

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINKA PANKER
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINKA PANKER

**DOLOČANJE UČINKA NEKATERIH BISFENOLOV IN PARABENOV NA
ANDROGENSKE IN GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE**

**DETERMINATION OF THE EFFECTS OF SOME BISPHENOLS AND PARABENS
ON THE ANDROGEN AND GLUCOCORTICOID RECEPTORS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za vso pomoč, usmerjanje in spodbudo pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi mladi raziskovalki Katri Kolšek, mag. farm. za vsestransko pomoč pri izvajanju praktičnega dela in za vse koristne nasvete. Posebna zahvala gre mojim domačim in Borutu za spodbujanje in potrpežljivost tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Tinka Panker

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	ii
KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO PREGLEDNIC.....	v
POVZETEK.....	vi
ABSTRACT.....	viii
SEZNAM OKRAJŠAV.....	x
1 UVOD.....	12
1.1 HORMONSKI MOTILCI.....	12
1.1.1 VALIDIRANI TESTI ZA DOLOČANJE VPLIVA SPOJIN NA HORMONSKI SISTEM.....	3
1.2 HORMONSKI SISTEM.....	4
1.2.1 STEROIDNI HORMONI.....	5
1.2.2 MEHANIZEM DELOVANJA ANDROGENOV IN GLUKOKORTIKOIDOV PREK JEDRNIH RECEPTORJEV.....	6
1.2.3 ANDROGENSKI SISTEM.....	8
1.2.4 GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM.....	9
1.3 BISFENOL A IN NJEGOVI ANALOGI.....	11
1.3.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI BISFENOLA A.....	11
1.3.2 UPORABA BISFENOLA A.....	12
1.3.3 IZPOSTAVLJENOST BISFENOLU A.....	13
1.3.4 BIOMONITORING BISFENOLA A.....	15
1.3.5 TOKSIKOKINETIČNE LASTNOSTI BISFENOLA A.....	16
1.3.6 TOKSIKODINAMIČNE LASTNOSTI BISFENOLA A.....	17
1.3.7 BISFENOL AF.....	20
1.3.8 BISFENOL F.....	21
1.3.9 BISFENOL S.....	22
1.3.10 OSTALI ANALOGI BPA.....	22
1.4 PARABENI.....	23
1.4.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI PARABENOV.....	24
1.4.2 UPORABA IN DELOVANJE PARABENOV KOT KONZERVANSOV..	24
1.4.3 IZPOSTAVLJENOST PARABENOM.....	25

1.4.4	BIOMONITORING PARABENOV	26
1.4.5	TOKSIKOKINETIČNE LASTNOSTI PARABENOV	26
1.4.6	TOKSIKODINAMIČNE LASTNOSTI PARABENOV	28
2	NAMEN DELA	35
3	MATERIALI IN METODE	37
3.1	TESTIRANE SPOJINE	37
3.1.1	CELIČNA LINIJA MDA-kb2	40
3.1.2	OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI	41
3.1.3	TEST CITOTOKSIČNOSTI	44
3.1.4	DOLČANJE UČINKOV NA ANDROGENSKIH IN GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH	46
3.1.5	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	48
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	49
4.1	BISFENOLI	49
4.1.1	TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI	49
4.1.2	DOLOČANJE UČINKA BISFENOLOV NA ANDROGENSKIH RECEPTORJIH	50
4.1.3	DOLOČANJE UČINKA BISFENOLOV NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH	55
4.2	PARABENI	61
4.2.1	TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI	61
4.2.2	DOLOČANJE UČINKA PARABENOV NA ANDROGENSKIH RECEPTORJIH	62
4.2.3	DOLOČANJE UČINKA PARABENOV NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH	66
5	SKLEP	70
6	LITERATURA	73

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz strukturnih domen jedrnega receptorja.	7
Slika 2: Shematski prikaz delovanja jedrnega oziroma steroidnega receptorja.	8
Slika 3: Sinteza polikarbonata iz BPA in difenilkarbonata.	13
Slika 4: Shematski prikaz reakcije hidrolize polikarbonata.	14
Slika 5: Struktura barvila MTS (tetrazolijeva sol) in njegovega produkta formazana.	45
Slika 6: Reakcija bioluminescence, ki jo katalizira kresničkina luciferaza.	46
Slika 7: Rezultati treh bioloških ponovitev testa MTS.	50
Slika 8: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko neselektivnega določanja agonističnega delovanja.	52
Slika 9: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na AR.	53
Slika 10: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na AR.	55
Slika 11: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na GR.	56
Slika 12: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na GR.	58
Slika 13: Rezultati treh bioloških ponovitev testa MTS.	62
Slika 14: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko neselektivnega določanja agonističnega delovanja.	63
Slika 15: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na AR.	64
Slika 16: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na AR.	65
Slika 17: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na GR.	67
Slika 18: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na GR.	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Fizikalno kemijske lastnosti BPA.	12
Preglednica II: Fizikalno kemijske lastnosti parabenov.	24
Preglednica III: Izmerjene koncentracije parabenov v vzorcih urina ljudi.	26
Preglednica IV: Zbrani rezultati dveh do zdaj izvedenih <i>in vitro</i> študij določanja učinkov parabenov na AR.	30
Preglednica V: Rezultati <i>in vitro</i> študije določanja učinkov parabenov na GR, uporabljeni sta dve celični liniji; 3T3-L1 in COS-70.	31
Preglednica VI: Rezultati raziskav vpliva parabenov na steroidogenezo, izločanje testosterona, tvorbo spermijev, semenske tekočine in razvoj spolnih organov pri samcih.	33
Preglednica VII: Preglednica struktur testiranih spojin (preiskovanih spojin in kontrol).	38

POVZETEK

Bisfenoli in parabeni so hormonski motilci, ki jih zelo pogosto najdemo v izdelkih za vsakdanjo uporabo. Bisfenoli se zaradi ugodnih lastnosti uporabljajo predvsem pri izdelavi plastike, parabeni pa se zaradi protimikrobnih lastnosti v največji meri uporabljajo v kozmetičnih izdelkih. Zaradi široke in pogoste uporabe smo jim izpostavljeni v vsakdanjem življenju, vendar le v nizkih koncentracijah. Po drugi strani pa vedno več *in vitro* in *in vivo* študij poroča, da lahko že zelo nizke koncentracije nekaterih preiskovanih spojin preko različnih mehanizmov in tarč motijo delovanje hormonskega sistema, in tako izkazuje možnost, da negativno vplivajo na naše zdravje. Najpogostejši mehanizem delovanja hormonskih motilcev zajema interakcije z receptorjem oz. interakcije na ravni delovanja endogenih hormonov. Bisfenol A in parabeni delujejo kot šibki estrogeni, rezultati novejših študij kažejo, da delujejo tudi antiandrogensko. Zelo malo pa je znanega o njihovem vplivu na glukokortikoidni sistem. Slednje velja tudi za analoge bisfenola A, ki so glede delovanja precej manj ali pa sploh niso raziskani.

Glavna naloga naše raziskave je bila proučevanje učinkov nekaterih bisfenolov in parabenov na androgenskih (AR) in glukokortikoidnih (GR) receptorjih. Kot modelni sistem za ugotavljanje učinkov smo uporabili celično linijo MDA-kb2, ki izraža AR in GR in omogoča določanje učinkov na vsakem receptorju posebej, z razlikovanjem agonističnega in antagonističnega učinka spojin. Na začetku eksperimentalnega dela smo s pomočjo metabolnega testa določili ali je katera preiskovana spojina v prvotno izbrani koncentraciji, tj. 50 μM , citotoksična. Spojine, ki so bile pri tej koncentraciji citotoksične ali so se obarjale v gojitvenem mediju, smo testirali v nižjih koncentracijah. Tako smo testirali bisfenol A (BPA), bisfenol AF (BPAF) in bisfenol C (BPC) pri 10 μM , 4,4'-sulfonil-bis(2-metilfenol) (dBPS), 4,4'-tiodifenol (TIO), propilparaben (PrPB) in butilparaben (BuPB) pa pri 25 μM . Ostale preiskovane spojine, bisfenol F (BPF), bisfenol S (BPS), bisfenol Z (BPZ), bis[4-(2-hidroksietoksi)fenil]sulfon (BHEPS), metilparaben (MePB) in etilparaben (EtPB), pa smo testirali pri prvotno izbrani koncentraciji, tj. 50 μM . Za določanje učinkov na AR in GR smo uporabili *in vitro* presejalni luciferazni test, ki temelji na aktivaciji transkripcije gena za luciferazo. Inducibilno izražanje reporterskega gena za luciferazo je uravnava s promotorskim zaporedjem, na katero se veže AR oz. GR v obliki kompleksa z ligandom, kar predstavlja transkripcijski faktor. Rezultati našega eksperimentalnega dela so pokazali, da vse preiskovane spojine izkazujejo učinek na AR

in/ali GR. Nobena preiskovana spojina ne deluje agonistično na AR, pri vseh, razen pri BHEPS, PrPB in BuPB, pa smo na AR zaznali signifikanten antagonističen učinek. EtPB, PrPB in BuPB so dosegli agonističen učinek na GR, signifikanten antagonističen učinek na GR pa je dosegel le BPZ. BPF, BHEPS in TIO ter BuPB pa so signifikantno povečali učinek hidrokortizona pri testiranju antagonističnega delovanja spojin na GR. Preiskovane spojine so povzročile opisane signifikantne učinke pri dokaj visokih koncentracijah, ki bi jim bili zaradi nizkih dnevni vnosov lahko le izjemoma izpostavljeni. Zavedati pa se moramo potencialne nevarnosti, ki jo lahko predstavlja tudi izpostavljenost majhnim odmerkom.

Rezultati našega eksperimentalnega dela opravičujejo potrebo po nadaljnjem raziskovanju delovanja parabenov, bisfenola A in njegovih analogov na hormonski sistem. Za popolno ovrednotenje tveganja, ki ga za zdravje ljudi predstavljajo preiskovane spojine, bo treba izvesti še veliko *in vitro* in *in vivo* ter tudi epidemioloških študij.

ABSTRACT

Bisphenols and parabens are endocrine disruptors that are commonly found in products for everyday use. The properties of bisphenols are ideal for the manufacture of plastics and parabens with their antimicrobial properties are mainly used in cosmetic products. Due to their wide and frequent use we are exposed to them in everyday life, but only in low concentrations. However, an increasing number of *in vitro* and *in vivo* studies report that even very low concentrations of some of the studied compounds interfere with the hormonal system and possibly have a negative effect on human health, acting via different mechanisms and targets. The most common action mechanism of endocrine disruptors includes interactions with the receptor or interactions with the endogenous hormones functioning. Bisphenol A and parabens act as weak estrogens, with the results of recent studies suggesting that they also act as antiandrogens. Very little is known about their effects on the glucocorticoid system. The same goes for the bisphenol A analogues, the functioning of which has been studied to a lesser extent or not at all.

The main objective of this study was to determine the effects of some bisphenols and parabens on the androgen (AR) and glucocorticoid (GR) receptors. The model system used to understand the effects was cell line MDA-kb2, which expresses both the AR and GR, and allows the determination of effects on the receptors, with the distinction between agonistic and antagonistic effect of the compounds. At the beginning of the experiment a MTS metabolic test was carried out to discover, whether any of the investigated compounds were cytotoxic in the original concentration, i.e. 50 μM . Some compounds, which were proven to be cytotoxic or inadequate due to the precipitation of compounds in the culture medium, were tested at lower concentrations. Such compounds were bisphenol A (BPA), bisphenol AF (BPAF) and bisphenol C (BPC), which were tested at 10 μM , and 4,4'-sulphonyl-bis(2-methylphenol) (dBPS), 4,4'-thiodiphenol (TIO), propylparaben (PrPB) and butylparaben (BuPB), which were tested at 25 μM . Bisphenol F (BPF), bisphenol S (BPS), bisphenol Z (BPZ), bis[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]sulfone (BHEPS), methylparaben (MePB) and ethylparaben (EtPB) were tested at 50 μM . To determine the effects on AR and GR the luciferase *in vitro* screening test was used, which is based on the activation of transcription. Induced reporter gene expression for luciferase is controlled by

the promoter sequence to which AR or GR binds to in the complex form with a ligand, which is a transcription factor. The results of our experimental work suggest that all tested compounds show the effect on AR and/or GR. None of the investigated compounds work agonistically on AR and all except BHEPS, PrPB and BuPB, were discovered to have a significant antagonistic effect on the AR. EtPB, PrPB and BuPB reached an agonistic effect on GR and only BPZ reached a significant antagonistic effect on GR. BPF, BHEPS, TIO and BuPB have significantly increased the effect of the hydrocortisone in the antagonistic action of the tested compounds on the GR. Investigated compounds caused described significant effects in relatively high concentrations; due to low daily intakes the exposition of humans to these concentrations is not likely. However, the potential hazard of exposure to small doses must not be overlooked.

The results of our experimental work justify the need for further studying of parabens, bisphenol A and its analogues on the hormonal system. Many more in vitro and in vivo studies as well as epidemiological studies have to be performed before the risks of the studied compounds to human health can be fully assessed.

SEZNAM OKRAJŠAV

AMP	adenozin monofosfat
AR	androgenski receptor
ARH	arilni ogljikovodikov receptor
ATP	adenozin trifosfat
BHEPS	bis[4-(2hidroksietoksi)fenil] sulfon
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPC	bisfenol C
BPF	bisfenol F
BPS	bisfenol S
BPZ	bisfenol Z
BuPB	butilparaben
CAT	kloramfenikol acetil transferaza
dBPS	4,4'-sulfonilbis(2-metilfenol)
DHT	dihidrotestosteron
DMSO	dimetilsulfoksid
EC ₅₀	koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka
E2	estradiol
ER	estrogenski receptor
ERR γ	estrogenskemu podoben γ -receptor
EtPB	etilparaben
FBS	fetalni goveji serum
FLUT	flutamid
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GnRH	gonadoliberin
GPR30	z G-proteinom sklopljen estrogenski receptor 30
GR	glukokortikoidni receptor
HC	hidrokortizon
HM	hormonski motilci

HRE	hormonsko odzivni element
IC ₅₀	inhibitorna koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka
JECFA	evropska agencija za varnost hrane
LD ₅₀	letalna doza, odmerek, ki povzroči smrt pri 50 % izpostavljenih osebkih
LH	luteinizirajoči hormon
LOAEL	najnižji testni odmerek pri katerem je opaziti negativen učinek
LOD	meja zaznave
MePB	metilparaben
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NOAEL	najvišji testni odmerek pri katerem ni opaziti nobenega negativnega učinka
OECD	organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PBS	fosfatni pufer
PHBA	p-hidroksi benzojska kislina
PP _i	pirofosfat
PPAR γ	s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor gama
PrPB	propilparaben
RU-486	mifepriston
TDI	dovoljen dnevni vnos
TIO	4,4'-tiodifenol
TM	telesna masa

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

V zadnjem času so za znanstvenike in širšo javnost posebej zanimive spojine, ki izkazujejo vpliv na hormonski sistem, saj ta skupaj z živčnim sistemom predstavlja glavni regulatorni mehanizem za številne ključne funkcije v telesu človeka in živali. Hormonski motilci (HM) so eksogene snovi, ki motijo sintezo, sproščanje, transport, vezavo, delovanje in/ali eliminacijo organizmu lastnih hormonov, kateri so odgovorni za vzdrževanje homeostaze, razmnoževanje, rast in razvoj (1). HM torej prek različnih mehanizmov spremenijo delovanje hormonskega sistema in so lahko posledično zdravju škodljivi. Najpogostejši mehanizem delovanja HM zajema interakcije z receptorjem oz. interakcije na nivoju delovanja endogenih hormonov. Tako se v telesu vežejo na receptor in izzovejo njegov odziv (agonistično delovanje) ali pa samo zasedejo vezavno mesto endogenemu hormonu in s tem preprečijo njegovo delovanje (antagonistično delovanje). Receptorske tarče zajemajo estrogenske (ER), androgenske (AR), progesteronske, glukokortikoidne (GR), mineralokortikoidne, tiroidne, retinoidne in arilne ogljikovodikove (ARH) receptorje ter s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor gama (PPAR γ). Novejša dognanja kažejo, da HM ne delujejo samo na jedrne receptorje, temveč tudi na steroidne nejedrne receptorje in nesteroidne receptorje, kot so serotoninški, dopaminski in noradrenalinski receptorji (2, 3).

Začetnik problematike HM je dietilstilbestrol, ki se je sredi 20. stoletja uporabljal za preprečevanje splava med rizično nosečnostjo in ga je FDA pozneje umaknila iz tržišča, ker je pri potomkah, ki so mu bile izpostavljene med razvojem v maternici, povzročal večjo incidenco vaginalnega tumorja. Skupina HM je zelo heterogena, nimajo veliko skupnih strukturnih in tako tudi ne fizikalno kemijskih lastnosti. Skupno jim je le, da so lipofilni, nekateri so sposobni tudi bioakumulacije in da so vsesplošno prisotni v nizkih koncentracijah. Pogosto vsebujejo fenolno in halogensko funkcionalno skupino (2). Lahko so naravnega ali sinteznega izvora. Slednji prehajajo v okolje prek fekalnih vod iz gospodinjstev, industrijskih obratov in kmetijske dejavnosti. Številni sodijo tudi med zdravilne učinkovine; najbolj razširjeni med njimi so peroralni kontraceptivi. Obstajajo pa

še sintezni hormoni, ki se uporabljajo v terapiji neplodnosti in hormonski nadomestni terapiji. Tudi naravni hormoni, ki pridejo v okolje v konjugirani obliki kot presnovni produkti in se v njem s pomočjo mikroorganizmov dekonjugirajo, se v organizmih, ki pridejo v stik z njimi, obnašajo kot HM. Med HM so pogoste kemikalije, ki jih uvrščamo med pesticide (npr. diklorodifeniltrikloroetan) in fungicide (npr. vinklozolin) ter industrijske kemikalije, kot so bisfenoli, ftalati, poliklorirani bifenili, dioksini, polibromirani difenilni etri, policiklični aromatski ogljikovodiki in alkilfenoli (2, 3).

Učinki HM se izrazijo v različnih tarčnih tkivih, ki izkazujejo ekspresijo receptorjev odzivnih na hormone, vključujoč predvsem možgane, hipotalamus, hipofizo, ščitnico, trebušno slinavko, maščobno tkivo, prostato in moda pri moških ter mlečne žleze, jajčnike in maternico pri ženskah. *In vitro* in *in vivo* ter epidemiološke študije kažejo na to, da lahko HM povzročijo debelost, sladkorno bolezen tipa 2, prezgodnjo puberteto, neplodnost, abnormalnosti reproduktivnega trakta (npr. policistični ovarijski sindrom, testikularni disgenezni sindrom) in spontan splav ter rakava obolenja, med katerimi velja izpostaviti raka dojke, jajčnikov, maternice ter prostate in mod (2, 3).

Zdravstvene težave, ki se pojavijo zaradi izpostavljenosti HM, so odvisne od številnih faktorjev. Eden pomembnejših je čas oz. faza razvoja, v katerem smo izpostavljeni HM. Človek je najbolj občutljiv in dovzeten za vplive HM v embrionalni in fetalni fazi razvoja ter v zgodnjem otroštvu. Težave pa se navadno izrazijo šele v odrasli dobi (2, 4, 5). Lahko pa vplivajo tudi na naslednje generacije. Pomemben faktor je tudi časovno trajanje izpostavljenosti, čeprav smo praviloma nizkim koncentracijam HM izpostavljeni kronično. Krivulja odmerka-odziv ima pri večini HM obliko črke »U« ali obrnjene črke »U«. Zato so nizki odmerki lahko še bolj škodljivi kot visoki. Poleg tega igra pomembno vlogo tudi dejstvo, da človek ni nikoli izpostavljen le enemu HM, temveč so ti prisotni v različnih kombinacijah, ki pa lahko delujejo celo aditivno ali sinergistično (2, 3).

Z uporabo *in vitro* in *in vivo* testov so določili večje število spojin, ki delujejo kot HM. Obstaja kar nekaj primerov, kjer neželeni endokrini učinki in tudi znaki reproduktivne toksičnosti pri pticah in sesalcih sovpadajo z visokimi koncentracijami oz. z izpostavljenostjo antropogenim spojinam, ki so se v določenih testnih sistemih že izkazale kot HM. Tako obstaja verjetnost povezave med izpostavljenostjo nizkim koncentracijam spojin, ki posnemajo delovanje hormonskega sistema in vedno pogostejšimi zdravstvenimi težavami ljudi, kot so npr. spermatogenetska disfunkcija, nepravilen spust testisov,

malformacije penisa in rak mod ter dojk (6). Glavni vprašanji sta še zmeraj, ali lahko onesnaževala, ki se v okolju pojavljajo v nizkih koncentracijah, vplivajo na zdravje ljudi in kakšen je morebiten vpliv (7). V zadnji letih so različne mednarodne skupine, nacionalne agencije in znanstvena združenja pregledala znane podatke raziskav s področja HM in zaključila naslednje:

- interakcija spojine s hormonskim sistemom predstavlja mehanizem za možne učinke, vendar to še ne pomeni, da so ti neželeni,
- povezava med HM pri koncentracijah, v katerih so prisotni v okolju, in zdravjem ljudi še ni dokazana,
- ljudje so v večji meri izpostavljeni naravnim fitoestrogenom kot sinteznim HM,
- obstaja možnost povezave med HM v koncentracijah prisotnih v okolju in reproduktivnimi učinki na živalih,
- obstaja dokaz za povezavo med visokimi lokalnimi koncentracijami v okolju in reproduktivnimi učinki na živalih in
- potrebno je nadaljnje znanstveno delo na tem področju (7).

1.1.1 VALIDIRANI TESTI ZA DOLOČANJE VPLIVA SPOJIN NA HORMONSKI SISTEM

Znanstvenike in tudi širšo javnost vedno bolj zaposluje vprašanje ali lahko različne spojine (naravne in antropogene), ki se pojavljajo v okolju, izzovejo neželene učinke na endokrinem sistemu. Zaradi številčnosti in raznolikosti teh spojin je potrebno za določitev njihovih učinkov postaviti strategije testiranja in uvesti ustrezne validirane testne metode. Tako je organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj OECD (angl. Economic Cooperation and Development) že leta 1998 ustanovila specifično delovno skupino EDTA (angl. Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force), katere naloga je, da vzpostavlja smernice ter validira presejalne in potrditvene teste, s katerimi lahko ocenimo delovanje spojin kot HM (6). Sprejela je strategijo stopenjskega testiranja ter sistem testov, ki so po zahtevnosti metode in moči dokaza, razdeljeni na pet ravni:

- 1. raven: sortiranje oz. razvrščanje velikega števila spojin po pomembnosti z uporabo že obstoječih podatkov, predstavlja hitro in poceni začetno orodje raziskave (npr. fizikalno-kemijske lastnosti, podatki izpostavljenosti, *in silico* študije),
- 2. raven: *in vitro* presejalni testi, ki bi lahko pojasnili mehanizem delovanja potencialnega HM, vključene so študije (kvantitativnih) razmerij med strukturo in aktivnostjo (npr. test vezave na receptor, test aktivacije transkripcije, test proliferacije, QSAR model),
- 3. raven: *in vivo* presejalni testi za ugotavljanje specifične endokrine aktivnosti (npr. uterotropni test, Hershbergerjev test, test na samicah zetov (spiggin), test vitelogenina),
- 4. raven: *in vivo* testi namenjeni določanju stranskih učinkov v različnih hormonskih sistemih, zaznajo se tudi učinki, ki niso vezani na hormonski sistem (npr. posodobljeni OECD 407 test, histopatološki test endokrinih žlez) ter
- 5. raven: *in vivo* testi endokrinih in ostalih učinkov, narejeni na eni ali dveh generacijah živali (ptice, ribe), rezultati so uporabni za oceno tveganja (4, 7).

Princip strategije je ta, da se s pomočjo *in vitro* in kratkotrajnih *in vivo* testov (1., 2. in 3. raven) določi spojine, ki jih je smiselno uvrstiti v dolgotrajne študije določanja stranskih učinkov, katere so osnova za oceno tveganja (4. in 5. raven). Za celovito končno oceno posamezne spojine glede tveganja, ki ga predstavlja za zdravje ljudi, so potrebni še podatki biomonitoringa in podatki glede izpostavljenosti tej spojini.

In vitro presejalni test za določanje učinkov na AR in GR, ki smo ga uporabili v naši diplomski nalogi, sloni na aktivaciji transkripcije in sodi v skupino testov iz 2. OECD nivoja. Test, ki smo ga uporabili, ni uradno validiran, vendar OECD do zdaj še ni validirala nobenega *in vitro* testa za določanje učinkov na GR.

1.2 HORMONSKI SISTEM

Hormonski oz. endokrini sistem predstavljajo žleze z notranjim izločanjem, ki v kri izločajo kemijske obveščevalne snovi – hormone. Slednji se po krvi prenesejo do ciljnih

celic, v katerih povzročijo fiziološki učinek. Hormoni uravnavajo procese v notranjem okolju organizma, vplivajo na vedenje človeka, prilagajanje na zunanje okolje ter imajo ključni pomen pri razvoju, rasti in razmnoževanju. Nekateri vplivajo samo na določena tarčna tkiva oz. celice, nekateri pa vplivajo na več različnih tipov celic v telesu. Hkrati lahko na celico deluje več hormonov, učinek je lahko dopolnjujoč, nasprotujoč ali permisiven. Tarčne celice imajo v glavnem več tisoč receptorjev in vsak je specifičen za svoj hormon (8). Po kemijski strukturi jih v grobem razdelimo v tri razrede: polipeptidne oz. proteinske hormone (npr. adrenokortikotropni hormon, oksitocin, prolaktin, folikle stimulirajoči hormon, luteotropni hormon), derivate tirozina (adrenalin, noradrenalin, tiroksin, trijodtironin) in steroidne hormone (npr. estradiol, progesteron, testosteron, aldosteron, kortizol) (8).

Pogoj za delovanje hormona je, da se ta veže s specifičnim receptorjem tarčne celice. Ta vezava pa v glavnem sproži zaporedje reakcij, kjer je vsaka naslednja stopnja aktivacijsko močnejša. Zaradi tega imajo že zelo majhne koncentracije hormona velik učinek. Zato so tudi koncentracije hormonov v krvi zelo majhne (pikogram do največ nekaj mikrogramov na mililiter) (8).

Tako imenovana povratna zanka predstavlja osnovni mehanizem kontrole delovanja hormonov in tako skrbi za stanje homeostaze v organizmu. V večini primerov poteka kontrola po principu negativne povratne zanke, ki preprečuje prekomerno aktivnost endokrinega sistema in s tem zagotavlja primerno količino hormonov v določenem tkivu. Negativna povratna zanka deluje tako, da hormon sam ali produkt njegovega delovanja zavre nadaljnje izločanje prvega. Primer slednjega je kontrola izločanja hormonov na osi hipotalamus-hipofiza-ščitnica. V nekaterih primerih pa gre za pozitivno povratno zanko (npr. oksitocin pri porodu) (8, 9).

1.2.1 STEROIDNI HORMONI

Steroidni hormoni so derivati holesterola in so si strukturno zelo podobni. Ciklopentanofenantrenski obroč predstavlja pri vseh osrednji del, se pa razlikujejo po številu in položaju dvojnih vezi ter številu in vrsti funkcionalnih skupin. Nimajo niti kislih niti bazičnih lastnosti z izjemo estradiola, ki je zaradi fenolne skupine na obroču A rahlo kisel. So zelo lipofilne molekule in zaradi tega zlahka prehajajo celične membrane (10).

Steroidni hormoni se navadno sintetizirajo iz holesterola. Njihova zaloga v proizvajajočih celicah je majhna, se pa po potrebi hitro sintetizirajo iz holesterolnih estrov, ki se takoj po stimulusu mobilizirajo iz vakuol. Večina holesterola za sintezo pa pride v celico iz plazme. Steroidi nastajajo v različnih tkivih, v glavnem pa v nadledvičnih in spolnih žlezah, pri čemer sodelujejo številni encimi (8).

Zaradi lipofilnosti se po krvi do tarčnih celic prenesejo vezani na transportne proteine. Navadno jih manj kot 10 % obstaja v plazmi v prosti obliki. Steroidni hormoni prehajajo v celico z difuzijo ali s prenašalci. V glavnem delujejo tako, da se v celici vežejo na receptorje, ki so locirani v jedru ali citosolu, z njimi tvorijo komplekse, ki se vežejo na DNA (na hormonsko odziven element – HRE) in tako uravnavajo izražanje ustreznih genov. Poleg dolgoročnega delovanja prek sinteze proteinov lahko delujejo tudi hitro in kratkoročno, in sicer tako, da prek membransko vezanih receptorjev sprožijo nastanek sekundarnih prenašalcev (npr. cAMP). Njihovo negenomsko delovanje zajema tudi interakcije z ionskimi kanalčki in receptorji za rastne dejavnike (11).

Kljub zelo podobni strukturi imajo različno fiziološko vlogo. Glede na to, na katere receptorje se vežejo in kakšni so njihovi učinki, steroidne hormone razdelimo v glukokortikoide, mineralokortikoide, vitamin D, estrogene, progestagene in androgene. V nadaljevanju se bomo osredotočili na androgenski in glukokortikoidni sistem oz. androgene in glukokortikoide, njihov prevladujoč mehanizem delovanja (prek jedrnih receptorjev) in njihove fiziološke učinke.

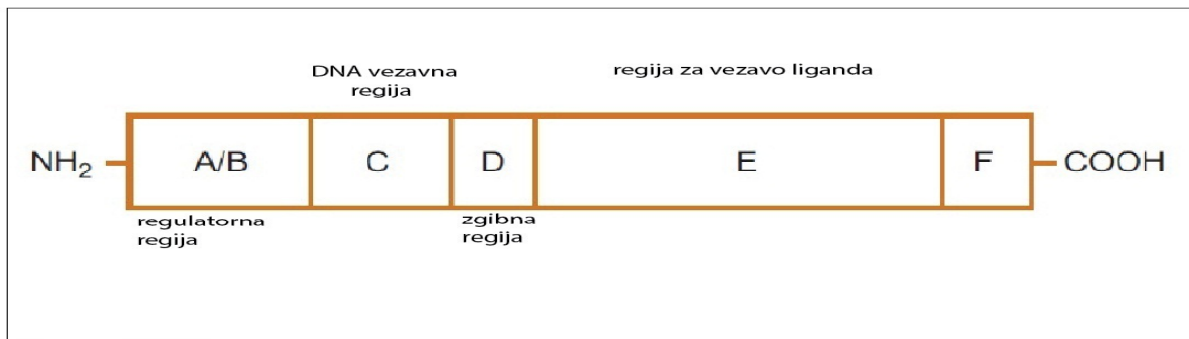
1.2.2 MEHANIZEM DELOVANJA ANDROGENOV IN GLUKOKORTIKOIDOV PREK JEDRNIH RECEPTORJEV

Androgeni in glukokortikoidi v glavnem delujejo na ravni prepisovanja tarčnih genov prek ustreznih znotrajceličnih receptorjev, tako imenovanih jedrnih receptorjev. V odsotnosti liganda so AR in GR locirani v citoplazmi. Ko se specifičen ligand veže na AR oz. GR, ta z vezanim ligandom potuje v jedro, kjer se običajno v obliki dimera veže na ustrezen HRE DNA in vpliva na izražanje genov (12).

Jedrni receptorji so od ligandov odvisni transkripcijski faktorji, ki uravnavajo specifično izražanje tarčnih genov, vključenih v metabolizem, reprodukcijo in razvoj. Naddružina

jedrnih receptorjev je skupina 48 receptorjev. Glede na ligande, ki se vežejo nanje, jih razdelimo v tri podrazrede. V prvi razred uvrščamo receptorje, ki vežejo steroidne hormone. V drugi razred uvrščamo tiroidni, retinoidni, s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor gama (PPAR γ) in arilni ogljikovodikov receptor (ARH) ter receptor za vitamin D. V tretjem razredu so receptorji sirote, katerih endogeni ligandi še niso poznani. AR in GR spadajo v prvi razred (12).

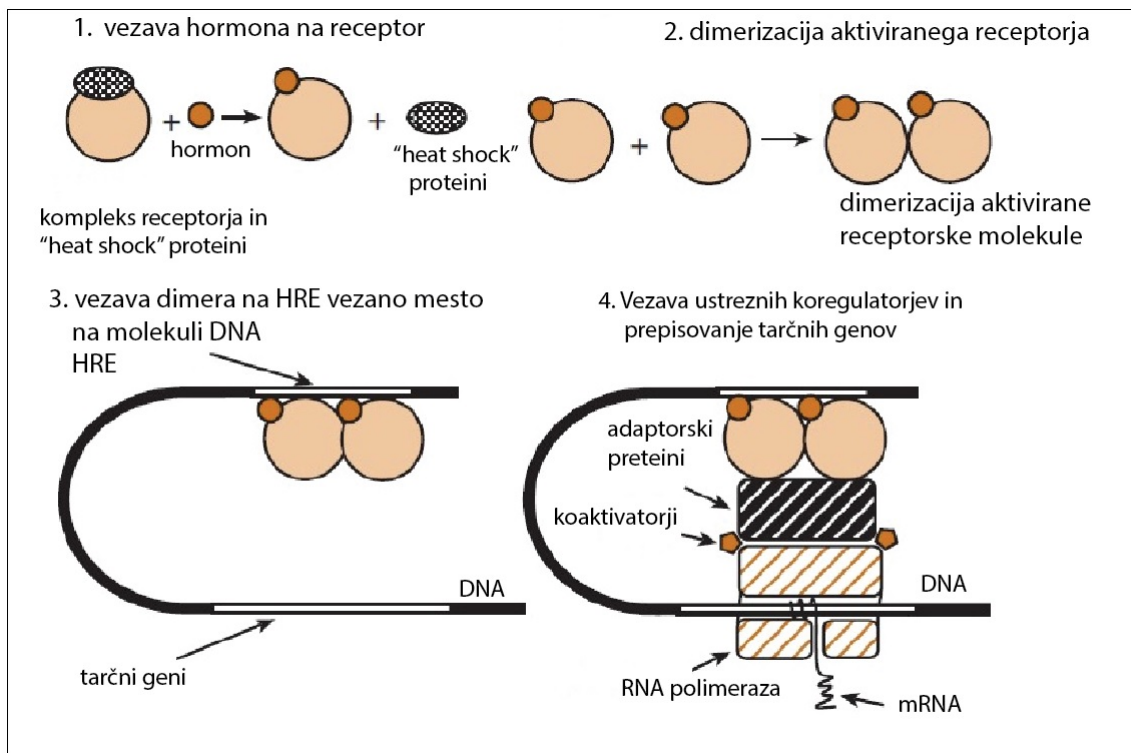
Jedrni receptorji vsebujejo karakteristične regije s točno določenimi funkcijami. Gre za področja, označena od A do F (slika 1). Najbolj variabilna regija A/B na N-terminalnem koncu receptorja predstavlja regulatorno domeno in vsebuje od liganda neodvisen aktivacijski segment AF-1. Centralni del C vsebuje 2 cinkova prsta (prvi služi prepoznavanju določenega dela DNA, drugi pa dimerizaciji) in predstavlja DNA vezavno domeno, ki je do 50 % homologna med receptorji. Regija D povezuje dela C in E/F ter med njima deluje kot tečaj, ki omogoča rotacijo okoli osi. C-terminalni del regije vsebuje ligand vezavno domeno. Regija E vsebuje od liganda odvisen aktivacijski segment AF-2 ter igra pomembno vlogo pri vezavi hormona, transaktivaciji, dimerizaciji, poziciji v jedru in vezavi s stresnimi proteini. Regija F pa olajšuje dimerizacijo receptorja (9).



Slika 1: Prikaz strukturnih domen jedrnega receptorja (13).

Učinek z ligandi vezanih jedrnih receptorjev na prepisovanje genov uravnava različni koregulatorji. Ob odsotnosti hormonov je transkripcijsko neaktiven steroidni receptor v jedru povezan s tako imenovanimi proteini toplotnega šoka oz. stresnimi proteini, ki imajo funkcijo korepresorjev (slika 2). Ko se hormon veže na receptor, se ta konformacijsko spremeni in sprostijo se inhibitorni proteini. Nato aktivni receptor z vezanim ligandom spontano dimerizira in se veže na HRE. Hkrati se na dimer veže ustrezni koaktivatorski

kompleks in drugi adaptorski proteini (slika 2). Sledi prepisovanje tarčnih genov in sinteza proteinov (13, 14).



Slika 2: Shematski prikaz delovanja jedrnega oziroma steroidnega receptorja (13).

1.2.3 ANDROGENSKI SISTEM

Moške spolne hormone, tj. androgene, izločajo ženske in moške spolne žleze ter skorja nadledvične žleze. Pomembni so za oba spola, vendar imajo pomembnejšo vlogo pri moških. Pri slednjih igrajo ključno vlogo testisi, ki izločajo več androgenov, in sicer testosteron, dihidrotestosteron (DHT) in androstendion (8).

Izločanje androgenov uravnava hipotalamus-hipofizna os. Gonadoliberin (GnRH) iz hipotalamusa stimulira adenohipofizo, ki izloča luteinizirajoči hormon (LH) in folikle stimulirajoči hormon (FSH). Izločanje teh treh po načelu negativne povratne zanke uravnava testosteron in inhibin, ki ga izločajo Sertolijeve celice testisov. FSH pri moškem stimulira spermatogenezo, LH pa izločanje testosterona (8).

Učinke androgenov lahko v grobem razdelimo v androgene in anabolne učinke. Prva skupina učinkov se nanaša predvsem na reproduktivni sistem in sekundarne spolne znake, druga pa obsega rast in razvoj nereproduktivnih tkiv (8).

Najpomembnejši hormon androgenega sistema je testosteron (večina se ga v tarčnih tkivih pretvori v bolj aktiven DHT), ki je v splošnem odgovoren za razvoj moških spolnih znakov. Že med fetalnim razvojem horionski gonadotropin iz placente stimulira testise, zaradi česar se testosteron izloča skozi ves čas embrionalne rasti in še 10 tednov po rojstvu. Nato se do 10. oz. 13. leta ne izloča, potem pa se njegovo izločanje močno poveča zaradi stimulusov iz adenohipofize in začne upadati po 50. letu (8).

Testosteron je že pri zarodku in plodu odgovoren za rast in razvoj penisa, mod, modnika, semenovoda, prostate in drugih vodov ter žlez, ki sestavljajo moški spolni organski sistem. V zadnjem tromesečju nosečnosti je odgovoren za spuščanje mod v modnik. Spodbuja spermatogenezo ter razvoj in vzdrževanje sekundarnih spolnih znakov. Slednji obsegajo:

- večanje penisa, mod in modnika,
- rast telesnih dlak in plešavost,
- hipertrofijo mišic grla, povečanje grla (posledično »globji« glas),
- debelejšo kožo, možen razvoj aken zaradi povečane sekrecije lojnic,
- povečano tvorbo proteinov in razvoj mišic,
- zadrževanje kalcija ter zvečano gostoto, moč in dolžino kosti,
- učinek na ravnovesje vode in elektrolitov; povečana reabsorpcija natrija v distalnih tubulih,
- stimulacijo eritropoeze v kostnem mozgu in s tem povečan hematokrit ter
- spolno aktivno vedenje; povečan libido, potencia in vpliv na erektilno funkcijo (8, 9).

1.2.4 GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM

Glukokortikoidi so steroidni hormoni, ki se sintetizirajo in sproščajo iz vmesnega sloja (*zona fasciculata*) skorje nadledvične žleze. Glavni fiziološki stimulus za sintezo in

sproščanje glukokortikoidov je kortikotropin, ki se izloča iz anteriornega dela hipofize, po predhodnem sproščanju kortikoliberina iz hipotalamusa. Stimulusi za izločanje kortikoliberina so pretirana vročina ali mraz, poškodbe, infekcije oziroma kakršen koli fiziološki in psihološki stres. Zveza hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvične žleze je regulirana preko negativne povratne zveze. Glavna endogena glukokortikoida sta kortizol oz. hidrokortizon (HC) in kortizon (8).

Okrog 95 % glukokortikoidnih učinkov je posledica delovanja HC. Eden najboljše poznanih učinkov je stimulacija glukoneogeneze v jetrih, do česar pride zaradi dveh učinkov kortizola: povečane količine potrebnih encimov in mobilizacije aminokislin iz ekstrahepatičnih tkiv. Zmanjša se tudi hitrost porabe glukoze v večini celic (najverjetneje prek zmanjšanja oksidacije NADH v NAD⁺, ki je potreben za glikolizo). K dodatnemu dvigu glukoze v krvi prispeva še zmanjšana občutljivost mnogih tkiv na stimulatorne učinke inzulina (8).

Eden glavnih učinkov glukokortikoidnega sistema na sistemski metabolizem je redukcija proteinskih zalog (zmanjšana sinteza in povečan katabolizem proteinov) v vseh tkivih razen v jetrih, kjer velja obratno. Do tega naj bi prišlo zaradi povečanega transporta aminokislin v jetra, medtem ko se pri drugih tkivih zgodi obratno. Obstaja verjetnost, da je skupna točka in vzrok učinkov v presnovi ogljikovih hidratov in proteinov, mobilizacija aminokislin iz perifernih tkiv ter hkratno povečanje jetrnih encimov za sintezo (8).

Glukokortikoidni sistem ima vpliv tudi na metabolizem maščob. Iz še ne povsem pojasnenih mehanizmov HC poveča mobilizacijo maščobnih kislin iz adipoznega tkiva. Poleg tega naj bi še povečal oksidacijo maščobnih kislin v celicah, kar je pomembno za dolgoročno ohranjanje glukoze in glikogena v času stradanja (8).

Glukokortikoidi imajo poleg učinkov na celično presnovo tudi druge funkcije. Pomagajo prebroditi stres in delujejo protivnetno. Sintezni glukokortikoidi (večja jakost delovanja od HC) se predvsem zaradi slednjega uporabljajo za farmakološke namene. Glukokortikoidi delujejo sistemsko in nespecifično protivnetno. Glavni protivnetni učinki HC so: stabilizirana membrana lizosomov in posledično manjše izločanje proteolitičnih encimov ter najverjetneje kot posledica slednjega tudi zmanjšana prepustnost kapilar in s tem manjše prehajanje krvnih sestavin v intersticij poškodovanega tkiva. Migracijo levkocitov v območje vnetja in fagocitozo poškodovanih celic najverjetneje zmanjša posredno prek

zmanjšanja tvorbe prostaglandinov in levkotrienov, ki so močni kemotaktični agensi in aktivatorji levkocitov, poleg tega povečajo prepustnost žil in povzročijo vazodilatacijo. Zavira tudi imunski sistem, predvsem zmanjša nastajanje limfocitov in tudi na ta način zmanjša količino vnetnih mediatorjev (predvsem citokinov), ki spodbujajo vnetje. HC zmanjša vnetje prek širokega spektra učinkov. V kakšni meri so ti rezultat stabilizacije membrane lizosomov ali zmanjšanega nastajanja prostaglandinov in levkotrienov ni popolnoma jasno (8).

1.3 BISFENOL A IN NJEGOVI ANALOGI

Bisfenol A (BPA) je industrijska kemikalija, ki po obsegu proizvodnje sodi med najbolj uporabljene snovi na svetu. Na leto ga proizvedejo povprečno 3.6 milijona tone. Zaradi razširjene uporabe prehaja tudi v okolje, vodo, zemljo in sedimente ter predstavlja eno najpomembnejših okoljskih onesnaževal. Ljudje smo izpostavljeni BPA v glavnem prek uživanja hrane in pijače, ki je v stiku z vsebniki, izdelanimi ali prevlečenimi s polimeri iz BPA.

V okolju se pojavljajo tudi analogi BPA. Torej gre za strukturno podobne spojine in kot pričakovano tudi podobne učinke. V nadaljevanju diplomske naloge se bomo osredotočili na sam BPA in na njegove analoge, ki so manj raziskani in zaradi tega toliko bolj zanimivi glede učinkov, ki jih povzročajo.

1.3.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI BISFENOLA A

Kemijsko gledano je BPA (2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) organska spojina sestavljena iz dveh fenolnih obročev, povezanih z metilnim mostom, ki je substituiran z dvema metilnima skupinama (preglednica VII). Sintetiziramo ga s kondenzacijo fenola in acetona ob prisotnosti kisline kot katalizatorja (15). Je bele barve, prisoten v obliki kristalov ali kosmičev. Je težko topen v vodi in bolje topen v etanolu, benzenu in dietil etru. Ima dve rahlo kisli fenolni skupini, zato je bolje topen v bazičnem mediju. Osnovne fizikalno kemijske lastnosti so zajete v preglednici I. Kljub temu, da je BPA v trdni obliki stabilen, je v okolju neobstoje. V vodi in zemlji znaša njegov razpolovni čas približno 4,5 dni. V glavnem se odstrani z aerobno biorazgradnjo (16).

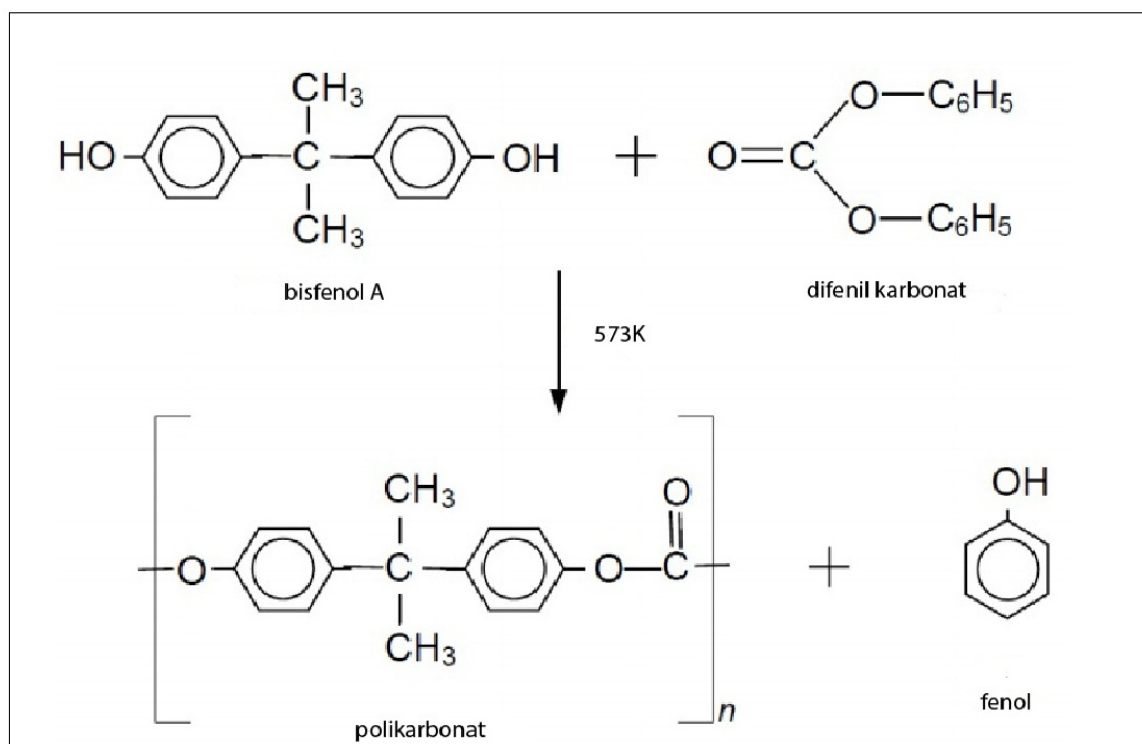
Preglednica I: Fizikalno kemijske lastnosti BPA (16).

Molekulska masa	228,29 g/mol
Tališče	155 °C
Vrelišče	398 °C
Topnost v vodi	0,3 g/L
log P	3,4
pKa	9,6-11,3

1.3.2 UPORABA BISFENOLA A

BPA je spojina sinteznega izvora, ki se v glavnem uporablja kot monomer pri izdelavi polikarbonatne plastike in epoksidnih smol (95 % celotne porabe v letu 2009) (18). V manjšem obsegu se uporablja tudi pri sintezi fenolnih smol, poliestrov in poliakrilatov ter kot antioksidant in stabilizator v polivinilkloridu (PVC) (17, 18).

Polikarbonatni material nastane pri reakciji med BPA in difenil karbonatom ali fosgenom (slika 3). Odlikujejo ga trdnost, transparentnost ter temperaturna odpornost (-40 do 145 °C) in odpornost na mnoge kisline in baze. Zaradi ugodnih lastnosti najdemo polikarbonatno plastiko v številnih izdelkih, večina od teh pa prihaja neposredno v stik s hrano. Ti izdelki med drugim obsegajo kuhinjske aparate in pripomočke, pribor, plastenke za otroško hrano in vodo ter posode za shranjevanje hrane (15, 18).



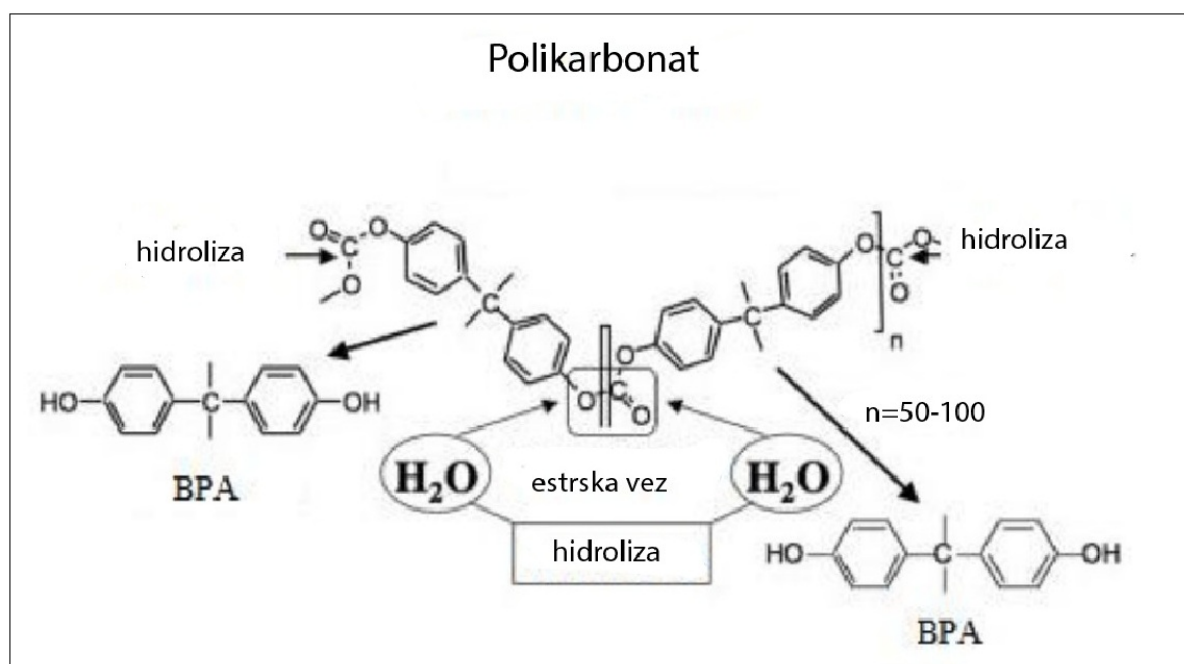
Slika 3: Sinteza polikarbonata iz BPA in difenilkarbonata (19).

Epoksidno smolo dobimo z reakcijo med BPA in epiklorhidrinom. Zaradi antikoroziivnih lastnosti in lepljivosti se uporablja kot notranji zaščitni sloj v pločevinkah za hrano in pijačo in kot premaz kovinskih pokrovov za različne steklene posode, ki se uporabljajo za shranjevanje živil (15, 17, 18). Uporablja se še kot zaščitna prevleka in adheziv za PVC cevi ter za izdelavo kompozitnih zalivk, ki se uporabljajo v dentalni medicini (15).

1.3.3 IZPOSTAVLJENOST BISFENOLU A

Zaradi razširjene uporabe izdelkov oz. materialov, ki vsebujejo BPA, smo slednjemu vsakodnevno izpostavljeni. Številna poročila o neželenih učinkih, ki jih BPA povzroča, spodbujajo regulatorne organe k omejevanju oz. zmanjševanju njegove uporabe in s tem posledično k zmanjševanju izpostavljenosti le-temu. Vendar se spremembe na tem področju odvijajo počasi. Zaradi večje občutljivosti razvijajočega se organizma na BPA, so v Kanadi leta 2010 prepovedali prodajo polikarbonatnih otroških plastenk, ki ga vsebujejo (20). Začasno prepoved se je leto pozneje odločila tudi Evropska unija (21).

Ljudje smo v glavnem izpostavljeni BPA preko uživanja hrane in pijače, v kateri je ta prisoten zaradi prehajanja iz vsebnikov, ki so izdelani iz polikarbonatne plastike ali so premazani z epoksidnimi smolami. Pomembna dejavnika, ki vplivata na prehajanje BPA iz vsebnikov, sta čas shranjevanja živila v vsebniku in temperatura med tem časom ter temperatura, ki je bila uporabljena pri proizvodnji vsebnika in živila. Če se v proizvodnji vsebnika, ki je prevlečen z epoksidno smolo, uporablja nizka temperatura, pride do nepopolne polimerizacije in tako ostane prosti BPA na površini in med shranjevanjem prehaja v živilo (15, 22). Povprečne koncentracije se v pijači iz plastenke gibljejo od 1 do 23 $\mu\text{g/L}$ tekoče hrane (18). Vsebniki iz polikarbonatnega materiala pa so pogosto izpostavljeni višjim temperaturam in kislemu ter alkalnemu pH, pri čemer prihaja do hidrolize esterske vezi, (15, 18, 22). Koncentracije v vodah iz plastenk so običajno višje kot v vodovodnih vodah in se gibljejo v območju od 2 do 13 ng/L , dosežejo pa tudi 300 ng/L (23). Na splošno so izmerili višje koncentracije BPA v hrani v primerjavi s pijačami in v zelenjavi v primerjavi s sadjem ter najvišje v hrani z veliko maščobe (18).



Slika 4: Shematski prikaz reakcije hidrolize polikarbonata (24).

Poleg hrane in pijače kontaminirane prek embalaže, predstavlja pomemben vir izpostavljenosti pitna voda. BPA prehaja v pitno vodo v glavnem posredno preko odpadnih vod tovarn, v katerih ga proizvajajo in uporabljajo (15). V vodovodni vodi se gibljejo koncentracije v območju od nekaj ng/L do 300 ng/L (23). Se pa zaradi industrijskih odplak

nahaja tudi v morski vodi, kjer je njegova obstojnost v primerjavi s sladkimi vodami daljša in posledično v morski hrani, kjer so se izmerjene koncentracije BPA gibale med 13,3 in 213,1 ng/g mokre teže (15).

Na osnovi podatkov o izpostavljenosti, povprečni dnevni vnos BPA s hrano in pijačo pri odraslih znaša 0,01 do 0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne mase (TM) in pri otrocih ter najstnikih 0,1 do 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM (18). Torej je povprečna dnevna izpostavljenost pod mejo od leta 1988 še nespremenjenega veljavnega dopustnega vnosa (tolerable daily intake, TDI), ki znaša 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM/dan (25, 26).

1.3.4 BIOMONITORING BISFENOLA A

BPA so odkrili v različnih bioloških vzorcih ljudi. Pojavlja se zlasti v urinu in krvi, vendar so ga med drugim odkrili tudi v popkovnični krvi, plodovni vodi, placenti, v materinem mleku in kolostrumu ter adipoznem tkivu (15, 27). Predvsem je pomembna detekcija prostega BPA v krvi, ker predstavlja neposreden podatek o notranji izpostavljenosti biološko aktivni obliki. V povprečju so se koncentracije prostega BPA v krvi zdravih, odraslih gibale okrog 1 ng/mL (27). Srednja vrednost oz. mediana koncentracije prostega BPA pa je v krvi ploda znašala 3,1 ng/mL, v krvi matere 2,3 ng/mL in v placenti 12,7 ng/g tkiva (15). BPA so zaznali tudi v 80 % vzorcev adipoznega tkiva, kjer je povprečna koncentracija znašala 3,16 ng/g. Študij biomonitoringa na adipoznem tkivu primanjkuje, predvsem zaradi invazivnega načina pridobitve vzorcev, primanjkuje pa tudi raziskav prisotnosti BPA v krvi otrok (27).

Do danes je bilo izvedenih veliko raziskav, kjer so določevali BPA v vzorcih urina, in v večini od teh so merili koncentracijo celokupnega BPA, tj. konjugiranega in nekonjugiranega. V študiji, v katero je bilo vključenih 2517 Američanov, so v 92,6 % vzorcev zaznali celokupen BPA, in sicer so se vrednosti gibale od 0,4 do 149 ng/mL (geometrična sredina je znašala 2,6 ng/mL) (27). Za otroke so vrednosti na splošno višje, celokupna koncentracija BPA je na primeru 314 otrok, starih 6-11 let, znašala v povprečju 3,6 ng/mL. Konjugiran BPA so zaznali tudi v vseh 41 primerih nedonošenčkov. Pri ženskah, ki so že bile vključene v raziskavo in so pozneje zanosile, so se vrednosti testiranega celokupnega BPA v urinu v času nosečnosti povečale za 33 %. V sedmih študijah, kjer so specifično raziskovali nekonjugiran BPA, so slednjega zaznali v šestih. V

eni od teh so ga zaznali v 75 % vzorcev (0,3 ng/mL; mediana), konjugiranega pa v vseh vzorcih, celokupna koncentracija je znašala 1,1 ng/mL. Vendar je pa potrebno dodati, da je bilo v to raziskavo vključenih samo 12 oseb, in sicer odraslih Avstrijcev (27).

Pri raziskavah biomonitoringa in interpretaciji rezultatov se moramo zavedati, da so koncentracije BPA v bioloških vzorcih običajno zelo nizke, poleg tega pa dodaten problem pri določanju predstavlja še nekonstantna kontaminacija. V študiji, kjer je oseba zaužila 5 µg BPA in 5 µg BPA-d16, slednjega v urinu niso zaznali, neoznačenega pa so (LOD 0,3 µg/L). Slednje nakazuje tudi na možnost kontaminacije vzorcev z BPA, do katere pa lahko pride že med vzorčenjem. V isti študiji so namreč še določili, da je BPA prisoten tudi v hišnem prahu, in sicer v koncentraciji v povprečju 553 µg/kg prahu (28).

1.3.5 TOKSIKOKINETIČNE LASTNOSTI BISFENOLA A

Človek je izpostavljen BPA v glavnem preko uživanja hrane in pijače. *In vivo* študije na glodavcih in ljudeh kažejo, da se BPA po peroralnem zaužitju hitro in v velikem obsegu absorbira iz gastrointestinalnega trakta in je za tem v velikem obsegu podvržen predsistemskemu metabolizmu v črevesju in jetrih. Glavni metabolit je konjugat BPA in glukuronske kisline, ki ni več aktiven in se ne akumulira v telesu (18). V študiji, v kateri so določali prisotnost posameznih metabolitov v urinu, so prišli do naslednjih zaključkov, 9,5 % BPA je v prosti obliki, 21 % v obliki sulfata in 69,5 % v obliki glukoronida (29). Slednji se pri ljudeh v 6 urah z urinom izloči iz telesa (18). Prosti BPA pa se običajno v 24 urah izloči s fecesom. V tkivu bi se naj normalno zadržalo manj kot 1 % BPA. Prehaja pa placento, v kateri se akumulira, zato je njegova koncentracija v placenti višja kot v materini in plodovi krvi (15).

Pri metabolizmu BPA je v ospredju glukoronidacija, ki jo omogočajo jetrne UDP-glukuronoziltransferaze, pri podganah predvsem izooblika UGT2B1, pri ljudeh pa UGT2B15 (30, 31). Pri podganah se aktivnost tega encima zmanjša med brejostjo, pri plodu je odsotna in se pojavi šele po rojstvu (30). Rezultati nekaterih študij kažejo, da je pri človeškem plodu aktivnost teh encimov zmanjšana, vendar so za dokončno potrditev potrebne dodatne raziskave (15, 18).

So pa rezultati na področju farmakokinetike precej neenotni. Poleg tega, študija, kjer so dokazali prisotnost BPA v telesu izpostavljenemu postu, nakazuje, da slednji ni podvržen hitremu metabolizmu in izločanju iz telesa, kot so predvidevali na začetku, temveč da je razpolovni čas daljši od pričakovanega in da se akumulira v telesu. oz. izpostavlja tudi možnost, da smo v precejšnji meri izpostavljeni BPA tudi preko drugih poti vnosa in ne samo prek uživanja kontaminirane hrane in pijače (26).

1.3.6 TOKSIKODINAMIČNE LASTNOSTI BISFENOLA A

Študije poročajo o interakcijah BPA s številnimi tarčami, ki obsegajo jedrni estrogenski receptor (ER), estrogenskemu podoben γ -receptor (ERR γ), transmembranski estrogenski receptor, ki je sklopljen z G-proteinom (GPR30), ARH, tiroidni receptor in AR ter GR (32). V nadaljevanju je natančneje opisano *in vitro* delovanje BPA na ER, predvsem pa na AR in GR, z osredotočenostjo na dokaze pridobljene s testi aktivacije transkripcije, med katere spada tudi test, ki smo ga uporabili pri našem eksperimentalnem delu.

IN VITRO ESTROGENSKO DELOVANJE BISFENOLA A

BPA deluje kot direktni reverzibilni kompetitivni agonist na ER in vedno več je dokazov, da deluje kot selektivni modulator ER (33). BPA lahko tvori vodikove vezi z akceptorskim delom estrogenskega receptorja zaradi svoje angularne konfiguracije in OH funkcionalnih skupin na para mestu fenilnih obročev. Veže se na dva podtipa ER, in sicer, na ER α in z 10-krat večjo afiniteto na ER β . In vitro študije potrjujejo, da deluje šibko estrogeno, z 10.000 do 1000.000-krat manjšo jakostjo kot estradiol (E2) (17, 27). Vendar pa vedno več študij poroča, da lahko stimulira celične odgovore tudi pri nižjih koncentracijah od tistih, pri katerih bi pričakovali vezavo na ER, za kar je podanih več možnih razlag (18, 27). Ena sloni na tem, da se BPA veže na drugačen način na ER kot E2, poročajo pa tudi o razlikah v transkripcijskih ko-regulatorjih. Vzrok je moč iskati tudi v vezavi BPA na ERR γ , membranske estrogenske receptorje in GPR30 (24, 26). BPA se veže na ERR γ z 80 do 100-krat večjo afiniteto kot na ER. Kompleks BPA- ERR γ se lahko veže na ERR γ ali ER odzivne elemente. Z vezavo na membranske estrogenske receptorje sproži negenomske odgovore z enako jakostjo kot E2 (27).

IN VITRO ANDROGENSKO DELOVANJE BISFENOLA A

Rezultati *in vitro* študij kažejo, da BPA deluje antiandrogensko. Je pa do danes v primerjavi z raziskavami estrogenskega delovanja izvedenih precej manj raziskav (anti)androgenskega delovanja. V eni od teh študij je bila uporabljena celična linija iz mišjih fibroblastov, imenovana NIH3T3, ki po indukciji androgenov, izraža AR in reporterski gen za luciferazo. Rezultati te študije kažejo, da deluje BPA na AR antagonistično, z IC_{50} 4,3 μ M (IC_{50} flutamida je 2,5 μ M). BPA je pri koncentraciji 10 μ M zmanjšal aktivnost luciferaze, katere izražanje je bilo inducirano z DHT (0,1 nM), za 60 %, pri nižjih koncentracijah pa je deloval nesignifikantno. Aktivnost luciferaze inducirane z 10-krat nižjo koncentracijo DHT (0,01 nM), pa je BPA signifikantno zmanjšal že pri 1 μ M, in sicer za 60 %, pri 10 μ M pa za kar 100 % (34). O enakem trendu poroča še ena *in vitro* študija, osnovana na reporterskem genu za kloramfenikol acetil transferazo (CAT) in celični liniji CV-1, ki izhaja iz ledvic opic (35). Torej ti rezultati kažejo, da se BPA kompetitivno veže na AR in na ta način sproži antagonistični učinek. Iz kristalne strukture vezanega DHT na AR in ustreznih vezi, ki se med tem tvorijo, lahko sklepamo, da se ena hidroksilna skupina BPA veže na Arg752, tj. mesto kamor se veže 3-karbonilna skupina DHT, druga pa na mesto vezave 17 β -hidroksilne skupine, tj. Asn705 in Thr877. Antiandrogenska aktivnost je bila dokazana tudi na celični liniji MDA-kb2, ki smo jo uporabili tudi mi, in prav tako na celični liniji CHO-K1 s pomočjo testa, ki ga je validirala in ga priporoča OECD (36, 7). Antiandrogenska aktivnost BPA je bila dokazana še na drugih celičnih linijah in s pomočjo različnih reporterskih genov, od katerih prevladujeta gena, ki kodirata encima CAT in luciferazo (33, 37). Rezultati študij, ki so določale mehanizem delovanja BPA na AR, kažejo, da lahko deluje na več ravneh. Poleg tega, da tekmuje z drugimi ligandi za vezavo na AR, vpliva tudi na samo vezavo oz. interakcijo AR s koregulatorji in pozicijo AR v jedru (33).

IN VITRO GLUKOKORTIKOIDNO DELOVANJE BISFENOLA A

Glukokortikoidno delovanje BPA je še dokaj neraziskano oz. do zdaj je izvedena samo po ena *in vitro* in *in vivo* ter ena *in silico* študija. Rezultati luciferaznega testa *in vitro* študije izvedene na preadipocitih imenovanih 3T3-L1, kažejo, da deluje BPA glukokortikoidno (agonistično). V koncentraciji 1 μ M stimulira izražanje luciferaze, ki je pod kontrolo inducibilnega promotorja, odzivnega na transkripcijski faktor – GR. Glede na kontrolo, tj. topilo, poveča aktivnost luciferaze za približno 3-krat (deksametazon pri enaki

koncentraciji poveča aktivnost za 3,5-krat. V isti študiji še ugotavljajo, da BPA v nanomolarnem območju s komponentami diferenciacijske mešanice deluje sinergistično na akumulacijo lipidov v adipocitih in ekspresijo adipocitnih proteinov (npr. adiponektin) (38). Tudi poznejša *in silico* študija potrjuje potencialno glukokortikoidno delovanje BPA. Rezultati molekulskega sidranja kažejo, da so interakcije BPA in GR ter vezavna energija podobne kot pri deksametazonu in kortizolu (32).

UČINKI BISFENOLA A NA LJUDI IN ŽIVALI

BPA ima nizko akutno toksičnost, LD₅₀ se za glodavce po oralni aplikaciji giblje od 4000 do 5200 mg/kg TM. Ni imunotoksičen, niti genotoksičen. Za dokončen zaključek glede kancerogenosti pa ni dovolj zanesljivih podatkov. Študije ponovljivih odmerkov na miših in podganah poročajo o učinkih BPA na ledvice, jetra in telesno težo (18).

Najnižji odmerek, ki je v študijah na podganah povzročil neželene učinke in predstavlja LOAEL vrednost, znaša 50 mg/kg TM/dan. Pri določanju še varne meje izpostavljenosti, so slednjo vrednost delili s 1000, tj. s faktorjem varnosti in tako predlagali 50 µg/kg TM za varen oz. dopusten dnevni vnos (angl. tolerable daily intake, TDI). Vendar so v poznejših študijah že veliko manjše vnesene količine (0,025-0,2 µg/kg TM/dan) povzročile neželene učinke. Krivulja odvisnosti učinka od odmerka ima obliko črke »U«, zato se lahko učinki izrazijo že pri nižjih odmerkih (15, 18, 39). Zaradi tega bi bilo potrebno pregledati tudi novejša podatke o delovanju nižjih odmerkov in znova ovrednotiti referenčne vrednosti.

V preteklosti je bilo na živalih izvedenih že veliko študij o učinkih BPA, večinoma so se nanašale na njegov vpliv na zarodek, plod, plodnost in karcinogenezo. Zaključki študij se med sabo precej razlikujejo, tako v opaženih učinkih kot v odmerkih, pri katerih so se učinki pojavili (18). *In vivo* študije na mladičih, večinoma glodavcih, ki so bili BPA izpostavljeni v prenatalnem in neonatalnem obdobju, kažejo na širok spekter neželenih učinkov. Poročajo o učinkih kot so preneoplastične spremembe mlečne žleze, povečana prostata, zmanjšana tvorba semenčic in zgodnja oz. prehitra spolna zrelost (32, 40). Rezultati študij na različnih vrstah in v različnih razvojnih obdobjih sesalcev kažejo, da izpostavljenost BPA vodi do motenj v delovanju razmnoževalnih organov, ki se kaže v slabši kakovosti semenske tekočine, neplodnosti in zgodnjem dozorevanju žensk, poveča tudi incidenco hormonsko odvisnih rakov, predvsem raka mlečnih žlez in prostate.

Poročajo še o povečani incidenci sladkorne bolezni, debelosti in vedenjskih motnjah (18, 32, 40).

BPA povezujejo s številnimi zdravstvenimi težavami ljudi, predvsem z diabetesom tipa 2, debelostjo, kardiovaskularnem obolenjem, ovarijsko disfunkcijo, hiperplazijo endometrija, spontanim splavom in zmanjšano kakovostjo sperme ter hiperaktivnostjo otrok (18, 26, 27). Navzkrižne epidemiološke študije poročajo o povezanosti višjih koncentracij BPA v telesu in povečano prevalenco za zgoraj opisane zdravstvene težave. Potrebni pa je več *in vitro* in tudi *in vivo* študij, da bomo lahko zgoraj omenjene povezave potrdili in razumeli tudi mehanizme delovanja (18).

1.3.7 BISFENOL AF

Bisfenol AF (BPAF) je fluoriran analog BPA. Pri BPAF sta na ogljik, ki povezuje oba fenilna obroča, namesto dveh metilnih skupin, vezani dve trifluorometilni skupini (CF₃). Slednja je v primerjavi z metilno skupino pri BPA, bolj elektronegativna in tako je BPAF potencialno bolj reaktiven. Uporablja se v proizvodnji polimerov, ki so namenjeni za uporabo, kjer se zahteva večja termična in mehanska odpornost. Slednje lastnosti se napram polimerom, ki so zgrajeni iz BPA, izboljšajo zaradi skupine CF₃. Najdemo ga predvsem v elektronskih materialih, plastičnih, optičnih vlaknih, fluoroelastomerih, in tudi v posodah, ki so v stiku s hrano. Ne glede na to, da se proizvodnja in uporaba BPAF povečujeta, je za enkrat še malo znanega o njem, predvsem primanjkuje podatkov o izpostavljenosti BPAF in podatkov biomonitoringa (40).

Rezultati *in vitro* določanja vezave in učinkov na ER kažejo, da se BPAF za razliko od BPA, v večji meri veže na klasične receptorje (ER α in ER β) kot pa na ER γ . Na ER α izzove agonistične učinke, na ER β , na katere se veže 3-krat močnejše, pa izzove antagonistične učinke (40). Tudi uterotropični test potrjuje estrogensko, v primerjavi z BPA, močnejše delovanje. V slednjem se je velikost maternice spolno nezrelih samic morskega prašička po 3-dnevni subkutani aplikaciji BPAF (100 mg/kg/dan) povečala za 337 % (pri BPA pa za 197 %) (41). Rezultati luciferaznega testa, kjer so uporabili celično linijo iz mišjih fibroblastov, imenovano NIH3T3, kažejo, da deluje BPAF tudi antiandrogensko. V koncentracijskem območju 10⁻⁷-10⁻⁵ M je zmanjšal aktivnost luciferaze, katere izražanje je bilo inducirano z DHT (0,1 nM). V tej študiji je IC₅₀ za

BPAF znašal 1,3 μM . Za primerjavo, IC_{50} flutamida je znašal 2,5 μM , BPA pa 4,3 μM (46). V *in vivo* študiji, kjer so bili samci podgane 14 dni izpostavljeni BPAF (0, 2, 10, 50 in 200 mg/kg TM/dan), so v skupinah, ki so bile izpostavljene višjim dozam, opazili znižane serumske vrednosti testosterona, LH in FSH, ter manjše izražanje genov in proteinov, ki so vpleteni v biosintezo holesterola ter v biosintezo in transport steroidnih hormonov. V skupini, ki je bila izpostavljena največjemu odmerku BPAF, so zaznali še zmanjšanje količin $\text{ER}\alpha$, receptorjev za luteinizirajoči hormon in mRNA inhibina B. Podobna *in vivo* študija je bila izvedena po načelih OECD in standardih posodobljenega testa 407. V slednji so bile 8 tednov stare podgane 28 dni izpostavljene BPAF (0, 10, 30 in 100 mg/kg TM/dan). V skupini, ki je bila izpostavljena največjemu odmerku BPAF, so pri samcih zaznali atrofične spremembe v mlečnih žlezah in Leydigovih celicah mod, zmanjšanje teže spolnih organov in hipertrofijo nadledvične žleze ter motnje v estrogenskem ciklu. Študija poroča še o vrednosti NOAEL, ki znaša 10 mg/kg TM/dan (42). LD_{50} za primer podgan in oralne aplikacije pa znaša okrog 3400 mg/kg TM (41).

1.3.8 BISFENOL F

Bisfenol F (BPF) je analog BPA, ki ima namesto propilne skupine med obema fenilnima obročema le metilno skupino, ki daje možnost večje rotacije. V glavnem se uporablja pri proizvodnji polikarbonatnih plastike in epoksidnih smol. BPF smo v največji meri izpostavljeni prek uporabe končnih izdelkov (plastenke za vodo, posode za hrano, konzerve, vodne pipe in zobozdravstveni materiali), ki ga vsebujejo in iz katerih se sprošča. V okolju se nahaja v manjših koncentracijah kot BPA. Se pa njegova proizvodnja z leti povečuje, med drugim zaradi tega, ker imajo epoksidne smole iz BPF v primerjavi z epoksidnimi smolami iz BPA manjšo viskoznost in boljšo odpornost na topila. BPF ima zaradi podobnih kemijskih lastnosti, tudi toksikodinamične in toksikokinetične lastnosti, podobne BPA (43, 44).

Rezultati uterotropičnega testa, izvedenega na podganah, in *in vitro* študij izvedenih na različnih celičnih linijah (MCF-7, HepG2, celice kvasovk) kažejo, da BPF deluje estrogensko, vendar močneje kot BPA, kljub temu, da imata približno enako afiniteto vezave na ER (44, 45). Rezultati luciferaznega testa, kjer so uporabili celično linijo iz mišjih fibroblastov, imenovano NIH3T3, kažejo, da deluje BPAF tudi antiandrogensko. V

tež študiji je IC_{50} za BPF znašal 12 μM . Za primerjavo, IC_{50} flutamida je znašal 2,5 μM , BPA pa 4,3 μM . BPF je pri koncentraciji 10 μM zmanjšal aktivnost luciferaze, katere izražanje je bilo inducirano z DHT (0.1 nM), za približno 50 %, pri nižjih koncentracijah pa je deloval nesignifikantno (46). Antiandrogenska aktivnost BPF je z luciferaznim testom dokazana tudi na celicah CHO-K1 in MDA-kb2, kjer so dobili podobne rezultate kot v zgoraj opisanem primeru (45, 47).

1.3.9 BISFENOL S

Bisfenol S (BPS) je analog BPA, ki ima namesto propilne skupine med obema fenilnima obročema sulfonilno skupino. Sintetiziramo ga s kondenzacijo dveh molekul fenola in ene molekule žveplove kisline. Uporablja se pri proizvodnji plastike in smol. Njegova proizvodnja in uporaba se povečuje, ker je odporen na pogoje pri katerih se npr. BPA v veliki meri sprošča iz polikarbonatne plastike. V številnih produktih zaradi omejevanje uporabe BPA, le-tega zamenjujejo z BPS, pa čeprav še ni kaj dosti znanega o njem. Niti ni znano ali je bolj varen za uporabo kot BPA. Ker je od leta 2011 v Evropski uniji prepovedana prodaja polikarbonatnih otroških plasten, ki vsebujejo BPA, se kot njegova zamenjava v otroških plastenkah uporablja BPS (48). V študiji v katero je bilo vključenih 315 vzorcev urina ljudi iz različnih držav po svetu, so v 81 % vzorcev zaznali celokupen (nekonjugiran in konjugiran) BPS. Vrednosti slednjega so se gibale od 0,2 do 21 ng/mL, oz. v povprečju 0,168 ng/mL (48).

Rezultati *in vitro* študije izvedene na celični liniji MCF-7, kažejo, da BPS deluje estrogensko, vendar nekoliko šibkejše kot BPA (46). Rezultati luciferaznega testa, kjer so uporabili celično linijo iz mišjih fibroblastov, imenovano NIH3T3, kažejo, da deluje tudi antiandrogensko. V koncentracijskem območju 10^{-6} - 10^{-4} M je zmanjšal aktivnost luciferaze, katere izražanje je bilo inducirano z DHT (0,1 nM). V tej študiji je IC_{50} za BPS znašal 17 μM . Za primerjavo, IC_{50} flutamida je znašal 2,5 μM , BPA pa 4,3 (46).

1.3.10 OSTALI ANALOGI BPA

Strukture ostalih analogov BPA so predstavljene v preglednici VII. Bisfenol C (BPC) se razlikuje od BPA po tem, da ima na meta mestu obeh fenilnih obročev vezano metilno

skupino. Bisfenol Z (BPZ) ima na metilni most, ki povezuje oba fenilna obroča, namesto dveh metilnih skupin vezan le cikloheksanski obroč. Bis[4-(2hidroksietoksi)fenil] sulfon (BHEPS) ima namesto propilne med obema fenilnima obročema sulfonilno skupino, obe hidroksilni skupini pa sta zaetreni z etilen glikolom. Pri 4,4'-sulfonilbis(2-metilfenolu) (dBPS) sta hidroksilni skupini prosti, na obeh fenilnih obročih je na meta mesto vezana metilna skupina, fenilna obroča pa prav tako povezuje sulfonilna skupina. Zadnji analog, tj. 4,4'-tiodifenol (TIO), pa se razlikuje od BPA po tem, da fenilna obroča povezuje tioetrška skupina. Vse spojine se uporabljajo kot monomeri pri sintezi različnih plastičnih materialov. TIO se za razliko od ostalih v veliki meri sprošča v okolje še iz organofosfatnih in karbamatnih insekticidov (49). Za vse pa primanjkuje podatkov o biomonitoringu, toksikokinetiki in toksikodinamiki. Prav tako ni znano v kolikšni meri smo izpostavljeni tem spojinam. Za enkrat je še od vseh petih največ znanega o BPZ in TIO. *In vitro* študije izvedene na celicah kvasovk kažejo, da slednji deluje estrogensko, v primerjavi z BPA z 10-krat večjo močjo (50). Za BPZ pa rezultati *in vitro* študije, izvedene na celični liniji MCF-7, kažejo, da deluje estrogensko, vendar prav tako močnejše kot BPA (46). Rezultati luciferaznega testa, kjer so uporabili celično linijo iz mišjih fibroblastov, imenovano NIH3T3, kažejo, da deluje BPZ tudi antiandrogensko. V tej študiji je IC_{50} za BPZ znašal 7,9 μ M. Za primerjavo, IC_{50} flutamida je znašal 2,5 μ M, BPA pa 4,3 (46).

1.4 PARABENI

Parabeni predstavljajo homologno vrsto spojin, kjer je p-hidroksibenzojska kislina zaestrena z alkilnim ali arilnim alkoholom in tako nastane paraben oz. alkil ali aril parahidroksibenzoat. So najpogosteje uporabljeni konzervansi v kozmetični industriji (51). Uporabljajo se metilparaben (MePB), etilparaben (EtPB), propilparaben (PrPB), butilparaben (BuPB), izopropilparaben (iPrPB), izobutilparaben (iBuPB) in benzilparaben (ByPB). Najpogostejši so prvi štirje, ki se kot konzervansi uporabljajo tudi v farmacevtskih izdelkih. So naravno prisotni v nekaterih bakterijah, insektih in zelenjavi, vendar se za komercialne namene že od leta 1920 uporabljajo samo parabeni sinteznega izvora. Študije v zadnjih letih poročajo, da motijo oz. modulirajo delovanje hormonskega sistema in tako njihova uporaba predstavlja potencialno tveganje za zdravje ljudi in živali (52, 53).

1.4.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI PARABENOV

Parabene sintetiziramo z esterifikacijo p-hidroksibenzojske kisline z ustreznim alkoholom ob prisotnosti kisline (npr. žveplova (VI) kislina) kot katalizatorja. Nahajajo se v obliki majhnih, brezbarvnih kristalov ali belega kristaliničnega praška in so brez vonja ter okusa. So težko topni v vodi (topnost pada z daljšanjem stranske alkilne verige estra) in bolje ob dodatku sotopil. So stabilni na zraku in odporni na hidrolizo v kislem in pogojih sterilizacije. Odpornost na hidrolizo narašča z daljšanjem alkilne verige (52). Osnovne fizikalno kemijske lastnosti posameznih parabenov so zajete v preglednici II.

Preglednica II: Fizikalno kemijske lastnosti parabenov (54, 55, 56).

Fizikalno kemijske lastnosti	MePB	EtPB	PrPB	BuPB
Molekulska masa (g/mol)	152,15	166,18	180,20	194,23
pKa	8,31	8,34	8,23	8,22
log P	1,96	2,47	3,04	3,57
Topnost v vodi (mg/L)	2500	885	500	207
Topnost v olivnem olju (mg/L)	29000	30000	52000	99000
Tališče (°C)	131	117	97	68
Vrelišče (°C)	275	297	180	156

1.4.2 UPORABA IN DELOVANJE PARABENOV KOT KONZERVANSOV

Zaradi protibakterijskega in protiglivičnega delovanja se parabeni uporabljajo kot konzervansi v farmacevtskih pripravkih in kozmetičnih ter prehrabnih izdelkih. Kot konzervansi so učinkoviti v širokem pH (4,5-7,5) in temperaturnem območju (lahko se avtoklavirajo brez signifikantne izgube protimikrobnega delovanja zaradi hidrolize) in imajo širok spekter delovanja (52). So bolj učinkoviti proti kvasovkam in plesnim kot proti bakterijam in bolj proti gram pozitivnim bakterijam kot proti negativnim. Aktivnost narašča z dolžino alkilne verige, vendar se v isti smeri zmanjšuje topnost (57). Lahko se uporablja vsak paraben samostojno ali v kombinaciji z drugimi parabeni ali z drugimi konzervansi. Kombinacije so učinkovitejše kot uporaba enega samega parabena, ker delujejo sinergistično. Njihovo delovanje se poveča v kombinaciji s sotopili, kot so npr.

etanol, glicerol in propilen glikol, ker ti povečajo topnost parabenov v vodnem okolju, poleg tega delujejo sinergistično na integriteto celične membrane mikroorganizma (52).

V kombinaciji ali posamezno se uporabljajo v farmacevtskih pripravkih, ki se aplicirajo na različne načine. Njihova uporaba v obliki pomožnih snovi prevladuje v pripravkih, ki so mikrobiološko občutljivejši, med samimi parabeni prevladuje uporaba PrPB (52). FDA jih uvršča v seznam neaktivnih sestavin zdravil. Maksimalne dovoljene koncentracije se razlikujejo glede na vrsto parabena in sproščanja učinkovine ter aplikacije pripravka (58). Vsakodnevno jih srečujemo v širokem spektru kozmetičnih izdelkov, kjer prevladujeta MePB in PrPB. Njihova uporaba v vlogi konzervansa je v kozmetiki razširjena tudi zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti: so brez vonja in okusa, praktično pH nevtralni in ne vplivajo na fizikalne lastnosti izdelka (52). Na podlagi zakona o kozmetičnih proizvodih, Pravilnik o sestavi dovoljuje kot najvišjo dovoljeno koncentracijo v končnem proizvodu 0,4 % za posamičen paraben oz. 0,8 % za zmes parabenov (59). Tudi v prehrambeni industriji se uporabljajo v različnih kategorijah izdelkov, najpogosteje v pecivu, sokovih, sirupih, omakah in marmeladah, večinoma v kombinaciji z drugimi konzervansi, kot so sorbati in benzoati. Njihovo uporabo in maksimalno koncentracijo v živilu pri nas ureja Pravilnik o aditivih za živila (60). Sprejemljiva skupna vrednost celotnega dnevnega vnosa za MePB in EtPB znaša 0-10 mg/kg TM. PrPB je JECFA (Evropska agencija za varnost hrane) leta 1996 iz te skupne vrednosti zaradi novejših dognanj izključila in še vedno nima postavljene nove lastne vrednosti TDI, BuPB pa ni bil vključen v ta vnos niti na začetku, ker se v živilih v glavnem ne uporablja (61-64). V državah Evropske unije in v večini drugih so za uporabo v živilih dovoljeni samo MePB, EtPB in PrPB (65).

1.4.3 IZPOSTAVLJENOST PARABENOM

Ljudje smo izpostavljeni parabenom v glavnem prek kozmetičnih in prehrabnih izdelkov ter farmacevtskih pripravkov, v katerih se uporabljajo kot konzervansi. Glede na različne ocene, naj bi bil 60 kg težek človek povprečno na dan izpostavljen naslednjim količinam parabenov: prek živil 1,3 mg, preko farmacevtskih pripravkov 25 mg in preko kozmetičnih izdelkov 50 mg. Torej povprečna dnevna izpostavljenost parabenom iz najpogostejših virov znaša na osebo 76 mg oz. 1,3 mg/kg TM/dan (52).

1.4.4 BIOMONITORING PARABENOV

Parabeni so dokazano prisotni v različnih tkivih ljudi (57, 66-70). Rezultati kažejo, da so parabeni prisotni tudi v intaktni obliki, kar pomeni, da se nekako izognejo metabolizmu v gastrointestinalnem traktu in jetrih po peroralnem vnosu, vendar bolj verjetno, v večinskem deležu hidrolizi v koži po dermalni aplikaciji. V večini testiranih vzorcev urina ljudi so zaznali proste, nemetabolizirane parabene, v 99 % vzorcev MePB, 96 % PrPB, 69 % BuPB in v 58 % EtPB (67). V vzorcih prevladujeta MePB in PrPB, kar kaže oz. potrjuje njuno najpogostejšo uporabo (66). Rezultati dveh raziskav biomonitoringa parabenov v urinu so zbrani v preglednici III. Veliko prahu je dvignila raziskava, kjer so dokazali prisotnost parabenov v prvotni estrski obliki v rakastem tkivu dojke. Od vseh parabenov je bil MePB prisoten v najvišji koncentraciji, in sicer je ta znašala 12,8 ng na gram tkiva, s koncentracijo 2,6 ng na gram tkiva mu je na drugem mestu sledil PrPB. Vendar dokazi o prisotnosti parabenov v rakastem tkivu dojke do danes niso bili potrjeni(57).

Preglednica III: Izmerjene koncentracije parabenov v vzorcih urina ljudi: vrednosti se nanašajo na celokupno koncentracijo parabenov; nekonjugirana in konjugirana oblika, pri čemer prevladuje slednja (67-69).

	Urin, ZDA; demografsko različna območja, ng/mL, mediana, n=100	Urin, Španija, ng/mL, mediana,	
		nosečnice, 3. trimester, n=120	otroci, 4 leta, n=30
MePB	43,9	191,0	150,0
EtPB	1,0	8,8	8,1
PrPB	9,1	29,8	21,5
BuPB	0,5	2,4	1,2

1.4.5 TOKSIKOKINETIČNE LASTNOSTI PARABENOV

Študije na podganah, kuncih, psih in ljudeh poročajo o hitri in obsežni absorpciji, hidrolizi, konjugaciji in eliminaciji po peroralnem vnosu. Večina metaboličnih procesov poteče v jetrih in ledvicah. Glavni metaboliti parabenov v padajočem vrstnem redu so p-hidroksi benzojska kislina (PHBA), 4-hidroksihipurna kislina, konjugat PHBA in glukuronske kisline (konjugat v obliki etra in estra) oz. aktiviranega sulfata (52, 57). Glavni metabolit PHBA je netoksična, v okolju naravno prisotna snov, npr. v korenu korenja prisotna do

800 µg/g suhe snovi (53). V 24 urah po gavaži (aplikacija po želodčni sondi) ali peroralni aplikaciji se okrog 80 % parabenov v obliki metabolitov (manj kot 1 % v nespremenjeni estrski obliki) izloči z urinom in okrog 3 % s fecesom. Že 30 minut po vnosu se vsi metaboliti zaznajo v urinu. Hitrost eliminacije je obratno sorazmerna z odmerkom vnosa in dolžino alkilne verige parabena. *In vivo* študije ne poročajo o akumulaciji parabenov po peroralnem vnosu enkratnega odmerka, niti po večkratnih odmerkih v daljših časovnih obdobjih (52, 53).

Po dermalnem nanosu je absorpcija hitra in le delna, namreč pri podganah se absorbira do 50 % nanesene količine parabenov, zaradi v koži prisotne karboksilaze večinoma v obliki metabolita PHBA. Rezultati študij o hitrosti dermalne absorpcije glede na dolžino alkilne verige niso enotni (53, 66). Po enkratni dermalni aplikaciji ni signifikantne akumulacije parabenov v koži na mestu nanosa ali drugem tkivu podgan (53). Tradicionalno je veljalo, da se parabeni iz kože absorbirajo v velikem deležu v že hidrolizirani obliki in se kot takšni ali kot konjugati hitro in skoraj v celoti z urinom izločijo iz telesa. Slednje je imelo velik doprinos k njihovi vsesplošno veljavni nizki toksičnosti in »inertnosti« (53). Po drugi strani, pa nekatere študije, tudi na ljudeh, potrjujejo starejše domneve o nepopolni hidrolizi v koži in posledični akumulaciji parabenov, osnovanih na prisotnosti proste esterske oblike v tkivih ljudi. Prvotne esterske oblike so v primerjavi z razgradnimi produkti bolj lipofilne in imajo večjo sposobnost akumulacije v maščobnem tkivu. V *in vitro* študiji 30 % nanesene količine PrPB prehaja skozi model kože podgane v prvotni estrski obliki in ta odstotek je po časovno daljšem topikalnem stiku še višji (57, 71). Po enkratnem topikalnem nanosu (2 mg/cm²) 2 % BuPB (skupno 800 mg) v obliki kreme na celotno kožo človeka, doseže BuPB v prvotni obliki v 3 urah maksimalno serumsko koncentracijo 135 µg/L (53, 57). K nepopolni hidrolizi in akumulaciji prispevajo interindividualne razlike v hitrosti in obsegu encimske razgradnje in redna, dalj časa trajajoča ter istočasna uporaba večjih pripravkov, ki vsebujejo parabene. Tudi prisotnost inhibitorjev esteraz (flavonoidi iz soka grenivke) in druge esterske spojine, ki tekmujejo s parabeni za encimsko razgradnjo zmanjšajo obseg hidrolize (66, 70, 72). Podatki o počasnejši hidrolizi v človeški koži glede na podganjo, kažejo na manjšo napovedno vrednost podatkov dobljenih na podganah (66, 73). Na dermalno absorpcijo parabenov, zlasti na penetracijo v kožo, vplivajo tudi preostale sestavine nanesenega pripravka. Snovi, ki povečajo prepustnost kože, povečajo penetracijo parabenov, med takimi je npr. v kozmetičnih pripravkih pogosto uporabljen

etanol. Slednji še dokazano *in vitro* inhibira hidrolizo MePB (edini testirani paraben) in poveča njegovo transesterifikacijo (66). Farmakokinetični parametri se za dermalno aplikacijo parabenov ustrezno razlikujejo od peroralne; c_{max} in AUC sta pri dermalni do 10-krat nižja, t_{max} pa je daljši za 8-16-krat. (53).

1.4.6 TOKSIKODINAMIČNE LASTNOSTI PARABENOV

IN VITRO ESTROGENSKO DELOVANJE PARABENOV

Do sedaj izvedene *in vitro* študije estrogenske aktivnosti parabenov kažejo, da imajo ti sposobnost, da se vežejo na ER in preko tega receptorja aktivirajo gene, povečajo raven proteinov in proliferacijo celic. Jakost estrogenskega delovanja narašča z daljšanjem alkilne verige estra in z razvejanostjo stranske verige. Pomembno pa je predvsem dejstvo, da je jakost estrogenskega delovanja vseh parabenov glede na do zdaj znane podatke za 1000 do 1000.000-krat manjša v primerjavi z E2. PHBA, ki je glavni metabolit parabenov, pa nima sposobnosti estrogenskega delovanja (74-77).

In vitro študije ocenjujejo estrogensko jakost delovanja parabenov prek več bioloških učinkov in za detekcijo teh uporabljajo različne metode in celične linije. Na celični liniji MCF-7, ki jo sestavljajo hormonsko odvisne celice raka dojke, je uporabljena in preizkušena večina najpogostejših metod za detekcijo bioloških učinkov. Test kompetitivne vezave z radioaktivnim izotopom označenega estradiola na celični liniji MCF-7 kaže, da so vsi testirani parabeni šibko estrogeni. Pri 1000.000-krat večji koncentraciji inhibirajo vezavo [3H] estradiola na ER α za 21 % (MePB), 54 % (EtPB), 77 % (PrPB) in 86 % (BuPB), pri 100.000-krat večji koncentraciji pa vezavo inhibirata samo PrPB in BuPB. Parabeni prek ER povečajo tudi proliferacijo celic, namreč le-ta se inhibira z dodatkom estrogenskega antagonistu ICI 162,780. Od vseh štirih testiranih parabenov, MePB, EtPB, PrPB in BuPB, ima slednji največjo moč proliferacije, in sicer je le-ta pri koncentraciji 10^{-5} M enaka kot pri E2 v območju od 10^{-10} M do 10^{-7} M (76). Več študij na enaki celični liniji potrjuje proliferacijski učinek parabenov, hkrati ena od njih poroča o aditivnem estrogenskem učinku kombinacij parabenov (66, 77, 78).

IN VITRO ANDROGENSKO DELOVANJE PARABENOV

Androgensko delovanje parabenov je v primerjavi z estrogenskim še dokaj neraziskano, rezultati dveh do zdaj izvedenih *in vitro* študij določanja učinkov na AR so zbrani v preglednici IV. V eni od študij testiranja agonističnega in antagonističnega delovanja izbranih parabenov (MePB, PrPB, BuPB) na AR sta uporabljena dva različna tipa celic iz CHO-K1 celične linije (celice jajčnika iz samice hrčka): AR-EcoScreen in c-luc, prve izražajo reporterski gen za luciferazo z indukcijo androgenov, druge pa brez nje. Oba tipa sta povezana v sistem AR-EcoScreen (79). V območju testiranih koncentracij, kjer je najvišja koncentracija $1,0 \times 10^{-4}$ M, ni zaznati agonističnega učinka na AR. BuPB in PrPB delujeta antagonistično z IC_{50} (M): $6,8 \times 10^{-5}$ in $8,6 \times 10^{-5}$. MePB in EtPB pa zmanjšata aktivnost luciferaze napram DHT ($1,7 \times 10^{-10}$ M) le za 10% oz. 20% in torej znaša $IC_{50} > 1,0 \times 10^{-4}$. Za primerjavo, IC_{50} za androgeni antagonist hidroksiflutamid znaša $7,0 \times 10^{-7}$ (79). V drugi študiji testiranja agonističnega in antagonističnega delovanja izbranih parabenov (MePB, PrPB, BuPB) na AR so bile uporabljene zarodne človeške celice ledvic, imenovane HEK 293. Prek plazmida imajo vgrajen reporterski gen za luciferazo in gen za človeški AR. V isti študiji so še z metodo MTS raziskovali proliferacijsko delovanje. Pri nobenem od testiranih parabenov ni zaznana signifikantna razlika v celični proliferaciji glede na kontrolo s topilom (0,2 % DMSO). V testiranem koncentracijskem območju (1 nM-10 μ M) se parabeni ne obnašajo kot agonisti na AR. Vsi pa v najvišji testirani koncentraciji, 10 μ M, inhibirajo transkripcijsko aktivnost testosterona (0,125 nM), in sicer MePB za 40 %, BuPB za 33 % in PrPB 19 %. Za primerjavo, flutamid (pozitivna kontrola) pri 10 μ M inhibira skoraj 10-kratno koncentracijo testosterona za 90 % (80).

Preglednica IV: Zbrani rezultati dveh do zdaj izvedenih *in vitro* študij določanja učinkov parabenov na AR. Rezultati se nanašajo na test, ki je bil izveden na celični liniji CHO-K1 pri 100 μ M koncentraciji parabenov oz. HEK 293 in koncentraciji 10 μ M. -: ni signifikantnega učinka, +: je signifikanten učinek, X: substanca ni testirana, * MePB in EtPB zmanjšata aktivnost luciferaze napram DHT ($1,7 \times 10^{-10}$ M) le za 10 oz. 20 % (79, 80).

učinek	agonistični učinek na AR		antagonistični učinek na AR	
	CHO-K1	HEK 293	CHO-K1	HEK 293
MePB	-	-	-*	+
EtPB	-	X	-*	X
PrPB	-	-	+	+
BuPB	-	-	+	+

IN VITRO GLUKOKORTIKOIDNO DELOVANJE PARABENOV

Glukokortikoidno delovanje parabenov je še dokaj neraziskano, namreč do zdaj je izvedena samo ena študija, in sicer na celični liniji mišjih preadipocitov, imenovani 3T3-L1. Celice te linije imajo vgrajen reporterski gen za luciferazo, ki se izraža v soodvisnosti glukokortikoidne aktivnosti testiranih spojin. Razen MePB, ki ne izkazuje aktivnosti, se ostali trije, EtPB, PrPB in BuPB, obnašajo kot glukokortikodni agonisti in posredno povečajo aktivnost luciferaze pri testirani koncentraciji 100 μ M. Glede na negativno kontrolo (DMSO) ima le BuPB signifikanten učinek, in sicer poveča aktivnost luciferaze za 2-krat, deksametazon (1 μ M), ki ima vlogo pozitivne kontrole pa za 3-krat. Moč delovanja narašča z daljšanjem alkilne verige parabenov. Glukokortikoidni učinek BuPB je v isti študiji po enakem principu potrjen še na celicah COS-7, kjer skupaj z deksametazonom deluje še signifikantno sinergistično. Samostojen in sinergističen učinek BuPB je dodatno potrjen na celicah 3T3-L1 prek povečane ekspresije mRNA za glukokortikoidni tarčni gen lipin 1 (fosfataza fosfatidne kisline, ki katalizira defosforilacijo fosfatidata) (70).

Preglednica V: Rezultati *in vitro* študije določanja učinkov parabenov na GR, uporabljeni sta dve celični liniji; 3T3-L1 in COS-7 ter enake testirane koncentracije za vse parabene (100 μ M). -: ni signifikantnega učinka, +: je signifikanten učinek, X: substanca ni testirana, *: substanca poveča aktivnost luciferaze, vendar nesignifikantno (70).

učinek	agonistični učinek na GR		antagonistični učinek na GR
	3T3-L1	COS-7	COS-7
MePB	-	X	X
EtPB	-*	X	X
PrPB	-*	X	X
BuPB	+	+	-

UČINKI PARABENOV NA LJUDI IN ŽIVALI

K njihovi vsestranski uporabi, poleg nizke cene in širokega spektra delovanja proti mikroorganizmom, prispeva tudi nizka toksičnost. LD₅₀ MePB in PrPB za primer miši in oralne aplikacije znaša okrog 8000 mg/kg TM. Rezultati spremljanja teže in nekropsije različnih testiranih živali ne kažejo signifikantnih sprememb v študijah kronične toksičnosti. Niso genotoksični, karcinogeni, teratogeni in nevrotoksični, draženje in preobčutljivostne reakcije povzročajo samo na poškodovani koži (52).

Predvsem na podlagi *in vivo* študij Generalni direktorat za zdravje Evropske komisije priporoča, da bi se sprejemljiva vrednost dnevnega vnosa preko zaužitja oz. dovoljena vsebnost v kozmetiki znižala za PrPB, pa tudi za BuPB, ker sta zaradi daljše stranske alkilne verige dokazano bolj aktivna in tako predstavljata večje tveganje za zdravje ljudi. PrPB je v študiji na samcih podgan po ponovljivih odmerkih 10 mg/kg TM/dan povzročil le manjše spremembe v delovanju reproduktivnega sistema in se zato ta odmerek smatra kot vrednost NOAEL (83). BuPB pa je v *in vivo* študiji na samcih podgan povzročil signifikantne neželene učinke na reproduktivni sistem v skupini, kjer je ponovljivi dnevni vnos znašal približno 10 mg/kg TM/dan. Se pa ti podatki ne upoštevajo kot relevantni oz. sprejemljivi za podajanje ocen tveganja za zdravje ljudi, ker raziskovalcem iz strani industrije ni uspelo ponoviti raziskave oz. so dobili nasprotno rezultate (NOAEL 1000 mg/kg TM/dan). Vendar se ne upoštevajo niti izsledki te ponovitvene študije zaradi

številnih pomanjkljivosti raziskave (74). Najnižji do zdaj dokazani ponovljivi odmerek BuPB, ki ni povzročil nobenega učinka na samcih podgan, znaša 2 mg/kg TM/dan in predstavlja vrednost NOEL. Ta podatek iz študije leta 1999 za enkrat še vedno predstavlja edini relevantni podatek, ki se uporablja za izračune ocen tveganj, čeprav je le vrednost NOEL in ne NOAEL, poleg tega izhaja iz študije, kjer je bil BuPB testiran samo v tej koncentraciji in apliciran samo subkutano (74). Zgoraj opisano potrjuje nujnost nadaljnjih raziskav, ki pa morajo biti seveda ustrezno načrtovane in kontrolirane, saj njihovi rezultati v nasprotnem primeru nimajo nobene vrednosti.

Hormonska aktivnost parabenov, predvsem estrogenska, je dokazana v številnih *in vivo* študijah na različnih živalih, najpogosteje preko povečanja maternice (uterotropni efekt) pri spolno nezrelih samicah podgan in miših ter samicah, ki so jim predhodno odstranili jajčnike (57, 66). Večinoma se učinki na živalskih modelih izrazijo šele v visokih odmerkih, okrog 1000 mg/kg TM/dan (74). Učinki pri nižjih odmerkih se nanašajo v glavnem na BuPB. Se pa rezultati *in vivo* študij glede najnižjih odmerkov, kateri so še izzvali uterotropni učinek, tudi precej razlikujejo (52). Podatki kažejo, da obstaja pozitivna korelacija med estrogensko aktivnostjo in dolžino stranske verige parabena (66). V zadnjih letih se raziskave vpliva parabenov na endokrini sistem preusmerjajo iz estrogenskega v manj raziskano antiandrogensko delovanje. Prek obojega lahko vplivajo na reproduktivni sistem živali. Veliko dokazanih fizioloških učinkov parabenov je nemogoče pripisati samo estrogenskemu ali samo antiandrogenskemu mehanizmu delovanja. So pa androgeni oz. antiandrogeni bolj pomemben faktor pri spolni diferenciaciji reproduktivnega trakta in tudi poznejšemu delovanju tega pri moških kot pri ženskah. Zato so v preglednici VI zbrani rezultati raziskav vpliva parabenov na tvorbo spermijev, semenske tekočine, izločanje testosterona in razvoj spolnih organov pri samcih. Ti so bili izpostavljeni parabenom posredno prek matere v času brejosti ali laktacije ali neposredno v postnatalnem ali poznejšem razvojnem obdobju. Učinke na reproduktivni sistem so beležili v skupinah, ki so bile izpostavljene dnevno, preko peroralnega vnosa vsaj 100 mg PrPB na kg TM ali 10,4 mg BuPB na kg TM. Učinki v glavnem zavzemajo zmanjšano rezervo semenske tekočine v obmodku in dnevno sintezo semenske tekočine, znižano število spermijev in prav tako znižano koncentracijo testosterona v serumu. V skupinah, ki so bile izpostavljene MePB in EtPB (pri obeh je največji dnevni vnos znašal 1000 mg/kg TM), niso opazili signifikantnih sprememb (74).

Preglednica VI: Rezultati raziskav vpliva parabenov na steroidogenezo, izločanje testosterona, tvorbo spermijev, semenske tekočine in razvoj spolnih organov pri samcih. V levem stolpcu so osnovni podatki testnega sistema; vrsta testirane živali, odmerek in način ter časovno obdobje izpostavljenosti parabenom.

TESTNI SISTEM	REZULTATI
MePB	
-podgane vrste Wistar; samci stari 25-27 dni -100 in 1000 mg/kg/dan; 8 tednov; PER OS	brez učinka na izločanje testosterona in reproduktivni sistem (74, 81)
EtPB	
-podgane vrste Wistar; samci stari 25-27 dni -100 in 1000 mg/kg/dan; 8 tednov; PER OS	brez učinka na izločanje testosterona in reproduktivni sistem (74, 81)
-podgane vrste Wistar; breje samice; od 7. do 21. dneva brejosti, učinek testiran na mladičih-moških potomcih -400 mg/kg/dan; 14 dni v času brejosti; subkutano	mladiči potomci: brez učinka na izločanje testosterona, anogenitalno razdaljo, brez histopatoloških posebnosti testisov (74, 82)
PrPB	
- podgane vrste Wistar; samci stari 19-21 dni -10, 100 in 1000 mg/kg/dan; 4 tedne; PER OS	≥ 100 mg/kg/dan: ↓ rezerva semenske tekočine v obmodku, ↓ dnevna sinteza semenske tekočine, ↓ število spermijev in ↓ koncentracija testosterona v serumu , v skupini 10 mg/kg/dan manjše nesignifikantne spremembe (83)
BuPB	
- podgane vrste Wistar; samci stari 2 dni -2 mg/kg/dan; 16 dni; subkutano	brez učinka na razvoj testisov (84)
- podgane vrste Wistar; samci stari 19-21 dni -10,4, 103, 1026 mg/kg/dan; 8 tednov; PER OS	v vseh treh skupinah: ↓ rezerva semenske tekočine v obmodku, ↓ dnevna sinteza semenske tekočine, ↓ število spermijev in ↓ koncentracija testosterona v serumu (74)
se nadaljuje na naslednji strani	

<p>- podgane vrste Sprague Dawley; breje samice, učinek testiran na mladičih-moških potomcih -100 in 200mg/kg/dan; 14 dni; subkutano</p>	<p>mladiči potomci; 100 in 200 mg/kg/dan : ↓ teža testisev, obmodka in prostate, ↓ število spermijev, ↑ ekspresija ERα- in ERβ-mRNA (74)</p>
<p>-podgane vrste Wistar; breje samice; od 7. do 21. dneva brejosti, učinek testiran na mladičih-moških potomcih -200 in 400 mg/kg/dan; 14 dni v času brejosti; subkutano</p>	<p>mladiči potomci; v obeh skupinah; od odmerka neodvisno signifikantno zmanjšano izražanje mRNA za transportni protein, ki sodeluje v steroidogenezi (StAR) (74, 82)</p>

2 NAMEN DELA

Zaradi človekovega načina življenja je v okolju vedno več snovi, ki niso naravno prisotne. V zadnjih letih so pogost predmet raziskav onesnaževala, ki izkazujejo vpliv na zdravje ljudi in živali. Spojine, ki povzročajo motnje v hormonskem sistemu, predstavljajo potencialno nevarnost za številne organizme. V primerjavi z raziskavami o vplivih HM na delovanje estrogenskega sistema, so ostala področja hormonskega sistema dokaj zapostavljena in še ne zadostno raziskana. Zato smo se odločili, da bomo v diplomski nalogi poskušali z *in vitro* testom določiti agonistične in antagonistične učinke preiskovanih spojin na AR in GR. Spojine, ki jih bomo testirali, lahko razdelimo v dve skupini glede na njihovo strukturo in uporabo. V prvi so spojine, ki se uporabljajo v proizvodnji plastike, to so analogi BPA in tudi sam BPA, v drugi pa štirje parabeni, ki se uporabljajo kot konzervansi. Za BPA in parabene je že kar nekaj časa znano, da delujejo estrogensko, vedno več dokazov je, da tudi antiandrogensko. Njihov vpliv na delovanje glukokortikoidnega sistema pa je še dokaj neraziskan, enako velja za vse analoge BPA.

Na začetku eksperimentalnega dela bomo testirali citotoksičnost vseh preiskovanih snovi v prvotno izbrani koncentraciji 50 μ M. V primeru, da se bo ta koncentracija za katero spojino izkazala kot citotoksična, bomo določili ustrezno nižjo koncentracijo za nadaljnje teste. Po ugotovitvi in potrditvi ustreznosti testiranih koncentracij bomo s pomočjo drugega *in vitro* testa, tj. luciferaznega testa, določili učinke spojin na AR in GR. Za vsak receptor posebej bomo določili signifikantne agonistične in antagonistične učinke spojin. Kot modelni sistem za ugotavljanje učinkov bomo uporabili celično linijo MDA-kb2, ki izraža endogene, funkcionalne AR in GR in omogoča določanje učinkov na obeh receptorjih z razlikovanjem agonističnega in antagonističnega učinka spojin. Glede na posamezen test bomo dodajali spojine v določenem vrstnem redu s polurnim zamikom. Pri testiranju antagonističnega delovanja posamezne spojine na določenem receptorju (AR ali GR) bomo celicam najprej dodali preiskovano spojino in po časovnem zamiku še znan agonist receptorja, na katerem določamo antagonističen učinek (DHT za testiranje antagonističnega delovanja spojin na AR oz. HC za primer GR). Tako bomo določili potencialen antagonističen učinek preiskovane spojine glede na njeno jakost zmanjšanja učinka zraven dodanega znanega agonista. Pri testiranju agonističnega delovanja preiskovane spojine na določenem receptorju (AR ali GR) pa bomo receptor, ki ni predmet

trenutnega testiranja, zasedli z njegovim znanim antagonistom, ker gre za celično linijo, kjer lahko z ustreznim ligandom merimo vezavo slednjega na AR in GR. Tako bomo pri testiranju agonističnega delovanja na AR najprej dodali RU-486 (antagonist na GR), ki bo predhodno zasedel GR in tako omogočil, da preiskovana spojina izrazi svoj učinek samo preko AR, in po pol ure dodali še preiskovano spojino. Pri testiranju agonističnega delovanja na GR pa bomo najprej dodali FLUT (antagonist na AR), ki bo predhodno zasedel AR in tako omogočil, da preiskovana spojina izrazi svoj učinek samo preko GR, in šele nato dodali preiskovano spojino.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 TESTIRANE SPOJINE

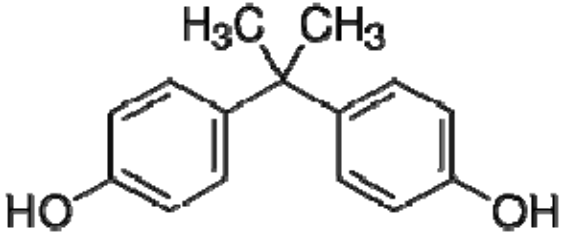
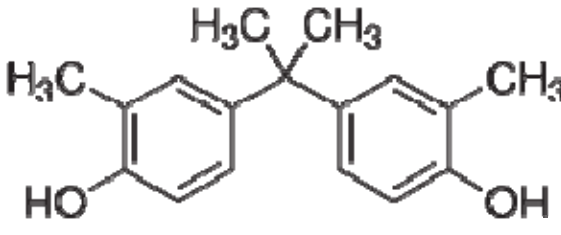
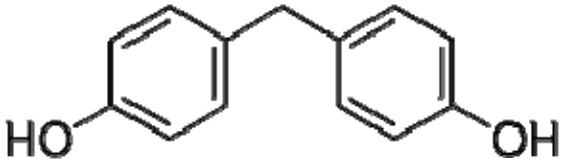
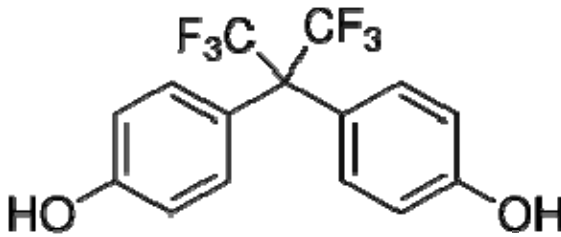
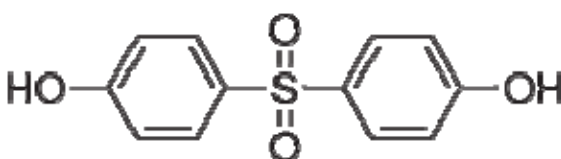
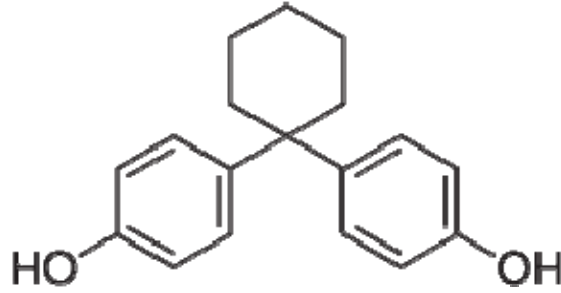
Preiskovane spojine, katerih učinek na AR in GR nas je zanimal, so bile BPA, BPAF, BPC, BPF, BPS, BPZ, BHEPS, dBPS, TIO, MePB, EtPB, PrPB in BuPB. Pri luciferaznem testu smo kot kontrolne spojine uporabili DHT, FLUT, HC in RU-486. Strukturne formule, stopnje čistote, molske mase in številke CAS ter proizvajalci vseh testiranih spojin so navedeni v preglednici VII.

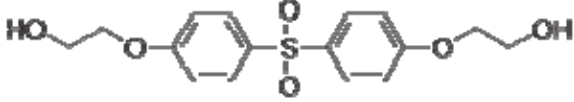
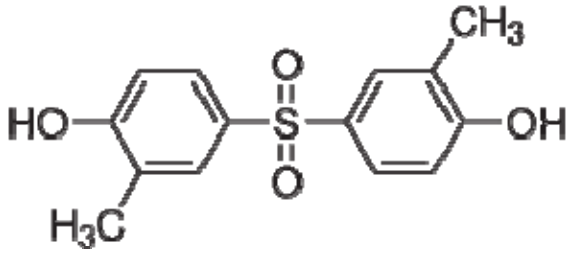
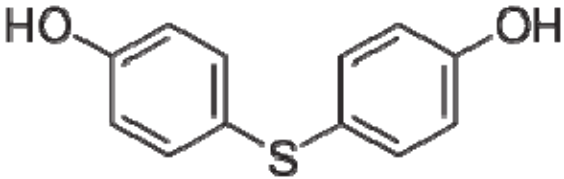
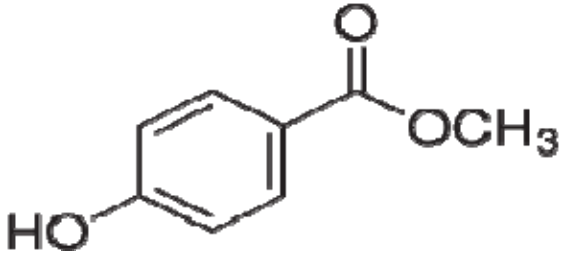
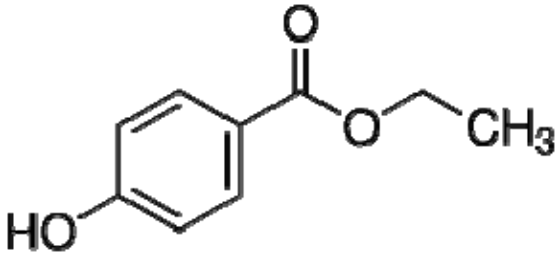
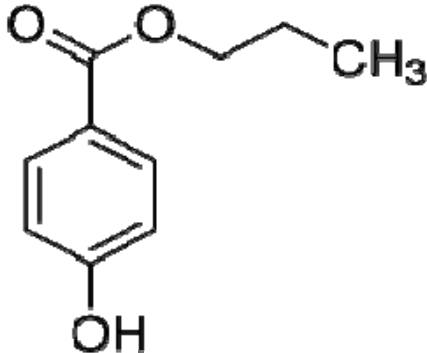
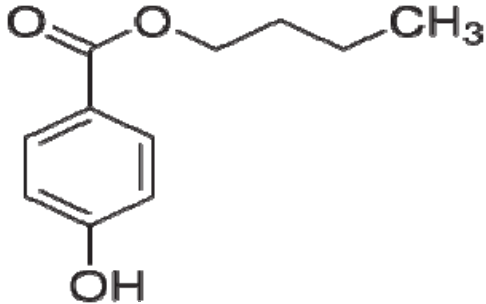
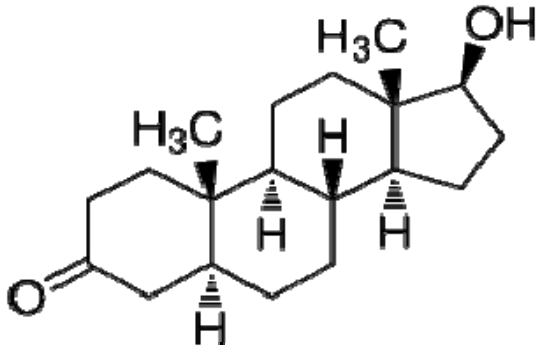
Kontrolni spojini DHT in HC smo testirali v koncentracijah, ki dosežejo 50 % maksimalnega učinka (EC_{50}) na izbrani celični liniji. FLUT in RU-486 pa smo testirali pri najnižji koncentraciji, pri kateri sta dosegla maksimalno inhibicijo agonista DHT oz. HC. Slednji koncentraciji in EC_{50} smo določili s predhodnimi luciferaznimi testi, kjer smo testirali koncentracije, ki ne delujejo citotoksično. Tako smo ugotovili, da znaša EC_{50} za DHT (agonist na AR) 0,5 nM in za HC (agonist na GR) 500 nM, najnižja koncentracija maksimalne inhibicije ustreznega agonista pa 5 μ M za FLUT (antagonist na AR) in 100 nM za RU-486 (antagonist na GR). Preiskovane spojine smo testirali v koncentraciji 50 μ M oz. nekatere zaradi citotoksičnosti ali obarjanja v mediju v ustrezno nižji koncentraciji, tj. 25 in 10 μ M. Najvišjo izhodno koncentracijo za testiranje (50 μ M) smo izbrali oz. določili glede na to, da višje koncentracije ni smiselno testirati, ker se tako visoke koncentracije načeloma ne nahajajo v okolju in zaradi tega niso toliko zanimive s toksikološkega vidika.

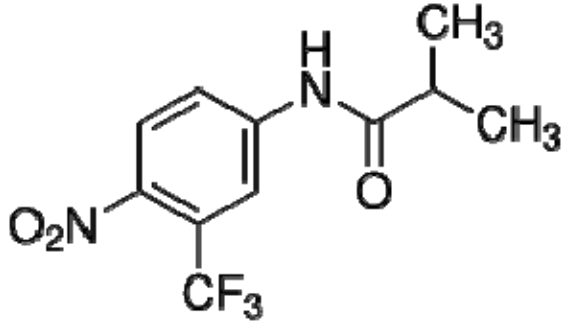
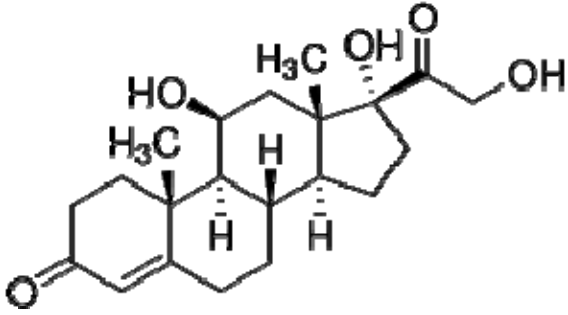
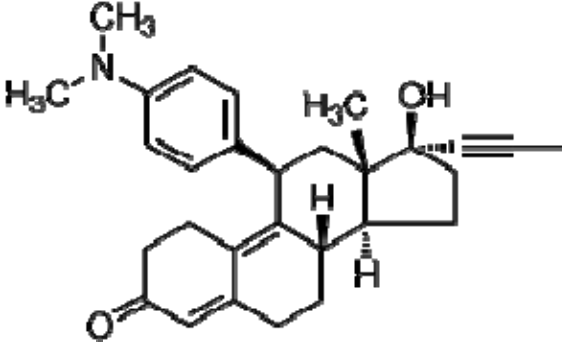
PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN

Založne raztopine testiranih spojin smo pripravljali v epicah v 1000-krat višjih koncentracijah od dejansko testiranih oziroma najvišjih testiranih. Spojine smo natehtali na analitski tehtnici (Mettler toledo, Greifensee, Švica) in raztopili v 99,8 % DMSO (Sigma-Aldrich, MO, ZDA). Zatem smo raztopine 1000-krat redčili z gojitvenim medijem. V primeru potrebe po nadaljnjih redčenjih za nižje koncentracije (pri testu citotoksičnosti smo testirali spojine v več koncentracijah) smo uporabili 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Končna koncentracija DMSO je v vseh raztopinah znašala 0,1 % (v/v). Ta koncentracija DMSO ni delovala citotoksično.

Preglednica VII: Preglednica struktur testiranih spojin (preiskovanih spojin in kontrol). V oklepaju je oznaka spojine, podčrtana vrednost predstavlja številko CAS, odstotek se nanaša na stopnjo čistote, naslednja številčna vrednost predstavlja molsko maso v g/mol, zadnji podatek pa predstavlja proizvajalca spojine.

Bisfenol A (BPA), <u>80-05-7</u> , ≥ 99 %, 228,29, Sigma-Aldrich, Nemčija	Bisfenol C (BPC), <u>79-97-0</u> , 97 %, 256,34, Sigma-Aldrich, Nemčija
	
Bisfenol F (BPF), <u>620-92-8</u> , 98 %, 200,23, Sigma-Aldrich, Nemčija	Bisfenol AF (BPAF), <u>1478-61-1</u> , ≥ 97 %, 336,23, Sigma-Aldrich, Nemčija
	
Bisfenol S (BPS), <u>80-09-1</u> , 98 %, 250,27, Sigma-Aldrich, Nemčija	Bisfenol Z (BPZ), <u>843-55-0</u> , 98 %, 268,35, Sigma-Aldrich, Nemčija
	
Bis[4-(2-hidroksietoksi)fenil]sulfon, (BHEPS), <u>27205-03-4</u> , 95 %, 338,38, Sigma-Aldrich, Nemčija	4,4'-sulfonil-bis(2-metilfenol), (dBPS), <u>16346-97-7</u> , 97 %, 278,32, Sigma-Aldrich, Nemčija

	
<p>4,4'-tiodifenol, (TIO), <u>2664-63-3</u>, 99 %, 218,27, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	<p>Metilparaben (MePB), <u>99-76-3</u>, 152,15, Fluka, Švica</p>
	
<p>Etilparaben (EtPB), <u>120-47-8</u>, 166,17, Chemos, Nemčija</p>	<p>Propilparaben (PrPB), <u>94-13-3</u>, 180,20, Fluka, Švica</p>
	
<p>Butilparaben (BuPB), <u>94-26-8</u>, 194,23, Chemos, Nemčija</p>	<p>Dihidrotosteron (DHT), $\geq 97,5$ %, <u>521-18-6</u>, 290,44, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>
	
<p>Flutamid (FLU), <u>13311-84-7</u>, 276,21, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	<p>Hidrokortizon (HC), <u>50-23-7</u>, ≥ 98 %, 362,46, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>

	
<p>Mifepriston (RU-486), 84371-65-3, $\geq 98\%$, 429,59, Sigma-Aldrich, Nemčija</p>	
	

3.1.1 CELIČNA LINIJA MDA-kb2

Za študijo smo uporabili celično linijo MDA-kb2 (ATCC, Nemčija), ki jo morfološko uvrščamo med pritrjene celične linije (adherentne). Celična linija MDA-kb2 je bila pridobljena s stabilno transfekcijo iz MDA-MB-453 linije človeških, epitelijskih celic raka dojke. Slednje izvorne celice izražajo endogene, funkcionalne AR in GR, v zelo majhni meri še ER β , na ravni mRNA pa niso zaznali ER α in progesteronskih receptorjev. Celicam MDA-MB-453 so vstavili reporterski vektor MMTV.luciferase.neo, ki vsebuje na androgene in glukokortikoide odzivno promotorsko zaporedje in reporterski gen za luciferazo (85, 86). Celično linijo MDA-kb2 smo izbrali za raziskavo zaradi njenih številnih prednosti: nezahtevnega gojenja in vzdrževanja celic, ustrezne občutljivosti in specifičnosti ter stabilne odzivnosti celic preko 80 pasaž, ni treba izvajati transfekcij, testi so hitro izvedljivi, rezultati so ponovljivi in obstaja možnost testiranja oz. določanja učinkov na obeh receptorjih z razlikovanjem agonističnega in antagonističnega učinka spojin (86).

3.1.2 OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI

Delo s celicami je potekalo v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka – LAF komori (Iskra, Šentjernej, Slovenija), ki je nameščena v prostoru, kjer velja poseben režim čistote (po načelih aseptičnih pogojev). LAF komora onemogoča dostop kontaminantov na delovno površino z omejenim dostopom in stalnim pretokom filtriranega zraka. Komoro smo pred uporabo razkužili s polurnim obsevanjem z ultravijolično svetlobo, tik pred pričetkom dela pa smo delovno površino očistili s 70-odstotnim etanolom. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice, ki smo jih prav tako razkužili s 70-odstotnim etanolom.

Med vzdrževanjem celic smo potrebovali naslednje reagente (prvi trije sestavljajo gojitveni medij):

- L-15 (Leibovitz) medij (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fetalni goveji serum – FBS (Gibco, USA),
- raztopino antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, MO, ZDA),
- DMSO 99,8 % (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fosfatni pufer – PBS (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- tripsin (Sigma-Aldrich, Nemčija) in
- barvilo tripan modro (Sigma-Aldrich, Nemčija).

ODMRZOVANJE CELIC

Pred pričetkom dela s celično kulturo je treba celice odmrzniti. Te smo namreč v obliki suspenzije shranjevali z zamrzovanjem v tekočem dušiku (-196 °C). V kriovialu (TPP, Transadingen, Švica) z volumnom 1 mL je bilo shranjenih okrog 5×10^6 celic. Po zamrzovanju smo kriovialo s celicami vzeli iz posode s tekočim dušikom in hitro odtajali v vodni kopeli (približno 37 °C, 2–4 minute). Nato smo celice prenesli v 15 mL centrifugirko in dodali 10 mL gojitvenega medija. Celotno vsebino smo v centrifugi (Tehtnica, Železniki, Slovenija) centrifugirali 5 minut pri 1000 obratih/min., nato odpipetirali in zavrgli supernatant ter na ta način odstranili krioprotektant (10 % DMSO). Zatem smo celice, ki so zaostale v sedimentu, resuspendirali v približno 5 mL gojitvenega

medija in suspenzijo na koncu prenesli v sterilno gojitveno posodo s površino 75 cm² (TPP, Transadingen, Švica).

GOJENJE IN PRESAJANJE CELIC

Celice za svoje preživetje in rast potrebujejo kontrolirano okolje. V ta namen smo celice MDA-kb2 gojili v sterilnih gojitvenih posodah (plastenke v obliki T s perforiranim zamaškom) v specializiranem inkubatorju MCO-18AIC (Sanyo, ZDA), pri 37 °C in atmosferskih pogojih.

Celice za svoje preživetje in rast potrebujejo tudi gojitveni medij z ustrezno sestavo. Pripravili smo ga po naslednji recepturi: v 500 mL medija Leibovitz smo dodali 50 mL FBS in 5,5 mL antibiotika (10000 U/mL penicilina in 10000 µg/mL streptomicina). Pripravljeni gojitveni medij smo hranili v hladilniku in ga vedno pred uporabo segreli v inkubatorju ali vodni kopeli na približno 37 °C. Med gojenjem celic smo ga zamenjali na 2 do 3 dni.

Celice se presajajo v fazi, ko dosežejo približno 80 % konfluenco. Slednje preverimo pod invertnim svetlobnim mikroskopom Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonksa). Celice so povprečno rasle tako hitro, da smo jih presajali na približno 7 dni, edino po odmrznitvi so potrebovale nekaj dodatnega časa, preden so začele normalno rasti. Pred presajanjem smo gojitveni medij in PBS na vodni kopeli ali v inkubatorju segreli na približno 37 °C, enako tripsin, ki smo ga predhodno 10-krat redčili. Pri tripsinu je bila potrebna previdnost, da se ni segreval predolgo, ker bi se s tem zmanjšala njegova aktivnost (velja podobno za vse raztopine, ki se shranjujejo v zamrzovalniku). Pomemben del presajanja adherentnih celic predstavlja odlepljanje teh od podlage. Najprej smo odstranili izrabljeni gojitveni medij, celice 1-krat sprali s približno 5 mL PBS, slednjega odstranili in dodali 5 mL razredčenega tripsina. Sledila je 4-minutna inkubacija v inkubatorju na 37 °C in atmosferski vrednosti CO₂. Po inkubaciji smo pod mikroskopom preverili ali so se celice res odlepili od podlage gojitvene posode. Celično suspenzijo smo nato s serološko pipeto za enkratno uporabo (Tpp, Transadingen, Švica) prenesli v centrifugirko z volumnom 15 mL, dodali 5 mL gojitvenega medija za ustavev delovanja tripsina in centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min. Supernatant smo odpipetirali in ostanek resuspendirali v 5 mL svežega gojitvenega medija s pomočjo pipete oziroma po potrebi z vibracijskim

mešalnikom (Biosan, Latvija). Celice smo presajali po priporočilu proizvajalca v razmerju 1 : 2 (85).

NASAJANJE CELIC

Celice smo nasajali na mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami. Za test citotoksičnosti smo celice nasajali na prozorne plošče tipa 92096 (TPP, Transadingen, Švica), za luciferazni test pa na bele Microlon Lumitrac 600 (Greiner bio-one, Kremsmünster, Avstrija). Pri nasajanju celic smo postopali enako kot pri presajanju, s to razliko, da smo jih na koncu v drugi koncentraciji prenesli v vdolbine mikrotitrskih plošč in ne v gojitvene posode. Z avtomatsko multikanalno pipeto (Biohit, Helsinki, Finska) smo v vsako vdolbino prenesli po 100 μ L homogene suspenzije, ki je vsebovala 10^4 celic. Pred tem smo celice prešteli in izračunali volumen suspenzije, ki je vsebovala priporočeno število celic za vseh 96 vdolbin, ter temu volumnu dodali še potrebno količino gojitvenega medija za ustrezno koncentracijo celic (10^5 celic/mL).

ŠTETJE CELIC

V postopku presajanja in nasajanja smo celice v suspenziji prešteli in na osnovi tega izračunali volumen suspenzije, ki je vsebovala priporočeno količino celic za presaditev oz. nasaditev. Celice smo šteli s pomočjo barvila tripan modro. Gre za vitalno barvilo, ki prodre samo v mrtve celice, ki jih obarva modro, žive celice pa ostanejo svetle (po daljšem času prodre tudi v žive in nanje deluje citotoksično).

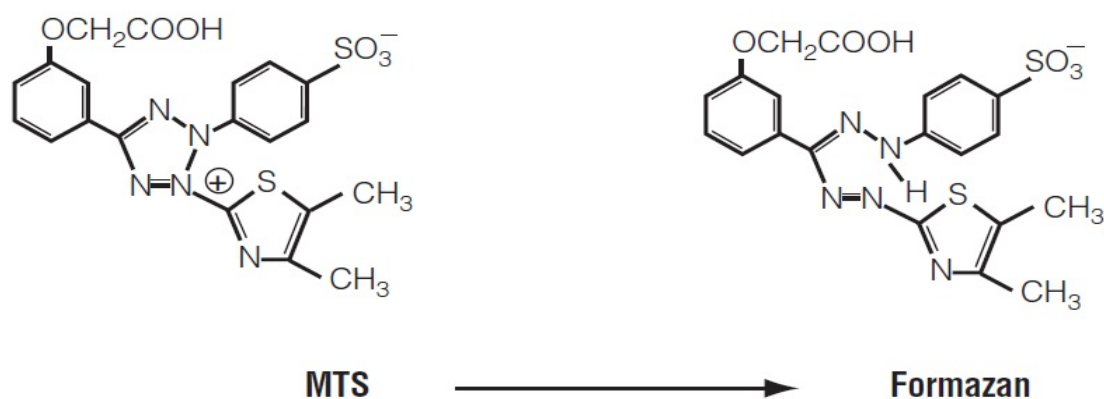
Za štetje celic smo v epico odpipetirali 100 μ L suspenzije celic, dodali enak volumen barvila tripan modro in celotno vsebino homogeno premešali. 1 μ L homogene suspenzije smo nanegli na hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija), tj. objektno ploščico s števnimi Neubauerjevimi komorami, in pod svetlobnim mikroskopom prešteli žive celice. Prešteli smo celice v štirih kvadrantih in skupno število celic v celotnem volumnu suspenzije izračunali po formuli: $(A + B + C + D)/4 \times R \times K_p \times V$.

- A, B, C, D – število celic v posameznih kvadrantih; prešteli smo celice v vseh 4 kvadrantih in nato izračunali povprečno število celic na 1 kvadrant.
- R – faktor redčenja; v našem primeru smo redčili 100 μ L celične suspenzije s 100 μ L barvila, torej je bil R enak 2.

- K_p – volumen, v katerem štejemo celice znaša 10^{-4} mL ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$), ker smo želeli izračunati število celic v 1 mL suspenzije, smo morali vrednost pomnožiti z 10^4 , torej je K_p znašal 10^4 .
- V – volumen suspenzije v katerem so bile resuspendirane celice.

3.1.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Izpostavljanje celic citotoksičnim snovem vodi do različnih pojavov, lahko pride do spremembe metabolizma celice ali pa celo do smrti celice (programirana celična smrt ali nekroza). Glede na naravo testa citotoksičnosti ločimo test preživetja, test viabilnosti, metabolni test ali inflamatorni test (87). Za testiranje citotoksičnosti smo izbrali metabolni test, imenovan tudi test MTS, ki določa spremembe v metabolizmu v kratkem času po tretiranju celic s preiskovanimi spojinami. Test MTS je dobil ime po glavni komponenti reagenta, barvilu MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol). Reagent MTS (Cell Titer 96®Aqueous One Solution Reagent) je zmes barvila MTS v obliki soli in fenazin etosulfata (PES), ki ima vlogo reagenta za prenos elektronov (87–89). Gre za kolorimetrični test, ki meri aktivnost encimov v živih, metabolno aktivnih celicah, ki so sposobne reducirati barvilo MTS do formazana. Dehidrogenaze tvorijo reducirajoče reagente (NADH ali NADPH), ki prenesejo svoj elektron na PES, ta pa reducira MTS v obarvan formazan, ki je topen v gojišču in absorbira pri 490 nm. Iz izmerjene absorbance dobimo količino nastalega formazana, ki je sorazmeren številu (deležu) živih, metabolno aktivnih celic v kulturi. S pomočjo tega testa naredimo vzporednico med preživetjem celic po tretiranju s preiskovanimi spojinami in njihovo metabolno aktivnostjo. Pri tem pa se je treba zavedati, da lahko citotoksična spojina samo spremeni celice oziroma jim okvari encim, ki je odgovoren za redukcijo barvila MTS, in dobimo negativne rezultate testiranja, celice pa vseeno preživijo (88, 89).



Slika 5: Struktura barvila MTS (tetrazolijeva sol) in njegovega produkta formazana (88).

Za izvedbo testa smo potrebovali naslednje reagente (prvi trije sestavljajo gojitveni medij):

- L-15 (Leibovitz) medij (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fetalni goveji serum – FBS (Gibco, ZDA),
- raztopino antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- DMSO 99,8 % (Sigma-Aldrich, Nemčija) in
- reagent MTS; Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, ZDA).

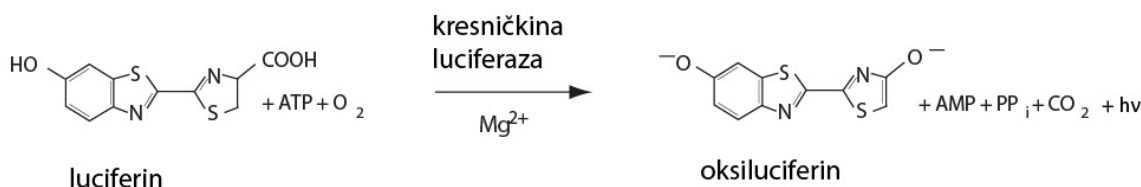
Preiskovane spojine smo testirali v prvotno izbrani koncentraciji 50 µM in istočasno še v dveh nižjih koncentracijah, 25 in 10 µM. Za kontrolo smo uporabili gojitveni medij, prav tako pa še raztopino 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, ki je služila kontroli topila. Test MTS je trajal 3 dni. Prvi dan smo celice nasadili na mikrotitrsko ploščo in jih inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 37 °C in atmosferskih pogojih. Naslednji dan smo odstranili gojitveni medij in celicam dodali pripravljene raztopine s spojinami (stimulirane celice) ali kontrolo (nestimulirane celice). Po 24-urni inkubaciji smo mikrotitrsko ploščo s celicami pogledali pod svetlobnim mikroskopom in preverili morebitno obarjanje testiranih spojin. Zatem smo dodali 10 µL reagenta MTS, inkubirali še vsaj 3 ure in s čitalcem mikrotitrskih plošč

Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, ZDA) izmerili absorbanco pri 490 nm. Absorbanco 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (brez celic; slepa) smo posneli kot ozadje in na koncu vrednost odšteli od absorbance stimuliranih in nestimuliranih celic. Končni rezultat preživetja celic smo podali relativno glede na kontrolo.

3.1.4 DOLČANJE UČINKOV NA ANDROGENSKIH IN GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH

Po tretiranju celic s spojinami, ki imajo sposobnost preko AR oz. GR povzročiti biološki odgovor, se v celici sproži veriga signalnih reakcij, ki se izrazi v sintezi specifičnih proteinov, ki so na koncu odgovorni za biološki odgovor. Ti se v *in vitro* testih določajo s pomočjo posrednih, merljivih parametrov, ki so v neposredni korelaciji z jakostjo delovanja oz. s koncentracijo aktivne spojine. Na ta način merimo relativno biološko aktivnost spojine glede na ustrezno kontrolo. Za posredno določanje delovanja spojin smo izbrali že uveljavljen luciferazni test, ki temelji na izražanju reporterskega gena, ki kodira encim luciferazo. Ta gen je uravnavan s promotorskim zaporedjem, na katero se veže AR oz. GR (v obliki kompleksa z ligandom) kot transkripcijski faktor. Aktivacija transkripcije oz. aktivnost luciferaze je torej pokazatelj biološke aktivnosti testiranih spojin.

Luciferin pri reakciji bioluminiscence nastopa kot substrat, ATP in magnezijev ion pa imata vlogo kofaktorja. Encim v prisotnosti ATP in magnezijevega iona katalizira oksidacijo luciferina do hidroperoksidnega intermedata, ki nato ciklizira in pri razpadu odda svetlobo (90).



Slika 6: Reakcija bioluminiscence, ki jo katalizira kresničkina luciferaza (90).

Za izvedbo testa smo potrebovali naslednje reagente (prvi trije sestavljajo gojitveni medij):

- L-15 (Leibovitz) medij (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fetalni goveji serum – FBS (Gibco, ZDA),
- raztopino antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- DMSO 99,8 % (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fosfatni pufer – PBS (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- izhodni lizirni pufer Reporter Lysis 5X Buffer (Promega, Madison, WI, ZDA) in
- luciferazni reagent Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI, ZDA).

Preiskovane spojine smo testirali v prvotno določeni koncentraciji, tj. 50 µM oz. nekatere zaradi citotoksičnosti ali obarjanja v mediju v ustrezno nižji koncentraciji, tj. 25 ali 10 µM. Za negativno kontrolo smo uporabili gojitveni medij, raztopina 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pa je služila kontroli topila. Kot pozitivni kontroli pa smo testirali DHT in HC. Kombinaciji DHT/FLUT in HC/RU sta služili kontroli antagonist, kombinaciji DHT/RU in HC/FLUT pa kontroli agonista. Prvi dan smo celice nasadili na mikrotitrsko ploščo in jih inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 37 °C in atmosferski vrednosti CO₂. Naslednji dan smo odstranili gojitveni medij in celicam dodali pripravljene raztopine s preiskovanimi spojinami oz. raztopine s kontrolnimi spojinami. Celicam smo dodajali spojine v odvisnosti glede na posamezen test v določenem vrstnem redu s polurnim zamikom. Izjema je bil receptorsko neselektiven (na AR in GR hkrati) test agonističnega delovanja, kjer smo celicam dodali samo 100 µL raztopine preiskovane spojine. Pri ostalih smo postopali na naslednji način:

- test agonističnega delovanja na AR; najprej smo dodali 50 µL pripravljene raztopine RU-486 (antagonist na GR, ki je predhodno zasedel GR in tako omogočil, da preiskovana spojina izrazi svoj učinek samo preko AR), inkubirali pol ure in zatem dodali še 50 µL pripravljene raztopine preiskovane spojine,

- test antagonističnega delovanja na AR; najprej smo dodali 50 μ L raztopine preiskovane spojine, inkubirali pol ure in zatem dodali še 50 μ L raztopine DHT (agonist na AR). Tako smo aktivnost spojine določili glede na njeno jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenskega agonista.

Pri testiranju agonističnega in antagonističnega delovanja na GR smo postopali podobno, s to razliko, da smo namesto RU-486 dodali FLUT (antagonist na AR), namesto DHT pa HC (agonist na GR). Po dodatku pripravljenih raztopin preiskovanih in kontrolnih spojin je sledila 24-urna inkubacija, zatem smo raztopine spojin in kontrol odpipetirali iz vdolbin. Njihov morebiten zaostanek smo odstranili s spiranjem oz. dodatkom 100 μ L PBS. Slednjega smo odstranili in za liziranje celic v vsako vdolbino dodali 20 μ L lizirnega pufru (predhodno z vodo 5-krat razredčeni izhodni pufer). Mikrotitrsko ploščo smo prenesli v zamrzovalnik (Sanyo, ZDA) in jo za najmanj 3 ure zamrznili na -80 °C. Zatem smo z multikanalno pipeto v vdolbine dodali 40 μ L luciferaznega reagenta z luciferinom in takoj pomerili luminescenco s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, ZDA). Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano substanco in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju s kontrolo, podamo kot relativno aktivnost luciferaze.

3.1.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Pridobljene rezultate meritev smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost meritev iz minimalno 3 neodvisnih ponovitev vsakega testa oziroma 3 bioloških ponovitev (vsakokrat na drugi pasaži celic). Vsakič pa smo preiskovano spojino v določeni koncentraciji in kontrolo testirali vsaj v duplikatu. Z dvostranskim Studentovim t-testom smo primerjali rezultate vzorčnih skupin (preiskovane spojine) in kontrole. Odstopanja od kontrole so bila statistično značilna, kadar je bila verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 5 % (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Za grafično predstavitev rezultatov smo rezultate meritev najprej normalizirali glede na kontrolo, katere vrednost smo izbrali za 100 %. Nato smo normaliziranim povprečnim vrednostim poskusov določili še standardne odklone.

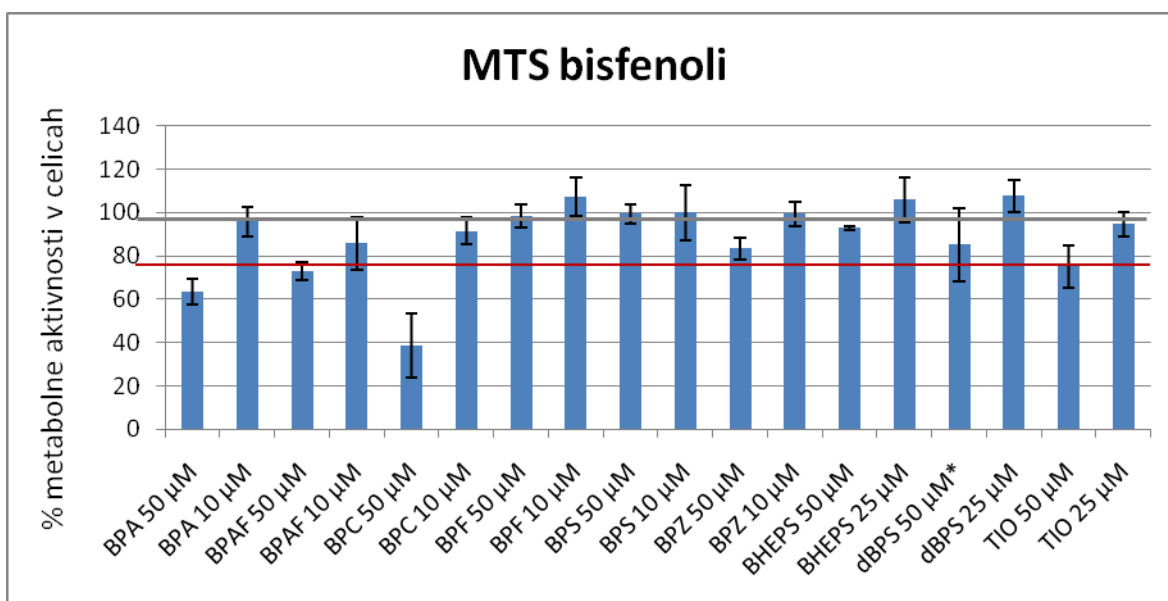
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 BISFENOLI

4.1.1 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

Morebitno citotoksičnost prvotno izbrane najvišje testirane koncentracije smo preverili s testom MTS. Če se je prvotno izbrana testirana koncentracija, tj. 50 μM , izkazala kot citotoksična ali neustrezna zaradi obarjanja spojine v gojitvenem mediju, smo s testom MTS poiskali in potrdili ustrezno nižjo koncentracijo, ki ni bila citotoksična in tudi ni povzročala obarjanja. Raven citotoksičnosti bisfenolov po 24-urni stimulaciji celic smo določili s primerjavo celic, ki so bile tretirane s preiskovanimi spojinami, in celic, ki so bile inkubirane v 0,1 % DMSO v mediju.

Bisfenole smo testirali v prvotno izbrani testirani koncentraciji 50 μM in istočasno še za primer citotoksičnosti oz. obarjanja v dveh nižjih koncentracijah, tj. 10 in 5 μM za BPA, BPAF, BPC, BPF, BPS in BPZ ter 25 in 10 μM za BHEPS, dBPS in TIO. Na spodnjem diagramu (slika 7) so prikazani rezultati samo za najvišjo izhodno oz. začetno postavljeno koncentracijo, tj. 50 μM in za naslednjo nižjo testirano koncentracijo, tj. 10 ali 25 μM . 0,1 % raztopino DMSO v gojitvenem mediju in sam gojitveni medij smo istočasno testirali kot kontroli. Absorbanci obeh kontrol sta bili približno enaki, kar tudi potrjuje, da 0,1 % DMSO, v katerem so bile pripravljene končne raztopine spojin, ni citotoksičen in ne vpliva na rezultate testa. Tega smo izvedli, kot je opisano v poglavju »Materiali in metode«. Po 24-urni stimulaciji celic z izbranimi bisfenoli (BPA, BPAF, BPC, BPF, BPS, BPZ, BHEPS, dBPS in TIO) se je koncentracija 50 μM izkazala kot citotoksična pri BPA, BPAF, BPC in TIO. Za slednje štiri lahko na sliki 7 vidimo, da je metabolična aktivnost celic padla pod 80 % (minimalna meja zadostne metabolne aktivnosti). Metabolična aktivnost pa je bila pri naslednji, manjši testirani koncentraciji zadostna. Pri BPA, BPAF in BPC je za koncentracijo 10 μM znašala 96 %, 86 % in 92 %, pri TIO pa pri koncentraciji 25 μM 95 %. Torej smo v nadaljnjih testih za BPA, BPAF in BPC izbrali koncentracijo 10 μM , v primeru TIO pa 25 μM . Metabolična aktivnost dBPS je pri koncentraciji 50 μM znašala 85 %, vendar smo ga v nadaljnjih testih testirali pri 25 μM , ker se je pri 50 μM obarjal v gojitvenem mediju. Pri ostalih bisfenolih pa smo za nadaljnje teste kot ustrezno koncentracijo izbrali 50 μM . Pri tej koncentraciji je metabolična aktivnost BPF znašala 98 %, BPS 99 %, BPZ 83 % in BHEPS 93 %.



Slika 7: Rezultati treh bioloških ponovitev testa MTS oziroma preverjanja ustreznosti (necitotoksičnosti) prvotno izbrane koncentracije 50 µM za nadaljnje teste določanja učinkov bisfenolov na AR in GR. Za primer citotoksičnosti koncentracije 50 µM smo celice istočasno stimulirali še z nižjimi koncentracijami. Vse vrednosti metabolične aktivnosti celic, tretiranih s preiskovanimi spojinami, so normalizirane glede na celice, inkubirane v 0,1 % DMSO (raven je označena z odebeljeno sivo črto) in prikazane v odstotkih (% ± SD). Rdeča črta označuje spodnjo mejo (80 %) ustrezne metabolične aktivnosti, * pa obarjanje spojine v gojitvenem mediju.

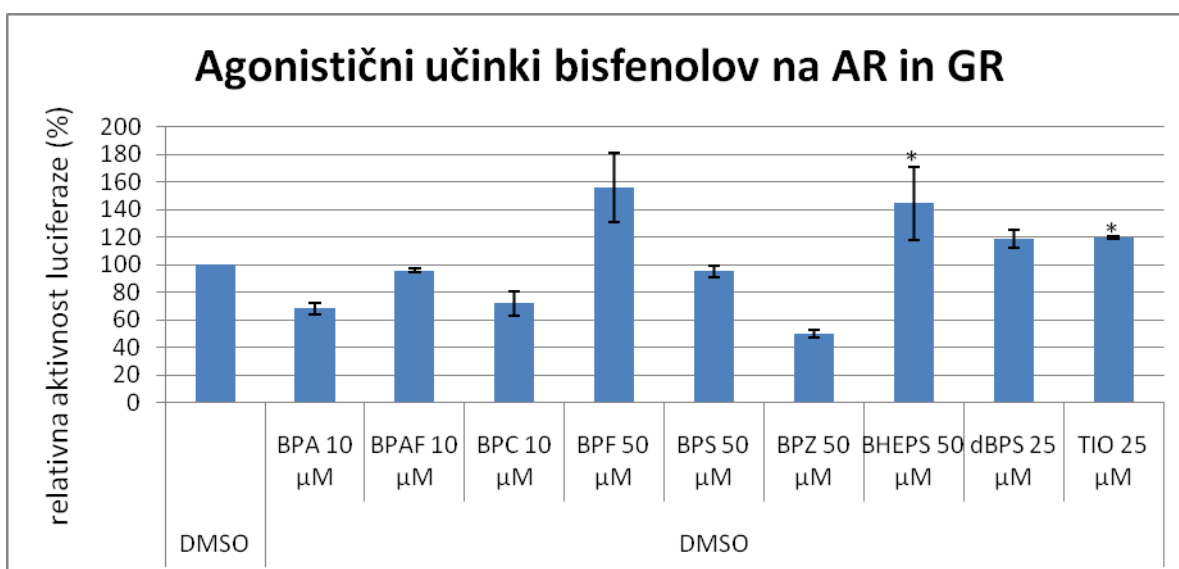
4.1.2 DOLOČANJE UČINKA BISFENOLOV NA ANDROGENSKIH RECEPTORJIH

Na začetku luciferaznih testov določanja učinkov smo testirali agonistični učinek bisfenolov na obeh v celici prisotnih receptorjih (AR in GR) hkrati. Od vseh testiranih bisfenolov sta le BHEPS in TIO glede na kontrolo (0,1 % DMSO v mediju) signifikantno povečala aktivnost luciferaze (slika 8). BHEPS je pri koncentraciji 50 µM povečal aktivnost luciferaze za približno 45 %, TIO pa pri koncentraciji 25 µM za približno 20 %. Ostali bisfenoli pri testirani koncentraciji (BPA 10 µM, BPAF 10 µM, BPC 10 µM, BPF 50 µM, BPS 50 µM, BPZ 50 µM in dBPS 25 µM) niso signifikantno povečali aktivnosti luciferaze, torej niso izkazali potenciala za agonistično delovanje na AR niti na GR.

Bisfenola, ki sta signifikantno povečala aktivnost, smo uvrstili v receptorsko selektivno agonistično testiranje (posebej na AR in posebej na GR), saj iz rezultatov tega receptorsko neselektivnega testiranja ni mogoče določiti, ali posamezna spojina deluje agonistično na AR ali GR ali oba receptorja hkrati. Glede na do zdaj znane podatke drugih raziskav agonističnega delovanja bisfenolov na AR oz. GR smo pričakovali, da bo še vsaj BPA izkazal potencial agonističnega delovanja. Iz literaturnih podatkov je namreč znano, da BPA na celični liniji 3T3-L1 pri koncentraciji 1 μM doseže signifikantni agonistični učinek na GR. Glede na kontrolo, tj. medij, je povečal aktivnost luciferaze za približno 3-krat. Za primerjavo, deksametazon je pri enaki koncentraciji aktivnost povečal za 3,5-krat (38). Glukokortikoidno delovanje BPA je dokazano tudi z *in silico* in eno *in vivo* študijo (32). Za ostale bisfenole za enkrat ni nobenih dostopnih podatkov o njihovih učinkih na GR. Glede na strukturno podobnost pa smo pričakovali, da bi lahko poleg BHEPS in TIO tudi BPA in ostali njegovi analogi izkazali agonistične učinke na GR. Torej bi v primeru potencialnega glukokortikoidnega delovanja morali povečati aktivnost luciferaze ne glede na učinek na AR, ker gre v našem primeru za receptorsko neselektiven test. Poleg tega glede na dostopne podatke nismo pričakovali, da se bi aktivnost luciferaze v tem testu povečala zaradi androgenega delovanja. Potencialno androgeno aktivnost BPA in nekaterih njegovih analogov so raziskovali v številnih *in vitro* študijah in v nobeni od teh niso zaznali agonističnega učinka na AR. Podatki so dostopni za BPA, ki so ga testirali v različnih študijah na različnih celicah, v koncentracijskem območju 10^{-7} - 10^{-4} μM , in še za BPAF, BPF in BPS ter BPZ (34, 35, 37). Morebitne agonistične učinke na AR zadnjih štirih so določali na celicah NIH3T3 pri koncentraciji 1 μM (34). Za ostale bisfenole pa ni dostopnih podatkov o potencialnem androgenem delovanju. Glede na njihovo podobnost z bisfenoli, za katere so rezultati že znani, pa nismo pričakovali agonističnega učinka na AR.

Zakaj nobeden od bisfenolov, razen BHEPS in TIO, ni izkazal agonističnega učinka na GR glede na do zdaj znane podatke, ki dokazujejo glukokortikoidno delovanje BPA in glede na strukturno podobnost BPA in ostalih bisfenolov, ni moč enostavno odgovoriti. Odgovor pa je najverjetneje moč iskati v celični liniji in njeni občutljivosti na potencialne agonistične učinke izbranih spojin v testiranih koncentracijah. Različna občutljivost celičnih linij na posamezne spojine je tudi vzrok zakaj je med sabo težko primerjati rezultate za posamezno spojino, dobljene na različnih celičnih linijah, čeprav je spojina testirana z enako metodo,

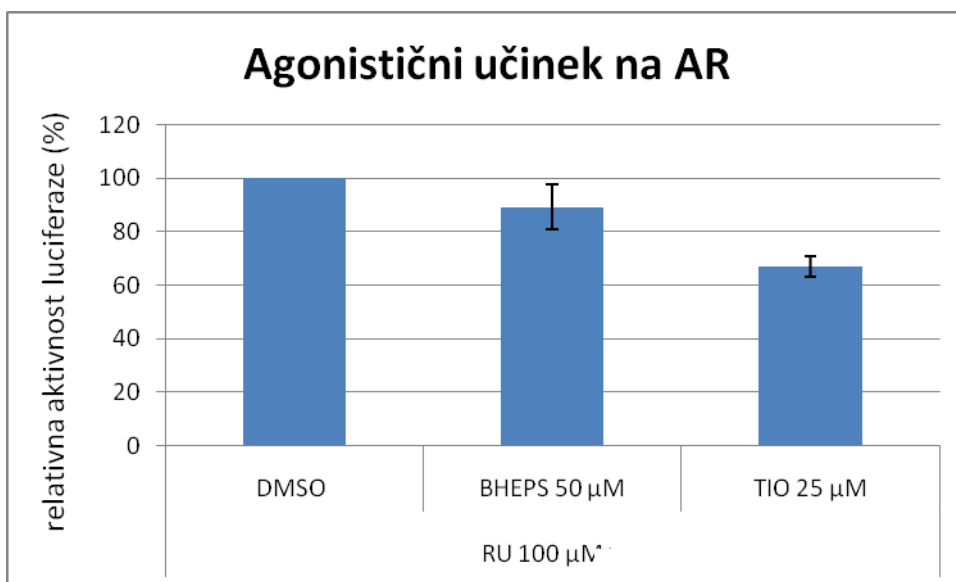
pri enaki koncentraciji. Določena spojina lahko npr. na eni celični liniji deluje agonistično, na drugi liniji pa v enaki koncentraciji citotoksično ali pa komaj ali sploh ne zaznamo kakršnega koli učinka. Tako je npr. celična linija CHO-K1 (test AR-EcoScreen) približno 100-krat bolj občutljiva na hidroksiflutamid kot celice MDA-kb2, ki smo jih v eksperimentalnem delu uporabljali mi. Vzrok za opisano razliko v občutljivosti v zgornjem primeru je, da pride do veliko večje ekspresije AR v celicah CHO-K1 kot pa v celicah MDA-kb2 (79). Celične linije se med sabo precej razlikujejo, vsaka ima določene prednosti in slabosti. Za *in vitro* študije se uporabljajo npr. tudi celice gliv kvasovk, katerih velika slabost je, da spojine zelo težko prehajajo skozi celično steno in membrano celic. Za teste, ki določajo hormonsko aktivnost spojin posredno preko transkripcijske aktivnosti, pa na splošno velja, da so zelo občutljivi (79).



Slika 8: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko neselektivnega določanja agonističnega delovanja. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (bisfenol) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju s kontrolo (DMSO) je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Spojini (BHEPS 50 μ M in TIO 25 μ M), ki sta v začetnem receptorsko neselektivnem testiranju delovali signifikantno agonistično, smo uvrstili v selektivno testiranje agonističnega delovanja na AR. Pol ure pred dodatkom posameznega bisfenola smo dodali

RU-486 (100 nM), ki je v tem času zasedel GR in tako omogočil, da sta bisfenola izrazila svoj učinek samo preko delovanja na AR in ne preko delovanja na oba receptorja hkrati. Noben pri testirani koncentraciji ni imel signifikantnega vpliva na aktivnost luciferaze (slika 9). Zaključimo lahko, da nobeden od teh dveh testiranih na AR ne delujejo agonistično.



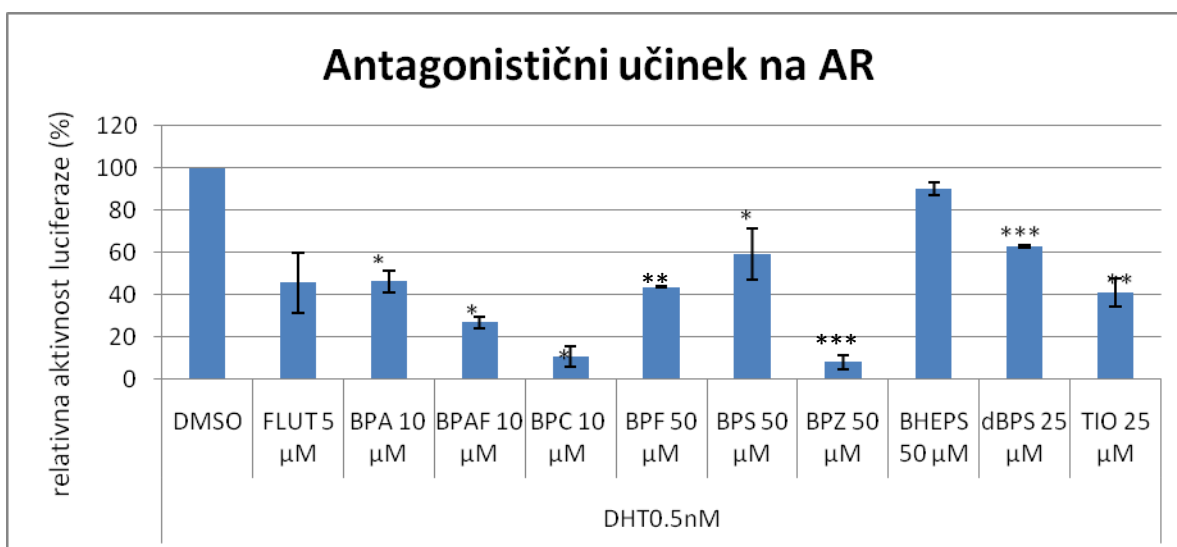
Slika 9: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na AR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (bisfenol) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju z RU-486 je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Pri testiranju antagonističnega učinka posameznega bisfenola na AR smo aktivnost določili glede na njegovo jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenega agonista DHT (0,5 nM- EC_{50} za uporabljeno celično linijo MDA-kb2). Razen pri BHEPS smo pri vseh ostalih bisfenolih zaznali signifikanten antagonističen učinek na AR. BPA (10 µM) je zmanjšal učinek DHT za 54 %, BPAF (10 µM) za 73 %, BPC (10 µM) za 81 %, BPF (50 µM) za 57 %, BPS (50 µM) za 51 %, BPZ (50 µM) za 92 %, dBPS (25 µM) za 37 % in TIO (25 µM) za 59 % (slika 10). BHEPS pri koncentraciji 50 µM ni izkazal signifikantnega učinka na AR. Obstaja verjetnost, da BHEPS ni signifikantno zmanjšal učinka DHT zaradi prenizke testirane koncentracije oz. prenizke občutljivosti celic na

spojino. Vzrok je moč iskati tudi v strukturni razliki po kateri se razlikuje od vseh ostalih bisfenolov, in sicer sta obe fenolni skupini zaetreni z etilen glikolom. Morebiti ta distančnik med aromatskim obročem in prosto hidroksilno skupino slednji preprečuje vezavo na AR ali pa samo zmanjša jakost učinka. Za ostale bisfenole so bili rezultati v glavnem pričakovani, namreč antiandrogensko delovanje je bilo za večino bisfenolov že potrjeno z vsaj eno študijo. BPA je v enaki koncentraciji, kot smo jo uporabili mi, tj. 10 μM in na enaki celični liniji, tj. MDA-kb2, prav tako izkazal antagonistični učinek na AR. Aktivnost luciferaze, katere izražanje je bilo inducirano z DHT (0,25 nM), je zmanjšal za 90 %. V tej študiji so uporabili 2-krat manjšo koncentracijo DHT kot v našem poskusu in zaradi tega je najverjetneje BPA dosegel tudi večjo jakost učinka (90 %) kot v našem primeru (54 %). Njegova antiandrogenska aktivnost je bila dokazana še na drugih celičnih linijah (npr. NIH3T3, CV-1) in tudi s pomočjo drugih reporterskih genov (npr. CAT) (34, 35, 37). Za določeno spojino pa je težje primerjati rezultate med sabo, če so ti pridobljeni na drugi celični liniji, z drugačno metodo in pri drugih koncentracijah. Tudi antiandrogenska aktivnost BPAF, BPF, BPS in BPZ je bila dokazana na drugi celični liniji, vendar prav tako z luciferaznim testom in v koncentracijskem območju, ki obsega tudi naše testirane koncentracije. Prvi je na celični liniji NIH3T3 dosegel večjo jakost delovanja kot BPA, ostali trije pa manjšo ali približno enako. V tej študiji je IC_{50} za BPAF znašal 1,3 μM , za BPF 12 μM , BPS 17 μM , BPZ 7.9 μM in za primerjavo – IC_{50} flutamida je znašal 2,5 μM , BPA pa 4,3 μM (34). Antiandrogenska aktivnost BPF je bila dokazana tudi na celični liniji MDA-kb2, vendar pri koncentraciji 10 μM in prav tako nižji koncentraciji DHT, tj. 0,4 nM. V slednjem primeru je zmanjšal aktivnost luciferaze za 41 % (45). Ni pa dostopnih nobenih rezultatov študij določanja učinkov na AR za BPC, TIO in dBPS. Glede na njihovo strukturno podobnost z ostalimi bisfenoli pa smo prav tako pričakovali antagonistični učinek na AR. Torej je bil ta za te tri spojine prvič dokazan v naši raziskavi.

Glede na to, da nismo testirali vseh bisfenolov pri enakih koncentracijah, jih niti ne moremo razvrstiti po doseženi jakosti antiandrogenega učinka. Lahko pa iz zgoraj omenjenih študij, kjer so testirali BPA, nekatere njegove analoge in podobne spojine, ter naših rezultatov sklepamo, da je za antagonistične učinke na AR potreben vsaj en fenilni obroč in ena nanj vezana hidroksilna funkcionalna skupina. Dodatni substituenti na fenilnem obroču in na metilnem mostu pa regulirajo moč antiandrogenega delovanja. V primeru, ko so bile na fenilni obroč vezane dodatne elektron akceptorske skupine

(halogenske in hidroksilne), se je jakost antiandrogenskega delovanja zmanjšala ali ga več ni bilo moč zaznati, močno pa se je povečalo pri alkilnih substituentih. Iz rezultatov antiandrogenske aktivnosti analogov z različnimi substituenti na metilnem mostu, ni moč razbrati trenda vplivanja na jakost delovanja. Npr. pri karboksilni ali metilhidroksilni skupini ni bilo moč zaznati delovanja, to pa je bilo približno ohranjeno ali po nekaterih rezultatih celo povečano pri dveh trifluorometilnih skupinah. Antiandrogensko pa deluje tudi spojina, kjer namesto metilnega mostu fenilna obroča povezuje le tio ali sulfonilna skupina (34, 35).

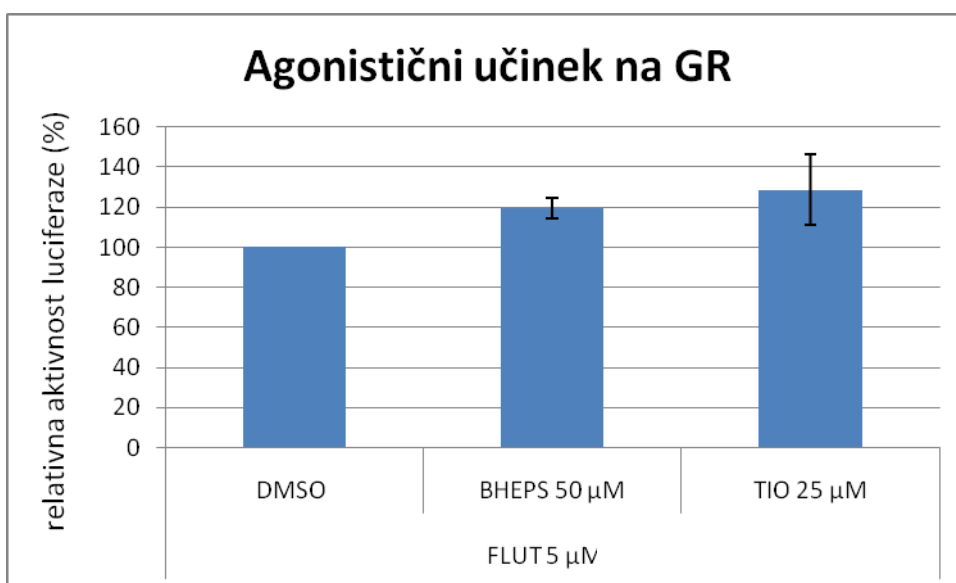


Slika 10: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na GR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (bisfenol) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju z DHT je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.1.3 DOLOČANJE UČINKA BISFENOLOV NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH

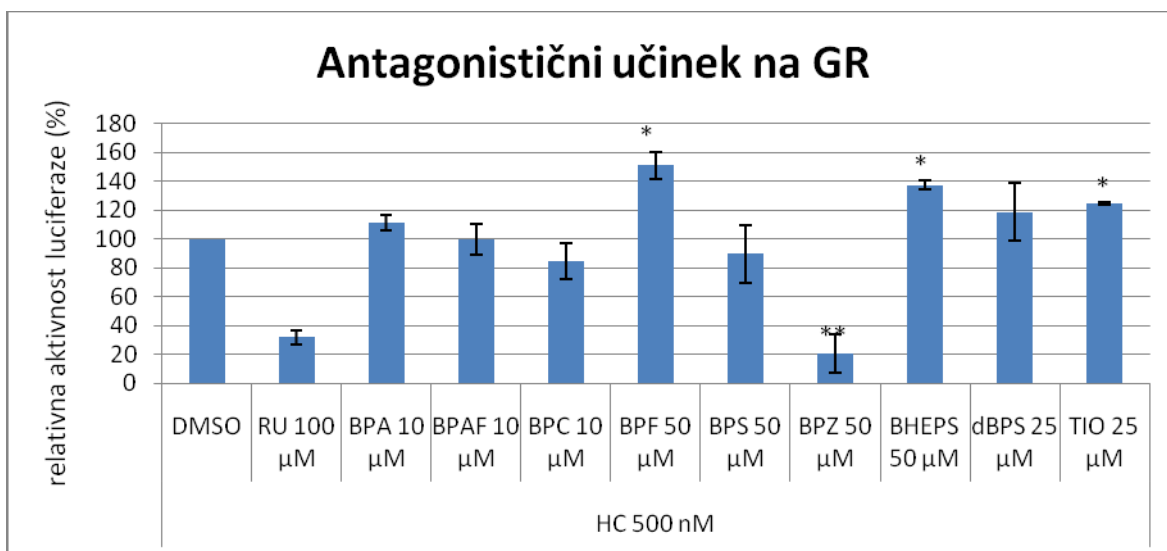
Potencialne agonistične učinke na GR smo določali za BHEPS (50 μ M) in TIO (25 μ M), ker sta le ta dva v začetnem receptorsko neselektivnem (na AR in GR hkrati) testiranju delovala signifikantno agonistično. Pol ure pred dodatkom posameznega bisfenola, smo dodali FLUT (5 μ M), ki je v tem času zasedel AR in tako omogočil, da bisfenola vplivata na aktivnost luciferaze samo preko delovanja na GR in ne preko delovanja na oba

receptorja hkrati. Noben ni pri testirani koncentraciji imel signifikantnega vpliva na aktivnost luciferaze (slika 11). Nakazala pa sta trend agonističnega delovanja na GR, vendar lahko zaključimo le, da nobeden od teh dveh testiranih bisfenolov na AR ne deluje agonistično. Njuno potencialno glukokortikoidno delovanje pa do zdaj ni bilo testirano v kakšni drugi študiji. Glede na njuno strukturno podobnost z BPA, za katerega je glukokortikoidno delovanje že dokazano, smo pričakovali, da bosta izkazala agonističen učinek na GR. Zakaj nista izkazala signifikantnega učinka, lahko najverjetneje pripišemo njuni prenizki testirani koncentraciji oz. premalo občutljivi celični liniji. V slednji najverjetneje tiči tudi razlog, zakaj se ni izkazal signifikanten agonističen učinek BHEPS in TIO na GR niti na AR, medtem ko sta delovala signifikantno agonistično ob obeh prostih receptorjih (receptorsko neselektiven test). Morebiti je razlog v sami osnovni razliki receptorsko neselektivnega in selektivnega testiranja agonističnega učinka. Pri slednjem smo signifikantnost učinka določili iz razmerja med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju s FLUT, pri neselektivnem pa iz razmerja po tretiranju celic s preiskovano spojino in inkubiranju celic z 0,1 % DMSO v mediju.



Slika 11: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na GR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (bisfenol) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju s FLUT je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Antagonistični učinek posameznega bisfenola smo na GR določali glede na njegovo jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega glukokortikoidnega agonista HC (500 nM-EC₅₀ za uporabljeno celično linijo MDA-kb2). Signifikanten antagonističen učinek smo na GR zaznali le pri BPZ. Slednji je pri koncentraciji 50 µM zmanjšal učinek HC za 79 % (slika 12). BPF, BHEPS in TIO pa so učinek HC signifikantno povečali. BPF je pri koncentraciji 50 µM povečal učinek HC za 51 %, BHEPS je pri koncentraciji 50 µM povečal aktivnost za 37 %, TIO pa pri 25 µM za 25 % (slika 12). Torej bi lahko za slednje tri rekli, da v kombinaciji s HC delujejo sinergistično. Ne moremo pa z gotovostjo trditi, da je bilo povečanje aktivnosti luciferaze doseženo samo preko GR, ker so bili v celici hkrati prisotni še neblokirani AR. Čeprav je verjetnost povečanja aktivnosti luciferaze preko AR zelo majhna, glede na to, da smo za BPF v receptorsko neselektivnem in za BHEPS ter TIO dodatno v receptorsko selektivnem testiranju ugotovili, da ne izkazujejo potencialnega agonističnega učinka na AR. BPAF (10 µM), BPC (50 µM), BPS (50 µM) in dBPS (25 µM) ter BPA (10 µM) niso dosegli signifikantnega učinka na GR. Od vseh bisfenolov so do zdaj znani samo rezultati za BPA. Rezultati tega *in vitro* testiranja učinkov BPA na GR na celicah 3T3-L1 kažejo, da je ta v nanomolarnem območju ob diferenciacijski mešanici, ki je med drugim vsebovala 11-dehidrokortizon, deloval sinergistično na akumulacijo lipidov v adipocitih. Glede na strukturno podobnost BPA in analogov, ki so povečali učinek delovanja HC, slednje ni nepričakovano (38). Na osnovi majhnega števila testiranih spojin in precej različnih končnih rezultatov in tudi različnih testiranih koncentracij pa ne moremo delati zaključkov glede povezave med strukturo in učinkom oz. njegovo jakostjo.



Slika 12: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na GR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (bisfenoli) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju z HC je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Na osnovi rezultatov testiranja učinkov bisfenolov na AR in GR lahko povzamemo in z gotovostjo zaključimo, da vsi testirani bisfenoli, razen BHEPS, delujejo antagonistično na AR. Antagonistično delovanje je bilo pričakovano glede na znane podatke drugih podobnih testiranj BPA, BPAF, BPF, BPS in BPZ ter strukturne podobnosti teh in ostalih testiranih spojin (34, 35, 37, 38). BHEPS pa ni dosegel signifikantnega agonističnega učinka najverjetneje zaradi prenizke koncentracije oz. občutljivosti celic na samo spojino ali strukturne posebnosti, po kateri se razlikuje od vseh ostalih testiranih bisfenolov. Slednja posebnost se nanaša na z etilen glikolom zaetreni fenolni skupini in morebiti ta distančnik med aromatskim obročem in prosto hidroksilno skupino botruje neaktivnosti ali samo manjši moči aktivnosti, ki pa je nismo zaznali. Na osnovi rezultatov našega eksperimentalnega dela in nekaterih drugih študij, kjer so prav tako na osnovi luciferaznega testa določali učinke nekaterih bisfenolov in sorodnih spojin na AR, lahko sklepamo še na druge korelacije med strukturo in antagonističnimi učinki na AR. Za slednje je potreben vsaj en fenilni obroč in ena nanj vezana hidroksilna funkcionalna skupina. Dodatni substituenti na fenilnem obroču in na metilnem mostu regulirajo moč

antagonističnega učinka. V primeru, ko so bile na fenilni obroč vezane dodatne elektron akceptorske skupine, se je moč antiandrogenega delovanja zmanjšala ali ga več ni bilo moč zaznati, moč pa se je povečala pri alkilnih substituentih. Učinek je prisoten tudi pri spojinah, kjer namesto metilnega mostu, fenilna obroča povezuje le tio ali sulfonilna skupina (34, 35). Na GR pa smo signifikanten antagonistični učinek zaznali le pri BPZ, BPF, BHEPS in TIO pa so celo učinek HC signifikantno povečali. O podobnem učinku poročajo v študiji, kjer so z luciferaznim testom določali učinke BPA na GR. In sicer, je z diferenciacijsko mešanico, ki je med drugim vsebovala 11-dehidrokortizon, povzročil sinergistični učinek na akumulaciji lipidov v adipocitih. Na osnovi te študije in naših rezultatov ne moremo delati zaključkov glede povezave med strukturo in učinkom oz. sinergističnim delovanjem. Testirali smo relativno majno število različnih bisfenolov, ki so na koncu ob prisotnosti HC dosegli precej različne učinke na GR (nobenega, antagonističnega, sinergističnega). Poleg tega smo testirali vsak bisfenol pri samo eni koncentraciji in še ta ni bila enaka za vse. Glede na rezultate naše in preostalih do zdaj objavljenih študij lahko z gotovostjo zaključimo le, da bisfenoli delujejo antagonistično na AR. Pomembno pa je dejstvo, da smo testirali bisfenole pri višjih koncentracijah kot so jih do zdaj izmerili v bioloških vzorcih ljudi. Rezultati biomonitoringa so za enkrat znani le za BPA, za ostale analoge pa se predvideva, da zaradi njihove manjše uporabe in izpostavljenosti, v organizmu ne dosegajo testiranih koncentracij. V povprečju so se izmerjene koncentracije prostega, nekonjugiranega BPA v krvi zdravih, odraslih gibale okrog 1 ng/mL (27). Torej je BPA v naši raziskavi dosegel antagonistični učinek na AR v 10.000-krat višji koncentraciji. Kljub temu pa je zaskrbljujoče, da nekatere *in vivo* študije poročajo, da BPA povzroči opazne, signifikantne učinke v odmerkih, ki so v območju odmerkov, ki smo jim v povprečju vsakodnevno izpostavljeni (26, 27). Nekateri neželeni učinki, ki so se izrazili na živalih v odmerkih, nižjih od 50 mg/kg TM (LOAEL vrednost) ali celo veliko nižjih od 50 µg/kg TM (TDI vrednost), obsegajo spremembe v času nastopa pubertete, estrogenskem ciklu, velikosti prostate (vključno s pojavom neoplazem), razvoju hormonalnih žlez (vključno s pojavom preneoplastičnih sprememb v kasnejšem, odraslem obdobju), na maternici in jajčnikih, ravni steroidnih receptorjev v možganih, v vedenju (hiperaktivnost, agresivnost, anksioznost) in spremembe v telesni teži in vzdrževanju homeostaze glukoze. Naštete spremembe se nanašajo na živali, ki so bile izpostavljene BPA v prenatalnem ali neonatalnem obdobju (26). Rezultati teh študij so za enkrat še predmet strokovnih debat. Nekateri rezultati niso dovolj relevantni ali jih ni bilo možno

ponoviti, poleg tega je nekatere težko primerjati med sabo, ker so v določenih študijah uporabili različne poti vnosa, enojne odmerke in majno število testiranih živali. Treba pa se je zavedati potencialne nevarnosti, ki jo lahko predstavljajo majhni odmerki. Tudi vedno več *in vitro* in *in vivo* študij dokazuje zgoraj opisano. Slednje si lahko razlagamo s tem, da ima pri številnih HM krivulja odvisnosti učinka od odmerka obliko črke »U« in da poleg tega ostaja možnost, da se majne koncentracije izognejo negativni povratni zanki. Celotnega delovanja BPA pa prav gotovo ne poznamo, čeprav je že zdaj jasno, da deluje na različne nerekceptorske in receptorske tarče, na določene tudi selektivno modulatorno.

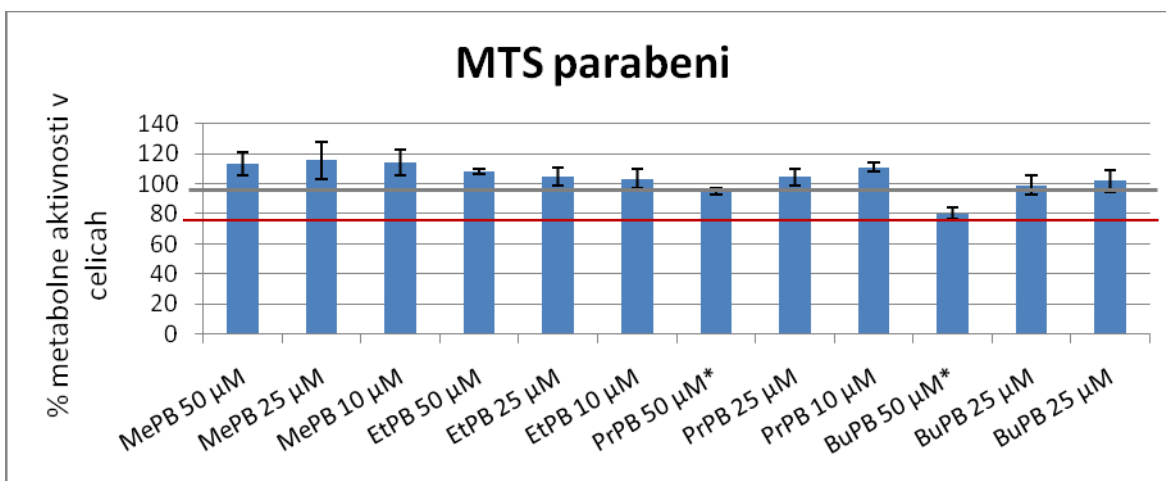
Učinki bisfenolov, ki smo jih sicer zaznali pri relativno kar visokih koncentracijah, so zaskrbljujoči tudi zaradi tega, ker so npr. višje vrednosti BPA izmerili v popkovnični krvi, placenti in krvi novorojenčkov ter tudi krvi nosečnic (15). Zaskrbljujoče pa je predvsem zaradi tega, ker imajo morebitni neželeni učinki večji vpliv na stopnji zarodka in med neonatalnim razvojem, kajti endogeni hormoni v tem obdobju uravnavajo rast in diferenciacijo celic, kar poveča občutljivost na prisotnost HM. BPA ima večji vpliv na razvijajoči se organizem tudi zaradi tega, ker je v tem obdobju še posebej pomembno nemoteno delovanje endokrinega, reproduktivnega in živčnega sistema. Prav na delovanje teh sistemov pa naj bi vplival BPA (18, 25). BPA je v največji meri škodljiv za plod, novorojenčke in majhne otroke, ker lahko v tem občutljivem razvojnem obdobju povzroči tudi ireverzibilne spremembe, ki se lahko izrazijo s časovnim zamikom. Te spremembe se lahko izrazijo v časovnem odstopanju začetka pubertete, v nepravilnostih prostate, maternice in jajčnikov, hiperaktivnem in agresivnem vedenju. Pri odraslih pa povišane koncentracije v telesu povezujejo z številnimi zdravstvenimi težavami, kot so npr. diabetes, debelost in kardiovaskularna obolenja. Pri ženskah poveča verjetnost za prezgodnji porod in spontani splav, pri moških pa zmanjša kakovost sperme (26). Najverjetneje pa bo preteklo še nekaj časa, dokler bo zgoraj opisano možno z gotovostjo potrditi ali zavreči. Za popolno ovrednotenje tveganja, ki ga za zdravje ljudi predstavlja BPA, bo treba izvesti še veliko *in vitro* in *in vivo* ter tudi epidemioloških študij. Enako velja za njegove analoge, ki so v primerjavi z BPA precej zapostavljeni, kljub temu da se njihova uporaba povečuje.

4.2 PARABENI

4.2.1 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

S testom MTS smo preverili morebitno citotoksičnost prvotno izbrane testirane koncentracije. V primeru, ko se je slednja izkazala kot citotoksična ali neustrezna zaradi obarjanja spojine v mediju, smo s testom MTS našli in potrdili ustrezno nižjo koncentracijo. Raven citotoksičnosti parabenov po 24-urni stimulaciji smo določili s primerjavo stimuliranih celic, ki so bile tretirane s preiskovanimi spojinami, in celic, ki so bile inkubirane v 0,1 % DMSO v mediju.

Parabene smo testirali v prvotno izbrani testirani koncentraciji 50 μM in hkrati še za primer citotoksičnosti v dveh nižjih koncentracijah, tj. 25 in 10 μM . Istočasno smo kot kontrolo testirali še sam gojitveni medij in topilo v mediju (0,1 % DMSO v gojitvenemu mediju). Absorbanci obeh kontrol sta bili približno enaki, kar pomeni, da topilo, tj. 0,1 % raztopina DMSO v mediju, ni citotoksično in ne vpliva na rezultate testa. Test smo izvedli, kot je opisano v poglavju »Materiali in metode«. Po 24 urah stimulacije celic z izbranimi parabeni (MePB, EtPB, PrPB in BuPB) se koncentracija 50 μM ni v nobenem primeru izkazala kot citotoksična. Na sliki 13, kjer so prikazane vrednosti za vse testirane koncentracije (50, 25, 10 μM), vidimo, da se metabolična aktivnost celic ni v nobenem primeru zmanjšala pod 80 % (minimalna meja ustreznosti testirane koncentracije). Pri MePB je znašala približno 113 %, pri EtPB 108 %, PrPB 105 % in BuPB 80 %. Vendar zadnjih dveh v nadaljnjih luciferaznih testih nismo testirali pri koncentraciji 50 μM , ker sta se pri slednji v gojitvenemu mediju obarjala. Torej smo za nadaljnje teste za PrPB in BuPB izbrali koncentracijo 25 μM ter za MePB in EtPB koncentracijo 50 μM . S pomočjo tega testa MTS smo naredili vzporednico med preživetjem celic in metabolno aktivnostjo po tretiranju s preiskovanimi spojinami.

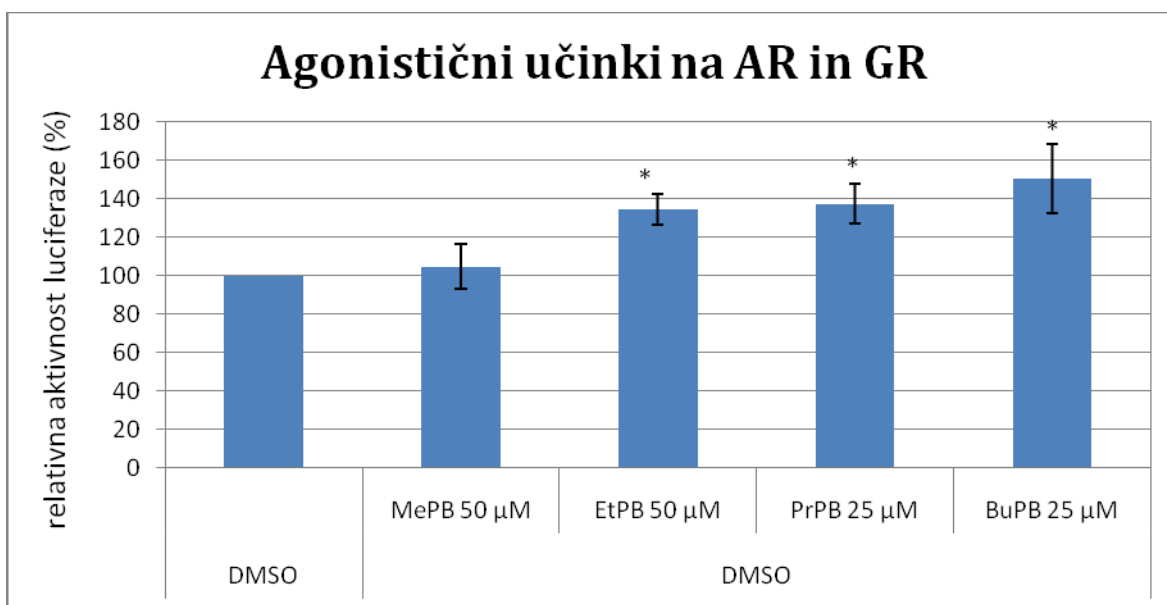


Slika 13: Rezultati treh bioloških ponovitev testa MTS oziroma preverjanja ustreznosti (necitotoksičnosti) prvotno izbrane koncentracije 50 µM za nadaljnje teste določanja učinkov parabenov na AR in GR. Za primer citotoksičnosti koncentracije 50 µM smo celice istočasno stimulirali še z nižjimi koncentracijami. Vse vrednosti metabolične aktivnosti celic, tretiranih s preiskovanimi spojinami, so normalizirane glede na celice, inkubirane v 0,1 % DMSO (raven je označena z odebeljeno sivo črto) in prikazane v odstotkih (% ± SD). Rdeča črta označuje spodnjo mejo (80 %) ustrezne metabolične aktivnosti, * pa obarjanje spojine v gojitvenem mediju.

4.2.2 DOLOČANJE UČINKA PARABENOV NA ANDROGENSKIH RECEPTORJIH

Najprej smo testirali agonistični učinek parabenov na obeh v celici prisotnih receptorjih (GR in AR) hkrati. EtPB, PrPB in BuPB so pri testirani koncentraciji glede na kontrolo (0,1 % DMSO v mediju) signifikantno povečali aktivnost luciferaze (slika 14). EtPB je pri koncentraciji 50 µM povečal aktivnost za približno 35%, PrPB pri 25 µM za 37 % in BuPB pri 25 µM za 51 %. MePB pri koncentraciji 50 µM ni imel učinka na aktivnost luciferaze, torej ni izkazal potenciala za agonistično delovanje na AR ali GR oz. obeh hkrati (slika 14). Parabene, ki so signifikantno povečali aktivnost, smo uvrstili v receptorsko selektivno agonistično testiranje. Iz rezultatov tega receptorsko neselektivnega testiranja namreč ni mogoče določiti, ali posamezna spojina deluje agonistično na AR ali GR ali oba receptorja hkrati. Glede na do zdaj znane podatke drugih raziskav glede agonističnega delovanja parabenov na AR in GR smo pričakovali, da bo slednjega izkazal

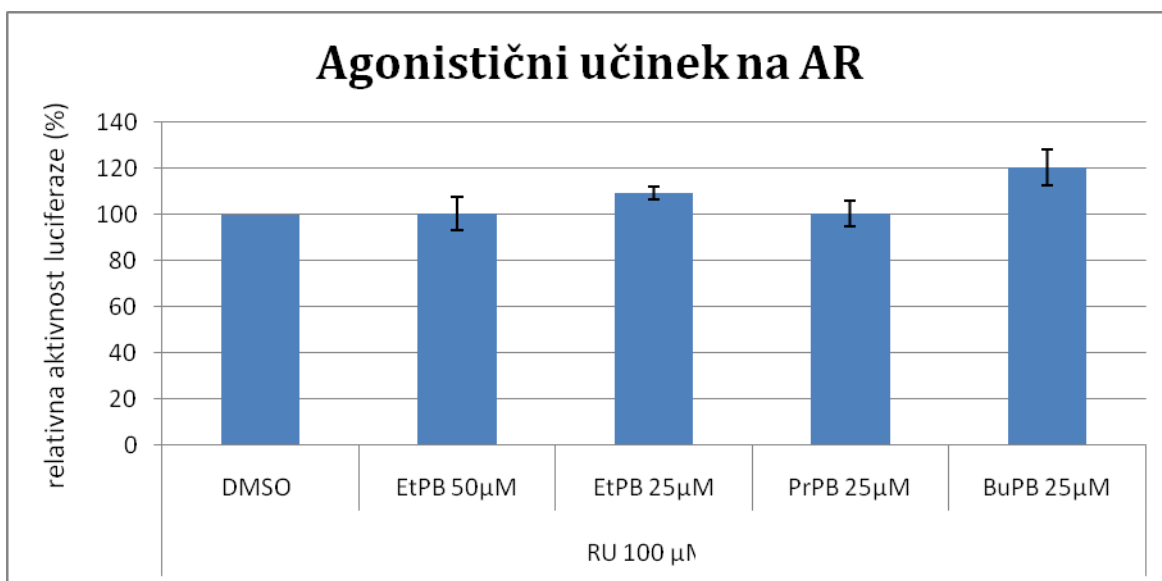
vsaj BuPB. Na celični liniji 3T3-L1 je namreč pri koncentraciji 100 μM za razliko od MePB, EtPB in PrPB izkazal signifikantni agonistični učinek na GR. Pri enaki koncentraciji pa so vsi kazali trend naraščanja jakosti delovanja v smeri daljšanja stranske alkilne verige parabena. Te povezanosti v našem primeru ni moč zaključiti, ker so poleg GR prisotni še AR, poleg tega nismo testirali parabenov pri enaki koncentraciji. Noben paraben pa ni deloval agonistično na AR v celični liniji CHO-K1 ali HEK 293 (70, 79, 80).



Slika 14: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko neselektivnega določanja agonističnega delovanja. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (paraben) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju s kontrolo (DMSO) je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Vse tri parabene (EtPB 50 μM , PrPB 25 μM in BuPB 25 μM), ki so v začetnem receptorsko neselektivnem testiranju delovali signifikantno agonistično, smo uvrstili v selektivno testiranje agonističnega delovanja na AR. Zraven teh smo zaradi lažjega določanja povezave med potencialno aktivnostjo in dolžino alkilne verige parabena testirali še EtPB pri nižji koncentraciji (25 μM), ki je enaka testirani koncentraciji PrPB in BuPB. Pol ure pred dodatkom posameznega parabena smo dodali RU-486 (100 nM), ki je v tem času zasedel GR in tako omogočil, da so parabeni povečali aktivnost luciferaze samo preko delovanja na AR in ne preko delovanja na oba receptorja hkrati. Noben paraben ni pri

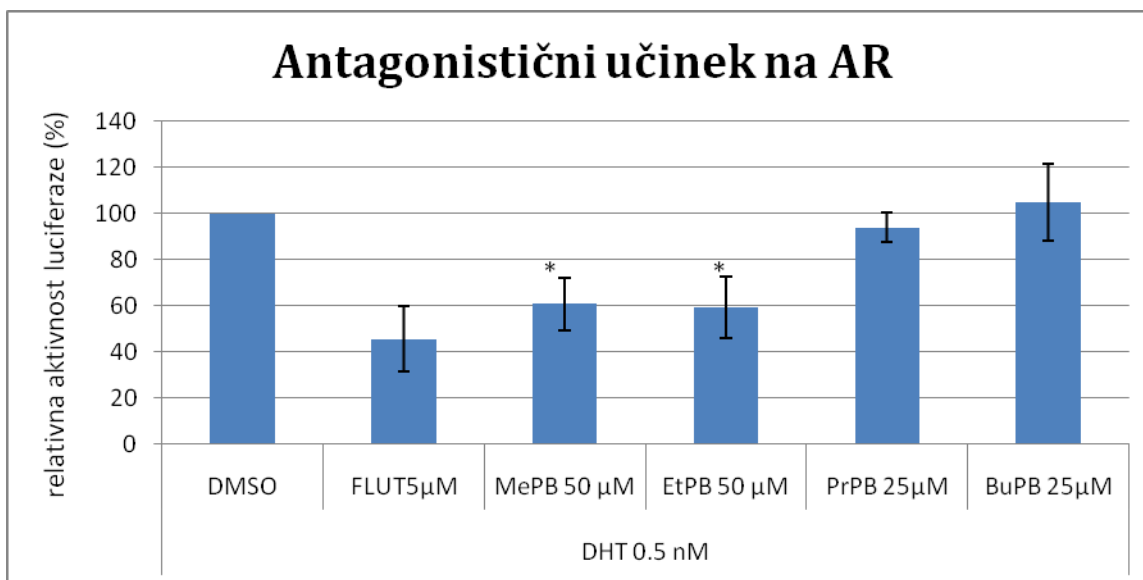
testirani koncentraciji (EtPB 50 μ M, EtPB, PrPB in BuPB 25 μ M) imel signifikantnega vpliva na aktivnost luciferaze (slika 15). Torej lahko zaključimo, da parabeni na AR ne delujejo agonistično. Tudi v dveh drugih *in vitro* študijah določanja agonističnega delovanja na AR, sicer na drugih celičnih linijah, se parabeni pri testiranih koncentracijah niso obnašali agonistično. V študiji na celicah HEK 293 so parabene testirali v koncentracijskem območju 1 nM do 10 μ M, v študiji na celicah CHO-K1 pa do 100 μ M. Obe pa sta prav tako bili osnovani na metodi luciferazne aktivnosti (79, 80).



Slika 15: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na AR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (paraben) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju z RU-486 je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Antagonistični učinek posameznega parabena na AR smo določili glede na njegovo jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenkega agonista DHT (0,5 nM- EC_{50} za uporabljeno celično linijo MDA-kb2). MePB in EtPB sta pri testirani koncentraciji 50 μ M delovala signifikantno antagonistično na AR, učinek DHT sta zmanjšala za 39% oz. 41% (slika 16). PrPB in BuPB smo testirali pri nižji koncentraciji, in sicer pri 25 μ M. Noben od njiju ni izkazal antagonističnega učinka na AR (slika 15). Glede na strukturno podobnost BuPB in PrPB z ostalima dvema testiranima parabenoma in podatke še dveh drugih podobnih do zdaj izvedenih študij, naj bi se tudi ta dva po pričakovanjih obnašala kot

antagonista. Obstaja verjetnost, da nista signifikantno zmanjšala učinka DHT zaradi močnejšega agonističnega delovanja na GR, ki so bili med tretiranjem prosti. Vzrok je lahko tudi to, da smo ju testirali pri manjši koncentraciji kot MePB in EtPB. Pri višji koncentraciji, tj. 50 μ M, ju nismo testirali, ker sta se v mediju obarjala. Z gotovostjo lahko zaključimo le, da sta MePB in EtPB pri koncentraciji 50 μ M delovala antiandrogeno. V dveh drugih do zdaj izvedenih študijah so prav tako določali antagonistično delovanje na AR s pomočjo celic, vsebujočih reporterski gen za luciferazo, vendar so se na drugih celičnih linijah vsi parabeni pri najvišji testirani koncentraciji obnašali kot antagonisti. V študiji na celicah HEK 293 so parabeni pri koncentraciji 10 μ M zmanjšali transkripcijsko aktivnost testosterona (0,125 nM) za 40 % (MePB), 33 % (BuPB) in 19 % (PrPB). V študiji na celicah CHO-K1 pa so zmanjšali učinek DHT (0,17 nM) za 60 % (BuPB), 50 % (PrPB), 20 % (EtPB) in 10 % (MePB) (79, 80).

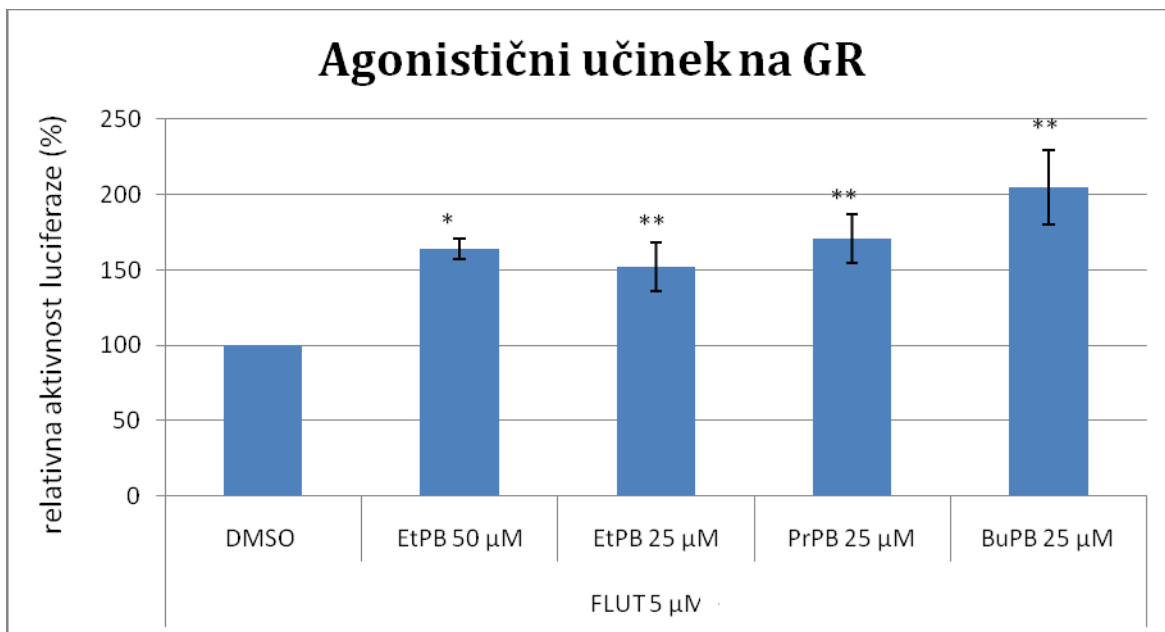


Slika 16: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na AR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (paraben) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju z DHT je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.2.3 DOLOČANJE UČINKA PARABENOV NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH

Agonistično delovanje na GR smo testirali za vse tri parabene (EtPB 50 μ M, PrPB 25 μ M in BuPB 25 μ M), ki so v začetnem receptorsko neselektivnem (na AR in GR hkrati) testiranju delovali signifikantno agonistično. Zraven teh smo zaradi lažjega določanja povezave med potencialno aktivnostjo in dolžino stranske alkilne verige estra, testirali še EtPB pri nižji koncentraciji (25 μ M), ki je enaka testirani koncentraciji ostalih dveh parabenov (PrPB in BuPB). Pol ure pred dodatkom posameznega parabena, smo dodali FLUT (5 μ M), ki je v tem času zasedel AR in tako omogočil, da parabeni povečajo aktivnost luciferaze samo preko delovanja na GR in ne preko delovanja na oba receptorja hkrati. Vsi testirani parabeni so pri testirani koncentraciji signifikantno povečali aktivnost luciferaze, in sicer je EtPB pri koncentraciji 50 μ M aktivnost povečal za približno 64 %, EtPB pri nižji koncentraciji, tj. 25 μ M, pa za približno 52 %, PrPB pri 25 μ M za 71 % in BuPB pri 25 μ M za 106 % (slika 17). Tako so vsi aktivirali GR in posredno povečali aktivnost luciferaze in izkazali glukokortikoidni agonistični učinek. Na osnovi aktivnosti vseh treh parabenov, testiranih pri koncentraciji 25 μ M vidimo, da je jakost delovanja naraščala z daljšanjem alkilne verige estra (slika 17). Pri EtPB, ki je bil testiran pri dveh različni koncentracijah, pri 50 in 25 μ M, lahko vidimo trend naraščanja jakosti delovanja z večanjem koncentracije. Na osnovi tega primera in dejstva, da parabeni predstavljajo homologno vrsto spojin, pa ne moremo delati zaključkov glede korelacije aktivnosti in koncentracij, ker gre samo za en primer, poleg tega gre za majhno povečanje aktivnosti pri višji koncentraciji glede na nižjo. Torej lahko zaključimo le, da so vsi testirani parabeni dosegli agonističen učinek na GR in da je jakost naraščala z daljšanjem alkilne verige estra. Do zdaj so samo še v eni študiji raziskovali agonistično delovanje parabenov na GR, in sicer prav tako s pomočjo reporterskega gena za luciferazo, vendar na drugi celični liniji (3T3-L1) in pri višji koncentraciji, tj. 100 μ M. Zaradi druge vrste celic težje primerjamo testirane koncentracije, vendar pa so se parabeni obnašali podobno kot v našem testu, in sicer MePB prav tako ni kazal aktivnosti, so se pa ostali trije, EtPB, PrPB in BuPB, obnašali kot glukokortikoidni agonisti. Razlika v primerjavi z našimi rezultati je, da je samo BuPB imel signifikanten učinek, EtPB in PrPB pa ne. Jakost delovanja je prav tako naraščala z daljšanjem alkilne verige. Glukokortikoidni učinek BuPB je bil v isti študiji po enakem principu potrjen še na celicah COS-7. Na osnovi podatkov testiranja glukokortikoidnega delovanja parabenov na celični liniji 3T3-L1 in COS-7 ter naših

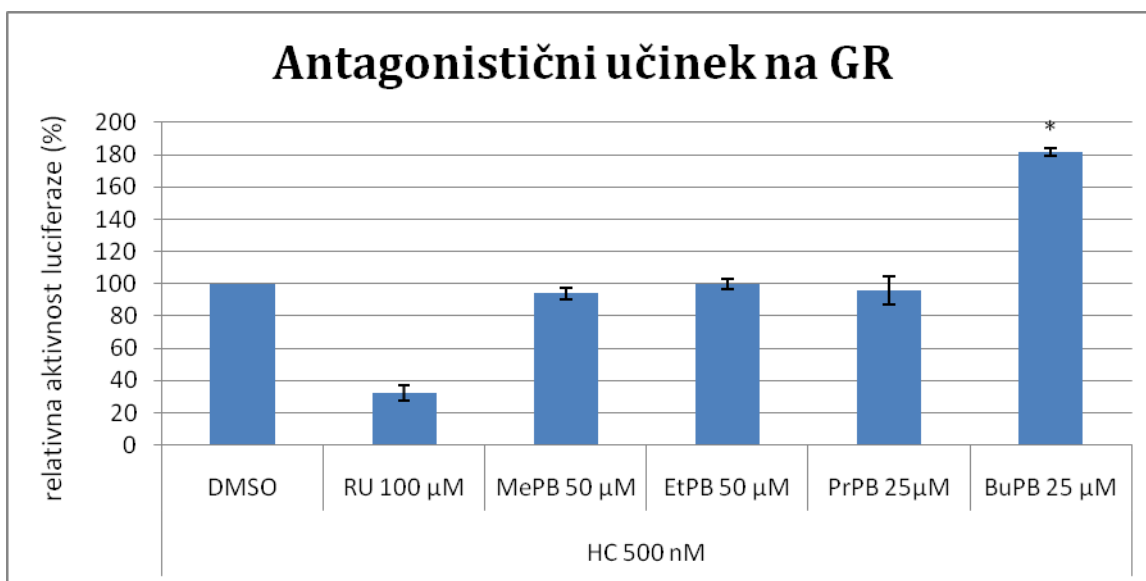
podatkov lahko zaključimo, da se vsi parabeni razen MePB obnašajo kot glukokortikoidni agonisti, moč delovanja pa narašča z daljšanjem alkilne verige estra (70).



Slika 17: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov receptorsko selektivnega določanja agonističnega učinka na GR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (paraben) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju s FLUT je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Antagonistični učinek posameznega parabena na GR smo določali glede na njegovo moč zmanjšanja učinka hkrati dodanega glukokortikoidnega agonista HC (500 nM- EC_{50} za uporabljeno celično linijo MDA-kb2). Pri nobenem od testiranih parabenov (MePB 50 µM, EtPB 50 µM, PrPB 25 µM in BuPB 25 µM) nismo zaznali antagonističnega delovanja, namreč nobeden ni signifikantno zmanjšal učinka HC (slika 18). Ravno nasprotno, ob njegovem dodatku je BuPB pri koncentraciji 25 µM signifikantno povečal aktivnosti luciferaze (slika 18). Ne moremo pa z gotovostjo trditi, da je bilo to povečanje doseženo preko GR, ker so bili v celici hkrati prisotni še neblokirani AR. Čeprav je verjetnost povečanja aktivnosti luciferaze preko AR zelo majhna, glede na to, da smo v testiranju agonističnega učinka parabenov na AR ugotovili, da BuPB na slednjem ne delujejo agonistično. Z gotovostjo lahko zaključimo le, da ne delujejo antagonistično na GR. V

edini do zdaj izvedeni študiji, kjer so določali učinek parabenov na GR, je bil samo BuPB pri koncentraciji 100 μM testiran ob dodatku glukokortikoidnega agonista deksametazona (1 μM). Aktivnost BuPB so prav tako kot mi določali s pomočjo reporterskega gena za luciferazo, vendar na drugi vrsti celic (COS-7) in ugotovili, da BuPB v kombinaciji z deksametazonom deluje signifikantno sinergistično na GR. Na osnovi podatkov testiranja antiglukokortikoidnega delovanja parabenov na celični liniji COS-7 ter naših podatkov lahko zaključimo, da parabeni nimajo antagonističnega učinka na GR (70).



Slika 18: Povprečne vrednosti (\pm SD) rezultatov določanja antagonističnega učinka na GR. Razmerje med izmerjeno intenziteto signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino (paraben) in izmerjeno intenziteto signala po tretiranju z HC je podano kot relativna aktivnost luciferaze v odstotkih. Statistična signifikantnost: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Na osnovi rezultatov določanja učinkov parabenov na AR in GR lahko povzamemo in z gotovostjo zaključimo, da MePB in EtPB pri koncentraciji 50 μM na AR delujeta antagonistično, prvi je učinek DHT (0,5 nM) zmanjšal za 39 %, drugi pa za 41 %. Glede na strukturno podobnost in rezultate dveh podobnih študij, sicer na drugih celičnih linijah, je bilo za pričakovati, da bosta tudi ostala dva testirana parabena, PrPB in BuPB, dosegla antagonističen učinek na AR, vendar ga nista. Vzrok slednjemu je najverjetneje to, da sta bila oba testirana pri nižji koncentraciji kot MePB in EtPB. Poleg tega se je lahko šibka

antagonistična aktivnost na AR zakrila s tem, da sta oba hkrati delovala z večjo jakostjo agonistično na istočasno prisotne GR, ki so bili prosti med tretiranjem celic. Na GR pa so vsi testirani parabeni signifikantno povečali aktivnost luciferaze in tako lahko z gotovostjo trdimo, da so dosegli agonističen učinek. Glede na rezultate naše in preostalih do zdaj objavljenih študij lahko zaključimo, da parabeni delujejo glukokortikoidno in antiandrogensko. Pomembno pa je dejstvo, da smo parabene testirali pri višjih koncentracijah, kot so jih do zdaj izmerili v bioloških vzorcih ljudi. Za primer, po enkratnem topikalnem nanosu (2 mg/cm^2) 2 % BuPB (skupno 800 mg) v obliki kreme na celotno kožo človeka, doseže BuPB v prvotni obliki v 3 urah maksimalno serumsko koncentracijo, tj. $135 \text{ } \mu\text{g/L}$ (53, 57, 66). Koncentracija BuPB v naši raziskava pa je znašala $25 \text{ } \mu\text{mol/L}$, kar je enako 4855 ng/mL . Torej je bila testirana koncentracija BuPB za približno 36-krat višja, kot so jo izmerili v zgornjem primeru. Poleg tega je treba upoštevati še dejstvo, da so v študiji zgornjega primera uporabili kremo z 2 % BuPB, Pravilnik o sestavi kozmetičnih proizvodov pa dovoljuje kot najvišjo dovoljeno koncentracijo v končnem proizvodu 0,4 % za posamičen paraben. Torej lahko hipotetično zaključimo, da bi ob uporabi kreme z največjo dovoljeno vsebnostjo maksimalna serumska koncentracija dosegla $27 \text{ } \mu\text{g/L}$ in bi se razlika glede na našo testirano koncentracijo povečala na 180. Kljub tej veliki razliki pa je za dokončen zaključek glede varnosti njihove uporabe potrebnih še veliko *in vitro* in *in vivo* študij. Predvsem pa je treba izvesti več sistematičnih, kontroliranih študij s ponovljivimi odmerki, ki bi obsegale vse pogosto uporabljene parabene (tudi v kombinaciji), več načinov vnosa in širše območje odmerkov. Tako bi dobili relevantne podatke za oceno tveganj oz. oceno razmerja med odmerkom in učinkom, med drugim vrednost NOAEL ali vsaj LOAEL, na osnovi tega pa tudi TDI. Zaenkrat namreč sploh nimamo postavljene vrednosti toleriranega dnevnega vnosa za PrPB, ki je poleg MePB najbolj pogosto uporabljen paraben. To, da zanj nimamo postavljene vrednosti TDI, izhaja iz tega, da so številne študije izvedene nesistematično in nekontrolirano in jih zato ne moremo obravnavati kot relevantnih za oceno tveganja.

5 SKLEP

Starejše toksikološke študije spojin, ki smo jim vsakodnevno izpostavljeni, so osredotočene v glavnem na osnovne raziskave akutne toksičnosti, kancerogenosti in teratogenosti. Njihovi rezultati ne kažejo, da bi lahko največje tveganje predstavljalo njihovo delovanje na ravni hormonskega sistema. Znanstveniki šele v zadnjih letih raziskujejo področje hormonskega delovanja številnih spojin, ki se pojavljajo v okolju kot onesnaževala, in tako je nastala skupina HM, ki se neprestano veča. Predmet teh raziskav so tudi parabeni in BPA. V diplomskem delu smo se osredotočili na učinke BPA in nekaterih njegovih analogov (BPAF, BPC, BPF, BPS, BPZ, BHEPS, dBPS in TIO) ter parabenov (MePB, EtPB, PrPB in BuPB) na AR in GR.

Na osnovi rezultatov našega eksperimentalnega dela glede preiskovanih spojin lahko zaključimo naslednje:

- prvotno izbrana testirana koncentracija, tj. 50 μM , se je izkazala kot citotoksična pri BPA, BPAF, BPC in TIO. Prav tako se je izkazala kot neustrezna zaradi obarjanja spojine v gojitvenem mediju pri dBPS, PrPB in BuPB. Kot ustrezna koncentracija za nadaljnje teste se je izkazala naslednja manjša testirana koncentracija. Ta je znašala 10 μM pri BPA, BPAF in BPC oz. 25 μM pri TIO, dBPS, PrPB in BuPB . Pri ostalih preiskovanih spojinah (BPF, BPS, BPZ, BHEPS, MePB in EtPB) pa smo za nadaljnje teste kot ustrezno koncentracijo izbrali 50 μM ;
- v receptorsko neselektivnem (AR in GR hkrati) testiranju so le BHEPS, TIO, EtPB, PrPB in BuPB signifikantno povečali aktivnost luciferaze in tako izkazali potencial za agonistično delovanje na AR in/ali GR. Tako smo teh pet spojin uvrstili v testiranje agonističnega delovanja na AR in posebej na GR;
- spojine (BHEPS 50 μM , TIO 25 μM , EtPB 50 μM , EtPB, PrPB in BuPB 25 μM), ki so v začetnem receptorsko neselektivnem testiranju delovale signifikantno agonistično, smo uvrstili v selektivno testiranje agonističnega delovanja na AR. Nobena pri testirani koncentraciji ni imela signifikantnega vpliva na aktivnost luciferaze, torej nobena od teh petih testiranih spojin ne deluje agonistično na AR;

- pri testiranju antagonističnega učinka posameznega bisfenola in parabena na AR smo učinek določili glede na jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenskega agonista DHT. Razen pri BHEPS, PrPB in BuPB smo pri vseh ostalih testiranih spojinah (BPA, BPAF, BPC, BPF, BPS, BPZ, dBPS, TIO, MePB in EtPB) zaznali signifikanten antagonističen učinek na AR, kajti ob njihovi prisotnosti se je aktivnost inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic z DHT zmanjšala;
- spojine (BHEPS 50 μ M, TIO 25 μ M, EtPB 50 μ M, EtPB, PrPB in BuPB 25 μ M), ki so v začetnem receptorsko neselektivnem testiranju delovale signifikantno agonistično, smo uvrstili tudi v selektivno testiranje agonističnega delovanja na GR. Vsi trije parabeni so pri testirani koncentraciji imeli signifikanten vpliv na aktivnost luciferaze. Iz tega sledi, da vsi trije parabeni na GR delujejo agonistično;
- signifikanten antagonističen učinek na GR je dosegel le BPZ. BPF, BHEPS in TIO ter BuPB pa so učinek HC signifikantno povečali. BPA, BPAF, BPC, BPS, dBPS, BHEPS, TIO, MePB, EtPB in PrPB niso dosegli signifikantnega učinka na GR.

Na področju delovanja bisfenolov in parabenov na androgenski in glukokortikoidni sistem so potrebne še nadaljnje raziskave. Potrebne so tudi dodatne raziskave vpliva na druge hormonske sisteme. Zaenkrat je še veliko vprašanj odprtih oziroma še ni mogoče delati nedvoumnih relevantnih zaključkov glede njihovega vpliva na hormonski sistem, saj imamo premalo podatkov, nekateri rezultati študij pa si med sabo celo nasprotujejo. Rezultati našega eksperimentalnega dela in nekaterih drugih do zdaj izvedenih raziskav kažejo, da vse preiskovane spojine izkazujejo učinek na AR in/ali GR in tako predstavljajo tveganje za zdravje ljudi in živali. Zavedati pa se moramo, da so preiskovane spojine povzročile učinke pri relativno visokih koncentracijah, ki jim zaradi nizkih dnevnih vnosov praviloma nismo nikoli izpostavljeni. Po drugi strani pa številne študije poročajo, da lahko npr. BPA povzroči neželene signifikantne učinke v odmerkih, ki so v območju odmerkov, ki smo jim v povprečju vsakodnevno izpostavljeni. Torej lahko zaključimo le, da je zaenkrat potrebna previdnost pri uporabi izdelkov, preko katerih smo v največji meri izpostavljeni preiskovanim spojinam, in da je treba stremeti k čimprejšnjim zaključkom glede tveganja, ki ga predstavljajo za naše zdravje. Preteklo pa bo še precej časa, dokler bo popolnoma razjasnjeno, kako kronična izpostavljenost različnim kombinacijam številnih

spojin, ki niso naravno prisotne oz. za katere je znano, da delujejo kot hormonski motilci, vpliva na zdravje ljudi.

6 LITERATURA

1. <http://www.epa.gov/endocrine/> Dostop: 8.2.2013
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser S, Prins GS, Soto AM, Zoeller RS, in Gore AC: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 2009; 30 (4): 293-342
3. Swedenborg E, Rüegg J, Mäkelä S, Pongratz I: Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2009; 43: 1-10
4. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA%20EDC%20Final%20Report%20V3%206%20Feb%2012.pdf Dostop: 8.2.2013
5. Rhomberg LR, Goodman JE, Foster WG, Borgert CJ, Van Der Kraak G: A critique of the European Commission document, "State of the Art Assessment of Endocrine Disrupters". *Critical Reviews in Toxicology*, 2012; 42: 465-73
6. Vallack HW in *sodelavci: Controlling persistent organic pollutants—what next?* *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1998; 6: 143-75
7. Gelbke HP, Kayser M, Poole A: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology*, 2004; 205: 17-25
8. Guyton AC, Hall JE: *Textbook of Medical Physiology*. 11th Edition, Elsevier Inc., Philadelphia, 2006: 905-17, 944-60, 996-1010
9. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: *Physiology*. 5th Edition, Mosby, St. Louis, 2003; 719-40, 884, 942-6
10. Williams DA, Lemke TL: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 685-717
11. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M: Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews*, 2000; 52 (4): 513-56

12. Janosek J, Hilscherová K, Bláha L, Holoubek I: Environmental xenobiotics and nuclear receptors--interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology In Vitro*, 2006; 20 (1): 18-37
13. Podczaski E, Mortel R: Hormonal treatment of endometrial cancer: past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2001; 15 (3): 469-89
14. Aranda A, Pascual A.: Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, 2001; 81 (3): 1269-304
15. Kang JH, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 2006; 226 (2-3): 79-89
16. http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1_chemistry_analytical_methods.pdf Dostop: 8.2.2013
17. Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V in Olea N: The Estrogenicity of Bisphenol A-related Diphenylalkanes with Various Substituents at the Central Carbon and the Hydroxy Groups. *Environmental Health Perspectives*, 106: 196-74
18. http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/BPA_Summary2010.pdf Dostop: 8.2.2013
19. Gramec D: Določanje bisfenola A in triklosana v urinu s plinski kromatografijo z masno selektivnim detektorjem. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012
20. <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2010/2010-03-31/html/sor-dors53-eng.html> Dostop: 8.2.2013
21. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:sl:PDF> Dostop: 8.2.2013
22. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM: Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews*; 2009, 30 (1): 75–95

23. Peterec A: Primerjava vsebnosti bisfenola A v pitnih vodah iz vodomatov in različnih vodovodnih zajetij. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011
24. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS: Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology*, 2006; 147 (6): 56-69
25. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm> Dostop: 8.2.2013
26. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011; 127 (1-2): 27-34
27. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJR in Schoenfelder G: Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 2010; 118 (8): 1055–70
28. Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H: Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicology Letter*, 2008; 179 (3): 155-62
29. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM: Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005; 383 (4): 638-44
30. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM: Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 2002; 110 (2): 193–96
31. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S: Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*, 2008; 74 (1): 33-6

32. Prasanth GK, Divya LM, Sadasivan C: Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *Journal of Applied Toxicology*, 2010; 30 (8): 769-74
33. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM: In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 2007; 24: 178-98
34. Kitamura S Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S: Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological sciences*, 2005; 84 (2): 249-59
35. Sun H, Xu LC, Chen JF, Song L, Wang XR: Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food and chemical toxicology*, 2006; 44 (11): 1916-21
36. Ermler S, Scholze M, Kortenkamp A: The sensitivity of the MDA-kb2 cell in vitro assay in detecting anti-androgenic chemicals--identification of sources of variability and estimation of statistical power. *Toxicology In Vitro*, 2010; 24 (6): 1845-53
37. Roy P, Salminen H, Koskimies P, Simola J, Smeds A, Saukko P, Huhtaniemi IT: Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2004; 88 (2): 157-66
38. Sargis RM, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ: Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity*, 2010; 18 (7): 1283-8
39. vom Saal FS, Hughes C: An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 2005; 113 (8): 926-33

40. Matsushima A, Liu X, Okada H, Shimohigashi M, Shimohigashi Y: Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α but a Highly Specific Antagonist for ER β . *Environmental Health Perspectives*, 2010; 118 (9): 1267–272
41. Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Shao B: Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicology Letters*, 2012; 211 (2): 201-9
42. Umamo T, Tanaka R, Yamasaki K: Endocrine-mediated effects of 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol in SD rats, based on a subacute oral toxicity study. *Archives of toxicology*, 2012; 86 (1): 151-7
43. Fromme H, K uchler T, Otto T, Pilz K, M uller J, Wenzel A: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water research*, 2002; 36 (6): 1429-38
44. Lu Z, Lin K, Gan J: Oxidation of bisphenol F (BPF) by manganese dioxide. *Environmental pollution*, 2011; 159 (10): 2546-51
45. Cabaton N, Dumont C, Severin I, Perdu E, Zalko D, Cherkaoui-Malki M, Chagnon MC: Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*, 2009; 255 (1-2): 15-24
46. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S: Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological sciences*, 2005; 84 (2): 249-59
47. Satoh K, Ohyama K, Aoki N, Iida M, Nagai F: Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food and chemical toxicology*, 2004; 42 (6): 983-93
48. Grignard E, Lapenna S, Bremer S: Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology In Vitro*, 2012; 26 (5): 727-31
49. Okuhata H, Ninagawa M, Takemoto N, Ji H, Miyasaka H, Iwamoto A, Nagae M, Ishibashi Y, Arizono K: Phytoremediation of 4,4'-thiodiphenol (TDP) and other

- bisphenol derivatives by *Portulaca oleracea* cv. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2013; 115 (1): 55-7
50. Yamada K, Terasaki M, Makino M: Estrogenic Activity of Alkyl(thio)phenols and 4,4'-thiodiphenol Formed from Degradation of Commercial Insecticides. *Journal of Health Science*, 2011; 57 (2): 134-41
51. <http://www.fda.gov/cosmetics/productandingredientsafety/selectedcosmeticingredients/ucm128042.htm> Dostop: 12.2.2013
52. Soni MG, Carabin IG, Burdock GA: Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 2005; 43 (7): 985-1015
53. Aubert N, Ameller T, Legrand JJ: Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology*, 2012; 50 (3-4): 445-54
54. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=0000099763> Dostop: 12.2.2013
55. <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/index.php/compound/inspect/CHEMBL325372> Dostop: 12.2.2013
56. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7176.html?rid=294f844f-d996-4891-b82c-fc39ce962e69> Dostop: 12.2.2013
57. Darbre PD, Harvey PW: Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, 2008; 28 (5): 561-78
58. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm> Dostop: 12.2.2013
59. <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200066&stevilka=3057> Dostop: 12.2.2013

60. <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200120&stevilka=1135> Dostop: 12.2.2013
61. <http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/chemical.aspx?chemID=3045> Dostop: 12.2.2013
62. <http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/chemical.aspx?chemID=342> Dostop: 12.2.2013
63. <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/afc040929.htm> Dostop: 12.2.2013
64. <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/83.pdf> Dostop: 12.2.2013
65. Davidson MP, Sofos J, Branen A: Antimicrobials in food. 3rd Edition, CRC Press, New Yourk, 2005: 291-304
66. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS: Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of applied toxicology*, 2004; 24 (1): 5-13
67. Ye X Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM: Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environmental Health Perspectives*, 2006; 114 (12): 1843–1846
68. Lee HB, Peart TE, Svoboda ML: Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of cromatography*, 2005; 1094 (1-2): 122-9
69. Casas L, Fernandez MF, Llop S, Guxens M, Ballester F, Olea N, Irurzun MB, Rodriguez LS, Riano I, Tardon A, Vrijheid M, Calafat AM, Sunyer J: Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environmental international*, 2011; 37 (5): 858-66
70. Hu P, Chen X, Whitener RJ, Boder ET, Jones JO, Porollo A, Chen J, Zhao L: Effects of Parabens on Adipocyte Differentiation. *Toxicological Sciences*, 2012; 131 (1): 56-70

71. Pedersen S, Marra F, Nicoli S, Santi P: In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *International journal of cosmetic science*, 2007; 29 (5): 361-7
72. Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T: Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of applied toxicology*, 2007; 27 (1): 1-9
73. Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL: Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology*, 2007; 232 (3): 248-56
74. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf Dostop: 12.2.2013
75. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP: Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998;153 (1): 12-9
76. Byford JR, Shaw LE, Drew MG, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD: Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2002; 80 (1): 49-60
77. van Meeuwen JA, van Son O, Piersma AH, de Jong PC, van den Berg M: Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008; 230 (3): 372-82
78. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I: ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR. *Food and Chemical Toxicology*, 2001; 39: 1225-32
79. Satoh K, Nonaka R, Ohyama K, Nagai F: Androgenic and Antiandrogenic Effects of Alkylphenols and Parabens Assessed Using the Reporter Gene Assay with Stably Transfected CHO-K1 Cells (AR-EcoScreen System). *Journal of Health Science*, 2005; 51 (5): 557-68

80. Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL: Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology of Applied Pharmacology*, 2007; 221 (3): 278-84
81. Oishi S: Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food and chemical toxicology*, 2004; 42 (11): 1845-9
82. Taxvig C: Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicological sciences*, 2008; 106 (1): 206-13
83. Oishi S: Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and chemical toxicology*, 2002; 40 (12): 1807-13
84. Fisher JS, Turner KJ, Brown D, Sharpe RM: Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environmental Health Perspectives*, 1999; 107 (5): 397-405
85. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2713&Template=cellBiology> Dostop: 10.2.2013
86. Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE Jr.: A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological sciences*, 2002; 66 (1): 69-81
87. Pečar Fonović U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M in Kos J. *Vaje iz farmacevtske biokemije*. 2. izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009: 102-22
88. <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf?la=en> Dostop: 10.2.2013
89. <http://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%2fresources%2fproduct-guides-and-selectors%2fprotocols-and-applications-guide%2fcell-viability%2f> Dostop: 10.2.2013

90. <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/luciferase%20assay%20system%20protocol.pdf?la=en> Dostop: 10.2.2013