbo, ki ima v primerjavi z drugo sočasno pretvorbo večjo možnost poteka (npr. primarni alkoholi se oksidirajo pred sekundarnimi). Relativno oceno lahko nastavimo na vrednosti 0, 1, 2 in 3, pri čemer nastavitve 0 pomeni analizo brez relativne ocene, nastavitve 1 pa prikaz metabolitov, ki so najbolj verjetni ob sočasnih pretvorbah. Nastavimo lahko tudi stopnjo reakcije, ki jo želimo prikazati (40).

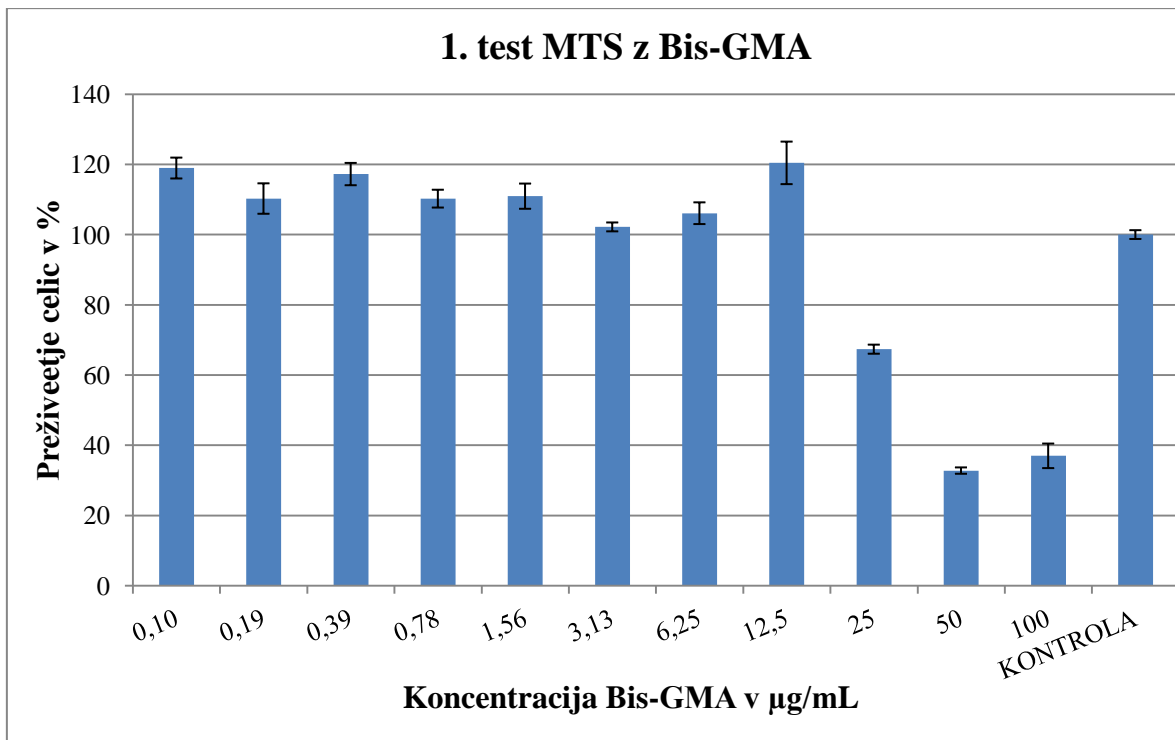
Program reakcije metabolizma poda z natančnim potekom, napovedane metabolite pa ovrednoti glede na njihovo verjetnost, zato smo ga uporabili za napoved možnih pretvorb Bis-GMA. Pri preučevanju metabolizma smo zaradi težnje po pretirani napovedi pretvorb uporabili nastavitve s prikazom le najbolj verjetnih metabolitov v prvem nivoju, in sicer z relativno oceno ali brez nje.

4 REZULTATI

Namen naše raziskave je bil preučiti citotoksičnost, agonistično estrogenu aktivnost in tvorbo reaktivnih metabolitov Bis-GMA. Citotoksičnost smo določevali s testom MTS na celični liniji BG1Luc4E2, pri čemer smo s spektrofotometrom določili število živih celic v mikrokulturi. Necitotoksične koncentracije smo uporabili pri metodi LUMI-CELL[®] ER, s katero smo preučevali agonistično estrogenu aktivnost Bis-GMA. V ta namen smo najprej izvedli test iskanja območja koncentracij, da smo določili pravi obseg koncentracij za izvedbo celostnega testa. Pri izvedbi slednjega smo celice 24 ur tretirali z 11 različnimi koncentracijami Bis-GMA, 11 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E2, pozitivno kontrolo (metoksiklor) in kontrolo topila, nato pa v vseh mikrokulturah z luminometrom izmerili emisijo svetlobe po dodatku luciferaznega reagenta. Reaktivne metabolite Bis-GMA smo preučevali z metodo v humanih jetrnih mikrosomskih frakcijah *in vitro*, kjer smo Bis-GMA eno uro inkubirali skupaj z NADPH in GSH. Slednji kot nukleofil lahko reagira z morebiti nastalimi elektrofilami. Nastale konjugate med GSH in reaktivnimi metaboliti Bis-GMA smo analizirali z metodo LC-MS/MS. Metabolizem Bis-GMA smo preučevali tudi s programom Meteor Nexus *in silico*, s čimer smo skušali napovedati nastanek možnih metabolitov pri najstrožjih kriterijih.

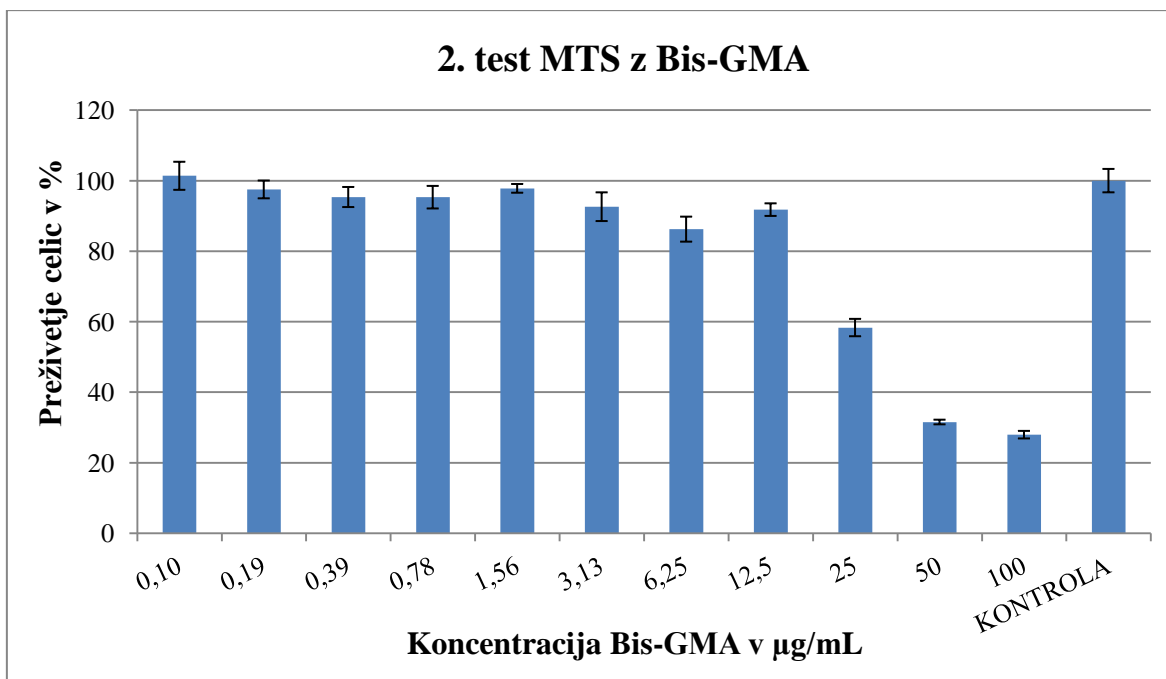
4.1 TEST MTS

Citotoksičnost Bis-GMA smo preučevali na celični liniji BG1Luc4E2 tako, da smo celice v mikrokulturah za 24 ur izpostavili 11 različnim koncentracijam Bis-GMA: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 in 0.01 µg/mL. Nato smo jim dodali reagent MTS in čez dve uri s spektrofotometrom izmerili količino nastalega formazana, ki se tvori le v metabolično aktivnih celicah. Njegova količina je proporcionalna številu živih celic v mikrokulturi. Izvedli smo dva neodvisna poskusa (Grafa 1 in 2).



Graf 1: Prikaz 1. izvedbe testa MTS z Bis-GMA. Prikazani so odstotki \pm SD preživelih celic v 8. pasaži celične linije BG1Luc4E2, in sicer po 24-urni izpostavljenosti 11 različnim koncentracijam Bis-GMA in primerjava s kontrolo, v kateri celice niso bile izpostavljene delovanju preiskovane spojine.

Iz rezultatov 1. izvedbe testa MTS, prikazanih v obliki Grafa 1 vidimo, da je bilo preživetje celic v 8. pasaži celične linije BG1Luc4E2 v primerjavi s kontrolo močno znižano pri koncentracijah Bis-GMA 25.0 $\mu\text{g/mL}$ (67.4 %), 50.0 $\mu\text{g/mL}$ (32.8 %) in 100 $\mu\text{g/mL}$ (37.0 %). Pri koncentracijah 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 in 0.01 $\mu\text{g/mL}$ pa je bilo preživetje celic večje kot pri kontroli, kar je najverjetneje posledica njihove proliferacije. Prvi test MTS je torej pokazal, da je bilo preživetje celic po 24-urni izpostavitvi Bis-GMA manjše od 80 % le pri koncentracijah 25.0, 50.0 in 100 $\mu\text{g/mL}$.



Graf 2: Prikaz 2. izvedbe testa MTS z Bis-GMA. Prikazani so odstotki \pm SD preživelih celic v 11. pasaži celične linije BG1Luc4E2, in sicer po 24-urni izpostavljenosti 11 različnim koncentracijam Bis-GMA in primerjava s kontrolo, v kateri celice niso bile izpostavljene delovanju preiskovane spojine.

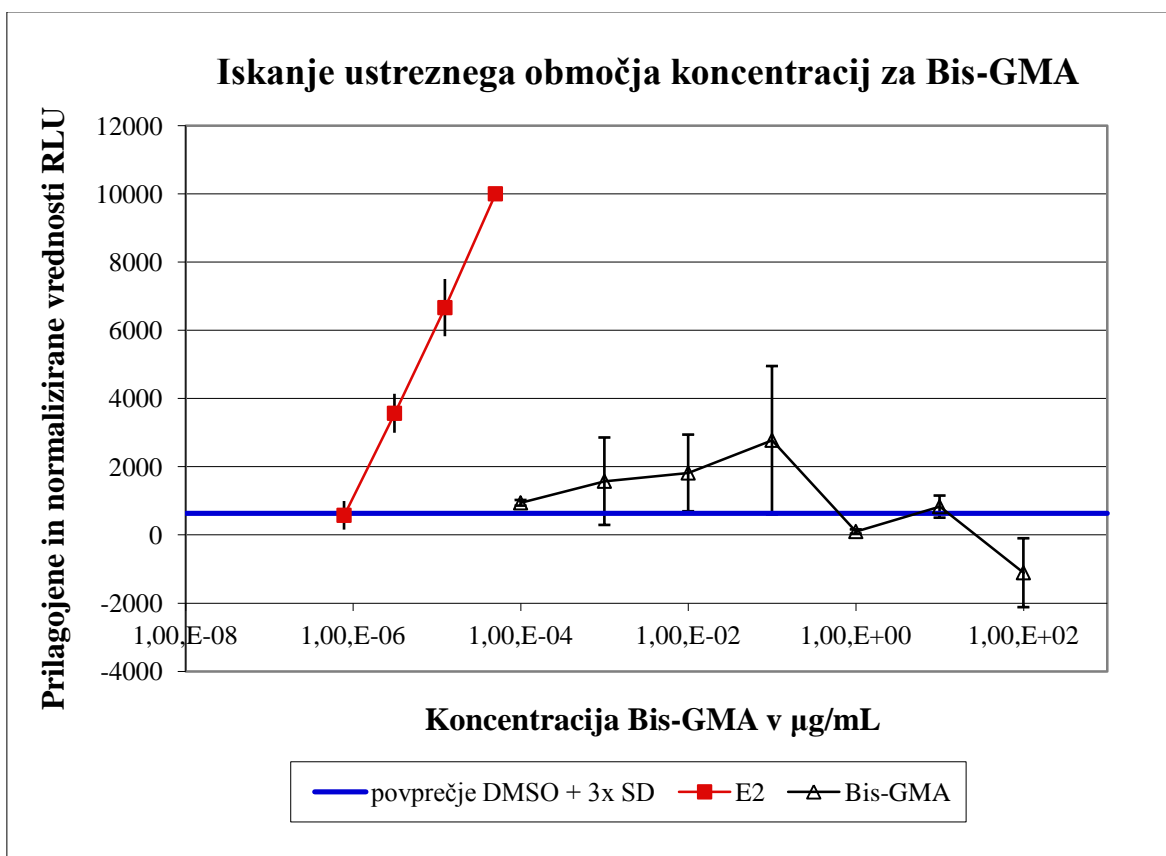
Rezultati 2. izvedbe testa MTS, prikazanih v obliki Grafa 2 kažejo, da je bilo preživetje celic v 11. pasaži v primerjavi s kontrolo močno znižano pri koncentracijah 25,0 $\mu\text{g/mL}$ (58,3 %), 50,0 $\mu\text{g/mL}$ (31,5 %) in 100 $\mu\text{g/mL}$ (28,0 %). Pri koncentracijah 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 in 0,01 $\mu\text{g/mL}$ pa je bilo preživetje celic večje od 80 %. Rezultati 2. paralelnega testa MTS so prav tako pokazali, da je bilo preživetje celic po 24-urni izpostavitvi Bis-GMA manjše od 80 % pri koncentracijah 25,0, 50,0 in 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 METODA LUMI-CELL[®] ER

4.2.1 Test iskanja območja koncentracij

S testom iskanja območja koncentracij smo ugotavljali, katero začetno koncentracijo spojine in kateri režim redčenja moramo uporabiti za celostni test, da bomo zajeli pravi interval za testiranje njene estrogene aktivnosti. Pri režimu redčenja se lahko odločimo za razmerje 1 : 2, s katerim zajamemo 3,5 logaritemskih razredov, ali pa za razmerje 1 : 5, ki obsega 7,5 logaritemskih razredov. Celice smo 24 ur tretirali s 7 različnimi koncentracijami raztopine Bis-GMA, in sicer s $1,00 \times 10^2$, $1,00 \times 10^1$, $1,00 \times 10^0$, $1,00 \times 10^{-1}$, $1,00 \times 10^{-2}$, $1,00 \times 10^{-3}$ in $1,00 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$, kontrolo topila (1 % raztopina DMSO) in 4 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E2, in sicer $5,00 \times 10^{-5}$, $1,25 \times 10^{-5}$, $3,13 \times 10^{-6}$ in $7,83 \times 10^{-7}$ $\mu\text{g/mL}$. Luminiscenco smo merili pri občutljivosti 180, čas

stresanja je bil 5 sekund, intervalni čas pa 1 sekunda. Rezultate meritev smo vstavili v pripravljeno Excelovo predlogo v list z neobdelanimi podatki (angl: RAW DATA sheet). V Excelovi predlogi smo najvišjo vrednost referenčnega standarda E2 normalizirali na vrednost 10.000 RLU in temu ustrezno prilagodili vse ostale meritve. Rezultate tega testa predstavlja Graf 3.



Graf 3: Prikaz normaliziranih vrednosti RLU po 24-urni izpostavljenosti 18. pasaže celične linije BG1Luc4E2 7 različnim koncentracijam Bis-GMA in 4 različnim koncentracijam referenčnega standarda E2. Prikazana je primerjava vrednosti z mejo indukcije, ki jo predstavlja povprečna vrednost kontrole DMSO, povečana za 3-kratno vrednost SD (modra črta).

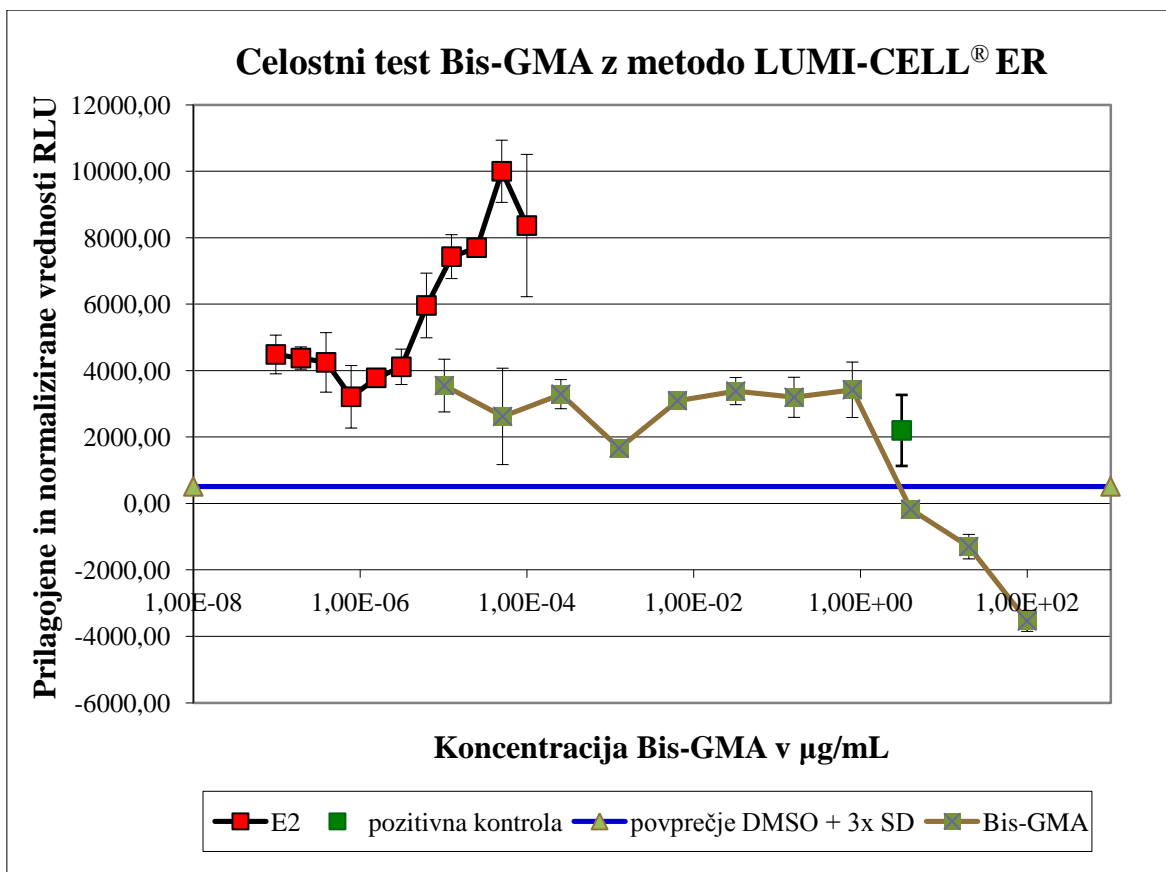
Test iskanja območja koncentracij je bil veljaven, saj je ustrezal kriterijem za sprejemljivost. DMSO kontrole je znotraj 2.5-kratne SD že obstoječih podatkov za to vrednost. Indukcija E2 je vsaj 3-kratna. Indukcija se izračuna z deljenjem najvišje povprečne vrednosti RLU referenčnega E2 s povprečno vrednostjo RLU kontrole DMSO. Odzivi za agonistično estrogenu aktivnost so bili večinoma pozitivni, pri koncentraciji 1.00 µg/mL pa negativni. Za celostni test smo zato izbrali redčenje v razmerju 1 : 5, ki zajame sedem logaritemskih velikostnih razredov, saj z redčenjem v razmerju 1 : 2 ne bi zajeli vseh možnih odzivov spojine. Začeti bi morali s koncentracijo Bis-GMA, ki je necitotoksična in 10-krat večja od tiste, ki da najvišjo vrednost RLU. Ker pa je obstajala

možnost, da bi s tako izbiro začetne koncentracije izpustili morebiten vrh oziroma plato odziva, smo redčenje začeli s koncentracijo $1.00 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, saj je izbrani režim redčenja 1 : 5 omogočal dovolj široko območje testiranja spojine, pri analizi rezultatov pa je nismo upoštevali.

4.2.2 Celostni test

S celostnim testom smo preučevali agonistično estrogeno aktivnost necitotoksičnih koncentracij spojine Bis-GMA na celični liniji BG1Luc4E2. Ta linija humanih celic rakavega jajčnika vsebuje reporterski gen (*luc*), ki v primeru estrogenosti testirane spojine sproži nastajanje encima luciferaza. Celice smo 24 ur tretirali z 11 različnimi koncentracijami Bis-GMA (1.00×10^2 , 2.00×10^1 , 4.00×10^0 , 8.00×10^{-1} , 1.60×10^{-1} , 3.20×10^{-2} , 6.40×10^{-3} , 1.28×10^{-3} , 2.56×10^{-4} , 5.12×10^{-5} , $1.02 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$), z 11 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E2 (1.00×10^{-4} , 5.00×10^{-5} , 2.50×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 6.25×10^{-6} , 3.13×10^{-6} , 1.56×10^{-6} , 7.83×10^{-7} , 3.92×10^{-7} , 1.95×10^{-7} , $9.78 \times 10^{-8} \mu\text{g/mL}$), s kontrolo topila (1 % raztopina DMSO) in pozitivno kontrolo (metoksiklor). Nato smo po dodatku luciferaznega reagenta z luminometrom izmerili emisije svetlobe v vsaki celični mikrokulturi in jih izrazili v obliki vrednosti RLU. Luminiscenco smo merili pri občutljivosti 180, čas stresanja je bil 5 sekund, intervalni čas pa 1 sekunda. Rezultate meritev smo vstavili v Excelovo predlogo, v list z neobdelanimi podatki, kjer smo najvišjo vrednost referenčnega standarda E2 normalizirali na vrednost 10.000 RLU.

Celostni test, ki ga prikazuje Graf 4, je veljaven, saj ustreza kriterijem za sprejemljivost. Povprečna vrednost RLU pozitivne kontrole je bila večja od povprečne vrednosti RLU kontrole DMSO, povečana za 3-kratno vrednost SD topila. Krivulja za referenčni standard E2 ima sigmoidno obliko, z vsaj 3 vrednosti v linearnem območju, na primer pri koncentracijah 3.13×10^{-6} , 6.25×10^{-6} in $1.25 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$. Indukcija E2 mora biti vsaj 3-kratna. V našem primeru je bila le malo nad to mejo (3.1). Povprečna vrednost kontrole DMSO pa je bila znotraj povprečnih vrednosti že obstoječih podatkov za to vrednost, povečanih za 2.5-kratno SD.



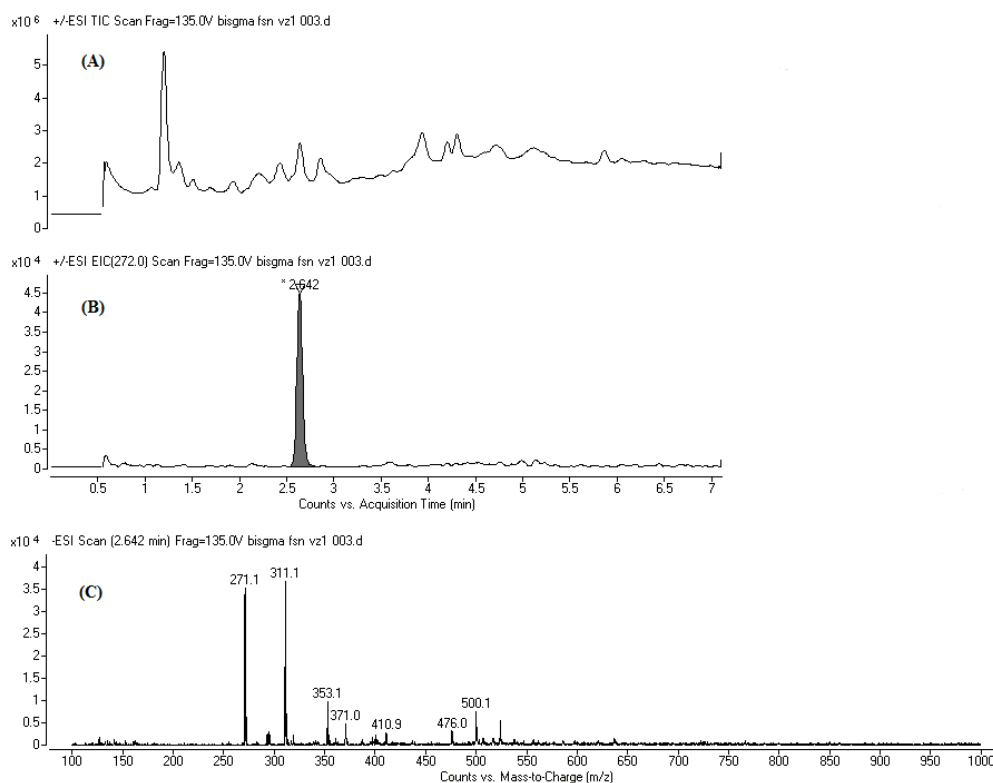
Graf 4: Prikaz normaliziranih vrednosti RLU po 24-urni izpostavljenosti 10. pasaže celične linije BG1Luc4E2 11 različnim koncentracijam Bis-GMA, 11 različnim koncentracijam referenčnega standarda E2 in pozitivni kontroli, glede na primerjalno vrednost z mejo indukcije, ki jo predstavlja povprečna vrednost kontrole DMSO, povečana za 3-kratno vrednost SD (modra črta).

Rezultati celostnega testa Bis-GMA prikazani na Grafu 4 izvirajo iz 3 točk meritev, ki so pod 20 % najvišje vrednosti referenčnega estrogena E2 (pod vrednostjo 2.000 RLU), in sicer pri koncentracijah 2.00×10^1 , 4.00×10^0 in 1.28×10^{-3} µg/mL. Kot smo že omenili, koncentracije 1.00×10^2 µg/mL nismo upoštevali zaradi njene citotoksičnosti. Pod to mejo so bile torej samo meritve treh necitotoksičnih koncentracij Bis-GMA, ostale pa presegajo vrednost 2.000 RLU. Koncentracijska krivulja je bila pri nizkih koncentracijah preiskovane spojine do 8.00×10^{-1} µg/mL nad modro črto in je izkazovala pozitiven odziv za estrogeno aktivnost, pri višjih pa je strmo padla pod to mejo in je imela negativen odziv. Amplituda odziva celic na Bis-GMA ni presegla 2.000 RLU.

4.3 REAKTIVNI METABOLITI BIS-GMA

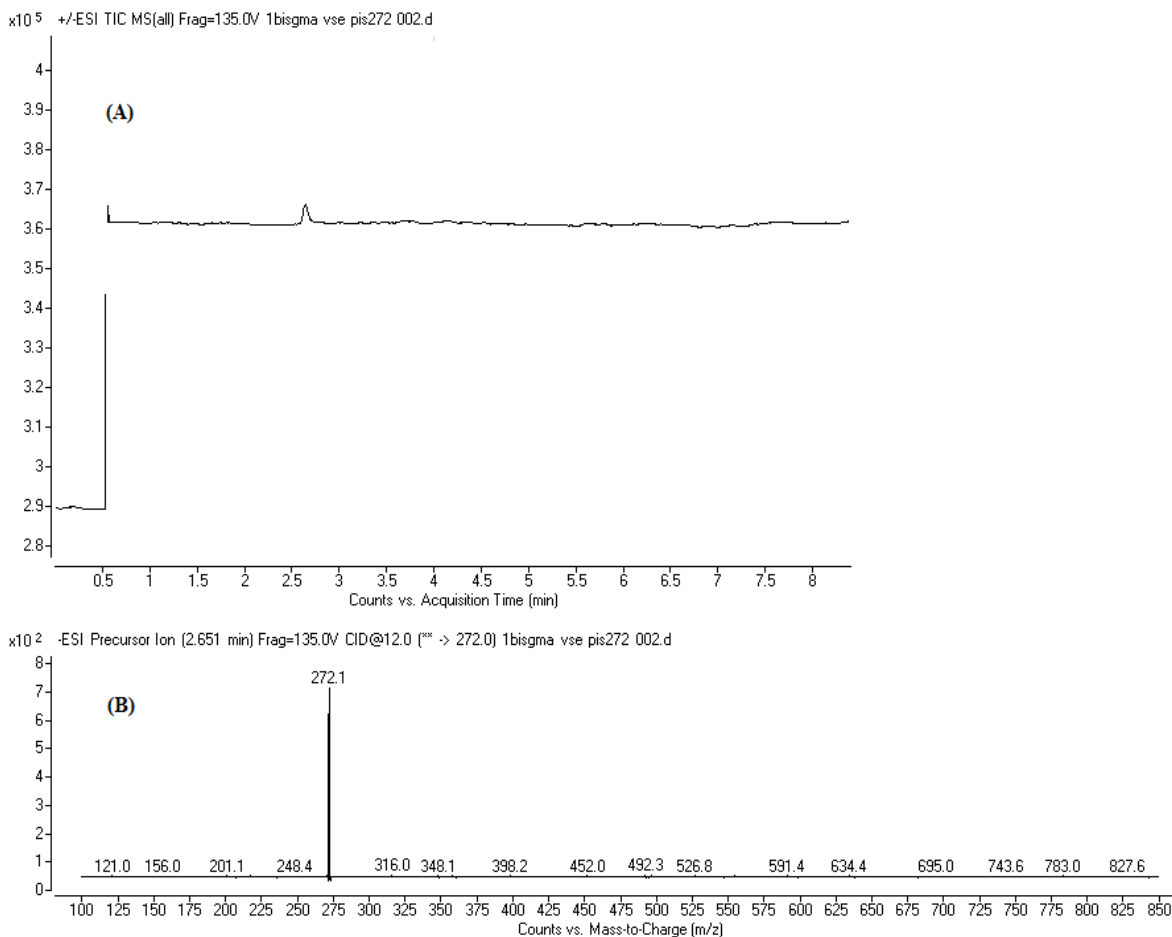
4.3.1 Metoda z uporabo humanih jetrnih mikrosomskih frakcij *in vitro*

Reaktivne metabolite Bis-GMA smo preučevali v humanih jetrnih mikrosomskih frakcijah *in vitro*, pri čemer smo Bis-GMA eno uro inkubirali skupaj z NADPH in GSH. Slednji se lahko konjugira z nastalimi elektrofilni. Pripravili smo tudi kontrolne mikroeprovete z mikrosomi, v katerih smo izvedli inkubacije brez dodatka GSH in/ali NADPH ter kontrolno mikroeproveto s fosfatnim pufrom in raztopino Bis-GMA. Pri kontrolni inkubaciji z GSH in brez NADPH smo ocenili samo kemijsko reaktivnost Bis-GMA. V primeru kontrolne inkubacije z NADPH, brez GSH, pa smo določali metabolite, ki nastanejo izključno zaradi delovanja citokromov P450. Končna molarna koncentracija Bis-GMA v mikroeprevetah je bila 100 μ M, GSH 5 mM, NADPH pa 1 mM. Pripravili smo tudi standardno raztopino Bis-GMA v 50 % acetonitrilu. Vse raztopine smo po inkubaciji centrifugirali in z metodo LC-MS/MS analizirali metabolite, prisotne v supernatantu. Analize omenjenih raztopin so predstavljene na Slikah od 7 do 13.



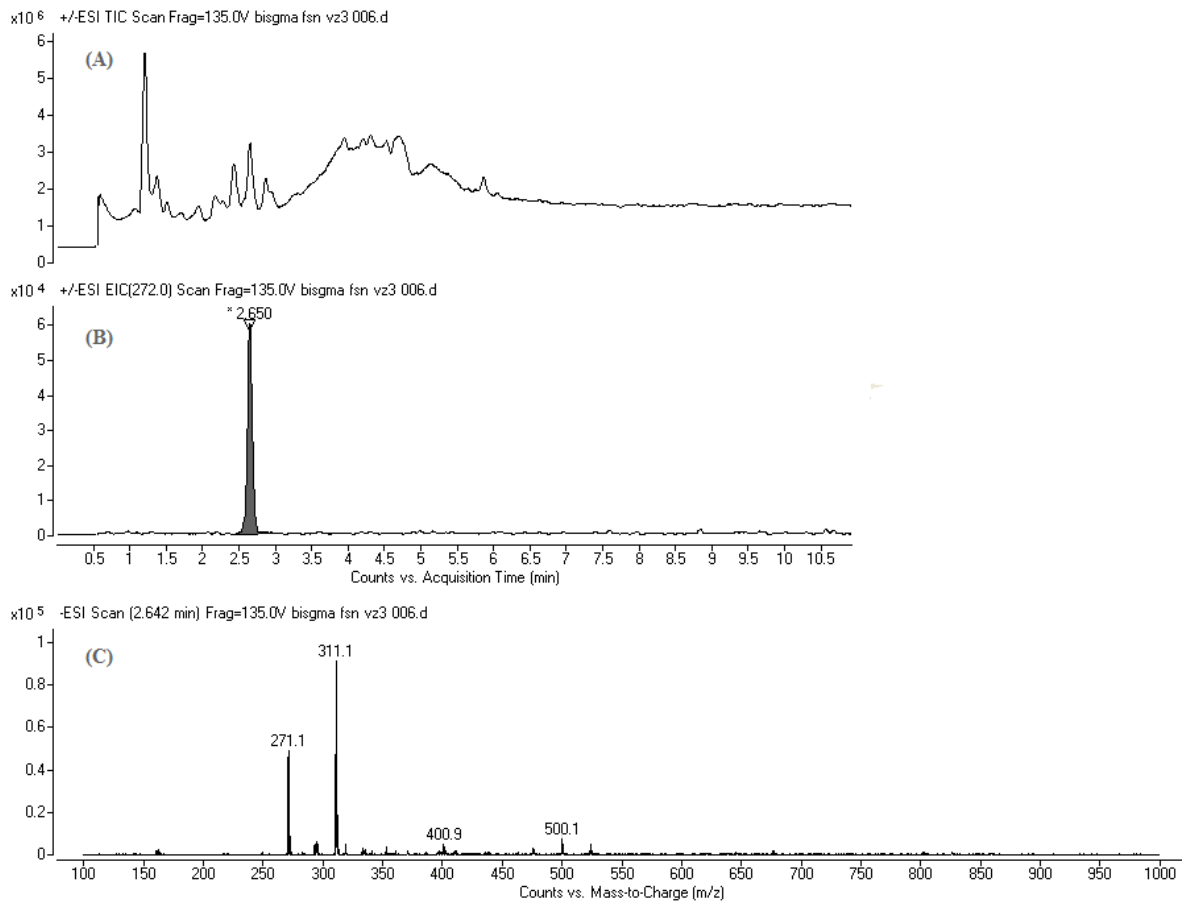
Slika 7: Analiza raztopine Bis-GMA s prisotnima GSH in NADPH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS. (A) Ionski kromatogram po snemanju celotnega spektra. (B) Ionski kromatogram ekstrahiranega fragmenta m/z 272, z vrhom pri času 2.642 minut. (C) Masni spekter pri času 2.642 minut.

Analiza raztopine Bis-GMA z GSH in NADPH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS je pokazala, da se v ionskem kromatogramu ekstrahiranega fragmenta m/z 272 pojavi vrh pri retencijskem času 2.642 (Slika 7B). Masni spekter pri času 2.642 vsebuje fragmente m/z 271.1, 311.1, 353.1, 371.0, 410.9, 476.0 in 500.1 (Slika 7C). Vrh pri retencijskem času 2.642 pa najverjetneje pripada GSH in ne konjugatu.



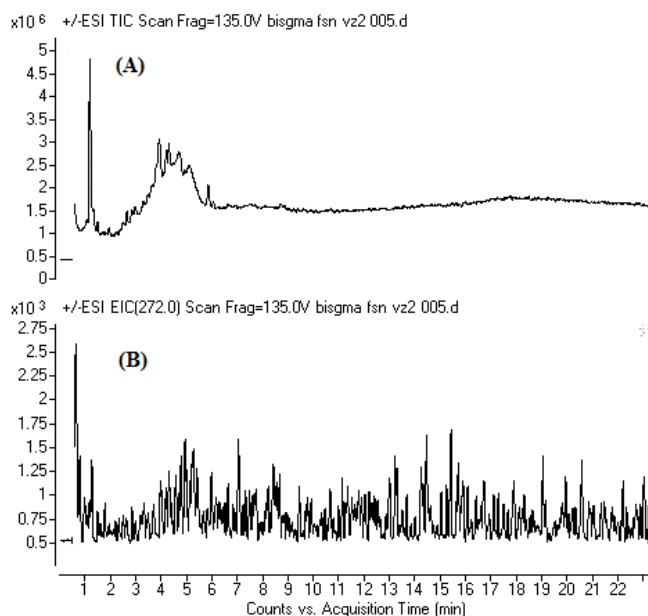
Slika 8: Analiza raztopine Bis-GMA s prisotnima GSH in NADPH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS. (A) Ionski kromatogram iskanja prekursorskega iona fragmenta m/z 272. (B) Pripadajoči masni spekter vrha ob času 2.651 minut.

Analiza raztopine Bis-GMA z GSH in NADPH je pokazala, da se pri iskanju prekursorskega iona fragmenta m/z 272 pojavi majhen vrh pri času 2.651 minut (Slika 8A), ki pa je na masnem spektru pokazal le molekulsko maso fragmenta m/z 272.1 (Slika 8B). Vrh pri času 2.651 minut torej verjetno pripada GSH, drugih fragmentov, ki bi kazali na nastanek konjugatov Bis-GMA pa nismo opazili.



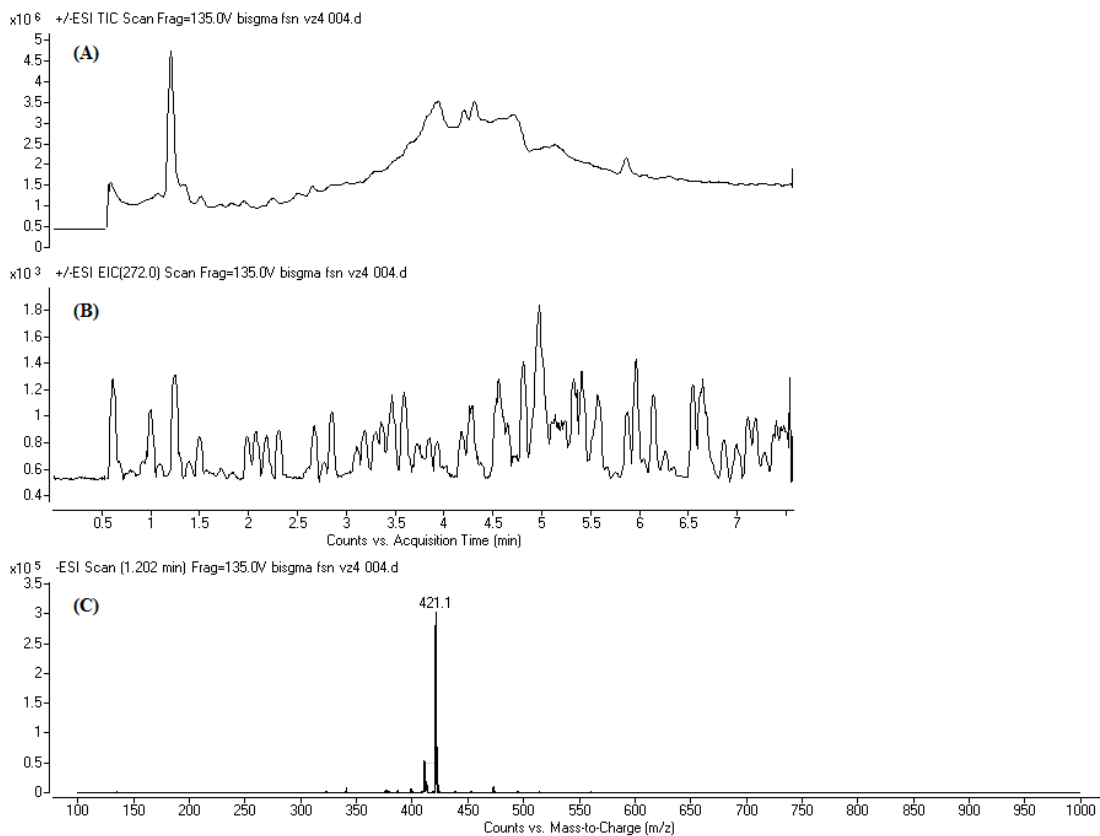
Slika 9: Analiza raztopine Bis-GMA s prisotnim GSH in brez NADPH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS. (A) Ionski kromatogram po snemanju celotnega spektra. (B) Ionski kromatogram ekstrahiranega fragmenta m/z 272, z vrhom pri času 2.650 minut. (C) Pripadajoči masni spekter vrha ob času 2.642 minut.

Iz analize kontrolne raztopine Bis-GMA s prisotnim GSH in brez NADPH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS na kromatogramu ekstrahiranega fragmenta m/z 272 vidimo vrh pri retencijskem času 2.650 (Slika 9B). Masni spekter pri vrhu ob času 2.642 je pokazal molekulske mase fragmentov m/z 271.1, 311.1, 400.9 in 500.1 (Slika 9C). Molekulska masa fragmenta m/z 271.1 najverjetneje ustreza GSH.



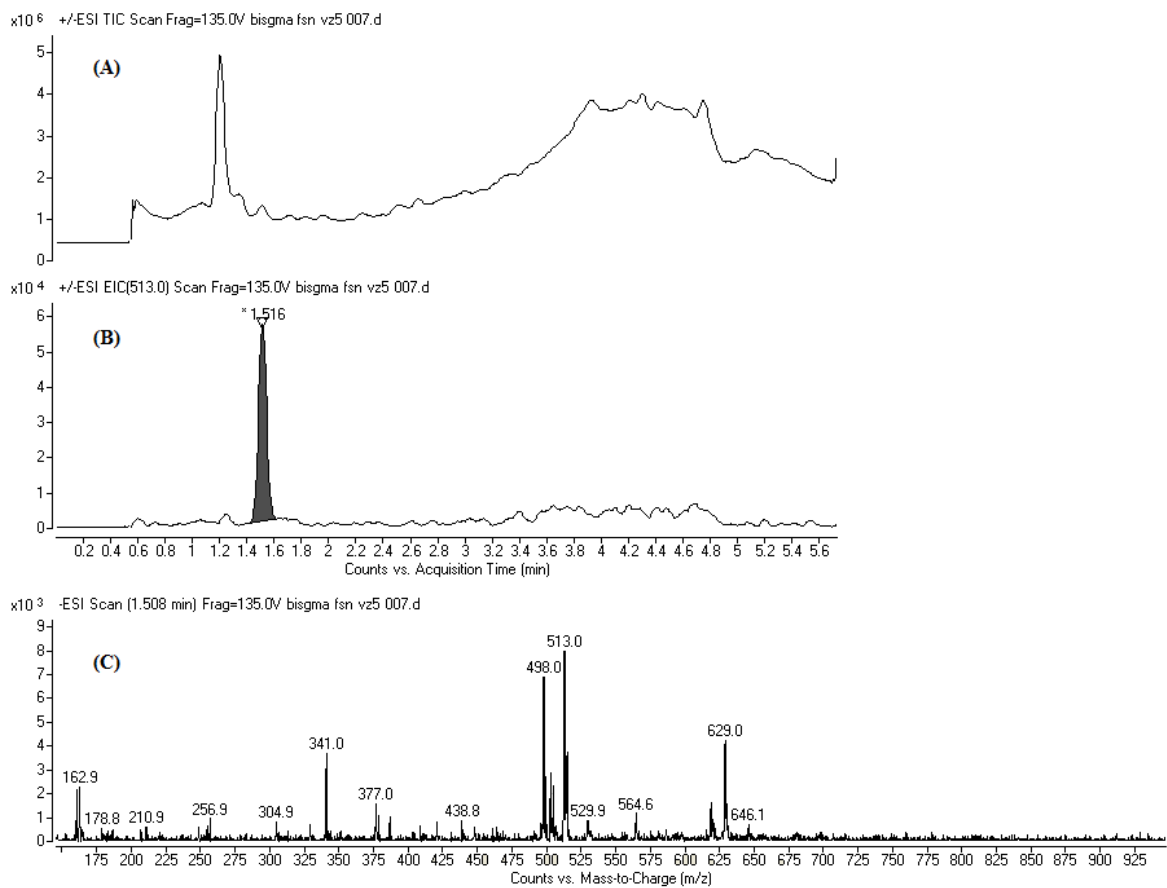
Slika 10: Analiza raztopine Bis-GMA s prisotnim NADPH in brez GSH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS. (A) Ionski kromatogram po snemanju celotnega spektra. (B) Ionski kromatogram ekstrahiranega fragmenta m/z 272.

V kontrolni raztopini Bis-GMA z NADPH in brez GSH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS na kromatogramu ekstrahiranega fragmenta m/z 272 nismo zaznali nobenega izrazitega vrha (Slika 10B). S to raztopino smo merili samo delovanje citokroma P450 brez dodanega GSH kot nukleofila. V odsotnosti GSH torej nismo detektirali metabolitov, ki bi bili izključno posledica delovanja citokromov P450.



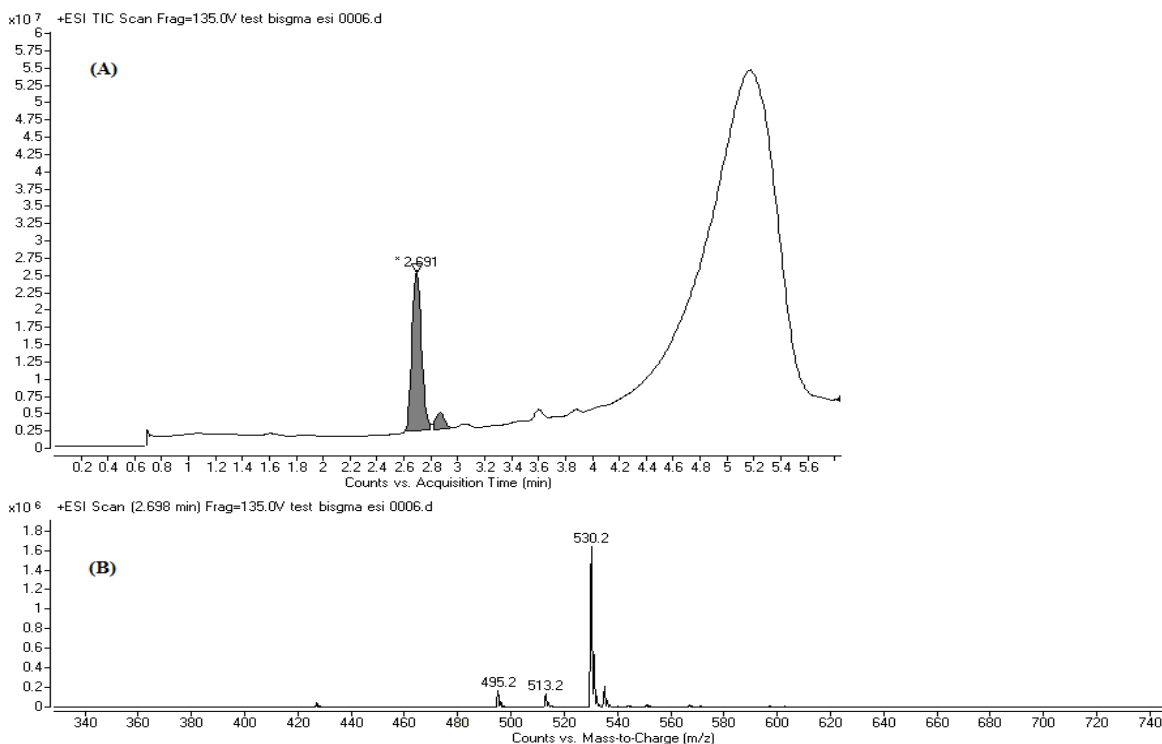
Slika 11: Analiza raztopine Bis-GMA brez NADPH in GSH v humanih jetrnih mikrosomih z metodo LC-MS/MS. (A) Ionski kromatogram po snemanju celotnega spektra. (B) Ionski kromatogram ekstrahiranega fragmenta m/z 272. (C) Masni spekter vrha ob času 1.202 minut.

Analiza raztopine Bis-GMA brez NADPH in GSH v humanih jetrnih mikrosomih je pokazala, da v odsotnosti obeh reagentov na Bis-GMA ne poteče nobena metabolična pretvorba. Masni spekter v vrhu ob času 1.202 minut tako vsebuje le fragment m/z 421.1, ki ustreza molekuli Bis-GMA (Slika 11C).



Slika 12: Analiza raztopine Bis-GMA v fosfatnem pufru z metodo LC-MS/MS. (A) Ionski kromatogram po snemanju celotnega spektra. (B) Ionski kromatogram ekstrahiranega fragmenta m/z 513. (C) Masni spekter vrha ob času 1.508.

Analiza raztopine Bis-GMA v fosfatnem pufru z metodo LC-MS/MS je na kromatogramu ekstrahiranega fragmenta m/z 513 pokazala vrh pri času 1.516 (Slika 12B). Masni spekter v vrhu ob času 1.508 je pokazal molekulsko maso fragmenta m/z 513, ki ustreza spojini Bis-GMA (Slika 12C).



Slika 13: Analiza standardne raztopine Bis-GMA v 50 % acetonitrilu z metodo LC-MS/MS v pozitivni ionizaciji. (A) Ionski kromatogram po snemanju celotnega spektra z vrhom pri času 2.691. (B) Masni spekter vrha ob času 2.698.

Analiza standardne raztopine Bis-GMA v 50 % acetonitrilu z metodo LC-MS/MS je na kromatogramu po snemanju celotnega spektra pokazala vrh pri času 2.691 (Slika 13A). Masni spekter vrha ob času 2.698 je razkril molekulsko maso fragmenta m/z 513, ki ustreza spojini Bis-GMA (Slika 13B). Standardno raztopino Bis-GMA v 50 % acetonitrilu smo pripravili za umerjanje inštrumenta.

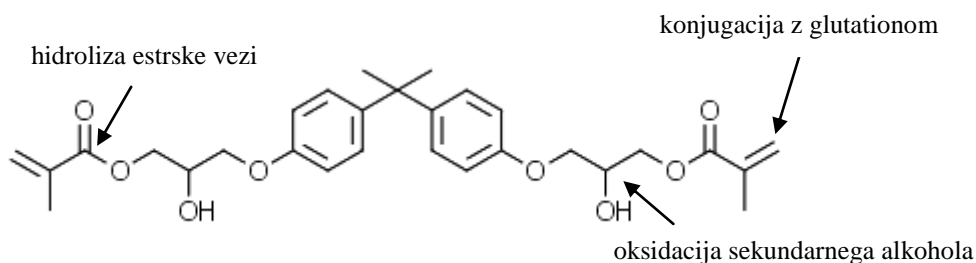
4.3.2 Napoved metaboličnih reakcij Bis-GMA s programom Meteor Nexus

Nastanek možnih metabolitov Bis-GMA smo preučevali tudi s programskim orodjem Meteor Nexus *in silico*. Ta predvidi tako reakcije citokroma P450 kot tudi necitokromne reakcije prve in druge faze metabolizma. Uporabili smo nastavitve za prikaz najverjetnejših (angl: probable) metabolitov preiskovane spojine v prvem nivoju, in sicer z relativno oceno in brez nje. Z najstrožjimi kriteriji smo pri obeh nastavitvah relativne ocene dobili 4 možne metabolite, ki jih predstavljamo v Preglednici V.

Preglednica V: Rezultati napovedi metaboličnih reakcij Bis-GMA s programom Meteor Nexus ob nastavitvi prikaza najverjetnejših metabolitov v prvem nivoju.

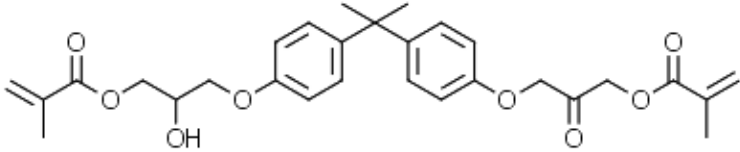
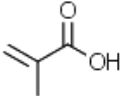
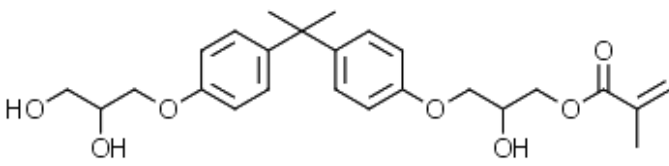
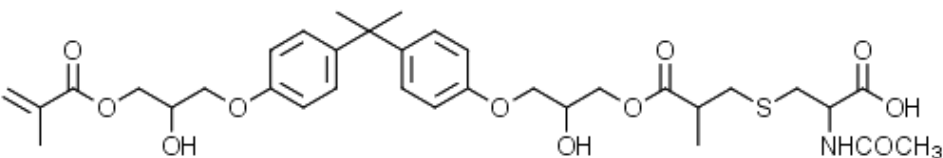
Oznaka metabolita	Ime reakcije	Formula	Molekulska masa [g/mol]	LogP	Faza reakcije	Encim
M1	Oksidacija sekundarnih akrilnih alkoholov	$C_{29}H_{34}O_8$	510.6	4.93	Faza I	ADH
M2	Hidroliza akrilnih estrov	$C_4H_6O_2$	86.1	0.66	Faza I	hidrolaza
M3	Hidroliza akrilnih karboksilnih estrov	$C_{25}H_{32}O_7$	444.5	3.12	Faza I	hidrolaza
M4	Konjugacija nenasičenih spojin α in β z glutationom	$C_{34}H_{45}NO_{11}S$	675.8	3.93	Faza II	GST, GT, peptidaza in NAT

Rezultati kažejo, da lahko trije najverjetnejši metaboliti nastanejo že v prvi fazi metabolizma. Metabolit M1 z molsko maso 510.6 g/mol bi lahko nastal pri oksidaciji sekundarnih akrilnih alkoholov v prisotnosti alkohol dehidrogenaze (ADH), metabolita M2 in M3 z molskima masama 86.1 g/mol in 444.5 g/mol pa bi se lahko pojavila po hidrolizi akrilnega karboksilnega estra v prisotnosti hidrolaze. V drugi fazi metabolizma bi lahko nastal konjugat Bis-GMA z GSH, in sicer v prisotnosti encimov glutationske S-transferaze (GST), glutationaze (GT), peptidaze in N-acetiltransferaze (NAT), pri čemer se po konjugaciji nenasičene vezi odcepita glutamini in glicilni ostanek tako, da nastane spojina z molsko maso 675.8 g/mol. Vsi štiri predvideni metaboliti so bolj polarni od izhodne spojine. Pretvorbe, ki lahko potečejo na molekuli Bis-GMA, so nazorneje prikazane na Sliki 14, v Preglednici VI pa so predstavljene strukture predvidenih metabolitov te spojine.



Slika 14: S programom Meteor Nexus predvidene metabolne pretvorbe, ki lahko potečejo na molekuli Bis-GMA.

Preglednica VI: Strukture najverjetnejših metabolitov Bis-GMA.

Oznaka metabolita	Struktura metabolitov
M1	
M2	
M3	
M4	

5 RAZPRAVA

Bis-GMA je glicidil metakrilatni derivat bisfenola A, ki deluje šibko estrogeno. Kot monomer se uporablja predvsem v zobozdravstvu za izdelavo kompozitnih zalivk, v ortopediji za izdelavo kostnega cementa, njegovi uretanski derivati pa so sestavine konic umetnih nohtov. Raziskave kažejo, da se nepolimerizirani monomeri Bis-GMA lahko sproščajo iz kompozita in tako povzročajo neželene učinke v organizmu. Njegova vloga v hormonskem sistemu in njegov metabolizem pa sta še dokaj neraziskana. Namen naše študije je bil preučiti njegovo citotoksičnost, estrogeno aktivnost ter tvorbo reaktivnih metabolitov z metodami *in vitro*. Na celicah BG1Luc4E2 smo citotoksičnost Bis-GMA preučili s testom MTS, njegovo estrogenost pa z metodo LUMI-CELL[®] ER. Tvorbo reaktivnih metabolitov smo najprej spremljali z uporabo humanih jetrnih mikrosomskih frakcij *in vitro*, in sicer z dodatkom GSH in NADPH, nato pa smo s programom Meteor Nexus izvedli še napoved metaboličnih reakcij Bis-GMA *in silico*.

5.1 VREDNOTENJE REZULTATOV TESTA MTS

Za določanje estrogenega delovanja Bis-GMA smo morali najprej določiti, pri katerih koncentracijah ta deluje citotoksično na celično linijo BG1Luc4E2. Nato pa smo analizirali rezultate, izmerjene z necitotoksičnimi koncentracijami. Citotoksičnost Bis-GMA smo določali s testom MTS in vizualno oceno viabilnosti (Preglednica II). Najprej smo izvedli dva neodvisna testa MTS, s katerima smo dobili praktično enake rezultate (Grafa 1 in 2), razen pri prvem (Graf 1) je bil odstotek preživelih celic malo povečan zaradi proliferacije celic. Preživetje celic po izpostavitvi Bis-GMA za 24 ur je bila pri obeh testih manjša od 80 % le pri koncentracijah 25.0, 50.0 in 100 µg/mL. Rezultati testa MTS so bili tudi v skladu z vizualno oceno viabilnosti, s katero smo pri koncentraciji 100 µg/mL stopnjo preživetja celic ocenili z oceno 4, ki je pomenila do 40 % viabilnost. Vplive koncentracij 20.0 µg/mL in nižje pa smo ocenili z 1, kar je pomenilo normalno celično morfologijo in gostoto in najmanj 80 % viabilnost. Točne koncentracije 20.0 µg/mL z našim testom MTS sicer nismo zajeli, smo pa zato iz podatkov, prikazanih v Grafih 1 in 2, sklepali, da je 80 % viabilnost celic lahko prisotna tudi pri tej koncentraciji. S testom MTS smo torej pokazali, da so bile koncentracije Bis-GMA, od vključno 25.0 µg/mL (0.05 mM) in višje citotoksične za celično linijo BG1Luc4E2. Najvišja necitotoksična koncentracija je bila 12.5 µg/mL (0.02 mM), glede na vizualno oceno pa 20.0 µg/mL. Pri analizi rezultatov celostnega testa zato nismo upoštevali le koncentracije 100 µg/mL.

Rezultati testa MTS za Bis-GMA na celični liniji BG1Luc4E2 so bili podobni tudi nekaterim izsledkom študij na drugih celičnih linijah z drugimi metodami. Yano in sodelavci so testirali citotoksičnost Bis-GMA na celicah LSC2 (humane celice zobne pulpe) pri koncentracijah 0.01, 0.02, 0.03, in 0.04 mM, kjer je Bis-GMA po 48-urni izpostavitvi razen pri prvi koncentraciji povzročil statistično značilno zmanjšanje deleža preživelih celic. Pri koncentraciji 0.04 mM pa je izzval tudi fragmentacije jeder in apoptozo celic (32). Engelmann in sodelavci so citotoksičnost Bis-GMA določali v humanih gingivalnih fibroblastih. Uporabili so koncentracije od 0.001 do 0.25 mM. Po 24-urni inkubaciji Bis-GMA pri koncentracijah 0.001-0.025 mM ni statistično značilno zmanjšal števila celic, pri 0,05 mM (89 %) ter 0.1 in 0.25 mM (50 %) pa je deloval citotoksično (33). Glede na te raziskave vidimo, da lahko nepolimeriziran Bis-GMA v zadostni koncentraciji povzroča toksične učinke že lokalno v ustni votlini ter tudi kasneje po absorpciji v gastrointestinalnem traktu.

5.2 VREDNOTENJE REZULTATOV METODE LUMI-CELL[®] ER

LUMI-CELL[®] ER je reporterska metoda z reporterskim genom v stabilno transfeciranih celicah, ki jo je za identifikacijo spojin z agonistično ali antagonistično aktivnostjo na ER validiral Nacionalni toksikološki program (NTP) Medagencijskega centra za oceno alternativnih toksikoloških metod (NICEATM). Leta 2012 pa je bila potrjena tudi s strani Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD). Zaradi stabilne transfekcije lahko celično linijo uporabljamo tudi za testiranje v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami, kar omogoča hitro testiranje spojin.

Zaradi navedenih razlogov smo to metodo uporabili za preučevanje estrogenosti Bis-GMA. Ta je derivat bisfenola A, ki ima dokazano šibko estrogeno delovanje. V diplomski nalogi smo zato preučevali, ali je Bis-GMA tudi agonist ER. V ta namen smo izvedli 4 poskuse, od katerih so bili prvi trije neveljavni (rezultati niso prikazani), četrti pa je ustrezal pogojem sprejemljivosti, zato smo ga celovito ovrednotili (Graf 4).

Agonistično aktivnost preiskovane spojine na ER lahko ovrednotimo kot pozitivno ali negativno, možno pa je tudi, da dobimo nezadostne rezultate. Spojina je pozitivna za agonistično aktivnost na ER, kadar ima koncentracijsko krivuljo najprej na bazni liniji, nato pa strmo naraste in se zaključi z vrhom ali platojem. Lahko pa izkazuje tudi samo po dve izmed teh značilnosti. Naraščajoča krivulja mora vsebovati vsaj 3 točke meritev, pri

čemer je ena lahko del vrha ali pa prva točka platoja. Imeti mora tudi določeno amplitudo odziva, saj mora predstavljati razlika med bazno linijo in vrhom krivulje vsaj 20 % najvišje vrednosti za referenčni estrogen (2.000 RLU, kadar je največja vrednost za referenčni estrogen prilagojena na 10.000 RLU). Naši rezultati za Bis-GMA nimajo značilne koncentracijske krivulje za agonistično aktivnost (Graf 4). Amplituda odziva pa tudi ni dosegla vrednosti 2.000 RLU, zato spojine ne moremo ovrednotiti kot pozitivne za agonistično estrogenu aktivnost na ER. Spojina je negativna za agonistično aktivnost na ER, kadar rezultati ne ustrezajo kriterijem za pozitivno klasifikacijo in če so vse točke meritev pod 20 % najvišje vrednosti referenčnega estrogena. Pod to mejo so bile v našem primeru 3 necitotoksične koncentracije meritev Bis-GMA, ostale pa so presegale mejo 2.000 RLU. Zato spojine nismo mogli popolnoma ovrednotiti kot negativno za agonistično delovanje na ER. V kolikor z rezultati meritev ne moremo potrditi prisotnosti ali odsotnosti agonistične aktivnosti spojine, se šteje, da so nezadostni oziroma neustrezni.

Z našimi rezultati agonističnega delovanja Bis-GMA na ER torej nismo potrdili. Glede na strukturo Bis-GMA smo sicer pričakovali, da ni agonist ER, saj sta hidroksilni skupini na para mestu benzenovega obroča zaetreni z glicidil metakrilatom. Za vezavo na ER bi namreč morali biti ti skupini prosti. Negativno delovanje do določene mere nakazujejo tudi nekatere raziskave *in vitro*, narejene na drugih celičnih linijah in z drugimi metodami. Olea in sodelavci so z metodo celične proliferacije na celicah MCF-7 (celična linija raka dojke) in testa kompetitivne vezave na ER ugotovili, da Bis-GMA ne deluje estrogenu, ker ne promovira celične proliferacije in ne tekmuje z E2 za vezavo na ER (41). Hashimoto s sodelavci je testiral estrogenu delovanje Bis-GMA z metodo reporterskega gena na plesnih in s kompetitivno metodo njegove vezave na ER. Pri tem prav tako ni ugotovil tovrstne aktivnosti (42). Nekatere raziskave pa nakazujejo mejno estrogenu delovanje Bis-GMA. Tako je Mariotti s sodelavci z metodo *in vivo* na glodalcih raziskoval, ali Bis-GMA 3 tedne po subkutanem injiciranju izzove stimulacijo rasti celic maternice. V koncentracijah, ki so bile veliko višje od tistih, ki jih sicer lahko izmerijo v slini (100 µg/kg teže), Bis-GMA v maternici miši ni povečal niti velikosti niti števila celic, je pa izzval povečanje teže maternice in vsebnosti kolagena v njej. Sklepali so, da je Bis-GMA v tem poskusu pokazal le delno estrogenu delovanje (43). Glede na to, da estrogeni vplivajo lahko tudi na obzobna tkiva, saj lahko povzročijo njihovo vnetje in krvavitve pri ščetkanju zob, bi pravzaprav

morali uporabo Bis-GMA v zobnih zalivkah preprečiti, če bi ta v nadaljnjih študijah pokazal pozitivno estrogeno delovanje.

Pred veljavnim poskusom smo, kot smo že omenili, izvedli tri celostne poskuse, ki pa niso ustrezali pogojem sprejemljivosti. Povprečna vrednost RLU pozitivne kontrole je bila pri njih manjša od povprečne vrednosti RLU kontrole DMSO, povečane za 3-kratno vrednost SD. Krivulja referenčnega standarda E2 ni imela sigmoidne oblike in linearnega območja, indukcija E2, ki se izračuna z deljenjem najvišje povprečne vrednosti RLU referenčnega E2 s povprečno vrednostjo RLU kontrole DMSO, pa tudi ni bila 3-kratna. Neustrezni rezultati bi lahko bili posledica visokih pasaž celic, ki smo jih uporabili za testiranje (18., 20. in 21.), in sicer kljub temu, da naj bi celična linija ostala funkcionalna do 30. pasaže, ne da bi se pri tem zmanjšala njena aktivnost (5). Vedno več raziskav na drugih celičnih linijah namreč dokazuje, da se z višjimi pasažami celic lahko spremenijo tudi njihove lastnosti, kot so: spremembe v morfologiji, odzivi na dražljaj, hitrost rasti, izražanje proteinov in učinkovitost transfekcije v primerjavi z nižjimi pasažami (44–47). Po treh neuspešnih preizkusih smo zato odmrznili celice 6. pasaže in jih v zaporednih kulturah presajali naprej do 10. pasaže tako, da smo končno dobili veljaven test, ki smo ga nato lahko analizirali. Ker pa rezultati tega testa niso potrdili prisotnosti ali odsotnosti agonistične aktivnosti Bis-GMA na ER, so potrebna nadaljnja testiranja z isto metodo pri nižjih pasažah celic, s čimer bi predvidoma dosegli tudi boljše odzive celic oziroma njihovo večjo indukcijo z referenčnim estrogenom. Tako bi najverjetneje lahko zanesljivo potrdili odsotnost agonistične estrogene aktivnosti spojine. Če pri tem ne bi bili uspešni, pa bi morali uporabiti kako drugo metodo *in vitro*. Z metodo LUMI-CELL[®] ER smo preučevali vezavo Bis-GMA na klasični steroidni ER. Ker pa estrogene spojine lahko povzročajo neželene učinke tudi preko drugih mehanizmov (glej poglavje 1.3), bi za končno oceno tveganja morali nujno izvesti tudi študijo *in vivo*.

5.3 VREDNOTENJE REAKTIVNIH METABOLITOV BIS-GMA

Tvorbo reaktivnih metabolitov smo preučevali z uporabo humanih jetrnih mikrosomskih frakcij *in vitro* ob dodatku NADPH in GSH (nukleofil). V teh celičnih frakcijah so prisotni predvsem citokromi P450, s katerimi smo preučevali reakcije oksidacije ter morebitne konjugacije z GSH. Metabolite smo po ustrezni inkubaciji mikrosomov analizirali v supernatantu z metodo LC-MS/MS.

Rezultati, izmerjeni v supernatantu humanih jetrnih mikrosomov nakazujejo, da Bis-GMA pri naših pogojih inkubacije, s končnimi molarnimi koncentracijami Bis-GMA 100 μ M, GSH 5 mM in NADPH 1 mM, v vsakem od preiskovanih vzorcev ne tvori konjugatov z GSH ali drugih metabolitov. Analiza vzorca, ki je vsebovala raztopino Bis-GMA skupaj z GSH in NADPH v humanih jetrnih mikrosomih, z metodo LC-MS/MS je namreč pokazala, da se pri iskanju prekursorkega iona ne pojavi noben vrh fragmenta m/z 272, ki je značilen za konjugate z GSH (Slika 8). Opazili smo majhen vrh, ki pa verjetno ne pripada konjugatu, ampak predstavlja lažno pozitiven rezultat zaradi visoke koncentracije GSH, za katerega je odziv m/z 272 tudi tipičen. To lahko vidimo tudi v pripadajočem spektru, v katerem je viden le fragment m/z 272 (Slika 8B) in pri meritvah vzorca s prisotnim GSH in brez NADPH iz retencijskega časa vrha, ki ustreza GSH (Slika 9). Drugi metaboliti, ki smo jih iskali z opazovanjem izbranih reakcij prehoda (MRM), v vzorcu niso bili prisotni ali pa se niso ionizirali. V kontrolnem vzorcu z NADPH in brez GSH nismo opazili posledic delovanja citokroma P450 (Slika 10), prav tako pa tudi ne kemijskih reakcij z Bis-GMA v prisotnosti GSH in odsotnosti NADPH (Slika 9). Konjugatov ali produktov oksidacije torej nismo zaznali, najverjetneje zaradi težave z ionizacijo molekul.

Metabolizem Bis-GMA smo preučevali tudi *in silico*, in sicer s programom Meteor Nexus, ki predvidi reakcije citokroma P450 ter necitokromne reakcije prve in druge faze metabolizma. Možnost napovedi metabolizma analizira glede na lipofilnost preiskovane spojine. Rezultati preučevanja napovedi metaboličnih reakcij Bis-GMA s programom Meteor Nexus, nastavljenega na prikaz najverjetnejših metabolitov v prvem nivoju, so pokazali 4 možne metabolite z molskimi masami 510.6, 86.1, 444.5 in 675.8 g/mol (Preglednica VI). Ker so vsi polarnejši od izhodne spojine, se verjetno lažje in hitreje izločijo iz organizma. Trije najverjetnejši metaboliti nastanejo že v prvi fazi metabolizma, in sicer v prisotnosti encimov alkoholne dehidrogenaze (ADH) in hidrolaze. Četrty napovedani metabolit pa se lahko pojavi v drugi fazi metabolizma v prisotnosti

glutationske S-transferaze (GST), glutationaze (GT), peptidaze in N-acetiltransferaze (NAT). V tem primeru se Bis-GMA konjugira z GSH po mehanizmu Michaelove adicije (konjugativna 1,4-adicija na α , β nenasičene karbonilne spojine), in sicer na mestu dvojne vezi, ki sicer sodeluje pri polimerizaciji. Po konjugaciji nenasičene vezi pa se odcepita še glutamilni in glicilni ostanek. Konjugacijo GSH lahko katalizira glutationska S-transferaza ali pa ta poteče spontano. Glutationaza nato hidrolizira glutationski del konjugata tako, da odstrani glutamilni del. V naslednjem koraku peptidaza hidrolizira glicilni del, pri čemer ostane le še cisteinski konjugat, ki ga N-acetiltransferaza pretvori v merkapturno kislino. Bis-GMA je torej elektrofil, saj se lahko konjugira z nukleofilnim GSH. V organizmu se zato lahko veže na nukleofilne celične makromolekule in povzroča neželene učinke. Na spojini lahko poteče tudi hidroliza, pri čemer med drugim nastane metakrilna kislina (M2), ki je dokaj toksična in korozivna (48). Toksičnost metabolitov M1 in M3 pa bi morali preveriti z nadaljnjimi študijami.

Pri preučevanju metabolizma Bis-GMA s programom Meteor Nexus pri najstrožje nastavljenih kriterijih nismo dobili bisfenola A kot možnega metabolita. Tudi raziskave kažejo, da kompozitne zalivke iz Bis-GMA ne sproščajo bisfenola A v slino. Njegovega sproščanja ni niti v primeru kemijske in encimske hidrolize, kar so preučili z encimi, izoliranimi iz podganjih jeter (21). Vendar pa je pri uporabi Bis-GMA treba paziti na njegovo čistoto, da preprečimo morebitne neželene učinke bisfenola A, ki bi ga lahko izhodni produkt vseboval.

Če primerjamo rezultate preučevanja metabolizma s programom Meteor Nexus s tistimi, dobljenimi z metodo v humanih jetrnih mikrosomskih frakcijah *in vitro*, vidimo, da lahko Bis-GMA teoretično tvori metabolite, ki pa jih pri analizi inkubacijskih raztopin nismo detektirali. Alkoholna dehidrogenaza ne spada v družino citokromov P450 in je v večji meri prisotna v celičnem citosolu, ne pa v mikrosomski frakciji. To bi lahko bil razlog, da po inkubaciji spojine v humanih jetrnih mikrosomskih frakcijah nismo detektirali metabolita M1, ki bi ga ta encim sicer lahko tvoril. Hidroliza poteče v prisotnosti hidrolaz, ki so prav tako večinoma v citosolu, v manjši meri pa tudi v mikrosomski frakciji in v plazmi. Ker v humanih jetrnih mikrosomih ni veliko hidrolaz, hidroliziranih metabolitov M2 in M3 pri našem poskusu tudi nismo pričakovali. Hidroliza Bis-GMA pa bi sicer verjetno lahko potekla kemijsko, če bi bila inkubacija daljša. Konjugata Bis-GMA z GSH z molsko maso 675.8 g/mol pri iskanju prekursorkega iona fragmenta m/z 272 nismo

detektirali. Razlog za to bi lahko bila nepopolna ionizacija, zato bi morali poskuse ponoviti pod drugačnimi pogoji. Pri tem bi morali zagotoviti popolno ionizacijo, nastavitve iskanja prekursorskega iona pa bi lahko prilagodili tudi molekulski masi napovedanega konjugata z GSH (675.8 g/mol).

Metabolizem Bis-GMA je pretežno še neraziskan, saj v študijah nismo zasledili konjugatov Bis-GMA z GSH, prav tako ne metabolita M1. Našli pa smo podatke za druga dva metabolita, ki so ju našli Koin in sodelavci, ko so raziskovali kemijsko razgradnjo dentalnega kompozita. Bis-GMA je bil v tem primeru kovalentno vezan na porozno površino SiO₂. Ta kompozit so izpostavili vodnemu okolju za 2 tedna in nato z LC-MS analizirali nastale razgradne produkte. Detektirali so hidrolizirane produkte Bis-GMA, med katerimi so bili metakrilna kislina (MA oziroma naš M2), metabolit M3 (Bis-GMA – MA), poleg tega pa tudi metabolit brez dveh metakrilnih skupin (Bis-GMA – 2MA). Hidroliza torej lahko poteče tudi kemijsko, in sicer po dveh tednih inkubacije (49). Metabolit brez dveh metakrilnih skupin so zaznali tudi Burmaster in sodelavci, in sicer po enourni inkubaciji Bis-GMA v podganjih in humanih frakcijah S9 (50). V študiji *in vitro*, v kateri so uporabili holinske esteraze, so prav tako dokazali hidrolizo Bis-GMA v metabolit brez dveh metakrilnih skupin, ki pa v nadaljnjih študijah *in vitro* tako kot Bis-GMA ni pokazal estrogene aktivnosti (21). Metabolizem Bis-GMA bi bil lahko predmet nadaljnjih raziskav z metodami *in vitro* z namenom, da bi poleg konjugata z GSH in metakrilne kisline natančneje preučili tudi prisotnost drugih možnih metabolitov in njihovo toksičnost.

6 SKLEP

Bis-GMA je monomer, ki se uporablja v zobozdravstvu pri izdelavi kompozitnih zalivk ter v ortopediji za izdelavo kostnega cementa. Raziskave kažejo, da se nepolimeriziran monomer lahko sprošča iz kompozita in povzroča neželene učinke v organizmu. V diplomski nalogi smo najprej s testom MTS preučili citotoksičnost Bis-GMA na celični liniji BG1Luc4E2. Citotoksične koncentracije spojine so bile 25, 50 in 100 µg/mL. Izsledke tega testa smo uporabili za določanje njegove agonistične estrogene aktivnosti z metodo LUMI-CELL[®] ER. Tvorbo reaktivnih metabolitov smo preučevali z metodo kvalitativnega zajetja elektrofilov z GSH v humanih jetrnih mikrosomskih frakcijah in nastale metabolite detektirali z metodo LC-MS/MS. Metabolizem Bis-GMA smo napovedovali tudi s programom Meteor Nexus *in silico*.

Rezultati za agonistično estrogenu aktivnost Bis-GMA so bili nezadostni, zato tovrstne aktivnosti nismo niti potrdili niti izločili. Glede na kemijsko strukturo spojine bi sicer lahko sklepali, da te aktivnosti nima, saj hidroksilna skupina na para mestu benzilnega obroča ni prosta, to pa je bistveno za vezavo na ER in posledično estrogenu delovanje. Negativno agonistično estrogenu aktivnost Bis-GMA so potrdili tudi v nekaterih raziskavah na drugih celičnih linijah in z drugimi metodami. Rezultati, izmerjeni v supernatantih humanih jetrnih mikrosomskih frakcij so pokazali, da pri naših eksperimentalnih pogojih Bis-GMA ni tvoril konjugatov z GSH in tudi ne drugih metabolitov. To bi lahko bila posledica nepopolne ionizacije ali pa neustreznih pogojev testiranja. S programom Meteor Nexus smo namreč pri najstrožjih kriterijih uspeli z veliko verjetnostjo napovedati 4 možne metabolite, pri čemer lahko trije nastanejo v prvi, konjugat Bis-GMA z GSH pa v drugi fazi metabolizma.

Bis-GMA, ki je citotoksičen že pri koncentraciji 25 µg/mL, je najverjetneje negativen za agonistično estrogenu aktivnost na ER in tvori konjugat z GSH, to pa pomeni, da lahko povzroča neželene učinke v organizmu. Vendar pa bi morali te domneve preveriti in potrditi v okviru nadaljnjih raziskav. Zato predlagamo nadaljnje testiranje estrogenosti Bis-GMA na celicah iz zgodnjih pasaj, bodisi z metodo LUMI-CELL[®] ER ali z drugimi metodami *in vitro*. Za končno potrditev nastanka metabolitov predlagamo optimizacijo naše metode, pri čemer bi iskanje prekursorskega iona prilagodili molekularni masi napovedanega konjugata in zagotovili popolno ionizacijo ter tako metabolite tudi detektirali.

LITERATURA

1. Timbrell J: Principles of biochemical toxicology, 4. izdaja, Informa Healthcare USA, New York, 2009: 1–14, 75–127.
2. Geisinger KR et al.: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors. *Cancer* 1989; 63, 280–8.
3. Schechtman LM: Implementation of the 3Rs (refinement, reduction, and replacement): validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. *ILAR J* 2002; 43: 85–94.
4. [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem/tg\(96\)9&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem/tg(96)9&doclanguage=en), dostopano: julij 2013.
5. OECD, Test No. 457: BG1Luc estrogen receptor transactivation test method for identifying estrogen receptor agonists and antagonists, OECD guidelines for the testing of chemicals, OECD Publishing 2012, Section 4.
6. Rogers JM, Denison MS: Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In Vitro Mol Toxicol* 2000; 13 (1): 67–82.
7. Hodgson E: A textbook of modern toxicology, 3. izdaja, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2004, 149–161, 306, 348, 529.
8. O'Brien P, Haskins JR: In vitro cytotoxicity assessment. *Methods Mol Biol* 2007; 356: 415–25.
9. Stoddart MJ: Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*, 2011; 740: 1–6.
10. Lee HR et al.: Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. *J Cell Mol Med* 2013; 17: 1–11.
11. De Coster S, Larebeke N: Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. Hindawi Publishing Corporation. *J Environ Public Health* 2012; 2012: 1–52.
12. Viñas R, Jeng YJ, Watson CS: Non-Genomic Effects of Xenoestrogen Mixtures. *Int J Environ Res Public Health* 2012; 9 (8): 2694–714.
13. Söderholm KJ, Mariotti A: Bis-GMA-based resins in dentistry: Are they safe? *JADA* 1999; 130 (2): 201–9.

14. Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJ: Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 110 (1-2): 138-43.
15. Lemke TL, Williams DA: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 1309.
16. Timbrell J: Introduction to toxicology, 3. izdaja, Informa Healthcare USA, New York, 2002: 40–55.
17. Stachulski AV et al.: The generation, detection, and effects of reactive drug metabolites. *Med Res Rev*, Wiley Periodicals Inc. 2012; 0: 1–96.
18. Ma S, Subramanian R: Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2006; 41 (9): 1121–39.
19. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=99437678&viewopt=PubChem>, dostopano: maj 2013.
20. Stansbury JW: Dimethacrylate network formation and polymer property evolution as determined by the selection of monomers and curing conditions. *Dent Mater* 2012; 28 (1): 13–22.
21. Gottfried S, Arenholt-Bindslev D: Biocompatibility of dental Materials, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2009: 99–137.
22. Pomrink GJ, DiCicco MP, Clineff TD, Erbe EM: Evaluation of the reaction kinetics of CortossTM; a thermoset cortical bone void filler. *Biomaterials* 2003; 24 (6): 1023–31.
23. Bowen RL: Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bisphenol and glycidyl acrylate. United States Patent, Patent number 3,066,112, date of patent Nov. 27, 1962.
24. Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Ž, Peterlin Mašič L: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol In Vitro* 2013, 27 (4): 1267–76.
25. Lin NJ, Lin-Gibson S: Osteoblast response to dimethacrylate composites varying in composition, conversion and roughness using a combinatorial approach. *Biomaterials* 2009; 30 (27): 4480–7.
26. Dickey BT, Tyndyk MA, Doman DA, Boyd D: *In silico* evaluation of stress distribution after vertebral body augmentation with conventional acrylics,

- composites and glass polyalkenoate cements. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012; 5 (1): 283–90.
27. Erbe EM, Clineff TD, Gualtieri G: Comparison of a new bisphenol-a-glycidyl dimethacrylate-based cortical bone void filler with polymethyl methacrylate. *Eur Spine J* 2001; 10: 147–52.
28. Lilley PH, Peterson S: Radiation curable nail coatings and artificial nail tips and methods of using same. United States Patent, Patent number 6,803,394, date of patent Oct. 12, 2004.
29. Rai AK, Ansari A, Gera A, Jain AK: Toxicological Aspect of Orthodontic Bonding Materials. *Virtual Journal of Orthodontics* 2011; 9 (3).
30. Yoshii E: Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997; 37 (4): 517–24.
31. Ausiello P et al.: Cytotoxicity of dental resin composites: an *in vitro* evaluation. *J Appl Toxicol* 2013; 33 (6): 451–7.
32. Yano J et al.: Apoptosis and survivability of human dental pulp cells under exposure to Bis-GMA. *J Appl Oral Sci* 2011; 19 (3): 218–22.
33. Engelmann J et al.: Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* 2004; 25 (19): 4573–80.
34. Butler M, Spearman M: Cell counting and viability measurements. *Methods in Biotechnology* 2007; 24: 205–22.
35. Gray Jr. LE et al.: Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod Toxicol* 1997; 11 (5): 719–50.
36. Wilson VS, Bobseine K, Gray Jr. LE: Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol Sci* 2004; 81 (1): 69–77.
37. Interagency coordinating committee on the validation of alternative methods. Test method evaluation report. The LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) test method: An *in vitro* assay for identifying human estrogen receptor agonist and antagonist activity of chemicals. NIH Publication, Research triangle park, NC: National institute of environmental health sciences 2011; 11–7814.

38. Trontelj J, Lušin TT: In vitro modeli za preučevanje metabolizma učinkovin v jetrih. *Farm vest* 2011; 62: 2–5.
39. Hollenberg PF, Kent UM, Bumpus NN: Mechanism-based inactivation of human cytochromes P450s: Experimental characterization, reactive intermediates, and clinical implications. *Chem Res Toxicol* 2008; 21 (1): 189–205.
40. T’Jollyn H et al.: Evaluation of three state-of-the-art metabolite prediction software packages (Meteor, MetaSite, and StarDrop) through independent and synergistic use. *Drug Metab Dispos* 2011; 39 (11): 2066–75.
41. Olea N et al.: Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (3): 298–305.
42. Hashimoto Y et al.: Estrogenic activity of chemicals for dental and similar use in vitro. *J Mater Sci–Mater M* 2000; 11 (8): 465–8.
43. Mariotti A, Söderholm KJ, Johnson S: The in vivo effects of BisGMA on murine uterine weight, nucleic acids and collagen. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 (6): 1022–7.
44. Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G: LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from high and low passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem* 1997; 62: 391–9.
45. Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM: Influence of culture time and passage number on morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214 (3): 248–57.
46. Chang-Liu CM, Woloschak GE: Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett* 1997; 113 (1-2): 77–86.
47. Yu H, Cook TJ, Sinko PJ: Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* 1997; 14 (6): 757–62.
48. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel: Final report of the safety assessment of methacrylic acid. *Int J Toxicol* 2005; 24: 33–51.
49. Koin PJ, Kilislioglu A, Zhou M, Drummond JL, Hanley L: Analysis of the degradation of a model dental composite. *J Dent Res* 2008; 87 (7): 661–5.

50. Burmaster S, Smith R, Eick D, Kostoryz EL, Yourtee D: *In vitro* stability, metabolism, and transport of dental monomers made from bisphenol A and bisphenol F. *Macromol Biosci* 2002; 2: 365–79.