

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA BRAJNIK

**PREUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* IN *MAOA* V
ČLOVEŠKIH OSTEOSARKOMSKIH CELICAH, IZPOSTAVLJENIH
BISFENOLOM A, S IN AF**

**STUDY OF CHANGES IN EXPRESSION OF *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* AND
MAOA GENES IN HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS EXPOSED TO
BISPHENOLS A, S AND AF**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo in Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm., in somentorju asist. dr. Vidu Mlakarju, univ. dipl. mikrobiol., za strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

Teja Brajnik

Ljubljana, marec 2014

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK.....	VII
ABSTRACT.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 HORMONSKI MOTILCI.....	1
1.1.1 Bisfenol A (BPA).....	2
1.1.2 Bisfenol S (BPS)	4
1.1.3 Bisfenol AF (BPAF).....	5
1.2 GENI	6
1.2.1 Kolagen tipa V, alfa 1 (<i>COL5A1</i>).....	7
1.2.1.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena <i>COL5A1</i>	7
1.2.1.1.1 Ehlers-Danlosov sindrom.....	7
1.2.2 Kolagen tipa XI, alfa 1 (<i>COL11A1</i>)	8
1.2.2.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena <i>COL11A1</i>	9
1.2.2.1.1 Sticklerjev sindrom	9
1.2.2.1.2 Marshallov sindrom	9
1.2.2.1.3 Osteoartritis.....	9
1.2.3 Gremlin 1 (<i>GREM1</i>).....	9
1.2.3.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena <i>GREM1</i>	10
1.2.3.1.1 Osteopenija in spontani zlomi	10
1.2.4 Monoamino-oksidaza A (<i>MAOA</i>)	10
1.2.4.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena <i>MAOA</i>	10
1.2.4.1.1 Brunnerjev sindrom.....	10
1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	11
1.3.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	13
1.3.2 Detekcija produktov PCR.....	14
1.3.3 Uporaba qPCR v študijah genskega izražanja.....	15
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17

3.1	MATERIALI IN NAPRAVE.....	17
3.1.1	Celične kulture	17
3.1.2	Izolacija RNK.....	18
3.1.3	Analiza na mikromrežah	18
3.1.4	Reverzna transkripcija.....	18
3.1.5	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	18
3.1.6	Ostalo	19
3.2	METODE	19
3.2.1	Celične kulture	19
3.2.2	Izolacija RNK.....	20
3.2.3	Analiza na mikromrežah	20
3.2.4	Reverzna transkripcija.....	21
3.2.5	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	21
3.2.6	Obdelava podatkov.....	22
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1	PRIMERJAVA VPLIVOV BPA, BPS IN BPAF NA IZRAŽANJE GENOV <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> IN <i>MAOA</i>	24
4.1.1	Vpliv BPA na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	24
4.1.2	Vpliv BPS na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	26
4.1.3	Vpliv BPAF na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	28
4.1.4	Medsebojna primerjava vplivov BPA, BPS in BPAF	30
4.2	DOLOČANJE VPLIVA ESTROGENA NA VPLIVE BPA, BPS IN BPAF NA IZRAŽANJE GENOV <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> IN <i>MAOA</i>	31
4.2.1	Vpliv estrogena na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	31
4.2.2	Vpliv BPA v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	33
4.2.3	Vpliv BPS v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	35
4.2.4	Vpliv BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	37
4.2.5	Medsebojna primerjava vplivov samih bisfenolov (BPA, BPS in BPAF) in teh bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	39
4.3	VPLIV BPA-3,4-Q NA IZRAŽANJE GENOV <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> IN <i>MAOA</i>	41
4.4	VPLIV BPA, BPS, BPAF, ESTROGENA IN IZBRANIH BISFENOLOV V KOMBINACIJI Z ESTROGENOM NA IZRAŽANJE GENOV <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i>	

IN <i>MAOA</i> TER DOLOČANJE MOŽNIH VPLIVOV NA ZDRAVJE PREKO SPREMENJENEGA IZRAŽANJA TEH GENOV	44
4.4.1 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena <i>COL5A1</i>	44
4.4.2 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena <i>COL11A1</i> :	47
4.4.3 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena <i>GREM1</i>	50
4.4.4 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena <i>MAOA</i>	53
4.4.5 Možni vplivi bisfenolov na zdravje preko vpliva na izražanje genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i>	56
4.4.5.1 Spremenjeno izražanje gena <i>COL5A1</i>	56
4.4.5.2 Spremenjeno izražanje gena <i>COL11A1</i>	57
4.4.5.3 Spremenjeno izražanje gena <i>GREM1</i>	57
4.4.5.4 Spremenjeno izražanje gena <i>MAOA</i>	58
5 SKLEP	59
6 VIRI IN LITERATURA	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula bisfenola A (povzeto po 5)	3
Slika 2: Strukturna formula bisfenola S (povzeto po 12)	4
Slika 3: Strukturna formula bisfenola AF (povzeto po 5)	6
Slika 4: Shematski prikaz poteka verižne reakcije s polimerazo (povzeto po 27)	12
Slika 5: Pomnoževanje tarčne DNK z verižno reakcijo s polimerazo (povzeto po 26, 30)	12
Slika 6: Prikaz krivulje pomnoževanja (povzeto po 27)	14
Slika 7: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA	25
Slika 8: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS	27
Slika 9: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF	29
Slika 10: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene estrogenu	32
Slika 11: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom	34
Slika 12: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom	36
Slika 13: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom	38
Slika 14: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez rezultatov, ki jih dobimo pri celicah, ki so bile izpostavljene 90 dni	38
Slika 15: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA-3,4-kinonu	43
Slika 16: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena <i>COL5A1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh	46
Slika 17: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena <i>COL11A1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh	49
Slika 18: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena <i>GREM1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh	52
Slika 19: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Istosmerni in obratnosmerni začetniki, uporabljeni v qPCR	19
Preglednica II: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA.....	24
Preglednica III: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS.....	26
Preglednica IV: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF.....	28
Preglednica V: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene estrogenu	31
Preglednica VI: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom	33
Preglednica VII: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom	35
Preglednica VIII: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom	37
Preglednica IX: Razmerja in standardne napake izražanja genov <i>COL5A1</i> , <i>COL11A1</i> , <i>GREM1</i> in <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA-3,4-kinonu	42
Preglednica X: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>COL5A1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu.....	44
Preglednica XI: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>COL5A1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom.....	45
Preglednica XII: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>COL11A1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu.....	47
Preglednica XIII: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>COL11A1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom.....	48
Preglednica XIV: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>GREM1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu.....	50
Preglednica XV: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>GREM1</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom.....	51
Preglednica XVI: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu.....	54
Preglednica XVII: Razmerja in standardne napake izražanja gena <i>MAOA</i> v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom.....	54

POVZETEK

Okoljski estrogeni oziroma hormonski motilci so lahko naravne spojine z estrogenim delovanjem ali pa sintezne kemikalije, ki oponašajo delovanje estrogenov. V diplomski nalogi smo se osredotočili na bisfenole, ki smo jim, zaradi njihove pogoste uporabe, izpostavljeni v vsakdanjem življenju, saj jih najdemo v najrazličnejših izdelkih za vsakdanjo uporabo, kot so plastični vsebniki, medicinska oprema ter zaščitni premazi za pločevinke.

V naši raziskavi smo preučevali vplive bisfenolov A, S in AF na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile do 3 mesece izpostavljene 10 nM koncentracijam bisfenolov. Gene smo izbrali na osnovi predhodno izvedene študije na mikromrežah. Poleg tega smo preučevali tudi vpliv estrogena, kinonskega metabolita BPA (BPA-3,4-Q) ter kombinacije estrogena s prej naštetimi bisfenoli na izražanje preiskovanih genov. Izražanje preiskovanih genov smo preučevali z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Na koncu smo iz dobljenih rezultatov poskušali določiti še, kakšne učinke bi te spremembe v izražanju lahko imele na zdravje ljudi.

Ugotovili smo, da se izražanje gena *COL5A1* pri do nekajdnevni izpostavljenosti celic bisfenolom poveča, pri 3-mesečni izpostavljenosti pa zmanjša. Na gen *COL11A1* bisfenoli vplivajo le pri 3-mesečni izpostavljenosti, ko njegovo izražanje povečajo. Izražanje gena *GREM1* je pri izpostavljenosti celic bisfenoloma BPS in BPAF do 45 dni zmanjšano, nato pa povečano, ko so bile celice izpostavljene BPA pa je izražanje vedno povečano. V primeru gena *MAOA* so spremembe v izražanju pri izpostavljenosti celic bisfenoloma BPS in BPAF do 45 dni majhne, po 90 dneh pa se je izražanje močno povečalo. Bisfenol A izražanje gena *MAOA* poveča. Sam estrogen v nobenem primeru nima signifikantnih učinkov na izražanje gena *MAOA*, poveča pa izražanje ostalih treh genov pri celicah, ki so mu izpostavljene 8 ur, ter genov *COL5A1* in *GREM1* pri celicah, ki so mu izpostavljene 90 dni. BPA-3,4-Q v nobenem primeru ne vpliva na izražanje preučevanih genov, vendar je bil tu najdaljši čas izpostavljenosti celic le 72 ur. Ko imamo bisfenole kombinirane z estrogenom najprej opazimo zelo dobro ujemanje rezultatov, ki jih dobimo v primerih, ko so bile celice 24 ur, 72 ur in 45 dni izpostavljene samim bisfenolom, z rezultati, ki jih v teh časovnih točkah dobimo, ko so bile celice izpostavljene bisfenolom v kombinaciji z

estrogenom. Se pa pojavijo opazne spremembe pri izpostavljenosti celic 8 ur in 90 dni. Pri vplivih bisfenolov na zdravje smo ugotovili, da bi spremenjeno izražanje izbranih genov lahko povzročalo celo vrsto zdravstvenih težav, kot so oslabitev vezivnega tkiva, anomalije kosti in sklepov, težave z vidom in sluhom, depresija in agresija.

ABSTRACT

Environmental estrogens or endocrine disrupting compounds are substances in our environment with estrogenic effects or synthetic chemicals that mimic the effects of estrogens. In this dissertation we have focused on bisphenols to which we are, because of their frequent use, exposed in everyday life. They can be found in many common consumer products such as plastic containers, medical equipment and protective coatings for metal cans.

In our study, we investigated the effects of bisphenols A, S and AF on the expression of *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* and *MAOA* genes in human osteosarcoma cells that were exposed to 10 nM concentrations of bisphenols for up to 3 months. Genes were selected on the basis of preliminary performed microarray analysis. In addition, we have also studied the effect of estrogen, a quinone metabolite of bisphenol A (BPA-3,4-Q), and the combinations of estrogen with the previously listed bisphenols on the expression of selected genes. To determine the expression of investigated genes we performed real-time polymerase chain reaction. At the end we tried to predict what effects could these changes in gene expression have on human health.

We found out that the expression of the *COL5A1* gene is increased when the cells are exposed to bisphenols for up to a few days and decreased when the cells are exposed to bisphenols for 3 months. Bisphenols have effect on the *COL11A1* gene only after a 3-month exposure and its expression is increased. The expression of the *GREM1* gene is decreased when the cells are exposed to BPS and BPAF for up to 45 days and increased after that period. When the cells are exposed to BPA, the expression is always increased. In the case of *MAOA* changes in gene expression are small when cells are exposed to BPS and BPAF for up to 45 days but after 90 days changes in gene expression significantly increase. Bisphenol A increases the expression of *MAOA* gene. Estrogen does not affect the expression of the *MAOA* gene in any case, but it increases the expression of the other three investigated genes in the cells that have been exposed to it for 8 hours, and the expression of the *COL5A1* and *GREM1* genes in the cells which have been exposed to it for 90 days. BPA-3,4-Q does not affect the expression of the studied genes but in this case we have to highlight that the longest exposure time of cells to bisphenols was only 72 hours. When we combine bisphenols with estrogen, the first thing we see is a very good correlation between

the results obtained in the cases where the cells were exposed to bisphenols for 24 hours, 72 hours and 45 days and the results obtained in the cases where the cells were exposed to bisphenols combined with estrogen. However, noticeable changes occur in the cases where the cells were exposed for 8 hours and 90 days. In determining the effects of bisphenols on human health, we found out that they can cause a whole range of health problems such as the weakening of connective tissue, abnormalities in the bones and joints, problems with vision and hearing, depression and aggression.

SEZNAM OKRAJŠAV

BPA – bisfenol A

BPS – bisfenol S

BPAF – bisfenol AF

BPA-3,4-Q – metabolit bisfenola A (BPA-3,4-kinon)

COL5A1 – kolagen tipa V, alfa 1

COL11A1 – kolagen tipa XI, alfa 1

GREM1 – gremlin 1

MAOA – monoamino-oksidadza A

RPLP0 – ribosomalni protein, veliki, P0

PCR – verižna reakcija s polimerazo

qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času

BMP – kostni morfogeni protein

DNK – deoksiribonukleinska kislina

RNK – ribonukleinska kislina

A – adenin

T – timin

G – gvanin

C – citozin

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

Za veliko naravnih spojin in sinteznih kemikalij najdemo poročila, da motijo delovanje endokrinega sistema. Te spojine, ki so označene kot hormonski motilci, se vpletajo v biosintezo, metabolizem in delovanje hormonov, kar lahko vpliva na homeostazo, razvoj in reprodukcijo. Veliko znanih hormonskih motilcev deluje preko vpliva na estrogenske receptorje, zato jih imenujemo tudi okoljski estrogeni. Estrogeni igrajo pomembno vlogo pri rasti, razvoju in homeostazi številnih tkiv, vključno z reproduktivnim traktom (moškim in ženskim), mlečnimi žlezami, kostmi, možgani in jetri (1).

Hormonske motilce najdemo v okolju, hrani in potrošnih izdelkih. Mednje sodijo sintetične kemikalije, ki se uporabljajo kot industrijska topila, maziva ter njihovi stranski produkti, plastika, plastifikatorji, pesticidi, fungicidi, farmacevtske učinkovine in naravne snovi, ki jih najdemo v človeški in živalski hrani, kot so na primer fitoestrogeni (2).

Viri izpostavljenosti hormonskim motilcem so različni in se zelo razlikujejo glede na različna področja sveta. Industrializirana področja so običajno onesnažena s široko paleto industrijskih kemikalij, ki lahko prehajajo v zemljo ali podtalnico, kar omogoča tem kompleksnim mešanici, da vstopijo v prehransko verigo. Do izpostavljenosti tako lahko pride preko kontaminirane pitne vode, hrane, zraka ter kontakta s kontaminirano zemljo. Še posebej velika nevarnost za izpostavljenost hormonskim motilcem obstaja pri ljudeh, ki delajo s pesticidi, fungicidi ali industrijskimi kemikalijami (2).

Težava pri hormonskih motilcih je, da so te spojine strukturno zelo različne in lahko ne kažejo nobene podobnosti v strukturi, jim je pa običajno skupno to, da imajo majhno molekularno maso, in sicer manj kot 1000 Daltonov. Se pravi, da na osnovi strukture težko predvidimo, ali bo molekula delovala kot hormonski motilec ali ne. Hormonski motilci, kot so dioksini, poliklorirani bifenili, polibromirani bifenili in pesticidi, pogosto vsebujejo halogenske skupine, kot sta kloro ali bromo skupini. Prav tako imajo te molekule pogosto fenolni del, ki posnema naravne steroidne hormone in tako omogoča hormonskemu motilcu, da se veže na receptor in deluje kot agonist ali antagonist. Estrogensko aktivnost imajo lahko tudi težke kovine in metaloidi, kar pomeni, da so te snovi tako hormonski motilci kot tudi bolj splošne toksične snovi (2).

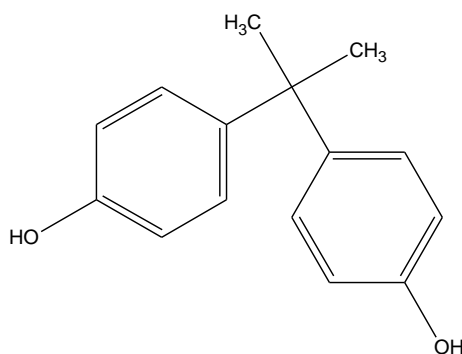
Veliko težavo predstavlja tudi velika obstojnost določenih hormonskih motilcev. Nekateri so bili namreč namenoma načrtovani tako, da imajo dolgo razpolovno dobo, kar je bilo koristno za njihovo industrijsko uporabo, vendar pa se je to kasneje izkazalo za zelo škodljivo za rastlinstvo, živalstvo in ljudi. Ker se te snovi težko razgradijo, je možno, da se v organizmu ne metabolizirajo, ali pa se metabolizirajo ali razpadejo v celo bolj toksične produkte, kot je bila prvotna molekula. Snovi, ki so bile prepovedane že pred desetletji, tako še danes ostajajo v okolju v velikih količinah in jih lahko zaznamo kot breme za organizem v praktično vseh testiranih živalih ali ljudeh. Nekatero hormonsko motilce so zaznali tudi v tako imenovanih nedotaknjenih okoljih. Gre za področja, ki so močno oddaljena od mesta, kjer so bili hormonski motilci proizvedeni, uporabljeni ali sproščeni v okolje, razlog za to pa so voda, zračni tokovi ter migracijske živali, ki del svojega življenja preživijo v onesnaženem okolju. Drugi hormonski motilci, kot je na primer BPA, pa nimajo tako dolge razpolovne dobe, vendar so jim ljudje izpostavljeni zaradi njihove široke uporabe (2).

Določanje vpliva hormonskih motilcev na zdravje ljudi je zelo zapleteno, saj so posamezniki in populacije izpostavljeni stalno spreminjajočemu se vzorcu produkcije in uporabe teh snovi. Poleg tega se te snovi pogosteje sproščajo v okolje kot mešanice različnih kemikalij in ne kot posamezne snovi, kar pomeni, da je pomembno tudi razumevanje učinkov teh mešanic, saj le-te lahko učinkujejo aditivno, sinergistično ali pa celo antagonistično. Podatki glede učinkov različnih kombinacij teh snovi so trenutno še zelo omejeni, saj je to področje še vedno precej neraziskano (2). Težava pri študijah na živalih je, da so običajno izvedene z uporabo visokih akutnih odmerkov hormonskih motilcev, medtem ko so učinki in mehanizem delovanja pri izpostavljenosti nizkim odmerkom teh snovi neznani (3).

1.1.1 Bisfenol A (BPA)

Bisfenol A (BPA) (Slika 1), katerega sinonimi so 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan, 4,4'-(1-metiletiliden)bisfenol in 4,4'-izopropilidendifenol, je industrijska kemikalija, ki se pridobiva iz acetona in fenola. Obsežno se uporablja kot monomer v proizvodnji polikarbonatne plastike in kot prekursor za epoksidne smole. Polikarbonat se široko uporablja v proizvodnji embalaže za hrano in pijačo ter v stekleničkah za dojenčke,

epoksidne smole pa se uporabljajo za prevleko notranjosti pločevink za hrano in pijačo (4). Poleg tega se bisfenol A uporablja tudi kot nepolimerni aditiv za druge vrste plastičnih mas (1). Proizvodnja BPA samo v Združenih državah Amerike znaša več kot 800 milijonov kilogramov letno (2).



Slika 1: Strukturna formula bisfenola A (povzeto po 5)

Ljudje smo izpostavljeni bisfenolu A preko hrane in pijače, kamor pride iz embalaže, iz katere se sprošča, ko je z njo v stiku, ter iz okolja. Njegove koncentracije v serumu so tako pri odraslih kot pri plodu v območju med 0,5 in 40 nM (1). Raziskava, ki so jo izvedli v ZDA, je pokazala, da je BPA pri več kot 93 % populacije prisoten v urinu, njegove koncentracije pa so bile 1–6 µg/L oziroma 6–26 nM. To so koncentracije, za katere so številne študije na živalih pokazale, da škodljivo vplivajo na zdravje (6). V modelnih organizmih je izpostavljenost BPA povezana s presnovnimi motnjami, neplodnostjo, rakom in vedenjskimi motnjami. Zadnje študije na živalih in ljudeh so pokazale povezavo med izpostavljenostjo bisfenolu A in neustreznim razvojem organizma (7).

Natančnih mehanizmov, preko katerih BPA vpliva na zdravje ljudi ne poznamo. Študija, v kateri so raziskovali vpliv BPA pri miših, je pokazala, da se pri izpostavljenosti zarodka fiziološkimi odmerki BPA spremeni izražanje genov in metilacija DNK. Geni, ki so jih preiskovali, so regulirani z metilacijo DNK in igrajo pomembno vlogo pri razvoju zarodka po rojstvu (7). Po nekaterih študijah BPA velja za šibki okoljski estrogen, ki se veže na estrogenske receptorje α in β , njegova afiniteta do teh receptorjev pa je od 10.000- do 100.000-krat manjša kot pri 17 β -estradiolu (4).

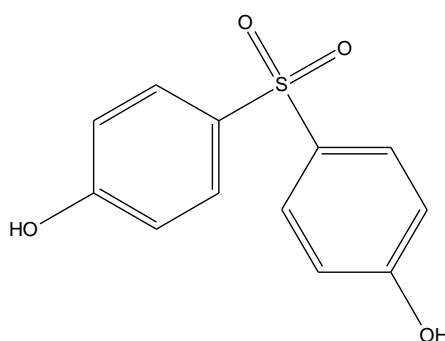
Metabolizem BPA je zelo pomemben za oceno njegove toksičnosti kot tudi za razumevanje njegove biorazpoložljivosti in njegovih bioloških lastnosti. Njegova vodotopnost je 0,5 do

1,3 mmol/L, se pa zelo obsežno metabolizira do bolj vodotopnih konjugatov z glukuronsko kislino. Pri metabolizmu prvega prehoda glavna metabolna pot vključuje konjugacijo z uridin difosfat glukuroniltransferazo (UGT), pri čemer nastaja BPA-glukuronid. Druga, manj obsežna metabolna pot vključuje sulfatiranje s sulfotransferazo, posledica česar je nastanek BPA-sulfata. Poleg teh dveh pa naj bi v organizmu nastajal še BPA-3,4-kinon (4).

Ena od poti metabolizma BPA je hidroksilacija enega od benzenskih obročev do katehola (3-OH-BPA), ki se nadaljno oksidira do BPA-3,4-kinona (BPA-3,4-Q). Kinon reagira z DNK, zaradi česar pride do izgube purinov iz DNK verige, kar lahko povzroči mutacije kritičnih genov, ki lahko sprožijo razvoj raka. Enak mehanizem metabolične aktivacije je bil pojasnjen tudi za naravne estrogene, za sintezni dietilstilbestrol (DES) ter številne druge karcinogene (8).

1.1.2 Bisfenol S (BPS)

Z vedno večjimi dokazi o toksičnosti BPA se njegova uporaba v komercialnih produktih vedno bolj zmanjšuje (9). Vedno bolj strogi predpisi glede proizvodnje in uporabe BPA so pripeljali do potrebe po razvoju alternativnih bisfenolov, med katerimi je tudi 4,4'-dihidroksidifenil sulfon, bolj znan po imenu bisfenol S (BPS) (Slika 2) (10). Za BPS je značilno, da ima odlično stabilnost pri visokih temperaturah in je dobro odporen proti sončni svetlobi (11).



Slika 2: Strukturna formula bisfenola S (povzeto po 12)

BPS se uporablja kot antikorozijsko sredstvo v epoksi lepilih, kot reagent v polimernih reakcijah, v zadnjem času pa se velike količine BPS uporablja tudi v termalnem papirju kot nadomestek za BPA (13). Različne študije kažejo na to, da je spojina že razširjena tako v

okolju kot tudi v človeškem telesu (14). Obstajajo tudi različna poročila o prisotnosti BPS v konzerviranih živilih (13).

Ker je BPS dokaj nova spojina, še nimamo vseh podatkov o njegovi toksičnosti, prav tako še ni bila raziskana sposobnosti BPS, da moti delovanje fizioloških estrogenov. Nekaj študij je preučevalo njegove učinke prek genomskih mehanizmov, pri čemer so uporabili zelo visoke koncentracije, ki so znašale med 0,1 in 1 mM. Rezultati teh študij so pokazali, da ima BPS šibko estrogensko aktivnost. V drugi, podobni študiji je bilo ugotovljeno, da ima kar 15-krat nižjo genomsko estrogensko aktivnost kot BPA (10).

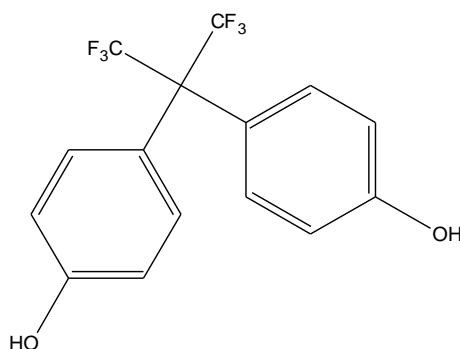
Zelo malo trenutno vemo tudi o prisotnosti BPS v okolju. V študiji, kjer so analizirali 16 različnih vrst papirja in izdelkov iz papirja, kot so termalni računi, bankovci, letaki, revije, časopisi, papirnata embalaža, ki je v kontaktu s hrano, etikete za letalsko prtljago, papir za tiskanje, kuhinjske papirnate brisače in toaletni papir, so ugotovili, da največji vir izpostavljenosti ljudi bisfenolu S predstavljajo termalni računi, katerih delež je več kot 88-odstoten (9). Razlog, da se BPS pojavlja tudi v recikliranem papirju, kot so prtički, letaki in revije, pa je verjetno to, da se reciklira tudi termalni papir (14).

Tudi podatki o prisotnosti BPS v ljudeh so trenutno še zelo omejeni. V študiji, v kateri so preučevali prisotnost celotnega BPS v urinu, so ugotovili, da je ta prisoten v kar 81 % urinskih vzorcev, njegove koncentracije pa so bile od manj kot 0,02 ng/mL do 21 ng/mL, pri čemer 0,02 ng/mL predstavlja mejo kvantifikacije. V študiji so uporabili 315 urinskih vzorcev, pridobljenih iz splošne populacije v ZDA, na Kitajskem, v Indiji, na Japonskem, v Koreji, Kuvajtu, Maleziji in Vietnamu. Najvišje koncentracije BPS v urinu so našli v vzorcih z Japonske, sledile so ZDA, Kitajska, Kuvajt in Vietnam. Ugotovili so tudi, da ni signifikantnih razlik v koncentraciji med spoloma, starostnimi skupinami in rasami (15).

1.1.3 Bisfenol AF (BPAF)

Bisfenol AF (BPAF) (Slika 3) je analog bisfenola A. Ima simetrično kemijsko strukturo s formulo $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-C}(\text{CF}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ in se po IUPAC-u imenuje 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis(4-hidroksifenil)propan. Polimeri, ki vsebujejo bisfenol AF, se uporabljajo v visokotemperaturnih kompozitih, elektronskih materialih, membranah, ki so prepustne za

pline, ter v mnogih drugih primerih. Ti polimeri vsebujejo skupino CF_3 in imajo zato boljše kemijske in mehanske lastnosti ter boljšo temperaturno obstojnost. Produkcija BPAF se trenutno znatno povečuje, nimamo pa podatkov o letni proizvodnji ter o koncentracijah BPAF v okolju. Težavo predstavlja tudi dejstvo, da trenutno nimamo zadostnih podatkov o toksičnosti BPAF (5).



Slika 3: Strukturna formula bisfenola AF (povzeto po 5)

BPA in BPAF se strukturno razlikujeta samo po tem, da ima bisfenol AF dve trifluorometilni skupini, bisfenol A pa dve metilni skupini. Prav te skupine pa so razlog, da je potencialna toksičnost BPAF zaskrbnjujoča, saj je skupina CF_3 veliko bolj elektronegativna in s tem potencialno reaktivna kot pa skupina CH_3 pri BPA (5).

1.2 GENI

Genska informacija je shranjena v celičnem jedru v deoksiribonukleinski kislini (DNK). DNK je sestavljena iz dveh verig, ki sta komplementarni in sta v obliki dvojne vijačnice. Vsaka od obeh verig je sestavljena iz različnih zaporedij nukleotidov, ki jih označujemo s črkami A (adenin), T (timin), G (gvanin) in C (citozin). Pri molekuli RNK timin nadomešča U (uracil). Nukleotidi se med seboj povezujejo, in sicer se A poveže s T in G s C, pri tem pa se tvorijo bazni pari A-T in G-C. Zaporedje nukleotidov v eni verigi tako določa zaporedje nukleotidov v partnerski, komplementarni verigi. Taka zgradba pa je pomembna, da se pri celični delitvi verigi lahko razkleneta in se ločeni verigi podvojita, kar omogoča, da ima vsaka od obeh novo nastalih celic popolnoma enako DNK, ki je kopija materinske DNK (16).

Genski kod je neke vrste abeceda, katere črke so zaporedja treh nukleotidov v verigi DNK in jih imenujemo kodoni. Vsak kodon nosi zapis za specifično aminokislino, te pa so gradbeni elementi proteinov. Zaporedje kodonov, ki kodirajo za protein, imenujemo gen. V širše območje gena prištevamo tudi nukleotidna zaporedja nad in pod samim genom, katerih naloga je uravnavanje izražanja gena. Izražanje gena je prepis genske informacije, shranjene v DNK celičnega jedra, v obveščevalno RNK (mRNK) in nato prevajanje le-te v ustreznemu protein v natančno določenem trenutku, ko so za to vzpostavljeni pogoji. Prevajanje se zgodi zunaj jedra, v citoplazmi, ki vsebuje za ta zapleten proces potrebne ribosome in encime (16).

1.2.1 Kolagen tipa V, alfa 1 (*COL5A1*)

Gen se nahaja na kromosomu 9, med pozicijama 34,2 in 34,3, in kodira za protein oziroma vsebuje navodila za izdelavo ene od komponent kolagena. Kolageni sestavljajo družino proteinov, ki ojačajo in podpirajo mnogo tkiv v telesu, vključno s kožo, vezmi, kostmi, kitami, mišicami ter ekstracelularnim matriksom. Gen *COL5A1* kodira za komponento kolagena tipa V, imenovano veriga pro-alfa1(V). Tri take verige skupaj tvorijo molekulo prokolagena tipa V. Lahko pa se dve verigi kombinirata z verigo pro-alfa2(V), ki je kodirana z genom *COL5A2*, pri čemer prav tako nastane prokolagen tipa V. Te trojnovijačne molekule prokolagena, ki so podobne vrvi, morajo biti obdelane z encimi zunaj celic, pri čemer se te molekule uredijo v dolge, tanke fibrile, ki se med seboj navzkrižno prepletajo v prostoru okrog celic. Rezultat navzkrižnega prepletanja pa so zelo močna, zrela vlakna kolagena tipa V. Kolagen tipa V je bistvenega pomena tudi za oblikovanje normalnih fibril kolagena tipa I (17).

1.2.1.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena *COL5A1*

1.2.1.1.1 Ehlers-Danlosov sindrom

Vzrok za klasični Ehlers-Danlos sindrom je v več kot 50 % primerov mutacija gena *COL5A1*, pri čemer nastane nefunkcionalna veriga pro-alfa1(V) ali pa ta sploh ni prisotna. Zaradi tega se kolagenski fibrili ne morejo ustrezno oblikovati in so posledično neurejeni in večji kot običajno. Ni pa znano, kako te spremembe v strukturi kolagena povzročajo

simptome klasičnega Ehlers-Danlos sindroma (17). To je bolezen vezivnega tkiva, za katero so značilni prekomerna raztegljivost kože, nenormalno celjenje ran in prekomerna gibljivost sklepov. Koža pri teh bolnikih je gladka, žametna na otip in prekomerno elastična, kar pomeni, da se enostavno raztegne in po izpustitvi skoči nazaj. Poleg tega je koža tudi zelo občutljiva, kar se kaže s pokanjem usnjice že pri manjših poškodbah, zlasti na predelih, ki so izpostavljeni pritiskom, kot so kolena in komolci, ter na območjih dovzetnih za poškodbe, kot so golenica, čelo in brada. Celjenje ran je tu upočasnjeno, poleg tega pa je značilno tudi raztezanje brazgotin po na videz uspešnem celjenju ran. Manj pogosti znaki so hipotonija z zakasnjanim motoričnim razvojem, utrujenost, mišični krči in nagnjenost k podplutbam. Še redkejši znaki so izpad mitralne in desne atrioventrikularne zaklopke, dilatacija aortne korenine in spontana ruptura velikih arterij (18).

1.2.2 Kolagen tipa XI, alfa 1 (*COL11A1*)

Gen *COL11A1* se nahaja na kromosomu 1, na poziciji 21, in vsebuje navodila za izdelavo ene od komponent kolagena tipa XI, imenovane veriga pro-alfa1(XI). Kolagen tipa XI daje strukturo in trdnost vezivnemu tkivu, ki podpira mišice, sklepe, organe in kožo. Običajno ga najdemo v hrustancu, ki je močno, vendar fleksibilno tkivo, in predstavlja velik del okostja v zgodnjem razvoju. Kasneje se večina hrustanca pretvori v kosti, izjema je le hrustanec, ki prekriva in ščiti konce kosti, in tisti, ki je prisoten v nosu in zunanjem ušesu. Poleg tega je kolagen tipa XI tudi del čistega gela, ki zapolnjuje očesno zrklo (steklovino), notranje uho ter sredino diska med vretenci v hrbtenici (19).

Veriga pro-alfa1(XI) s še dvema verigama kolagena (pro-alfa2(XI) in pro-alfa1(II)) tvori molekulo prokolagena. To trojnovijačno, vrvi podobno molekulo nato obdelajo encimi v celici, po tej obdelavi pa molekule prokolagena zapustijo celico in se uredijo v dolge, tanke fibrile, ki se med seboj prečno povežejo v prostorih okoli celic. Posledica prečnega povezovanja so zelo močna zrela vlakna kolagena tipa XI (19).

Naloga kolagena tipa XI je tudi, da pomaga ohranjati razmik med fibrili kolagena tipa II ter njegov premer. Kolagen tipa II je pomembna komponenta očesa ter zrelega hrustanca, zato je velikost in ureditev fibril kolagena tipa II bistvenega pomena za normalno strukturo teh tkiv (19).

1.2.2.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena *COL11A1*

1.2.2.1.1 Sticklerjev sindrom

Mutacija gena *COL11A1* je bila ugotovljena pri nekaterih ljudeh s Sticklerjevim sindromom. Nekatere mutacije vplivajo tako, da spremenijo eno od aminokislin, ki so gradniki proteina, in se uporabijo za izgradnjo pro-alfa1(XI) verige. Pri drugi obliki mutacije pa pride do preskoka segmenta DNK pri izgradnji proteina, pri čemer nastane nenormalno kratka veriga pro-alfa1(XI). Te spremembe kolagena tipa XI pa škodujejo njegovi funkciji, posledica česar so lahko izguba sluha, odstop mrežnice ter anomalije kosti in sklepov (19).

1.2.2.1.2 Marshallov sindrom

Mutacije gena *COL11A1* povzročajo tudi nekatere primere Marshallovega sindroma. To je bolezen, ki je zelo podobna Sticklerjevemu sindromu. Pri večini mutacij, ki povzročijo ta sindrom, se izpusti segment DNK pri izgradnji proteina, posledica česar je nenormalno kratka veriga pro-alfa1(XI). Ta skrajšani protein zavira nastanek zrelega kolagena tipa XI, posledica tega pa so simptomi Marshallovega sindroma. Trenutno še ni razjasnjeno, ali Marshallov sindrom predstavlja različico Sticklerjevega sindroma ali gre za ločeno bolezen (19).

1.2.2.1.3 Osteoartritis

Pri nekaterih ljudeh spremembe v genu *COL11A1* lahko povečajo tveganje za razvoj osteoartritisa – degenerativne bolezni sklepnega hrustanca. Posledica teh genetskih sprememb je uporaba nepravilnih aminokislin pri izgradnji verige pro-alfa1(XI) kolagena tipa XI. Spremenjena veriga pro-alfa1(XI) lahko oslabi kolagenska vlakna, kar lahko povzroči erozijo hrustanca v sklepih. To pa je značilna lastnost osteoartritisa (19).

1.2.3 Gremlin 1 (*GREM1*)

GREM1 je gen, ki kodira za protein in se nahaja na kromosomu 15, na poziciji 13,3. Nosi genski zapis za antagonist kostnega morfogenega proteina (BMP), njegovi antagonistični učinki pa so verjetno posledica direktne vezave na kostne morfogene proteine. Gen spada v CAN-skupino antagonistov BMP, za katero je značilen C-terminalni cisteinski vozle z osemčlenskimi obroči (20).

1.2.3.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena *GREM1*

1.2.3.1.1 Osteopenija in spontani zlomi

Kostne celice sintetizirajo tako kostne morfogene proteine (BMP) kot tudi njihove antagoniste. Gremlin se izraža v osteoblastih in po delovanju nasprotuje učinkom BMP pri diferenciaciji in funkciji osteoblastov. Vse to pa velja za *in vitro* učinke, medtem ko so njegovi učinki *in vivo* neznani. Da bi ugotovili njegove učinke na kosti *in vivo*, so v ZDA izvedli raziskavo na miših, pri katerih je bilo izražanje gremlina povečano. Ugotovili so, da gremlin zmanjša mineralno gostoto kosti za 20–30 % glede na kontrolno skupino ter število osteoblastov v trabekularnem področju kosti za kar 70 %. To pa vodi v osteopenijo in spontane zlome (21).

1.2.4 Monoamino-oksidaza A (*MAOA*)

MAOA nosi genski zapis za protein in se nahaja na kromosomu X, na poziciji 11,3. Gre za enega od dveh genov, ki pripadata isti družini. Gena kodirata za mitohondrijske encime, ki katalizirajo oksidativno deaminiranje aminov, kot so dopamin, noradrenalin in serotonin. Encim monoamino-oksidaza A katalizira oksidativno deaminiranje biogenih in ksenobiotičnih aminov in ima tako pomembno vlogo pri metabolizmu nevroaktivnih in vazoaktivnih aminov v centralnem živčnem sistemu in v perifernih tkivih (22).

1.2.4.1 Bolezni, povezane z mutacijami gena *MAOA*

Nenormalna regulacija encima *MAOA* v organizmu je povezana z vrstami psihičnih motenj, vključno z antisocialnim vedenjem (22). Nizka koncentracija *MAOA* v možganih povzroča agresijo, visoka pa depresijo (23).

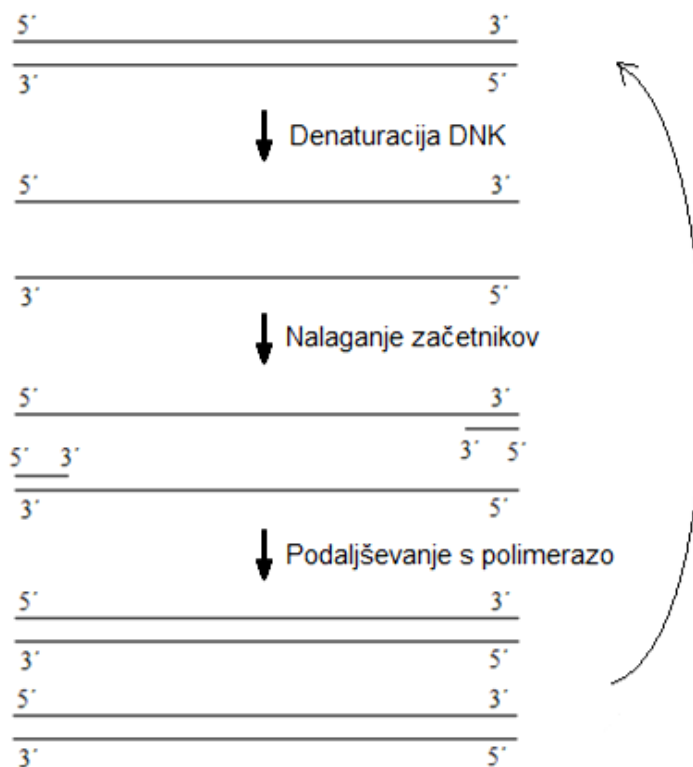
1.2.4.1.1 Brunnerjev sindrom

Mutacija tega gena povzroča Brunnerjev sindrom – obliko blage duševne zaostalosti (22, 24). Gre za bolezen, ki je posledica selektivne izgube aktivnosti izoencima *MAOA*, kar vodi do visokih vrednosti serotonina in noradrenalina v možganih (25). Bolezen je vezana na X-kromosom, kjer se nahaja gen za encim *MAOA*, kar je tudi razlog, da bolezen prizadane le moške, medtem ko so ženske nosilke bolezni. Za moške bolnike je značilna

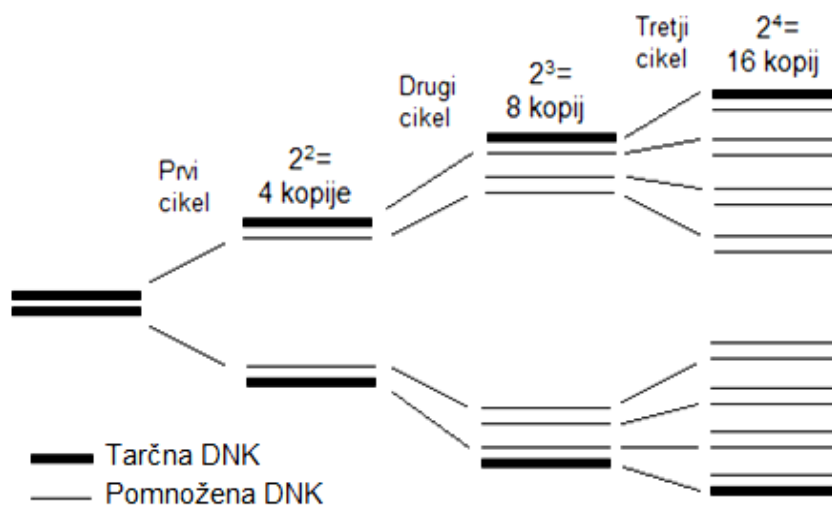
mejna mentalna zaostalost, kaže pa se tudi nenormalno vedenje, vključno z moteno regulacijo impulzivne agresije (24).

1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) je leta 1985 odkril Kary Mullis in leta 1993 zanjo prejel Nobelovo nagrado (26). PCR predstavlja *in vitro* metodo sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko pomnožimo željeni odsek DNK (27). Za izvedbo reakcije potrebujemo odsek DNK, ki ga želimo pomnožiti, ter oligonukleotidne začetnike, ki so komplementarni izbranemu odseku DNK in so večinoma dolgi 18–25 nukleotidov (28). Poleg tega reakcijska zmes vsebuje še deoksinukleozid-trifosfate, ki so gradniki nove verige DNK, Mg^{2+} ione, reakcijski pufer in termostabilno polimerazo DNK (27). Mg^{2+} ioni so nujni za delovanje polimeraze DNK in vplivajo na specifičnost in količino novonastalega produkta. Njihovo optimalno koncentracijo določimo za vsako reakcijo posebej. Reakcijski pufer zagotovi optimalne pogoje za delovanje encima in s tem olajša pomnoževanje izbranih fragmentov. Izberemo ga glede na polimerazo DNK, ki jo uporabimo v reakciji (29). Reakcija poteka ciklično in običajno vsebuje 30 do 40 ciklov (Slika 4). Vsak cikel je sestavljen iz treh stopenj, in sicer iz toplotne denaturacije DNK, ki jo želimo pomnožiti, nalaganja oligonukleotidnih začetnikov na 3' koncu obeh verig ter izgrajevanja komplementarne verige (28). Teoretično se število kopij DNK v vsakem ciklu reakcije podvoji, vendar pa se dejanski izkoristek teoretičnemu približa le v začetnih ciklih reakcije, ko količina produkta narašča eksponentno (Slika 5). V poznejših ciklih se število kopij produkta ne podvojuje več v vsakem ciklu, pomnoževanje je tu vedno počasnejše, dokler reakcija ne doseže platoja, ko se ustavi (27). Faza platoja je posledica razredčenja reagentov in akumulacije inhibitorjev (28).



Slika 4: Shematski prikaz poteka verižne reakcije s polimerazo (povzeto po 27)



Slika 5: Pomnoževanje tarčne DNK z verižno reakcijo s polimerazo (povzeto po 26, 30)

V prvi stopnji vsakega cikla zmes toplotno denaturiramo pri temperaturi 94–95 °C, pri čemer se dvoverižne DNK pretvorijo v enoverižne DNK. V drugi stopnji se pri temperaturi

40–55 °C na te enoverižne DNK pripnejo začetni oligonukleotidi. Temu sledi zadnja, tretja faza, kjer pride do sinteze nove, komplementarne verige z encimom polimeraza DNK. Ta faza je bila na začetku razvoja PCR tudi najbolj kritična, saj je treba reakcijsko zmes za vsak cikel segreti na 94–95 °C, pri čemer bi se polimeraza DNK uničila, zato jo je bilo treba dodati v vsakem ciklu posebej. Kmalu za tem so odkrili, da imajo bakterije *Thermus aquaticus* toplotno izredno stabilno polimerazo DNK, ki ima optimalno delovanje pri temperaturi 72 °C, kar je idealno za tretjo fazo reakcije PCR, poleg tega pa je stabilna tudi pri temperaturi 95 °C. Tako se danes v reakcijah PCR uporablja Taq polimeraza, ki omogoča, da reakcija poteka ciklično brez prekinitev med posameznimi cikli (26).

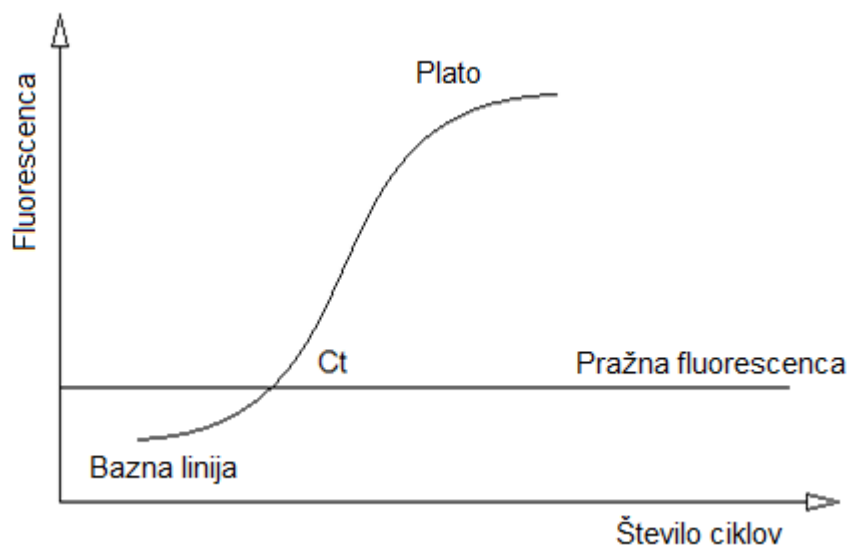
Pri klasičnem PCR detekcija poteka po končanem pomnoževanju z uporabo gelske elektroforeze, pri čemer se fragmenti DNK razdelijo v skupine glede na velikost. Temu sledi detekcija z etidijevim bromidom, ki se veže na te fragmente in tako omogoča detekcijo pod ultravijolično svetlobo. Poleg tega, da tu detekcija poteka šele po končanem pomnoževanju, so slabost klasičnega PCR tudi slaba občutljivost, časovna potratnost in nezmožnost kvantifikacije produkta. Temu se lahko izognemo z uporabo izpeljanke klasičnega PCR, imenovano PCR v realnem času (real-time PCR) oziroma kvantitativni PCR (qPCR). Gre za metodo, ki omogoča sočasno pomnoževanje in detekcijo produkta. Slednja temelji na merjenju fluorescence (28).

PCR je zaradi svoje enostavnosti zelo priljubljena metoda s širokim spektrom uporabe, ki ga omogočajo tri glavne prednosti te metode – hitrost, občutljivost in robustnost. Poleg prednosti pa ima metoda tudi nekatere omejitve pri kloniranju specifičnih zaporedij DNK. Slabosti te metode so tako potreba po poznavanju oligonukleotidnih začetnikov, majhna (nekje med 0,1 in 5 kb) velikost fragmenta DNK, ki ga želimo pomnožiti, ter velika verjetnost, da bo prišlo do napake pri pomnoževanju *in vitro* (28).

1.3.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času je široko razširjena metoda, ki zaradi uporabe posebne opreme omogoča kvantifikacijo DNK ali RNK. V primeru RNK moramo le-to najprej prevesti v komplementarno DNK, kar naredimo z encimom reverzna transkriptaza. Detekcija tu poteka sočasno s pomnoževanjem, kar omogoča kvantifikacijo nastalega produkta med samo reakcijo, in sicer že na začetku, ko le-ta narašča eksponentno, kar

omogoča večjo natančnost kot merjenje po končani reakciji, ki se uporablja pri klasičnem PCR (28). V eksponentni fazi tako določimo prazno fluorescenco, ki predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Cikel, v katerem vzorec preide to mejo, pa imenujemo cikel Ct (Slika 6). Vrednosti Ct so tako obratnosorazmerne z začetnim številom kopij DNK. Se pravi – večja kot je začetna količina DNK v vzorcu, nižji je cikel Ct. Iz količine produkta reakcije PCR tako lahko določimo začetno število kopij DNK v vzorcu (27).



Slika 6: Prikaz krivulje pomnoževanja (povzeto po 27)

1.3.2 Detekcija produktov PCR

Danes poznamo več načinov za merjenje produktov reakcije PCR, ki jih v osnovi delimo na specifične in nespecifične. Trenutno vsi temeljijo na merjenju fluorescence, ki je posledica vezave določenega reagenta v novo nastalo verigo DNK (28).

Nespecifični način detekcije temelji na vezavi fluorogenih barvil v nastajajočo dvojno vijačnico DNK in na fluorescenci teh barvil pri določeni valovni dolžini. Ta barvila fluorescirajo le, ko so vezana v DNK, način pa je nespecifičen zato, ker se barvila vežejo v katerokoli DNK. Jakost fluorescence je tu odvisna od količine vezanega barvila, se pravi od količine novonastalega produkta (31, 32). Primer takih barvil sta SYBRGreen1® in EvaGreen™. Slabost tu je, da ta barvila ne prepoznajo nukleotidnega zaporedja in je specifičnost pomnoževanja odvisna le od začetnikov. V tem primeru moramo specifičnost

potrditi po končani reakciji, kar naredimo z določitvijo disociacijskih krivulj, s čimer izključimo nastanek nespecifičnih produktov oziroma prisotnost dimerov začetnikov (27).

Specifični način detekcije temelji na procesu FRET (fluorescentni resonančni prenos energije). Največkrat se tu uporabljajo označene sonde, ki se vežejo na tarčno DNK in v intaktnem stanju ne fluorescirajo (32). Poznamo dva tipa sond. Prvi tip so hidrolizirajoče sonde, med katere spadajo TaqMan, drugi tip pa hibridizacijske sonde (27). Največkrat se uporabljajo TaqMan sonde, ki imajo na 5' koncu vezan fluorofor (reporterski fluorogen), na 3' koncu pa dušilec. V intaktni sondi sta barvilo in dušilec blizu skupaj, zato svetlobno energijo, ki jo oddaja fluorofor, sprejme dušilec, zaradi česar signala ne zaznamo. Pri pomnoževanju tarčne DNK pa polimeraza zaradi svoje 5' eksonukleazne aktivnosti razgradi sondo, pri čemer se fluorofor in dušilec ločita in to zaznamo kot fluorescenco, katere intenziteta je odvisna od količine pomnožene DNK (32, 33).

1.3.3 Uporaba qPCR v študijah genskega izražanja

Gre za eno najpomembnejših uporab qPCR (28). Te študije so zasnovane na primerjavi izražanja genov med dvema neodvisnima populacijama, zato moramo v tem primeru uporabiti kontrole, s pomočjo katerih rezultate najprej normaliziramo, da jih lahko nato primerjamo med seboj. Za normalizacijo uporabimo tako imenovane endogene kontrole, ki so v večini primerov hišni geni (27). To so geni, ki nosijo zapis za proteine, ki jih večina celic potrebuje ves čas in zato niso posebej uravnavani ter se stalno in konstantno prepisujejo v ustrezne mRNK v večini celic organizma (34). Pomembno je tudi, kateri del gena bomo pomnožili, saj ima veliko genov tudi svojo pseudogensko različico, ki ne daje funkcionalnega proteina in nas zato ne zanima, poleg tega pa lahko daje celo lažno pozitiven signal (27). Metoda omogoča absolutno in relativno kvantifikacijo. Pri absolutni kvantifikaciji rezultat podamo kot začetno število kopij izbranega zaporedja v vzorcu, ki smo ga pomnoževali, kar naredimo z uporabo umeritvene krivulje. V primeru relativne kvantifikacije poleg vzorca potrebujemo še kontrolno skupino, napram kateri podamo izražanje preiskovanega gena in tako določimo ali je le-to povečano ali zmanjšano (35).

2 NAMEN DELA

Bisfenole uvrščamo med hormonske motilce, ki se vpletajo v biosintezo, metabolizem in delovanje hormonov, zaradi česar lahko vplivajo na homeostazo, razvoj in reprodukcijo.

V diplomski nalogi bomo preučevali vpliv treh bisfenolov, BPA, BPS in BPAF, na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile do 3 mesece izpostavljene 10 nM koncentracijam bisfenolov. Poleg tega bomo preučevali tudi vpliv samega estrogena, kombinacij bisfenolov BPA, BPS, BPAF z estrogenom in kinonskega metabolita BPA (BPA-3,4-Q) na izražanje izbranih genov.

Gene, katerih spremembe v izražanju bomo preučevali, smo izbrali na osnovi predhodno izvedene študije na mikromrežah. Kot analizno metodo bomo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Spremembo izražanja bomo preverjali v 5 časovnih točkah, ki bodo v vseh primerih, razen pri BPA-3,4-Q, 8 ur, 24 ur, 72 ur, 45 dni in 90 dni. Pri BPA-3,4-Q bo izpostavljenost celic bistveno krajša, in sicer bomo tu izražanje preverjali po 1 uri, 4 urah, 8 urah, 24 urah ter 72 urah.

Ugotavljali bomo, ali bisfenoli vplivajo na izražanje preiskovanih genov in kako vplivajo na njihovo izražanje, se pravi, ali ga zmanjšajo ali povečajo. Pri tem nas bo zanimalo tudi, ali obstajajo razlike med učinki izbranih bisfenolov. Poleg tega bomo preučevali še vpliv samega estrogena, BPA-3,4-Q in bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje izbranih genov. Iz dobljenih rezultatov bomo skušali ugotoviti tudi, ali se vpliv bisfenolov kaj spremeni, ko jim dodamo estrogen, ter za kakšne učinke gre pri tem, se pravi, ali gre za aditivne, sinergistične ali antagonistične učinke med estrogenom in posameznim bisfenolom. Na koncu bomo skušali določiti še, kakšne učinke bi lahko imeli izbrani bisfenoli na zdravje preko delovanja na preiskovane gene.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN NAPRAVE

3.1.1 Celične kulture

- Celične kulture; ATCC collection, CRL-1543, HOS
- Vsebniki za celične kulture in plastični potrošni material; TPP, Techno Plastic Products AG, CH
- Inkubator (37 °C, 5 % CO₂)
- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM); Life Technologies, Gibco
Medij vsebuje:
 - Aminokisljine
 - Soli (kalcijev klorid, kalijev klorid, magnezijev sulfat, natrijev klorid, mononatrijev fosfat)
 - Glukoza
 - Vitamini (folna kislina, nikotinamid, riboflavin, B₁₂)
- 10 % goveji serum (FBS); Invitrogen, Life Technologies, Gibco
- L-glutamin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Tripsin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Penicilin-G; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Streptomycin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- BPA 99 %; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- BPS 99 %; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- BPAF 99 %; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Estrogen; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- BPA-3,4-Q (sintetiziran na FFA)
- Trypan modro (barvilo)
- Countess® Automated Cell Counter (celični števec); Invitrogen, Life Technologies

3.1.2 Izolacija RNK

- QIAzol Lysis Reagent (reagent za izolacijo RNK); Qiagen, Valencia, CA, USA
- QIAcube; Qiagen, Valencia, CA, USA
- Čistilni komplet RNeasy MinElute Cleanup Kit; Qiagen, Valencia, CA, USA
- Agilent Bioanalyzer 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
- NanoDrop spektrofotomete; NanoDrop products, Wilmington, DE, USA

3.1.3 Analiza na mikromrežah

- Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit; Life Technologies, Ambion
- T7 Oligo(dT) začetnik
- Čip DirectHyb_HumanHT-12 v4 Expression BeadChip; Illumina, San Diego, CA, USA
- Streptavidin-Cy3 (barvilo)
- Illumina iScan Reader

3.1.4 Reverzna transkripcija

- NanoDrop spektrofotometer; NanoDrop products, Wilmington, DE, USA
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA
- Termoblok

3.1.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

- 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus; Solis BioDyne
- Deionizirana H₂O (dH₂O)
- 200 nM istosmerni in obratnosmerni začetniki za gene gremlin1 (*GREM1*), monoamino oksidaza A (*MAOA*), kolagen tipa V alfa 1 (*COL5A1*), kolagen tipa XI alfa 1 (*COL11A1*), ribosomalni protein, veliki, P0 (*RPLP0*); Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
- LightCycler 480 II; Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA

Preglednica I: Istosmerni in obratnosmerni začetniki, uporabljeni v qPCR

Gen	Istosmerni začetnik	Obratnosmerni začetnik
<i>COL5A1</i>	5'-GACAACAACCCCTACATCCG-3'	5'-GACGCTTCACCGAAGTCAT-3'
<i>COL11A1</i>	5'-ACATCTGGTGGTGAGACTTG-3'	5'-GCAGTTTTCCCCTCTTAAATTCAC-3'
<i>GREM1</i>	5'-GAACTACAGCCACCTACCAAG-3'	5'-TTGTTTTAGGTCTGGGACTTCC-3'
<i>MAOA</i>	5'-ATGACTCAATATGGAAGGGTGAT-3'	5'-CTTCCCGAGACCATTTAAGACC-3'
<i>RPLP0</i>	5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3'	5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3'

3.1.6 Ostalo

- Ploščice s 96 vdolbinicami za reverzno transkripcijo
- Pokrovčki za ploščice za reverzno transkripcijo
- Konice za pipete
- Pipete
 - Ročne pipete; Eppendorf, Hamburg, Germany
 - Elektronska pipeta; Transferpette® electronic
 - Elektronska multikanalna pipeta; Eppendorf, Hamburg, Germany
- Ploščice s 384 vdolbinicami za qPCR
- Epruvete; Eppendorf, Hamburg, Germany
- Folija za zapiranje ploščice za qPCR
- Rokavice
- Centrifuga

3.2 METODE

3.2.1 Celične kulture

Celične kulture je pripravila mlada raziskovalka asist. Anja Fic. Uporabila je človeške osteosarkomske celice (HOS-celice), ki jih je gojila v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in v atmosferi s 5 % CO₂. Celice je redno vzdrževala z medijem DMEM, 10 % govejim serumom FBS, 2 mM L-glutaminom ter raztopino antibiotika in antimikotika, ki je

vsebovala 100 enot/mL penicilina-G in 100 enot/mL streptomocina. Te celice so bile nato izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA-3,4-kinonu ter kombinacijam BPA z estrogenom, BPS z estrogenom in BPAF z estrogenom (36). Koncentracije bisfenolov so bile 10 nM, kar naj bi bile koncentracije, ki so znotraj tistih, ki jih po trditvah različnih raziskav najdemo v serumskih vzorcih (1). Poleg tega je imela še celice, ki niso bile izpostavljene nobenemu od teh dejavnikov in so služile kot kontrola. Vse vzorce, vključno s kontrolo, je pripravila v treh bioloških ponovitvah. Čas izpostavljenosti je bil 8 ur, 24 ur, 72 ur, 45 dni in 90 dni, za vse razen BPA-3,4-Q, kjer je bil čas izpostavljenosti 1 ura, 4 ure, 8 ur, 24 ur in 72 ur. Vitalnost celic je preverjala med samim tretiranjem, in sicer s testom izključitve barvila, pri čemer je uporabila barvilo trypan modro, za kvantifikacijo živih in mrtvih celic pa je uporabila celični števec Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). Podobnost v številu vitalnih celic med kontrolo in tretiranimi celicami kaže na to, da so razlike v izražanju genov med kontrolo in tretiranimi celicami res posledica tretiranja in ne razlike v številu vitalnih celic med vzorcem in kontrolno skupino (36).

3.2.2 Izolacija RNK

Izolacijo RNK je izvedla z reagentom QIAzol Lysis Reagent, temu pa je sledilo avtomatsko čiščenje na QIAcube s čistilnim kompletom RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Za kvantifikacijo in oceno kakovosti izolirane RNK je uporabila Agilent Bioanalyzer2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) in NanoDrop spektrofotometer (NanoDrop products, Wilmington, DE, USA) (36).

3.2.3 Analiza na mikromrežah

Z uporabo Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit (Life Technologies, Ambion) je biotinirala in pomnožila cRNK za hibridizacijo. Izolirano RNK iz vsakega vzorca je prevedla v dvojnovijačno cDNK z uporabo T7 Oligo(dT) začetnika, ki vsebuje T7 promotorsko zaporedje. Dvojnovijačno cDNK je očistila in uporabila za *in vitro* transkripcijo, ki vključuje z biotinom označene nukleotide. Z biotinom označeno cRNK je na koncu očistila in hibridizirala na mikromreže po navodilih proizvajalca (36).

Za analizo genskega izražanja celotnega genoma je uporabila čip DirectHyb_HumanHT-12

v4 Expression BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), ki pokrije 47.231 transkripcij. Po neposredni hibridizaciji je mikromreže sprala, obarvala z barvilom streptavidin-Cy3 in skenirala (detektirala) z uporabo Illumina iScan Reader (36).

Rezultate, pridobljene z uporabo mikromrež, je obdelala, da so bili skladni z standardi MIAME, in jih posredovala GEO bazi podatkov. Da je te rezultate potrdila (validirala), je na koncu izvedla še verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (36).

Na mikromrežah je, zaradi visoke cene te metode, analizirala samo kontrole po 8 urah in 3 mesecih ter vzorce, ki so bili tretirani z BPA, BPS ter BPAF po 8 urah in 3 mesecih, vse ostale vzorce pa smo nato analizirali z uporabo qPCR. Gene, katerih izražanje smo preučevali z uporabo qPCR, smo izbrali na osnovi rezultatov, pridobljenih z uporabo mikromrež.

3.2.4 Reverzna transkripcija

Da smo lahko izvedli qPCR smo morali RNK iz vzorcev prevesti v cDNK, kar smo naredili z uporabo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Vzorce smo najprej pomerili z NanoDrop spektrofotometrom (NanoDrop products, Wilmington, DE, USA), da smo dobili koncentracije RNK v njih. Te vzorce smo nato, v ploščici s 96 vdolbinicami, razredčili z vodo, in sicer tako, da smo dobili volumen 10 μ L, ki vsebuje 200 ng RNK/ μ L. Temu smo dodali 10 μ L predhodno pripravljenega master mix-a, ploščice zaprli ter na kratko centrifugirali, da smo vsebino spravili na dno vdolbinic in se znebili zračnih mehurčkov. Tako pripravljene ploščice smo na koncu dali v termoblok, kjer je potekla reverzna transkripcija po predpisanem programu.

3.2.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Za PCR smo uporabili ploščice s 384 vdolbinicami, v katerih smo pripravili reakcijsko zmes, ki je bila sestavljena iz 2 μ L 10-krat razredčenega produkta reverzne transkripcije, 5,8 μ L dH₂O, 2 μ L EvaGreen qPCR Mix Plus in 0,2 μ L oligonukleotidnih začetnikov (Preglednica I). Reakcijski volumen je bil 10 μ L. Na ploščico smo poleg vzorčkov, ki smo jih nanесли v treh ponovitvah, dodali tudi negativno kontrolo, prav tako v treh ponovitvah.

Negativna kontrola je bila sestavljena iz dH₂O, EvaGreen qPCR Mix Plus in oligonukleotidnih začetnikov. Vzorčki so bile cDNK, pripravljene iz mRNK, izolirane iz človeških osteosarkomskih celic, ki so bile izpostavljene izbranim bisfenolom, estrogenu, kombinacijam bisfenolov z estrogenom, BPA-3,4-Q ter celice, ki niso bile izpostavljene ničemu od naštetega in so predstavljale kontrolo. Pripravljene ploščice smo na koncu zaprli s folijo in jih na kratko centrifugirali.

Reakcijo smo izvedli s pomočjo naprave LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA), in sicer smo po začetni 15-minutni inkubaciji pri 95 °C izvedli 40 ciklov pomnoževanja, pri čemer je bil vsak cikel sestavljen iz treh faz. Prva faza je potekala 15 sekund pri 95 °C, druga 20 sekund pri 55 °C, tretja pa 20 sekund pri 72 °C. Po končanem pomnoževanju je sledilo dokazovanje specifičnosti z določanjem talilne krivulje.

3.2.6 Obdelava podatkov

Po končani reakciji smo dobili rezultate v obliki vrednosti Ct. To so cikli, v katerih je fluorescenca presegla prazno fluorescenco, pri čemer prazna fluorescenca predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Iz teh vrednosti smo s pomočjo umeritvenih krivulj, ki smo jih dobili z uporabo standardov, izračunali logaritme koncentracij za tri tehnične ponovitve, ki smo jih nanegli na ploščice. Iz teh vrednosti smo izračunali koncentracije in njihovo povprečno vrednost. Izračunali smo tudi standardno deviacijo ter relativno standardno deviacijo za koncentracije treh tehničnih ponovitev. Temu je sledil izračun povprečne koncentracije treh bioloških ponovitev. Tudi v tem primeru smo izračunali standardno deviacijo ter relativno standardno deviacijo. Vse te izračune smo naredili tako za preiskovane gene, kot tudi za hišni gen, ki je bil *RPLP0* in smo ga uporabili kot endogeno kontrolo za normalizacijo rezultatov. Rezultate smo normalizirali tako, da smo povprečne vrednosti koncentracij treh tehničnih ponovitev za posamezni gen delili s povprečnimi vrednostmi koncentracij treh tehničnih ponovitev za hišni gen. Na koncu smo izračunali še povprečno vrednost normaliziranih rezultatov za tri biološke ponovitve, ki smo jih nanegli na ploščico. Tako kot v prejšnjih primerih, smo tudi tu izračunali standardno deviacijo ter relativno standardno deviacijo.

S pomočjo teh izračunov smo izračunali razmerje, tj. vrednost, ki nam pove, za kolikokrat

se poveča oziroma zmanjša izražanje preiskovanega gena glede na kontrolo, pri čemer kontrolo predstavljajo celice, ki niso bile izpostavljene nobenemu od bisfenolov, estrogenu ter BPA-3,4-Q. Razmerje dobimo tako, da povprečno vrednost normaliziranih vrednosti za vzorec delimo s povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo. Poleg razmerja nas je zanimala tudi vrednost $1/\text{razmerje}$, ki nam pri genih, katerih izražanje je zmanjšano, pove, za kolikokrat se le-to zmanjša. Signifikantnost rezultatov smo določali z uporabo t-testa, kjer smo za mejno vrednost vzeli $\alpha < 0,05$. Izračunali smo tudi standardno deviacijo razmerja, s pomočjo le-te pa še standardno napako (oznaka SE v preglednicah). Končne rezultate smo predstavili v obliki grafov, v katerih smo podali razmerja s standardnimi napakami in označili signifikantnost rezultatov ($\alpha < 0,05$: *; $\alpha < 0,01$: ** in $\alpha < 0,001$: ***).

V komentarju rezultatov in v razpravi smo upoštevali le statistično signifikantne rezultate, se pravi rezultate, kjer je α manjša kot 0,05, saj je tu verjetnost, da smo naredili napako, še sprejemljiva. Kljub temu ne moremo zagotovo trditi, da v teh primerih pride do zdravstvenih težav, povezanih s spremembami v izražanju teh genov, temveč le sklepamo, do česa bi takšne spremembe lahko vodile. Prav tako ne moremo trditi, da v primeru, ko spremembe niso statistično signifikantne, dejansko ne pride do sprememb v izražanju genov.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIMERJAVA VPLIVOV BPA, BPS IN BPAF NA IZRAŽANJE GENOV *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* IN *MAOA*

4.1.1 Vpliv BPA na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

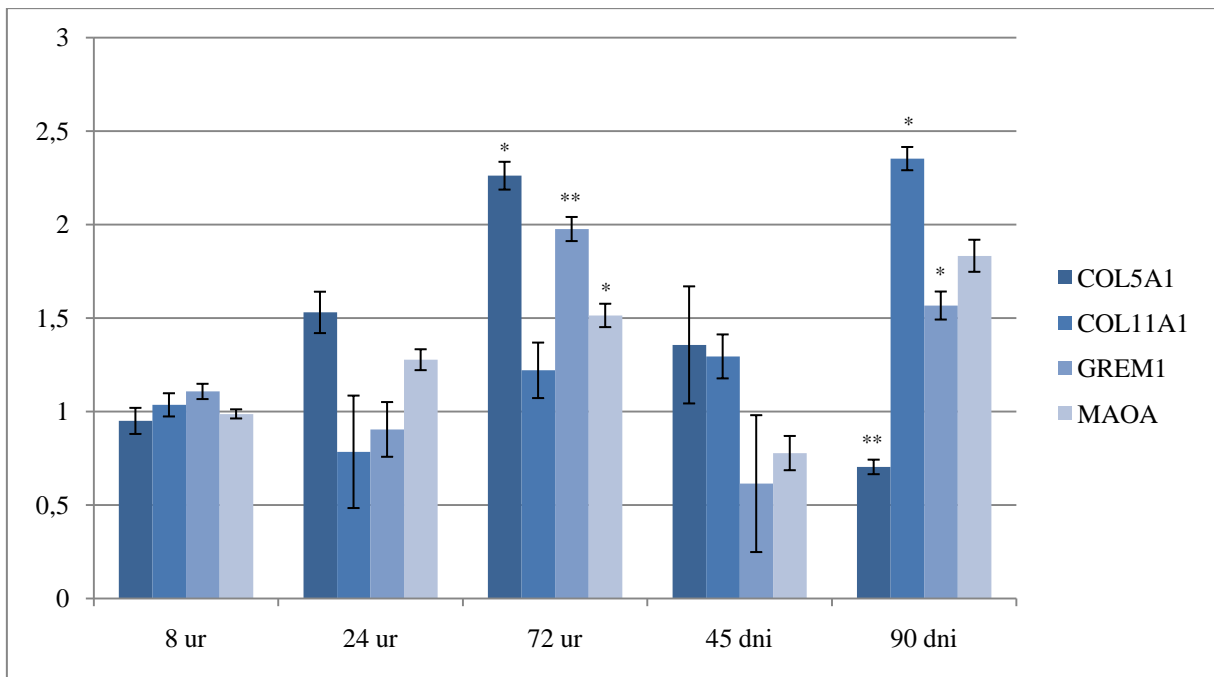
Zanimal nas je vpliv BPA na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* (Preglednica II in Slika 7). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila verižna reakcija s polimerazo v realnem času. Reakcijska zmes je bila sestavljena iz 2 μL 10-krat razredčenega produkta reverzne transkripcije, 5,8 μL dH_2O , 2 μL EvaGreen qPCR Mix Plus in 0,2 μL oligonukleotidnih začetnikov. Reakcijski volumen je bil 10 μL .

Preglednica II: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	0,95	0,07	1,03	0,06	1,11	0,04	0,99	0,02
24 ur	1,53	0,11	0,78	0,30	0,90	0,15	1,28	0,06
72 ur	2,26	0,07	1,22	0,15	1,98	0,06	1,51	0,06
45 dni	1,36	0,31	1,29	0,12	0,61	0,37	0,78	0,09
90 dni	0,70	0,04	2,35	0,06	1,57	0,07	1,83	0,08

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: *



Slika 7: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA

Vidimo, da ima BPA prve signifikantne vplive na izražanje izbranih genov po 72 urah, ko je povečano izražanje genov *COL5A1*, *GREM1* in *MAOA*.

Gena, pri katerih se sprememba pojavi največkrat, sta *COL5A1* in *GREM1*, in sicer je njuno izražanje spremenjeno v dveh časovnih točkah, ki sta 72 ur in 90 dni. Pri tem opazimo, da je pri genu *GREM1* izražanje v obeh primerih povečano, pri genu *COL5A1* pa je izražanje po 72 urah povečano in po 90 dneh zmanjšano.

Do največjega povečanja v izražanju pride pri genu *COL11A1* po 90 dneh, ko je njegovo izražanje povečano za 2,4-krat, do največjega zmanjšanja v izražanju pa pride pri genu *COL5A1* po 90 dneh, ko je njegovo izražanje zmanjšano za 1,4-krat.

Glede na čas se največje število sprememb pojavi po 72 urah in 90 dneh, ko je v obeh primerih spremenjeno izražanje treh genov.

Opazimo tudi, da se signifikantne spremembe pojavijo pri vseh štirih izbranih genih. Število vseh sprememb je šest, od tega je izražanje 1-krat zmanjšano in 5-krat povečano.

4.1.2 Vpliv BPS na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

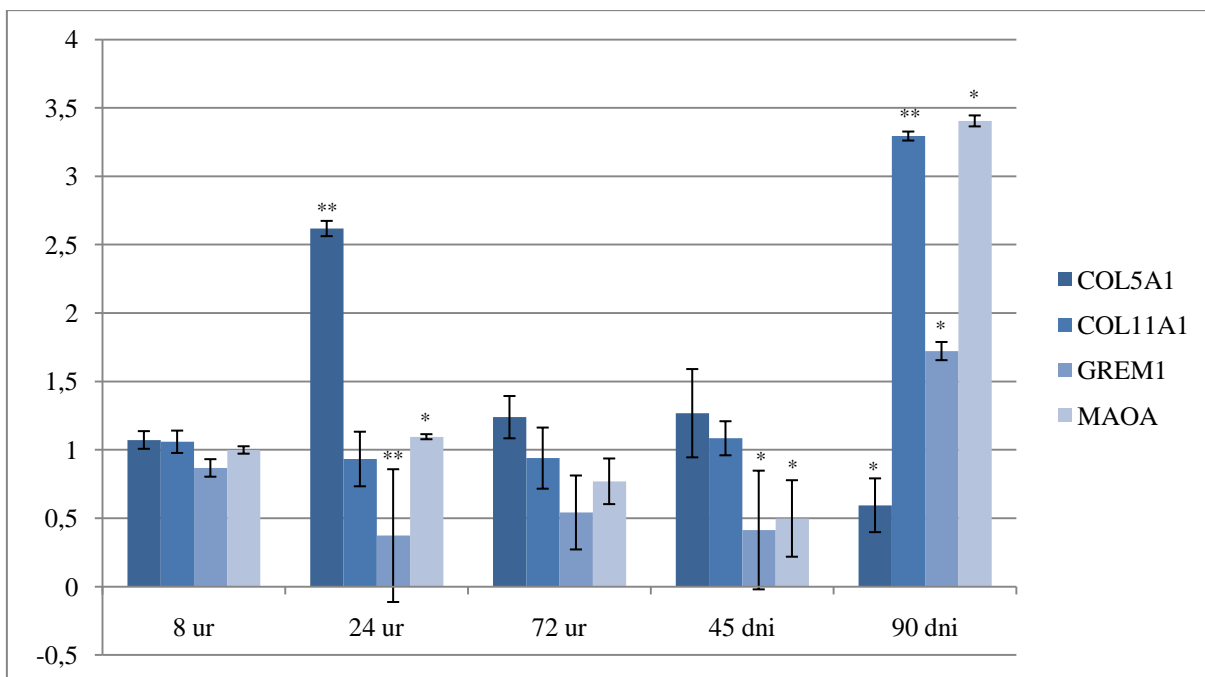
Zanimal nas je pliv BPS na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* (Preglednica III in Slika 8). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila verižna reakcija s polimerazo v realnem času. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica III: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	1,07	0,06	1,06	0,08	0,87	0,06	1,00	0,03
24 ur	2,62	0,06	0,93	0,20	0,37	0,49	1,10	0,02
72 ur	1,24	0,15	0,94	0,22	0,54	0,27	0,77	0,17
45 dni	1,27	0,32	1,08	0,12	0,41	0,43	0,50	0,28
90 dni	0,59	0,20	3,29	0,03	1,72	0,07	3,40	0,04

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: *



Slika 8: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS

Prve signifikantne spremembe se pri BPS pojavijo po 24 urah, ko je zmanjšano izražanje gena *GREM1* in povečano izražanje genov *COL5A1* in *MAOA*.

Gena, pri katerih se sprememba pojavi največkrat, sta *GREM1* in *MAOA*, katerih izražanje je spremenjeno v treh časovnih točkah, ki so 24 ur, 45 dni in 90 dni. Izražanje gena *GREM1* je po 24 urah in 45 dneh zmanjšano, po 90 dneh pa povečano. Pri genu *MAOA* je izražanje po 24 urah nekoliko povečano, po 45 dneh zmanjšano in po 90 dneh močno povečano.

Največje povečanje v izražanju se pojavi pri genu *MAOA* po 90 dneh, ko je njegovo izražanje povečano za 3,4-krat. Največje zmanjšanje v izražanju se pojavi pri genu *GREM1* po 24 urah, ko je njegovo izražanje zmanjšano za 2,7-krat.

Časovno imamo v tem primeru največ sprememb po 90 dneh, ko je spremenjeno izražanje vseh štirih genov.

Signifikantne spremembe se pojavijo pri vseh štirih preiskovanih genih. Vseh sprememb je devet, pri tem je izražanje 4-krat zmanjšano in 5-krat povečano.

4.1.3 Vpliv BPAF na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

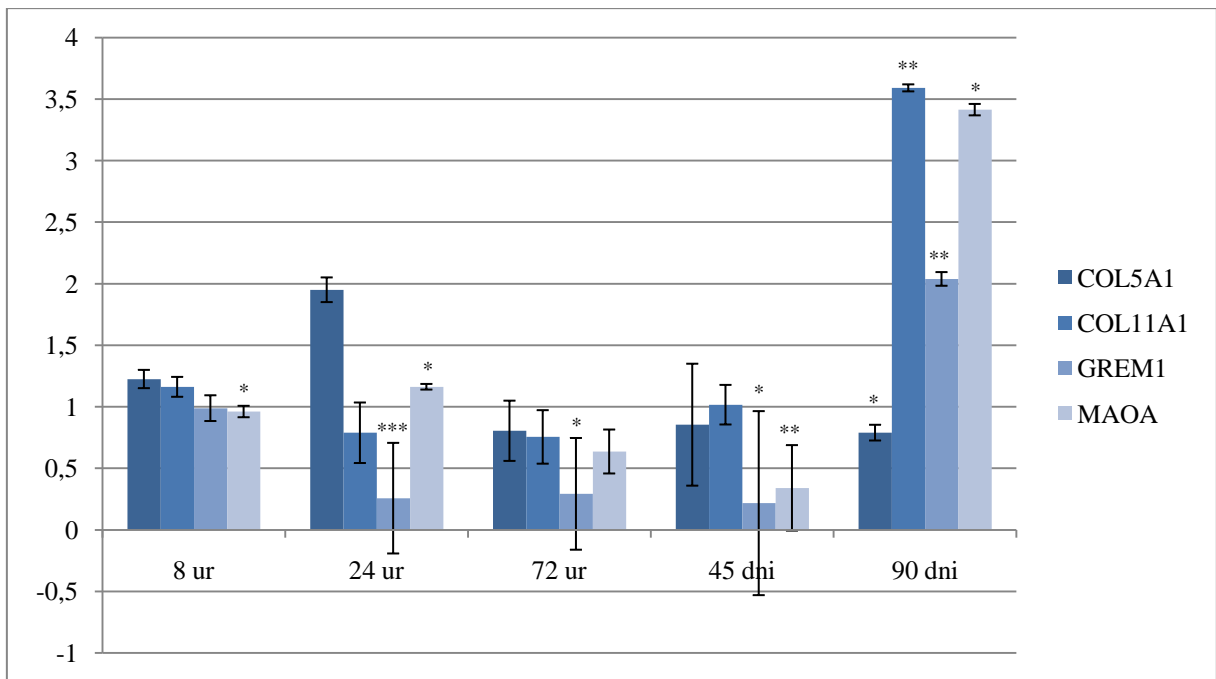
Zanimal nas je pliv BPAF na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* (Preglednica IV in Slika 9). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila verižna reakcija s polimerazo v realnem času. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica IV: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	1,23	0,07	1,16	0,08	0,99	0,10	0,96	0,05
24 ur	1,95	0,10	0,79	0,25	0,26	0,45	1,16	0,02
72 ur	0,80	0,24	0,75	0,22	0,29	0,45	0,64	0,18
45 dni	0,85	0,50	1,02	0,16	0,22	0,75	0,34	0,35
90 dni	0,79	0,06	3,59	0,03	2,04	0,06	3,41	0,05

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: *



Slika 9: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF

V primeru BPAF prve signifikantne spremembe opazimo že po 8 urah, ko je nekoliko zmanjšano izražanje gena *MAOA*.

Največkrat se signifikantne spremembe pojavijo pri genih *GREM1* in *MAOA*, in sicer v kar štirih časovnih točkah. Izražanje gena *GREM1* je po 24 urah, 72 urah in 45 dneh zmanjšano, po 90 dneh pa povečano. Pri genu *MAOA* je izražanje po 8 urah zmanjšano, po 24 urah povečano, po 45 dneh ponovno zmanjšano in po 90 dneh ponovno povečano.

Največje povečanje v izražanju se pojavi pri genu *COL11A1* po 90 dneh, ko je le-to povečano za 3,6-krat. Največje zmanjšanje v izražanju opazimo pri genu *GREM1* po 45 dneh, in sicer je le-to zmanjšano za 4,6-krat.

Tako kot pri BPA in BPS opazimo, da se tudi pri BPAF največ sprememb pojavi po 90 dneh, ko je spremenjeno izražanje vseh štirih genov.

Vseh signifikantnih sprememb je tu 10, od tega je izražanje 6-krat zmanjšano in 4-krat povečano. Tudi tu opazimo, da se spremembe pojavijo pri vsakemu od preiskovanih genov vsaj enkrat.

4.1.4 Medsebojna primerjava vplivov BPA, BPS in BPAF

Najhitreje signifikantne spremembe v izražanju opazimo pri celicah, ki so bile izpostavljene BPAF, kjer se le-te pojavijo že po 8 urah. Nekoliko kasneje se spremembe pojavijo pri celicah, ki so bile izpostavljene BPS, in sicer po 24 urah, najkasneje pa se spremembe v izražanju genov pojavijo pri celicah, ki so bile izpostavljene BPA. Iz teh podatkov bi tako lahko rekli, da ima največji vpliv na izražanje izbranih genov BPAF, najmanjši pa BPA.

Opazimo tudi, da se največje število signifikantnih sprememb v izražanju pojavi v primeru, ko so bile celice izpostavljene BPAF, najmanjše pa v primeru, ko so bile celice izpostavljene BPA. Enako kot čas, ko se pojavijo prve spremembe, tudi število sprememb kaže na to, da ima največji vpliv na izražanje izbranih genov BPAF, najmanjši pa BPA.

Če pogledamo jakost sprememb opazimo, da se največja sprememba pojavi pri BPAF, in sicer se za 4,6-krat zmanjša izražanje gena *GREM1* po 45 dneh. V primeru BPS do največje spremembe po jakosti pride pri izražanju gena *MAOA* po 90 dneh, ko je njegovo izražanje povečano za 3,4-krat. Največja sprememba po jakosti pri BPA je 2,4-kratno povečanje izražanja gena *COL11A1* po 90 dneh. Tudi ti podatki kažejo na to, da ima največji vpliv na izražanje izbranih genov BPAF, najmanjši pa BPA.

Zanimivo je tudi, da pri časovni odvisnosti vpliva bisfenolov na izražanje genov ne gre za nek linearen odnos, ampak rezultati zelo variirajo. Tako je naprimer izražanje gena *MAOA* v celicah, ki so bile izpostavljene BPAF, po 8 urah nekoliko zmanjšano, po 24 urah malo povečano, po 45 dneh močno zmanjšano in po 90 dneh močno povečano. Se pa s časom povečuje število genov, na katere vplivajo bisfenoli, saj pri vseh treh opazimo, da se največje število signifikantnih sprememb pojavi pri celicah, ki so bile bisfenolom izpostavljene 90 dni. Poleg tega opazimo še, da se s časom povečuje tudi jakost sprememb. Iz grafov namreč vidimo, da so te spremembe bistveno večje pri 90-dnevni izpostavljenosti celic bisfenolom kot v primerih krajše izpostavljenosti.

4.2 DOLOČANJE VPLIVA ESTROGENA NA VPLIVE BPA, BPS IN BPAF NA IZRAŽANJE GENOV *COL5A1*, *COL11A1*, *GREMI* IN *MAOA*

4.2.1 Vpliv estrogena na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREMI* in *MAOA*

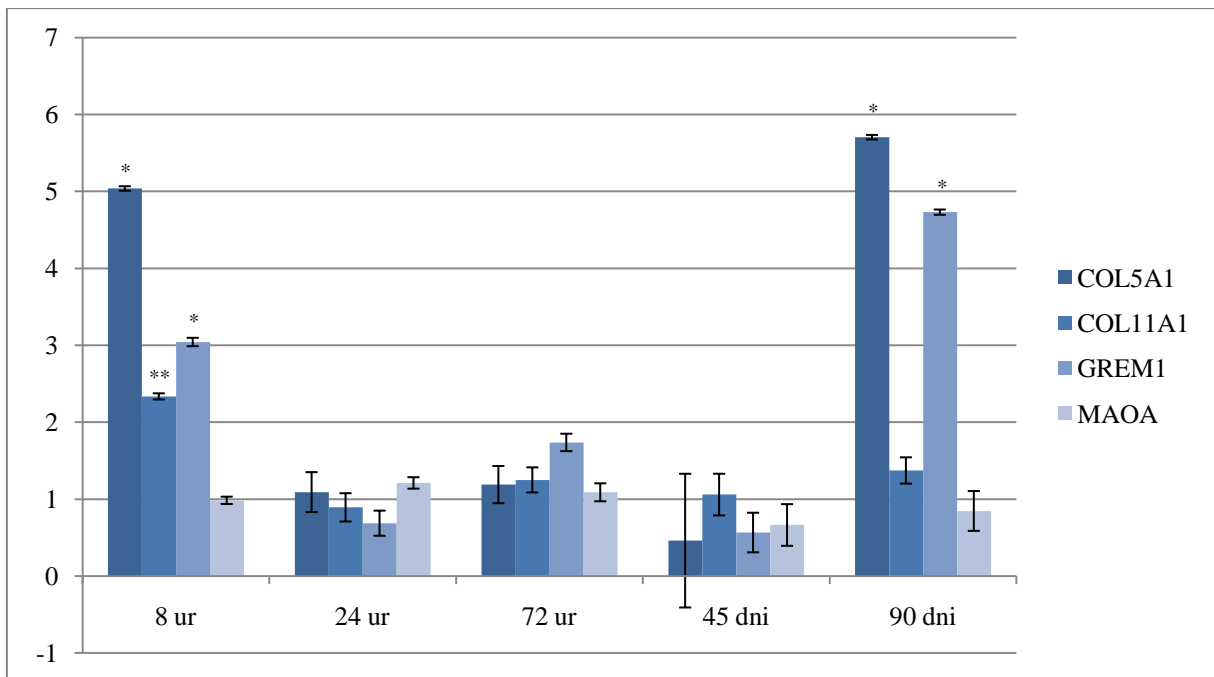
Zanimal nas je pliv estrogena na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREMI* in *MAOA* (Preglednica V in Slika 10). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila verižna reakcija s polimerazo v realnem času. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica V: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREMI* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene estrogenu

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREMI</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	5,04	0,03	2,33	0,04	3,04	0,05	0,98	0,05
24 ur	1,09	0,26	0,89	0,18	0,69	0,16	1,21	0,07
72 ur	1,19	0,24	1,25	0,16	1,74	0,11	1,09	0,12
45 dni	0,46	0,87	1,06	0,27	0,56	0,26	0,66	0,27
90 dni	5,70	0,03	1,37	0,17	4,73	0,03	0,85	0,26

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 10: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene estrogenu

Prve signifikantne spremembe v izražanju genov estrogen povzroči že po 8 urah, ko je povečano izražanje kar treh genov, ki so *COL5A1*, *COL11A1* in *GREM1*.

Gena, pri katerih se največkrat pojavijo signifikantne spremembe, sta *COL5A1* in *GREM1*. Njuno izražanje se spremeni 2-krat, in sicer se pri obeh spremembe pojavijo po 8 urah in ponovno po 90 dneh. Izražanje je tu vedno povečano in pri obeh genih je povečanje po 90 dneh večje kot po 8 urah.

Največje povečanje v izražanju estrogen povzroči pri genu *COL5A1* po 90 dneh, ko je njegovo izražanje povečano za 5,7-krat.

Največ sprememb se tu pojavi po 8 urah, ko je povečano izražanje kar treh genov, in ne po 90 dneh kot pri izpostavljenosti celic bisfenolom.

V primeru estrogena opazimo tudi, da ta v nobeni časovni točki nima signifikantnih vplivov na izražanje gena *MAOA*. Vseh signifikantnih sprememb je tu pet in v vseh primerih je izražanje povečano.

4.2.2 Vpliv BPA v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

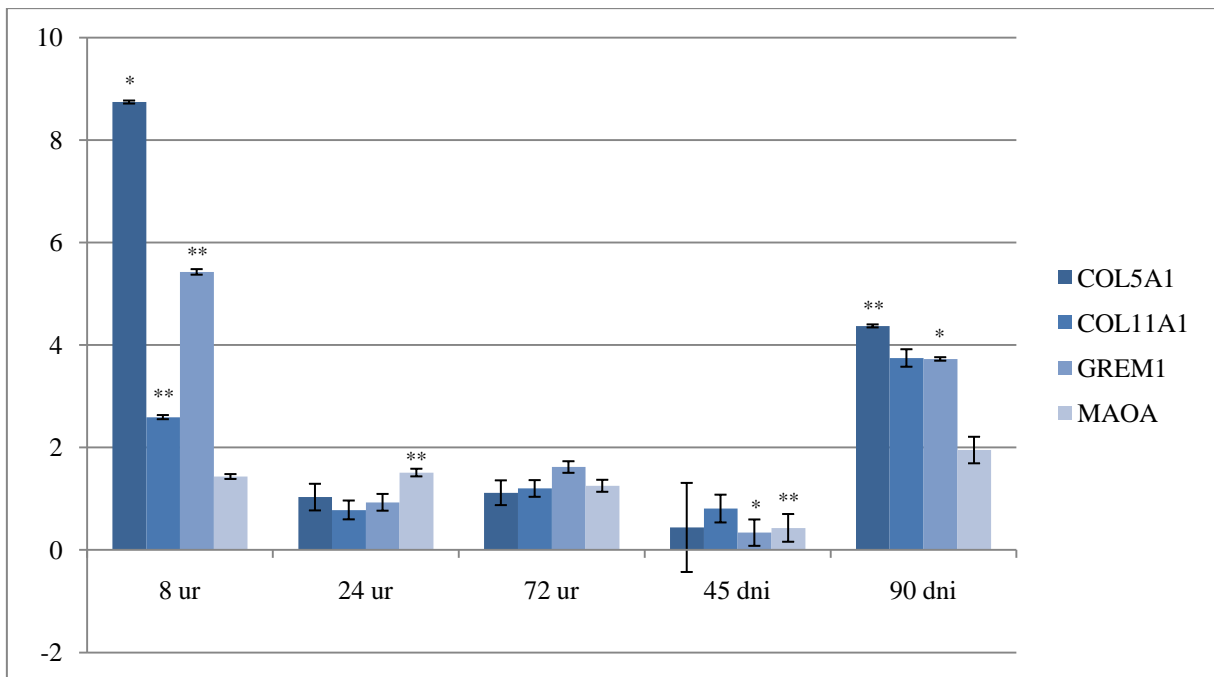
Preučevali smo vplive BPA v kombinaciji z estrogenom na izražanje izbranih genov, da bi lahko določili, ali se vpliv kaj spremeni, če je poleg BPA prisoten tudi estrogen (Preglednica VI in Slika 11). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica VI: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	8,74	0,02	2,59	0,03	5,43	0,02	1,43	0,06
24 ur	1,03	0,20	0,78	0,22	0,93	0,10	1,51	0,03
72 ur	1,12	0,16	1,20	0,15	1,62	0,10	1,25	0,08
45 dni	0,44	0,81	0,81	0,26	0,34	0,39	0,43	0,21
90 dni	4,37	0,02	3,75	1,53	3,73	0,05	1,95	0,09

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 11: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom

Vidimo, da ima BPA v kombinaciji z estrogenom prve signifikantne vplive na izražanje izbranih genov že po 8 urah, ko je povečano izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1* in *GREM1*.

Gen, pri katerem se sprememba pojavi največkrat, je *GREM1*, in sicer je njegovo izražanje spremenjeno v treh časovnih točkah. Pri tem opazimo, da je izražanje po 8 urah povečano, po 45 dneh zmanjšano in po 90 dneh ponovno povečano.

Največje povečanje v izražanju se pojavi pri genu *COL5A1* po 8 urah, ko je njegovo izražanje povečano za 8,7-krat. Do največjega zmanjšanja v izražanju pride pri genu *GREM1* po 45 dneh, ko je njegovo izražanje zmanjšano za 3-krat.

Glede na čas se največje število signifikantnih sprememb pojavi po 8 urah, ko je spremenjeno izražanje treh genov.

Opazimo, da se signifikantne spremembe pojavijo pri vseh štirih izbranih genih. Vseh sprememb je tu osem, od tega se izražanje 2-krat zmanjša in 6-krat poveča.

4.2.3 Vpliv BPS v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

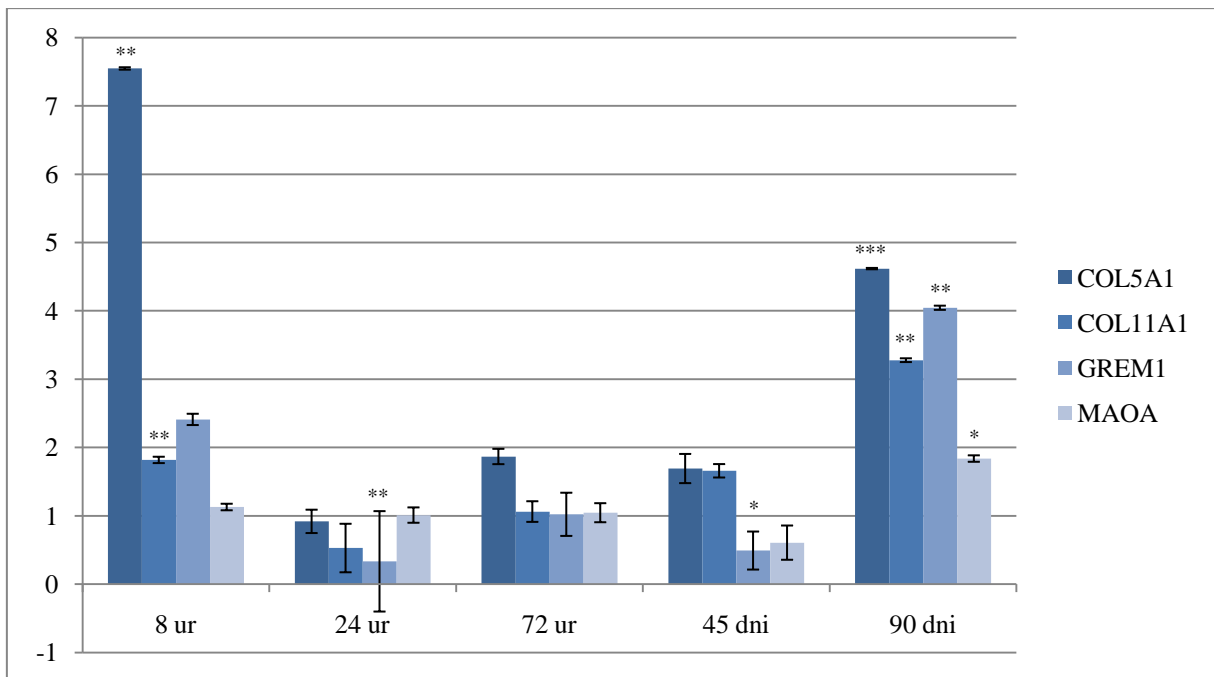
Preučevali smo vplive BPS v kombinaciji z estrogenom na izražanje izbranih genov, da bi lahko določili, ali se vpliv kaj spremeni, če je poleg BPS prisoten tudi estrogen (Preglednica VII in Slika 12). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica VII: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	7,55	0,02	1,82	0,05	2,41	0,08	1,13	0,05
24 ur	0,92	0,17	0,53	0,35	0,33	0,73	1,01	0,11
72 ur	1,87	0,11	1,06	0,15	1,02	0,32	1,04	0,14
45 dni	1,69	0,21	1,66	0,10	0,49	0,28	0,61	0,25
90 dni	4,62	0,01	3,28	0,03	4,04	0,03	1,84	0,05

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 12: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom

Pri BPS v kombinaciji z estrogenom se prve signifikantne spremembe pojavijo po 8 urah, ko je povečano izražanje dveh genov, ki sta *COL5A1* in *COL11A1*.

Največkrat se spremembe pojavijo v izražanju gena *GREM1*, in sicer kar 3-krat. Pri tem je njegovo izražanje po 24 urah in 45 dneh zmanjšano, po 90 dneh pa povečano.

Gen, pri katerem se izražanje najbolj poveča, je *COL5A1*, njegovo izražanje pa je po 8 urah povečano za kar 7,6-krat. Največje zmanjšanje v izražanju se pojavi pri genu *GREM1* po 24 urah, ko je le-to zmanjšano za 3-krat.

Največje število sprememb se pojavi po 90 dneh, ko je spremenjeno izražanje vseh štirih genov, in sicer je tu izražanje v vseh primerih povečano.

Signifikantne spremembe se pojavijo pri vseh štirih preiskovanih genih. Izražanje je v tem primeru signifikantno spremenjeno 8-krat, od tega je 2-krat zmanjšano in 6-krat povečano.

4.2.4 Vpliv BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

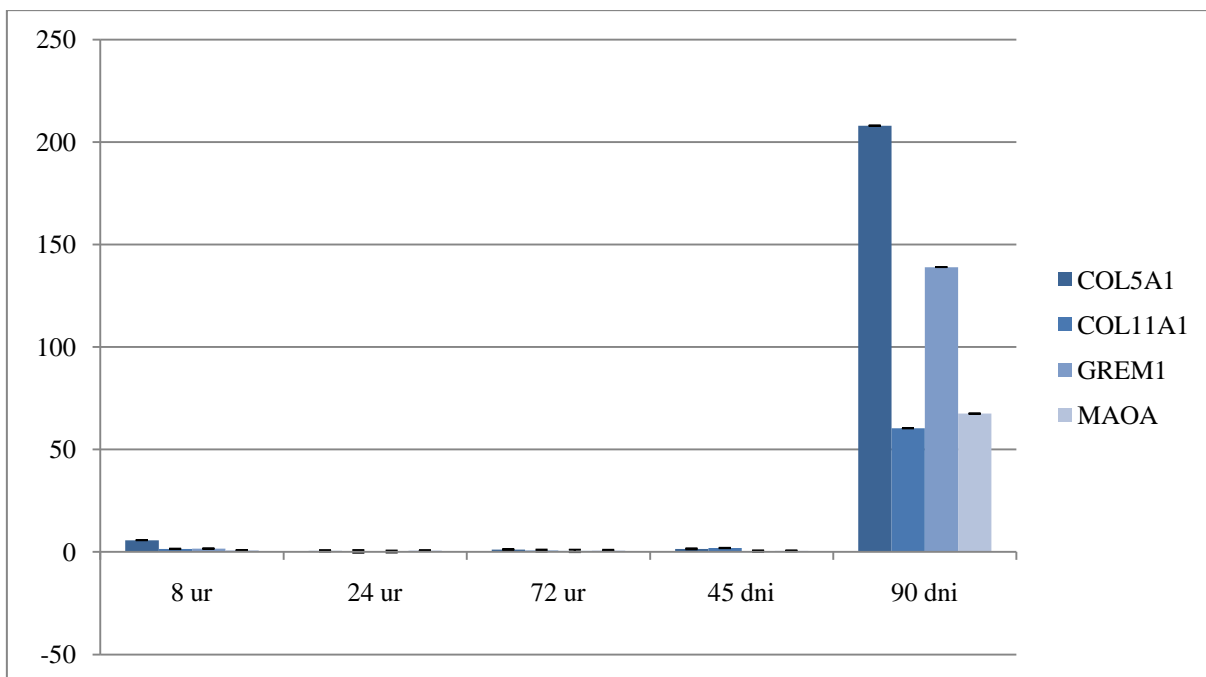
Preučevali smo vplive BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje izbranih genov, da bi lahko določili, ali se vpliv kaj spremeni, če je poleg BPAF prisoten še estrogen (Preglednica VIII ter Slika 13 in 14). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica VIII: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom

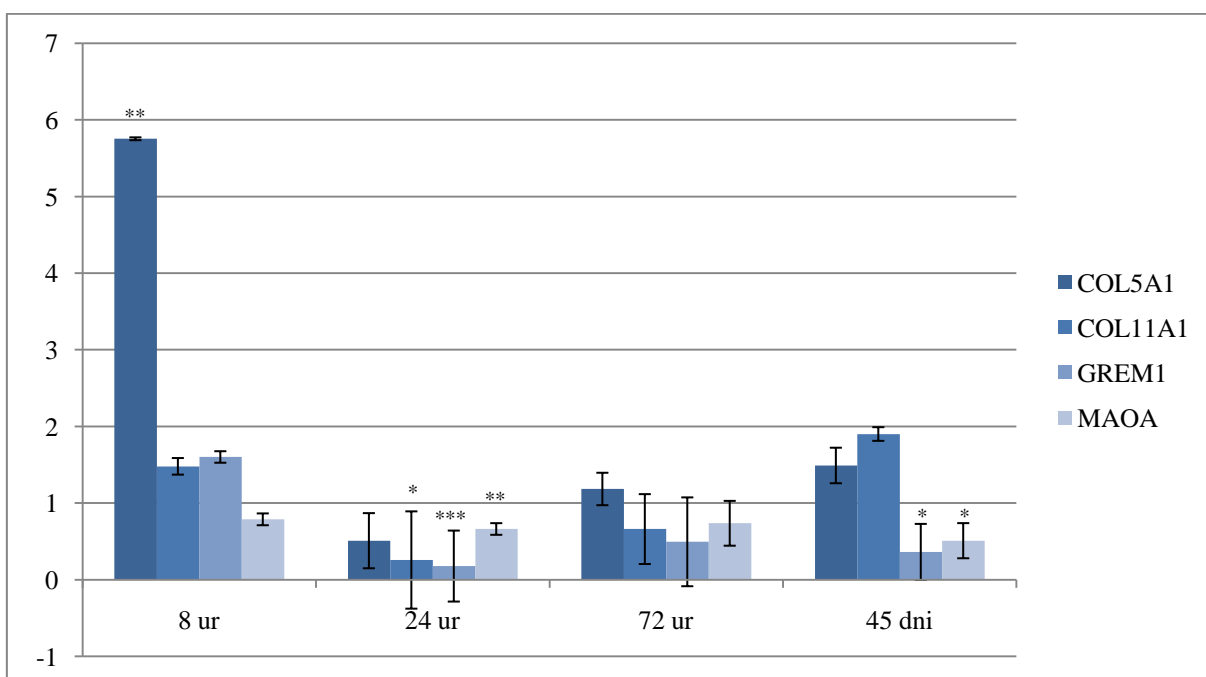
ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	5,75	0,02	1,48	0,11	1,60	0,08	0,79	0,08
24 ur	0,51	0,36	0,26	0,63	0,18	0,46	0,66	0,08
72 ur	1,18	0,21	0,66	0,46	0,50	0,58	0,74	0,29
45 dni	1,49	0,23	1,90	0,09	0,36	0,37	0,51	0,23
90 dni	207,94	0,01	60,37	0,01	138,98	0,00	67,46	0,01

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 13: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom



Slika 14: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez rezultatov, ki jih dobimo pri celicah, ki so bile izpostavljene 90 dni

Prve signifikantne spremembe pri BPAF v kombinaciji z estrogenom opazimo po 8 urah, ko je povečano izražanje enega gena, ki je *COL5A1*.

Največkrat se sprememba pojavi v izražanju genov *GREM1* in *MAOA*. Pri obeh genih se spremembe pojavijo po 24 urah in 45 dneh, in sicer se izražanje tu vedno zmanjša.

Gen, pri katerem se izražanje najbolj poveča, je *COL5A1*, in sicer je njegovo izražanje po 8 urah povečano za 5,8-krat. Največje zmanjšanje se pojavi pri genu *GREM1* po 24 urah, ko je njegovo izražanje zmanjšano za 5,6-krat.

Največje število signifikantnih sprememb se pojavi po 24 urah, ko je spremenjeno izražanje treh genov.

Signifikantne spremembe se pojavijo pri vseh štirih preiskovanih genih. Izražanje je signifikantno spremenjeno 6-krat, od tega 5-krat zmanjšano in 1-krat povečano.

Iz podatkov v preglednici vidimo tudi, da so vrednosti pri bisfenolu AF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh zelo visoke. Razlog za to je verjetno hišni gen in ne preiskovani gen. Pri meritvah za hišni gen so od devetih meritev namreč uspele le štiri, poleg tega pa sta vrednosti Ct pri tretji biološki ponovitvi tudi zelo visoki. Vzrok za tako odstopajoče podatke pri celicah, ki so bile 90 dni izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom, so tako verjetno rezultati, ki jih dobimo pri izražanju hišnega gena *RPLP0*.

4.2.5 Medsebojna primerjava vplivov samih bisfenolov (BPA, BPS in BPAF) in teh bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

Pri samih bisfenolih opazimo 25 signifikantnih sprememb, od tega je izražanje v 11 primerih zmanjšano in v 14 povečano. V primeru bisfenolov, kombiniranih z estrogenom, je vseh sprememb 22, od tega je izražanje zmanjšano v 9 primerih in povečano v 13. Če to pogledamo v odstotkih, vidimo, da je pri samih bisfenolih izražanje povečano v 56 %, medtem ko je zmanjšano v 44 %. Pri bisfenolih v kombinaciji z estrogenom je izražanje povečano v 59 % in zmanjšano v 41 %. Iz dobljenih rezultatov opazimo, da je izražanje tako pri samih bisfenolih kot tudi pri bisfenolih v kombinaciji z estrogenom večkrat povečano kot pa zmanjšano. Vidimo tudi, da je odstotek sprememb, ko

je izražanje povečano, večji v primeru, ko so bile celice izpostavljene bisfenolom v kombinaciji z estrogenom, razlog za to pa je lahko estrogen, saj pri celicah, ki so bile izpostavljene samemu estrogenu, opazimo, da le-ta v vseh primerih izražanje poveča.

Če pogledamo izražanje pri celicah, ki so bile izpostavljene samim bisfenolih, vidimo, da je največ signifikantnih sprememb po 90 dneh. Pri celicah, ki so bile izpostavljene bisfenolom v kombinaciji z estrogenom, pa največje število sprememb opazimo v dveh časovnih točkah, ki sta 8 ur in 90 dni. Vzrok za to lahko najdemo v estrogenu, saj ta največ sprememb povzroči po 8 urah, medtem ko sami bisfenoli največ sprememb povzročijo po 90 dneh.

Na osnovi dobljenih rezultatov bi lahko rekli, da estrogen ne spremeni učinkov bisfenolov v časovnih točkah 24 ur, 72 ur in 45 dni, saj imamo tu dobro ujemanje med rezultati, ki jih dobimo, ko so bile celice izpostavljene bisfenolom, in rezultati, ki jih dobimo, ko so bile celice izpostavljene bisfenolom v kombinaciji z estrogenom. Razlog za to je lahko v tem, da so to časovne točke, ko tudi sam estrogen nima vplivov na izražanje izbranih genov. Opazimo pa, da dodatek estrogena bisfenolom spremeni izražanje v določenih primerih po 8 urah in 90 dneh. Pri genu *COL5A1* imamo tako že po 8 urah močno povečano izražanje, medtem ko sami bisfenoli tu nimajo vplivov. Povečano je tudi njegovo izražanje po 90 dneh, ki je v primeru, ko so bile celice izpostavljene samim bisfenolom zmanjšano. To pomeni, da je v tem primeru izražanje spremenjeno v časovnih točkah, ko ima tudi sam estrogen vplive na izražanje gena *COL5A1*. V primeru gena *COL11A1* dodatek estrogena spremeni vplive bisfenolov le po 8 urah, kar je tudi edina časovna točka, ko tudi sam estrogen spremeni izražanje tega gena. BPA in BPS v kombinaciji z estrogenom tu povečata njegovo izražanje, medtem ko sama bisfenola tu nimata vplivov. Izražanje gena *GREM1* po 8 urah je v primeru, ko so bile celice izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, močno povečano, medtem ko je bilo v primeru, ko so bile celice izpostavljene samemu BPA, izražanje v tej časovni točki nespremenjeno. Pri izpostavljenosti celic 90 dni pa estrogen poleg vplivov BPA spremeni tudi vplive BPS, in sicer je tu izražanje bolj povečano kot pri samih bisfenolih. Tudi v tem primeru se pokaže, da estrogen spremeni vplive bisfenolov v časovnih točkah, ko ima tudi sam vplive na izražanje. Opazimo tudi, da sam estrogen v nobenem primeru ne vpliva na izražanje gena *MAOA* in da imamo pri tem genu v vseh časovnih točkah dokaj dobro ujemanje med rezultati, ko so bile celice izpostavljene samim bisfenolom, in rezultati, ko so bile celice izpostavljene bisfenolom v

kombinaciji z estrogenom. Edina večja sprememba, ki jo dodatek estrogena bisfenolom povzroči v izražanju gena *MAOA*, je pri BPS po 90 dneh, ko je izražanje pri celicah, ki so bile izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom, manj povečano, kot pri celicah, ki so bile izpostavljene samemu bisfenolu.

Težko bi na splošno rekli, ali gre za aditivne, sinergistične ali antagonistične učinke pri kombinaciji bisfenolov z estrogenom, se pa v nekaterih primerih kažejo antagonistični in sinergistični učinki. Pri genu *COL5A1* imamo po 8 urah izražanje pri celicah, ki so bile izpostavljene samemu estrogenu, povečano, medtem ko sami bisfenoli izražanja tu ne spremenijo. Ko bisfenolom dodamo estrogen pa se izražanje pri vseh treh bisfenolih poveča, in to bolj kot pri samem estrogenu. Iz tega bi lahko sklepali, da gre med bisfenoli A, S in AF ter estrogenom za sinergistične učinke na izražanje gena *COL5A1* pri izpostavljenosti celic 8 ur. Sam estrogen pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 90 dni, poveča izražanje gena *COL5A1*, bisfenoli ga zmanjšajo, ko imamo bisfenole, kombinirane z estrogenom, pa v primeru BPA in BPS pride do manjšega povečanja kot pri samih bisfenolih. Tu bi tako lahko rekli, da gre med bisfenoloma A in S ter estrogenom za antagonistične učinke na izražanje gena *COL5A1* pri izpostavljenosti celic 90 dni. Izražanje gena *GREM1* je pod vplivom samih bisfenolov po 8 urah nespremenjeno, medtem ko sam estrogen izražanje tu poveča. V primeru BPA v kombinaciji z estrogenom pa je to povečanje še bistveno večje kot pri samem estrogenu. Se pravi, da bi lahko rekli, da gre med BPA in estrogenom za sinergistične učinke na izražanje gena *GREM1* pri izpostavljenosti celic 8 ur. Bisfenol S poveča izražanje gena *MAOA* pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 90 dni, sam estrogen tu ne vpliva na izražanje, v primeru, ko so bile celice izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom, pa je izražanje povečano manj kot pri samem BPS. Tu torej lahko rečemo, da gre med BPS in estrogenom za antagonistične učinke na izražanje gena *MAOA* pri izpostavljenosti celic 90 dni.

4.3 VPLIV BPA-3,4-Q NA IZRAŽANJE GENOV *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

BPA se v organizmu metabolizira v BPA-3,4-Q, zato nas je zanimal tudi njegov vpliv na izražanje izbranih genov (Preglednica IX in Slika 15). Metoda, s katero smo to preučevali, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na

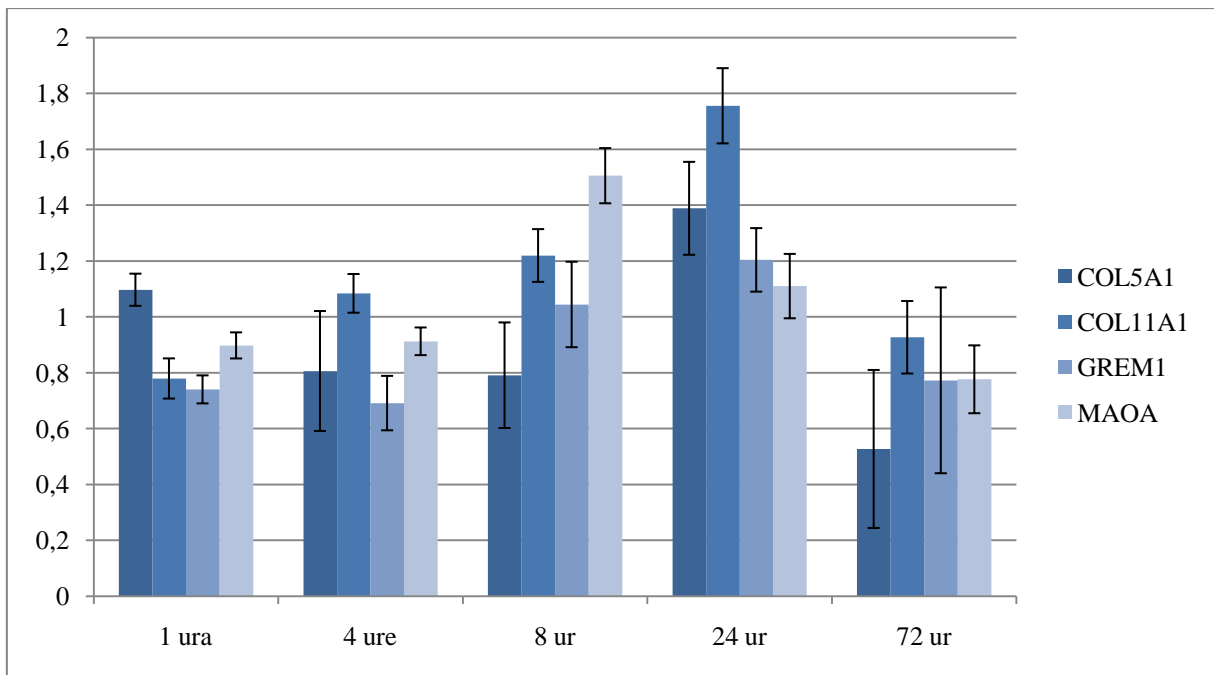
izražanje preiskovanih genov. Čas izpostavljenosti celic je bil tu bistveno krajši, in sicer smo spremembe v izražanju določali po 1 uri, 4 urah, 8 urah, 24 urah in 72 urah.

Preglednica IX: Razmerja in standardne napake izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA-3,4-kinonu

ČAS\GEN	<i>COL5A1</i>		<i>COL11A1</i>		<i>GREM1</i>		<i>MAOA</i>	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
1 ura	1,10	0,06	0,78	0,07	0,74	0,05	0,90	0,05
4 ure	0,81	0,21	1,08	0,07	0,69	0,10	0,91	0,05
8 ur	0,79	0,19	1,22	0,09	1,04	0,15	1,51	0,10
24 ur	1,39	0,17	1,76	0,13	1,20	0,11	1,11	0,12
72 ur	0,53	0,28	0,93	0,13	0,77	0,33	0,78	0,12

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 15: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA-3,4-kinonu

Ko so bile celice izpostavljene BPA-3,4-Q, opazimo, da v nobenem primeru ne pride do signifikantnih vplivov na izražanje preiskovanih genov, vendar moramo tu upoštevati dejstvo, da je bil najdaljši čas izpostavljenosti celic 72 ur, in ne 90 dni kot v vseh ostalih primerih. Ker prejšnji primeri kažejo, da se jakost sprememb povečuje s časom, je razlog za nespremenjeno izražanje v tem primeru verjetno ta, da so bile celice kinonu najdlje izpostavljene le 72 ur.

4.4 VPLIV BPA, BPS, BPAF, ESTROGENA IN IZBRANIH BISFENOLOV V KOMBINACIJI Z ESTROGENOM NA IZRAŽANJE GENOV *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* IN *MAOA* TER DOLOČANJE MOŽNIH VPLIVOV NA ZDRAVJE PREKO SPREMENJENEGA IZRAŽANJA TEH GENOV

4.4.1 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *COL5A1*

Preučevali smo vplive BPA, BPS, BPAF, estrogena, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *COL5A1* (Preglednica X in XI ter Slika 16). Metoda, s katero smo preučevali spremembe v izražanju, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica X: Razmerja in standardne napake izražanja gena *COL5A1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu

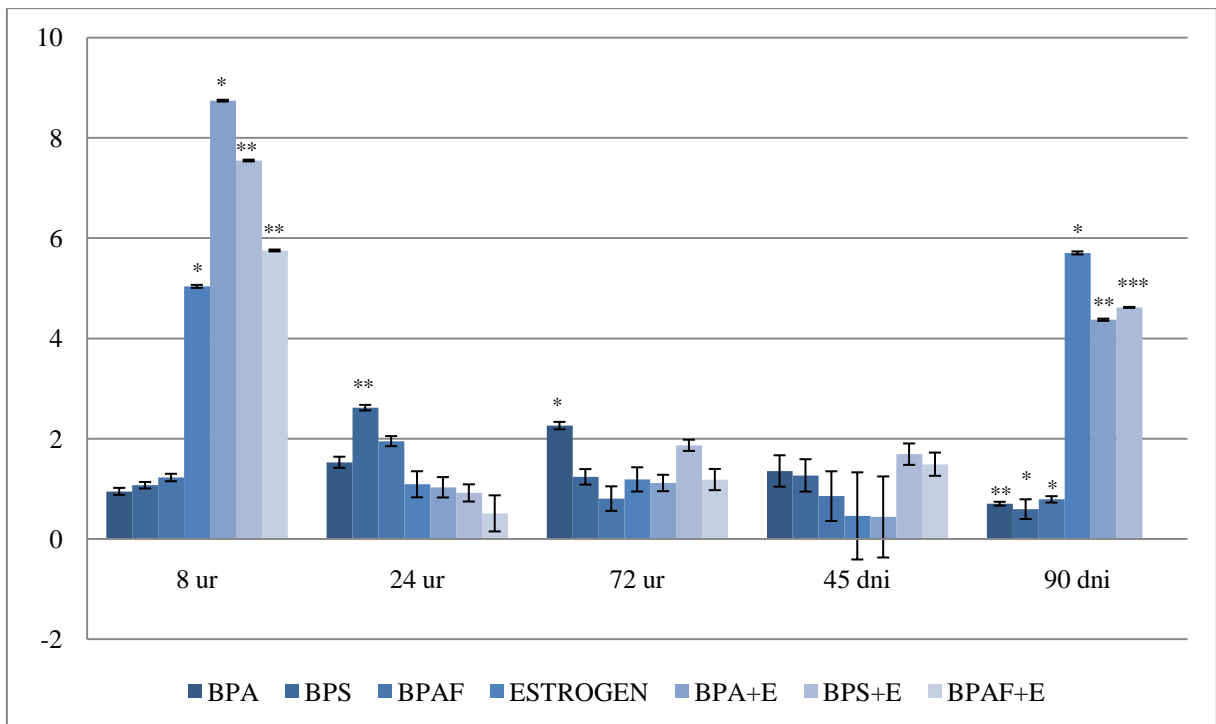
ČAS\BISFENOL	BPA		BPS		BPAF		ESTROGEN	
ČAS\ESTROGEN	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	0,95	0,07	1,07	0,06	1,23	0,07	5,04	0,03
24 ur	1,53	0,11	2,62	0,06	1,95	0,10	1,09	0,26
72 ur	2,26	0,07	1,24	0,15	0,80	0,24	1,19	0,24
45 dni	1,36	0,31	1,27	0,32	0,85	0,50	0,46	0,87
90 dni	0,70	0,04	0,59	0,20	0,79	0,06	5,70	0,03

Preglednica XI: Razmerja in standardne napake izražanja gena *COL5A1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom

ČAS\BISFENOL + E	BPA + E		BPS + E		BPAF + E	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	8,74	0,02	7,55	0,02	5,75	0,02
24 ur	1,03	0,20	0,92	0,17	0,51	0,36
72 ur	1,12	0,16	1,87	0,11	1,18	0,21
45 dni	0,44	0,81	1,69	0,21	1,49	0,23
90 dni	4,37	0,02	4,62	0,01	207,94	0,00

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 16: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena *COL5A1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh

Največ signifikantnih sprememb se pojavi po 90 dneh, ko je izražanje gena *COL5A1* spremenjeno kar 6-krat. Opazimo, da sami bisfenoli po tem času zmanjšajo izražanje tega gena, medtem ko estrogen ter bisfenoli v kombinaciji z estrogenom njegovo izražanje povečajo.

Vidimo, da največje signifikantno povečanje v izražanju povzroči BPA v kombinaciji z estrogenom po 8 urah, kjer je izražanje povečano za 8,7-krat. Največje zmanjšanje v izražanju pa povzroči BPS po 90 dneh, kjer je izražanje zmanjšano za 1,7-krat.

Opazimo tudi, da je izražanje gena *COL5A1* zmanjšano v primeru BPA, BPS in BPAF po 90 dneh, medtem ko je njegovo izražanje v primeru BPS po 24 urah in BPA po 72 urah povečano. Iz tega lahko sklepamo, da je pri kratkotrajni izpostavljenosti bisfenolom njegovo izražanje povečano, pri dolgotrajni pa zmanjšano.

Sam estrogen signifikantno vpliva na izražanje gena *COL5A1* po 8 urah in ponovno po 90 dneh, in sicer poveča njegovo izražanje. Opazimo tudi, da je izražanje po 90 dneh bolj povečano kot po 8 urah. Tu bi tako lahko rekli, da estrogen poveča izražanje *COL5A1*.

V primeru, ko imamo bisfenole kombinirane z estrogenom, je izražanje gena *COL5A1* pri vseh signifikantnih spremembah povečano. Tako je povečano izražanje pri celicah, ki so bile 8 ur in 90 dni izpostavljene bisfenolom A, S in AF v kombinaciji z estrogenom.

4.4.2 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *COL11A1*:

Preučevali smo vplive BPA, BPS, BPAF, estrogena, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *COL11A1* (Preglednici XII in XIII ter Slika 17). Metoda, s katero smo preučevali spremembe v izražanju, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica XII: Razmerja in standardne napake izražanja gena *COL11A1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu

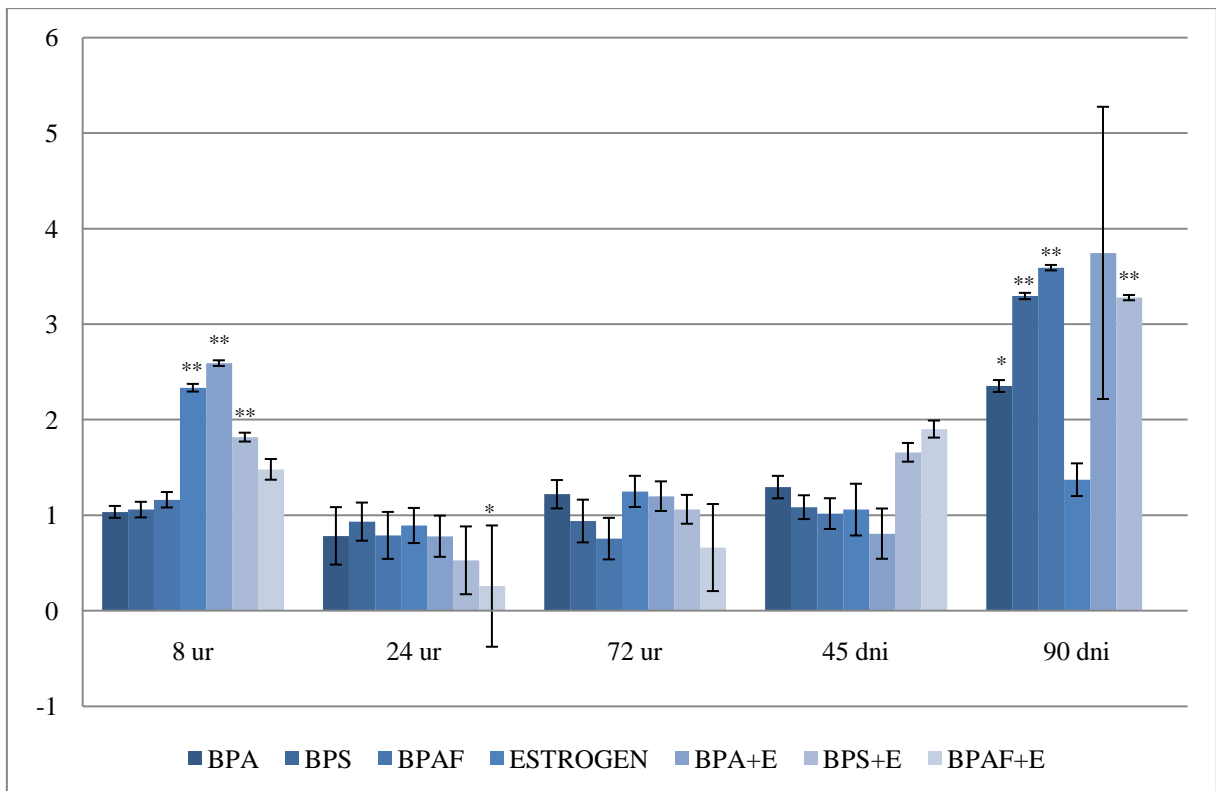
ČAS\BISFENOL	BPA		BPS		BPAF		ESTROGEN	
ČAS\ESTROGEN	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	1,03	0,06	1,06	0,08	1,16	0,08	2,33	0,04
24 ur	0,78	0,30	0,93	0,20	0,79	0,25	0,89	0,18
72 ur	1,22	0,15	0,94	0,22	0,75	0,22	1,25	0,16
45 dni	1,29	0,12	1,08	0,12	1,02	0,16	1,06	0,27
90 dni	2,35	0,06	3,29	0,03	3,59	0,03	1,37	0,17

Preglednica XIII: Razmerja in standardne napake izražanja gena *COL11A1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom

ČAS\BISFENOL + E	BPA + E		BPS + E		BPAF + E	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	2,59	0,03	1,82	0,05	1,48	0,11
24 ur	0,78	0,22	0,53	0,35	0,26	0,63
72 ur	1,20	0,15	1,06	0,15	0,66	0,46
45 dni	0,81	0,26	1,66	0,10	1,90	0,09
90 dni	3,75	1,53	3,28	0,03	60,37	0,01

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 17: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena *COL11A1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh

Največ signifikantnih sprememb v izražanju gena *COL11A1* se pojavi po 90 dneh, ko je izražanje spremenjeno 4-krat in je v vseh primerih povečano.

Vidimo, da največje signifikantno povečanje v izražanju povzroči BPAF po 90 dneh, ko je izražanje povečano za 3,6-krat. Največje zmanjšanje v izražanju povzroči BPAF v kombinaciji z estrogenom po 24 urah, ko je le-to zmanjšano za 3,9-krat. Je pa to tudi edini primer, ko je izražanje *COL11A1* zmanjšano.

Opazimo tudi, da sami bisfenoli prve signifikantne spremembe povzročijo šele po 90 dneh, ko je izražanje pri vseh treh povečano. Pri tem največje povečanje povzroči BPAF, najmanjše pa BPA. Iz tega lahko sklepamo, da bisfenoli povečajo izražanje gena *COL11A1*.

Sam estrogen povzroči samo eno signifikantno spremembo, in sicer že po 8 urah, ko je povečano izražanje gena *COL11A1*.

Ko imamo bisfenole kombinirane z estrogenom, se največ sprememb pojavi po 8 urah, ko se izražanje poveča pri celicah, izpostavljenih BPA in BPS v kombinaciji z estrogenom. Ponovno se signifikantna sprememba pojavi po 24 urah, ko BPAF v kombinaciji z estrogenom zmanjša izražanje *COL11A1*. Po 90 dneh je izražanje ponovno povečano pri celicah, izpostavljenih BPS v kombinaciji z estrogenom. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da BPS v kombinaciji z estrogenom poveča izražanje gena *COL11A1*, BPA v kombinaciji z estrogenom poveča njegovo izražanje pri kratkotrajni izpostavljenosti, BPAF v kombinaciji z estrogenom pa pri kratkotrajni izpostavljenosti izražanje zmanjša.

4.4.3 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *GREM1*

Preučevali smo vplive BPA, BPS, BPAF, estrogena, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *GREM1* (Preglednica XIV in XV ter Slika 18). Metoda, s katero smo preučevali spremembe v izražanju, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica XIV: Razmerja in standardne napake izražanja gena *GREM1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu

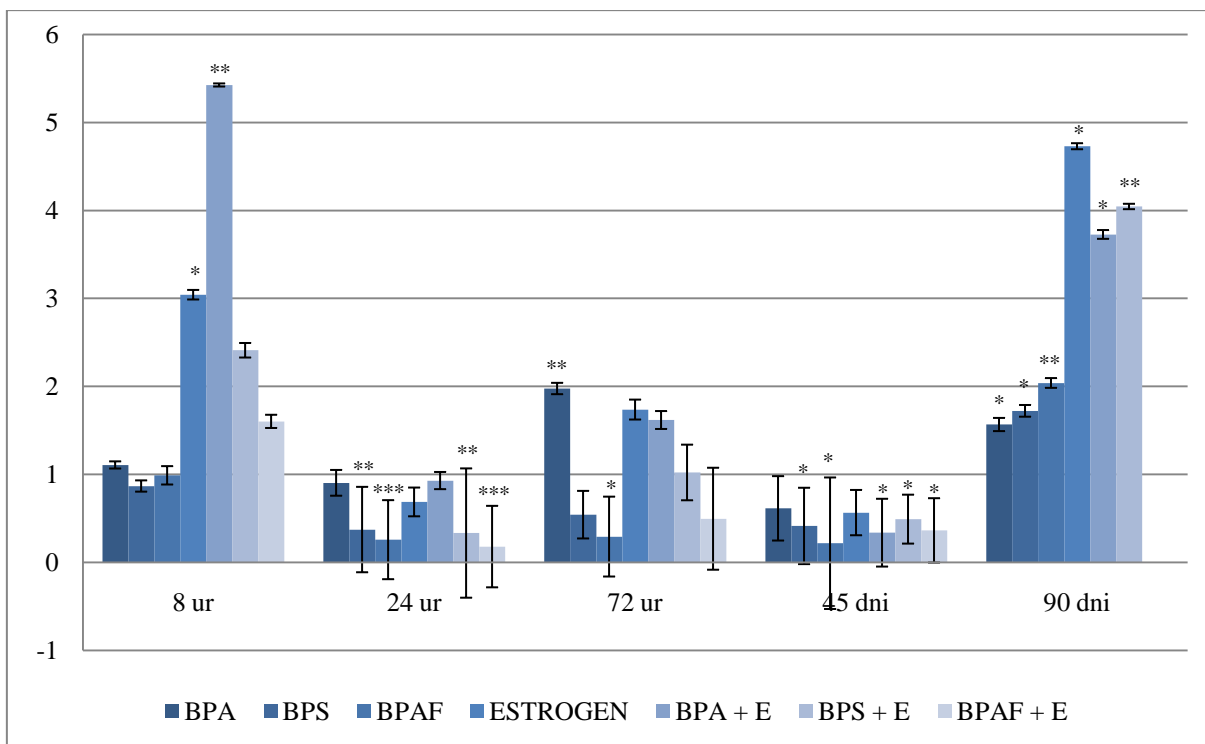
ČAS\BISFENOL ČAS\ESTROGEN	BPA		BPS		BPAF		ESTROGEN	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	1,11	0,04	0,87	0,06	0,99	0,10	3,04	0,05
24 ur	0,90	0,15	0,37	0,49	0,26	0,45	0,69	0,16
72 ur	1,98	0,06	0,54	0,27	0,29	0,45	1,74	0,11
45 dni	0,61	0,37	0,41	0,43	0,22	0,75	0,56	0,26
90 dni	1,57	0,07	1,72	0,07	2,04	0,06	4,73	0,03

Preglednica XV: Razmerja in standardne napake izražanja gena *GREM1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom

ČAS\BISFENOL + E	BPA + E		BPS + E		BPAF + E	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	5,43	0,02	2,41	0,08	1,60	0,08
24 ur	0,93	0,10	0,33	0,73	0,18	0,46
72 ur	1,62	0,10	1,02	0,32	0,50	0,58
45 dni	0,34	0,39	0,49	0,28	0,36	0,37
90 dni	3,73	0,05	4,04	0,03	138,98	0,00

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: barva; oznaka na grafu: *



Slika 18: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena *GREM1* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh

Največ signifikantnih sprememb se v izražanju gena *GREM1* pojavi po 90 dneh, ko je njegovo izražanje spremenjeno kar 6-krat, in sicer je v vseh primerih povečano. Edini primer, ko po 90 dneh ne pride do signifikantne spremembe, je BPAF v kombinaciji z estrogenom.

Vidimo, da največje signifikantno povečanje v izražanju povzroči BPA v kombinaciji z estrogenom po 8 urah, kjer je izražanje povečano za 5,4-krat. Največje zmanjšanje v izražanju povzroči BPAF v kombinaciji z estrogenom po 24 urah, ko je le-to zmanjšano za 5,6-krat.

Sami bisfenoli prve signifikantne spremembe povzročijo po 24 urah. BPA povzroči dve signifikantni spremembi, in sicer poveča izražanje gena *GREM1* po 72 urah in 90 dneh. BPS po 24 urah in 45 dneh zmanjša izražanje gena *GREM1*, po 90 dneh pa ga poveča. V primeru BPAF se izražanje gena *GREM1* zmanjša pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 24 ur, 72 ur ter 45 dni, in poveča pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 90 dni. Na osnovi

tega lahko rečemo, da BPA poveča izražanje gena *GREM1*, medtem ko je pri vplivu BPS in BPAF izražanje odvisno od časa izpostavljenosti. Tako tu lahko rečemo, da pri izpostavljenosti celic do 45 dni pride do zmanjšane izražanja, kasneje pa do povečanega.

Iz rezultatov vidimo, da sam estrogen povzroči dve signifikantni spremembi, in sicer po 8 urah in 90 dneh, ko je izražanje gena *GREM1* v obeh primerih povečano.

V primerih, ko imamo bisfenole kombinirane z estrogenom, dobimo v različnih časovnih točkah zelo različne rezultate. Tako BPA v kombinaciji z estrogenom po 8 urah povzroči povečano izražanje gena *GREM1*, po 45 dneh je izražanje zmanjšano in po 90 dneh ponovno povečano. BPS v kombinaciji z estrogenom po 24 urah in 45 dneh zmanjša izražanje gena *GREM1*, po 90 dneh pa ga poveča. Pri celicah, ki so bile izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom se izražanje spremeni po 24 urah in 45 dneh, in sicer se v obeh primerih zmanjša.

4.4.4 Vpliv BPA, BPS, BPAF, estrogena ter bisfenolov v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *MAOA*

Preučevali smo vplive BPA, BPS, BPAF, estrogena, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom na izražanje gena *MAOA* (Preglednica XVI in XVII ter Slika 19). Metoda, s katero smo preučevali spremembe v izražanju, je bila qPCR. Reakcijska zmes in volumen sta bila enaka kot v primeru vpliva BPA na izražanje izbranih genov.

Preglednica XVI: Razmerja in standardne napake izražanja gena *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF in estrogenu

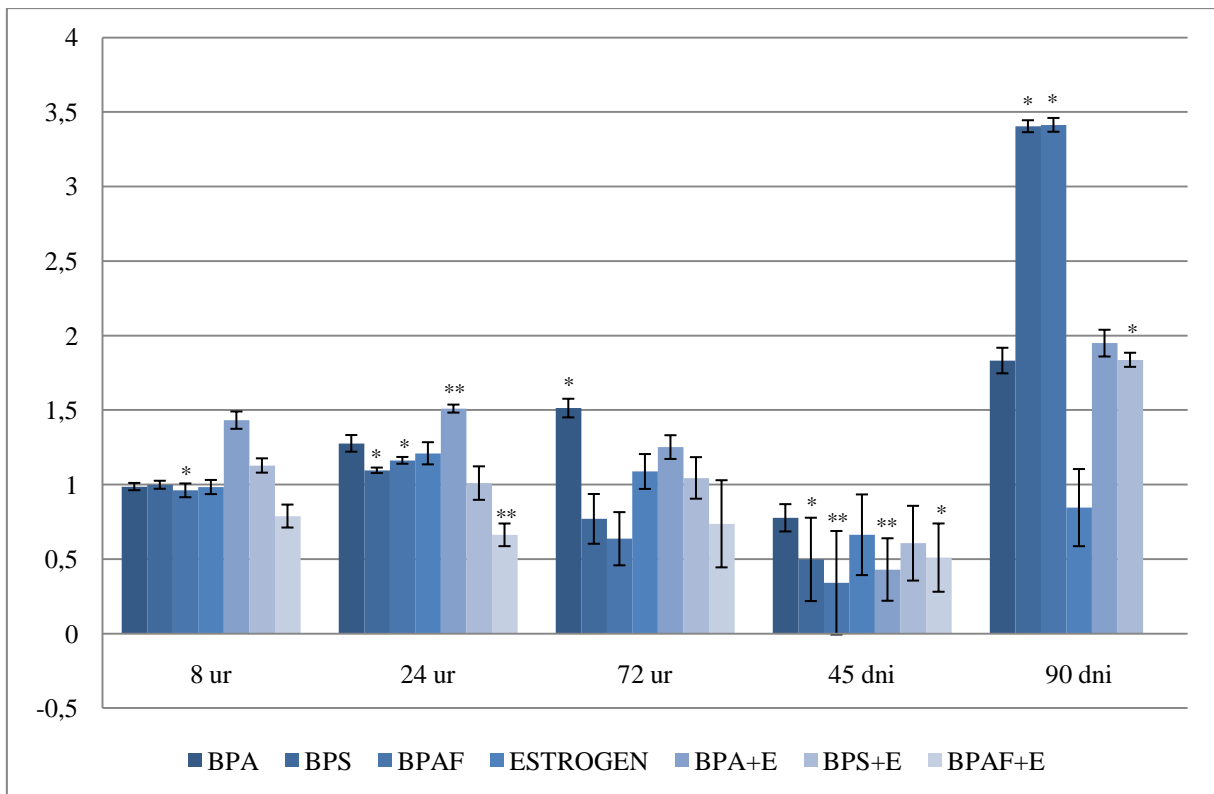
ČAS\BISFENOL	BPA		BPS		BPAF		ESTROGEN	
ČAS\ESTROGEN	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	0,99	0,02	0,10	0,03	0,96	0,05	0,98	0,05
24 ur	1,28	0,06	1,10	0,02	1,16	0,02	1,21	0,07
72 ur	1,51	0,06	0,77	0,17	0,64	0,18	1,09	0,12
45 dni	0,78	0,09	0,50	0,28	0,34	0,35	0,66	0,27
90 dni	1,83	0,09	3,40	0,04	3,41	0,05	0,85	0,26

Preglednica XVII: Razmerja in standardne napake izražanja gena *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom

ČAS\BISFENOL + E	BPA + E		BPS + E		BPAF + E	
	razmerje	SE	razmerje	SE	razmerje	SE
8 ur	1,43	0,06	1,13	0,05	0,79	0,08
24 ur	1,51	0,03	1,01	0,11	0,66	0,08
72 ur	1,25	0,08	1,04	0,14	0,74	0,29
45 dni	0,43	0,21	0,61	0,25	0,51	0,23
90 dni	1,95	0,09	1,84	0,05	67,46	0,01

Oznake signifikantnosti rezultatov v preglednici in na grafu:

- alfa < 0,001: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: ***
- alfa < 0,01: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: **
- alfa < 0,05: oznaka v preglednici: **barva**; oznaka na grafu: *



Slika 19: Graf z razmerji in standardnimi napakami izražanja gena *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile izpostavljene BPA, BPS, BPAF, estrogenu, BPA v kombinaciji z estrogenom, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, brez vrednosti za BPAF v kombinaciji z estrogenom po 90 dneh

Največ signifikantnih sprememb v izražanju gena *MAOA* se pojavi v dveh časovnih točkah, ki sta 24 ur in 45 dni. V obeh primerih se izražanje spremeni 4-krat, od tega se po 45 dneh vedno zmanjša, po 24 urah pa se v treh primerih poveča in v enem zmanjša.

Največje signifikantno povečanje se pojavi pri BPS in BPAF po 90 dneh, ko je izražanje v obeh primerih povečano za 3,4-krat. Največje zmanjšanje v izražanju povzroči BPAF po 45 dneh, ko je le-to zmanjšano za 2,9-krat.

Iz rezultatov vidimo, da se prva signifikantna sprememba pri samih bisfenolih pojavi že po 8 urah. Sam BPA povzroči le eno signifikantno spremembo v izražanju gena *MAOA*, to je povečano izražanje pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 72 ur. V primeru, ko so bile celice izpostavljene BPS in BPAF, najprej opazimo, da rezultati tu zelo variirajo. Pri BPS je izražanje po 24 urah nekoliko povečano, po 45 dneh zmanjšano in po 90 dneh ponovno povečano. BPAF po 8 urah izražanje nekoliko zmanjša, po 24 urah nekoliko poveča, po

45 dneh močno zmanjša in po 90 dneh ponovno močno poveča. Na osnovi teh podatkov bi lahko rekli, da BPA poveča izražanje gena *MAOA*. Pri BPS in BPAF lahko rečemo, da pri 90-dnevni izpostavljenosti celic izražanje povečata, medtem ko pri izpostavljenosti celic do 45 dni spremembe v izražanju zelo variirajo.

Sam estrogen v nobenem primeru ne povzroči signifikantnih sprememb v izražanju gena *MAOA*.

V primerih, ko imamo bisfenole kombinirane z estrogenom, vidimo, da BPA v kombinaciji z estrogenom po 24 urah izražanje gena *MAOA* poveča in po 45 dneh zmanjša. BPS v kombinaciji z estrogenom povzroči eno samo signifikantno spremembo, in sicer poveča izražanje gena *MAOA* po 90 dneh. Pri BPAF v kombinaciji z estrogenom pride do zmanjšane izražanja gena *MAOA* po 24 urah in 45 dneh.

4.4.5 Možni vplivi bisfenolov na zdravje preko vpliva na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*

4.4.5.1 Spremenjeno izražanje gena *COL5A1*

Gen *COL5A1* proizvaja komponento kolagena tipa V, imenovano veriga pro-alfa1(V). Kolageni so proteini, ki ojačujejo in podpirajo številna tkiva v telesu, vključno s kožo, vezmi, kostmi, kitami, mišicami ter ekstracelularnim matriksom. V primeru, ko se zmanjša izražanje gena, do česar naj bi po naših rezultatih prišlo pri dolgotrajni izpostavljenosti bisfenolom, nastajajo manjše količine verige pro-alfa1(V) in s tem manjše količine zrelih vlaken kolagena tipa V. Posledica tega je lahko zmanjšana trdnost vezivnega tkiva, zaradi česar se lahko zmanjša podpora številnim tkivom v telesu. Poleg tega se lahko pojavijo prekomerna raztegljivost kože, prekomerna gibljivost sklepov, nenormalno celjenje ran ter nagnjenost k podplutbam.

Ko je izražanje gena *COL5A1* povečano, kar v našem primeru opazimo pri celicah, ki so bile kratkotrajno izpostavljene bisfenolom, in pri celicah, ki so bile izpostavljene bisfenolom v kombinaciji z estrogenom, pa nastajajo večje količine verige pro-alfa1(V) in s tem večje količine kolagena tipa V. Posledica tega je ojačanje oziroma ohranitev vezivnega tkiva, kar je pozitiven učinek. Iz tega lahko sklepamo, da kratkotrajne izpostavitve bisfenolom nimajo negativnih učinkov na zdravje preko izražanja gena *COL5A1*, v

primeru, ko je poleg bisfenolov prisoten še estrogen, pa negativni učinki izginejo tudi pri dolgotrajni izpostavljenosti.

4.4.5.2 Spremenjeno izražanje gena *COL11A1*

Gen *COL11A1* proizvaja komponento kolagena tipa XI, imenovano veriga pro-alfa1(XI). Kolagen tipa XI daje strukturo in trdnost vezivnemu tkivu, ki podpira mišice, sklepe, organe in kožo. Običajno ga najdemo v hrustancu, poleg tega pa je tudi del čistega gela, ki zapolnjuje očesno zrklo, notranje uho ter sredino diska med vretenci v hrbtenici. Ko se izražanje gena zmanjša, kar se v naši raziskavi pojavi samo pri celicah, ki so bile 24 ur izpostavljene BPAF v kombinaciji z estrogenom, nastajajo manjše količine verige pro-alfa1(XI) in s tem manjše količine zrelih vlaken kolagena tipa XI. Posledica tega je zmanjšana funkcija kolagena tipa XI, kar lahko vodi v izgubo sluha, odstop mrežnice ter do anomalij kosti in sklepov. Še posebej velika verjetnost za pojav težav s kostmi in sklepi je pri otrocih, saj kolagen tipa XI običajno najdemo v hrustancu, ta pa predstavlja velik del okostja v zgodnjem razvoju.

Povečano izražanje gena *COL11A1* se v našem primeru pojavi pri celicah, ki so bile izpostavljene samim bisfenolom, pri celicah, ki so bile 8 ur izpostavljene bisfenoloma A in S v kombinaciji z estrogenom, ter pri celicah, ki so bile 90 dni izpostavljene BPS v kombinaciji z estrogenom. V tem primeru nastajajo večje količine verige pro-alfa1(XI) in s tem večje količine kolagena tipa XI. Posledica tega je ojačanje oziroma ohranitev vezivnega tkiva, kar je dober vpliv na kosti, lahko pa se pojavijo težave z vidom in sluhom, saj je kolagen tipa XI tudi del čistega gela, ki zapolnjuje očesno zrklo ter notranje uho.

4.4.5.3 Spremenjeno izražanje gena *GREM1*

Gen *GREM1* nosi genski zapis za antagonist kostnega morfogenega proteina, ki se izraža v osteoblastih in po delovanju nasprotuje učinkom BMP pri diferenciaciji in funkciji osteoblastov. Zmanjšano izražanje gena, ki ga povzročata BPS in BPAF – tako sama kot tudi v kombinaciji z estrogenom – pri celicah, ki so jima bile izpostavljene do 45 dni, privede do zmanjšanega antagonističnega učinka kostnemu morfogenemu proteinu.

Posledica tega sta večje število osteoblastov in povečana mineralna gostota kosti. Se pravi, da ima zmanjšano izražanje gena *GREMI* pozitivne učinke na kosti.

V primeru, ko je izražanje gena *GREMI* povečano, pride do povečanja antagonističnega učinka kostnemu morfogenemu proteinu, posledica česar sta lahko zmanjšano število osteoblastov in zmanjšana mineralna gostota kosti, to pa lahko vodi v osteopenijo in spontane zlome. V našem primeru je izražanje povečano pri celicah, ki so bile izpostavljene bisfenolu A – tako samemu kot tudi v kombinaciji z estrogenom – ter pri celicah, ki so bile 90 dni izpostavljene BPS, BPAF ter BPS v kombinaciji z estrogenom.

4.4.5.4 Spremenjeno izražanje gena *MAOA*

Gen *MAOA* nosi genski zapis za encim monoamino oksidaza A, ki katalizira oksidativno deaminacijo biogenih in ksenobiotičnih aminov in ima tako pomembno vlogo pri metabolizmu nevrottransmitterjev. Iz dobljenih rezultatov pri izražanju gena *MAOA* najprej opazimo, da tu rezultati pri celicah, ki so bile do 45 dni izpostavljene BPS, BPAF, BPS v kombinaciji z estrogenom ter BPAF v kombinaciji z estrogenom, zelo variirajo, pri celicah, ki so jim bile izpostavljene 90 dni pa je izražanje v vseh signifikantnih primerih povečano. BPA povzroči samo eno signifikantno spremembo v izražanju gena *MAOA*, in sicer poveča njegovo izražanje pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 72 ur. Pri zmanjšanem izražanju gena *MAOA* se zmanjša nastajanje encima MAOA, zaradi česar se poveča količina nevrottransmitterjev, kar lahko vodi v agresijo.

Pri povečanem izražanju gena *MAOA* nastaja večja količina encima MAOA, zaradi česar se poveča metabolizem nevrottransmitterjev, posledica tega pa je lahko depresija.

5 SKLEP

Namen našega dela je bil preučiti vpliv bisfenolov A, S in AF na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA* v človeških osteosarkomskih celicah.

Izražanje gena *COL5A1* se pri izpostavljenosti celic bisfenoloma A in S do 72 ur poveča, pri celicah, ki so bile 90 dni izpostavljene vsem trem bisfenolom, pa se njegovo izražanje zmanjša. V primeru, ko je bisfenolom dodan estrogen, se izražanje, glede na vplive, ki jih imajo sami bisfenoli, spremeni po 8 urah in 90 dneh, ko pride do povečanega izražanja gena *COL5A1*.

Na izražanje gena *COL11A1* imajo bisfenoli vplive samo pri 3-mesečni izpostavljenosti, ko vsi trije izražanje povečajo. Ko bisfenolom dodamo estrogen, se izražanje spremeni po 8 in 24 urah napram učinkom, ki jih imajo sami bisfenoli. Po 8 urah BPA in BPS v kombinaciji z estrogenom izražanje povečata, po 24 urah pa se izražanje zmanjša pod vplivom BPAF v kombinaciji z estrogenom.

Bisfenola S in AF zmanjšata izražanje gena *GREM1* v času izpostavljenosti do 45 dni in povečata pri 3-mesečni izpostavljenosti. Bisfenol A izražanje gena *GREM1* poveča v dveh časovnih točkah, ki sta 72 ur in 90 dni. Pri kombinacijah bisfenolov z estrogenom imamo po 24 urah, 72 urah in 45 dneh dokaj dobro ujemanje z rezultati, ki jih dobimo pri samih bisfenolih. Po 8 urah izpostavljenosti celic bisfenolu A, ki mu je dodan estrogen, pride do močnega povečanja izražanja gena *GREM1*, medtem ko sam BPA tu nima vplivov. Bisfenola A in S ob dodatku estrogena v primeru 3-mesečne izpostavljenosti povzročita večje povečanje kot v primeru, ko so celice izpostavljene samima bisfenoloma.

V genu *MAOA* bisfenol A povzroči eno samo signifikantno spremembo, in sicer poveča njegovo izražanje po 72 urah. Pri BPS in BPAF najprej opazimo, da podatki v primeru, ko so jima bile celice izpostavljene do 45 dni, zelo variirajo, po 90 dneh pa pride do močnega povečanja v izražanju gena *MAOA*. Ob dodatku estrogena bisfenolom tu ni večjih razlik v primerjavi z rezultati, ki jih dobimo pri samih bisfenolih. Opazimo le, da pri 3-mesečni izpostavljenosti sam BPS povzroči večje povečanje izražanja gena *MAOA* kot v primeru, ko mu je dodan estrogen.

Dobljeni rezultati kažejo, da obstajajo razlike med vplivi BPA, BPS in BPAF na izražanje preiskovanih genov, in sicer naj bi imel največje vplive BPAF in najmanjše BPA. Na to

kažejo jakost in število signifikantnih sprememb pri posameznem bisfenolu ter čas, ko se pojavijo prve spremembe pri posameznem bisfenolu. Se pa pri vseh treh bisfenolih največ signifikantnih sprememb pokaže v primeru, ko so jim bile celice izpostavljene 90 dni.

V primeru BPA-3,4-Q rezultati kažejo, da pri kratkotrajni izpostavljenosti celic ne vpliva na izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1*, *GREM1* in *MAOA*. Ne vemo pa, kakšni bi bili učinki na izražanje preiskovanih genov pri dolgotrajni izpostavljenosti, saj je bil v našem primeru najdaljši čas izpostavljenosti celic kinonu le 72 ur. Tu bi bilo zato dobro narediti še dodatne, dolgotrajnejše študije.

Pri estrogenu se prve signifikantne spremembe pojavijo že po 8 urah, in sicer se poveča izražanje genov *COL5A1*, *COL11A1* in *GREM1*. Nato njegovi učinki popolnoma izginejo in se ponovno pojavijo šele po 90 dneh, ko je povečano izražanje dveh genov – *COL5A1* in *GREM1*. Se pravi, da estrogen največ signifikantnih sprememb na izražanje izbranih genov povzroči že po 8 urah.

Dobljeni rezultati kažejo, da bisfenoli lahko privedejo do najrazličnejših zdravstvenih težav preko delovanja na izbrane gene. Posledica vpliva bisfenolov so lahko oslABLjeno vezivno tkivo, anomalije kosti in sklepov, težave z vidom in sluhom, agresija in depresija.

6 VIRI IN LITERATURA

- 1) Li Y, Luh CJ, Burns KA, Arao Y, Jiang Z, Teng CT, Tice RR, Korach KS: Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs): *In Vitro* Mechanism of Estrogenic Activation and Differential Effects on ER Target Genes. *Environmental Health Perspectives* 2013; 121(4): 459–466.
- 2) Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* 2009; 30(4): 293–342.
- 3) Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS: Differential Estrogenic Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals Bisphenol A, Bisphenol AF, and Zearalenone through Estrogen Receptor α and β in Vitro. *Environmental Health Perspectives* 2012; 120(7): 1029–1035.
- 4) Šutiaková I, Kovalkovičová N, Tulenková M, Šutiak V: Bisphenol A and its potential toxic effects on living organisms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2012; 2(2): 526–535.
- 5) 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): 1267–1272.
- 6) Cooper JE, Kendig EL, Belcher SM: Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere* 2011; 85(6): 943–947.
- 7) Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C, Bartolomei MS: Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLOS Genetics* 2013; 9(4): 1–18.
- 8) Cavalieri EL, Rogan EG: Is Bisphenol A a Weak Carcinogen like the Natural Estrogens and Diethylstilbestrol? *IUBMB Life* 2010, 62(10): 746–751.
- 9) Liao C, Liu F, Kannan K: Bisphenol S, a New Bisphenol Analogue, in Paper Products and Currency Bills and Its Association with Bisphenol A Residues. *Environmental Science & Technology* 2012; 46(12): 6515–6522.
- 10) Viñas R, Watson CS: Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives* 2013; 121(3): 352–358.

- 11) Molina-Molina JM, Amayaa E, Grimaldib M, Sáenza JM, Realá M, Fernández MF, Balaguerb P, Oleaa N: In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 272(1): 127–136.
- 12) Danzl E, Sei K, Soda S, Ike M, Fujita M: Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2009; 6(4): 1472–1484.
- 13) Liao C, Liu F, Kannan K: Bisphenol S, A New Bisphenol Analogue, in Paper Products and Currency Bills and Its Association with Bisphenol A Residues. *Environmental Science & Technology* 2012; 46(12): 6515–6522.
- 14) Konkel L: Thermal Reaction: The Spread of Bisphenol S via Paper Products. *Environmental Health Perspectives* 2013; 121(3): a76.
- 15) Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon HB, Nakata H, Kannan K: Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environmental Science & Technology* 2012; 46(12): 6860–6866.
- 16) Komel R: Gensko inženirstvo: Naravoslovni, etični in pravni vidiki. *Proteus*; 60(1): 8–21.
- 17) *COL5A1*, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL5A1> (25. 11. 2013).
- 18) Malfait F, Wenstrup RJ, Paepe AD: Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genetics in Medicine* 2010; 12(10): 597–604.
- 19) *COL11A1*, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL11A1> (25. 11. 2013).
- 20) *GREM1* gremlin 1, DAN family BMP antagonist [*Homo sapiens* (human)], National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26585> (4. 9. 2013).
- 21) Gazzero E, Pereira RC, Jorgetti V, Olson S, Economides AN, Canalis E: Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinology* 2005; 146(2): 655–665.
- 22) *MAOA*, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MAOA> (25. 11. 2013).

- 23) Soliman A, Bagby RM, Wilson AA, Miler L, Clark M, Rusjan P, Sacher J, Houle S, Meyer JH: Relationship of monoamine oxidase A binding to adaptive and maladaptive personality traits. *Psychological Medicine* 2011; 41(5): 1051–1060.
- 24) MAOA, Sino Biological Inc., <http://www.sinobiological.com/MAOA-a-2938.html> (25. 11. 2013).
- 25) Bortolato M, Shih JC: Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *International Review of Neurobiology* 2011; 100: 13–42.
- 26) Štrukelj B: Metodologija in tehnike rekombinantne DNK. *Farmacevtski vestnik* 1996; 47: 127–138.
- 27) Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine, Slovensko Farmacevtsko Društvo, Ljubljana, 2007: 55-58.
- 28) Strachan T, Read A: *Human Molecular Genetics*, 4th edition, Taylor & Francis, New York, 2010: 182–189 in 241–242.
- 29) Day INM: *Molecular Genetic Epidemiology – A Laboratory Perspective*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2002; 112 – 113.
- 30) Monsen-Collar KJ, Dolcemascolo P: Using Molecular Techniques to Answer Ecological Questions. *Nature Education Knowledge* 2010; 3(10): 1.
- 31) Mackay IM: *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2007; 12–13.
- 32) Logan J, Edwards K, Saunders N: *Real-time PCR: Current Technology and Applications*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009: 26–33.
- 33) Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF: *Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing*. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(1): 165–256.
- 34) Komel R: Kako se izražajo geni pri višjih organizmih. *Proteus*; 60(5): 207–213.
- 35) Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
- 36) Fic A, Jurković Mlakar S, Juvan P, Mlakar V, Broberg K, Peterlin Mašič L: Članek v pripravi: Genome-wide gene expression profiling of low-dose, long-term exposure of

human osteosarcoma cells to bisphenol A and its analogs bisphenols AF and S. (29. 8. 2013).