

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ZALOKAR

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ZALOKAR

**DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI  
BISFENOLOV A, AF IN S in vitro**

**EVALUATION OF ESTROGENIC ACTIVITY OF  
BISPHENOLS A, AF AND S in vitro**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvomizr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svoji mentoriciizr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm. za vse strokovne nasvete in napotke pri izdelovanju diplomske naloge. Hvala tudi mladi raziskovalki Anji Fic, mag. farm. za vso pomoč in nasvete pri opravljanju praktičnega dela.*

*Zahvaljujem se tudi vsem članom družine, prijateljem in sošolcem za vso pomoč in podporo v času mojega študija.*

## **Izjava**

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

Katja Zalokar

Ljubljana, marec 2014

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

Članica diplomske komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	iv
ABSTRACT .....	v
SEZNAM OKRAJŠAV .....	vi
1. UVOD .....	1
1.1. HORMONSKI MOTILCI .....	1
1.1.1. Mehanizem delovanja hormonskih motilcev .....	2
1.1.2. Vrste hormonskih motilcev ter viri nahajanja .....	3
1.2. HORMONSKI SISTEM.....	4
1.2.1. Steroidni hormoni .....	6
1.2.2. Estrogenski sistem .....	6
1.2.3. Estrogenski receptorji .....	7
1.3. BISFENOL A .....	8
1.3.1. Fizikalno-kemijske lastnosti ter viri in uporaba .....	8
1.3.2. Opredelitev toksičnosti.....	9
1.3.3. Toksikokinetika in metabolizem.....	9
1.3.4. Toksikodinamika .....	11
1.4. BISFENOL AF .....	12
1.4.1. Fizikalno-kemijske lastnosti ter viri in uporaba .....	12
1.4.2. Toksikologija.....	13
1.5. BISFENOL S.....	14
1.5.1. Fizikalno-kemijske lastnosti ter viri in uporaba .....	14
1.5.2. Toksikologija.....	15
2. NAMEN DELA .....	16
3. MATERIALI IN METODE.....	17
3.1. TESTIRANE SPOJINE IN PRIPRAVA VZORCEV.....	17
3.1.1. Priprava vzorcev testiranih spojin za test citotoksičnosti MTS.....	18
3.1.2. Priprava vzorcev testiranih spojin za LUMI-CELL® ER metodo.....	18
3.2. CELIČNA LINIJA BG1Luc4E2.....	19
3.3. OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI .....	20
3.3.1. Odmrzovanje celic .....	22

3.3.2. Gojenje in presajanje celic.....	22
3.3.3. Štetje celic .....	24
3.3.4. Nasajanje celic.....	25
3.4. TEST CITOTOKSIČNOSTI MTS.....	25
3.4.1. MTS testiranje linearnega območja.....	26
3.4.2. MTS testiranje citotoksičnosti bisfenolov A, AF in S .....	27
3.5. OECD TESTI ZA ODKRIVANJE ENDOKRINE AKTIVNOSTI.....	27
3.6. LUMI-CELL® ER TESTNA METODA ZA DOLOČANJE AGONISTOV NA ESTROGENSKIH RECEPTORJIH .....	28
3.7. VREDNOTENJE REZULTATOV .....	32
3.7.1. Kriteriji za vrednotenje rezultatov pri LUMI-CELL® ER metodi .....	33
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	35
4.1. MTS TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	35
4.1.1. MTS testiranje linearnega območja.....	35
4.1.2. MTS testiranje citotoksičnosti bisfenolov A, AF in S .....	37
4.2. LUMI-CELL®ER TESTNA METODA.....	39
4.2.1. Range finder test.....	39
4.2.2. Comprehensive test.....	41
6. SKLEP.....	52
7. LITERATURA.....	53

## POVZETEK

Bisfenoli A, AF in S so kemikalije sinteznega izvora, ki se uporabljajo predvsem v industriji polikarbonatne plastike in epoksi smole. Zlasti bisfenol A je zelo razširjena kemikalija in sestavni del najrazličnejših tovrstnih izdelkov za vsakdanjo rabo. Relativno novejši kemikaliji, bisfenola AF in S, se zaradi ugodnejših lastnosti pri izdelavi plastike in zaradi omejevanja uporabe bisfenola A, vse pogosteje uporabljata kot njegov nadomestek. Že dolgo časa je znano, da bisfenol A deluje kot hormonski motilec in vpliva na normalno delovanje hormonskega sistema ljudi in živali. Največ podatkov govori o njegovem estrogenem delovanju z vezavo na jedrna receptorja ER- $\alpha$  in ER- $\beta$ , preko katerih izkazuje svoje učinke že v zelo nizkih koncentracijah. V primerjavi z bisfenolom A pa je vpliv in mehanizem delovanja bisfenolov AF in S na hormonski sistem veliko manj raziskan.

V diplomski nalogi smo želeli z uporabo OECD validirane *in vitro* testne metode LUMI-CELL<sup>®</sup> ER preučiti agonistično estrogeno aktivnost bisfenolov A, AF in S. Na začetku eksperimentalnega dela smo želeli preučiti tudi citotoksičnost izbranih bisfenolov, zato smo za ta namen uporabili metabolni test MTS, s katerim smo na celični liniji BG1Luc4E2 bisfenole testirali v treh različnih koncentracijah. Obenem smo testirali tudi območje linearnosti MTS testa in določili primerno koncentracijo celic BG1Luc4E2 za nasajanje testnih ploščic pri nadaljnjem MTS testiranju s to celično linijo. BG1Luc4E2 je celična linija človeških ovarijskih rakavih celic, ki endogeno izražajo estrogenske receptorje ER- $\alpha$  in ER- $\beta$  in katerim so s stabilno transfekcijo vnesli plazmid z estrogen-odzivnimi elementi in genom *luc* za encim kresničkina luciferaza. Ta se sintetizira pod vplivom estrogenov oz kemikalij z estrogenim delovanjem, ki se v kompleksu z ER vežejo na estrogen-odzivne elemente v plazmidu in delujejo kot transkripcijski faktorji za luciferazni encim. Slednje smo preučevali z LUMI-CELL<sup>®</sup> ER testno metodo, s katero smo nato pri necitotoksičnih koncentracijah na celični liniji BG1Luc4E2 določevali agonistično estrogeno aktivnost bisfenolov.

Rezultati MTS testa so pokazali, da je najbolj citotoksičen bisfenol AF, sledi mu bisfenol A in bisfenol S. Za necitotoksično koncentracijo smo za vse bisfenole določili 0,01 mg/mL. Rezultati LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metode so pokazali, da BPAF z izračunano EC<sub>50</sub> vrednostjo  $7,356 \times 10^{-8}$  M izkazuje najmočnejše agonistično estrogeno delovanje, z nekoliko šibkejšim delovanjem mu sledi BPA z EC<sub>50</sub> vrednostjo  $2,089 \times 10^{-7}$  M. Najmanjše estrogeno agonistično delovanje pa izkazuje BPS z EC<sub>50</sub> vrednostjo  $9,706 \times 10^{-7}$  M.

## ABSTRACT

Bisphenols A, AF and S are synthetic compounds which are primarily used in the polycarbonate plastics industry and epoxy resins. Especially bisphenol A is a very common industrial chemical and a component of a wide range of polycarbonate products used for everyday life. Relatively new chemicals, bisphenols AF and S, are being introduced as a chemical alternative to bisphenol A due to their positive characteristics in the production of polycarbonate plastics and because of stringent global bisphenol A production regulations. It is well known that bisphenol A is an endocrine disruptor and interferes with normal hormone and endocrine system function in people and animals. Most data suggests its estrogenic effect in interactions with nuclear receptors ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  even in very small dosages. On the contrary, very little is known about the functions of bisphenols AF and S and the effects they have on the endocrine system and hormones.

The main objective in our study was evaluation of cytotoxicity of bisphenols A, AF and S and also their evaluation of potential estrogen receptor agonist activity using *in vitro* methods. The metabolic MTS assay was used for cytotoxicity evaluation to test bisphenols in three different concentrations using BG1Luc4E2 cell line. The optimal number of BG1Luc4E2 cells per well that produces an assay signal in the linear range of the MTS assay was also determined. BG1Luc4E2 cell line is a human ovarian adenocarcinoma cell line that endogenously expresses ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  and was stably transfected with plasmid containing estrogen responsive elements and *luc* gene encoding luciferase enzyme. ER-mediated transcription of the *luc* gene results in the production of luciferase, the activity of which is quantified using a luminometer. OECD validated *in vitro* LUMI-CELL<sup>®</sup> ER test method was used to evaluate these estrogenic effects of bisphenols A, AF and S in non-cytotoxic concentrations.

The MTS assay results show that the most cytotoxic bisphenol is bisphenol AF, followed by bisphenol A and the least cytotoxic amongst them is bisphenol S. Non-cytotoxic concentration for all bisphenols was 0,01 mg/mL. The LUMI-CELL<sup>®</sup> ER test method results and determined EC<sub>50</sub> values were sufficient to confirm positive estrogenic activity of the bisphenols tested. According to our experimental results, BPAF (EC<sub>50</sub>=7,356x10<sup>-8</sup> M) is the most potent agonist for estrogen receptors (ER- $\alpha$  and - $\beta$ ), followed by BPA (EC<sub>50</sub>=2,089x10<sup>-7</sup> M) and BPS (EC<sub>50</sub>=9,706x10<sup>-7</sup> M).

## SEZNAM OKRAJŠAV

AhR	aril ogljikovodikov receptor
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPS	bisfenol S
CDC	ameriški center za nadzor nad nalezljivimi boleznimi
DES	dietilstilbestrol
DHT	dihidrotosteron
DMSO	dimetilsulfoksid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; fosfatni pufer
E2	17 $\beta$ -estradiol
EC <sub>50</sub>	koncentracija agonista, ki izzove učinek enak polovici maksimalnega učinka
EER $\gamma$	estrogenskemu receptorju podoben receptor gama
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane
EPA	ameriška Agencija za varstvo okolja
ER	estrogenski receptor
ERE	estrogen-odzivni element
FBS	fetalni goveji serum
FDA	ameriški Urad za živila in zdravila
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GnHR	gonadotropin sproščujoči hormon
GPR30	z G-proteinom skopljen estrogenski receptor 30
HM	hormonski motilec
HRE	hormonsko odzivni element
ICCVAM	Medresorski koordinacijski odbor za potrjevanje alternativnih metod (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)
LD <sub>50</sub>	letalni odmerek; t.j. odmerek (mg/kg telesne teže), ki povzroči smrt pri 50 % izpostavljenih osebkih
LOAEL	najnižji testni odmerek, pri katerem je opaziti neželeni učinek (mg/kg/dan)



NCI	ameriški Nacionalni inštitut za raka
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NICEATM	Medresorski center nacionalnega toksikološkega programa za potrjevanje alternativnih metod (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)
NOAEL	najvišji testni odmerek, pri katerem ni opaziti nobenega neželenega učinka (mg/kg/dan)
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PBB	polibromirani bifenili
PBDE	polibrominirani difenil etri
PC	polikarbonat
PCB	poliklorirani bifenili
POP	obstojna organska onesnaževala
PPAR $\gamma$	s peroksisomskim poliferatorjem aktivirani receptor gama
PVC	polivinil klorid
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TDI	dovoljen dnevni vnos
SERM	selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev
SSRI	selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

# 1. UVOD

## 1.1. HORMONSKI MOTILCI

Živimo v svetu, v katerem so kemikalije, ki jih je ustvaril človek, postale del našega vsakdana. Nekatero od teh kemikalij, ki jih imenujemo hormonski motilci (HM), imajo zmožnost vplivati na endokrini sistem in se vpletati v hormonsko regulirane procese pri ljudeh in živalih (1, 2). Poglavitni dokaz, ki nakazuje, da izpostavljenost kemikalijam iz okolja lahko vodi do motenj v delovanju endokrinega sistema, so zlasti spremembe, vidne pri številnih različnih vrstah divjih živali (3, 4).

Znanstvenica in raziskovalka Theo Colborn je v 80. letih prejšnjega stoletja preučevala zdravstveno stanje vretenčarjev, živečih v območju Great Lakes, ZDA. Njena analiza je potrdila prisotnost ponavljajočih se nezaželenih učinkov pri tamkaj živečih pticah in ribah, npr.: zmanjšana reprodukcija, problemi s ščitnico, spremenjeno obnašanje, spremembe metabolizma, itd. Med drugim je opazila, da so se opisani problemi pojavljali pri potomcih, kemikalijam izpostavljenih živali. Julija 1991 je v Wisconsinu (ZDA, Wingspread Conference Center) v okviru te tematike zbrala skupino 21 znanstvenikov. Soglasno so prišli do zaključkov, da veliko število v okolje spuščениh umetnih kemikalij in prav tako določene kemikalije naravnega izvora lahko potencialno motijo normalno delovanje endokrinega sistema ljudi in živali. Omenjena konferenca je postala mejnik, kjer se je izoblikoval izraz hormonski motilec in od takrat postal široko priznan in sprejet v znanstvenih krogih (5, 6).

Najjasnejši primer HM pri ljudeh je kemikalija dietilstilbestrol (DES), sintetični estrogen, ki so ga v obdobju 40. do 70. let prejšnjega stoletja predpisovali nosečnicam za preprečitev spontanih splavov. Kasneje so odkrili, da je pri otrocih mater, ki so v času nosečnosti jemale DES, prišlo do povečanih razvojnih abnormalnosti, in pri deklicah v času pubertete do razvoja nenavadne oblike vaginalnega raka, zato so zdravilo umaknili s tržišča (3).

HM je po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije eksogena snov ali zmes, ki spremeni funkcijo/-e endokrinega sistema in posledično povzroči nezaželene zdravstvene učinke pri organizmu, njegovih potomcih ali (sub)populacijah (1, 3). Ameriška agencija EPA nazorneje opisuje HM kot eksogene snovi, ki motijo sintezo, sproščanje, transport, metabolizem, vezavo, delovanje ter eliminacijo endogenih hormonov v telesu, ki so odgovorni za vzpostavljjanje in vzdrževanje homeostaze ter uravnavanje razvojnih procesov (7).

### 1.1.1. Mehanizem delovanja hormonskih motilcev

V splošnem sta dve poti, preko katerih lahko kemikalija deluje kot HM: direktno delovanje kot agonist/antagonist na hormonski receptorski kompleks ali posredno na specifični protein, ki kontrolira prenos hormonov do tarčnega mesta (npr. prenašalni protein - kortizol vezavni protein). Hormonski receptorji imajo veliko afiniteto do svojih naravnih ligandov, vendar običajno precej manjšo afiniteto do HM. Kljub temu afiniteta vezave HM na receptor ni vedno ekvivalentna njegovi jakosti delovanja (1). V največji meri se HM vežejo na družino jedrnih receptorjev: steroidni estrogenski, androgenski, progesteronski, glukokortikoidni, mineralkortikoidni, tiroidni in retinoidni X receptor. Lahko pa delujejo tudi preko drugih mehanizmov, kot je npr. interakcija z receptorjema PPAR $\gamma$  in AhR. Slednji je vpleten tudi v metabolizem številnih ksenobiotikov. Poleg jedrnih se HM vežejo tudi na steroidne nejedrne (npr. membranske) ter nesteroidne receptorje (npr. serotoninске, dopaminske in noradrenalske), lahko pa delujejo tudi na več receptorjev hkrati (2, 8).

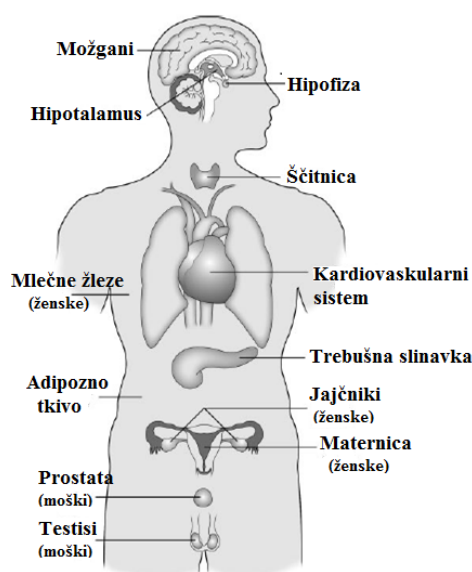
Farmakokinetični model, s katerim opišemo delovanje HM, je podobno kot pri hormonih nelinearna krivulja odmerka-odziv. Krivulja lahko zavzame različne oblike z najpreprostejšo sigmoidno, ki nakazuje nasičenost receptorjev pri določeni koncentraciji liganda. Obenem lahko HM, podobno kot hormoni in živčni prenašalci, ustvarijo nemonotonične krivulje, pri katerih se predznak naklona krivulje spreminja z odmerkom. Največkrat so krivulje v obliki črke U oz. obrnjene črke U (bifazne) ter multifazne krivulje, kar ponazarja, da lahko pri različnih koncentracijah opazimo nasprotnе učinke (8, 9).

Pomembna je tudi hipoteza o učinkovanju HM v območju nizkih koncentracij ( $\mu\text{mol} - \text{pmol}$ ), kjer lahko nizki odmerki povzročijo dejansko večji učinek kot visoki. Podobno kot hormoni se tudi HM vežejo z visoko afiniteto na specifične receptorje, hkrati pa je razmerje med koncentracijo HM in zasedenostjo receptorjev nelinearno. To pomeni, da lahko v območju nizkih koncentracij HM povzročijo večje spremembe v zasedenosti receptorjev, in obratno v območju visokih. Prav tako je nelinearno razmerje med zasedenostjo receptorjev in biološkim učinkom. Zaradi tega lahko tudi majhne spremembe v območju nizkih koncentracij povzročijo velik odziv oz. biološki učinek (9, 10).

Eden izmed pomembnejših dejavnikov je zlasti obdobje izpostavljanja HM. Slednji lahko delujejo in vplivajo skozi celotno življenje preko istih poti kot hormoni. Predvsem obdobje embrionalnega razvoja in fetalno obdobje pa sta najbolj občutljiva na vplive HM, saj lahko vplivajo na celično programiranje in razvoj tkiva z največkrat trajnimi učinki. Posledica je

lahko spremenjena nagnjenost tkiva za določeno bolezen, ki pa se najpogosteje izrazi šele kasneje v življenju. Obenem za učinek v času razvoja zadostuje nižji odmerek HM kot v odrasli dobi, kjer je njegov učinek lahko drugačen in zgolj prehodni (1, 11). Večina okoljskih kemikalij in HM sicer ne zmore spremeniti DNK zaporedja oz. povzročiti genetskih mutacij. Lahko pa vplivajo na spremembe epigenoma (DNK metilacija in acetilacija histonov), ki se, če delujejo na kritično časovno okno zgodnjega razvojnega obdobja in vplivajo na zarodne celice, lahko prenesejo na naslednje generacije. Nasprotno pa se epigenetske spremembe somatskih celic izrazijo pri posamezniku, vendar se ne prenesejo na nadaljnje rodove (11, 12).

Študije na populacijah divjih živali, laboratorijske *in vitro/in vivo* ter epidemiološke študije nakazujejo na povezavo med HM in določenimi neželenimi učinki. Slednji naj bi vplivali na različne organske sisteme (Slika 1): ženski in moški reprodukivni sistem, prezgodnji začetek pubertete, menopavzo, endometriozo, sindrom policističnih jajčnikov, (ne)plodnost, zmanjšano kakovost semenčic, probleme, povezane s ščitnico, nevro-endokrinološke motnje, metabolizem, debelost, diabetes, kardiovaskularna obolenja ter delovanje imunskega sistema. Povzročali naj bi tudi večjo incidenco hormonsko povezanih rakavih obolenj, kot so rak dojke, jajčnikov, maternice, mod, prostate, ščitnice. Potrebna so še nadaljnja testiranja in epidemiološke študije, ki bi dokazali neposredno povezavo med HM in učinki, ki naj bi jih povzročali. Vseeno trenutni podatki zadoščajo za opredelitev, da HM predstavljajo zdravstveni problem sodobne družbe (1, 8, 13, 14).



**Slika 1:** Organski sistemi, na katere delujejo hormonski motilci (8).

### 1.1.2. Vrste hormonskih motilcev ter viri nahajanja

Znanih je na stotine sinteznih in naravnih spojin, za katere vemo ali pa sumimo, da lahko interagirajo z endokrinim sistemom ljudi in živali. Skupina sinteznih HM je heterogena in sestavljena iz kemikalij, ki se uporabljajo npr. kot industrijska topila/lubrikanti in njihovi

stranski produkti (PCB, PBB), sestavni del plastike (BPA), plastifikatorji (ftalati), zaviralci gorenja (PBDE), pesticidi (metoksiklor, DDT, atrazin, klorpirifos), fungicidi (vinklozolin), farmacevtske spojine (DES). Kot HM se obnašajo tudi nekatere naravne spojine, ki jih najdemo v hrani, npr. fitoestrogeni (izoflavoni, kumestani). Skupina HM je raznolika in med njimi ni očitne strukturne podobnosti, ima pa večina majhno molekulsko maso (<1000 Da) in so lipofilne narave. Pogosto imajo fenolni del, ki naj bi oponašal naravne steroidne hormone in omogočil interakcijo s hormonskimi receptorji kot agonisti oz. antagonisti. Nekateri HM (dioksini, PCB, PBB in pesticidi) so pogosto substituirani s halogensko skupino, klorom ali bromom. Kot HM pa lahko delujejo tudi težke kovine in nekovine s pripadajočimi estrogenskimi lastnostmi (arzenik, kadmij, svinec, metil živo srebro) (1, 8). HM se nahajajo v vodi, zemlji in atmosferi. Najdemo jih v različnih materialih (embalaža), izdelkih (elektronika, pohištvo, oblačila), izdelkih za osebno nego (kozmetika, mila, šamponi), zdravilih (kontraceptivi, SSRI) in tudi v prašnih delcih v stanovanju. Na delovanje endokrinega sistema vplivajo v svoji prvotni obliki ali se v organizmu v procesu metabolizma presnovijo v aktivno obliko. Nekateri so zelo obstojni v okolju (dolga razpolovna doba) in sposobni bioakumulacije ter se preko prehranjevalne verige kopičijo do visokih koncentracij v ljudeh in živalih (obstojna organska onesnaževala - POP). Lahko se prenesejo tudi na razvijajoči zarodek preko placente oz. na novorojenčka z dojenjem. Drugi niso tako obstojni v okolju in se ne bioakumulirajo v organizmu (policiklični aromatski ogljikovodiki, halogenirani/nehalogenirani fenoli, plastifikatorji), vendar kljub temu predstavljajo tveganje, saj smo nekaterim izmed njih kronično izpostavljeni vsak dan preko različnih poti. Pomembno je tudi dejstvo, da običajno nismo izpostavljeni zgolj eni kemikaliji, ampak več različnim, katerih učinek je lahko aditiven ali pa sinergističen (1, 8).

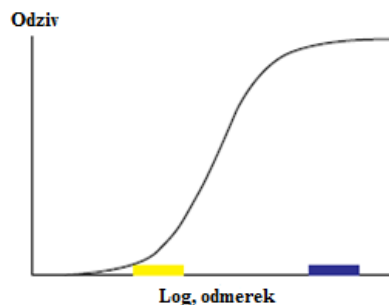
## 1.2. HORMONSKI SISTEM

Hormonski sistem oz. endokrini sistem sestavljajo endokrine žleze, ki sintetizirajo in izločajo hormone, ki se vežejo na specifične celične receptorje v tarčnih tkivih in organih ter na ta način uravnavajo številne fiziološke procese v telesu (15). Hormonski sistem v povezavi z živčnim vzdržuje dinamično ravnovesje telesa, prilagajanje na zunanje okolje, razmnoževanje, rast in razvoj ter proizvodnjo, porabo in shranjevanje energije (16). Biokemijsko gledano poznamo tri glavne skupine hormonov: proteini oz. polipeptidi, steroidi in derivati aminokislone tirozin. Endokrine žleze pod vplivom specifičnega

dražljaja sintetizirajo in sproščajo hormone v krvni obtok, s katerim nato potujejo po celotnem telesu in delujejo kot kemijski prenašalci. Čeprav dosežejo vse predele telesa, se na specifične hormone odzovejo zgolj tarčne celice, ki na svoji površini ali v notranjosti izražajo ustrezne receptorje za vezavo. Na receptor se hormoni vežejo na enak način, kot se ključ prilega v ključavnico. Po vezavi se sporočilo, ki ga nosi hormon, z zaporedjem reakcij prevede v celični odziv. Aktivirani kompleks hormon-receptor preko različnih signalnih poti vpliva na delovanje ali sintezo celičnega/-ih že obstoječega/-ih proteina/-ov oz. aktivira specifične gene za izdelavo novega/-ih proteina/-ov (15, 16, 17).

Večina endokrinega sistema je urejena v t. i. endokrine osi, kjer vsako os sestavlja hipotalamus, hipofiza in periferna endokrini žleza. Prvo stopnjo predstavlja hipotalamus, ki povezuje živčni in endokrini sistem ter izloča sproščujoče hormone, ki vplivajo na sintezo in sproščanje tropnih hormonov hipofize. Slednji delujejo na periferno endokrino žlezo ter stimulirajo sintezo in izločanje žlezni hormonov, ki se nato vežejo na tarčne celice in tkiva (17). Ključni mehanizem, ki uravnava takšno delovanje endokrinega sistema, je povratna zanka (negativna/pozitivna), ki skrbi, da so plazemske vrednosti hormonov natančno kontrolirane (18).

Večina hormonov je v krvi prisotnih v izredno nizkih koncentracijah, od 1 pg/mL do največ 1 µg/mL. Delno zato, ker se vežejo na tarčne receptorje z visoko afiniteto in lahko že zelo nizke koncentracije hormona izzovejo ustrezen biološki odgovor. Za delovanje hormonov je značilna tudi sigmoidna krivulja odmerka-odziv. Tako lahko iste spremembe v koncentraciji hormona v začetnem delu krivulje (rumeni kvadrata, slika 2) ustvarijo večje razlike v biološkem učinku kot iste koncentracijske spremembe (modri kvadrata, slika 2) pri višji koncentraciji hormona, v končnem delu krivulje (1, 18).



Slika 2: Sigmoidna krivulja (1).

Hormoni delujejo skozi celotno življenje, kljub temu pa je časovni okvir pomembna determinanta njihovega delovanja. V odrasli dobi hormoni izkazujejo učinke, ki so najpogosteje prehodne narave. Nasprotno pa so v zgodnjem razvojnem obdobju njihovi učinki največkrat trajni, saj vplivajo na diferenciacijo in proliferacijo tkiv in sodelujejo v procesih programiranja (1). Tako lahko npr. že manjše spremembe v delovanju estrogenov v fetalnem obdobju spremenijo reproduktivno os in zmanjšajo plodnost (19, 20).

### 1.2.1. Steroidni hormoni

Skupina steroidnih hormonov zajema: **estrogene, progestine, androgene, mineralkortikoide, glukokortikoide** in **aktivni metabolit vitamina D**. Vsi so sestavljeni iz osnovnega ciklopentano-perihidro-fenantrenskega skeleta, med seboj pa se razlikujejo po številu in položaju dvojnih vezi ter različnih funkcionalnih skupinah, pripetih na osnovni skelet. Skoraj vsi biološko aktivni steroidi imajo obliko holestana. Kljub podobnostim v kemijski strukturi in stereo-kemijskim lastnostim vsak izmed predstavnikov steroidov predstavlja edinstveno in izrazito drugačno biološko delovanje (21).

Strukturno so zelo podobni holesterolu, skupnemu prekurzorju, iz katerega se običajno biosintetizirajo. V celicah, ki sintetizirajo steroidne hormone, so ti shranjeni v zelo majhnih količinah. Kljub temu se zadostne količine holesterolnih estrov, shranjenih v celičnih vakuolah v citoplazmi, lahko hitro pretvorijo v steroidne hormone, ko je to potrebno. Pomembna je tudi periferna medsebojna pretvorba aktivnih steroidnih hormonov (17, 18).

V telesu so steroidni hormoni prisotni v izredno nizkih koncentracijah (od 0,1–1,0 nM). So lipofilni, zato v krvi potujejo vezani na prenašalne proteine in nato v prosti obliki z difuzijo zlahka prehajajo skozi celično membrano tarčnih celic. Z visoko afiniteto se vežejo na znotrajcelične receptorje v citoplazmi ali jedru tarčnih celic, kjer z gensko ekspresijo vplivajo na biosintezo proteinov. Receptorski kompleks z vezanim steroidom deluje kot transkripcijski faktor, ki se veže na specifično mesto na DNK, t. i. hormonsko odzivno mesto (HRE), in povzroči biološki odziv (21).

### 1.2.2. Estrogenski sistem

Estrogenski sistem sestavljajo endokrine žleze, ki izločajo steroidne hormone estrogene. Uvrščamo jih v skupino spolnih hormonov, v katero vključujemo še progestine in androgene. Potrebni so predvsem za reprodukcijo in razvoj sekundarnih spolnih znakov in so prisotni pri obeh spolih. Naravni estrogeni so C<sub>18</sub> steroidi in so sestavljeni iz aromatskega obroča A s hidroksilno skupino na mestu 3. Estrogeni so pri ženskah prisotni v treh oblikah. Največjo jakost delovanja ima **β-estradiol**, ki predstavlja 10–20 % cirkulirajočih estrogenov. Druga oblika je **estron**, nekoliko šibkejši od estradiola in predstavlja 60–80 % cirkulirajočih estrogenov. Ostalih 10–20 % cirkulirajočih estrogenov pa predstavlja **estriol**, zelo šibek estrogen (21).

Biosinteza estrogenov pri predmenopavzalnih ženskah poteka v ovarijih v dozorevajočem dominantnem foliklu in rumenem telescu, med nosečnostjo pa v placenti. Sintetizirajo se pod vplivom gonadotropnega hormona FSH, ki ga izloča adenohipofiza, to pa predhodno stimulira hipotalamus s hormonom GnHR. V času otroštva se estrogeni skorajda ne izločajo, v puberteti pa pod vplivom gonadotropnih hormonov njihova vrednost naraste za 20-krat ali več.  $\beta$ -Estradiol je glavni estrogen, ki ga sintetizirajo ovariji in čigar estrogena aktivnost je 12-krat večja od estrona in 80-krat večja od estriola. Po krvi estrogeni potujejo vezani na albumin in specifične estrogen-vezavne globuline. Njihov metabolizem poteka v jetrih, kjer se konjugirajo in izločijo z žolčem ter večinoma z urinom (18).

Primarna funkcija estrogenov je vpliv na celično proliferacijo in razvoj spolnih organov ter drugih tkiv, povezanih z reprodukcijo. Prav tako vplivajo na razvoj sekundarnih spolnih znakov pri ženskah in stimulirajo razvoj mlečnih žlez med nosečnostjo. Med drugim inhibirajo aktivnost osteoklastov in tako spodbujajo rast kosti. Po menopavzi jajčniki skoraj ne izločajo več estrogenov, kar lahko privede do začetka nastanka osteoporoze. Vplivajo tudi na rahlo povišanje stopnje metabolizma, delež maščobnega tkiva in teksturo kože, ki je pri ženskah bolj mehka in gladka (18).

### 1.2.3. Estrogenski receptorji

Biološka tarča, preko katere estrogeni posredujejo svoje učinke, so estrogenski receptorji (ER). Najpomembnejša sta ER- $\alpha$  in ER- $\beta$ , ki spadata v družino jedrnih receptorjev, t. i. z ligandom aktivirani transkripcijski faktorji. Imata skoraj identično DNK-vezavno mesto (96 % homologija), vendar le okoli 60 % homologijo C-terminalne ligand vezavne domene. Njuna ekspresija in tkivna razporeditev je neenakomerna, razlikujeta se tudi po fizioloških učinkih. ER- $\alpha$  je prevladujoč v ženskem reproduktivnem traktu, jetrih in mlečnih žlezah, ER- $\beta$  pa se pretežno nahaja v vaskularnem endoteliju celic, kosteh, jajčnikih, tkivu prostate ter v tkivu živčnega, kardiovaskularnega, GIT in imunskega sistema (21, 22).

Estrogeni svoje učinke posredujejo večinoma preko genomskih mehanizmov z vezavo na jedrna receptorja ER- $\alpha$  in ER- $\beta$ , ki se v nevezanem stanju nahajata v celičnem citosolu in tudi v jedru. Največjo afiniteto vezave ima  $17\beta$ -estradiol (glej Preglednica I). Po vezavi se receptorski protein fosforilira, spremeni se njegova konformacija in ustvari se homo- ali heterodimer (ER- $\alpha/\alpha$  ali  $\beta/\beta$  ali  $\alpha/\beta$ ). Dimerni receptorski kompleks nato potuje iz citosola



do celičnega jedra, kjer se poveže s specifičnimi estrogen-odzivnimi elementi (ERE) na DNK in tako vpliva na izražanje tarčnih genov. Pri transkripciji sodelujejo številni proteini in koaktivatorji, npr. CoA (21).

**Preglednica I:** relativna afiniteta vezave endogenih estrogenov (21).

Estrogen	Afiniteta vezave na ER- $\alpha$ (%)	Afiniteta vezave na ER- $\beta$ (%)
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	100	100
<b>Estron</b>	60	37
<b>Estriol</b>	14	21

Poleg klasičnih jedrnih receptorjev ER- $\alpha$  in ER- $\beta$ , ki sta odgovorna za genomsko posredovan odziv, se znotraj celične membrane nahajajo t. i. membranski receptorji. Tak je GPR30/GEPR receptor, ki je za razliko od jedrnih sklopljen z G proteinom in s kaskado znotrajceličnih signalov sproži takojšen negenomski odziv. V membrani pa se nahajata tudi ekstranuklearna receptorja ER- $\alpha$  in ER- $\beta$ , ki delujeta preko negenomskih mehanizmov in sta prav tako odgovorna za takojšen estrogenski odziv (23).

### 1.3. BISFENOL A

#### 1.3.1. Fizikalno-kemijske lastnosti ter viri in uporaba

Bisfenol A (BPA) s kemijskim imenom (2,2-bis(4-hidroksifenil)propan, molekulsko formulo  $C_{15}H_{16}O_2$  in maso 228, 29 g/mol je po izgledu bež kristaliničen prašek s tališčem pri 158–159 °C in vreliščem pri 220 °C; LD<sub>50</sub> na podganah je 2000–5000 mg/kg (24).

Bisfenol A (BPA) in analogi (bisfenol AF, F, Z, S, itd.) so organske spojine, ki jih kemijsko imenujemo difenilmetani. Vsebujejo dva benzenova obroča, ki sta ločena z enim centralnim ogljikovim atomom. Običajno imajo na para mestu vezano hidroksilno skupino na obeh benzenovih obročih (25). BPA se pripravi s kombinacijo dveh ekvivalentov fenola in enega ekvivalenta acetona. Prvi ga je sintetiziral ruski kemik A.P. Dianin leta 1891 (26). Kot primarna komponenta se uporablja v industriji proizvodnje polikarbonatne plastike (PC), iz katere izdelujejo najrazličnejše izdelke: plastenke za vodo, plastenke za dojenčke, plastične vsebnike za hrano, posode za uporabo v mikrovalovni pečici, za uporabo v zobozdravstvu, medicinski pripomočki, itd. BPA je pomembna komponenta tudi v proizvodnji epoksi smole, ki služi kot zaščitni sloj v notranjosti konzerv in pločevink ter premaz na kovinskih pokrovcih za zapiranje steklenic in kozarcev. V določenem obsegu dodajajo derivate BPA tudi PVC plastiki. Več kot 95 % proizvedenega BPA v svetu je bilo leta 2009 namenjenega za proizvodnjo polikarbonatne plastike in epoksi smole (27, 28).

### 1.3.2. Opredelitev toksičnosti

Današnja svetovna proizvodnja BPA znaša več kot 3,5 milijard kg/leto ter s tem predstavlja zelo velik trg, ki naj bi v prihodnjih letih še naraščal. Vprašanja o toksičnosti BPA so bila tako vedno razpeta med ekonomski, politični in znanstveni svet (6, 29).

Kanada je leta 2008 kot prva država BPA uradno označila za nevarnega in začela razmišljati o omejitvah in prepovedi prodaje ter uvoza plastenk za dojenčke, ki vsebujejo BPA. Marca 2010 je predlagano prepoved tudi uradno uvedla in BPA uvrstila na seznam toksičnih snovi (30, 31). Evropska komisija je naslednje leto uvedla prepoved uporabe BPA v izdelavi polikarbonatnih plastenk za dojenčke (32). FDA je podobno storila leta 2012 (33). Trenutno stališče Kanade glede varnosti BPA in njegovemu izpostavljanju ljudi prek hrane je, da ta ne oz. naj ne bi predstavljal tveganja za zdravje splošne populacije, vključujoč novorojence in majhne otroke (34). Tudi po najnovejših ocenah ameriške agencije FDA je BPA v zelo majhnih vrednostih, pri katerih se pojavlja v določeni hrani, varen (35). Evropska Unija in agencija EFSA dovoljujeta uporabo BPA v materialih za shranjevanje hrane v okviru Regulative 10/2011/EU za plastične materiale in delce, ki lahko pridejo v stik s hrano (32).

Leta 1977 je ameriška agencija NCI izvedla prvo študijo karcinogenosti BPA. V okviru dveletne študije na odraslih glodavcih so določili LOAEL vrednost 50 mg/kg telesne teže/dan. Ameriška agencija EPA pa je leta 1988 postavila prvi varnostni standard za BPA z določeno referenčno vrednostjo 50 µg/kg telesne teže/dan, katerega je privzela tudi FDA (6). Isti varnostni standard ostaja veljaven tudi sedaj, navkljub novim dejstvom o BPA, kot so nemonotonične krivulje in učinkovanje pri nizkih koncentracijah (29).

Evropska unija je leta 2002 za BPA določila splošno NOAEL vrednost 5 mg/kg telesne teže/dan in začasno vrednost TDI 0,01 mg/kg telesne teže/dan. Leta 2006 je EFSA določila novo TDI vrednost 0,05 mg/kg telesne teže/dan in izračunala, da je dnevni vnos BPA s hrano in pijačo za odrasle, otroke in dojenčke precej pod TDI (32, 36).

### 1.3.3. Toksikokinetika in metabolizem

Po peroralnem zaužitju se BPA dobro absorbira iz GIT, kar je skladno z njegovo topnostjo v vodi (0,5–1,3 mmol/L) in lipofilnostjo ( $P_{\text{(oktanol/voda)}} = 2,2\text{--}3,4$ .) Absolutna biološka uporabnost BPA po peroralni aplikaciji pri primatih je 0,9–1,9 %, pri podganah pa 2,8 % (28). Poglavitni metabolizem BPA se odvija v jetrih, ki s pomočjo jetrnih encimov UDP-

glukuroniltransferaz in mehanizmom konjugacije z glukuronsko kislino omogočajo pretvorbo v glavni metabolit BPA pri ljudeh - konjugiran BPA (mono)glukuronid (26, 37). Pretvorba s konjugacijo je pomembna, saj se konjugiran BPA za razliko od aglikonske oblike BPA ne more vezati na ER in delovati kot HM (38, 39). Izmed vseh izoformnih oblik družine UDP encimov ima največjo vlogo pri glukuronidaciji BPA encim UGT2B15 (40). BPA se v jetrih z encimom sulfottransferaza konjugira tudi do BPA sulfata, kar prav tako povzroči odsotnost estrogene aktivnosti (41). Kljub temu je pri ljudeh delež BPA-sulfata (9 %) občutno nižji od glukuronida (91 %), nekoliko večji delež sulfata (20 %) je pri podganah in opicah (42). Farmakokinetične študije kažejo, da se BPA konjugira tudi v drugih organskih sistemih. Pri ljudeh tudi v črevesju in ledvicah, vseeno pa jetra ostajajo poglavitno mesto metabolizma (26, 43). Po glukuronidaciji v jetrih se BPA glukuronid pri ljudeh izloča skozi ledvica z urinom s  $t_{1/2} < 6\text{h}$  (37). Pri glodavcih je metabolizem nekoliko drugačen, saj se glukuronid v veliki meri veže na plazemske proteine in izloča v žolč. Podvržen enterohepatični cirkulaciji se iz črevesja reabsorbira v krvni obtok zopet v prosti obliki. Cikel se lahko nekajkrat ponovi, preden se BPA dokončno izloči, večinoma z blatom tudi nekaj dni pozneje. Zaradi počasne eliminacije so glodavci tako dlje časa izpostavljeni povišani vrednosti proste, estrogenske oblike BPA (28, 38).

Študije navajajo, da BPA lahko prehaja človeško placento (6). Ontogeneza UDP-glukuroniltransferaz pa je kasnejša in sposobnost glukuronidacije pri zarodku in novorojenčku je tako manjša kot pri odraslih. Obenem razvojne študije kažejo na zgodnjo ontogenezo glukuronidaz (dekonjugacija), z visoko aktivnostjo encimov v placenti in tkivu zarodka, kar kaže na večjo izpostavljenost zarodka prosti obliki BPA (44).

Pri ljudeh velja zaužitje s hrano in pijačo za najpomembnejšo obliko izpostavljanja BPA. Študija, izvedena na podlagi NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) podatkov, pa navaja, da postenje ne vpliva na padec BPA vrednosti v urinu in tako namiguje, da peroralno zaužitje BPA s hrano ali pijačo ni glavni način izpostavljanja pri ljudeh in da se BPA lahko akumulira v telesu, npr. v maščobnem tkivu (45).

Raziskovalna skupina Volkel et al. je na ljudeh proučevala metabolizem nizkega odmerka d-16 BPA. Študijo so izvedli na treh zdravih ženskah in moških. Vsakemu so peroralno aplicirali 5 mg d-16 BPA. Zbirali so vzorce urina in krvi in kot edini metabolit so identificirali d-16 BPA glukuronid. Koncentracije prostega d-16 BPA so bile pod limitama detekcije tako v urinu (6 nM) kot v krvi (10 nM). Razpolovni čas ledvičnega očistka d-16 BPA iz krvi je bil 5,3 h ter razpolovni čas eliminacije z urinom 5,4 h. Njihovi rezultati

kažejo na praktično popolno presnovo prostega BPA v glukuronid in izločanje slednjega z urinom (37). V podobni študiji raziskovalne skupine Volkel et al. iz leta 2005, v kateri so trem zdravim moškim in ženskam peroralno aplicirali 25 µg BPA/osebo, so 5 h po peroralnem odmerku pri ženskah v urinu izmerili 75 % apliciranega odmerka v obliki konjugiranega BPA, pri moških pa 85 %. (46). Raziskovalna skupina Vanderberg et al. pa je po pregledu več kot 80 različnih biomonitring študij prišla do zaključkov, ki podpirajo hipotezo, da jetrni metabolizem BPA po peroralni aplikaciji ni 100 %, saj so v mnogih študijah v vzorcih krvi in urina zasledili nekonjugirano obliko BPA. Obenem kritično ocenjujejo predhodni študiji Volkel et al., ki naj bi imeli signifikantne pomanjkljivosti in sta zato nezanesljivi (47). Študije izpostavljanja ljudi BPA so omejene zaradi etičnih razlogov in težav pri iskanju posameznikov, popolnoma neizpostavljenih BPA iz okolja. Zato med drugim pri ljudeh nimamo na voljo nobenih *in vivo* podatkov o hitrosti, s katero se nekonjugiran BPA pretvori v glukuronid, ampak zgolj predvidevanja (48).

#### 1.3.4. Toksikodinamika

Edward Charles Dodds je v tridesetih letih prejšnjega stoletja na Univerzi v Londonu prvi identificiral estrogene lastnosti BPA (6). Kljub temu je uporabo BPA v farmakološke namene nadomestila strukturno podobna, sintetična učinkovina dietilstilbestrol (DES) z veliko močnejšim estrogenim delovanjem (49). Delovanje BPA v telesu je raznovrstno in kompleksno. Izkazuje številne tkivno specifične učinke, ki so odvisni tako od obdobja izpostavljanja kot tudi od odmerka (29). BPA je ksenoestrogen z agonističnim delovanjem na ER. S svojima dvema benzenovima obročema in (4,4')-OH skupinama se prilega v aktivno vezavno mesto estrogenskega receptorja in se veže na ER- $\alpha$  in ER- $\beta$ , na  $\beta$  z 10-krat večjo afiniteto kot na  $\alpha$  (26). Sprva so BPA smatrali kot šibek okoljski estrogen, katerega afiniteta vezave na klasični jedrni receptor ER- $\alpha$  in ER- $\beta$  je 1000 do 10.000-krat manjša od estradiola (50). Vseeno pa lahko izzove nekatere celične odzive pri zelo nizkih koncentracijah (pmol do nmol), kar je pod mejo potrebne koncentracije za aktivacijo jedrnih ER (51). V nekaterih primerih je estrogeno delovanje BPA po jakosti celo primerljivo z estradiolom. Obenem naj bi imeli nekateri njegovi metaboliti večjo jakost estrogenega delovanja kot sam BPA. BPA z aktivnim mestom klasičnega ER interagira na drugačen način kot estradiol (29). Po vezavi sproži drugačen transkripcijski odziv (28), oz. povzroči svojstveno konformacijo ER. Nekateri omenjajo njegovo delovanje predvsem kot

selektivni modulator estrogenskih receptorjev (SERM) s tkivno in vrstno specifičnimi učinki (52, 53). V nekaterih celicah naj bi tako na ER- $\beta$  izkazoval estradiolu podobno agonistično aktivnost, na ER- $\alpha$  pa mešano agonistično/antagonistično aktivnost (50).

Poleg klasičnih ER se BPA veže tudi na neklasične membranske estrogenske receptorje in z G-proteinom sklopljen receptor (GPR30) ter deluje preko negenomskih poti (26, 52). Študije poročajo tudi o vezavi na estrogenskemu receptorju podoben receptor gama (ERR $\gamma$ ), na katerega naj bi se vezal z 80-krat večjo afiniteto kot na ER- $\alpha$ . ERR $\gamma$  je prisoten v razvijajočem zarodku in novorojenčku in bi zato lahko bil odgovoren za delovanje BPA v času razvoja. ERR $\gamma$  se precej izraža tudi v placenti, kjer naj bi pospeševal akumulacijo BPA in omogočal večje izpostavljanje zarodka kemikaliji (51, 54). Endokrino delovanje BPA zajema interakcijo tudi z drugimi receptorji. Kot antagonist se vpleta v tiroidne hormonske poti ter izpodriva T3 (tiroksin) iz vezavnih mest. Vseeno je njegova afiniteta do tiroidnega receptorja manjša od afinitete do ER. Halogenirani derivati BPA pa naj bi izkazovali večjo kompetitivnost v vezavi na tiroidni receptor kot BPA (51, 52). BPA inducira tudi ekspresijo genov, ki so vpleteni v sintezo tiroidnih hormonov in proliferacijo tiroidnih celic (55). Podatki nedavne *in silico* študije pa nakazujejo na možno vezavo BPA kot agonista tudi na glukokortikoidne receptorje (29). Kot antagonist se med drugim veže na androgenske receptorje. BPA povzroča tudi zmanjšanje aktivnosti encima aromataze, ki je ključen pri sintezi steroidnih hormonov, saj omogoča irreverzibilno pretvorbo androgenov v estrogene. S tem in z antagonizmom na androgenskih receptorjih, kar povzroča zmanjšano transkripcijo encima aromataze, vpliva na zmanjšano endogeno produkcijo estradiola. V tej smeri BPA torej posredno deluje tudi kot antiestrogen (51).

Izpostavljanje BPA zlasti v času razvoja ima lahko vplive tudi na epigenetske spremembe. Več *in vivo* študij je prikazalo spremembo v DNA metilaciji, ki je sledila izpostavljanju BPA v zgodnjem obdobju (v nosečnosti). Vseeno so na tem področju potrebne nadaljnje študije, ki bodo natančno določile mehanizme, po katerih BPA spreminja epigenom (29).

## 1.4. BISFENOL AF

### 1.4.1. Fizikalno-kemijske lastnosti ter viri in uporaba

Bisfenol AF (BPAF) je kemijsko 4,4'-(heksafluoroizopropiliden) difenol z molekulske formulo  $(CF_3)_2C(C_6H_4OH)_2$  in maso 336,23 g/mol. Po izgledu je bež prah s tališčem pri

160–163 °C (56). Akutna toksičnost po oralnem zaužitju je pri podganah (LD<sub>50</sub>) 3400 mg/kg (57).

BPAF (t. i. heksafluoro bisfenol A) je homolog BPA oz. njegov fluoriniran derivat. Strukturno se razlikuje v dveh trifluormetilnih skupinah (-CF<sub>3</sub>), pripetih na ogljik, ki povezuje oba fenilna obroča. Slednja je v primerjavi z metilno skupino pri BPA veliko bolj elektronegativna in reaktivna ter s tem potencialno bolj nevarna za zdravje ljudi in živali (58, 59). Tako kot BPA se tudi BPAF uporablja pri proizvodnji polikarbonatnih smol in predstavlja nadomestno kemikalijo za BPA (60). Polimeri, kot so polikarbonatni kopolimeri, poliimidi, poliamidi in poliestri, ki vsebujejo monomer BPAF, so namenjeni za uporabo, kjer se zahteva večja termična in mehanska odpornost. Omenjene lastnosti so v primerjavi z BPA izboljšane predvsem zaradi trifluorometilne skupine CF<sub>3</sub> (59).

Najdemo ga v pripomočkih za shranjevanje in predelavo hrane, optičnih vlaknih, elektronskih napravah, itd. Še posebej pa se uporablja kot »crosslinking« reagent v proizvodnji fluoropolimerov in fluoroelastomerov ter kot monomer v proizvodnji različnih polimerov (58, 61). Industrijska proizvodnja BPAF se povečuje (v ZDA ocenjujejo 4.500–225.000 kg/leto), vendar pa kljub temu še vedno primanjkuje podatkov o njegovih toksikoloških učinkih, prisotnosti v okolju in izpostavljenosti ter vplivu na okolje in ljudi (61, 59). Lahko pa predvidevamo, da je tudi izpostavljanje nizkim odmerkom nevarno zdravju, predvsem zaradi njegove dolge razpolovne dobe, bioakumulativnih lastnosti in reaktivne skupine CF<sub>3</sub> (60).

#### 1.4.2. Toksikologija

Akutna toksičnost peroralno vnesenega BPAF, testirana na laboratorijskih živalih, je majhna (62). Kljub temu lahko predstavlja visok potencial kot HM preko vezave na hormonske receptorje. *In vitro* testi navajajo, da se BPAF veže na ER- $\alpha$  približno 20-krat in na ER- $\beta$  skoraj 50-krat bolj učinkovito kot BPA (na ER- $\beta$  3x bolj kot na ER- $\alpha$ ). Vzrok naj bi bila CF<sub>3</sub> elektronegativna skupina, s katero vezavni žep ER- $\beta$  reagira veliko bolj ugodno kot s CH<sub>3</sub> skupino BPA. Obenem je BPAF polni agonist na ER- $\alpha$  in antagonist na ER- $\beta$ , zelo slabo pa se veže na EER $\gamma$  (59). V primerjalni študiji BPA in sorodnih spojin so s pomočjo *in vitro* ter *in vivo* testiranja odkrili, da BPAF izraža visoko estrogensko kot tudi anti-androgensko aktivnost. Slednjo so proučevali s pomočjo luciferaznega testa, v katerem so uporabili NIH3T3 celice, transficirane z luciferaznim reporterskim genom, in jo izrazili

kot relativno aktivnost glede na androgeno aktivnost DHT v koncentraciji  $1 \times 10^{-10}$  M.  $IC_{50}$  za BPAF je znašal 1,3  $\mu$ M v primerjavi s flutamidom 2,5  $\mu$ M ter BPA 4,3  $\mu$ M (62).

V primerjalni toksikološki študiji, kjer so spolno nezrelim samicam podgan tri dni dajali subkutane injekcije 100 mg/kg BPAF, je prišlo do 337 % povečanja velikosti maternice, v primerjavi z 200 mg/kg BPA pa zgolj do 197 % povečanja, kar namiguje na večjo estrogenost BPAF (61). Študija nevrotoksičnosti BPAF na celični liniji HT-22 hipokampusa in mišjih primarnih živčnih celicah je pokazala, da BPAF lahko izzove apoptozo omenjenih celičnih linij, med drugim s povečanjem vrednosti intracelularnega kalcija in tvorbo ROS. Vseeno so potrebna še nadaljnja testiranja na *in vivo* modelih (60).

V toksikokinetični raziskavi določanja BPAF v bioloških vzorcih so štirim podganam peroralno odmerjali BPAF in nato določali sledove slednjega v tkivih in iztrebkih. Prišli so do ugotovitev, da so jetra poglavitni organ njegovega metabolizma, glavna pot izločanja je z blatom (nekonjugirana oblika), sekundarna pa preko ledvic (58).

## 1.5. BISFENOL S

### 1.5.1. Fizikalno-kemijske lastnosti ter viri in uporaba

Bisfenol S (BPS) je kemijsko 4,4'-sulfonildifenol (sinonim: bis(4-hidroksifenil) sulfon) z molekulsko formulo:  $C_{12}H_{10}O_4S$  in maso 250,27 g/mol. Pri sobni temperaturi je v kristalinični obliki, po izgledu rahlo rumene barve. Tali se pri 245–250 °C. Akutna toksičnost po peroralnem zaužitju je pri podganah ( $LD_{50}$ ) 4556 mg/kg (63).

Zaskrbljenost glede varnosti BPA ter vse bolj zaostrene zakonodaje glede njegove proizvodnje in uporabe je povzročila usmeritev pozornosti v iskanje novih, nadomestnih in termično bolj odpornih bisfenolov. V to skupino spada tudi relativno novejša kemikalija bisfenol S (BPS), analog BPA, od katerega se strukturno razlikuje po sulfonilni skupini med obema fenilnima obročema. Zaradi odlične stabilnosti pri visokih temperaturah in odpornosti na sončno svetlobo BPS predstavlja ustrezno zamenjavo za BPA v različnih plastičnih proizvodih (64, 65).

Uporablja se kot monomer v proizvodnji epoksi smol, antikorozivno sredstvo v epoksi lepilih ter reagent v polimernih reakcijah. Pomemben je tudi kot kemijski aditiv v pesticidih, barvilih, sredstvih za barvanje usnja, zaviralec gorenja, površinsko aktivnih snoveh, itd. Zlasti v proizvodnji termičnega papirja so začeli namesto BPA uporabljati BPS. Ljudje smo prek dermalnega kontakta vsakodnevno izpostavljeni vsaj eni od takšnih

oblik termičnega papirja (računi, bankovci, knjige, revije, itd). V študiji, v kateri so v različnih vzorcih papirja določevali vsebnost BPS, so ugotovili prisotnost slednjega v vseh vzorcih papirnatih računov in v 87 % vzorcih bankovcev. Po njihovih ocenah je povprečno dnevno izpostavljanje splošne populacije preko dermalnega kontakta 4,18 ng/kg telesne teže/dan ter kar 312 ng/kg telesne teže/dan pri posameznikih, ki so poklicno v kontaktu s termičnim papirjem (66).

Nekatere študije poročajo o pojavljanju BPS v konzerviranih živilih v koncentraciji nekaj deset ng/g (66). Zasedili so ga tudi v okolju; v rekah v koncentraciji do 3 µg/L. Obenem naj bi bil bolj odporen na razpad v okolju kot BPA. Leta 2011 je Evropska komisija prepovedala prodajo plastenk za dojenčke, ki vsebujejo BPA. BPS se od takrat pogostokrat uporablja kot komponenta plastičnih nadomestkov v proizvodnji otroških plastenk (67).

### 1.5.2. Toksikologija

Informacije o toksikoloških učinkih BPS in vplivih na endokrini sistem so omejene (67). Več študij je npr. testiralo učinke BPS preko genomskih mehanizmov pri izredno visokih koncentracijah, pri katerih je malo verjetno, da se sproščajo iz materialov, ki vsebujejo BPS. Pri koncentracijah 0.1–1 mM je BPS na testnem sistemu kvasovk pokazal zgolj rahlo estrogeno aktivnost. V podobni študiji je BPS pri koncentraciji 40 µM pokazal 15-krat nižjo genomsko estrogeno aktivnost od BPA. Študija na celični liniji MCF-7 rakavih celic pa je pokazala primerljivo vrednost BPS z BPA v estrogen-odzivnem ekspresijskem sistemu. Neskladje med omenjenimi študijami je morda posledica različnih vrst tkivnih sistemov, na katerih so bile izvedene (64). *In vitro* študija, izvedena na celični liniji MCF-7 luciferaznega reporterskega testa, poroča o estrogeni aktivnosti BPS ( $EC_{50}=1,1 \mu M$ ), ki pa je nekoliko manjša od estrogene aktivnosti BPA ( $EC_{50}=0,63 \mu M$ ). V isti študiji so obenem na celični liniji NIH3T3 iz mišjih fibroblastov potrdili anti-androgeno aktivnost BPS (62). Rezultati študije o negenomskih učinkih BPS navajajo, da je slednji lahko aktiven tudi v fmol do pmol koncentracijah in lahko spreminja številne z E2 inducirane negenomske odgovore v celicah hipofize. Študija je pokazala, da BPS lahko inducira hitro negenomsko signaliziranje v estrogen-odzivnih celicah hipofize pri nizkih koncentracijah (fmol–pmol) (64). Zaradi toksičnega potenciala BPS so potrebne nadaljnje študije o njegovem pojavljanju in obnašanju v naravi ter vplivu na okolje in ljudi (66).



## 2. NAMEN DELA

Zdravje in dobro počutje ljudi sta tesno povezana z okoljem, v katerem živimo. Stopnja endokrinih bolezni in motenj, kot so npr. nekatera reproduktivna in razvojna obolenja, se je povišala vzporedno z naraščanjem kemične industrije, kar vzbuja skrb o medsebojni povezanosti teh dejavnikov. Vemo, da nekatere kemikalije, t. i. hormonski motilci, vplivajo na delovanje hormonskega sistema ljudi in živali. Zaradi tega se vse več pozornosti namenja razvoju zanesljivih testnih metod in strategij za identifikacijo in oceno endokrino aktivnih spojin.

V naši diplomski nalogi smo izbrali s strani OECD validirano *in vitro* testno metodo LUMI-CELL<sup>®</sup> ER, s katero bomo poskušali ovrednotiti agonistično estrogeno aktivnost trem bisfenolom: bisfenolu A, bisfenolu AF in bisfenolu S. Bisfenol A je že znan hormonski motilec na estrogenskih receptorjih in se uporablja v proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smole. Bisfenol AF in bisfenol S sta njegova analoga, nekoliko novejši spojini, ki se ju vse pogosteje uporablja kot zamenjava za bisfenol A. Za določanje njihove agonistične estrogene aktivnosti bomo uporabljali luciferazno metodo LUMI-CELL<sup>®</sup> ER, ki temelji na transkripcijski aktivnosti potencialnih estrogeno aktivnih spojin, ki z vezavo na estrogen-odzivne elemente v reporterskem plazmidu celične linije BG1Luc4E2 povzročijo sintezo encima luciferaze. Slednjega bomo posredno določali z uporabo luminometra in merili RLU vrednosti luminiscence. Na podlagi Excelove predloge izbranega testa bomo izmerjene vrednosti luminiscence ustrezno normalizirali in prilagodili ter grafično prikazali koncentracijske krivulje preiskovanih spojin in referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola. Poskušali bomo tudi določiti EC<sub>50</sub> vrednosti za tiste spojine, ki bodo dajale pozitiven odziv na agonistično estrogeno aktivnost.

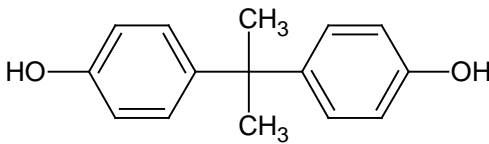
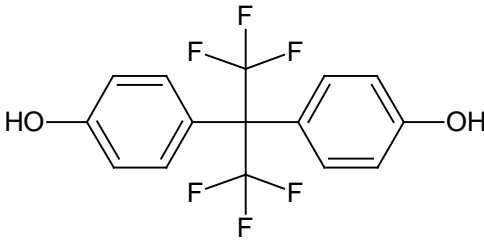
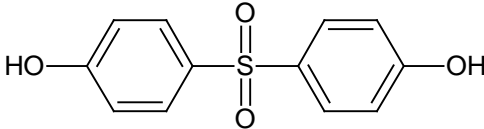
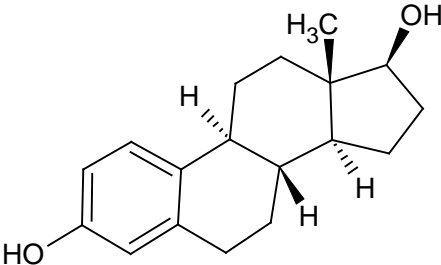
Pred začetkom eksperimentalnega dela luciferaznega testa bomo vzgojili zadostno število celic celične linije BG1Luc4E2, ki endogeno izražajo estrogenska receptorja ER- $\alpha$  in ER- $\beta$  in jih uporabili tudi v MTS testu citotoksičnosti. S slednjim bomo pri koncentracijah 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL in 1 mg/mL preverili citotoksičnost izbranih bisfenolov. Dobljene rezultate MTS testa bomo upoštevali pri izbiri necitotoksičnih koncentracij za testiranje v luciferaznem testu LUMI-CELL<sup>®</sup> ER ter jih uporabili pri interpretaciji rezultatov.

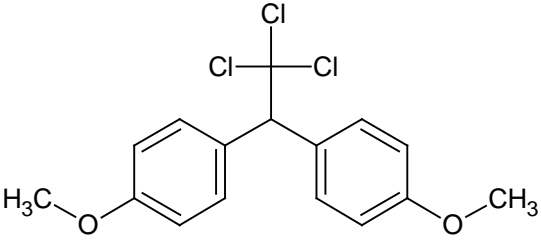
### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. TESTIRANE SPOJINE IN PRIPRAVA VZORCEV

Preučevali smo agonistično estrogeno aktivnost spojine BPA ter njenih analogov BPAF in BPS na estrogenskih receptorjih ER. Izbrali smo validirano OECD *in vitro* testno metodo LUMI-CELL<sup>®</sup> ER, kjer smo uporabili kontroli: 17 $\beta$ -estradiol (referenčni standard E2) in metoksiklor (šibka pozitivna kontrola). Za bisfenole smo predhodno izvedli tudi MTS test citotoksičnosti. V preglednici II so navedene strukturne formule, CAS številke, stopnje čistote, molske mase ter proizvajalci uporabljenih bisfenolov in kontrolnih spojin.

**Preglednica II:** Preglednica z navedenimi testiranimi spojinami (bisfenoli in kontrolne spojine).

Bisfenol A (CAS: 80-05-7) 	Molska masa: 228,29 g/mol Čistota: 99+ %	Sigma Aldrich
Bisfenol AF (CAS: 1478-61-1) 	Molska masa: 336,23 g/mol Čistota: 97 %	Sigma Aldrich
Bisfenol S (CAS: 80-09-1) 	Molska masa: 250,27 g/mol Čistota: 98 %	Sigma Aldrich
17- $\beta$ estradiol (CAS: 50-28-2) 	Molska masa: 272,38 g/mol Čistota: $\geq 98$ %	Sigma Aldrich

<p>Metoksiklor (CAS: 72-43-5)</p> 	<p>Molska masa: 345,65 g/mol</p> <p>Čistota: 100 %</p>	<p>Sigma Aldrich</p>
---	--	--------------------------

### 3.1.1. Priprava vzorcev testiranih spojin za test citotoksičnosti MTS

Za določevanje citotoksičnosti preiskovanih spojin BPA, BPAF in BPS smo slednje testirali v treh koncentracijah: 1 mg/mL, 0,1 mg/mL in 0,01 mg/mL. Najprej smo spojine natehtali na analitski tehtnici in v epicah pripravili izhodne raztopine s koncentracijo 100 mg/mL v 99,8 % DMSO topilu. Slednje smo nato 100-krat redčili z gojitvenim medijem RPMI+, da smo dobili najvišje testirane koncentracije. Za nadaljnja redčenja nižjih koncentracij (v razmerju 1:10) smo uporabili gojitveni medij RPMI+ z dodanim 1 % DMSO. Končna koncentracija DMSO v vseh pripravljenih raztopinah je bila 1 % (v/v). Pri pripravi izhodnih raztopin preiskovanih spojin smo morali paziti, da so se spojine v topilu popolnoma raztopile ter ni bilo prisotne motnosti ali precipitata (bister izgled). V nasprotnem primeru bi tolikokrat povečali redčitev izhodnih raztopin za faktor 10, da bi dosegli stopnjo popolnega raztapljanja. Izhodne in nadaljnje raztopine smo pripravljali v 1,5 mL epicah in jih homogenizirali z vorteksiranjem.

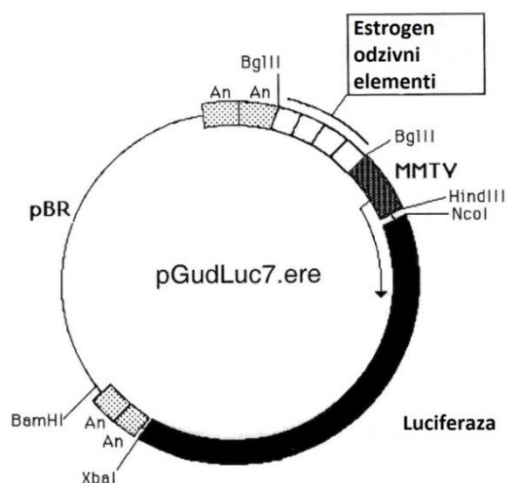
### 3.1.2. Priprava vzorcev testiranih spojin za LUMI-CELL® ER metodo

OECD testna metoda LUMI-CELL® ER je sestavljena iz dveh stopenj testiranja. Sprva smo preiskovane spojine testirali z »range finder« testom. BPA, BPAF in BPS smo najprej natehtali na analitski tehtnici in pripravili izhodne raztopine v koncentraciji 100 mg/mL v 99,8 % DMSO topilu. Pripravili smo tudi izhodno raztopino za referenčni standard E2 v koncentraciji  $1 \times 10^{-2}$  µg/mL v 99,8 % DMSO ter kontrolo topila (1 % DMSO v gojitvenem mediju DMEM+). Izhodne raztopine preiskovanih spojin in referenčnega standarda smo nato redčili z gojitvenim medijem DMEM+ (oz. DMEM+ z dodanim 1 % DMSO) do ustreznih koncentracij. Vsebnost DMSO v vseh končnih raztopinah je bila 1 % (v/v). Za »comprehensive« test smo glede na rezultate predhodnega testa range finder pripravili izhodne raztopine preiskovanih spojin BPA, BPAF in BPS v koncentraciji 1 mg/mL v 99,8

% DMSO. Pripravili smo tudi izhodno raztopino referenčnega standarda E2 v koncentraciji  $1 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  v 99,8 % DMSO in šibke pozitivne kontrole metoksiklora v koncentraciji 313  $\mu\text{g/mL}$  v 99,8 % DMSO ter kontrolo topila (1 % DMSO v gojitvenem mediju DMEM+). Izhodne raztopine preiskovanih spojin, referenčnega standarda in šibke pozitivne kontrole smo v nadaljevanju redčili z gojitvenim medijem DMEM+ (oz. DMEM+ z dodanim 1 % DMSO) do ustreznih koncentracij. Vsebnost DMSO v vseh končnih raztopinah je bila 1 % (v/v). Pri pripravi izhodnih raztopin za oba testa smo morali paziti, da so se spojine v topilu popolnoma raztopile ter ni bilo prisotne motnosti ali precipitata (bister izgled). Izhodne in nadaljnje raztopine smo pripravljali v 1,5 mL oz. 200  $\mu\text{L}$  epicah in jih homogenizirali z vorteksiranjem.

### 3.2. CELIČNA LINIJA BG1Luc4E2

LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metoda predpisuje uporabo človeških ovarijskih rakavih celic BG1Luc4E2. Gre za rekombinantno celično linijo, ki je bila razvita iz nesmrtnih človeških adenokarcinomskih ovarijskih celic BG-1, ki izražajo endogene, funkcionalne estrogenske receptorje (90 % ER- $\alpha$  in 10 % ER- $\beta$ ) in jih odlikuje visoka estrogenska odzivnost *in vitro*. BG-1 celicam so s stabilno transfekcijo vnesli plazmid pGudLuc7.ERE z estrogenodzivnim elementom pGudLuc7.0, MMTV promotorskim zaporedjem in reporterskim genom (*luc*) za encim kresničkina luciferaza (Slika 3). Rekombinantne celice se pri izpostavljanju 17 $\beta$ -estradiolu oz. kemikalijam, ki delujejo kot estrogenski agonisti, odzovejo z indukcijo ekspresije luciferaznega gena in sintezo encima luciferaze, katerega kvantitativno določamo z merjenjem luminiscence. Celična linija je odzivna na koncentracije 17 $\beta$ -estradiola vse do 1pM. Omenjena celična linija je uporabna za hitro testiranje (t. i. rapid screening), identifikacijo in karakterizacijo endokrino aktivnih snovi. Celična linija je stabilna in odporna na spremembe, saj jo lahko dve leti kontinuirano gojimo v kulturi brez izgube odzivnosti na estrogene. Poleg agonistične estrogenske aktivnosti (v našem testu) pa lahko z omenjeno celično linijo določamo tudi antagonistično estrogensko aktivnost spojin (68, 69, 70). Isto celično linijo smo uporabili tudi v MTS testu citotoksičnosti.



**Slika 3. Plazmid pGudLuc7.ERE.** Črno polje: reporterski gen za encim luciferazo; črtkano polje: MMTV promotorsko zaporedje; belo polje: 4 kopije sintetičnega oligonukleotida z estrogen-odzivnimi elementi (68).

### 3.3. OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI

Delo s celicami zahteva upoštevanje posebnih režimov, standardnih mikrobioloških praks in tehnik ter s tem zagotovitev ustreznih pogojev za eksperimentalno izvedbo poskusov. V prvi vrsti je potrebno poskrbeti za varnost laboratorijskega osebja in preprečiti okužbe z biološkim materialom ter hkrati preprečiti kontaminacijo proučevane celične kulture. Temeljnega pomena za doseganje kakovosti testov na celičnih kulturah je upoštevanje treh karakteristik: čistost, avtentičnost in stabilnost celične kulture (71, 72).

Z upoštevanjem smernic za varno delo s celičnimi kulturami smo eksperimentalni del testiranja izvajali pod aseptičnimi pogoji v celičnem laboratoriju Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Delo neposredno s celicami je potekalo v brezprašni komori z laminarnim pretokom sterilnega zraka - LAF komora. Slednja z omejenim fizičnim dostopom in stalnim pretokom filtriranega zraka skozi HEPA filter onemogoča kontaminacijo delovne površine in zagotavlja aseptične pogoje dela. Za čistočo komore smo skrbeli z obsevanjem z ultravijolično svetlobo ter razkuževanjem delovne površine s 70-odstotnim etanolom, vsakokrat neposredno pred začetkom dela. Prav tako smo vse laboratorijske pripomočke pred vnosom v LAF komoro predhodno avtoklavirali oz. obrisali s 70-odstotnim etanolom. S slednjim smo si vsakokrat razkužili tudi zaščitne rokavice. Ob morebitnem razlitju celične kulture po delovni površini smo le-to nemudoma pobrisali prav tako s 70-odstotnim etanolom. Za gojenje in nasajanje celic smo uporabljali naslednje reagentne, laboratorijsko opremo in aparature:

**Reagenti:**

- gojitveni medij RPMI 1640, Sigma Aldrich;
- penicilin 5000 I.U. streptomycin 5 mg/mL raztopina, Sigma Aldrich;
- fetusni serum goveda FBS, Gibco;
- gojitveni medij DMEM- Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija, Invitrogen;
- fetusni serum goveda z nizko vsebnostjo hormonov FBS-CS, Biological Industries;
- L-glutamin, Sigma Aldrich;
- natrijev piruvat, Invitrogen;
- Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufru - DPBS, Gibco;
- antibiotik gentamicinijev sulfat - G418, Biological Industries;
- tripsin (10x), Gibco;
- Hanksova uravnotežena raztopina soli HBSS (1x), Gibco;
- barvilo tripan modro (0,4 %), Life Technologies;
- dimetilsulfoksid (DMSO 99,8 %), Sigma Aldrich.

**Laboratorijska oprema:**

- plastenke za gojenje celic v obliki črke T s perforiranim zamaškom v velikosti 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> in 150 cm<sup>2</sup> (T25, T75, T150), TPP;
- 96-mikrotitrna ploščica, TPP;
- pipete 2-20 µL, 100-1000 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, Gilson;
- pipete 0,5-10 µL, 100-1000 µL, Biohit;
- multikanalna pipeta e300 10-300 µL, Biohit;
- velika pipeta Midiplus, Biohit;
- serološke pipete 5, 10, 25 in 50 mL, TPP;
- centrifugirke 15 in 50 mL, TPP;
- epice LPE 200 µL in 1,5 mL, Plastibrand;
- viala, Agilent Technologies.

**Aparature:**

- LAF komora, Iskra, Šentjernej, Slovenija;
- inkubator Incusafe, Sanyo;
- analitska tehtnica, Mettler Toledo;

- invertni mikroskop Olympus CKX41, Olympus;
- centrifuga;
- vibracijski stresalnik Combi spin, Biosan;
- hemocitometer;
- avtomatski merilnik za štetje celic (countess automated cell counter), Invitrogen;
- hladilnik, Gorenje;
- zamrzovalnik, Gorenje.

### 3.3.1. Odmrzovanje celic

Celično linijo BG1Luc4E2 smo pridobili iz ZDA (Michael S. Denison, Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis) in jo v 2 mL krioviali shranjevali zamrznjeno v obliki suspenzije v zamrzovalni omari pri temperaturi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kriovialo smo vzeli iz zamrzovalne omare in izvedli hitro odtajanje v vodni kopeli (temp. približno  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2–4 min). Odmrznjene celice smo nato z mikropipeto prenesli v 50 mL centrifugirko, dodali 20 mL gojitvenega medija RPMI+ in centrifugirali 8 min pri 2400 rpm. Na dnu centrifugirke se je tvoril sediment, supernatant pa smo s pipetiranjem odstranili in se na ta način znebili tudi krioprotektanta (10 % DMSO). Sediment s celicami smo zatem resuspendirali v 5 mL gojitvenega medija RPMI+. Resuspendirane celice smo prenesli v sterilno gojitveno posodo (T25) s površino  $75\text{ cm}^2$  in jo označili s pasažo +1. Pri vsakem nadaljnjem presajanju smo število pasaže povečali za 1.

### 3.3.2. Gojenje in presajanje celic

Celice za svojo rast in preživetje potrebujejo ustrezno kontrolirano okolje. BG1Luc4E2 celice smo gojili v obliki monosloja v sterilnih gojitvenih posodicah (T25–T125) v specializiranem inkubatorju pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vlažnosti  $90\text{ } \% \pm 5\text{ } \%$  in  $5\text{ } \% \pm 1\text{ } \% \text{ CO}_2$  v zraku. Pred selekcijanjem celic (v začetnih pasažah) smo za njihovo vzdrževanje uporabljali **gojitveni medij RPMI+**. Pripravili smo ga tako, da smo v 500 mL plastenko medija RPMI 1640 dodali 5 mL raztopine antibiotika penicilin/streptomycin in 44 mL FBS. Pripravljeni gojitveni medij smo razdelili v 50 mL centrifugirke in ga hranili v hladilniku ( $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Pred vsako uporabo smo ga segreti v vodni kopeli ali inkubatorju na približno  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Medij smo celicam menjavali na 2–3 dni oz. po potrebi pogosteje.

Za potrebe testiranja smo morali vzgajati primerno število celic. Pred nasajanjem celic na mikrotitrne plošče za LUMI-CELL<sup>®</sup> ER testiranje, smo celice selekcionirali z antibiotikom gentamicinom (G418). S tem smo izločili vse tiste celice, ki niso izražale reporterskega plazmida. V nadaljevanju smo za gojenje in nasajanje selekcioniranih celic uporabljali **gojitveni medij DMEM+**, ki ne vsebuje estrogenskih sestavin, ki bi lahko povzročile lažno pozitiven rezultat. Pripravili smo ga po recepturi: v 500 mL plastenko medija DMEM smo dodali 24 mL fetusnega seruma goveda z nizko vsebnostjo hormonov (FBS-CS), 10 mL L-glutamina, 5 mL natrijevega piruvata in 5 mL raztopine antibiotika Pen-Strep. Pripravljeni gojitveni medij smo hranili v hladilniku ter ga pred vsako uporabo segreli v vodni kopeli ali inkubatorju na približno 37 °C. Medij smo celicam menjavali na 2–3 dni oz. po potrebi pogosteje.

Optimalna konfluentnost celic za presajanje je med 70 in 80 %. Slednjo smo vsakodnevno spremljali z opazovanjem pod invertnim mikroskopom ter beležili njihovo rast in morebitne posebnosti. Pazili smo, da celice nikoli niso dosegle previsoke konfluentnosti, saj bi s tem tvegali nezaželene spremembe celic in pojav kontaktne inhibicije. Prav tako bi jih s tripsinizacijo težje odlepili od podlage gojitvenih posodic. Celice smo presajali na približno 2–3 dni. Pred vsakim presajanjem smo gojitveni medij in DPBS segreli na vodni kopeli ali v inkubatorju, da smo dosegli približno temperaturo 37 °C. S tem smo preprečili šok, ki bi ga celice doživele ob stiku z nizko temperaturo. Segrevali smo tudi razredčen 1x tripsin (reagent za odlepljanje celic s podlage, predhodno 10x redčen s HBSS), vendar ne predolgo, saj bi se v nasprotnem primeru zmanjšala njegova aktivnost.

Postopek presajanja celic je bil venomer enak, razlikovali so se le volumni reagentov in medija (tudi vrsta medija) glede na velikost gojitvene posodice. Najprej smo iz gojitvene posodice previdno odpipetirali star gojitveni medij in nato celice 1-krat sprali s DPBS (količina prilagojena velikosti gojitvene posodice), katerega smo nato prav tako odstranili s pipetiranjem. Zatem smo celicam dodali razredčen 1x tripsin (količina prilagojena velikosti posodice) in celice inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in atmosferskem CO<sub>2</sub> 5–10 min, da so se odlepili od podlage; to smo nato preverili pod invertnim mikroskopom. Zatem smo odlepljenim celicam v posodici dodali svež gojitveni medij (vsaj 2x količino predhodno dodanega tripsina) in s tem ustavili delovanje tripsina. Celično suspenzijo smo s serološko pipeto za enkratno uporabo prenesli v centrifugirko z volumnom 50 mL in centrifugirali 8 min pri 2400 rpm. Supernatant, ki se je tvoril nad sedimentom iz celic, smo odpipetirali stran in celice resuspendirali v ustrezni količini svežega gojitvenega medija (RPMI+ ali



DMEM+). Suspenziji resuspendiranih celic smo s hemocitometrom določili številčno koncentracijo in jih zeleno številko nasadili naprej v svežo gojitveno posodo (nova pasaža).

### 3.3.3. Štetje celic

Štetje celic je v postopku presajanja in nasajanja celic nujno potrebno. Na podlagi izračunane koncentracije celic smo določili potreben volumen celične suspenzije za presaditev ali nasaditev. Štetje smo izvajali ročno ali z avtomatskim merilcem. Za postopek ročnega štetja smo uporabili metodo s hemocitometrom, kjer smo uporabili barvilo tripan modro, ki je vitalno barvilo. To pomeni, da prodre zgolj v mrtve celice, ki se posledično obarvajo modro in za razliko od živih, v katere barvilo ne prodre, ne svetijo pod invertnim mikroskopom. Na podlagi teh razlik ločimo mrtve celice od živih in preštujemo le tiste, ki svetijo (žive).

Za štetje s hemocitometrom smo v 200  $\mu\text{L}$  epico odpipetirali 40  $\mu\text{L}$  barvila tripan modro in dodali 10  $\mu\text{L}$  resuspendirane celične suspenzije ter vse skupaj s pipeto homogeno premešali. Zatem smo odpipetirali 10  $\mu\text{L}$  homogenizirane suspenzije in jo nanegli na hemocitometer. Slednjega smo vstavili pod invertni mikroskop in prešteli žive celice. Celotno število celic v prvotni suspenziji smo nato izračunali po sledeči formuli:

$$\text{Koncentracija celic v prvotni suspenziji} = (A + B + C + D)/4 \times R \times Kp \times V \quad /1/$$

- A, B, C, D - **števila celic v posameznih kvadrantih**; v vsakem kvadrantu smo posebej prešteli celice in na koncu izračunali povprečno število celic.
- R - **faktor redčenja**; število, ki pove, kolikokrat smo prvotno suspenzijo celic redčili z barvilom. V našem primeru smo redčili 10  $\mu\text{L}$  suspenzije s 40  $\mu\text{L}$  barvila, R je bil enak 5.
- Kp - **volumen območja hemocitometra, v katerem štejemo celice** = ( 1 mm x 1 mm x 0,1 mm = 0,1 mm<sup>3</sup> = 10<sup>-4</sup> mL). Določevali smo koncentracijo celic v 1 mL, Kp je tako znašal 10<sup>-4</sup>.
- V - **volumen medija**, v katerem smo reuspendirali celice.

Za postopek avtomatskega štetja celic, ki smo ga uporabljali pri postopku nasajanja celic na mikrotitrne ploščice, smo v 200  $\mu\text{L}$  epico odpipetirali 10  $\mu\text{L}$  barvila tripan modro in dodali 10  $\mu\text{L}$  homogene celične suspenzije. Vsebinsko smo s pipeto homogeno premešali,

odpipetirali 10  $\mu$ L in nanegli na ploščico za štetje celic. Števec nam je podal število celic v 1 mL, od tega tudi delež živih in mrtvih ter odstotek njihove preživelosti - viabilnost.

### 3.3.4. Nasajanje celic

Za MTS test linearnosti in citotoksičnosti ter LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodo smo celice nasajali na mikrotitrne testne plošče s 96 vdolbinami (TPP). Postopek nasajanja celic je bil v začetnih korakih enak postopku presajanja. Razlika je bila, da smo pri nasajanju ustrezno količino celic, resuspendiranih v svežem gojitvenem mediju, prenesli v vdolbine mikrotitrskih plošč in ne v nove gojitvene posode. Za nasajanje smo uporabili tudi drugačno koncentracijo celic kot pri presajanju. Ta se je razlikovala tudi glede na izbrani test. Za izračun primerne koncentracije celic za nasajanje smo uporabili sledečo formulo:

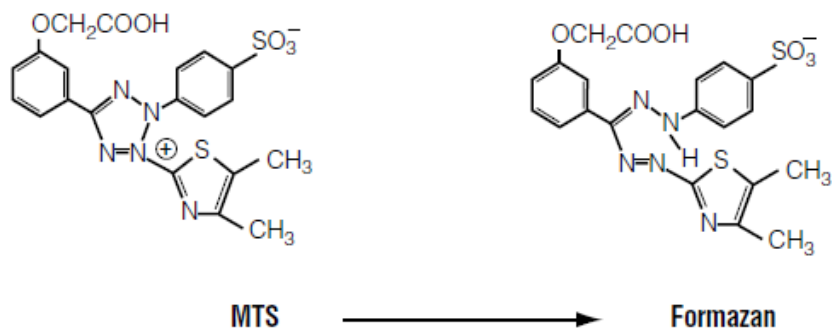
$$\text{Koncentracija}_{(\text{končna})} \times \text{Volumen}_{(\text{končni})} = \text{Koncentracija}_{(\text{začetna})} \times \text{Volumen}_{(\text{začetni})} / 2$$

Določili smo želeni volumen<sub>(končni)</sub> in koncentracijo<sub>(končna)</sub> celične suspenzije za nasaditev. Slednjo smo pripravili z ustreznim redčenjem začetne koncentracije celične suspenzije resuspendiranih celic z gojitvenim medijem. Pri nasajanju smo uporabljali avtomatsko multikanalno pipeto, s katero smo v več vdolbin hkrati prenesli po 200  $\mu$ L pripravljene homogene celične suspenzije želene koncentracije.

## 3.4. TEST CITOTOKSIČNOSTI MTS

MTS test citotoksičnosti je kolorimetrična metoda za določanje števila živih celic v proliferacijskih ali citotoksičnih testih. MTS reagent (Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent) je sestavljen iz barvila MTS v obliki soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) in reagenta za prenos elektronov PES (fenazin etosulfat). Test temelji na merjenju metabolne aktivnosti celic po njihovem izpostavljanju preiskovanim spojinam, katerim določamo stopnjo citotoksičnosti. S testom merimo, kolikšna je aktivnost encimov v živih celicah glede na njihovo sposobnost redukcije barvila MTS do obarvanega produkta formazana (Slika 4). Pri tem večja intenziteta barve nakazuje na večjo preživelost celic. V metabolno aktivnih celicah to pretvorbo povzročijo dehidrogenazni encimi s produkcijo NAD(P)H. Slednji prenesejo svoj elektron na PES, ki naprej reducira MTS v obarvan formazan, ki je topen v gojišču in

absorbira pri 490 nm. Z izmerjeno absorbanco nato določimo količino nastalega formazana, ki je sorazmerna številu (deležu) živih, metabolno aktivnih celic. Glede na delež živih celic določimo stopnjo citotoksičnosti spojine, s katero smo celice tretirali (73).



**Slika 4 .:** Struktura barvila MTS (tetrazolijeva sol) in njegovega produkta po redukciji, formazana (73).

**Pri izvedbi MTS testiranja smo potrebovali naslednje reagente:**

- gojitveni medij RPMI + (sestava, glej poglavje 3.3.2.);
- fosfatni pufer DPBS, Gibco;
- tripsin (1x), Gibco;
- barvilo tripan modro (0,4 %), Life Technologies;
- dimetilsulfoksid (DMSO 99,8 %), Sigma Aldrich;
- reagent MTS – Cell Titer 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent, Promega.

### 3.4.1. MTS testiranje linearnega območja

Za določitev primerne koncentracije celic za testiranje citotoksičnosti MTS, ki daje linearno razmerje med odzivom in številom živih celic, smo najprej izvedli testiranje linearnega območja. Nasadili smo 7 različnih koncentracij celic v mediju RPMI+ z 1 % DMSO (od 5000 do 320.000 celic/vdolbino, pasaža BG1+4). Posamezno koncentracijsko območje smo testirali v treh paralelah in v vsako vdolbino nanесли 200  $\mu$ L pripravljenih celičnih suspenzij. Za slepo vrednost smo uporabili gojitveni medij RPMI+ z 1 % DMSO, brez predhodno nasajenih celic. Eno uro po nasaditvi celic smo v vsako vdolbino dodali 40 $\mu$ L reagenta MTS s tehniko reverznega pipetiranja, da smo preprečili pojav mehurčkov, ki bi motili merjenje absorbance. Po dveh urah inkubacije smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 490 nm.

### 3.4.2. MTS testiranje citotoksičnosti bisfenolov A, AF in S

Glede na dobljen graf linearnosti smo določili najprimernejšo koncentracijo celic za nasajanje: 10.000 celic/vdolbino. Bisfenole smo testirali v treh koncentracijah: 1 mg/mL, 0,1 mg/mL in 0,01 mg/mL, vsako koncentracijsko območje v petih paralelah. Najprej smo v 96-well ploščico nasadili celice s preračunano koncentracijo celične suspenzije 50.000 celic/mL (pasaža BG1+5). V vdolbine za preiskovane spojine in kontrolo (razen v vdolbine za slepo vrednost) smo vnesli 200  $\mu$ L pripravljene celične suspenzije. Celice smo nasadili 24 ur pred tretiranjem s spojinami in jih v tem času inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in atmosferskih pogojih. 24 ur po nasaditvi celic smo pod invertnim mikroskopom pregledali enakomernost nasaditve. Celicam smo nato previdno odstranili gojitveni medij in v vsako vdolbino dodali 100  $\mu$ L pripravljenih raztopin bisfenolov, razen v slepo in kontrolo. Za slepo vrednost in kontrolo smo uporabili gojitveni medij RPMI+ z 1 % DMSO. Bisfenole smo za tretiranje predhodno raztopili v 99,8 % DMSO v koncentraciji 100 mg/mL - izhodna raztopina. Slednjo smo nato redčili z gojitvenim medijem RPMI+ do ustreznih koncentracij. 24 ur po dodatku preiskovanih spojin in inkubaciji smo celice najprej pregledali pod invertnim mikroskopom in vizualno ocenili viabilnost celic. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 20  $\mu$ L reagenta MTS (tudi v slepo in kontrolo). Ploščico smo zatem inkubirali 2 uri v inkubatorju ter nato s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 490 nm. Zaradi občutljivosti MTS reagenta na svetlobo smo pri obeh testih postopek izvajali pri ugasnjeni luči, v temnem prostoru.

### 3.5. OECD TESTI ZA ODKRIVANJE ENDOKRINE AKTIVNOSTI

Vprašanje, ali lahko določene kemikalije kot hormonski motilci vplivajo na delovanje endokrinega sistema ljudi in živali ter povzročajo neželene učinke, je zanimivo tako za znanstvenike kot splošno javnost. Zaradi potencialne vsakodnevne izpostavljenosti kemikalijam, je zato postavitev ustreznih testnih strategij in robustnih testnih metod še toliko bolj pomembna (74). Mednarodna organizacija OECD od leta 1996 namenja veliko svojih sredstev razvoju in validaciji novih testnih smernic za detekcijo in ocenitev endokrino aktivnih spojin (75, 76). Pod okriljem OECD je delovna skupina EDTA AG razvila konceptualni okvir stopenjskega testiranja, vključujoč *in vitro* ter *in vivo* presejalne in potrditvene teste, razdeljene na pet ravni z naraščanjem po metodološki kompleksnosti

in moči dokaza (74). Konceptualni okvir stopenjskega testiranja je predstavljen v preglednici III.

**Preglednica III.** OECD konceptualni okvir za testiranje in ocenitev kemikalij kot hormonskih motilcev.

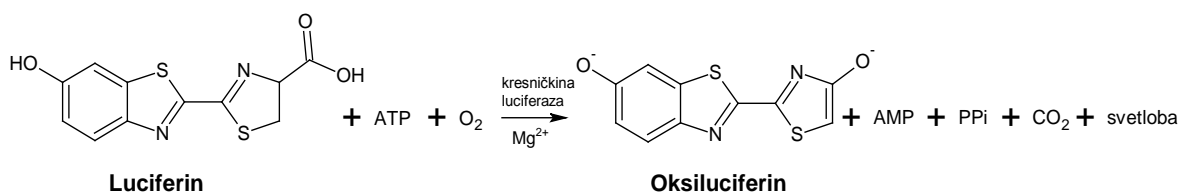
Toksikologija sesalcev in nesesalcev		
<b>Raven 1</b>	<b>Razvrščanje</b> (obstoječi podatki in ne-testne informacije)	Za razvrstitev velikega števila kemikalij (umetnih in naravnih) po pomembnosti, z uporabo obstoječih podatkov. Razvrstitev glede na fizikalno-kemijske lastnosti, toksikološke podatke, QSAR, ADME model.
<b>Raven 2</b>	<b><i>In vitro</i> presejalni testi</b> (mehanistični podatki)	Za pridobitev mehanističnih podatkov; vezava na receptor, transkripcijska aktivnost.
<b>Raven 3</b>	<b><i>In vivo</i> presejalni testi</b> (endokrini mehanizem delovanja)	Za določitev specifičnega endokrinega delovanja.
<b>Raven 4</b>	<b><i>In vivo</i> testi</b> (multipli endokrini mehanizmi delovanja)	Za določitev neželenih učinkov v različnih endokrinih sistemih.
<b>Raven 5</b>	<b><i>In vivo</i> testi</b> (endokrini + drugi učinki)	Najbolj celoviti testi za določitev neželenih učinkov skozi daljše življenjsko obdobje organizma, ki se lahko uporabijo za končno oceno tveganja.

Konceptualni okvir ni stopenjska strategija testiranja oz predpis testov, ki jih je potrebno izvajati linearno od ravni 1 do 5, ampak »orodje«, ki odraža, kakšen tip informacij zagotavljajo testi z določene ravni. Informacije, pridobljene iz testov nižjih ravni, se lahko uporabijo za določitev, kateri specifični testi iz višjih ravni so potrebni za trdnejši dokaz, ali je specifična kemikalija hormonski motilec ali ne (75, 77, 78). *In vitro* in kratkotrajni *in vivo* presejalni testi (raven 1, 2, 3) služijo za izbiro spojin, ki jih je v nadaljevanju smiselno uvrstiti v dolgotrajne študije potrditvenih testov (raven 4 in 5) za določitev neželenih učinkov, ki so osnova za oceno tveganja (74). LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metoda sodi v drugo raven OECD testov (76).

### 3.6. LUMI-CELL<sup>®</sup> ER TESTNA METODA ZA DOLOČANJE AGONISTOV NA ESTROGENSKIH RECEPTORJIH

Za določanje agonistične estrogene aktivnosti preiskovanih spojin smo izbrali validiran OECD *in vitro* luciferazni test, ki temelji na izražanju reporterskega gena, ki kodira encim

za luciferazo. Slednji je uravnavan z MMTV promotorskim zaporedjem, na katero se veže ER v obliki kompleksa z ligandom in deluje kot transkripcijski faktor. Aktivacijo transkripcije in sintezo encima luciferaze, katerega aktivnost je pokazatelj biološke aktivnosti testiranih spojin, kvantificiramo z uporabo luminometra in merjenjem luminiscence (79). BG1Luc ER TA testna metoda v primerjavi z drugimi estrogenskimi transkripcijskimi metodami ponuja številne prednosti: 1.) validacija za uporabo testnih spojin preko širšega koncentracijskega območja; 2.) potencial za detekcijo širšega območja endokrino aktivnih spojin; 3.) sposobnost za indentifikacijo spojin, ki inducirajo ali inhibirajo estrogenski receptor. Pri luciferazni metodi gre za reakcijo bioluminiscence. Luciferin nastopa tu kot substrat, produkcija svetlobe pa je posledica pretvorbe kemijske energije iz oksidacije luciferina s prenosom elektrona do nastanka oksiluciferina. Kresničkina luciferaza katalizira oksidacijo luciferina v prisotnosti ATP in  $Mg^{2+}$  iona, ki sodelujeta v vlogi kofaktorja (Slika 5), (80).



**Slika 5:** Reakcija bioluminiscence, ki jo katalizira encim kresničkina luciferaza (80).

**Za izvedbo LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metode smo potrebovali naslednje reagente:**

- gojitveni medij DMEM+ (sestava, glej poglavje 3.3.);
- gentamicin (G418), Biological Industries;
- dimetilsulfoksid (DMSO 99,8 %), Sigma Aldrich;
- Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (DPBS), Gibco;
- tripsin (1x), Gibco;
- metoksiklor, Sigma Aldrich;
- 17 $\beta$  estradiol, Sigma Aldrich;
- izhodni lizirni pufer (5x) redčimo z deionizirano vodo na (1x) (Promega Lysis solution);
- luciferazni reagent: Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate, Promega.

A.) **Range finder test:** Na 96-well ploščico smo nasadili celice, predhodno selekcionirane z gentamicinom, v koncentraciji 40.000 celic/vdolbino. Pripravili smo si 15 mL celične suspenzije s koncentracijo 200.000 celic/mL in v vdolbine z multikanalno avtomatsko pipeto nanесли 200  $\mu$ L pripravljene celične suspenzije. Po nasaditvi smo plošče inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 37 °C in atmosferskih pogojih. Naslednji dan smo nasajenim celicam previdno odstranili gojitveni medij, pod invertnim mikroskopom pregledali nasaditve in zapisali morebitne posebnosti (neenakomernost nasaditve). Zatem smo v vdolbine dodali po 200  $\mu$ L pripravljenih raztopin preiskovanih spojin, referenčnega standarda E2 in kontrole topila DMSO (negativna kontrola). Predhodno smo za preiskovane spojine in referenčni standard pripravili izhodno raztopino in jo za nanos v testne vdolbine do ustreznih koncentracij redčili z gojitvenim medijem DMEM+ oz. DMEM+ z 1 % DMSO. Za BPA, BPAF in BPS smo pripravili izhodne raztopine s koncentracijo 100 mg/mL in jih nato testirali v 7 različnih konc. z razmerjem redčenja 1:10, v dveh paralelah (maksimalna koncentracija na plošči je bila  $C_1=1000 \mu\text{g/mL}$ ). Referenčni standard E2 smo testirali v 4 različnih koncentracijah (4x redčenje), v dveh paralelah. Kontrolo topila DMSO (negativna kontrola) smo pripravili v 1 % koncentraciji v mediju DMEM+ in testirali v 4 paralelah. V vseh končnih raztopinah je koncentracija DMSO znašala 1 % (v/v). Shematsko je primer testne plošče prikazan na preglednici IV.

**Preglednica IV:** 96-well mikrotitrna plošča z označenimi polji preiskovanih spojin, referenčnega standarda E2 in kontrole topila DMSO ter navedenimi testiranimi koncentracijami. **Rdeče polje:** BPA; **zeleno polje:** BPAF; **rumeno polje:** BPS; **belo polje:** prazne vdolbine; **modro polje:** kontrola topila (1% raztopina DMSO v gojitvenem mediju DMEM+); **roza polje:** referenčni standard E2 ( $E_{2_1}= 5 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ ,  $E_{2_2}= 1,25 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ ,  $E_{2_3}= 3,13 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ ,  $E_{2_4}= 7,83 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ ).

$C_1$	1000 $\mu\text{g/mL}$	$C_1$	1000 $\mu\text{g/mL}$	$C_1$	1000 $\mu\text{g/mL}$						
$C_2$	100 $\mu\text{g/mL}$	$C_2$	100 $\mu\text{g/mL}$	$C_2$	100 $\mu\text{g/mL}$						
$C_3$	10 $\mu\text{g/mL}$	$C_3$	10 $\mu\text{g/mL}$	$C_3$	10 $\mu\text{g/mL}$						
$C_4$	1 $\mu\text{g/mL}$	$C_4$	1 $\mu\text{g/mL}$	$C_4$	1 $\mu\text{g/mL}$						
$C_5$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	$C_5$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	$C_5$	0,1 $\mu\text{g/mL}$						
$C_6$	00,1 $\mu\text{g/mL}$	$C_6$	00,1 $\mu\text{g/mL}$	$C_6$	00,1 $\mu\text{g/mL}$						
$C_7$	000,1 $\mu\text{g/mL}$	$C_7$	000,1 $\mu\text{g/mL}$	$C_7$	000,1 $\mu\text{g/mL}$						
$E_{2_4}$	$E_{2_3}$	$E_{2_2}$	$E_{2_1}$	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	$E_{2_4}$	$E_{2_3}$	$E_{2_2}$	$E_{2_1}$

Po 24-urni inkubaciji tretiranih celic pri 37 °C in atmosferskih pogojih smo iz vdolbin previdno odstranili raztopine preiskovanih spojin, referenčnega standarda in DMSO kontrole ter vdolbine sprali s 50 µL 1x raztopine DPBS ter s tem odstranili zaostale raztopine spojin in presnovne produkte celic. Ponovno smo celice pregledali pod invertnim mikroskopom ter vizualno ocenili citotoksičnost (pri tem smo si pomagali s preglednico, glej poglavje 3.7.1.). Zatem smo na dno mikrotitrne plošče nalepili bel papir, da smo povečali učinek merjenja z luminometrom, in z multikanalno pipeto v vsako vdolbinico dodali 50 µL 1x raztopine lizirnega reagenta. Po dodatku lizirnega reagenta smo testno ploščo 1 min stresali v krožnih horizontalnih gibih, da je potekla liza celic. Nato smo pri ugasnjeni luči v vdolbine dodali 50 µL luciferaznega reagenta luciferina (predhodno smo ga pripravili tako, da smo zmešali skupaj substrat in pufer; ekvilibrirana na sobno temperaturo) in izmerili luminiscenco v območju od 300 do 650 nm pri občutljivosti 180 in intervalnem času 1 s.

B.) **Comprehensive test:** Na 96-well mikrotitrsko ploščo smo nasadili celice (predhodno selekcionirane z gentamicinom) v koncentraciji 40.000 celic/vdolbino. Pripravili smo si 25 mL celične suspenzije s koncentracijo 200.000 celic/mL in v vdolbine z multikanalno avtomatsko pipeto nanegli 200 µL pripravljene celične suspenzije. Vse do nanosa preiskovanih in kontrolnih spojin je bil postopek enak kot pri range finder testu. Predhodno smo si prav tako pripravili izhodne raztopine preiskovanih spojin, referenčnega standarda E2 in dodatno metoksiklora (šibka pozitivna kontrola, ki ponazarja, da test deluje pravilno in je dovolj občutljiv, da zazna tudi šibke agoniste). Te smo za nanos v testne vdolbine do ustreznih koncentracij redčili z gojitvenim medijem DMEM+ oz DMEM+ z 1 % DMSO. Glede na rezultate range finderja smo pri comprehensive testu pripravili izhodne raztopine bisfenolov s koncentracijo 1 mg/mL. Bisfenole smo testirali v 11 različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:5, v treh paralelah (maksimalna koncentracija na plošči je bila  $C_1=10 \mu\text{g/mL}$ ). Referenčni standard E2 smo testirali v 11 različnih koncentracijah v dveh paralelah, metoksiklor (šibka pozitivna kontrola) pa v koncentraciji 3,13 µg/mL v štirih paralelah. Kontrolo topila DMSO (negativna kontrola) smo pripravili v 1 % koncentraciji v mediju DMEM+ in testirali v štirih paralelah. V vseh končnih raztopinah je koncentracija DMSO znašala 1 % (v/v). Shematsko je primer testne plošče prikazan na preglednici V.



**Preglednica V:** 96-well mikrotitrna plošča z označenimi polji preiskovanih spojin, referenčnega standarda E2, kontrole topila DMSO in šibke pozitivne kontrole metoksiklor ter navedenimi testiranimi koncentracijami. **Rdeče polje:** BPA; **zeleno polje:** BPAF (na dodatni plošči smo testirali BPS); **roza polje:** referenčni standard E2; **modro polje:** kontrola topila DMSO (1% raztopina DMSO v mediju DMEM+); **rumeno polje:** šibka pozitivna kontrola (metoksiklor: 3,13 µg/mL).

C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	DMSO
10 µg/mL	2 µg/mL	0,4 µg/mL	0,08 µg/mL	0,016 µg/mL	0,0032 µg/mL	0,00064 µg/mL	1,28E-4 µg/mL	2,56E-5 µg/mL	5,12E-6 µg/mL	1,024E-6 µg/mL	DMSO
											DMSO
C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	DMSO
10 µg/mL	2 µg/mL	0,4 µg/mL	0,08 µg/mL	0,016 µg/mL	0,0032 µg/mL	0,00064 µg/mL	1,28E-4 µg/mL	2,56E-5 µg/mL	5,12E-6 µg/mL	1,024E-6 µg/mL	Metoksi- klor
											Metoksi- klor
E2 <sub>1</sub>	E2 <sub>2</sub>	E2 <sub>3</sub>	E2 <sub>4</sub>	E2 <sub>5</sub>	E2 <sub>6</sub>	E2 <sub>7</sub>	E2 <sub>8</sub>	E2 <sub>9</sub>	E2 <sub>10</sub>	E2 <sub>11</sub>	Metoksi- klor
1,00E-4 µg/mL	5,00E-5 µg/mL	2,50E-5 µg/mL	1,25E-5 µg/mL	6,25E-6 µg/mL	3,13E-6 µg/mL	1,56E-6 µg/mL	7,83E-7 µg/mL	3,92E-7 µg/mL	1,95E-7 µg/mL	9,78E-8 µg/mL	Metoksi- klor

Sledila je 24-urna inkubacija tretiranih celic v inkubatorju pri 37 °C in atmosferskih pogojih. Zatem je bil postopek dodajanja lizirnega in luciferaznega reagenta enak kot pri range finder testiranju. Na enak način smo izmerili tudi luminiscenco.

### 3.7. VREDNOTENJE REZULTATOV

Dobljene rezultate MTS in LUMI-CELL<sup>®</sup> ER testiranja smo statistično ovrednotili in grafično predstavili z računalniškim programom Microsoft Excel.

Pri MTS testiranju linearnosti smo izmerjenim vrednostim absorbance za posamezno koncentracijsko območje določili povprečje in jim odšteli povprečje absorbance za slepo vrednost (medij RPMI+ z 1 % DMSO brez celic). Iz dobljenih vrednosti smo naredili graf in določili območje linearnosti ter število celic, primerno za nasajanje testnih plošč za nadaljnje MTS testiranje bisfenolov.

Pri MTS testiranju citotoksičnosti bisfenolov smo absorbanco slepe vrednosti (medij RPMI+ z 1 % DMSO brez celic) posneli kot ozadje. Izmerjenim vrednostim absorbance tretiranih celic smo določili povprečje, odšteli slepo vrednost in slednje primerjali glede na negativno kontrolo (medij RPMI+ z 1 % DMSO + celice), katere vrednost smo nastavili na 100 %. Končni rezultat preživetja celic, ki je odraz citotoksičnosti spojine, smo podali relativno glede na kontrolo. Za grafično predstavitev smo rezultate MTS testa prikazali v obliki histograma, s pripadajočimi standardnimi odkloni.

Pri LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodi smo izmerjene vrednosti luminiscence normalizirali (odšteli ozadje oz. povprečje kontrole topila DMSO) in jih pomnožili s prilagoditvenim faktorjem (izračunali smo ga tako, da smo najvišjo povprečno RLU vrednost referenčnega standarda E2 uravnali na vrednost 10.000 RLU) ter določili povprečje normaliziranih in prilagojenih vrednosti. Za grafično predstavitev smo rezultate prikazali v obliki koncentracijskih krivulj, s pripadajočimi standardnimi odkloni. Za veljavne ponovitve comprehensive testiranja smo z uporabo računalniškega programa GraphPad Prism 6.0. poskušali določiti EC<sub>50</sub> vrednosti bisfenolov. Izračun je temeljil na Hill-ovi enačbi:

$$Y = \min + [\min - \max / 1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \text{Hill-ov naklon}}] \quad /3/$$

Y= odziv (RLU); X= logaritem koncentracije; min= minimalni odziv; max= maksimalni odziv; log EC<sub>50</sub>= logaritem X, ko je odziv na sredini med min in max; Hill-ov naklon= opisuje strmino naklona krivulje. Uporabljeni model je izračunal najboljše ujemanje za min, max, Hill-ov naklon in EC<sub>50</sub> vrednosti.

### 3.7.1. Kriteriji za vrednotenje rezultatov pri LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodi

Po 24-urni inkubaciji nasajenih celic s preiskovanimi spojinami ter pred merjenjem luminiscence smo celice pregledali pod invertnim mikroskopom in vizualno podali ocenitev celične viabilnosti. Pomagali smo si s preglednico VI. Dobljene rezultate LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metode smo nato vrednotili po predpisanih kriterijih za veljavnost posameznega testa in za razvrstitev spojin med pozitivne oz negativne na agonistično estrogeno aktivnost.

**Preglednica VI:** Preglednica z opisanimi značilnostmi posameznega razreda za vizualno ocenitev celične viabilnosti.

Ocena viabilnosti	Značilnosti posameznega razreda
<b>1</b>	Normalna morfologija in gostota celic (cca. 80 % viabilnost)
<b>2</b>	Spremenjena morfologija in/ali zmanjšana gostota (80–60 % viabilnost)
<b>3</b>	Spremenjena morfologija in/ali zelo zmanjšana gostota (60–40 % viabilnost)
<b>4</b>	Malo ali nič vidnih celic (manj kot 40 % viabilnost)
<b>P</b>	Vdolbine z vidnim precipitatom

### **Kriteriji sprejemljivosti za veljavnost testa range finder:**

- indukcija plošče: vrednost mora biti  $> 3$ . Izračunamo jo z deljenjem najvišje povprečne RLU vrednosti referenčnega standarda E2 z RLU povprečjem kontrole topila DMSO.
- DMSO kontrola: RLU vrednosti kontrole topila morajo biti znotraj območja  $2,5 \times SD$  vrednosti iz baze podatkov.

### **Kriteriji sprejemljivosti za veljavnost testa comprehensive:**

- rezultati referenčnega standarda E2: koncentracijska krivulja referenčnega standarda E2 mora biti sigmoidne oblike in imeti vsaj tri vrednosti znotraj linearnega območja koncentracijske krivulje.
- pozitivna kontrola: RLU vrednosti metoksiklora morajo biti nad linijo, ki označuje povprečje DMSO +  $3 \times SD$  DMSO.
- + isti kriteriji kot pri testu range finder.

### **Kriteriji za pozitivno klasifikacijo spojine za agonistično estrogenu aktivnost:**

- koncentracijska krivulja spojine mora vsebovati bazno linijo, ki ji sledi pozitiven naklon in se zaključuje s platojem ali vrhom. V nekaterih primerih krivulja zadostuje zgolj dvema karakteristikama (bazna linija-naklon ali naklon-vrh).
- črta, ki označuje pozitiven naklon mora vsebovati vsaj tri točke (povprečje  $\pm SD$ ). Linearni del krivulje lahko vsebuje vrh ali prvo točko platoja.
- amplituda odziva (razlika med bazno linijo in vrhom ali platojem) mora biti vsaj 20 % vrednosti referenčnega estrogena E2 (t. j. vsaj 2000 RLU, če je maksimalna vrednost referenčnega estrogena uravnana na 10.000 RLU).
- če je možno, za vsako pozitivno spojino izračunamo  $EC_{50}$ .

### **Kriteriji za negativno klasifikacijo spojine za agonistično estrogenu aktivnost:**

- vse spojine označimo negativne za agonistično estrogenu aktivnost, če ne zadostijo kriterijem za pozitivno klasifikacijo in če se hkrati vse vrednosti krivulje nahajajo pod 20 % maksimalne vrednosti referenčnega estrogena E2 (t. j. 2000 RLU, če je najvišja vrednost referenčnega estrogena uravnana na 10.000 RLU).

### **Kriteriji za nezadostno klasifikacijo spojine za agonistično estrogenu aktivnost:**

- podatke označimo kot nezadostne, če jih zaradi velikih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev ne moremo opredeliti kot to velja za bodisi pozitivne ali negativne spojine.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

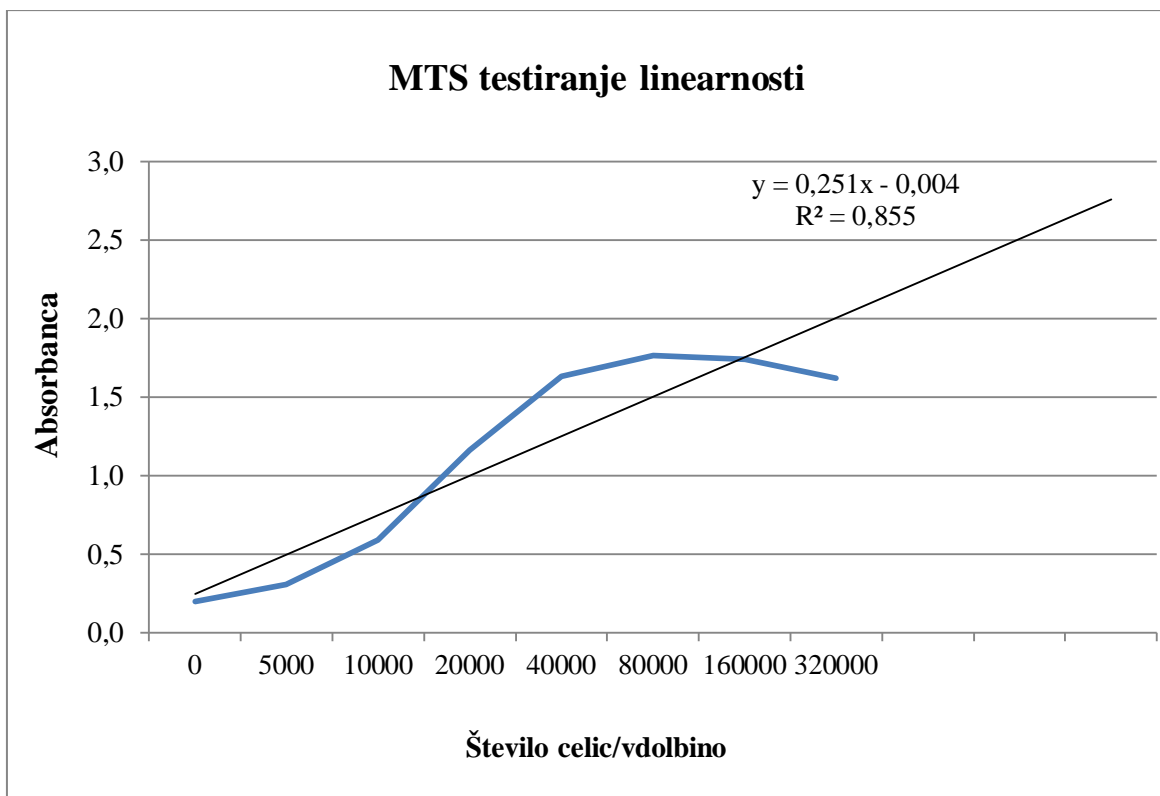
### 4.1. MTS TEST CITOTOKSIČNOSTI

Za določitev citotoksičnosti bisfenolov smo uporabili metabolni test MTS. Rezultate slednjega smo upoštevali pri testiranju in interpretaciji rezultatov LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metode. Predhodno smo z MTS testiranjem linearnosti določili tudi primerno koncentracijo celic BG1Luc4E2 za uporabo pri nadaljnjem MTS testiranju bisfenolov.

#### 4.1.1. MTS testiranje linearne območja

Testiranje linearne območja MTS testa smo izvedli pred MTS testiranjem bisfenolov A, AF in S z namenom, da bi slednjega izvedli pod najbolj optimalnimi pogoji. Zaradi različne stopnje metabolne aktivnosti med različnimi vrstami celic (in s tem različne sposobnosti redukcije barvila MTS) je potrebno preveriti, katera številčna koncentracija celic daje ustrezen odziv in zagotavlja testiranje v območju linearnosti, v katerem je izmerjena absorbanca direktno proporcionalna koncentraciji oz. številu živih celic. Različni faktorji, ki vplivajo na metabolno aktivnost celic, lahko vplivajo na razmerje med številom celic in absorbanco. Npr. prevelika gostota nasajenih celic lahko vodi do nastanka kontaktne inhibicije, kar lahko vpliva na spremenjeno metabolno aktivnost celic ter nelinearno razmerje med njihovim številom in absorbanco. Nasprotno pa premajhna gostota nasajenih celic ne daje zadosti velikega signala, ki bi ga lahko razlikovali od signala, ki ga daje ozadje (slepa vrednost).

Rezultate smo pridobili v skladu s postopkom v poglavju 3.4.1. Za testiranje smo izbrali 7 različnih koncentracij celic 4. pasaže celične linije BG1Luc4E2 in posneli absorbanco pri valovni dolžini 490 nm, ki po priporočilu proizvajalca (Promega) zagotavlja največjo občutljivost. Slepi vrednosti (število nasajenih celic 0) smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco s povprečno vrednostjo 0,1995 in vrednost slednje odšteli od povprečnih vrednosti absorbanc pri drugih koncentracijah. Izmerjene vrednosti sedmih različnih številčnih koncentracij celic smo grafično predstavili s koncentracijsko krivuljo. Rezultati testiranja linearne območja MTS testa so prikazani na **grafu 1**.



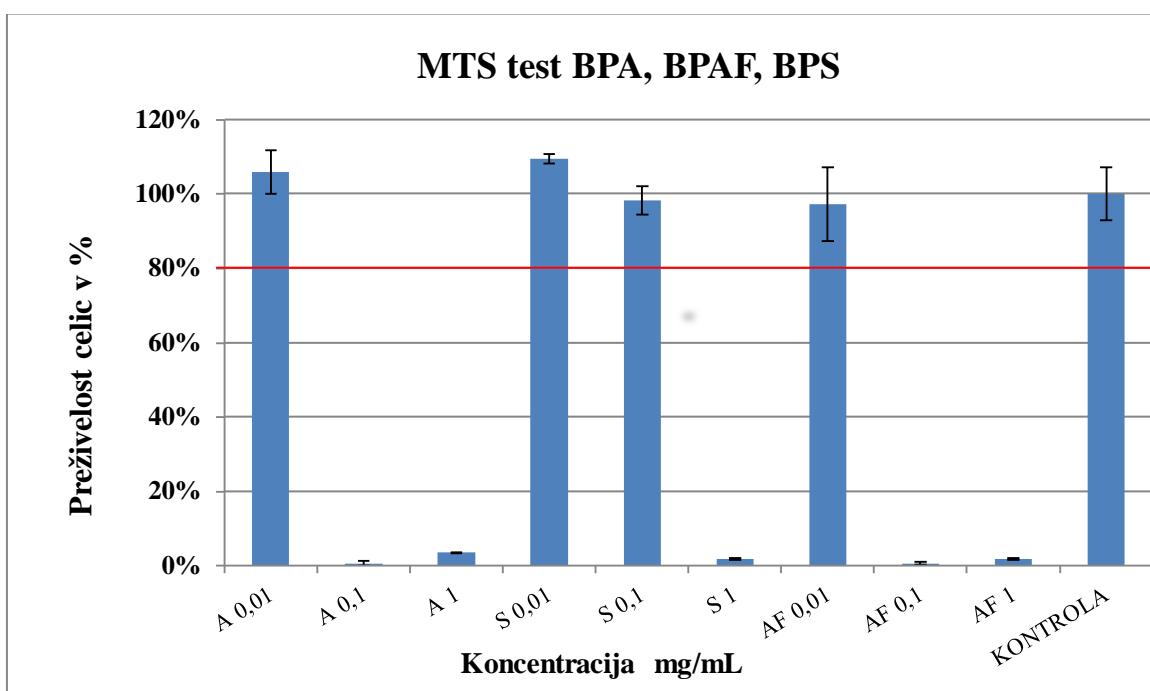
**Graf 1:** Prikaz koncentracijske krivulje MTS testiranja linearnega območja: absorbanca v odvisnosti od števila celic/vdolbino. Nasajenim celicam 4. pasaje celične linije BG1Luc4E2 v gojitvenem mediju RPMI+ z dodanim 1 % DMSO smo 1h po nasaditvi dodali 40 $\mu$ L reagenta MTS in nato 2h po dodatku izmerili absorbanco pri 490 nm.

Iz grafa vidimo, da krivulja zavzema sigmoidno obliko z določenim korelacijskim koeficientom  $R^2 = 0,855$ , ki pa nekoliko odstopa od zaželene vrednosti  $\geq 0,9$ . Kot primerno koncentracijo celic za nasajanje smo izbrali vrednost iz začetka linearnega območja: 10.000 celic/vdolbino. To vrednost smo izbrali z namenom, da signal, ki ga merimo v končnem delu testiranja, ne preseže meje linearnega območja.

Pri izvajanju testa smo morali biti pozorni, da smo pripravili homogene celične suspenzije in da pri nanašanju reagenta v vdolbine testne ploščice nismo vnesli mehurčkov zraka. Ti bi lahko vplivali na merjenje absorbance in neustrezen rezultat. Pod invertnim mikroskopom smo preverili tudi enakomernost nasaditve celic za posamezno koncentracijsko območje. Neenakomernost nasajenih celic bi lahko vplivala na lažno povišano oz. znižano vrednost izmerjene absorbance za tisto vdolbino. V našem testu neenakomernosti nismo zasledili. Upoštevali smo tudi lastnost fotosenzibilnosti MTS reagenta in testiranje opravljali pri minimalnem izpostavljanju svetlobi ter se na ta način izognili rezultatom lažnega povišanja absorbance pri merjenju ozadja.

#### 4.1.2. MTS testiranje citotoksičnosti bisfenolov A, AF in S

Na podlagi predhodnega testa smo izbrali primerno število celic BG1Luc4E2 za testiranje citotoksičnosti - 10.000 celic/vdolbino. Bisfenole smo testirali v treh koncentracijah: 1 mg/mL, 0,1 mg/mL in 0,01 mg/mL. Izmerjene absorbance bisfenolov smo primerjali glede na absorbanco kontrole (netretirane celice), katere vrednost je predstavljala 100-odstotno preživelost celic. Želeli smo ugotoviti, katere izmed treh izbranih koncentracij delujejo na celice citotoksično in dobljene rezultate uporabiti pri LUMI-CELL<sup>®</sup> ER testni metodi z namenom testiranja agonistične estrogene aktivnosti bisfenolov pri necitotoksičnih koncentracijah (viabilnost nad 80 %). Rezultati MTS testiranja, ki smo jih pridobili v skladu s postopkom v poglavju 3.4.2., so prikazani na **grafu 2**.



**Graf 2:** Histogram MTS testiranja citotoksičnosti BPA, BPAF in BPS na celični liniji BG1Luc4E2 (5. pasaža) po 24-urni izpostavljenosti trem različnim koncentracijam bisfenolov. Vrednosti prikazujejo delež absorbance, ki je sorazmerna deležu preživelih, metabolno aktivnih celic. Prikazane vrednosti v histogramu so normalizirane glede na kontrolo (celice inkubirane v gojitvenem mediju RPMI+ z 1 % DMSO) in podane v odstotkih  $\pm$  SD. Rdeča črta prikazuje spodnjo mejo (80 %) ustrezne metabolične aktivnosti.

Na grafu 2 vidimo, da je po 24-urni stimulaciji celic z izbranimi bisfenoli koncentracija 1 mg/mL citotoksična pri vseh bisfenolih, najbolj pa pri BPAF. Omenjene vrednosti so hkrati pod mejo 80 % ustrezne metabolične aktivnosti. Naslednja, 10-krat manjša

proučevana koncentracija (0,1 mg/mL), pa je pri BPA in BPAF dejansko še bolj citotoksična. Pri 10-krat manjši koncentraciji bi sicer pričakovali večji delež preživelih celic oz. manjšo citotoksičnost. Za razliko od BPA in BPAF pa je absorbanca BPS pri koncentraciji 0,1 mg/mL dosegla vrednost 98 %, s čimer lahko zaključimo, da bi bila ta koncentracija primerna za vključitev v nadaljnje testiranje z LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodo kot maksimalna testirana koncentracija BPS, ki ni citotoksična. BPS je tako tudi edini bisfenol izmed testiranih, ki je necitotoksičen pri dveh koncentracijah. Najmanjša testirana koncentracija 0,01 mg/mL pa se je pri vseh bisfenolih izkazala za necitotoksično, saj je BPA dosegel 100,6 %, BPAF 97,3 % in BPS 110 % vrednosti absorbance glede na kontrolo. Obenem je pri BPA in BPS preživelost pri tej koncentraciji večja od kontrole. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je maksimalna necitotoksična koncentracija za BPA in BPAF 0,01 mg/mL in bi jo bilo smiselno uporabiti v nadaljnjih testiranjih z LUMI-CELL<sup>®</sup> ER testno metodo.

Če primerjamo proučevane bisfenole med seboj, lahko zaključimo, da je najbolj citotoksičen BPAF, sledi mu BPA in BPS. Na dobljene rezultate bi sicer lahko vplivala tudi neenakomerna nasaditev celic v testnih vdolbinah. V primeru, da bi bila nasaditev manjša od zastavljene, bi namreč lahko dobili lažno pozitiven dokaz za citotoksičnost, saj bi bilo na voljo manj celic, ki bi s svojimi encimi pretvorile MTS reagent v obarvan formazan. V našem primeru, po pregledu testnih vdolbin, neenakomernosti nismo zasledili.

Dobljeni rezultati MTS testa so skladni z vizualno oceno citotoksičnosti preiskovanih spojin, ki smo jo s pregledom celic pod invertnim mikroskopom določili pred dodatkom MTS reagenta in merjenjem absorbance. Zmanjšajo število celic smo opazili pri koncentracijah bisfenolov: BPA (0,1 in 1 mg/mL), BPAF (0,01, 0,1 in 1 mg/mL) ter BPS pri 1 mg/mL. Zmanjšano število celic je nakazovalo na citotoksično delovanje spojine pri opazovani koncentraciji. Rezultati na histogramu so nato potrdili naša vizualna opažanja. Glede na to, da se odstotek preživelosti celic med citotoksično in necitotoksično koncentracijo precej razlikuje, bi bilo smiselno testirati še vmesne koncentracije. Npr. vmesne koncentracije med 0,01 in 0,1 mg/mL za BPA in BPAF ter vmesne koncentracije med 0,1 in 1 mg/mL za BPS. Na ta način bi lahko postopoma spremljali porast citotoksičnosti in natančneje določili, katera je tista koncentracija, ki povzroča citotoksičnost (odziv, ki se nahaja pod mejo 80 % viabilnosti).

## 4.2. LUMI-CELL® ER TESTNA METODA

LUMI-CELL® ER (BG1LucER TA) metodo smo uporabili za določevanje agonistične estrogene aktivnosti bisfenolov A, AF in S. Testna metoda je bila validirana s strani ameriških organizacij NICEATM in ICCVAM v sodelovanju z mednarodnimi centri za validacijo iz Evrope in Japonske. LUMI-CELL® ER je hkrati edina validirana OECD *in vitro* testna metoda za določanje estrogene aktivnosti spojin.

### 4.2.1. Range finder test

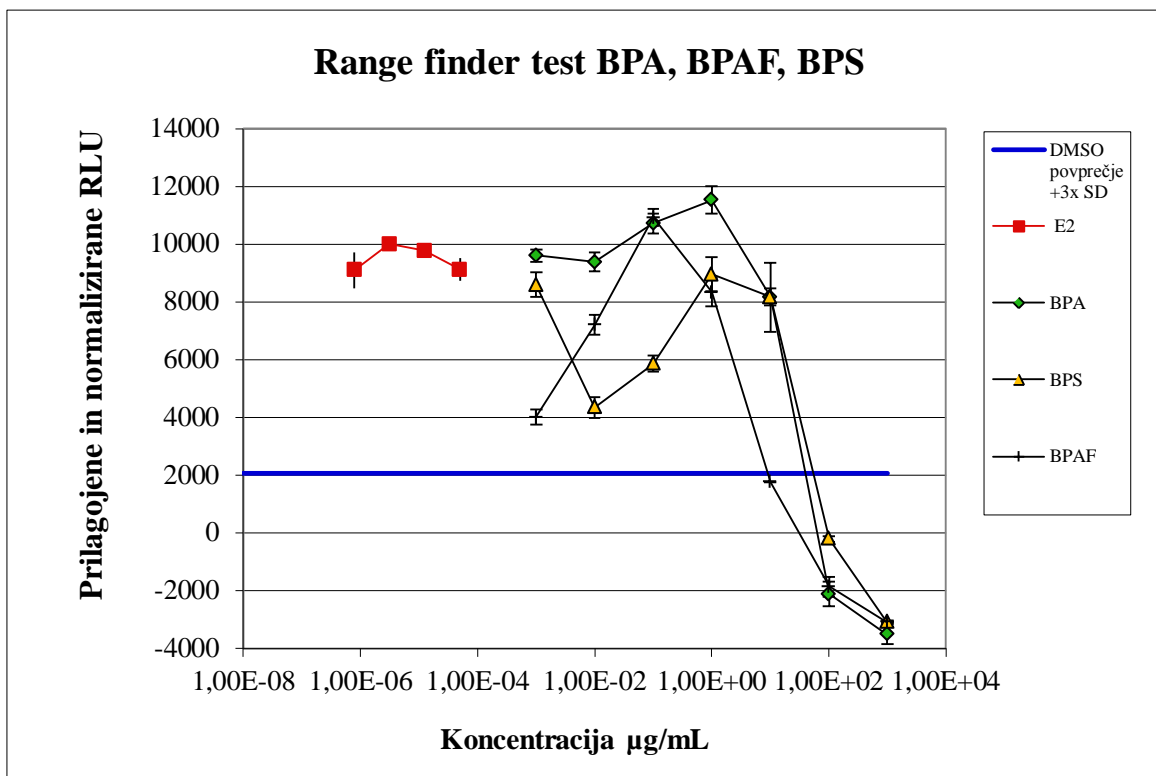
Range finder test oz. test iskanja območja koncentracij je prva stopnja testiranja v okviru izbrane metode. Z njim smo določili začetno koncentracijo posameznega bisfenola in razmerje redčenja za nadaljnje testiranje v comprehensive testu. Na podlagi dobljenih rezultatov smo lahko izbirali med razmerjem redčenja 1:2 ali 1:5, odvisno od tega kolikšno logaritemsko območje smo želeli zajeti, da bi najustrezneje prikazali agonistično estrogeno aktivnost. Rezultati testa, ki smo jih pridobili v skladu s postopkom v poglavju 3.6., so prikazani na **grafu 3**. Rezultati vizualne ocene citotoksičnosti so prikazani v preglednici VII.

Range finder test je ustrezal predpisanim kriterijem sprejemljivosti, zato smo ga izvedli samo enkrat. Indukcija plošče, ki jo izračunamo tako, da najvišjo povprečno RLU vrednost referenčnega standarda E2 delimo s povprečjem RLU vrednosti kontrole topila DMSO, je znašala 3,0776 (kriterij >3). Ta sicer zadošča predpisanim kriterijem o veljavnosti testa, vendar bi si kljub temu želeli doseči večjo indukcijo. Obenem je test ustrezal še zahtevi za DMSO kontrolo, katere RLU vrednosti morajo biti znotraj območja 2,5x SD iz baze podatkov.

**Preglednica VII:** C<sub>1</sub>= 1000 µg/mL; C<sub>2</sub>= 100 µg/mL; C<sub>3</sub>= 10 µg/mL; C<sub>4</sub>= 1 µg/mL; C<sub>5</sub>= 0,1 µg/mL; (C<sub>6</sub>= 0,01 µg/mL; C<sub>7</sub>= 0,001 µg/mL).

Vizualna ocena citotoksičnosti		
BPA	BPAF	BPS
C <sub>1</sub> - 2	C <sub>1</sub> - 2	C <sub>1</sub> - 4
C <sub>2</sub> - 4	C <sub>2</sub> - 2	
C <sub>3</sub> - 2		
C <sub>4</sub> - 2		





**Graf 3:** Prikaz normaliziranih in prilagojenih vrednosti luminiscence (RLU) v odvisnosti od koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na celični liniji BG1Luc4E2 (7. pasaža) smo preiskovane spojine BPA, BPAF in BPS testirali v 7-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:10 in najvišjo testirano koncentracijo  $1000 \mu\text{g/mL}$ . Referenčni standard E2 (rdeča krivulja) smo testirali v 4-ih različnih koncentracijah, kontrolo topila DMSO pa v 1 % (v/v) koncentraciji v gojitvenem mediju DMEM+. Modra ravna črta predstavlja povprečje kontrole topila DMSO + 3x SD in označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost (pozitiven odziv nad, negativen pod modro črto).

Vse bisfenole smo testirali pri maksimalni koncentraciji  $C_1=1000 \mu\text{g/mL}$  in jih redčili v razmerju 1:10 do končne koncentracije  $C_7=1 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ . Če upoštevamo rezultate predhodnega testa MTS, vidimo, da so vse koncentracije BPA in BPAF  $> 10 \mu\text{g/mL}$  in vse koncentracije BPS  $> 100 \mu\text{g/mL}$  citotoksične. Na grafu 3 vidimo, da so RLU vrednosti bisfenolov A, AF in S pri koncentracijah  $C_1=1000 \mu\text{g/mL}$  in  $C_2=100 \mu\text{g/mL}$  močno znižane in se nahajajo pod modro črto, ki označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost (BPAF je hkrati tudi pri  $C_3=10 \mu\text{g/mL}$  močno znižan v primerjavi z ostalima dvema). Range finder test nam torej podobno kot MTS test potrjuje, da so koncentracije nad  $10 \mu\text{g/mL}$  citotoksične in se zato celice niti ne morejo odzvati na estrogeno aktivnost, saj so pri tej koncentraciji podvržene apoptozi oz. nekrozi. Izjema je le BPS, ki na podlagi rezultatov MTS testa pri koncentraciji  $100 \mu\text{g/mL}$  namreč ne bi smel izkazovati (tolikšne) citotoksičnosti na celice.

Tudi vizualna ocena celic (preglednica VII) neposredno pred merjenjem luminiscence je skladna z dobljenimi rezultati na grafu 3, saj nakazuje na citotoksično delovanje bisfenolov pri koncentracijah  $C_1$  in  $C_2$ ; edino pri BPS pri  $C_2$  citotoksičnosti nismo opazili. Vendar, če primerjamo RLU vrednosti bisfenolov pri koncentraciji  $C_2$ , lahko vidimo, da je vrednost BPS manj znižana kot so pri tej koncentraciji vrednosti za BPA in BPAF.

Rezultati prikazujejo, da so preiskovane spojine pri oceni agonistične estrogene aktivnosti po večini pozitivne. Na grafu namreč vidimo točke koncentracijskih krivulj preiskovanih spojin, ki so večje od povprečja RLU vrednosti kontrole topila DMSO + 3xSD (se nahajajo nad modro črto na grafu). Na podlagi predhodne ugotovitve smo za vse bisfenole izbrali razmerje redčenja 1:5, ki smo ga nato uporabili v comprehensive testiranju. To razmerje nam je omogočilo večji koncentracijski razpon testiranja, kot bi nam ga razmerje 1:2. Za vse bisfenole smo za začetno koncentracijo testiranja izbrali 10  $\mu\text{g/mL}$  (t. j. koncentracija, ki je 10-krat višja od tiste, ki v range finder testu daje najvišjo RLU vrednost). Za BPAF bi sicer za začetno koncentracijo morali izbrati 1  $\mu\text{g/mL}$ , saj na grafu 3 vidimo, da je najvišja RLU vrednost BPAF 10-krat manjša od najvišje RLU vrednosti za BPA in BPS. Kljub temu smo za BPAF izbrali koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$ , saj comprehensive test omogoča dovolj veliko koncentracijsko območje testiranja spojin. Hkrati je ta koncentracija, glede na rezultate MTS testa, necitotoksična pri vseh bisfenolih.

#### 4.2.2. Comprehensive test

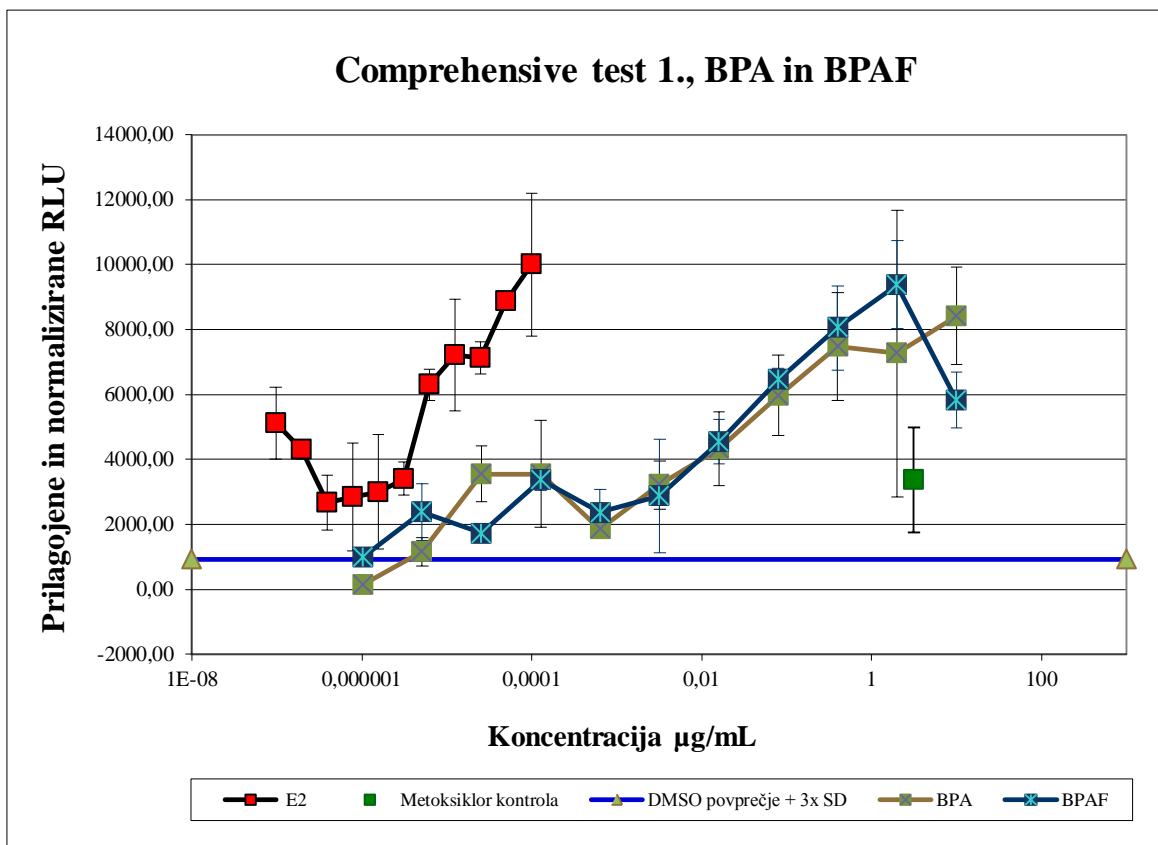
Comprehensive test oz. celostni test je druga stopnja testiranja v okviru LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metode in je namenjen določitvi agonistične estrogene aktivnosti preiskovanih spojin. Pri slednjem smo na testni ploščici lahko hkrati testirali dve spojini. Bisfenol A in AF smo testirali skupaj, na istih pasažah celične linije BG1Luc4E2, in naredili tri ponovitve testiranja. Bisfenol S pa smo testirali ločeno, na drugih pasažah celic, in naredili dve ponovitvi testiranja. Spojine smo testirali v 11-ih različnih koncentracijah z izbranim razmerjem redčenja 1:5 in začetno koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$ . Izjemoma smo pri 3. ponovitvi za BPA in BPAF (graf 6) ter pri 2. ponovitvi za BPS (graf 8) testiranje začeli z začetno koncentracijo 100  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultate comprehensive testa smo pridobili v skladu s postopkom v poglavju 3.6. Pri veljavnih testih smo za bisfenole, pozitivne za agonistično estrogeno aktivnost, s programom GraphPad Prism določili tudi  $EC_{50}$  vrednosti.

#### A.) Comprehensive test za bisfenol A in bisfenol AF, 1. ponovitev testa

Rezultati vizualne ocene citotoksičnosti niso pokazali spremenjene celične morfologije oz. zmanjšanje viabilnosti (stopnja 1). Rezultati 1. ponovitve comprehensive testa za BPA in BPAF so prikazani na **grafu 4**.

Rezultati na grafu 4 ustrezajo kriterijem sprejemljivosti, test je veljaven. Indukcija plošče je znašala 7,149 (kriterij  $> 3$ ). Povprečna RLU vrednost kontrole topila DMSO je znotraj območja vrednosti  $2,5x$  SD iz baze podatkov. Pozitivna kontrola metoksiklor zadostuje kriteriju, saj se na grafu nahaja nad modro črto, ki predstavlja RLU povprečje DMSO +  $3xSD$  in s tem dokazuje, da je test dovolj občutljiv tudi za šibke agoniste. Krivulja referenčnega standarda E2, razen pri zadnjih dveh koncentracijah ( $C_{10}$  in  $C_{11}$ ), načeloma zadostuje kriteriju za sigmoidno obliko.  $C_{10}$  in  $C_{11}$  bi namreč morali imeti nekoliko manjši odziv za doseg optimalnejše oblike sigmoidne krivulje. Koncentracije na krivulji, ki bi lahko spadale v linearno območje, so npr.:  $C_4$ – $C_6$ .

Za opredelitev spojine, pozitivne za agonistično estrogeno aktivnost, mora biti njena amplituda odziva (t. j. razlika med bazno linijo in vrhom) vsaj 20 % maksimalne RLU vrednosti referenčnega estrogena. Če zanemarimo variiranje točk na bazni liniji obeh bisfenolov, potem amplitudi odziva pri obeh presegata vrednost 2000 RLU in s tem ustrezata kriteriju. Rezultati BPA bi dajali ustrežnejšo koncentracijsko krivuljo, če bi bil odziv pri koncentraciji  $C_1$  nekoliko nižji in bi predstavljal del platoja skupaj s koncentracijo  $C_2$ . Krivulja ima sicer pozitiven naklon z vsaj tremi točkami v linearnem območju, npr.  $C_3$ – $C_5$ . Krivulja načeloma ustreza kriteriju za pozitivno agonistično aktivnost. Rezultati BPAF bi prav tako dajali ustrežnejšo koncentracijsko krivuljo, če bi točke na bazni liniji manj variirale. V nadaljevanju krivulja sicer lepo strmo narašča s pozitivnim naklonom in se zaključuje z vrhom pri koncentraciji  $C_2=2 \mu\text{g/mL}$ . V linearno območje krivulje spadajo točke, npr.  $C_3$ – $C_6$ . Krivulja načeloma ustreza kriteriju za pozitivno agonistično aktivnost. Ker je bil test veljaven in sta oba bisfenola hkrati zadoščala kriterijem za pozitivno agonistično estrogeno aktivnost, smo za njiju izračunali  $EC_{50}$  vrednosti:  $BPA=1,141 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  in  $BPAF=9,021 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ .

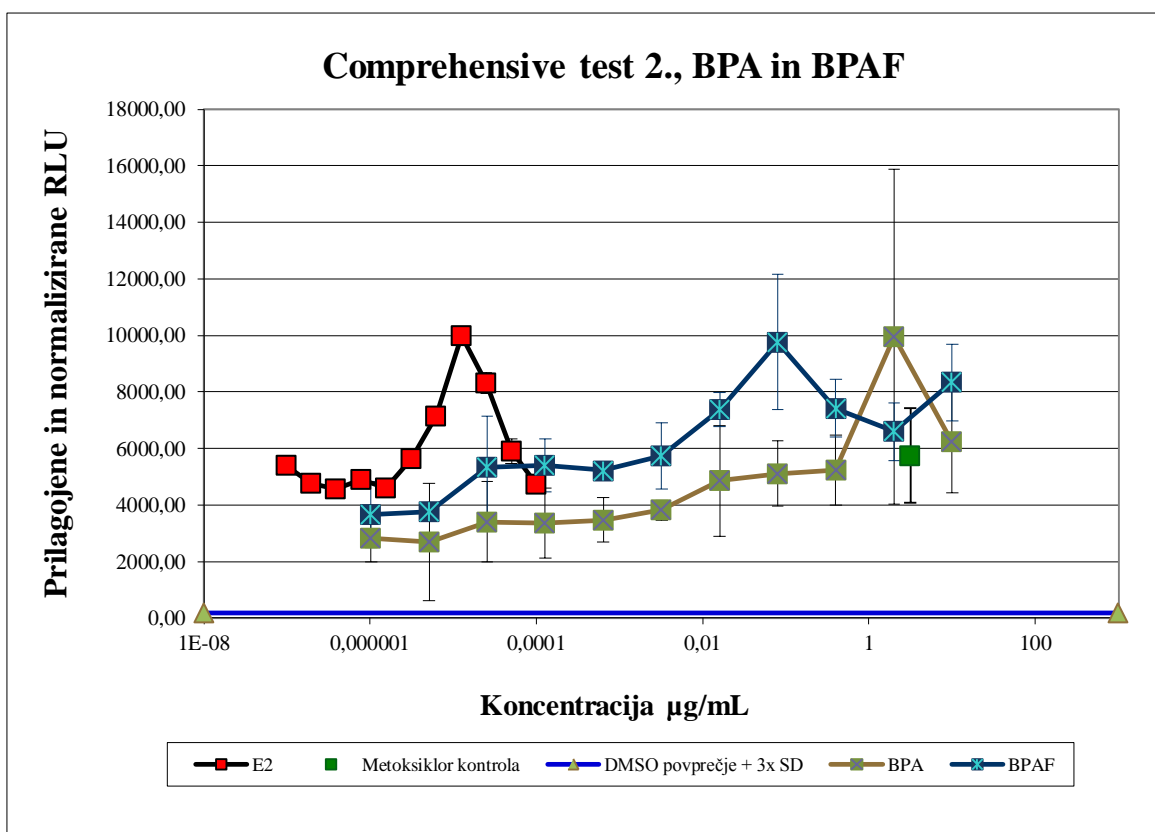


Graf 4: **1. ponovitev testa.** Graf prikazuje normalizirane in prilagojene vrednosti luminiscence (RLU) v odvisnosti od koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na celični liniji BG1Luc4E2 (8. pasaža) smo BPA in BPAF (zeleni in modri krivulji) testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:5 in začetno koncentracijo  $10 \mu\text{g/mL}$ . Referenčni standard E2 (rdeča krivulja) smo testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:2, pozitivno kontrolo metoksiklor (zeleni kvadrat) v koncentraciji  $3,13 \mu\text{g/mL}$ , kontrolo topila DMSO pa v 1 % (v/v) koncentraciji v gojitvenem mediju DMEM+. Modra ravna črta predstavlja povprečje kontrole topila DMSO + 3x SD in označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost (pozitiven odziv nad, negativen pod modro črto).

Koncentraciji BPAF, ki se nahajata pod mejo 2000 RLU sta:  $C_9 = 2,56 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$  in najmanjša  $C_{11} = 1,02 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ . Pri BPA so te koncentracije:  $C_7 = 6,4 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ ,  $C_{10} = 5,12 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$  in najmanjša  $C_{11} = 1,02 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ . Obenem se BPA pri koncentraciji  $C_{11}$  nahaja pod modro črto, ki označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost. BPAF pa se pri vseh koncentracijah nahaja nad modro črto. Bisfenola s tem ne ustrezata kriteriju za negativno agonistično estrogeno klasifikacijo spojin, saj se vse RLU vrednosti ne nahajajo pod 2000 RLU, ki označuje 20 % maksimalne RLU vrednosti referenčnega estrogena.

## B.) Comprehensive test za bisfenol A in bisfenol AF, 2. ponovitev testa

Rezultati vizualne ocene citotoksičnosti niso pokazali spremenjene celične morfologije oz. zmanjšanje viabilnosti (stopnja 1). Rezultati 2. ponovitve comprehensive testa za BPA in BPAF so prikazani na **grafu 5**. Rezultati ne ustrezajo vsem kriterijem sprejemljivosti, test je neveljaven. Indukcija plošče je znašala 5,264, kar sicer ustreza kriteriju  $> 3$ . Prav tako je test ustrezal kriterijema za kontrolo topila DMSO in pozitivno kontrolo metoksiklor. Krivulja referenčnega standarda E2, ki pa naj bi imela sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega območja koncentracijske krivulje, pa temu kriteriju nikakor ne zadostuje. Zaradi neveljavnosti testa nismo določevali  $EC_{50}$  vrednosti bisfenolov.



Graf 5: **2. ponovitev testa**. Graf prikazuje normalizirane in prilagojene vrednosti luminiscence (RLU) v odvisnosti od koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na celični liniji BG1Luc4E2 (11. pasaža) smo BPA in BPAF (zeleni in modri krivulji) testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:5 in najvišjo testirano koncentracijo  $10 \mu\text{g/mL}$ . Referenčni standard E2 (rdeča krivulja) smo testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:2, metoksiklor (pozitivna kontrola) v koncentraciji  $3,13 \mu\text{g/mL}$ , kontrolo topila DMSO pa v  $1\%$  (v/v) koncentraciji v gojitvenem mediju DMEM+. Modra ravna črta predstavlja povprečje kontrole topila DMSO +  $3x$  SD in označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost (pozitiven odziv nad, negativen pod modro črto).

### C.) Comprehensive test za bisfenol A in bisfenol AF, 3. ponovitev testa

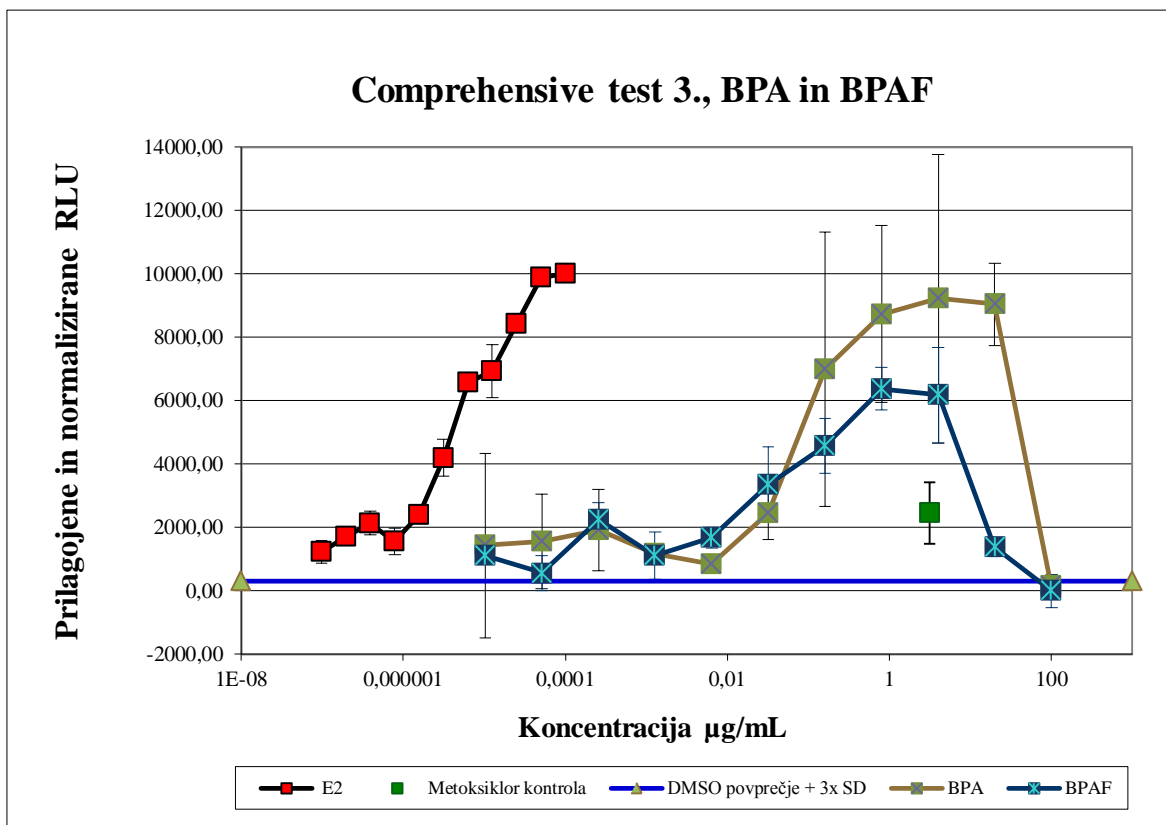
Izjemoma smo 3. ponovitev testiranja začeli s koncentracijo  $C_1=100 \mu\text{g/mL}$ , kateri so se vse naslednje koncentracije ustrezno prilagodile. Rezultati 3. ponovitve testa za BPA in BPAF so prikazani na **grafu 6**. Preglednica VIII ponazarja vizualno oceno citotoksičnosti.

**Preglednica VIII:**  $C_1= 1 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ ;  $C_2= 2 \times 10^1 \mu\text{g/mL}$

Vizualna ocena citotoksičnosti	
BPA	BPAF
$C_1$ - (4)	$C_1$ - (3)
$C_2$ - (2)	$C_2$ - (3)

Rezultati na grafu 6 ustrezajo kriterijem sprejemljivosti, test je veljaven. Indukcija plošče je znašala 8,356 (kriterij  $> 3$ ). Povprečna RLU vrednost kontrole topila DMSO je znotraj območja vrednosti  $2,5 \times \text{SD}$  iz baze podatkov. Pozitivna kontrola metoksiklor se na grafu nahaja nad modro črto. Krivulja referenčnega standarda E2 ustreza sigmoidni obliki. Koncentracije na krivulji E2, ki bi lahko spadale v linearno območje, so npr.:  $C_5$ – $C_7$ .

Za opredelitev spojine, pozitivne za agonistično estrogenu aktivnost, mora biti njena amplituda odziva vsaj 20% maksimalne RLU vrednosti referenčnega estrogenu. Amplitudi odziva za BPA in BPAF lahko ocenimo večji od 2000 RLU, s čimer ustrezata kriteriju. Obenem točke na baznih linijah v tem primeru ne variirajo toliko kot pri 1. ponovitvi. Rezultati BPA bi dajali ustrežnejšo koncentracijsko krivuljo, če ne upoštevamo prve koncentracije  $C_1=100 \mu\text{g/mL}$ , ki pa smo jo izjemoma vključili v testiranje, saj je citotoksična. Krivulja ima pozitiven naklon s tremi točkami v linearnem območju, npr.  $C_5$ – $C_7$ . Rezultati BPAF prav tako ne dajejo značilne sigmoidne koncentracijske krivulje. Krivulja se ne zaključi s platojem ali vrhom. Upoštevati pa moramo dejstvo, da smo testiranje začeli s koncentracijo  $C_1=100 \mu\text{g/mL}$ , pri kateri je BPAF (isto BPA) glede na MTS test citotoksičen. Tudi naslednja koncentracija  $C_2=20 \mu\text{g/mL}$  je citotoksična, šele pri koncentraciji  $C_3=4 \mu\text{g/mL}$  testiranje poteka pri necitotoksični koncentraciji (glede na MTS). Če upoštevamo to dejstvo, potem je tudi krivulja za BPAF podobna sigmoidni obliki. Ker je bil test veljaven in sta hkrati bisfenola zadoščala kriterijem za pozitivno agonistično estrogenu aktivnost, smo izračunali  $EC_{50}$  vrednosti:  $BPA=3,037 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  in  $BPAF=5,690 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ .

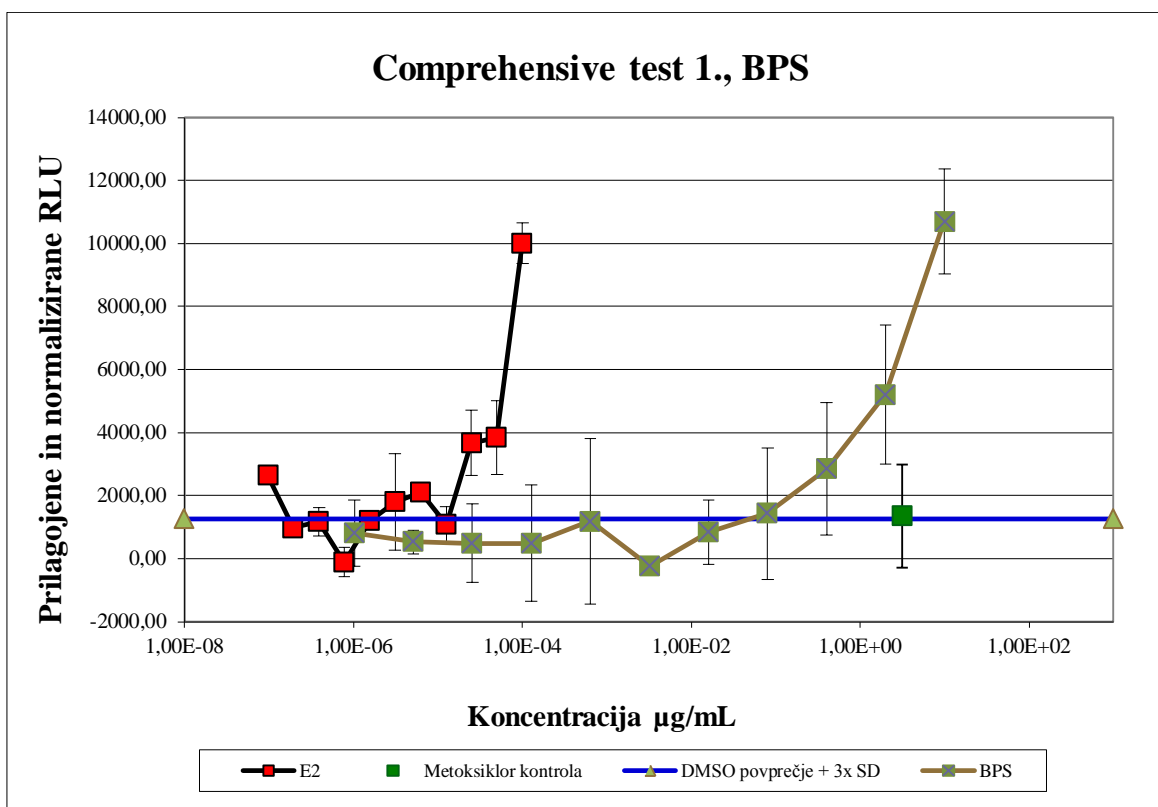


**Graf 6: 3. ponovitev testa:** Graf prikazuje normalizirane in prilagojene vrednosti luminiscence (RLU) v odvisnosti od koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na celični liniji BG1Luc4E2 (18. pasaža) smo BPA in BPAF (zelena in modra krivulja) testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:5 in začetno koncentracijo 100  $\mu\text{g/mL}$ . Referenčni standard E2 (rdeča krivulja) smo testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:2, metoksiklor (pozitivna kontrola) v koncentraciji 3,13  $\mu\text{g/mL}$ , kontrolo topila DMSO pa v 1 % (v/v) koncentraciji v gojitvenem mediju DMEM+. Modra ravna črta predstavlja povprečje kontrole topila DMSO + 3x SD in označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost (pozitiven odziv nad, negativen pod modro črto).

Koncentracije BPA, ki se nahajajo pod 2000 RLU so:  $C_1 = 100 \mu\text{g/mL}$ ,  $C_6 = 3,2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ ,  $C_7 = 6,4 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ ,  $C_8 = 1,28 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ ,  $C_9 = 2,56 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ ,  $C_{10} = 5,12 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$  in  $C_{11} = 1,02 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ . Pri BPAF so to:  $C_1 = 100 \mu\text{g/mL}$ ,  $C_2 = 20 \mu\text{g/mL}$  in enako kot pri BPA  $C_7 - C_{11}$ . Krivulji BPA in BPAF se v večini nahajata nad modro črto, kar označuje pozitivno agonistično estrogeno aktivnost, razen pri citotoksični koncentraciji  $C_1 = 100 \mu\text{g/mL}$ . Bisfenola s tem ne ustrezata kriteriju za negativno agonistično estrogeno klasifikacijo spojin saj se vse RLU vrednosti ne nahajajo pod 2000 RLU, ki označuje 20 % maksimalne RLU vrednosti referenčnega estrogena.

#### D.) Comprehensive test za bisfenol S, 1. ponovitev testa

Rezultati vizualne ocene citotoksičnosti BPS pri koncentraciji  $C_1=10 \mu\text{g/mL}$  so pokazali zmanjšano število celic, kar smo ocenili s stopnjo 2. Pri referenčnem standardu E2 smo pri koncentraciji  $C_1=1 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$  tudi opazili zmanjšano število celic in ocenili s stopnjo 2. Rezultati 1. ponovitve comprehensive testa za BPS so prikazani na **grafu 7**. Rezultati ne ustrezajo vsem kriterijem sprejemljivosti za comprehensive test, test je neveljaven. Indukcija plošče je znašala 4,225, kar sicer ustreza kriteriju  $> 3$ . Prav tako je test ustrezal kriterijema za kontrolo topila DMSO in pozitivno kontrolo metoksiklor. Krivulja referenčnega standarda E2, ki naj bi imela sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega območja koncentracijske krivulje, pa temu kriteriju nikakor ne zadostuje.



**Graf 7: 1. ponovitev testa.** Graf prikazuje normalizirane in prilagojene vrednosti luminiscence (RLU) v odvisnosti od koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na celični liniji BG1Luc4E2 (20. pasaža) smo BPS (zelena krivulja) testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:5 in začetno koncentracijo  $10 \mu\text{g/mL}$ . Referenčni standard E2 (rdeča krivulja) smo testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:2, metoksiklor (pozitivna kontrola) v koncentraciji  $3,13 \mu\text{g/mL}$ , kontrolo topila DMSO pa v 1 % (v/v) koncentraciji v gojitvenem mediju DMEM+. Modra ravna črta predstavlja povprečje kontrole topila DMSO + 3x SD in označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost.



## E.) Comprehensive test za bisfenol S, 2. ponovitev testa

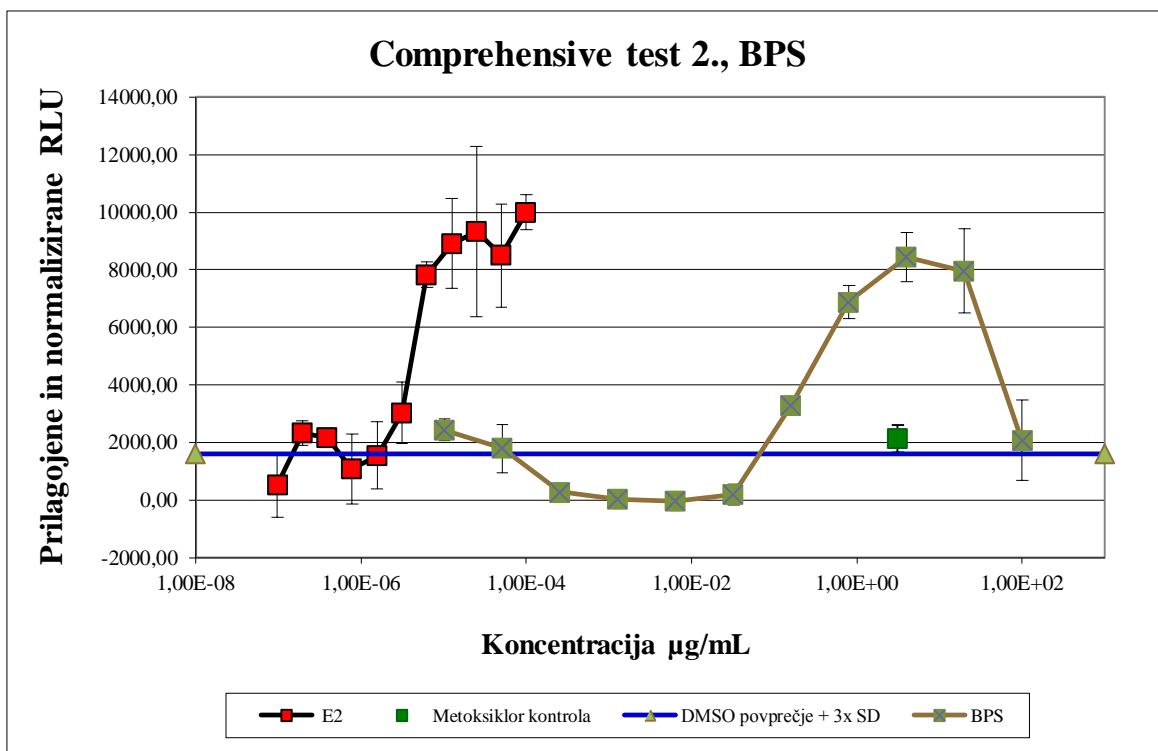
Pred merjenjem luminiscence smo vizualno ocenili citotoksičnost BPS. Pri prvi koncentraciji  $C_1=100 \mu\text{g/mL}$  smo opazili zmanjšano število celic in citotoksičnost ocenili s stopnjo 3. Pri koncentracijah  $C_2=20 \mu\text{g/mL}$  in  $C_3=4 \mu\text{g/mL}$  smo citotoksičnost označili s stopnjo 2. Izjemoma smo 2. ponovitev testiranja začeli s koncentracijo  $C_1=100 \mu\text{g/mL}$ , kateri so se vse naslednje koncentracije ustrezno prilagodile. Rezultati 2. ponovitve comprehensive testa za BPS so prikazani na **grafu 8**.

Rezultati na grafu 8 ustrezajo kriterijem sprejemljivosti za comprehensive test, test je veljaven. Indukcija plošče je znašala 3,875, (kriterij  $> 3$ ). Prav tako je povprečna RLU vrednost kontrole topila DMSO znotraj območja vrednosti  $2,5x$  SD iz baze podatkov. Pozitivna kontrola metoksiklor se na grafu nahaja malo nad modro črto in zadostuje kriteriju. Krivulja za referenčni standard E2 je kriteriju o sigmoidni obliki v grobem ustrezala, kljub temu da so točke na bazni liniji variirale, koncentracija  $C_2$  pa bi morala imeti nekoliko večji odziv za doseg optimalnejše sigmoidne oblike krivulje. Koncentracije na krivulji E2, ki bi lahko spadale v linearno območje, so npr.:  $C_4-C_7$ .

Bisfenol S smo izjemoma testirali pri 10-krat višjih koncentracijah ( $C_1= 100 \mu\text{g/mL}$ ), saj smo glede na rezultate 1. ponovitve želeli preveriti odziv pri 10-krat večji koncentraciji. Za opredelitev spojine, pozitivne za agonistično estrogenu aktivnost, mora biti njena amplituda odziva vsaj 20% maksimalne RLU vrednosti referenčnega estrogenu. Amplituda odziva za BPS je večja od 2000, če ne upoštevamo koncentracije  $C_1$ , ki se je izkazala za citotoksično. Krivulja BPS ne daje ustrezne sigmoidne oblike. Začetna koncentracija  $C_1= 100 \mu\text{g/mL}$  je glede na  $C_2= 20 \mu\text{g/mL}$  močno znižana, zato lahko zaključimo, da je citotoksična in je ne upoštevamo (glede na MTS test bi BPS pri konc.  $100 \mu\text{g/mL}$  moral biti necitotoksičen). Krivulja ima sicer pozitiven naklon s koncentracijami  $C_4-C_5$  v linearnem območju in se zaključuje s platojem, če ne upoštevamo začetne koncentracije  $C_1$ . Ker je bil test veljaven in je BPS hkrati zadoščal kriterijem za pozitivno agonistično estrogenu aktivnost, smo zanj izračunali  $EC_{50}$  vrednost  $9,706 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ .

Vrednosti BPS, ki se nahajajo pod 2000 RLU so pri koncentracijah  $C_6-C_{10}$ . Vrednosti BPS, ki se nahajajo pod modro črto na grafu, ki označuje mejo med pozitivnim in negativnim estrogenskim odzivom pa so pri koncentracijah  $C_6-C_9$ . BPS s tem ne ustreza

kriteriju za negativno klasifikacijo spojin za agonistično estrogeno aktivnost, saj se vse RLU vrednosti ne nahajajo pod 2000 RLU, ki označuje 20 % maksimalne RLU vrednosti referenčnega estrogena.



**Graf 8: 2. ponovitev testa.** Graf prikazuje normalizirane in prilagojene vrednosti luminiscence (RLU) v odvisnosti od koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na celični liniji BG1Luc4E2 (21. pasaža) smo BPS (zelena krivulja) testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:5 in začetno koncentracijo  $100 \mu\text{g/mL}$ . Referenčni standard E2 (rdeča krivulja) smo testirali v 11-ih različnih koncentracijah z razmerjem redčenja 1:2, metoksiklor (pozitivna kontrola) v koncentraciji  $3,13 \mu\text{g/mL}$ , kontrolo topila DMSO pa v 1 % (v/v) koncentraciji v gojitvenem mediju DMEM+. Modra ravna črta predstavlja povprečje kontrole topila DMSO + 3x SD in označuje mejo med pozitivnim in negativnim odzivom za agonistično estrogeno aktivnost (pozitiven odziv nad, negativen pod modro črto).

Rezultati veljavnih comprehensive testiranj (1. in 3. ponovitev za BPA in BPAF ter 2. ponovitev za BPS) ne ustrezajo povsem pozitivni klasifikaciji za agonistično estrogeno aktivnost, saj koncentracijske krivulje ne dosegajo optimalne sigmoidne oblike. Kljub temu smo za ta testiranja z uporabo računalniškega programa GraphPad Prism, ki je prilagodil eksperimentalne podatke dobljenih krivulj (curve fitting), izračunali  $EC_{50}$  vrednosti bisfenolov. Z upoštevanjem slednjih smo bisfenole razvrstili glede na največjo jakost estrogenega delovanja. Če izračunamo povprečje, je  $EC_{50}$  vrednost za BPA znašala

$2,089 \times 10^{-7}$  M, za BPAF  $7,356 \times 10^{-8}$  M ter za BPS  $9,706 \times 10^{-7}$  M. Po definiciji je  $EC_{50}$  vrednost koncentracija agonista, ki izzove učinek, enak 50 % maksimalnega učinka in je hkrati merilo, ki določa jakost agonista. Pri tem manjša  $EC_{50}$  vrednost nakazuje na večjo jakost agonista pri primerljivih maksimalnih odzivih ( $E_{max}$ ). V našem testu  $EC_{50}$  vrednost določa jakost agonistične estrogene aktivnosti bisfenolov na estrogenskih receptorjih ER- $\alpha$  in ER- $\beta$  celične linije BG1Luc4E2. Glede na to, da BG1 celična linija endogeno izraža pretežno ER- $\alpha$  receptorje (90 %), bi lahko natančneje govorili o agonistični estrogenu aktivnosti na ER- $\alpha$  receptorjih. Pri primerjavi  $EC_{50}$  vrednosti vidimo, da je ta najmanjša pri BPAF, sledi ji BPA, največja  $EC_{50}$  vrednost pa je izračunana pri BPS. Iz tega lahko sklepamo, da BPAF izkazuje najmočnejšo, BPS pa najšibkejšo agonistično estrogenu aktivnost. Če primerjamo rezultate našega eksperimentalnega dela z objavljenimi ugotovitvami nekaterih raziskovalnih skupin, lahko opazimo skladnost z njihovimi zaključki.

Podatki iz literature raziskovalne skupine Kitamura et al., kjer so z luciferaznim reporterskim testom na celični liniji MCF-7 (človeške rakave celice dojke) preučevali agonistično estrogenu aktivnost BPA in analogov, navajajo enako  $EC_{50}$  zaporedje bisfenolov. BPAF je v njihovem primeru dosegel  $EC_{50}$  vrednost  $0,05 \mu\text{M}$ , BPA  $0,63 \mu\text{M}$  in BPS  $1,1 \mu\text{M}$ . Ugotovili so tudi, da se estrogenu aktivnost zmanjša pri tistih BPA analogih, pri katerih je vmesni metilenski most BPA substituiran s hidrofilno skupino (kot npr. pri BPS), in da se ta poveča pri tistih s hidrofobno skupino (kot npr. pri BPAF). S slednjo naj bi vezavni žep estrogenskega receptorja tudi ugodneje interagirala. Obenem sta za estrogenu delovanje BPA analogov nujno potrebni prosti 4-OH skupini na A in B fenilnem obroču. V splošnem se za ligande na estrogenskih receptorjih zahteva prosta OH skupina na arilnem obroču s hidrofobno skupino, pritrjeno na para mestu glede na OH (62).

V študiji Matshushima et al. so določali afiniteto vezave BPA in BPAF na ER- $\alpha$  in - $\beta$ . Ugotovili so 20-krat večjo afiniteto vezave BPAF na ER- $\alpha$  in 50-krat večjo afiniteto na ER- $\beta$  v primerjavi z BPA. Obenem so z luciferaznim reporterskim testom na HeLa celični liniji ugotovili, da BPAF deluje na ER- $\alpha$  kot močan agonist, na ER- $\beta$  pa kot antagonist.  $EC_{50}$  vrednost za BPAF na ER- $\alpha$  je znašala  $58,7 \text{ nM}$ , medtem ko za BPA  $317 \text{ nM}$  (59).

V študiji Molina-Molina et al. so na celični liniji MELN (pridobljeni iz celične linije MCF-7), ki izraža ER- $\alpha$  receptorje ter je stabilno transficirana z luciferaznim reporterskim genom, preučevali transkripcijsko aktivnost BPA in BPS. Oba bisfenola sta inducirala luciferazno aktivnost, vendar je BPA izkazal večjo učinkovitost in jakost estrogenega

delovanja kot BPS. Selektivnost na  $\alpha$  oz.  $\beta$  receptorjih so ugotavljali tudi s pomočjo reporterskih celičnih linij HELN-ER- $\alpha$  in HELN-ER- $\beta$ . Pri tem je BPS izkazoval večje estrogeno delovanje na ER- $\beta$  celični liniji oz. na  $\beta$  estrogenskem receptorju (81). Do podobnih zaključkov pa so prišli tudi v študiji Grignard et al. Z uporabo OECD testne smernice TG 455, prav tako na celični liniji BG1Luc4E2, so prišli do ugotovitev, da je BPA ( $3,95 \times 10^{-7}$  M) močnejši agonist od BPS ( $4,93 \times 10^{-6}$  M) na estrogenskih receptorjih, natančneje za faktor 10. Hkrati so za oba bisfenola določili približno 100.000-krat manjšo jakost estrogenega delovanja v primerjavi z 17- $\beta$  estradiolom (82).

Testiranje z LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodo bi morali vsekakor ponoviti, da bi lahko dobili ustrežnejše rezultate (večja indukcija plošče in optimalnejše sigmoidne krivulje) za zanesljivo uvrstitev preiskovanih spojin med pozitivne za agonistično estrogeno aktivnost na estrogenskih receptorjih (ER- $\alpha$  in - $\beta$ ). Verjetno bi morali na novo vzgojiti celice od začetne pasaže 1, jih ponovno selekcionirati in sproti preverjati njihovo odzivnost z referenčnim estrogenom. Poleg LUMI-CELL<sup>®</sup> ER testiranja na BG1Luc4E2 celični liniji pa bi bilo smiselno uporabiti tudi katero drugo celično linijo, ki endogeno izraža estrogenske receptorje, in preveriti, ali se morda transkripcijska aktivnost razlikuje tudi glede na tkivno specifičnost (npr. uporaba OECD smernice TG 455 za določanje estrogene agonistične aktivnosti na ER $\alpha$ -HeLa-9903 celični liniji). Poleg tega bi bilo za celovitejšo oceno estrogenega delovanja smiselno preveriti tudi aktivnost bisfenolov na drugih estrogenskih receptorjih, npr. ERR $\gamma$ . *In vitro* testiranja pa bi lahko dopolnili tudi z *in vivo* testiranjem estrogenega agonističnega delovanja, npr. z uporabo OECD smernice TG 440. To je uterotropični biološki test na glodavcih (kratkotrajni presejalni test za določanje estrogene aktivnosti), ki temelji na povečanju teže maternice oz. uterotropičnem odzivu in s tem ocenjuje, kolikšna je sposobnost spojin, da izzovejo biološki odziv, primerljiv z naravnimi estrogeni. Primerjava rezultatov *in vivo* testiranj bi nam omogočila celovitejšo oceno estrogenega delovanja posameznega bisfenola, saj imajo metaboliti pogostokrat spremenjeno delovanje v primerjavi z izhodno spojino. Vendar pa tudi rezultate *in vivo* testiranj, pridobljenih na živalskem testnem sistemu, ne bi mogli v celoti ekstrapolirati na človeka, saj se metabolizem in ostali farmakokinetični procesi v organizmu lahko tudi vrstno razlikujejo.

## 6. SKLEP

V diplomski nalogi smo določevali citotoksičnost in agonistično estrogeno aktivnost trem bisfenolom: bisfenolu A, bisfenolu AF in bisfenolu S z uporabo MTS testa citotoksičnosti in OECD validirane *in vitro* testne metode LUMI-CELL<sup>®</sup> ER. Ljudje in živali smo bisfenolom zaradi njihove široke uporabnosti vsakodnevno izpostavljeni preko številnih različnih virov. Vedno več je tudi dokazov, da te spojine delujejo kot hormonski motilci, kar predstavlja resen zdravstveni problem, predvsem zaradi visoke incidence in naraščajočega trenda endokrino-povezanih obolenj in motenj.

Sprva smo testirali območje linearnosti MTS testa in kot primerno koncentracijo celic BG1Luc4E2, ki daje linearno razmerje med koncentracijo in odzivom, določili 10.000 celic/vdolbino. Na osnovi rezultatov MTS testiranja citotoksičnosti bisfenolov na celični liniji BG1Luc4E2 smo zaključili, da je koncentracija 0,01 mg/mL necitotoksična pri vseh bisfenolih in s tem tudi primerna za testiranje agonistične estrogene aktivnosti z LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodo. Obenem je bisfenol S za razliko od bisfenolov A in AF necitotoksičen tudi pri 10-krat večji koncentraciji 0,1 mg/mL. S primerjavo bisfenolov lahko zaključimo, da je najbolj citotoksičen BPAF, sledita mu BPA in BPS. Smiselno bi bilo testirati citotoksičnost tudi pri drugih, vmesnih koncentracijah, da bi natančneje ugotovili, katera je najmanjša koncentracija, ki povzroča citotoksičnost. Rezultati testiranja z LUMI-CELL<sup>®</sup> ER metodo so v grobem zadostovali kriterijem za opredelitev spojin, pozitivnih na agonistično estrogeno aktivnost. Z uporabo programa GraphPad Prism smo bisfenolom določili tudi EC<sub>50</sub> vrednosti. Povprečna EC<sub>50</sub> vrednost za BPAF je znašala  $7,356 \times 10^{-8}$  M, za BPA  $2,089 \times 10^{-7}$  M ter za BPS  $9,706 \times 10^{-7}$  M. S primerjavo EC<sub>50</sub> vrednosti lahko zaključimo, da največjo jakost agonističnega estrogenega delovanja na estrogenskih receptorjih celične linije BG1Luc4E2 izkazuje BPAF, sledi mu BPA in BPS.

Testiranje agonistične estrogene aktivnosti bi bilo smiselno ponoviti, najprimernejše na sveži celični liniji BG1Luc4E2. Za celovito oceno tveganja bi bilo smiselno vpeljati tudi *in vivo* testiranje agonistične estrogene aktivnosti bisfenolov A, AF in S, saj so *in vitro* testiranja v splošnem omejena na en specifični mehanizem. Ta pa morda sploh ne posnema *in vivo* mehanizmov delovanja oz. odraža kompleksnih interakcij v intaktnem organizmu. ADME procesi imajo pogostokrat ključno vlogo pri določanju biološke aktivnosti, zato rezultate *in vitro* testiranja ne moremo ekstrapolirati na celoten organizem.

## 7. LITERATURA

1. WHO/UNEP: State of the science of endocrine disrupting chemicals-2012, WHO Library Cataloguing in Publication data 2013.
2. Swedenborg E, Ruegg J, Makela S, Pongratz I: Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology* 2009; 43: 1–10.
3. European Commission, What are endocrine disruptors: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm), dostop: 12.10.2013.
4. European Commission, What areas might endocrine disruptors affect: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/affect\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/affect_en.htm), dostop: 12.10.2013.
5. Markey CM, Rubin BS, Soto AM, Sonnenschein C: Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 83(1–5): 235–244.
6. Vogel SA: The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety”. *American Journal of Public Health*; 2009; 99(3): 559-566.
7. EPA, Endocrine disruptor research: <http://www.epa.gov/research/endocrinedisruption/faq.htm#2>, dostop 12.10.2013.
8. 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.
9. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP: Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 2012; 33(3): 378-455.
10. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Myers JP, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT: Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reproductive Toxicology* 2013; 38: 1–15.

11. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ: Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127(3–5): 204–215.
12. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reproductive Toxicology* 2011; 31(3): 337–343.
13. European Environment Agency: The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments – The Weybridge+15 (1996–2011) report. EEA Technical report 2012; No 2.
14. EEA, Increase in cancers and fertility problems may be caused by household chemicals pharmaceuticals: <http://www.eea.europa.eu/media/newsreleases/increase-in-cancers-and-fertility>, dostop 4.9.2013.
15. EPA: Endocrine disruptor screening program (EDSP): <http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm>, dostop 4.9.2013.
16. <http://e.hormone.tulane.edu/learning/endocrine-system.html>, dostop 4.9.2013.
17. Berne RM, Levy MN, Koeppe BM, Stanton BA: *Berne & Levy Physiology*, 6<sup>th</sup> Edition, Mosby/Elsevier, Philadelphia, 2008: 653-663, 769-797.
18. Hall JE: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 12<sup>th</sup> Edition, Elsevier Inc., 2011: 881-893, 921-933, 987-999.
19. Mahoney MM, Padmanabhan V: Developmental programming: Impact of fetal exposure to endocrine disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010; 247(2): 98-104.
20. Fowden AL, Forhead AJ: Hormones as epigenetic signals in developmental programming. *Experimental Physiology* 2009; 94: 607-625.
21. Williams DA, Lemke TL: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 877-882, 1301-1307.
22. Hu G, Wang J: Ligand selectivity of estrogen receptors by a molecular dynamics study. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; *in press*.
23. Gao H, Dahlman-Wright K: The gene regulatory networks controlled by estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 334(1–2): 83-90.
24. <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SI&lllan=sl&productNumber=239658&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Finterface%3DA>

- 26term%3Dbisphenol%2BA%26lang%3Den%26region%3DSI%26focus%3DproD  
Dpr%26N%3D0%2B220003048%2B219853238%2B219853286%26mode%3Dm  
DDmD%2520partialmax, dostop 21.8.2013.
25. Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Ž, Peterlin Mašič L: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in Vitro* 2013; 27(4): 1267–1276.
  26. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM: Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews* 2009; 30(1): 75–95.
  27. Kolšek K, Mavri J, Sollner Dolenc M: Reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with DNA. A quantum chemical study. *Toxicology in Vitro* 2012; 26(1): 102–106.
  28. FAO/WHO: Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A:  
[http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/BPA\\_Summary2010.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/BPA_Summary2010.pdf), dostop 19.8.2013.
  29. Rubin BS: Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127(1–2) 27–34.
  30. Canada Gazette: Order Amending Schedule I to the Hazardous Products Act (bisphenol A): <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2010/2010-03-31/html/sor-dors53-eng.html>, dostop 22.8.2013.
  31. <http://www.bisphenol-a-europe.org/index.php?page=additional-legislation>, dostop 22.8.2013.
  32. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm>, dostop 22.8.2013.
  33. Janet Raloff: FDA bans BPA in baby bottles, cups:  
<https://www.sciencenews.org/blog/science-public/fda-bans-bpa-baby-bottles-cups>, dostop 22.8.2013.
  34. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/index-eng.php>, dostop 22.8.2013.
  35. <http://www.fda.gov/newsevents/publichealthfocus/ucm064437.htm>, dostop 22.8.2013.
  36. EFSA: EFSA re-evaluates safety of bisphenol A and sets tolerable daily intake:  
<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/afc070129.htm>, dostop 22.8.2013.



37. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W: Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology* 2002; 15(10): 1281–1287.
38. FAO/WHO: Bisphenol A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO:  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf), dostop 24.8.2013.
39. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR: In Vitro and in Vivo Interactions of Bisphenol A and Its Metabolite, Bisphenol A Glucuronide, with Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Chemical Research in Toxicology* 2001; 14(2): 149–157.
40. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S: Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 2008; 74(1): 33–36.
41. Shimizu M, Ohta K, Matsumoto Y, Fukuoka M, Ohno Y, Ozawa S: Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology in Vitro* 2002; 16(5): 549–556.
42. Kurebayashi H, Okudaira K, Ohno Y: Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicology Letters* 2010; 198(2): 210–215.
43. Trdan Lušin T, Roškar R, Mrhar A: Evaluation of bisphenol A glucuronidation according to UGT1A1\*28 polymorphism by a new LC–MS/MS assay. *Toxicology* 2012; 292(1): 33–41.
44. Ginsberg G, Rice DC: Does Rapid Metabolism Ensure Negligible Risk from Bisphenol A? *Environmental Health Perspectives* 2009; 117(11): 1639–1643.
45. Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH: Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both. *Environmental Health Perspectives* 2009; 117(5): 784–789.
46. Völkel W, Bittner N, Dekant W: Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug metabolism and disposition* 2005; 33(11): 1748–1757.
47. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G: Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate

- Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 2010; 118(8): 1055–1070.
48. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS: Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 2010; 5(1): 8673.
  49. Dodds EC, Lawson W: Synthetic estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* 1936; 137: 996.
  50. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I, Nadal A: Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012; 355(2): 201-207.
  51. Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ: The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior* 2011; 59(3): 296–305.
  52. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS: Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology* 2006; 147(6): 56–69.
  53. Delfosse V, Grimaldi M, Pons JL, Boulahtouf A, le Maire A, Cavailles V, Labesse G, Bourguet W, Balaguer P: Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *PNAS* 2012; 109(37): 14930–14935.
  54. Teng C, Goodwin B, Shockley K, Xia M, Huang R, Norris J, Merrick BA, Jetten AM, Austin CP, Tice RR: Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* 2013; 203(3): 556–564.
  55. Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, De Felice M, Ambrosino C: Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* 2013; 304: 21-31.
  56. <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SI&language=sl&productNumber=257591&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Finterface%3DCAID%2520No.%26term%3D1478-61-1%26lang%3Den%26region%3DSI%26focus%3Dproduct%26N%3D0%2B220003220%2B219853238%2B219853286%26mode%3Dmatch%2520partialmax, dostop> 12.8.2013.

57. NTP: Chemical information profile for bisphenol AF (CAS No. 1478-61-1): [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem\\_background/exsumpdf/bisphenolaf\\_093008\\_508.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bisphenolaf_093008_508.pdf). dostop 12.8.2013.
58. Yang Y, Yin J, Yang Y, Zhou N, Zhang J, Shao B, Wu Y: Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2012; 901: 93–97.
59. Matsushima A, Liu X, Okada H, Shimohigashi M, Shimohigashi Y: Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER $\alpha$  but a Highly Specific Antagonist for ER  $\beta$ . *Environmental Health Perspectives* 2010; 118(9): 1267–1272.
60. Lee S, Kim YK, Shin TY, Kim SH: Neurotoxic Effects of Bisphenol AF on Calcium-Induced ROS and MAPKs. *Neurotoxicity Research* 2013; 23(3): 249–259.
61. Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Li M, Shao B: Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicology Letters* 2012; 211(2): 201–209.
62. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S: Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences* 2005; 84(2): 249–259.
63. <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SI&lllllan=sl&productNumber=103039&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Finterface%3DCAD%2520No.%26term%3D80-09%201%26lang%3Den%26region%3DSI%26focus%3Dproduct%26N%3D0%2B220003048%2B219853238%2B219853286%26mode%3Dmatch%2520partialmax>, dostop 21.7.2013.
64. 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.
65. Liao C, Kannan K: Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013; 61(19): 4655–4662.

66. 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.
67. Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K: Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science&Technology* 2013; 47(15): 8793–8800.
68. Rogers JM, Denison MS: Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors : Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In vitro & molecular toxicology* 2000; 13(1): 67–82.
69. Baldwin WS, Curtis SW, Cauthen CA, Risinger JI, Korach KS, Barrett JC: BG-1 ovarian cell line: An alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 1998; 34(8): 649–654.
70. ICCVAM, NICEATM: ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals. NIH Publication Number 11-7850 2011; 1-559.
71. CDC: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition, Appendix H: Working with human, NHP and other mammalian cells and tissues: [http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5\\_appendixH.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_appendixH.pdf), dostop 15.10.2013.
72. Aschner M, Suñol C, Bal-Price AK: *Cell Culture Techniques, Neuromethods*, Humana Press 2011; 56: 1-25.
73. Promega Corporation: CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Technical Bulletin 2009; Part# TB245.
74. Gelbke HP, Kayser M, Poole A: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 2004; 205(1-2): 17–25.
75. <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>, dostop 3.10.2013.
76. Gouremelon A (OECD): OECD recent activities on endocrine disrupters testing and assessment: <http://www.efsa.europa.eu/en/events/documents/130320a-p05.pdf>, dostop 3.10.2013.

77. Dekant W, Colnot T: Endocrine effects of chemicals: Aspects of hazard identification and human health risk assessment. *Toxicology Letters* 2013; 223(3): 280–286.
78. <http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282012%2922&doclanguage=en>, dostop 3.10.2013.
79. OECD (2012), Test No. 457: BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD publishing 2012.
80. Promega Corporation: Luciferase Assay System; Instructions for use of products E1483, E1500, E1501, E1531, E4030, E4530 and E4550. Technical Bulletin 2011; Part# TB281.
81. Molina-Molina JM, Amaya E, Grimaldi M, Sáenz JM, Real M, Fernández MF, Balaguer P, Olea 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.
82. Grignard E, Lapenna S, Bremer S: Weak estrogenic activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in vitro* 2012; 26: 727–731.