

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA MIRNIK
DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA MIRNIK
**IN SILICO VREDNOTENJE METABOLIZMA,
ENDOKRINIH UČINKOV IN REPRODUKTIVNE
TOKSIČNOSTI IZBRANIH PARABENOV**

**IN SILICO EVALUATION OF METABOLISM,
ENDOCRINE EFFECTS AND REPRODUCTIVE TOXICITY
OF SELECTED PARABENS**

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za potrpežljivost, spodbudo in strokovno usmerjanje pri izdelavi diplomskega dela.

Najlepša hvala staršem, sestri in bratu, da ste mi tekom študija stali ob strani, me spodbujali in v teh letih niste obupali nad menoj. Hvala tudi ostalim domačim in prijateljem, da ste verjeli vame in mi polepšali študijska leta. Še posebej hvala Matjažu in sinu Luku za vso podporo in neomajno zaupanje vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko/magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Urška Mirnik

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm

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

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	1
1.1 ENDOKRINI SISTEM	1
1.1.1 HORMONI.....	1
1.1.2 RECEPTORJI.....	1
1.1.3 HORMONSKO RAVNOVESJE	2
1.2 ENDOKRINA TOKSIČNOST.....	2
1.2.1 HORMONSKI MOTILCI	2
1.2.2 UČINEK HORMONSKIH MOTILCEV	3
1.2.3 VRSTE HORMONSKIH MOTILCEV.....	4
1.2.4 DOLOČANJE HORMONSKIH MOTILCEV	5
1.3 REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST	6
1.4 <i>IN SILICO</i> METODE.....	6
1.4.1 SAR in QSAR MODELI.....	7
1.4.2 EKSPERTNI SISTEMI	8
1.4.3 PODATKOVNE BAZE.....	8
1.4.4 <i>IN SILICO</i> METODE NAPOVEDOVANJA METABOLIZMA.....	9
1.4.5 <i>IN SILICO</i> METODE NAPOVEDOVANJA ENDOKRINE TOKSIČNOSTI.....	10
1.4.6 <i>IN SILICO</i> METODE NAPOVEDOVANJA REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI	10
1.5 PARABENI	10
1.5.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI PARABENOV	10
1.5.2 BIOLOŠKA AKTIVNOST PARABENOV.....	11
1.5.3 IZPOSTAVLJENOST PARABENOM	11
1.6.4 ABSORPCIJA, DISTRIBUCIJA, METABOLIZEM, ELIMINACIJA	14
1.5.5 TOKSIČNI UČINKI	15
2. NAČRT ZA DELO	16
3. METODE IN MATERIALI	17
3.1 IZBRANI PARABENI	17
3.2 KONTROLE	18
3.3 UPORABLJENI PROGRAMI IN NJIHOVE NASTAVITVE	19
3.3.1 NAPOVED METABOLIZMA	19
3.3.2 NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI.....	20
3.3.3 NAPOVED RAZLIČNIH VIDIKOV REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....	22
4. REZULTATI in RAZPRAVA	25

4.1 METABOLIZEM PARABENOV	25
4.1.1 METILPARABEN	25
4.1.2 ETILPARABEN.....	26
4.1.3 PROPILPARABEN.....	28
4.1.4 BUTILPARABEN	30
4.1.5 IZOPROPILPARABEN	32
4.1.6 IZOBUTILPARABEN	34
4.1.7 PENTILPARABEN	36
4.1.8 HEPTILPARABEN	38
4.1.9 FENILPARABEN	41
4.1.10 BENZILPARABEN	42
4.1.11 P-HIDROKSIBENZOJSKA KISLINA.....	44
4.1.12 RAZPRAVA	46
4.2 ZBRANI METABOLITI.....	47
4.3 NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI.....	52
4.3.1 RELATIVE BINDING AFFINITY MODEL (VegaNIC).....	52
4.3.2 ENDOCRINE DISRUPTOME	54
4.3.3 RAZPRAVA	57
4.4 NAPOVED RAZLIČNIH VIDIKOV REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....	61
4.4.1 DEREK NEXUS	61
4.4.2 VEGANIC (Developmental Toxicity (CAESAR) 2.1.7).....	61
4.4.3 VEGANIC (Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0)	62
4.4.4 TEST	63
4.4.5 RAZPRAVA	65
5. SKLEP	68
6. VIRI IN LITERATURA.....	69
7. PRILOGA I	82
8. PRILOGA II	83
8.1 METABOLIZEM PARABENOV	83
8.2 ESTROGENSKA AKTIVNOST PARABENOV	84
8.3 (ANTI)ANDROGENSKA AKTIVNOST PARABENOV	88
8.4 REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST PARABENOV.....	89

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Izbrani parabeni, njihove CAS številke, SMILES kode ter strukture.	17
Preglednica II: Izbrani kontroli, njihovi CAS številki, SMILES kodi ter strukturi.	19
Preglednica III: Postavljene mejne vrednosti proste energije vezave (v kcal/mol) za receptorje.	22
Preglednica IV: Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.	47
Preglednica V: Rezultati s programom VegaNIC napovedane preko ER posredovane endokrine toksičnosti izbranih parabenov.	53
Preglednica VI: Rezultati s programom VegaNIC napovedane preko ER posredovane endokrine toksičnosti zbranih metabolitov izbranih parabenov.	53
Preglednica VII: Rezultati s programom Endocrine disruptome napovedane endokrine toksičnosti izbranih parabenov.	55
Preglednica VII: Rezultati s programom Endocrine disruptome napovedane endokrine toksičnosti zbranih metabolitov izbranih parabenov.	56
Preglednica IX: Rezultati napovedi različnih vidikov reproduktivne toksičnosti izbranih parabenov s pomočjo programov Derek Nexus, VegaNIC (Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7, Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0) in TEST.	64
Preglednica X: Rezultati napovedi različnih vidikov reproduktivne toksičnosti zbranih metabolitov izbranih parabenov s pomočjo programov Derek Nexus, VegaNIC (Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7, Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0) in TEST.	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema metabolizma metilparabena.....	26
Slika 2: Shema metabolizma etilparabena.....	27
Slika 3: Shema metabolizma propilparabena	29
Slika 4: Shema metabolizma butilparabena.....	32
Slika 5: Shema metabolizma izopropilparabena.....	33
Slika 6: Shema metabolizma izobutilparabena	35
Slika 7: Shema metabolizma pentilparabena.....	38
Slika 8: Shema metabolizma heptilparabena.....	40
Slika 9: Shema metabolizma fenilparabena	42
Slika 10: Shema metabolizma benzilparabena	44
Slika 11: Shema metabolizma p-hidroksibenzojske kisline.....	46

POVZETEK

Parabeni so kot konzervansi v kozmetični, prehrabni in farmacevtski industriji v uporabi že več kot 90 let. Predvsem metilparaben, etilparaben in propilparaben naj bi bili razmeroma varni, medtem ko so butilparaben, izopropilparaben, izobutilparaben, pentilparaben, heptilparaben, fenilparaben in benzilparaben precej manj raziskani. Od kar tako znanstveniki kot širša javnost precej pozornosti posvečajo t.i. hormonskim motilcem, je vprašanje njihove varnosti zopet odprto.

In silico metode za določanje absorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije in toksičnosti spojin, ki se v zadnjih treh desetletjih razvijajo vse hitreje, predstavljajo eno izmed potencialnih alternativ dragim ter dolgotrajnim *in vivo* metodam. Njihov razvoj spodbujajo tudi regulatorne ustanove Evropske unije v okviru Uredbe (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij, saj bi z njihovo pomočjo preprečili pretirano in nepotrebno testiranje kemikalij na živalih ter olajšali izdelavo mnenj obsežne količine kemikalij na evropskem trgu, ki jih zahteva zakonodaja. V diplomskem delu smo različne *in silico* metode uporabili za napoved metabolizma ter endokrine in reproduktivne toksičnosti desetih najbolj znanih parabenov.

S pomočjo programa Meteor Nexus smo napovedali metabolizem parabenov. Dobljeni rezultati so bili precej podobni rezultatom *in vitro* ter *in vivo* raziskav, dopuščajo pa tudi možnost nastanka določenih še nedokazanih metabolitov. Napovedane metabolite z izjemo konjugatov smo uporabili za nadaljnje raziskave.

S programom Endocrine Disruptome ter VegaNIC (Relative Binding Affinity Model) smo napovedali vezavno afiniteto parabenov in metabolitov na 12 različnih jedrnih receptorjev. Rezultati so potrdili, da obstaja potencial za endokrino toksičnost parabenov, povzročeno predvsem preko estrogenskih, androgenskih, glukokortikoidnih ter tiroidnih receptorjev. Potencial se povečuje z daljšanjem alkilne stranske verige parabena oz. s prisotnostjo aromatskega obroča v stranski skupini.

S programi Derek Nexus, VegaNIC in TEST smo napovedali različne vidike reproduktivne toksičnosti parabenov in metabolitov. Rezultati niso bili enoznačni, reproduktivne toksičnosti parabenov pa na njihovi podlagi ne moremo ne potrditi niti zavreči.

Do sedaj raziskave še niso podale dokončnih zaključkov o vplivu parabenov na endokrini sistem in reprodukcijo, zato so nujne še nadaljnje *in vitro*, *in vivo* ter epidemiološke raziskave. Naši rezultati potrjujejo tudi potrebo po nadaljnjem razvoju in optimizaciji *in silico* metod za določanje endokrine in reproduktivne toksičnosti spojin.

ABSTRACT

Parabens have been widely used as preservatives in cosmetics, food, and pharmaceutical industry for more than 90 years. Methylparaben, ethylparaben and propylparaben are supposed to be relatively safe, while butylparaben, isopropylparaben, isobutylparaben, pentylparaben, heptylparaben, phenylparaben and benzylparaben have been far less studied. Since both, scientists and general public have been paying a lot of attention to endocrine disrupters the question of safety of parabens has been reopened.

Increasingly developed during last three decades, *in silico* methods have become possible alternatives to costly and time consuming *in vivo* methods for predicting absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity of compounds. Their development has also been promoted by regulatory institutions of European Union within Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals in order to prevent excessive and unnecessary animal testing of chemicals and facilitate reporting on chemicals on the European market. We used some *in silico* methods for prediction of metabolism, endocrine and reproductive toxicity of ten most well-known parabens.

We used the Meteor Nexus program to predict the metabolism of parabens. The results are similar to those obtained by *in vitro* and *in vivo* studies, but they also allow the possibility of the formation of some previously undetected metabolites. The predicted metabolites, except the conjugates, were used for further studies.

We used Endocrine Disruptome and VegaNIC (Relative Binding Affinity Model) programmes to predict the binding affinity of parabens and metabolites to 12 different nuclear receptors. The results confirmed that there exists a potential for endocrine toxicity of parabens caused primarily through the oestrogen, androgen, glucocorticoid and thyroid receptor. The potential increases with longer parabene alkyl side chains or with the presence of the aromatic ring in the paraben side group.

We used Derek Nexus, VegaNIC and TEST programs to predict different aspects of parabens and metabolites reproductive toxicity. The results were inconsistent, we can neither confirm nor discard reproductive toxicity of parabens.

Until now, the research on the parabens endocrine and reproductive effects has not given final conclusions, therefore further *in vitro*, *in vivo* and epidemiological studies are necessary. Our results also point out the need for further development and optimization of *in silico* methods for determining endocrine and reproductive toxicity of compounds.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACS	acetil koencim A-sintaza
ADH	alkohol-dehidrogenaza
ADMET	absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity (absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje, toksičnost)
AR	androgenski receptor
BP	butilparaben
BzP	benzilparaben
CHO	Chinese hamster ovary (cells) (ovarijske (celice) kitajskega hrčka)
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CYP450	citokrom P450
EP	etilparaben
ER (α , β)	estrogenski receptor (alfa, beta)
EU	Evropska unija
FDA	Food and Drug Administration (Uprava za živila in zdravila)
FP	fenilparaben
GR	glukokortikoidni receptor
GRAS	generally recognized as safe (splošno sprejeto kot varno)
GST	glutathion-S-transferaza
HM	hormonski motilci
HP	heptilparaben
iBP	izobutilparaben
iPP	izopropilparaben
LXR (α , β)	liver X receptor (jetrni X receptor)
MP	metilparaben
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj)
PentP	pentilparaben
PHBA	parahidroksibenzojska kislina
PP	propilparaben
PPAR (α , β , γ)	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor (alfa, beta, gama)

(Q)SAR	(Quantitative) structure-activity relationship ((kvantitativno razmerje med strukturo in aktivnostjo)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij)
ROC	Receiver Operating Characteristics
RXR (α)	retinoidni X receptor (alfa)
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SULT	sulfotransferaza
TEST	The Toxicity Estimation Software Tool
TR (α , β)	tiroidni receptor (alfa, beta)
UGT	uridindifosfat-glukuronoziltransferaza
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike)

1.UVOD

1.1 ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem je mreža žlez in hormonov, ki imajo pomembno vlogo tako pri kratkoročnem kot tudi dolgoročnem uravnavanju procesov v telesu (1). Na molekulskem nivoju nadzoruje transkripcijo genov, sintezo in razgradnjo proteinov, aktivnost encimov, konformacije proteinov in interakcije med proteini. Na celičnem nivoju nadzoruje celično delitev, diferenciacijo, motiliteto, sekrecijo, privzem hranil in celično smrt. Na nivoju celotnega telesa pa skrbi za vzdrževanje homeostaze, nadzoruje metabolizem, skrbi za rast in razvoj, reprodukcijo in odzivanje na zunanje dražljaje (2).

1.1.1 HORMONI

Hormoni so molekule, ki jih v kri ali zunajcelično tekočino izločajo celice endokrinega sistema in po vezavi na specifičen receptor sprožijo ali zavrejo določen fiziološki učinek. Glede na učinek poznamo agoniste, antagonist, delne agoniste, inverzne agoniste ter mešane agoniste in antagonist. Delujejo lahko le na en tip celic ali pa na različne tipe celic. Obratno se lahko en tip celic odziva le na en hormon ali pa na več različnih hormonov. Glede na strukturo jih delimo na steroidne hormone (aldosteron, estrogen, testosteron, kortizol), proteine in peptide (antidiuretični hormon, folikel-stimulirajoči hormon, glukagon, rasni hormon, inzulin, luteinizirajoči hormon, oksitocin, prolaktin, tiroidni hormon, tirotropin, tiroliberin) ter derivate aminokislin (noradrenalin, adrenalin, trijodotironin, tiroksin) (3). Hormoni izkazujejo v organizmu učinek pri zelo nizkih koncentracijah (od 10^{-12} M do 10^{-7} M). Učinek hormona v odvisnosti od njegove koncentracije lahko običajno ponazorimo s sigmoidno krivuljo, obstajajo pa tudi bolj kompleksne krivulje v obliki črke U ali v obliki obrnjene črke U (4).

1.1.2 RECEPTORJI

Hidrofilni hormoni se vežejo na receptorje na zunanji strani celične membrane, hidrofobni pa na znotrajcelične receptorje v citosolu ali celičnem jedru. Receptorji imajo visoko afiniteto in zaradi številnih strukturnih podobnosti med različnimi hormoni tudi specifičnost za določen hormon. Njihovo število je končno, zato lahko pride do zasičenja receptorjev, vezava hormonov nanje pa je običajno reverzibilna. Številne celice prilagajajo število receptorjev, ki se na/v njih nahajajo, glede na količino stimulacije, ki jo preko njih prejmejo. Pogosta in intenzivna stimulacija povzroči upad števila receptorjev, obratno pa redka

stimulacija ali njeno pomanjkanje povzroči povišanje števila receptorjev (2,5). Preglednica z jedrnimi receptorji, njihovi ligandi in funkcijo se nahaja v Prilogi I (5).

1.1.3 HORMONSKO RAVNOVESJE

Vzdrževanje hormonskega ravnovesja v telesu je kompleksen proces, povezan z živčnim ter imunskim sistemom. Endokrine celice se odzivajo na različne notranje ali zunanje dražljaje (npr. vpliv koncentracije glukoze na izločanje inzulina, vpliv sesanja novorojenčka na izločanje prolaktina in oksitocina), lahko tudi na dražljaj povzročen z drugim hormonom (npr. vpliv hormonov hipotalamusa na sproščanje hormonov hipofize). Hormone lahko izločajo vsak dan, enkrat mesečno ali celo le enkrat letno. Pogosto izločanje hormonov sledi rednim vzorcem. Če pride v endokrinem sistemu do motenj, kot so nezadostno ali pretirano izločanje hormonov, se to kaže na različnih organih in funkcijah, kar lahko povzroči bolezen ter celo ogroža življenje (1). Koncentracija hormonov v krvnem obtoku mora biti zato ves čas ustrezno uravnana. Nanjo vpliva hitrost nastajanja hormona, hitrost porazdeljevanja v tarčne celice in hitrost razgradnje sproščenega hormona. Vse to je v telesu nadzorovano preko pozitivnih in negativnih povratnih zank ter nekaterih drugih mehanizmov, ki spremljajo in se odzivajo na spremembe v telesu. Večina hormonov se po sproščanju iz celic endokrinega sistema hitro razgradi v manj aktivno ali neaktivno obliko in izloči preko urina ali blata. Njihova biološka razpolovna doba v krvi je manj kot 10 minut, obstajajo pa tudi izjeme, npr. ščitnični hormoni z biološko razpolovno dobo od 1 do 5-7 dni. Ko koncentracija hormona v krvi upade, se zmanjša tudi koncentracija v medceličnini in celici, hormoni pa disociirajo z receptorjev (2,3).

1.2 ENDOKRINA TOKSIČNOST

1.2.1 HORMONSKI MOTILCI

V zadnjih dveh desetletjih tako znanstveniki kot širša javnost precej pozornosti posvečajo t.i. hormonskim motilcem (HM). Problem HM se je pod drobnogledom evropskih in ameriških regulatornih ustanov prvič znašel na srečanju v Weybridgu leta 1996, ko so se osredotočili predvsem na estrogene spojine in njihov preko receptorjev posredovan vpliv na reproduktivni sistem. Prva odkritja, da lahko HM zmotijo običajen razvoj in funkcijo moškega reproduktivnega sistema, so vodila v nadaljnje raziskave njihovega vpliva tudi na druge endokrine sisteme, preko drugih mehanizmov in njihovih učinkov ne samo na reprodukcijo, ampak tudi na možgane, kardiovaskularni sistem, prebavila, ščitnico idr. (4,6).

HM so »eksogene spojine ali zmesi spojin, ki spremenijo delovanje endokrinega sistema in posledično povzročijo škodljive učinke na zdravje nepoškodovanega organizma, njegovih potomcev ali (sub)populacij« (1). Delujejo lahko preko več različnih mehanizmov, in sicer lahko motijo ali se vpletajo v običajno sintezo, izločanje, transport, vezavo in metabolizem hormonov, kar sčasoma pripelje do deregulacije homeostatskih mehanizmov, reprodukcije in razvoja organizma (4). Čeprav so za vpliv HM na organizem enako pomembni vsi mehanizmi njihovega delovanja, je bilo do sedaj največ pozornosti posvečeno delovanju HM preko receptorjev. Podrobni mehanizmi delovanja različnih HM so še precej neraziskani. Zanje trenutno veljajo naslednja spoznanja:

- izpostavljenost HM v obdobju razvoja endokrinega sistema lahko vodi do trajnih sprememb njegovih funkcij ali občutljivosti na stimulatorne/inhibitorne dražljaje,
- pri odraslih z dobro razvitim homeostatskim mehanizmom se lahko zgodi, da izpostavljenost HM ne povzroči nikakršnih pomembnih sprememb, saj pride do kompenzacije endokrinih učinkov,
- v različnih življenjskih obdobjih lahko izpostavljenost enaki količini HM povzroči različne učinke,
- zaradi medsebojnih vplivov različnih komponent endokrinega sistema, se lahko učinki HM pojavijo nepredvideno, na drugih mestih kot je predvideno, da delujejo (1).

Podobno kot pri hormonih tudi pri HM učinek ni linearno odvisen od njihove koncentracije. Pogosto je krivulja učinka v odvisnosti od koncentracije v obliki črke U ali obrnjene črke U. To pomeni, da izkazujejo endokrini učinek le pri nizkih in visokih koncentracijah, v vmesnem intervalu koncentracij pa ne, ali obratno. Čeprav je afiniteta HM do receptorjev znatno nižja od afinitete hormonov, je možno, da delujejo tudi pri nizkih koncentracijah (4).

1.2.2 UČINEK HORMONSKIH MOTILCEV

Pojavlja se veliko vprašanj glede vpliva HM na zdravje ljudi. Pod drobnogledom je predvsem njihov vpliv na reprodukcijo, nevrološke vedenjske motnje, imunski sistem in različne vrste raka. Ker na razvoj in funkcijo reproduktivnega, centralnega živčnega in imunskega sistema najbolj vplivajo spolni in tiroidni hormoni, je večina do sedaj znanih eksperimentalnih raziskav usmerjenih prav na področje teh dveh hormonskih sistemov in njihovih tarčnih tkiv (1).

HM vplivajo na spremembe tako moškega kot tudi ženskega reproduktivnega zdravja. Obstaja vedno več dokazov, da so s HM povzročene motnje v razvoju moških spolnih

organov v fetalnem in neonatalnem obdobju pa tudi izpostavljenost HM v kasnejših obdobjih, vzrok za hipospadijo, kriptorhizem, zmanjšanje teže testisov in obmodka, zmanjšano produkcijo sperme in njeno motilnost, povečanje teže prostate ter zakasnen nastop pubertete (1, 7, 8). Pri ženskah izpostavljenost HM poveča tveganje za endometriozo, zgodnji nastop pubertete, sindrom policističnih jajčnikov in skrajšanje dojenja (9). Možno je tudi, da imajo HM komaj zaznavne, dolgotrajne učinke, ki vplivajo na splošni trend spreminjanja razmerja spolov v korist ženskega spola ter da so deloma odgovorni za povečanje števila spontanih splavov, vendar bodo za potrditev teh teorij potrebne še obsežne nadaljnje raziskave (1).

Številne v okolju prisotne kemikalije, vključno z nekaterimi potencialnimi HM, povzročajo nevrotoksične učinke, od motenj motorike in izgube spomina do komaj opaznih vedenjskih sprememb (10). Novorojenčki izpostavljeni HM imajo večje težave pri psihomotoričnem, nevrološkem in kognitivnem razvoju, kar bi lahko bila tudi posledica vpliva HM na tiroidni, estrogenski in androgenski sistem, saj vsi igrajo pomembno vlogo pri razvoju možganov in celotnega organizma (1, 6).

Številni HM posedujejo imunotoksične lastnosti, vendar pa je za le redke dokazano, da so posredovani z mehanizmi endokrine toksičnosti. Izpostavljenost majhnim koncentracijam določenih HM ima lahko neposreden učinek na imunsko funkcijo organizma preko vpliva na produkcijo citokinov (11). HM pa lahko vplivajo na imunski sistem tudi posredno, preko vplivov na sisteme imuno-modulatornih hormonov, npr. kortizola, kar lahko povzroči oslavljen imunski sistem ali poslabša potek avtoimunskih bolezni (12, 13).

Obstaja možnost, da so HM povezani s povečano incidenco določenih vrst raka, saj je rak hormonsko občutljivih tkiv, kot so maternica, dojke, prostata, testisi, ščitnica, odvisen predvsem od hormonskega okolja v telesu (1, 14). HM povezujejo tudi z debelostjo ter posledično s sladkorno boleznijo, hiperlipidemijo in povišanim krvnim pritiskom (6). Zadnje ugotovitve kažejo, da HM izkazujejo dolgotrajne učinke na potomce preko epigenetskih toksičnih mehanizmov, kot so spremembe v metilaciji DNA, modifikaciji histonov in izražanju ne-kodirajoče RNA (15, 16).

1.2.3 VRSTE HORMONSKIH MOTLCEV

V okolju se nahaja veliko število spojin, ki so hormonsko aktivne, pa naj bodo to sintezne spojine (pesticidi, industrijske kemikalije), ali naravne spojine (fitoestrogeni, estrogeni iz gliv). Nekateri so lipofilni in se v organizmu kopičijo v maščevju, medtem ko so druge lahko v organizmu prisotne le kratek čas, vendar v kritičnih obdobjih prav tako znatno

vplivajo na organizem. HM se tako po strukturi kot tudi po moči med seboj precej razlikujejo. Do leta 2012 je bilo znanih že okoli 800 različnih spojin, ki se obnašajo kot HM. Mednje sodijo tako naravni kot sintezni hormoni (estradiol, dietilstilbestrol), spojine rastlinskega izvora (genistein), mikotoksini (zearalenon), insekticidi (metoksiklor, diklorodifeniltrikloroetan, diklorodifenildikloroetilen), fungicidi (vinklozolin), snovi v industriji plastike ter potrošniških izdelkov (ftalati, alkilfenoli, bisfenoli, poliklorirani in polibromirani bifenili) in drugi stranski proizvodi in onesnaževala v industriji (17).

1.2.4 DOLOČANJE HORMONSKIH MOTILCEV

Ena izmed najbolj preučevanih in dognanih poti endokrine toksičnosti je neposredna interakcija hormonskega motilca in jedrnega receptorja, še posebej estrogenskega receptorja (ER) ter androgenskega receptorja (AR), raziskujejo pa tudi že druge poti, npr. vpliv na encime, ki sodelujejo pri metabolizmu hormonov, kot so aromataza in 5α -reduktaza (18, 19). Zaradi kompleksnosti delovanja in učinkov HM, njihove številčnosti ter raznolikosti je določanje, ali spojina sodi med HM, zelo zahtevno. Že v letu 1996 je organizacija Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) ustanovila specifično delovno skupino Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA), ki naj bi delovala v smeri poenotenja testiranj in ocenjevalnih pristopov pri določanju HM v različnih državah (17). Zbrali so možne presejalne in določitvene teste, ki so jih glede na kompleksnost metode in moč dokaza razdelili na pet stopenj. Prva stopnja vsebuje postopke za vrednotenje spojin na podlagi že znanih podatkov, kot so fizikalno-kemijske lastnosti in podatki izpostavljenosti. Sem sodijo tudi Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) in druge *in silico* napovedi. Druga stopnja vsebuje *in vitro* teste s katerimi ugotavljajo vezavno afiniteto na receptorje, transkripcijsko aktivacijo receptorjev, vpliv na proliferacijo celic idr. Tretja, četrta in peta stopnja pa vsebujejo *in vivo* teste za dokazovanje endokrinih učinkov: (a) na en endokrini sistem, (b) na več endokrinih sistemov ter (c) učinkov na celoten organizem. Princip določanja je, da s pomočjo kratkotrajnih testov (1., 2. in 3. stopnje) določijo potencialne HM, za katere je smiselno, da jih vključijo v nadaljnje dolgotrajno testiranje (4. in 5. stopnja), ki je osnova za oceno tveganja (17, 20). OECD pri uresničevanju svojega cilja sodeluje tudi z US Environmental Protection Agency (US EPA), ki deluje v smeri razvoja in implementacije nabora testov za določanje HM v Združenih državah Amerike (ZDA) (6).

1.3 REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST

Reproduktivna toksičnost je širok pojem, ki zajema tako toksične učinke na razmnoževanje starševske generacije (učinki na spolne organe in z njimi povezan endokrini sistem – produkcija, transport gamet, spolni cikel, plodnost, nosečnost, porod, laktacija idr.), kot tudi razvojno toksičnost pri potomcih (učinki, ki so inducirani ali izraženi pri embriju ter fetusu, ter učinki inducirani v času dojenja ali izraženi postnatalno) (21, 22). Zaradi številnih raznolikih in kompleksnih vidikov, ki jih vključuje, se pri njenem določanju ne moremo osredotočiti le na eno končno točko. Ocenjujemo jo na podlagi podatkov o vplivu spojine na ljudi (primeri, opisna in analitična epidemiologija), živalskih eksperimentov (generacijske študije, študije teratogenosti, vedenjske študije, testi morfologije sperme) ter *in vitro* testov teratogenosti (23). Študije reproduktivne toksičnosti so med najkompleksnejšimi, najdražjimi in časovno najbolj potratnimi študijami, potekajo pa tudi na velikem številu živali, zato je pomemben razvoj bolj ugodnih in uporabnih alternativnih metod (24). Regulatorne ustanove spojine, ki vplivajo na reprodukcijo in razvoj, klasificirajo glede na trenutno znanje o njihovih učinkih. Združeni narodi uporabljajo Globalno harmoniziran sistem za klasifikacijo in označevanje kemikalij (GHS UN2003), Food and Drug Administration (FDA) uporablja svoj način klasifikacije, države članice Evropske unije (EU) pa uporabljajo sistem klasifikacije spojin v tri razrede, ki je opisan v prilogi 6 Direktive Komisije 2001/59/ES (25).

1.4 *IN SILICO* METODE

Izraz *in silico* pomeni »kar se izvaja na računalniku ali z računalniško simulacijo« (26). *In silico* metode analize podatkov so v vzponu že od zgodnjih 1980-tih, ko je prišlo do napredka v razvoju osebnih računalnikov ter nastanka različnih podatkovnih baz, ki predstavljajo temelje za razvoj metode. V devetdesetih letih prejšnjega stoletja se je v farmacevtski industriji na področju odkrivanja novih potencialnih zdravilnih učinkovin s pojavom kombinatorne kemije in rešetanjem visoke zmogljivosti pojavila potreba po hitrejših in učinkovitejših metodah za ugotavljanje njihovih ADMET lastnosti. *In vivo* testiranja so tako nadomestila hitrejša *in vitro* testiranja ter še hitrejša in cenejša *in silico* testiranja (27). *In silico* metode vključujejo podatkovne baze, različne vrste (Q)SAR metod, ekspertne sisteme, molekularno modeliranje (na osnovi farmakoforov, homologije idr.), orodja za strojno učenje, podatkovno rudarjenje, analize omrežja ter druga računalniška orodja za analizo podatkov (26). Razvoj *in silico* metod ter drugih alternativnih metod za ugotavljanje

fizikalno-kemijskih, okoljskih ter toksikoloških lastnosti kemikalij, spodbujajo tudi regulatorne ustanove Evropske unije v okviru Uredbe (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH). Z njihovim razvojem in uporabo bi namreč preprečili pretirano in nepotrebno testiranje kemikalij na živalih ter olajšali izdelavo mnenj obsežne količine kemikalij na evropskem trgu, ki jih zahteva zakonodaja (24, 28, 29).

1.4.1 SAR in QSAR MODELI

SAR in QSAR modeli, za katere se pogosto uporablja skupno poimenovanje (Q)SAR modeli, so teoretični modeli, s katerimi lahko na podlagi poznavanja kemijske strukture spojin napovemo njihove fizikalno-kemijske in biološke (npr. toksikološke) lastnosti ter njihovo obstojnost v okolju (18). SAR je kvalitativno razmerje, ki povezuje strukturo ali podstrukturo spojine s prisotnostjo ali odsotnostjo določene lastnosti ali aktivnosti (binarna napoved). QSAR je matematični model, ki povezuje enega ali več kvantitativnih parametrov, izpeljanih iz kemijske strukture, s kvantitativnim merilom lastnosti ali aktivnosti (30). (Q)SAR modeli so sestavljeni iz treh glavnih elementov:

- lastnosti spojine, na kateri temelji model (deskriptor ali strukturni fragment),
- lastnosti ali učinka, ki ga model napoveduje (končna točka, odziv),
- algoritma, ki deskriptorje (ali strukturne fragmente) pretvori v končno točko (ali odziv).

Lahko so teoretični (določevanje osnovnih fizikalno-kemijskih lastnosti), statistični (empirični) ali temeljijo na odločitvah na podlagi izkušenj ali strokovne presoje. Za napovedovanje lastnosti kemikalije je treba oceniti veljavnost izbranega modela (Q)SAR in preveriti, ali kemikalija sodi v območje uporabnosti, da se zagotovi zanesljiva napoved. Pri ocenjevanju tveganja kemikalij rezultate, ki jih dobijo s pomočjo (Q)SAR ocenjevalnih metod običajno uporabijo v kombinaciji s podatki, ki jih dobijo s pomočjo *in vitro* ter *in vivo* raziskav. Kadar se rezultati (Q)SAR modela uporabljajo v regulativi, mora biti model validiran, kar po sklepu OECD pomeni, da mora imeti model določeno toksično lastnost spojine (končna točka), nedvoumen algoritem, definirano območje uporabnosti, ustrezno stopnjo prileganja, robustnosti in napovedljivosti ter če je mogoče tudi mehanistično razlago (18). Do sedaj je bilo razvitih že več kot dvajset tisoč različnih (Q)SAR modelov. Računalniški programi za njihovo izgradnjo so: QSAR Application Toolbox (31), ICM Chemist Pro (32), QSAR Workbench (33), MDL QSAR (34), ToxCreate (35) idr.

1.4.2 EKSPERTNI SISTEMI

Ekspertni sistem (ES) je računalniški program, ki s pomočjo logičnega sklepanja ter presojanja rešuje probleme oz. dela napovedi z uporabo pravil, ki nastanejo na podlagi že obstoječega znanja, ustvarjenega z *in vitro* ter *in vivo* študijami (36). Je hevrističen (sposoben sklepanja na podlagi teorije in strokovnega znanja), transparenten (pojasni svoj način sklepanja) in prilagodljiv (sposoben vključevanja novega znanja v obstoječo bazo). Običajno je sestavljen iz treh komponent: skupka/izbora podatkov in pravil, sistema za izvrševanje sklepanja ter generatorja pravil. V večini ES je človeško znanje pridobljeno s strani strokovnjakov vključeno v t.i. pravila v obliki logičnih izrazov if – then (»če <stanje> potem <dejanje>«). Celotni nabor pravil je izpostavljen mehanizmu sklepanja, ki zazna vse možne povezave med pravili, dejstvi in rešitvami. Ker je v praksi to precej obsežen in posledično dolgotrajen proces, lahko programer umetno določi, katera pravila so prioriteta, vendar je pri tem treba upoštevati možnost pristranskih, zunanje vsiljenih rešitev. Pomembna prednost ES pri določevanju je, da so sposobni upoštevati tudi nezanesljive ali pomanjkljive informacije, ki jih je npr. na področju toksikologije še veliko. Poznamo več vrst ES, ki se med seboj razlikujejo po tem ali generirajo pravila sami ali to storijo strokovnjaki, ali zaznajo fragmente, ki zmanjšujejo toksičnost, kako se odzovejo v primeru večjega števila aktivnih fragmentov hkrati, ali rezultate prikažejo kvantitativno, ali upoštevajo velikost fragmentov, iz katerih podatkovnih baz izhajajo, glede na način, kako pridejo do rezultatov, pa jih delimo na:

- ES, ki temeljijo na pravilih in obstoječem strokovnem znanju (Rule-based ES): DEREK Nexus (37), METEOR Nexus (38), HazardExpert (39), MetabolExpert (40), Oncologic (41). Tipičen pristop, ki ga uporabljajo je, da primerjajo strukturno podobnost molekul.
- ES, ki uporabljajo statistični pristop, npr. multiplo linearno regresijo, in temeljijo na (Q)SAR zakonitostih (ES using statistical procedures): TOPKAT (42), CASE (raziskovalni program).
- ES, ki kodirajo mehanistične procese (ES encoding mechanistic processes): COMPACT (raziskovalni program).
- Hibridne ES: CASE Ultra (43) (44, 45).

1.4.3 PODATKOVNE BAZE

Kakovost vsake *in silico* metode je odvisna od kvalitete in zanesljivosti podatkov, ki se uporabljajo za njeno izgradnjo (46). Pomembno je tudi, da je nabor podatkov čimbolj

raznolik (47). Obstajajo številne komercialne in prosto dostopne podatkovne baze v katerih so zbrani različni podatki o spojinah, od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti do ADMET lastnosti (46).

1.4.4 *IN SILICO* METODE NAPOVEDOVANJA METABOLIZMA

V iskanju učinkovitejših in bolj ekonomičnih metod za simulacijo metabolizma ksenobiotikov, predvsem posnemanju *in vivo* metabolizma v jetrih, je prišlo do precejšnjega napredka. Okolje znotraj hepatocitov posnemajo biokatalitsko (izolirani hepatociti, izolirane celične frakcije, rekombinantni encimi), z elektrokemijsko vzdrževanimi encimskimi sistemi, z elektrokemijskimi oksidacijami, s svetlobno induciranimi oksidacijami ter tudi z *in silico* modeli. *In silico* analize metabolizma temeljijo na računalniškem modeliranju z encimi kataliziranih metaboličnih reakcij (48). So hitre ter poceni, njihovi rezultati metabolizma pa dopolnjujejo ugotovitve, do katerih pridejo z *in vitro* raziskavami (44). Pogosto se uporabljajo za eliminacijo potencialnih metabolično nestabilnih spojin v zgodnji fazi iskanja novih učinkovin (27). Trenutno dostopne metode vključujejo tako QSAR metode, ekspertne sisteme, podatkovno rudarjenje, sidranje ligandov, simulacije molekularne dinamike, metode, ki temeljijo na kvantitativnem strojnem učenju, farmakoforih, obliki ligandov in encimov, molekulskih interakcijah ali reaktivnosti ter njihove kombinacije (44). Metode kot osnovo za izgradnjo modelov uporabljajo velike podatkovne baze, kjer so zbrani rezultati *in vivo* ter *in vitro* raziskav: Accelrys Metabolite Database (49), MetaBase (50), ADME DB (51), DrugBank (52) idr. (27).

Glede na napoved, lahko metode delimo v pet skupin:

- Napoved mesta v molekuli (SOM), kjer naj bi metabolizem potekel in verjetnost le-tega (regiolabilnost ali regioselektivnost): ADC/Percepta (53), CypScore (54), Metaprint2D (55), ADMET Predictor (Metabolite Module) (56), MetaSite (57) idr.,
- napoved metaboličnih reakcij oz. možnih metabolitov: MetabolExpert (58), Metabolizer (59), MetaDrug (60), METEOR Nexus (38), TIMES (61), Metaprint2D-React (55) idr.,
- napoved verjetnosti interakcije z encimi in/ali vezavne afiniteto za encime, ki sodelujejo v metabolizmu: ADC/Percepta (53), ADMET Predictor (56), VirtualToxLab (62), PASS (63) idr.,
- napoved inhibicije/indukcije encimov, ki sodelujejo v metabolizmu: ADC/Percepta (53), ADMET Predictor (56), MetaDrug (60), PASS (63) idr.,

- ocena celokupne metabolične stabilnosti spojine v organizmu (ocena klirensa): ADC/Percepta (53), ADMET Predictor (56), MEXAlert (64) idr. (27, 44).

1.4.5 *IN SILICO* METODE NAPOVEDOVANJA ENDOKRINE TOKSIČNOSTI

Kljub raznolikim in kompleksnim mehanizmom endokrine toksičnosti se predvsem zaradi omejene količine podatkov večina *in silico* metod osredotoča na ugotavljanje endokrine toksičnosti posredovane preko jedrnih receptorjev, še posebej preko ER ter AR (65). *In silico* metode vključujejo različne tehnike, kot so (Q)SAR ter 3D-QSAR (primerjalna analiza molekularnega polja – CoMFA) modeliranje, sidranje, simulacija molekularne dinamike, virtualno skeniranje idr. (22, 65, 66). Podatkovne baze, ki jih pri izgradnji *in silico* modelov uporabljajo, so: EDKB (67), EDCs DataBank (68), NureXbase (69), The Comparative Toxicogenomics Database (70) idr. Nekatere do sedaj razvite *in silico* metode so: ADMET Predictor (56), MolCode Toolbox (71), TIMES (61), VirtualToxLab (62) idr. (22).

1.4.6 *IN SILICO* METODE NAPOVEDOVANJA REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

Zaradi kompleksnosti bioloških sistemov, pogosto še nerazumljenih mehanizmov delovanja ter tudi zaradi pomankanja enotnih podatkov za razvoj modelov, je trenutno razvitih malo *in silico* metod, ki bi zanesljivo napovedovali parametre reproduktivne toksičnosti. Razviti so predvsem ekspertni sistemi, različni QSAR modeli ter ocenjevalne metode, npr. metoda odločitvenega drevesa, ki pa se zaenkrat še ne morejo uporabljati pri izdelavah ocene tveganja spojin (22). Nekateri programi izdelajo kategorično napoved, ko spojino razvrstijo v enega izmed razredov ali izdajo opozorilo o potencialni toksičnosti spojine (Derek Nexus, HazardExpert), medtem ko drugi izdelajo kvantitativno napoved (TOPKAT, MultiCASE) (18, 22). Podatkovne baze v katerih so zbrani podatki o reproduktivni toksičnosti spojin so: TOXNET DART (72), Toxicity Reference Database (ToxRefDB) (73), OECD (Q)SAR Toolbox (31), The Comparative Toxicogenomics Database (70) idr. Nekatere trenutno razvite *in silico* metode so: VegaNIC (74), Derek Nexus (37), TEST (75), Leadscope (76), CASE Ultra (43), PASS (63), TOPKAT (42) idr. (22).

1.5 PARABENI

1.5.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI PARABENOV

Parabeni so alkilni ali arilni estri PARA-hidroksiBENzojske kisline. Poimenujemo jih glede na alkohol, s katerim je p-hidroksibenzojska kislina (PHBA) zaestrena, ter tako poznamo metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP), izopropilparaben (iPP),

butilparaben (BP), izobutilparaben (iBP), pentilparaben (PentP), heptilparaben (HP), fenilparaben (FP) benzilparaben (BzP) idr. (77). V čisti obliki so brezbarvni ali beli kristali brez vonja in okusa, le metilparaben ima rahlo pekoč okus. So higroskopni in imajo visok porazdelitveni koeficient (2 in več). Topni so v alkoholu, etru, glicerinu, propilen glikolu, v vodi pa so delno topni ali praktično netopni (77, 78).

1.5.2 BIOLOŠKA AKTIVNOST PARABENOV

Parabeni imajo številne biološke učinke. Najbolj pomembna sta zaviranje transporta skozi membrane in zaviranje procesov v mitohondrijih bakterij in gliv. Zaradi njihovih protimikrobnih lastnosti jih že od sredine 1920-tih let uporabljajo kot konzervanse v kozmetični, prehranski in farmacevtski industriji. Imajo številne ugodne lastnosti, ki vplivajo na njihovo široko uporabo, kot so širok spekter delovanja proti glivam, plesnim in bakterijam, kemična stabilnost, inertnost, biološka razgradljivost, majhna sistemska toksičnost, redko povzročajo senzibilizacijo, zadostna topnost v vodi, so relativno varni, nizki stroški proizvodnje, so brez značilnega vonja ali okusa, ne spreminjajo konsistence in barve proizvodov (77, 79, 80, 81). Tudi protimikrobne lastnosti parabenov so neposredno povezane z dolžino njihovih alkilnih stranskih skupin, saj se z daljšanjem skupine povečuje tudi njihova sposobnost zaviranja rasti bakterij, vendar se hkrati zmanjšuje njihova topnost v vodi (77).

1.5.3 IZPOSTAVLJENOST PARABENOM

Človek je parabenom v največji meri izpostavljen preko kozmetičnih proizvodov, farmacevtskih izdelkov in prehrane, z njimi v stik pa pride tudi preko drugih virov v okolju, kot so papirnati izdelki, cigareti, detergenti, lepila, laki, hrana za živali, pitna voda, prah, barve za tekstil idr. (77, 82).

1.5.3.1 PARABENI V KOZMETIČNI INDUSTRIJI

Parabeni se nahajajo v široki paleti kozmetičnih proizvodov od mil, šamponov, balzamov za lase pa do različnih krem, mleka za telo in ličil. V EU uporabo parabenov v kozmetiki urejajo Uredba (ES) št. 1223/2009, Uredba Komisije EU št. 358/2014 ter Uredba Komisije EU št. 1004/2014. Dovoljena je uporaba MP, EP (in Na ter K soli) v koncentraciji do 0,4 % za posamezni paraben in do največ 0,8 % za kombinacijo parabenov ter PP, BP (in Na ter K soli) do 0,14 % za posamezni paraben ali njihovo kombinacijo ter do največ 0,8 % za kombinacijo z MP, EP in njunimi solmi, pri čemer kombinacija PP in BP ne sme preseči 0,14 %. Vse koncentracije veljajo preračunano na PHBA. Hkrati se izdelkov, ki vsebujejo

PP, BP in njune soli, ne sme uporabljati v pleničnem predelu otrok mlajših od treh let, kar mora biti na kozmetičnih izdelkih za otroke tudi navedeno. Uporaba iPP, iBP, FP, BzP in PentP in njihovih soli je v kozmetičnih izdelkih prepovedana. Na Danskem je od leta 2011 prepovedana uporaba PP, iPP, BP in iBP v izdelkih za osebno nego za otroke mlajše od 3 let (83). Tudi v ZDA je predlagana omejitev uporabe zmesi parabenov v kozmetiki na največ 0,8 % oziroma do največ 0,4 % za posamezni paraben, preračunano na PHBA, vendar predlog ni zavezujoč (84).

V Evropi vsebuje parabene med 30-50 % kozmetičnih izdelkov (84, 85, 86), v ZDA pa je odstotek izdelkov, ki vsebujejo parabene, še nekoliko večji. Koncentracija parabenov v kozmetiki se znižuje (87). Po ocenah naj bi bila dnevna poraba kozmetičnih proizvodov, ki vsebuje parabene, pri odraslih 17,76 g in pri otrocih 0,378 g. Če upoštevamo maksimalen dovoljen delež parabenov v kozmetiki (0,8 %), to ustreza 142,08 mg/kg telesne teže parabenov na odraslega in 3,024 mg/kg telesne teže parabenov na otroka dnevno (88). Podobno so ocenili tudi v raziskavi izpostavljenosti parabenom pri otrocih med 0 in 3 let. Ugotovili so, da so otroci zunanje izpostavljeni največ 2,32 mg/kg telesne teže MP, 1,05 mg/kg telesne teže PP, 0,36 mg/kg telesne teže EP in 0,47 mg/kg telesne teže BP. Z upoštevanjem prehajanja skozi kožo to pomeni največ 1,01 mg/kg telesne teže MP, 0,41 PP in 0,20 mg/kg telesne teže EP ter BP dnevno (89). Ocenjen maksimalni dnevni vnos parabenov preko kozmetike v ZDA je bil za otroke med 58,6 in 766 µg/kg telesne teže, za odrasle pa približno 3-krat manjši (87). Po nekaterih ugotovitvah naj bi bila skupna izpostavljenost MP, PP, BP in EP še za 51 %, 58 %, 90 % in 92 % nižja od predvidene (90).

1.5.3.2 PARABENI V PREHRAMBNI INDUSTRIJI

Parabene v prehrani v EU najdemo v slaščicah, prigrizkih na osnovi žit, krompirja ali škroba, prelitih oreščkih, tekočih prehranskih dopolnilih, površinsko obdelanih suho-mesnih izdelkih ter žele premazih mesnih izdelkov in paštet. V prehrani v ZDA in drugod po svetu se nahajajo tudi v sladkih pijačah, marmeladah, želejih, konzervirani hrani, olivah, kislih kumaricah, sirupih, alkoholnih pijačah, predelanem sadju in zelenjavi, pasiranem paradižniku, sladkornih nadomestkih, začimbah, sojini omaki ter drugje (85, 91, 92). Uporabo parabenov v prehrambni industriji v EU urejajo direktive 95/2/ES, 2003/114/ES in 2006/52/ES. Dovoljena je uporaba MP in EP (in Na soli) za površinsko tretiranje suhomesnih proizvodov v količini *quantum satis*, za žele premaze mesnih proizvodov, npr. paštet v koncentraciji do 1 g/kg in v slaščicah, z izjemo čokolade v koncentraciji do 0,3 g/kg (93). Predvsem MP in PP sta v ZDA že več kot 50 let pogosto uporabljena konzervansa v

prehrani. FDA ju uvršča med na splošno spoznane kot varne spojine (GRAS), če sta uporabljena v koncentraciji manj kot 0,1 %. MP in PP je dovoljeno uporabljati tudi v embalaži prehranskih izdelkov. ZDA dovoljujejo tudi uporabo HP v fermentiranih pijačah iz slada v koncentraciji do 12 ppm in v brezalkoholnih pijačah brez mehurčkov in pijačah na osnovi sadja v koncentraciji do 20 ppm (77).

Do sedaj ni znanih raziskav o parabenih v prehrani v EU. V ZDA se najvišja celokupna koncentracija parabenov nahaja v žitaricah, pijačah in mlečnih izdelkih. Od 267 pregledanih izdelkov v letih 2008-2012 (pijače, mlečni izdelki, maščobe, morska hrana, žitarice, meso, sadje in zelenjava) se je MP nahajal kar v 91 %, PP v 63 %, EP v 62%, BP in BzP pa v manj kot 30 % vzorcev. Koncentracija parabenov v hrani sega lahko tudi do 400 ng/g izdelka, čeprav v povprečju znaša nekaj ng/g izdelka. Ocenjen povprečni dnevni vnos parabenov s hrano je najvišji pri dojenčkih do 1 leta 940 ng/kg telesne teže, pri odraslih pa znaša 307 ng/kg telesne teže (91).

1.5.3.3 PARABENI V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI

Parabeni se nahajajo v različnih zdravilih tako na recept kot tudi brez recepta. Najdemo jih v tabletah, sirupih, svečkah, anestetikih, raztopinah za injiciranje, kremah in drugod. Kot vsi ostali konzervansi v farmaciji se tudi parabeni uporabljajo le, ko je to nujno potrebno in v najnižjih še učinkovitih koncentracijah (95).

V zdravilih namenjenih peroralni aplikaciji se nahajata predvsem MP v koncentraciji 0,015 do 0,2 % in PP v koncentraciji od 0,02 do 0,06 %. EP in BP se uporabljata v precej manjši meri in predvsem v topikalnih zdravilih (78). Na Slovaškem je leta 2012 od 159 registriranih topikalnih zdravil parabene vsebovalo 10 % zdravil na recept in 5 % zdravil, ki so na voljo brez recepta. Največ jih je vsebovalo MP (98 %, 88 %) in PP (67 %, 50 %), nekaj pa tudi EP in BP (86). Glede na trenutno odmerjanje zdravil, ki vsebujejo MP in PP, je ocenjen maksimalni dnevni vnos za MP 140 mg/dan ter za BP 50 mg/dan (95).

1.5.3.3 PARABENI V OKOLJU

Zaradi velike proizvodnje in uporabe parabenov se le-ti v nizkih koncentracijah (do nekaj 100 ng/L v vodah, do nekaj ng/kg v sedimentih) pojavljajo tudi v okolju. Nahajajo se v prsti in blatu, ter tudi v prahu v zaprtih prostorih in v zraku. Parabeni tudi v okolju niso stabilni in za človeka predstavljajo minimalno breme v primerjavi s parabeni neposredno zaužitimi s hrano, farmacevtskimi izdelki in tistimi nanešenimi na kožo (82).

1.5.3.3 DNEVNA IZPOSTAVLJENOST PARABENOM

Ocenjeno je, da je odrasel človek dnevno izpostavljen 76 mg parabenom, od tega 50 mg (66 %) preko kozmetike in izdelkov za osebno nego, 25 mg (33 %) preko farmacevtskih proizvodov in 1 mg (1,3 %) preko hrane (77).

1.6.4 ABSORPCIJA, DISTRIBUCIJA, METABOLIZEM, ELIMINACIJA

Peroralno zaužiti parabeni se popolnoma in hitro absorbirajo ter so v telesu (tanko črevo, jetra) skoraj v celoti podvrženi metabolizmu prvega prehoda, ko jih karboksiesteraze razgradijo na PHBA in pripadajoč alkohol. *In vitro* študije kažejo, da hidroliza parabenov v človeških jetrnih mikrosomih poteka hitro, in sicer po kinetiki 1. reda. Za hidrolizo parabenov sta pomembni dve izoformi karboksiesteraz: hEC1 (v večji meri prisotna v jetrih; predvsem hidroliza MP, EP in PP) in hEC2 (v večji meri prisotna v tankem črevesju; predvsem hidroliza BP, PentP, HP, BenzP, FP) (96).

Dermalna absorpcija parabenov je zapletena in je odvisna od dolžine stranske alkilne verige parabenov (obratno sorazmerna), temperature (sorazmerna), kombinacije parabenov (zmanjšanje absorpcije), prisotnosti nabitih površinsko aktivnih snovi (obratno sorazmerna), formulacije v kateri se nahajajo, velikosti površine nanosa, prisotnosti pospeševalcev penetracije, kot sta urea in propilenglikol, stanja kože idr. (97, 98, 99). Absorpcija dermalno nanešenih parabenov pri podganah znaša od 8 % do 15-30 % (97, 100). Ker je podganja koža kar 2- do 37-krat bolj prepustna od človeške, bi se po ocenah pri človeku absorbiralo največ 15 % nanešenega parabena (101). *Ex vivo* študije na človeški koži kažejo, da je prehajanje parabenov skozi kožo še manjše, vendar pa se povečuje pri večkratnem nanosu le-teh (102, 103). Tudi v koži in podkožnem maščevju se nahajajo hEC1 in hEC2, ki hidrolizirajo dermalno nanešene parabene, vendar imajo le-te manjšo kapaciteto kot tiste v jetrih (104). Pri hidrolizi parabenov je lahko prisotna tudi do 3-kratna razlika v hitrosti hidrolize med posamezniki, ki je posledica različne stopnje izražanja in genskega polimorfizma karboksiesteraz (96). Ob prisotnosti alkoholov (uživanje etanola, metanola, etanol v kozmetičnih proizvodih) pride do transesterifikacije in posledično zakasnjene eliminacije parabenov (105).

Po hidrolizi parabenov na večini molekul PHBA potečejo reakcije metabolizma 2. faze, ko pride do konjugacije PHBA s sulfatom, glicinom in glukuronsko kislino. Do konjugacije lahko pride tudi na nehidroliziranih parabenih (106). Kljub hitremu metabolizmu se določen delež parabenov ohrani in se v telesu nahaja v prvotni obliki. Pri večkratnem dermalnem nanosu parabenov se delež nemetaboliziranih parabenov akumulira v koži, vendar po

prenehanju uporabe ta delež hitro upade (103). Raziskave so pokazale, da so parabeni v človeški plazmi razmeroma stabilni, saj se karboksieraze tam ne nahajajo, prisotne pa so druge esteraze, ki parabene hidrolizirajo v precej manjši meri (butirilholinesteraze, paroksonaze, acetilholinesteraze in albumin) (107). Na plazemske albumine se vežejo v zelo majhni količini oz. se nanje sploh ne vežejo, tako da so v prosti obliki razpoložljivi za porazdeljevanje v tkiva (108). Parabeni prehajajo placento, zato so jim izpostavljeni tudi zarodki (109). Precej odmevna študija je pokazala, da se parabeni nahajajo tudi v tkivu v dojkah, kjer se zaradi odsotnosti karboksieraz in ustreznih izoencimov sulfotransferaz ter glukuroniltransferaz ne metabolizirajo (110). Kljub temu do sedaj še ni dokazov, da bi se parabeni kopičili v tkivih (100). Večina parabenov se v obliki njihovih metabolitov izloči z urinom. Majhen delež parabenov se izloči z urinom v svoji prvotni obliki, pri čemer so v večji meri konjugirani s sulfatom ali glukuronsko kislino in le v nekaj odstotkih v prosti obliki. Nekaj odstotkov zaužite količine parabenov se izloči tudi preko žolča z blatom (97).

1.5.5 TOKSIČNI UČINKI

Dolgo časa so parabeni veljali za popolnoma neškodljive spojine, kar je vplivalo na njihovo obširno uporabo. Predvsem MP, EP in PP naj bi bili razmeroma varni konzervansi, medtem ko so BP, iPP, iBP, PentP, HP, FP in BzP precej manj raziskani. V zadnjem desetletju prihaja do novih ugotovitev in burnih razprav o njihovih učinkih na človeško telo in zdravje. Odkar je pod drobnogledom vpliv spojin na endokrini sistem, se pojavljajo nova vprašanja o varnosti parabenov in njihovi endokrini ter reproduktivni toksičnosti. Parabeni naj bi delovali preko več različnih mehanizmov v različnih tkivih, zato je ugotavljanje njihovih učinkov precej kompleksno. Trenutno so najbolj osredotočeni so na estrogensko in antiandrogensko aktivnost parabenov, v raziskavah pa odkrivajo tudi vpliv parabenov na druge receptorje, kot so glukokortikoidni, s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani, tiroidni, kortikosteroidni receptorji idr. Vprašanje, ali estrogenski ter antiandrogenski potencial parabenov vplivata tudi na razmnoževanje in razvoj živali in ljudi, ostaja odprto. Do sedaj izvedene raziskave so precej raznolike in preučujejo različne vidike reproduktivne toksičnosti, njihovi rezultati pa so precej neenotni (77). Kratek povzetek raziskav endokrine in reproduktivne toksičnosti parabenov se nahaja v Prilogi II.

2. NAČRT ZA DELO

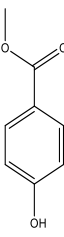
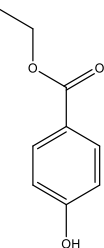
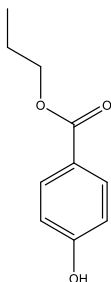
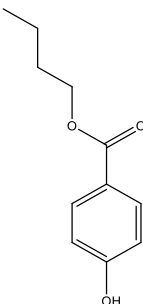
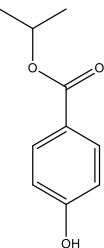
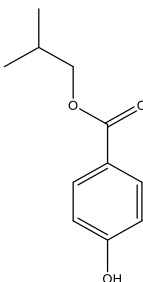
- S pomočjo programa **Meteor Nexus** bomo napovedali metabolizem desetih najpogosteje uporabljenih parabenov (MP, EP, PP, iPP, BP, iBP, PentP, HeptP, BzP in FP).
- Napovedane metabolite I. faze metabolizma parabenov bomo zbrali za nadaljnjo analizo.
- S pomočjo programov **Endocrine disruptome** in **VegaNIC (Relative Binding Affinity model)** bomo napovedali endokrine učinke izbranih parabenov in zbranih metabolitov.
- S pomočjo programov **Derek Nexus**, **VegaNIC (Developmental Toxicity Classification Model version 2.1.7, Developmental/Reproductive Toxicity virtual library version 1.0.0)** ter **TEST** bomo napovedali nekatere vidike reproduktivne toksičnosti izbranih parabenov in zbranih metabolitov.
- Dobljene rezultate bomo komentirali ter primerjali z rezultati do sedaj opravljenih *in vitro* ter *in vivo* testiranj.

3. METODE IN MATERIALI

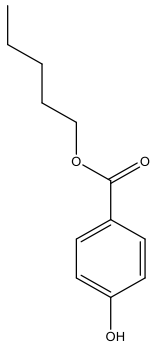
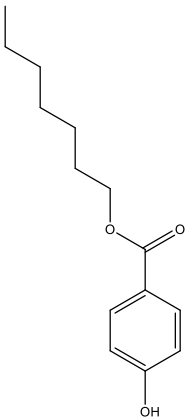
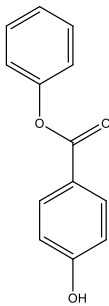
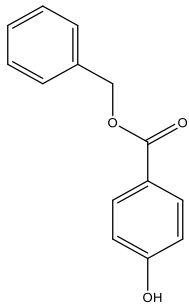
3.1 IZBRANI PARABENI

Osredotočili smo se na 4 najpogosteje uporabljene parabene (MP, EP, PP, BP) ter na parabene, ki se v literaturi sicer omenjajo, vendar so redkeje uporabljeni in so z vidika varnosti še precej manj raziskani (iPP, iBP, PentP, HP, BzP, FP). Njihove strukture, CAS številke in SMILES kode so prikazane v preglednici I.

Preglednica I: Izbrani parabeni, njihove CAS številke, SMILES kode ter strukture.

<p>Metilparaben (MP), 99-76-3, <chem>COC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 	<p>Etilparaben (EP), 120-47-8, <chem>CCOC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 	<p>Propilparaben (PP), 94-13-3, <chem>CCCOC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 
<p>Butilparaben (BP), 94-26-8, <chem>CCCCOC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 	<p>Izopropilparaben (iPP), 4191-73-5, <chem>CC(C)OC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 	<p>Izobutilparaben (iBP), 4247-02-3, <chem>CC(C)COC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 

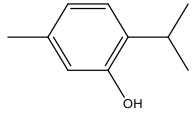
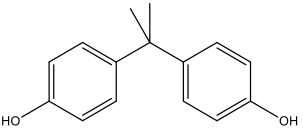
Preglednica I (nadaljevanje): Izbrani parabeni, njihove CAS številke, SMILES kode ter strukture.

<p>Pentilparaben (PentP), 6521-29-5, <chem>CCCCCOC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 	<p>Heptilparaben (HP), 1085-12-7, <chem>CCCCCCCOC(=O)c1ccc(cc1)O</chem></p> 	<p>Fenilparaben (FP), 17696-62-7, <chem>c1ccc(cc1)OC(=O)c2ccc(cc2)O</chem></p> 
<p>Benzilparaben (BzP), 94-18-8, <chem>c1ccc(cc1)COC(=O)c2ccc(cc2)O</chem></p> 		

3.2 KONTROLE

Za negativno kontrolo smo izbrali timol, za pozitivno pa bisfenol A.

Timol smo izbrali, ker zaradi aromatskega obroča in aromatske hidroksilne skupine obstaja strukturna podobnost s parabeni. Gre za naravno spojino, ki jo najdemo v origanu in timijanu in za katero do sedaj opravljene raziskave ne ugotavljajo endokrine ali reproduktivne toksičnosti (111). Bisfenol A je eden izmed najbolj proučevanih HM in je dokazano aktiven na estrogenskih receptorjih α , estrogenskih receptorjih β , z estrogenom povezanih receptorjih (ERR), pregnanskih X receptorjih, s peroksisomskim proliferatorjem aktiviranih receptorjih, tiroidnih receptorjih ter deluje kot antagonist na androgenskih receptorjih (66). Njuni strukturi, CAS številki in SMILES kodi sta prikazani v preglednici II.

<p>Timol, 89-83-8, <chem>CC(C)c1ccc(C)cc1O</chem></p> 	<p>Bisfenol A (BPA), 80-05-7, <chem>CC(C)(c1ccc(cc1)O)c2ccc(cc2)O</chem></p> 
---	--

3.3 UPORABLJENI PROGRAMI IN NJIHOVE NASTAVITVE

3.3.1 NAPOVED METABOLIZMA

PROGRAM: **Meteor Nexus**, Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK.

RAZLIČICA: Meteor Nexus: 2.1.0, Nexus: 2.0.0.

DOSTOP: Računalnik FFA.

NASTAVITVE: Species: Mammals,

Processing direction: Breadth first,

Phase constraints: Don't grow from phase II products,

Max. depth: 3,

Max Metabolites:1000,

Min. Likelihood: EQUIVOCAL,

Apply relative reasoning: NO,

Level cutoff: 2;

Show open likelihood: No,

Show negative predictions: Yes,

Show Rapid Prototypes: Yes.

Gre za ekspertni sistem razvit pod okriljem neprofitne organizacije Lhasa Limited v začetku 1997 (46). Podatkovna baza programa je sestavljena iz dveh komponent podatkov zbranih iz podatkovne baze Accelrys Metabolite Database (49), iz literature ter preko posvetov s strokovnjaki iz industrije, regulatornih agencij in univerz. Prva komponenta obsega t.i. slovar biotransformacij, podprtih z grafičnimi opisi, komentarji, referencami in primeri metaboličnih poti. Drugo komponento sestavljajo z referencami ter komentarji podprta pravila, ki izražajo verjetnost poteka biotransformacije pod določenimi pogoji (36). Hkrati program omogoča, da uporabnik v podatkovno bazo vstavi tudi svoja lastna pravila (18). Program kot rezultat napovedi metabolizma poda vse možne metabolite faze I in faze II, jih

organizira v metabolično drevo, identificira potencialno reaktivne metabolite ter oceni verjetnost nastanka metabolitov oz. poteka metabolnih poti (36). Poleg metabolične reakcije poda tudi encim, ki omenjeno reakcijo katalizira, npr. hidrolaza, sulfotransferaza (SULT), uridindifosfat-glukuronoziltransferaza (UGT), citokrom P450 (CYP450), katehol-O-metiltransferaza (COMT), alkohol-dehidrogenaza (ADH), acetil koencim A-sintaza (ACS) in glutation-S-transferaza (GST). Z napovedjo poteka metabolnih reakcij zaključijo, ko eksterni program za napovedovanje logP določi, da so vsi metaboliti dovolj vodotopni, da jih organizem lahko izloči. Glede na verjetnost poteka metabolizma metabolite razdeli v 5 skupin: verjeten (probable), možen (plausible), dvoumen (equivocal), dvomljiv (doubted) ter malo verjeten (improbable). Verjetnost, da bo določena spojina podvržena metabolizmu, je premosorazmerna z lipofilnostjo, kar temelji na predpostavki, da imajo bolj hidrofilne molekule manjšo sposobnost prehajanja v celice, kjer bi bile izpostavljene nadaljnjim metabolnim reakcijam. Slabost programa je, da generira tudi precejšnje število lažno pozitivnih rezultatov, zato avtorji programa priporočajo, da se potencialne metabolite preveri z nadaljnjimi raziskavami (44).

3.3.2 NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI

PROGRAM: **VegaNIC** - Vega Non-Interactive Client, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri Milano,

RAZLIČICA: 1.1.0,

DOSTOP: <http://www.vega-qsar.eu/download.html>,

NASTAVITVE: Model: Relative Binding Affinity Model version 1.0.0.

Vega je novejša prosto dostopna spletna platforma, ki deluje v podporo zakonodaji REACH. Njen nastanek je produkt dela številnih evropskih in ameriških institucij (UK FERA, US EPA), znanstvenih inštitutov (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Kemijski inštitut) ter različnih projektov (ANTARES, CAESAR, ToxBank idr.). Na njej lahko dostopamo do številnih QSAR modelov. Večina jih izhaja iz projekta CAESAR, kjer so razvili znanstveno veljavne modele za določanje bioakumulacije v ribah, senzibilizacije kože, mutagenosti, karcinogenosti in razvojne toksičnosti, nekaj modelov je privzetih iz programa TEST ali pa razvitih s pomočjo sodelavcev Vega platforme. Vsi modeli so na voljo tudi v obliki prosto dostopnega programa VegaNIC (VEGA Non-Interactive Client), razvitega s strani Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. Z njegovo pomočjo lahko ocenimo toksičnost, ekotoksičnost, vpliv na okolje ter fizikalno-kemijske lastnosti spojin z uporabo (trenutno) 22 različnih modelov (45, 74).

Eden od modelov je tudi model za napovedovanje relativne vezavne afinitete na ER (**Relative Binding Affinity Model**). Gre za QSAR klasifikacijski model, ki temelji na algoritmu klasifikacijskega in regresijskega drevesa (CART). V setu za usposabljanje je 806 spojin izbranih iz podatkovne baze japonskega Ministrstva za ekonomijo, trgovino in industrijo (116). Spojine, ki jih želimo analizirati, lahko v program vnesemo v obliki datoteke .mol ali v obliki SMILES kode. Kot rezultat program poda napoved ali je spojina aktivna ali neaktivna. Ob tem je z zvezdicami predstavljena tudi zanesljivost napovedi (*/** – obstaja možnost, da napoved ni zanesljiva, spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela, **/** – obstaja nekaj kritičnih vidikov napovedi, spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela, ***/** – napoved se zdi zanesljiva, spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ob vsaki napovedi pa so podane tudi opombe v primeru, da so se pri napovedovanju pojavile kakršnekoli težave (117, 118).

PROGRAM: **Endocrine Disruptome**, Katra Kolšek, Samo Turk, Fakulteta za farmacijo in Kemijski inštitut Slovenija.

RAZLIČICA: 21.1.2015

DOSTOP: <http://endocrinedisruptome.ki.si/>.

NASTAVITVE: ni nastavitvev.

Gre za spletno storitev, ki predvidi vezavno afiniteto na 12 različnih jedrnih receptorjev, in sicer androgenski receptor (AR), estrogenski receptor α (ER α), estrogenski receptor β (ER β), glukokortikoidni receptor (GR), jetrni X receptor α (LXR α), jetrni X receptor β (LXR β), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor α (PPAR α), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor β (PPAR β), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor γ (PPAR γ), retinoidni X receptor α (RXR α), tiroidni receptor α (TR α) in tiroidni receptor β (TR β). Pri štirih receptorjih je določena predvidena vezava tako na agonistično (AR, ER α , ER β , GR) kot antagonistično (AR an, ER α an, ER β an, GR an) konformacijo receptorja. Avtorji so jo ustvarili z namenom, da bo zaradi svoje enostavnosti za uporabo ter hitrosti v pomoč strokovnjakom na področju toksikologije pri sprejemanju odločitev za nadaljnje testiranje spojin. S pomočjo programa AutoDock Vina (112) so določili konformacije jedrnih receptorjev z najboljšimi napovednimi vrednostmi vezave ligandov. Dobljene rezultate so nato uporabili za izbiro konformacij, na katerih s sidranjem določajo vezavno afiniteto ligandov. Storitev uporabniku omogoča, da s programom ChemDoodle Sketcher (113) nariše strukturo za poizvedbo ali pa vstavi neposredno njeno SMILES kodo.

Rezultati sidranja so podani številčno, kot vrednost proste energije vezave (v kcal/mol), ter obarvani glede na verjetnost vezave od zelene barve (majhna verjetnost vezave), preko rumene in oranžne do rdeče barve (največja verjetnost vezave). Postavljene mejne vrednosti proste energije vezave (v kcal/mol), ki za vsak receptor posebej določajo štiri razrede verjetnosti vezave, so podane v preglednici III.

Preglednica III: Postavljene mejne vrednosti proste energije vezave (v kcal/mol) za receptorje.

VERJETNOST VEZAVE	AR	AR _{an}	ER _α	ER _α _{an}	ER _β	ER _β _{an}	GR	GR _{an}	LXR _α	LXR _β	PPA _{Rα}	PPA _{Rβ}	PPA _{Rγ}	RXR _α	TR _α	TR _β
največja	> -8,6	> -8,4	> -9,3	> -10,7	> -9,2	> -9	> -10,7	> -9,8	> -11,9	> -12,1	> -10	> -10,5	> -10,3	> -12,1	> -10,2	> -10,5
velika	> -8,1	> -7,6	> -8,8	> -9,5	> -8,7	> -8,6	> -9,7	> -9,2	> -10,7	> -11,3	> -9,4	> -10,1	> -9,6	> -10,8	> -9,2	> -9,4
srednja	> -7,4	> -3,1	> -8,2	> -8,6	> -8	> -8,3	> -7,3	> -8,5	> -9,8	> -10,3	> -8,9	> -9,6	> -8,9	> -10	> -7,2	> -7,8
majhna	< -7,4	< -3,1	< -8,2	< -8,6	< -8	< -8,3	< -7,3	< -8,5	< -9,8	< -10,3	< -8,9	< -9,6	< -8,9	< -10	< -7,2	< -7,8

Vse strukture receptorjev in protokoli so validirani. Avtorji opozarjajo, da je bila validacija opravljena s precej močnimi ligandi, kar je treba upoštevati pri interpretaciji rezultatov, saj lahko šibki ligandi kljub napovedani manjši vezavni afiniteti vseeno predstavljajo problem za zdravje, predvsem če smo jim kronično izpostavljeni. Na spletni strani so na kratko opisani tudi vsi receptorji, ter Receiver Operating Characteristics (ROC) krivulje za vsako strukturo (v agonistični ter antagonistični konformaciji) (114, 115).

3.3.3 NAPOVED RAZLIČNIH VIDIKOV REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

PROGRAM: **Derek Nexus**, Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK.

RAZLIČICA: Derek Nexus: 4.1.0, Nexus: 2.0.0.

DOSTOP: Računalnik FFA.

NASTAVITVE: Selected Species: mammal,

Reasoning Level: At least EQUIVOCAL,

Perceive tautomers: Yes,

Perceive mixtures: Yes,

Match alerts without rules: No,

Show open likelihood: No,

Show negative predictions: Yes,

Show Rapid Prototypes: Yes.

Gre za ekspertni program za napovedovanje toksičnosti spojin, razvit pod okriljem Lhasa Limited. Model temelji na hipotezah povezanih z mehanizmi delovanja spojin ali na opazovanih empiričnih odnosih. Njegova baza znanja obsega opozorila, primere ter pravila, ki vsi skupaj prispevajo k napovedi toksičnosti. Spojino, ki je predmet poizvedbe, v

programu narišemo ali uvozimo v obliki datoteke .mol, .skc ali .sdf. Sistem napove več končnih točk toksičnosti, med drugim tudi kancerogenost, mutagenost, genotoksičnost, reproduktivno toksičnost idr. V okviru reproduktivne toksičnosti opozori na možnost razvojne toksičnosti, teratogenosti ter testikularne toksičnosti, pri čemer je napoved lahko gotova (probable), skoraj gotova (probable), verjetna (plausible), dvoumna (equivocal), dvomljiva (doubted), malo verjetna (improbable), nemogoča (impossible), odprta (open) ali kontradiktorna (contradicted). Rezultat opozori tudi na del molekule, ki naj bi bil odgovoren za toksičnost (toksikofor), ter poda reference, komentarje ter primere (37, 46).

PROGRAM: **VegaNIC** – Vega Non-Interactive Client, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri Milano.

RAZLIČICA: 1.1.0.

DOSTOP: <http://www.vega-qsar.eu/download.html>.

NASTAVITVE: Model: Developmental Toxicity Classification Model version 2.1.7, Developmental/Reproductive Toxicity virtual library version 1.0.0.

Za napoved razvojne/reproduktivne toksičnosti v programu VegaNIC obstajata dva modela: **Developmental Toxicity Classification Model version 2.1.7**, ki je razširjen CAESAR model, in **Developmental/Reproductive Toxicity virtual library version 1.0.0**, razvit s strani Procter&Gamble.

Prvi model kvalitativno, na podlagi binarne klasifikacije FDA (spojine iz kategorij A in B so toksikanti, iz C, D in X pa ne-toksikanti) napove razvojno toksičnost, pri čemer uporablja metodo odločitvenega drevesa, ki jo izvaja s pomočjo WEKA open-source (119), ki je priljubljena odprtokodna programska oprema za strojno učenje.

Drugi model zagotavlja kvalitativno napoved tako razvojne kot reproduktivne toksičnosti in tudi temelji na podlagi binarne klasifikacije. Model uporablja virtualno knjižnico 641 toksičnih spojin, ki so kategorizirane v 25 skupin (anorganske spojine in derivati, spojine, ki se vežejo na AR in ER, spojine, ki se vežejo na retinoidni receptor in aril hidrokarbonski receptor, ...). Pri analizi išče povezavo med spojino, ki je predmet napovedi in spojinami v virtualni knjižnici. Če povezavo najde, je spojina označena kot toksikant, če povezave ne najde, pa je označena kot ne-toksikant.

Spojine, ki jih želimo analizirati, lahko v program vnesemo v obliki datoteke .mol ali v obliki SMILES kode. Kot rezultat program poda napoved ali je spojina razvojni/reproduktivni

toksikant ali ne. Ob tem je z zvezdicami predstavljena tudi zanesljivost napovedi (*/** – obstaja možnost, da napoved ni zanesljiva, spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela, **/** – obstaja nekaj kritičnih vidikov napovedi, spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela, ***/** – napoved se zdi zanesljiva, spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ob vsaki napovedi pa so podane tudi opombe v primeru, da so se pri napovedovanju pojavile kakršnekoli težave (24, 117).

PROGRAM: **Toxicity Estimation Software Tool (TEST)**, US EPA.

RAZLIČICA: 4.0.

DOSTOP: <http://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>.

NASTAVITVE: Endpoint: Developmental toxicity,

Method: Consensus.

Gre za prosto dostopno aplikacijo razvito pod okriljem US EPA. Preko različnih QSAR modelov napove osnovne fizikalno-kemijske lastnosti ter različne končne točke toksičnosti spojin, npr. količino, pri kateri pogine 50% podgan, bioakumulacijski faktor, mutagenost ter tudi razvojno toksičnost. Pri napovedi lahko uporabnik izbira med več različnimi metodami: hierarhična metoda, FDA metoda, metoda enotnega modela, metoda prispevka skupine, metoda najbližjega sosedu, metoda odločanja s konsenzom ter metoda odločitvenega drevesa. Metoda odločanja s konsenzom, ko je rezultat metode povprečje rezultatov vseh ostalih metod, se je pri eksterni validaciji izkazala za najboljšo, zato smo jo izbrali za našo raziskavo. Metoda določanja razvojne toksičnosti napove, ali spojina na ljudeh ali živalih izkazuje kakršnekoli učinke razvojne toksičnosti. Podatkovna baza, iz katere izhaja, vključuje 285 različnih spojin. Uporabnik lahko spojino, ki je predmet poizvedbe, nariše, jo naloži v obliki datoteke .mol, vstavi njeno SMILES kodo ali jo uvozi iz podatkovne baze struktur, ki je vključena v program. Rezultat modela se izpiše v obliki spletne strani, na kateri se nahaja kvantitativna in kvalitativna napoved razvojne toksičnosti, strukture podobnih spojin v setu za usposabljanje ter njihovi rezultati (120).

4. REZULTATI in RAZPRAVA

4.1 METABOLIZEM PARABENOV

S programom **Meteor Nexus** smo ugotavljali metabolizem parabenov. Iz rezultatov, ki smo jih izvozili v obliki Excelove preglednice, smo izdelali sheme metabolizma. Kot najverjetnejši potek metabolizma je bila pri vseh parabenih ugotovljena hidroliza na PHBA in pripadajoči alkohol, zato smo zaradi večje preglednosti za metabolizem PHBA izdelali samostojno shemo.

4.1.1 METILPARABEN

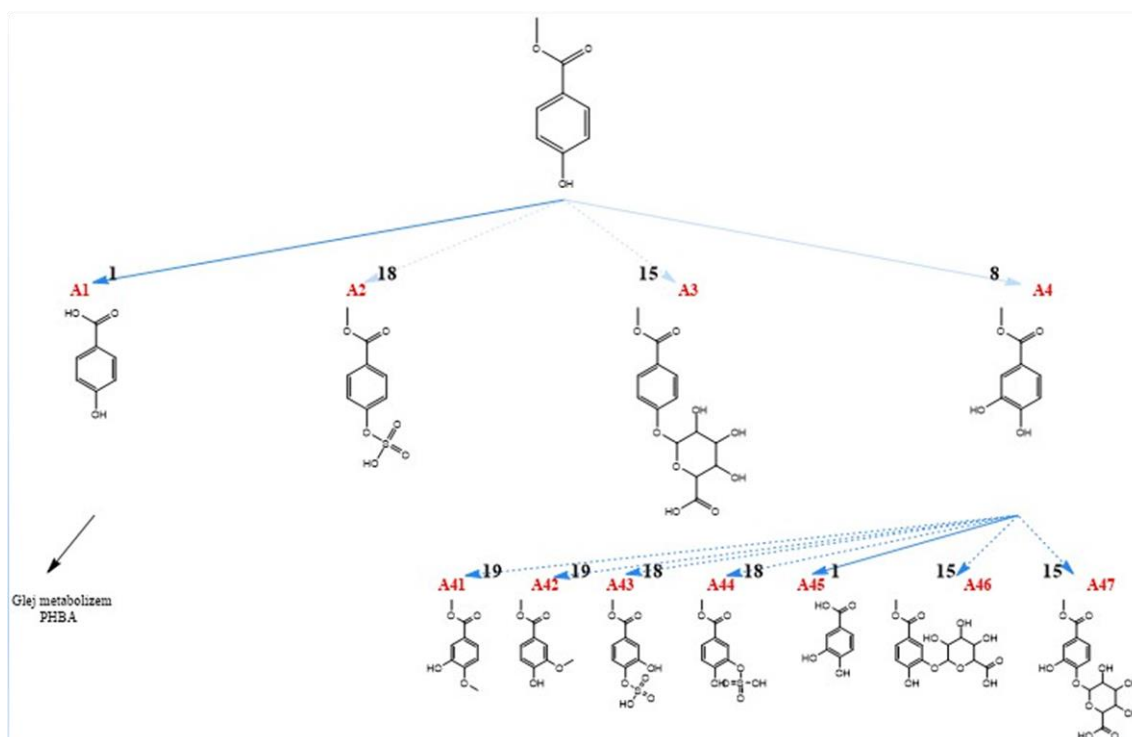
Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 1):

1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* MP do PHBA (A1) (*plausible*).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine MP do produkta A2 (*equivocal*).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske alkoholne skupine MP do produkta A3 (*equivocal*).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* MP do produkta A4 (*equivocal*).

2. stopnja:

- S COMT katalizirana *O-metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine A4 do produkta A41 ali A42 (*plausible*).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine A4 do produkta A43 ali A44 (*plausible*).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine A4 do produkta A45 (*plausible*).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine A4 do produktov A46 ali A47 (*plausible*).



Slika 1 : SHEMA METABOLIZMA METILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.2 ETILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 2):

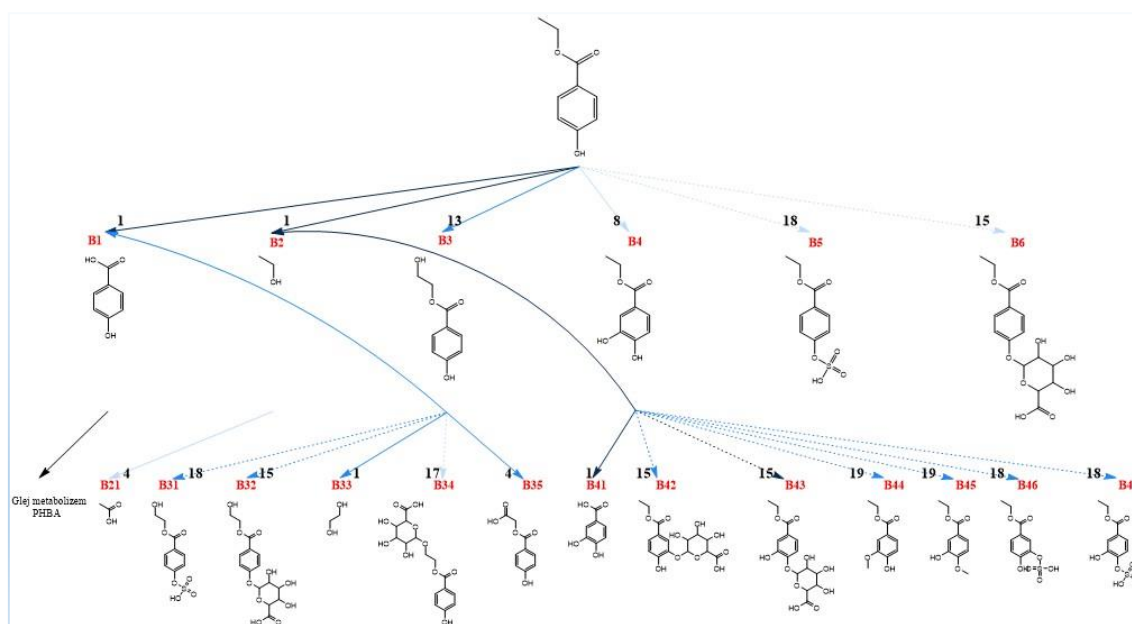
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* EP do PHBA (B1) in etanola (B2) (probable).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalne metilne skupine EP do produkta B3 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* EP do produkta B4 (equivocal).
- S SUPT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine EP do produkta B5 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine EP do produkta B6 (equivocal).

2. stopnja:

- Z ADH katalizirana *oksidacija* etanola (B2) do etanojske kisline (B21) (equivocal).
- S SUPT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine B3 do

- produkta **B31** (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine **B3** do produkta **B32** (plausible).
 - S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine **B3** do **PHBA** (**B1**) in produkta **B33** (plausible).
 - Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine **B3** do produkta **B34** (equivocal).
 - Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine **B3** do produkta **B35** (plausible).
 - S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine **B4** do **PHBA** (**B1**) in produkta **B41** (probable).
 - Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **B4** do produkta **B42** (plausible) ali **B43** (probable).
 - S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **B4** do produkta **B44** ali **B45** (plausible).
 - S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **B4** do produkta **B46** ali **B47** (plausible).



Slika 2 : SHEMA METABOLIZMA ETILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal

4.1.3 PROPILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 3):

1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* PP do PHBA (C1) in propanola (C2) (probable).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predzadnjega C-atoma propilne skupine PP do produkta C3 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalnega C-atoma propilne skupine PP do produkta C4 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* PP do produkta C5 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine PP do produkta C6 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine PP do produkta C7 (equivocal).

2. stopnja:

- Z ADH katalizirana *oksidacija* propanola (C2) do propanojske kisline (C21) (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine propanola (C2) do produkta C22 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine C3 do produkta C31 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine C3 do produkta C32 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine C3 do produkta C33 (plausible).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine C3 do produkta C34 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine C3 do PHBA (C1) in produkta C35 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine C4 do produkta C41 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine C4 do produkta C42 (plausible).

4.1.4 BUTILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 4):

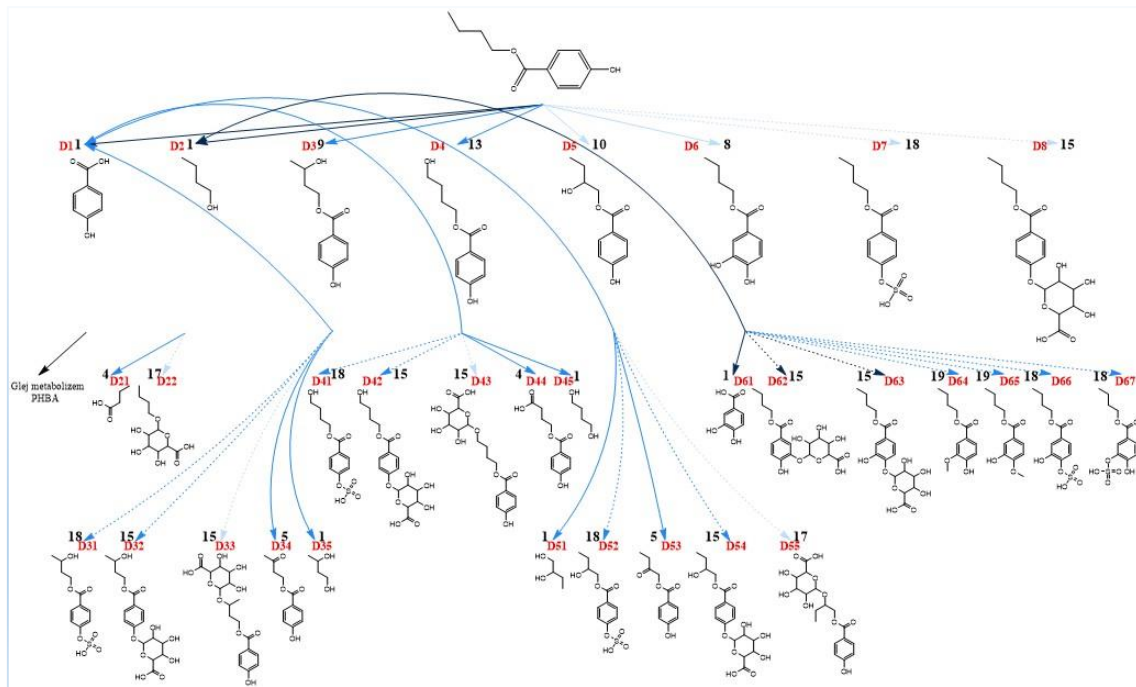
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* BP do PHBA (D1) in butanola (D2) (probable).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predzadnjega C-atoma butilne skupine BP do produkta D3 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalnega C-atoma butilne skupine BP do produkta D4 (plausible).
- S CYP 450 katalizirana *hidroksilacija* predpredzadnjega C-atoma butilne skupine BP do produkta D5 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* BP do produkta D6 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine BP do produkta D7 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine BP do produkta D8 (equivocal).

2. stopnja:

- Z ADH katalizirana *oksidacija* butanola (D2) do butanojske kisline (D21) (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine butanola (D2) do produkta D22 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine D3 do produkta D31 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine D3 do produkta D32 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine D3 do produkta D33 (equivocal).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine D3 do produkta D34 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine D3 do PHBA (D1) in produkta D35 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine D4 do produkta D41 (plausible).

- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine D4 do produkta D42 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine D4 do produkta D43 (equivocal).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine D4 do produkta D44 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine D4 do PHBA (D1) in produkta D45 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine D5 do PHBA (D1) in produkta D51 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine D5 do produkta D52 (plausible).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine D5 do produkta D53 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine D5 do produkta D54 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine D5 do produkta D55 (equivocal).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine D6 do PHBA (D1) in produkta D61 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine D6 do produkta D62 (plausible) ali D63 (probable).
- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine D6 do produkta D64 ali D65 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine D6 do produkta D66 ali D67 (plausible).



Slika 4: SHEMA METABOLIZMA BUTILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metilenske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.5 IZOPROPILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 5):

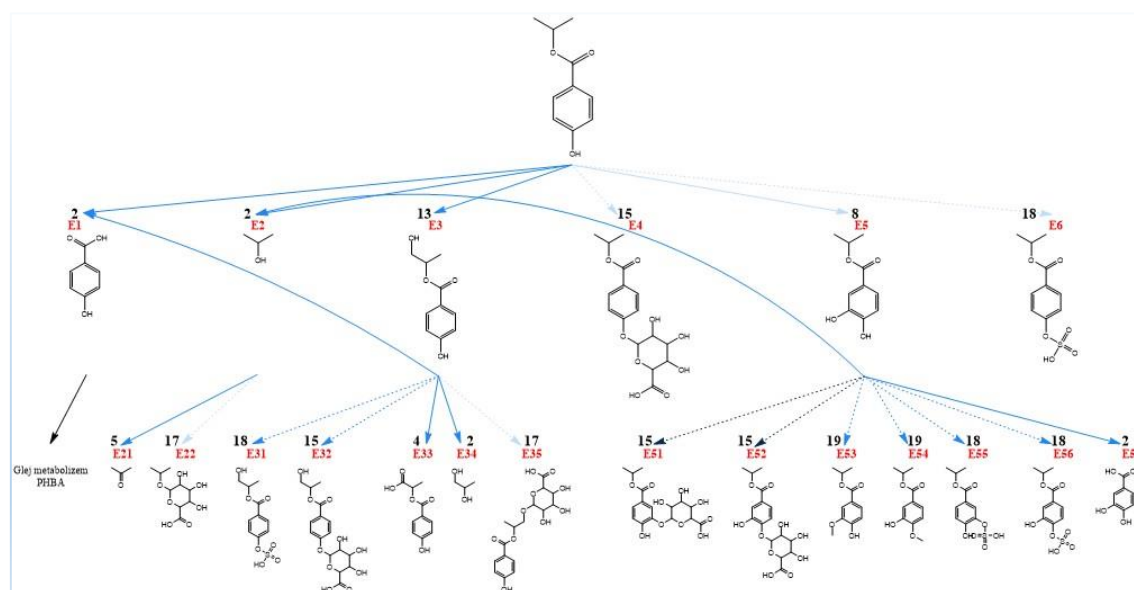
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* iPP do PHBA (**E1**) in izopropanola (**E2**) (*plausible*).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalnega C-atoma izopropilne skupine iPP do produkta **E3** (*plausible*).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine iPP do produkta **E4** (*equivocal*).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* iPP do produkta **E5** (*equivocal*).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine iPP do produkta **E6** (*equivocal*).

2. stopnja:

- Z ADH katalizirana *oksidacija* izopropanola (**E2**) do acetona (**E21**) (*plausible*).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine izopropanola (**E2**) do produkta **E22** (*equivocal*).

- S SULT katalizirana *O*-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine spojine **E3** do produkta **E31** (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine **E3** do produkta **E32** (plausible).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine **E3** do produkta **E33** (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine **E3** do PHBA (**E1**) in produkta **E34** (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine **E3** do produkta **E35** (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **E5** do produkta **E51** ali **E52** (probable).
- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **E5** do produkta **E53** ali **E54** (plausible).
- S SULT katalizirana *O*-sulfatacija ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **E5** do produkta **E55** ali **E56** (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine **E5** do PHBA (**E1**) in produkta **E57** (plausible).



Slika 5: SHEMA METABOLIZMA IZOPROPILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metilenske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.6 IZOBUTILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 6):

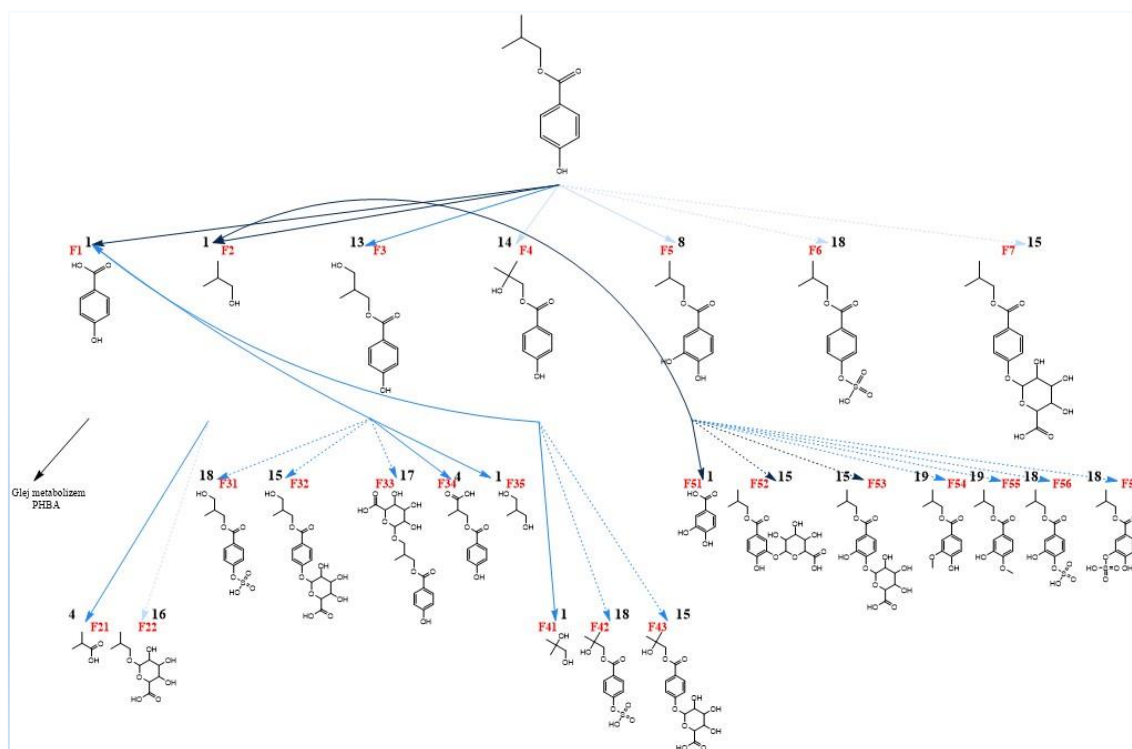
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* iBP do PHBA (F1) in izobutanola (F2) (probable).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalnega C-atoma izobutilne skupine iBP do produkta F3 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predzadnjega C-atoma izobutilne skupine iBP do produkta F4 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* iBP do produkta F5 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine iBP do produkta F6 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine iBP do produkta F7 (equivocal).

2. stopnja:

- Z ADH katalizirana oksidacija izobutanola (F2) do izobutanojske kisline (F21) (plausible).
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine izobutanola (F2) do produkta F22 (equivocal).
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine spojine F3 do produkta F31 (plausible).
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine spojine F3 do produkta F32 (plausible).
- Z UGT katalizirana glukuronidacija alifatske hidroksilne skupine spojine F3 do produkta F33 (plausible).
- Z ADH katalizirana oksidacija alifatske hidroksilne skupine spojine F3 do produkta F34 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana hidroliza spojine F3 do PHBA (F1) in produkta F35 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana hidroliza spojine F4 do PHBA (C1) in produkta F41 (plausible).
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine spojine F4 do produkta F42 (plausible).
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine spojine F4 do produkta F43 (plausible).

- S hidrolazo katalizirana hidroliza spojine **F5** do **PHBA** (**F1**) in produkta **F51** (probable).
- Z UGT katalizirana glukuronidacija ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **F5** do produkta **F52** ali **F53** (probable).
- S COMT katalizirana metilacija ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **F5** do produkta **F54** ali **F55** (plausible).
- S SULT katalizirana O-sulfatacija ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **F5** do produkta **F56** ali **F57** (plausible).



Slika 6: SHEMA METABOLIZMA IZOBUTILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metilenske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alifatske karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.7 PENTILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 7):

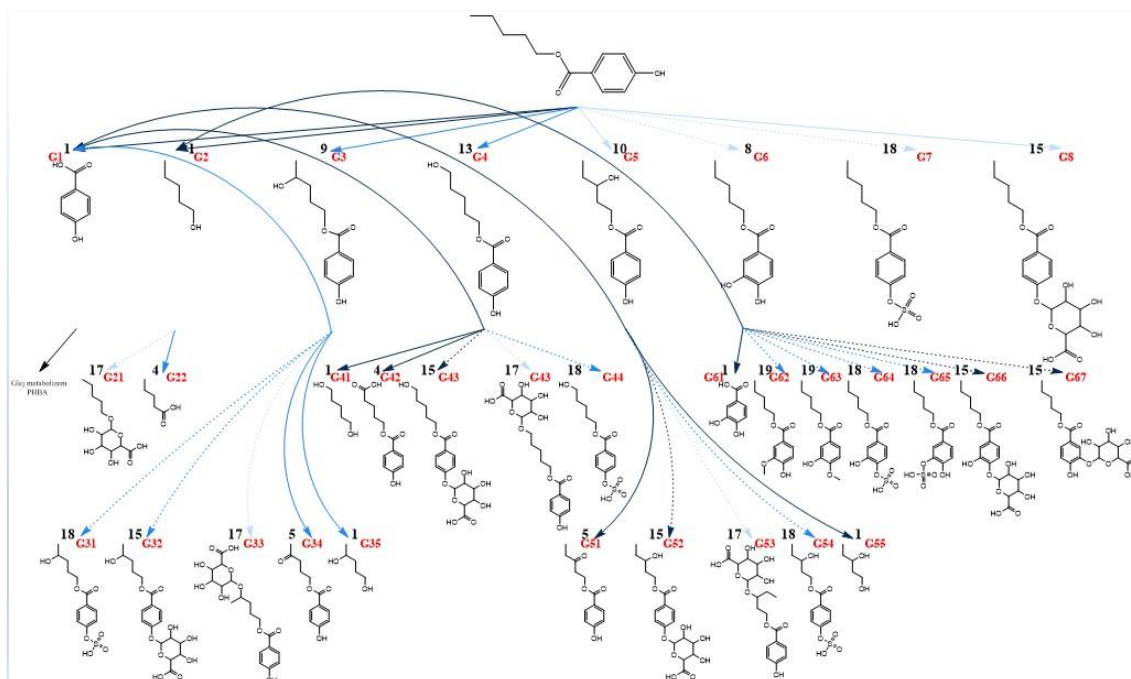
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* PentP do PHBA (G1) in pentanola (G2) (probable).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predzadnjega C-atoma pentilne skupine PentP do produkta G3 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalnega C-atoma pentilne skupine PentP do produkta G4 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predpredzadnjega C-atoma pentilne skupine PentP do produkta G5 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* PentP do produkta G6 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine PentP do produkta G7 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine PentP do produkta G8 (equivocal).

2. stopnja:

- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine pentanola (G2) do produkta G21 (equivocal).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* pentanola (G2) do pentanojske kisline (G22) (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine G3 do produkta G31 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine G3 do produkta G32 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine G3 do produkta G33 (equivocal).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine G3 do produkta G34 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine G3 do PHBA (G1) in produkta G35 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine G4 do PHBA (G1) in produkta G41 (probable).

- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine G4 do produkta G42 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine G4 do produkta G43 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine G4 do produkta G44 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine G4 do produkta G45 (plausible).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine G5 do produkta G51 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine G5 do produkta G52 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine G5 do produkta G53 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine G5 do produkta G54 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine G5 do PHBA (G1) in produkta G55 (probable).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine G6 do PHBA (G1) in produkta G61 (probable).
- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine G6 do produkta G62 ali G63 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine G6 do produkta G64 ali G65 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine G6 do produkta G66 ali G67 (probable).



Slika 7: SHEMA METABOLIZMA PENTILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.8 HEPTILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 8):

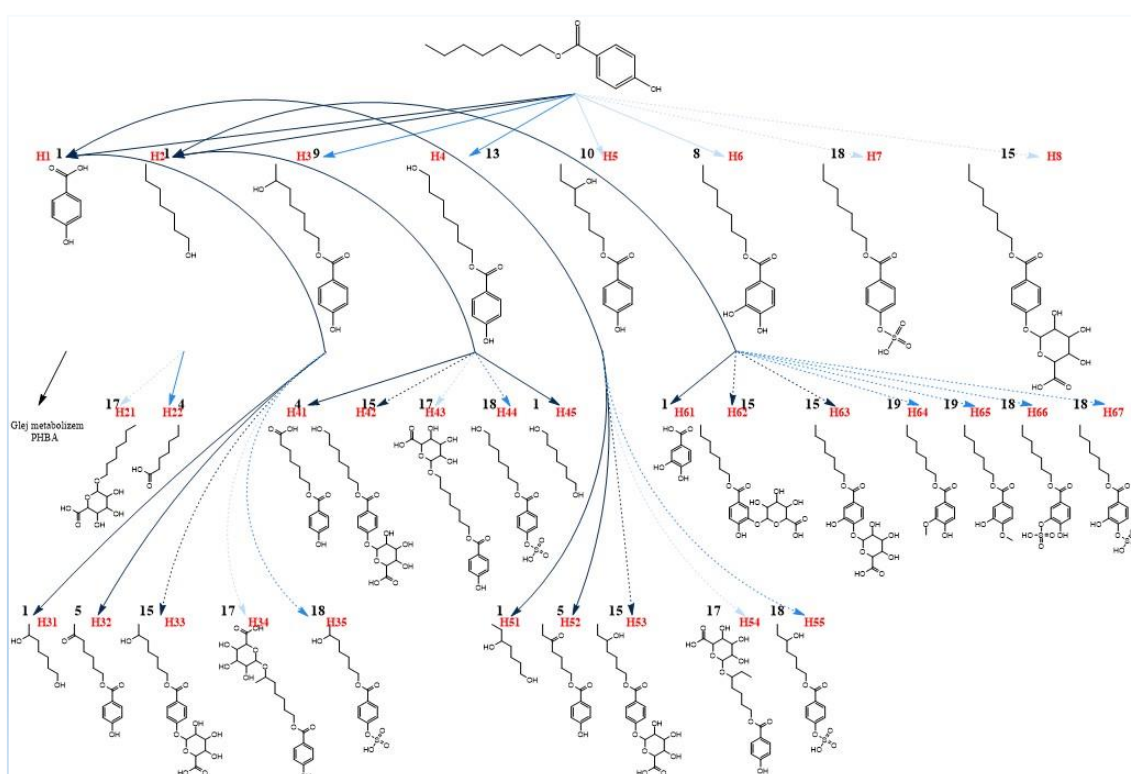
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* HP do PHBA (H1) in heptanola (H2) (probable).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predzadnjega C-atoma heptilne skupine HP do produkta H3 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* terminalnega C-atoma heptilne skupine HP do produkta H4 (plausible).
- S CYP450 katalizirana *hidroksilacija* predpredzadnjega C-atoma heptilne skupine HP do produkta H5 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* HP do produkta H6 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine HP do produkta H7 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine HP do produkta H8 (equivocal).

2. stopnja:

- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine heptanola (H2) do produkta H21 (equivocal).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* heptanola (H2) do heptanojske kisline (H22) (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine H3 do PHBA (H1) in produkta H31 (probable).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine H3 do produkta H32 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine H3 do produkta H33 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine H3 do produkta H34 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine H3 do produkta H35 (plausible).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine H4 do produkta H41 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine H4 do produkta H42 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine H4 do produkta H43 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine spojine H4 do produkta H44 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine H4 do PHBA (H1) in produkta H45 (probable).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine H5 do PHBA (H1) in produkta H51 (probable).
- Z ADH katalizirana *oksidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine H5 do produkta H52 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine H5 do produkta H53 (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* alifatske hidroksilne skupine spojine H5 do produkta H54 (equivocal).

- S SULT katalizirana *O*-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine spojine **H5** do produkta **H55** (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine **H6** do **PHBA** (**H1**) in produkta **H61** (probable).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **H6** do produkta **H62** ali **H63** (probable).
- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **H6** do produkta **H64** ali **H65** (plausible).
- S SULT katalizirana *O*-sulfatacija ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **H6** do produkta **H66** ali **H67** (plausible).



Slika 8: SHEMA METABOLIZMA HEPTILPARABENA; LEGENDA: številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenkih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.9 FENILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 9):

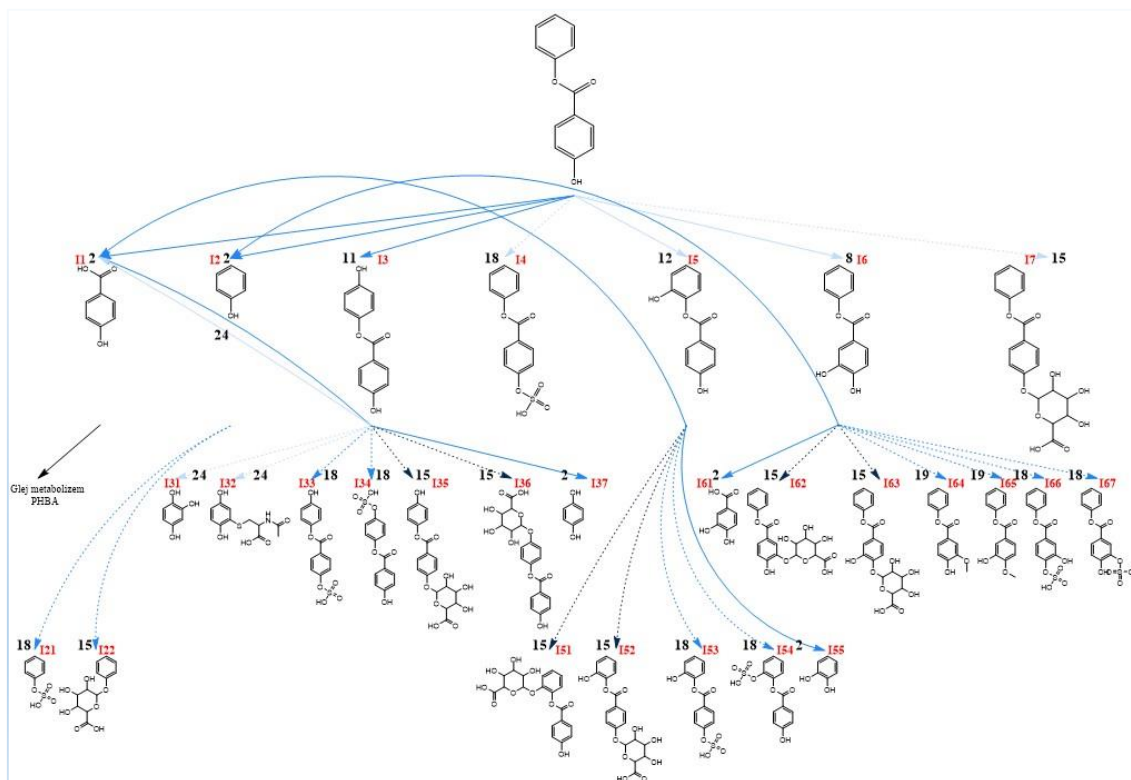
1. stopnja:

- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* FP do PHBA (I1) in fenola (I2) (plausible).
- S CYP450 katalizirana *p-hidroksilacija* fenilne skupine FP do produkta I3 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine FP do produkta I4 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *o-hidroksilacija* fenilne skupine FP do produkta I5 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *2-hidroksilacija* FP do produkta I6 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine FP do produkta I7 (equivocal).

2. stopnja:

- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* hidroksilne skupine fenola (I2) do produkta I21 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine fenola (I2) do produkta I22 (plausible).
- Formacija katehola ali merkapturne kisline preko aren oksidov do PHBA (I1) ter produkta I31 ali I32 (equivocal).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine I3 do produkta I33 ali I34 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine I3 do produkta I35 ali I36 (probable).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine I3 do PHBA (I1) in produkta I37 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine I5 do produkta I51 ali I52 (probable).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine I5 do produkta I53 ali I54 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine I5 do PHBA (I1) in produkta I55 (plausible).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine I6 do PHBA (I1) in produkta I61 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine I6 do produkta I62 ali I63 (probable).

- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **I6** do produkta **I64** ali **I65** (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **I6** do produkta **I66** ali **I67** (plausible).



Slika 9: SHEMA METABOLIZMA FENILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.10 BENZILPARABEN

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 10):

1. stopnja:

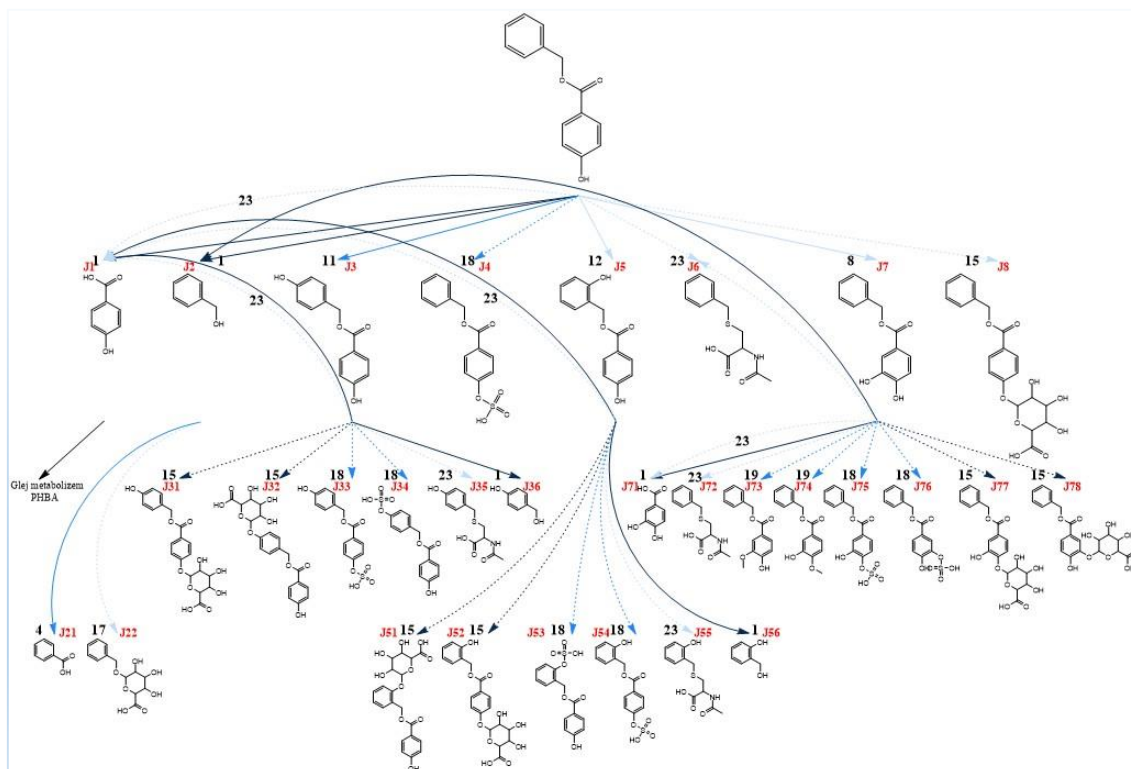
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* **BenzP** do **PHBA** (**J1**) in benzil alkohola (**J2**) (probable).
- S CYP450 katalizirana *p-hidroksilacija* benzilne skupine **BenzP** do produkta **J3** (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine **BenzP** do produkta **J4** (plausible).

- S CYP450 katalizirana *o*-hidroksilacija benzilne skupine BenzP do produkta J5 (equivocal).
- Z GST katalizirana *konjugacija* karboksilnega estra BenzP z glutationom do produkta J6 (equivocal).
- S CYP450 katalizirana *2*-hidroksilacija BenzP do produkta J7 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine BenzP do produkta J8 (equivocal).

2. stopnja:

- Z ADH katalizirana *oksidacija* hidroksilne skupine benzil alkohola (J2) do benzojske kisline (J21) (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine benzil alkohola (J2) do produkta J22 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine J3 do produktov J31 ali J32 (probable).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine J3 do produktov J33 ali J34 (plausible).
- Z GST katalizirana *konjugacija* spojine J3 z glutationom do PHBA (J1) in produkta J35 (equivocal).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine J3 do PHBA (J1) in produkta J36 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine J5 do produktov J51 in J52 (probable).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine J5 do produktov J53 ali J54 (plausible).
- Z GST katalizirana *konjugacija* z glutationom spojine J5 do PHBA (J1) in produkta J55 (equivocal).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine J5 do PHBA (J1) in produkta J56 (probable).
- S hidrolazo katalizirana *hidroliza* spojine J7 do produktov J2 in J71 (probable).
- Z GST katalizirana *konjugacija* spojine J7 z glutationom do produktov J71 in J72 (equivocal).
- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine J7 do produkta J73 ali J74 (plausible).

- S SULT katalizirana *O*-sulfatacija ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **J7** do produkta **J75** ali **J76** (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine **J7** do produkta **J77** ali **J78** (probable).



Slika 10: SHEMA METABOLIZMA BENZILPARABENA; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – *O*-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – *O*-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkilne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.11 P-HIDROKSIBENZOJSKA KISLINA

Program je napovedal naslednji potek metabolizma (slika 11):

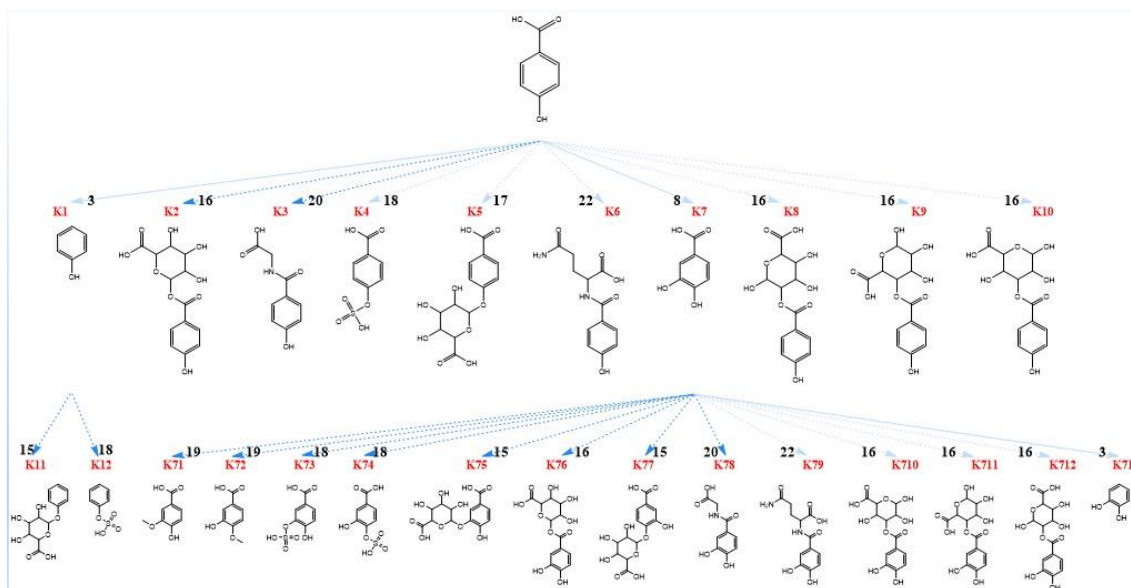
1. stopnja:

- Z dekarboksilazo katalizirana *dekarboksilacija* aromatske karboksilne kisline **PHBA** do **fenola (K1)** (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* karboksilne skupine **PHBA** do produkta **K2** (plausible).
- Z ACS katalizirana *konjugacija* **PHBA** z glicinom do produkta **K3** (plausible).

- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* aromatske hidroksilne skupine PHBA do produkta K4 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine PHBA do produkta K5 (equivocal).
- Z ACS katalizirana *konjugacija* PHBA z glutaminom do produkta K6 (equivocal).
- S CYP 450 katalizirana *2-hidroksilacija* PHBA do produkta K7 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine PHBA do produktov K8, K9 ali K10 (equivocal).

2. stopnja:

- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* hidroksilne skupine fenola (K1) do produkta K11 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* hidroksilne skupine fenola (K1) do produkta K12 (plausible).
- S COMT katalizirana *metilacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine K7 do produktov K71 ali K72 (plausible).
- S SULT katalizirana *O-sulfatacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine K7 do produktov K73 ali K74 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* ene od aromatskih hidroksilnih skupin spojine K7 do produktov K75 in K77 (plausible).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* karboksilne skupine spojine K7 do produkta K76 (plausible).
- Z ACS katalizirana *konjugacija* spojine K7 z glicinom do produkta K78 (equivocal).
- Z ACS katalizirana *konjugacija* spojine K7 z glutaminom do produkta K79 (equivocal).
- Z UGT katalizirana *glukuronidacija* aromatske hidroksilne skupine spojine K7 do produktov K710, K711 ali K712 (equivocal).
- Z dekarboksilazo katalizirana *dekarboksilacija* aromatske karboksilne kisline K7 do katehola (K713) (equivocal).



Slika 11: SHEMA METABOLIZMA P-HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE; LEGENDA: Številčenje reakcij v shemi: 1 – hidroliza acikličnega karboksilnega estra, 2 – hidroliza sterično oviranega acikličnega karboksilnega estra, 3 – dekarboksilacija α -amino, aromatske ali β -keto karboksilne kisline, 4 – oksidacija primarnega alkohola, 5 – oksidacija sekundarnega (acikličnega) alkohola, 6 – β -oksidacija karboksilne kisline, 7 – PROTOTIP- α -hidroksilacija karboksilne kisline, 8 – 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena, 9 – hidroksilacija predzadnje alkil metilenske skupine, 10 – hidroksilacija predpredzadnje alkil metilenske skupine, 11 – para hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 12 – orto hidroksilacija monosubstituirane benzenove spojine, 13 – hidroksilacija terminalne metilne skupine, 14 – hidroksilacija alkil metinske skupine, 15 – glukuronidacija aromatskega alkohola, 16 – glukuronidacija karboksilne kisline, 17 – glukuronidacija primarnega ali sekundarnega alifatskega ali benzilnega alkohola, 18 – O-sulfatacija aromatskega alkohola, 19 – O-metilacija katehola, 20 – konjugacija aril ali alkilarilne karboksilne kisline z glicinom, 21 – konjugacija alkinne karboksilne kisline z glicinom, 22 – konjugacija karboksilne kisline z glutaminom, 23 – konjugacija karboksilnega estra z glutationom, 24 – PROTOTIP-formacija katehola ali merkapturne kisline preko arenjskih oksidov; Faze metabolizma: Polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, Črtkana črta – reakcija metabolizma 2. faze; Verjetnost poteka metabolizma: Temno modra – probable, Modra – plausible, Svetlo modra – equivocal.

4.1.12 RAZPRAVA

Program je kot najbolj verjeten potek metabolizma za vse parabene napovedal hidrolizo do PHBA in pripadajočega alkohola. PHBA se na novo nastali karboksilni skupini v naslednjem koraku najverjetneje konjugira z glukuronsko kislino ali glicinom. Encimi, ki pri metabolizmu sodelujejo, so hidrolaze in specifične transferaze. Tak potek navajajo tudi številne *in vivo* raziskave, ki so našteje v preglednici 1 v Prilogi II. (121, 122, 123, 124, 125, 126, 127) Raziskave kot metabolite parabenov navajajo še konjugate s sulfatom in glukuronsko kislino na aromatski hidroksilni skupini parabena ali PHBA. Program je napovedal tudi te metabolite, vendar je glede na napoved njihov nastanek manj verjeten. Kot manj verjetne metabolite je program napovedal še na aromatskem obroču ali stranski skupini hidroksilirane parabene, njihove konjugate, oksidirane ali hidrolizirane metabolite ter tudi fenol in 3,4-dihidroksibenzojsko kislino kot potencialna metabolita PHBA. Teh metabolitov v dosedanjih raziskavah metabolizma parabenov še niso zaznali. V raziskavah so večinoma proučevali metabolite v urinu in ne v ostalih telesnih tekočinah in tkivih, kjer bi morda lahko bili prisotni predvsem metaboliti reakcij I. faze metabolizma pred njihovim nadaljnjim metabolizmom. Možno je tudi, da metabolizem v telesu v nekatere napovedane smeri sploh

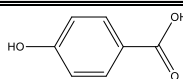
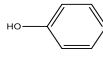
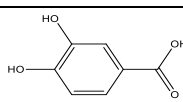
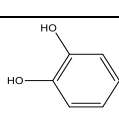
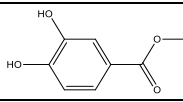

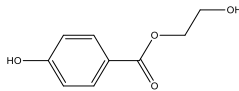
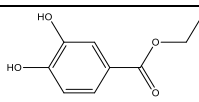


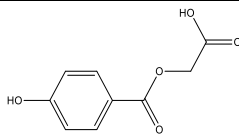

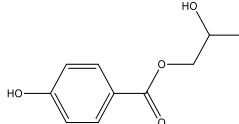
ne poteka, ali poteka v tako majhni meri, da metabolitov ni mogoče zaznati. Kljub temu nastanka do sedaj še nedokazanih metabolitov ne moremo povsem izključiti.

Program z napovedjo poteka metabolizma parabenov daje možnost nadaljnje eksperimentalne analize v smeri detekcije napovedanih metabolitov ter odkritja do sedaj še neznanih metabolitov.

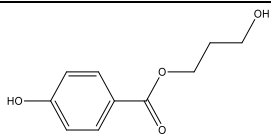
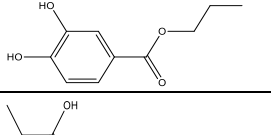
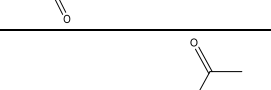
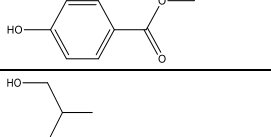
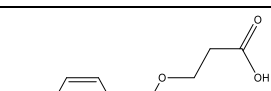
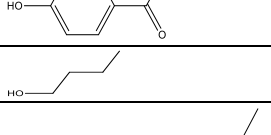
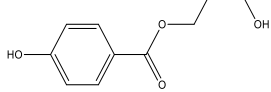
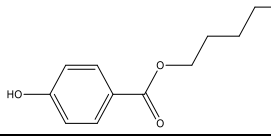
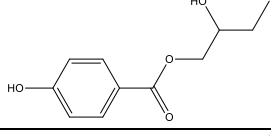
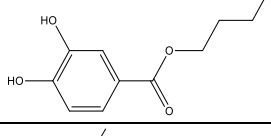
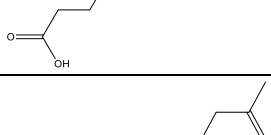
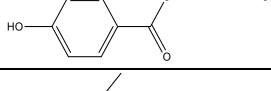
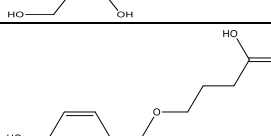
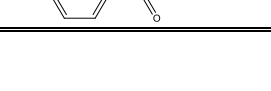

4.2 ZBRANI METABOLITI

Za nadaljnjo napoved endokrinih učinkov in različnih vidikov reproduktivne toksičnosti smo zbrali le napovedane metabolite I. faze metabolizma, saj so konjugirani metaboliti II. faze običajno biološko neaktivni in se iz telesa hitro izločijo predvsem skozi ledvice. Zbranih metabolitov je 79 in so predstavljeni v preglednici IV.

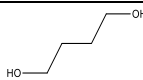
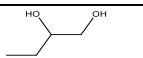
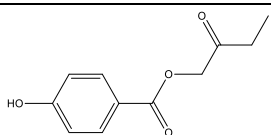
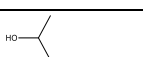
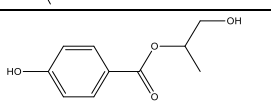
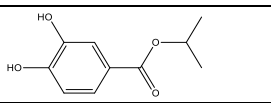

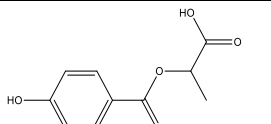
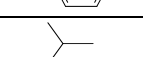
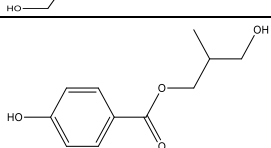
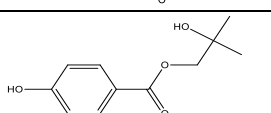
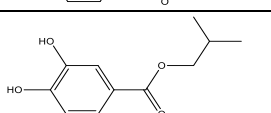
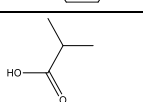
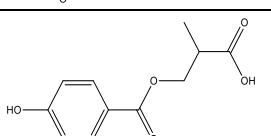
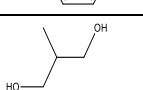
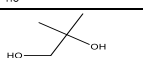
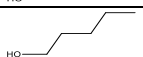
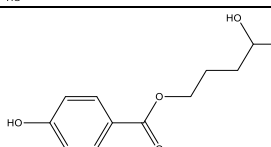
Preglednica IV: Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.

ŠT.	METABOLIT	SMILES	IZVORNI PARABEN
<u>1</u>		<chem>c1ccc(cc1O)C(=O)O</chem>	MP (A1), EP (B1), PP (C1), BP (D1), iPP (E1), iBP (F1), PentP (G1), HP (H1), FP (I1), BzP (J1)
<u>2</u>		<chem>c1ccc(cc1)O</chem>	MP (K1), EP (K1), PP (K1), BP (K1), iPP (K1), iBP (K1), PentP (K1), HP (K1), FP (I2, K1), BzP (K1)
<u>3</u>		<chem>C=1(C=CC(=CC=1O)C(=O)O)O</chem>	MP (A45, K7), EP (B41, K7), PP (C51, K7), BP (D61, K7), iPP (E57, K7), iBP (F51, K7), PentP (G61, K7), HP (H51, K7), FP (I61, K7), BzP (J71, K7)
<u>4</u>		<chem>C=1(C=CC=CC=1O)O</chem>	MP (K713), EP (K713), PP (K713), BP (K713), iPP (K713), iBP (K713), PentP (K713), HP (K713), FP (I55, K713), BzP (K713)
<u>5</u>		<chem>C=1(C=CC(=C(C=1O)O)C(OC)C(=O)O</chem>	MP (A4)
<u>6</u>		<chem>OCC</chem>	EP (B2)
<u>7</u>		<chem>c1ccc(cc1O)C(=O)OCCO</chem>	EP (B3)
<u>8</u>		<chem>C=1(C=CC(=C(C=1O)O)C(OCC)C(=O)O</chem>	EP (B4)
<u>9</u>		<chem>O=C(C)O</chem>	EP (B21)
<u>10</u>		<chem>OCCO</chem>	EP (B33)
<u>11</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1O)C(OCC(=O)O)O)O</chem>	EP (B35)
<u>12</u>		<chem>OCCC</chem>	PP (C2)
<u>13</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1O)C(OCC(C)O)O)O</chem>	PP (C3)

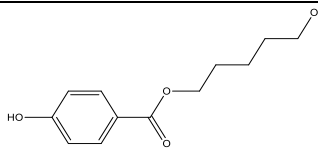
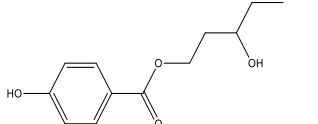
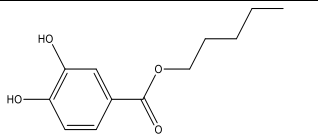

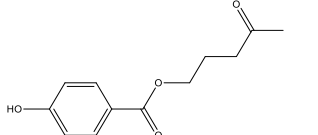

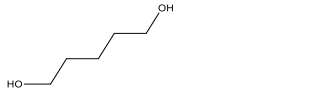
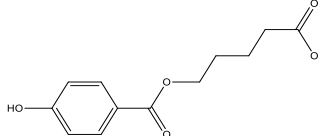
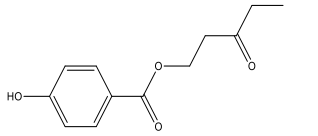
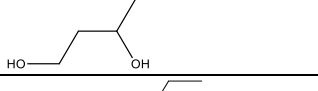
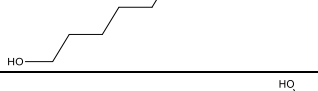
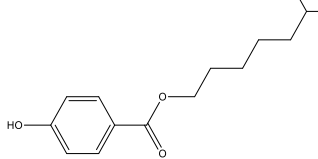
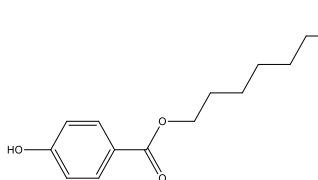
Preglednica IV (nadaljevanje): Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.

ŠT.	METABOLIT	SMILES	IZVORNI PARABEN
14		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC O)=O</chem>	PP (C4)
15		<chem>C=1(C=CC(=C(C=1)O)O)C(O CCC)=O</chem>	PP (C5)
16		<chem>O=C(CC)O</chem>	PP (C21)
17		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC(C)=O)=O</chem>	PP (C34)
18		<chem>OCC(C)O</chem>	PP (C35), iPP (E34)
19		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC(=O)O)=O</chem>	PP (C44)
20		<chem>OCCCC</chem>	BP (C43)
21		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC(C)O)=O</chem>	BP (D3)
22		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC CO)=O</chem>	BP (D4)
23		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC(C C)O)=O</chem>	BP (D5)
24		<chem>C=1(C=CC(=C(C=1)O)O)C(O CCC)=O</chem>	BP (D6)
25		<chem>O=C(CCC)O</chem>	BP (D21)
26		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC(C)=O)=O</chem>	BP (D34)
27		<chem>OCCC(C)O</chem>	BP (D35)
28		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC C(=O)O)=O</chem>	BP (D44)

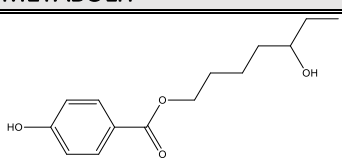
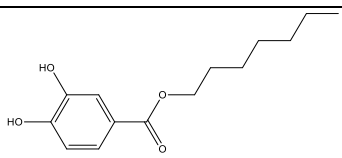
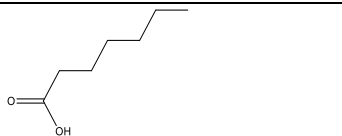
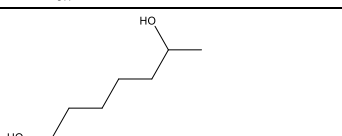
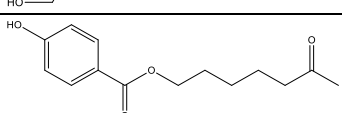
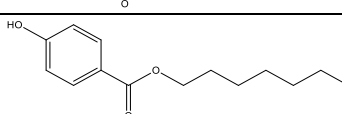
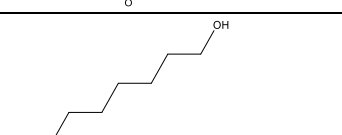
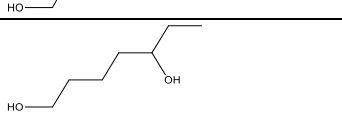
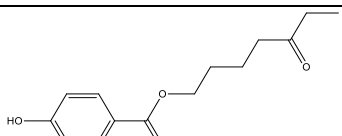
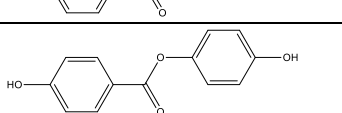
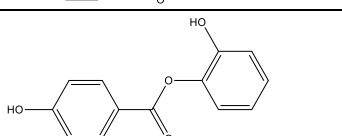
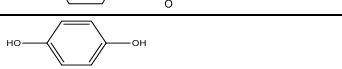
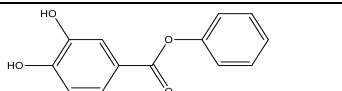
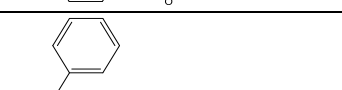
Preglednica IV (nadaljevanje): Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.

ŠT.	METABOLIT	SMILES	IZVORNI PARABEN
29		OCCCCO	BP (D45)
30		OCC(CC)O	BP (D51)
31		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC(C)C)=O	BP (D53)
32		OC(C)C	iPP (E2)
33		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OC(C)C)C(=O)O	iPP (E3)
34		C=1(C=CC(=C(C=1)O)O)C(O)C(C)C=O	iPP (E5)
35		O=C(C)C	iPP (E21)
36		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OC(C)C(=O)O)C(=O)O	iPP (E33)
37		OCC(C)C	iBP (F2)
38		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC(C)C)C(=O)O	iBP (F3)
39		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC(C)(C)C)C(=O)O	iBP (F4)
40		C=1(C=CC(=C(C=1)O)O)C(O)CC(C)C=O	iBP (F5)
41		O=C(C)C(C)O	iBP (F21)
42		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC(C)C(O)C(=O)O)C(=O)O	iBP (F34)
43		OCC(C)CO	iBP (F35)
44		OCC(C)(C)O	iBP (F41)
45		OCCCCC	PentP (G2)
46		C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC(C)C)C(=O)O	PentP (G3)

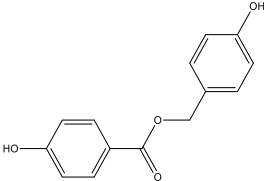
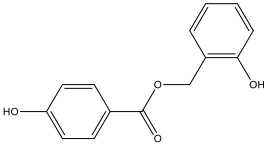
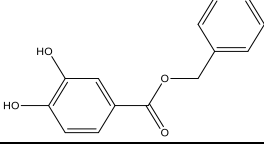
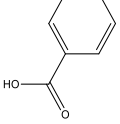
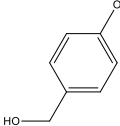
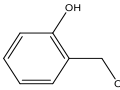
Preglednica IV (nadaljevanje): Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.

ŠT.	METABOLIT	SMILES	IZVORNI PARABEN
<u>47</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCCCO)=O</chem>	PentP (G4)
<u>48</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCC(C)O)=O</chem>	PentP (G5)
<u>49</u>		<chem>C=1(C=CC(=C(C=1)O)O)C(OCCCCC)=O</chem>	PentP (G6)
<u>50</u>		<chem>O=C(CCCCC)O</chem>	PentP (G22)
<u>51</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCC(=O)C)=O</chem>	PentP (G34)
<u>52</u>		<chem>OCCCC(C)O</chem>	PentP (G35)
<u>53</u>		<chem>OCCCCCO</chem>	PentP (G41)
<u>54</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCC(O)O)=O</chem>	PentP (G42)
<u>55</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCC(=O)C)=O</chem>	PentP (G51)
<u>56</u>		<chem>OCCC(CC)O</chem>	PentP (G55)
<u>57</u>		<chem>OCCCCCO</chem>	HP (H2)
<u>58</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCC(C)(C)O)=O</chem>	HP (H3)
<u>59</u>		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCCO)=O</chem>	HP (H4)

Preglednica IV (nadaljevanje): Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.

ŠT.	METABOLIT	SMILES	IZVORNI PARABEN
60		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCCC(C)O)=O</chem>	HP (H5)
61		<chem>C=1(C=CC(=C(C=C1)O)O)C(OCCCCCCC)=O</chem>	HP (H6)
62		<chem>O=C(CCCCCC)O</chem>	HP (H22)
63		<chem>OCCCCC(C)O</chem>	HP (H31)
64		<chem>c1(ccc(cc1)O)C(=O)OCCCCC(C=O)C</chem>	HP (H32)
65		<chem>c1(ccc(cc1)O)C(=O)OCCCCC(CC(=O)O)O</chem>	HP (H41)
66		<chem>OCCCCCCC(O)O</chem>	HP (H45)
67		<chem>OCCCCC(CC)O</chem>	HP (H51)
68		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCCCCC(C)C(=O)C)=O</chem>	HP (H52)
69		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OC2=CC=C(C=C2)O)=O</chem>	FP (I3)
70		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OC2=CC=CC(=C2)O)=O</chem>	FP (I5)
72		<chem>OC1=CC=C(C=C1)O</chem>	FP (I37)
71		<chem>C=1(C=CC(=C(C=C1)O)O)C(OC2=CC=CC=C2)=O</chem>	FP (I6)
73		<chem>OCC1=CC=CC=C1</chem>	BzP (J2)

Preglednica IV (nadaljevanje): Zbrani metaboliti za nadaljnjo analizo.

ŠT.	METABOLIT	SMILES	IZVORNI PARABEN
74		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC2=CC=C(C=C2)O)=O</chem>	BzP (J3)
75		<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(OCC=2C=CC=CC=2O)=O</chem>	BzP (J5)
76		<chem>C=1(C=CC(=C(C=1)O)O)C(OCC2=CC=CC=C2)=O</chem>	BzP (J7)
77		<chem>O=C(C1=CC=CC=C1)O</chem>	BzP (J21)
78		<chem>OCC1=CC=C(C=C1)O</chem>	BzP (J36)
79		<chem>OCC=1C=CC=CC=1O</chem>	BzP (J56)

4.3 NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI

4.3.1 RELATIVE BINDING AFFINITY MODEL (VegaNIC)

S pomočjo modela **Relative Binding Affinity model** programa **VegaNIC** smo napovedali preko ER posredovano endokrino toksičnost. Program je za vsako spojino napovedal, ali je spojina **aktivna** ali **neaktivna** in z zvezdicami od ena do tri podal zanesljivost napovedi.

Za izbrane parabene smo dobili naslednje rezultate, ki so predstavljeni v preglednici V:

- Program je za **timol** (- kontrola) napovedal, da na ER **ni aktiven**, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.
- Za **BPA** (+ kontrola) je napovedal, da je na ER **aktiven**, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.
- Za **MP** je napovedal, da na ER **ni aktiven**.
- Za **EP, PP, BP, iPP, iBP** in **BzP** je napovedal, da so na ER **aktivni**, kar za **PP, BP** in **iPP** potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.

- **PentP** in **FP** se nahajata izven območja uporabnosti modela, **HP** pa bi se lahko nahajal izven območja uporabnosti modela, zato njihovi rezultati niso zanesljivi.

Preglednica V: Rezultati s programom VegaNIC napovedane preko ER posredovane endokrine toksičnosti izbranih parabenov.

SPOJINA	REZULTAT
timol (-)	--- (E)
BPA (+)	+++ (E)
MP	---
EP	+++
PP	+++ (E)
BP	+++ (E)
iPP	+++ (E)
iBP	+++
PentP	-
HP	++
FP	+
BzP	+++ (E)

OPOMBA: Kot rezultat je zapisan + (aktivna spojina) ali - (neaktivna spojina), število znakov pomeni zanesljivost napovedi (en znak */***, dva znaka **/**, trije znaki ***/**); če se v podatkovni bazi modela nahaja eksperimentalni podatek, je poleg rezultata zapisan (E); zaradi večje preglednosti je negativna napoved največje zanesljivosti osenčena zeleno, pozitivna napoved največje zanesljivosti pa rdeče.

Za zbrane metabolite izbranih parabenov smo dobili naslednje rezultate, ki so predstavljeni v preglednici VI:

- Program je za hidroksilirane metabolite parabenov **13**, **14**, **33** in **75** ter še dodatno oksidirana metabolita, karboksilni kislini **19** in **42**, napovedal, da so na ER **aktivni**.
- Za **PHBA (1)** in njena nadaljnja metabolita **2** in **4** je napovedal, da na ER **niso aktivni**.
- Za metabolne ostanke alkilnih stranskih skupin parabenov **10**, **12**, **16**, **18**, **20**, **25**, **27**, **29**, **30**, **32**, **35**, **37**, **41**, **43**, **44**, **45**, **50**, **52**, **56**, **57**, **62**, **63**, **66** in **67** ter produkte hidrolize FP in BzP **72**, **77** in **79** je napovedal, da na ER **niso aktivni**.
- Več kot polovica metabolitov (43 od 79) bi se lahko nahajala ali se nahaja izven območja uporabnosti modela, zato njihovi rezultati niso zanesljivi.

Preglednica VI: Rezultati s programom VegaNIC napovedane preko ER posredovane endokrine toksičnosti zbranih metabolitov izbranih parabenov.

SPOJINA	REZULTAT
timol (-)	--- (E)
BPA (+)	+++ (E)
<u>1</u>	--- (E)
<u>2</u>	--- (E)
<u>3</u>	--
<u>4</u>	--- (E)
<u>5</u>	--
<u>6</u>	-
<u>7</u>	+
<u>8</u>	+; - (E)
<u>9</u>	-
<u>10</u>	--- (E)
<u>11</u>	+
<u>12</u>	---
<u>13</u>	+++
<u>14</u>	+++
<u>15</u>	+
<u>16</u>	---
<u>17</u>	+

<u>18</u>	---
<u>19</u>	+++
<u>20</u>	---
<u>21</u>	++
<u>22</u>	++
<u>23</u>	++
<u>24</u>	+
<u>25</u>	---
<u>26</u>	++
<u>27</u>	---
<u>28</u>	++
<u>29</u>	---
<u>30</u>	---
<u>31</u>	++
<u>32</u>	---
<u>33</u>	+++
<u>34</u>	+
<u>35</u>	---
<u>36</u>	+
<u>37</u>	---

<u>38</u>	++
<u>39</u>	++
<u>40</u>	+
<u>41</u>	---
<u>42</u>	+++
<u>43</u>	---
<u>44</u>	---
<u>45</u>	---
<u>46</u>	++
<u>47</u>	-
<u>48</u>	++
<u>49</u>	+
<u>50</u>	---
<u>51</u>	++
<u>52</u>	---
<u>53</u>	-
<u>54</u>	-
<u>55</u>	++
<u>56</u>	---
<u>57</u>	---
<u>58</u>	++

<u>59</u>	-
<u>60</u>	-
<u>61</u>	+
<u>62</u>	---
<u>63</u>	---
<u>64</u>	++
<u>65</u>	-
<u>66</u>	---
<u>67</u>	---
<u>68</u>	-
<u>69</u>	++
<u>70</u>	+
<u>71</u>	+
<u>72</u>	--- (E)
<u>73</u>	--
<u>74</u>	+
<u>75</u>	+++
<u>76</u>	+
<u>77</u>	---
<u>78</u>	-
<u>79</u>	---

OPOMBA: Kot rezultat je zapisan + (aktivna spojina) ali – (neaktivna spojina), število znakov pomeni zanesljivost napovedi (en znak */***, dva znaka **/**, trije znaki ***/***); če se v podatkovni bazi modela nahaja eksperimentalni podatek, je poleg rezultata zapisan (E); zaradi večje preglednosti je negativna napoved največje zanesljivosti osenčena zeleno, pozitivna napoved največje zanesljivosti pa rdeče.

4.3.2 ENDOCRINE DISRUPTOME

S pomočjo programa **Endocrine disruptome** smo napovedali verjetnost vezave na dvanajst različnih receptorjev v šestnajstih različnih konformacijah. Program je kot rezultat podal številčne vrednosti in jih obarval glede na verjetnost vezave: **rdeča** – največja verjetnost vezave, **oranžna** – velika verjetnost vezave, **rumena** – srednja verjetnost vezave, **zeleno** – majhna verjetnost vezave (iz praktičnih razlogov je v nadaljnje nadomeščena z belo barvo). Opazili smo, da nekaterih vrednosti ni obarval skladno z razredom verjetnosti vezave, v katerega sodijo, zato smo jih v teh primerih glede na verjetnostne razrede obarvali sami.

Za izbrane parabene smo dobili naslednje rezultate, ki so predstavljeni v preglednici VII:

- Program je za **timol** (- kontrola) napovedal **srednjo verjetnost vezave** na AR an in majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **BPA** (+ kontrola) je napovedal **največjo verjetnost vezave** na AR in AR an, **srednjo verjetnost vezave** na ER α , ER β , GR, TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **MP**, **EP**, **PP**, **BP**, **iPP** in **PentP** je napovedal **srednjo verjetnost vezave** na AR an ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **iBP** in **HP** je napovedal **srednjo verjetnost vezave** na AR an in TR α ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **FP** je napovedal **srednjo verjetnost vezave** na AR, AR an, TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.

- Za **BzP** je napovedal **veliko verjetnost vezave** na AR, **srednjo verjetnost vezave** na AR an in TR α ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.

Preglednica VII: Rezultati s programom Endocrine disruptome napovedane endokrine toksičnosti izbranih parabenov.

SPOJINA	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
timol (-)	-6,1	-6,8	-6,1	-5,9	-6,0	-6,0	-6,3	-5,9	-6,8	-6,8	-5,8	-6,2	-6,3	-6,2	-6,9	-6,7
BPA (+)	-8,7	-8,6	-8,3	-8,6	-8,5	-8,2	-7,8	-7,5	-8,5	-8,1	-7,8	-8,0	-7,2	-7,9	-8,5	-8,6
MP	-6,2	-5,9	-5,7	-5,7	-5,8	-5,7	-5,9	-5,3	-5,7	-6,1	-5,5	-5,7	-5,4	-6,1	-5,9	-5,8
EP	-6,3	-6,0	-6,0	-6,0	-6,1	-6,1	-6,0	-5,6	-5,9	-6,3	-5,8	-6,0	-5,8	-6,5	-6,4	-6,1
PP	-6,4	-6,2	-6,4	-6,3	-6,4	-6,3	-6,1	-5,8	-6,2	-6,5	-6,1	-5,9	-6,2	-6,8	-6,6	-6,5
BP	-6,8	-6,3	-6,7	-6,3	-6,5	-6,5	-6,4	-5,9	-6,4	-6,9	-6,5	-6,0	-6,7	-7,0	-6,8	-6,8
iPP	-6,7	-6,4	-6,5	-6,4	-6,5	-6,5	-6,3	-5,9	-6,5	-6,8	-6,2	-6,2	-6,2	-6,9	-7,0	-6,6
iBP	-6,8	-6,6	-6,6	-6,5	-6,5	-6,7	-6,4	-6,1	-6,6	-6,9	-6,5	-6,4	-6,6	-7,0	-7,4	-7,2
PentP	-6,9	-6,5	-6,7	-6,4	-6,6	-6,6	-5,7	-5,8	-6,4	-7,0	-6,6	-6,5	-6,8	-7,3	-7,0	-7,0
HP	-7,0	-6,5	-6,9	-6,9	-7,0	-7,0	-6,1	-5,8	-6,8	-6,4	-6,7	-7,1	-7,1	-7,5	-7,5	-7,5
FP	-8,0	-7,9	-7,9	-7,8	-7,9	-8,0	-7,2	-7,1	-7,7	-8,0	-7,6	-7,5	-7,6	-8,6	-8,0	-8,0
BzP	-8,2	-8,0	-8,1	-8,0	-8,0	-7,7	-7,7	-6,9	-7,8	-8,2	-7,7	-8,0	-8,0	-8,7	-8,3	-8,1

OPOMBA: Rezultati so obarvani glede na verjetnost vezave od rdeče (največja verjetnost vezave) preko oranžne in rumene do bele (majhna verjetnost vezave).

Za zbrane metabolite izbranih parabenov smo dobili naslednje rezultate, ki so predstavljeni v preglednici VIII:

- Program je za metabolite **6** (etanol), **9** (etanojska kislina) in **35** (acetone) napovedal majhno verjetnost vezave na vse receptorje.
- Za metabolite **1-5, 7, 8, 10-23, 25-34, 36, 37, 39, 41-48, 50-57, 59, 62-67, 72, 73 in 77-79** je napovedal **srednjo verjetnost vezave** na AR an ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za hidroksilirane metabolite parabenov **24, 38, 40, 49, 48, 60 in 61** ter še dodatno oksidiran metabolit **68** je napovedal **srednjo verjetnost vezave** na AR an in TR α ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za hidroksilirane metabolite FP **69, 70 in 71** je napovedal **veliko verjetnost vezave** na AR an, **srednjo verjetnost vezave** na AR, GR, TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za hidroksiliran metabolit BzP **74** je napovedal **veliko verjetnost vezave** na AR in AR an, **srednjo verjetnost vezave** na ER α , TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za hidroksiliran metabolit BzP **75** je napovedal **veliko verjetnost vezave** na AR in AR an, **srednjo verjetnost vezave** na GR, TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za hidroksiliran metabolit BzP **76** je napovedal **veliko verjetnost vezave** na AR an, **srednjo verjetnost vezave** na AR, ER α , GR, TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.

Preglednica VIII: Rezultati s programom Endocrine disruptome napovedane endokrine toksičnosti zbranih metabolitov izbranih parabenov.

SPOJINA	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
timol (-)	-6,1	-6,8	-6,1	-5,9	-6,0	-6,0	-6,3	-5,9	-6,8	-6,8	-5,8	-6,2	-6,3	-6,2	-6,9	-6,7
BPA (+)	-8,7	-8,6	-8,3	-8,6	-8,5	-8,2	-7,8	-7,5	-8,5	-8,1	-7,8	-8,0	-7,2	-7,9	-8,5	-8,6
<u>1</u>	-6,0	-5,9	-5,6	-5,6	-5,7	-5,6	-5,7	-5,2	-5,5	-6,0	-5,5	-5,8	-5,3	-6,3	-5,9	-5,7
<u>2</u>	-5,1	-5,3	-4,8	-4,9	-4,8	-4,8	-5,1	-4,6	-5,0	-4,9	-4,7	-4,9	-5,1	-5,4	-5,1	-5,0
<u>3</u>	-6,1	-5,9	-5,8	-5,9	-5,7	-5,6	-6,4	-5,8	-6,0	-6,0	-5,7	-5,9	-5,4	-6,2	-6,1	-6,2
<u>4</u>	-5,3	-5,5	-5,2	-5,2	-5,2	-5,0	-5,5	-5,1	-5,2	-5,0	-4,7	-5,0	-5,5	-5,6	-5,8	-5,2
<u>5</u>	-6,2	-6,1	-5,9	-6,0	-5,9	-5,7	-6,6	-5,5	-6,0	-6,1	-5,7	-5,8	-5,5	-6,2	-6,3	-6,3
<u>6</u>	-2,7	-2,6	-2,5	-2,6	-2,5	-2,5	-2,6	-2,6	-2,4	-2,4	-2,5	-2,5	-2,6	-2,6	-2,7	-2,9
<u>7</u>	-6,3	-6,2	-6,0	-5,7	-5,9	-5,7	-6,0	-5,7	-6,2	-6,4	-6,1	-6,1	-5,8	-6,3	-6,2	-6,3
<u>8</u>	-6,3	-6,2	-6,3	-6,1	-6,1	-6,0	-6,6	-5,8	-6,1	-6,3	-5,9	-5,8	-6,1	-6,7	-6,6	-6,5
<u>9</u>	-3,2	-2,9	-2,7	-2,5	-2,7	-2,6	-3,0	-2,7	-2,6	-2,4	-2,5	-2,6	-2,7	-3,2	-2,8	-2,5
<u>10</u>	-3,2	-3,2	-2,9	-2,8	-2,9	-2,8	-3,0	-3,2	-2,8	-2,9	-2,8	-2,9	-3,0	-3,1	-3,3	-3,2
<u>11</u>	-6,7	-6,4	-6,2	-6,2	-6,4	-6,1	-6,5	-5,9	-6,3	-6,7	-6,3	-5,9	-6,1	-6,5	-6,5	-6,4
<u>12</u>	-3,3	-3,3	-3,1	-3,2	-3,1	-3,1	-3,1	-3,2	-3,0	-2,9	-3,1	-3,1	-3,2	-3,1	-3,3	-3,3
<u>13</u>	-6,7	-6,5	-6,3	-6,2	-6,5	-6,3	-6,3	-5,8	-6,4	-6,8	-6,6	-6,4	-6,4	-6,7	-6,8	-6,7
<u>14</u>	-6,5	-6,4	-6,0	-5,9	-6,5	-6,0	-6,0	-5,9	-6,4	-6,7	-6,2	-5,9	-6,1	-6,5	-6,6	-6,4
<u>15</u>	-6,7	-6,3	-6,6	-6,3	-6,4	-6,3	-6,7	-6,1	-6,5	-6,6	-6,2	-6,1	-6,4	-6,9	-7,0	-6,9
<u>16</u>	-3,7	-3,5	-3,2	-3,0	-3,3	-2,9	-3,5	-3,3	-3,3	-3,1	-3,2	-3,1	-3,4	-3,8	-3,5	-3,1
<u>17</u>	-6,7	-6,5	-6,5	-6,2	-6,5	-6,3	-6,3	-5,9	-6,4	-6,7	-6,4	-6,1	-6,4	-6,7	-6,8	-6,7
<u>18</u>	-3,6	-3,5	-3,5	-3,3	-3,4	-3,3	-3,7	-3,4	-3,3	-3,3	-3,4	-3,5	-3,3	-3,7	-3,9	-3,8
<u>19</u>	-6,9	-6,5	-6,5	-6,4	-6,7	-6,5	-6,4	-6,0	-6,4	-6,7	-6,5	-6,1	-6,3	-6,9	-6,7	-6,6
<u>20</u>	-3,7	-3,8	-3,5	-3,5	-3,6	-3,5	-3,5	-3,6	-3,5	-3,5	-3,5	-3,4	-3,8	-3,7	-3,8	-3,8
<u>21</u>	-6,8	-6,8	-6,8	-6,4	-6,8	-6,4	-6,5	-5,7	-6,4	-6,7	-6,8	-6,4	-6,6	-6,8	-6,6	-6,5
<u>22</u>	-7,0	-6,8	-6,8	-6,5	-6,9	-6,5	-6,4	-6,0	-6,6	-6,9	-7,0	-6,3	-6,7	-7,1	-6,8	-6,8
<u>23</u>	-6,7	-6,8	-6,5	-6,6	-6,5	-6,4	-6,4	-6,0	-6,6	-7,0	-6,7	-6,2	-7,0	-7,0	-6,8	-6,5
<u>24</u>	-6,8	-6,8	-6,7	-6,6	-6,5	-6,5	-6,9	-6,2	-6,6	-6,6	-6,6	-6,3	-6,7	-7,2	-7,3	-7,1
<u>25</u>	-4,1	-3,9	-3,7	-3,3	-3,8	-3,5	-3,9	-3,7	-3,8	-3,5	-3,6	-3,7	-3,8	-4,4	-3,7	-3,6
<u>26</u>	-7,0	-6,4	-6,6	-6,5	-6,9	-6,7	-6,4	-6,0	-6,6	-7,0	-6,6	-6,1	-6,6	-7,1	-6,9	-6,8
<u>27</u>	-4,2	-4,0	-3,9	-4,1	-3,8	-3,9	-3,9	-3,6	-3,5	-3,6	-3,6	-3,7	-3,6	-4,0	-4,1	-4,2
<u>28</u>	-7,0	-6,6	-6,8	-6,6	-7,0	-6,6	-6,5	-5,9	-6,6	-6,7	-6,3	-6,1	-6,4	-7,4	-7,0	-6,9
<u>29</u>	-4,0	-3,8	-3,9	-3,8	-3,8	-3,7	-3,7	-3,8	-3,3	-3,4	-3,5	-3,7	-3,5	-4,0	-4,2	-4,1
<u>30</u>	-4,0	-3,9	-4,0	-3,7	-4,0	-3,7	-4,1	-3,8	-3,7	-3,7	-3,8	-3,8	-3,9	-4,1	-4,3	-4,3
<u>31</u>	-7,0	-6,6	-6,5	-6,7	-6,6	-6,5	-6,6	-6,0	-6,6	-6,9	-6,7	-6,2	-6,8	-7,1	-6,9	-7,0
<u>32</u>	-3,4	-3,2	-3,0	-3,0	-3,1	-3,0	-3,2	-3,1	-3,0	-3,1	-3,1	-3,0	-3,2	-3,2	-3,4	-3,1
<u>33</u>	-6,8	-6,5	-6,5	-6,1	-6,3	-6,2	-6,4	-5,7	-6,7	-7,0	-6,5	-6,4	-6,2	-6,7	-6,8	-6,7
<u>34</u>	-6,9	-6,8	-6,7	-6,6	-6,6	-6,6	-6,9	-6,0	-6,7	-6,8	-6,2	-6,1	-6,2	-7,0	-7,0	-7,1
<u>35</u>	-3,3	-3,1	-2,8	-2,7	-2,9	-2,7	-2,9	-2,8	-2,9	-2,7	-2,8	-2,9	-3,0	-3,2	-3,0	-2,7
<u>36</u>	-7,0	-6,9	-6,7	-6,6	-6,8	-6,7	-6,8	-6,2	-6,7	-7,1	-6,6	-6,4	-6,5	-7,0	-7,1	-6,8
<u>37</u>	-4,0	-3,8	-3,6	-3,5	-3,7	-3,6	-3,6	-3,7	-3,7	-3,5	-3,7	-3,5	-3,8	-3,8	-3,7	-3,7
<u>38</u>	-6,9	-6,8	-6,9	-6,3	-6,8	-6,4	-6,2	-5,8	-6,5	-6,9	-6,6	-6,3	-6,8	-6,7	-7,3	-6,9
<u>39</u>	-7,1	-6,9	-6,6	-6,6	-6,8	-6,7	-6,7	-6,1	-6,8	-7,4	-6,9	-6,5	-6,8	-7,1	-7,2	-6,8
<u>40</u>	-6,8	-6,7	-6,8	-6,7	-6,9	-6,6	-7,0	-6,2	-7,0	-6,9	-6,6	-6,4	-6,8	-7,1	-7,4	-7,4
<u>41</u>	-4,4	-4,1	-3,7	-3,5	-3,9	-3,5	-4,1	-3,7	-3,9	-3,8	-3,8	-3,8	-3,9	-4,5	-3,8	-3,7
<u>42</u>	-7,3	-6,9	-6,8	-6,8	-7,1	-6,7	-6,9	-6,2	-6,9	-7,1	-6,6	-6,6	-6,8	-7,3	-7,1	-7,1
<u>43</u>	-3,9	-3,8	-3,6	-4,0	-3,8	-3,7	-3,9	-3,6	-3,6	-3,6	-3,8	-3,8	-3,9	-4,1	-4,3	-3,9
<u>44</u>	-3,9	-3,8	-4,0	-3,7	-4,0	-3,7	-4,2	-3,8	-3,8	-3,8	-3,7	-3,9	-3,8	-4,1	-3,7	-4,0
<u>45</u>	-4,0	-4,1	-3,9	-3,9	-4,0	-3,9	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-3,8	-4,0	-4,1	-4,1	-4,0	-4,2
<u>46</u>	-7,2	-6,8	-6,8	-6,9	-7,0	-6,5	-6,4	-6,1	-6,7	-6,9	-6,9	-6,3	-6,9	-7,3	-7,0	-6,9
<u>47</u>	-6,6	-6,6	-7,1	-6,5	-6,5	-6,4	-5,9	-5,7	-6,7	-6,9	-6,5	-6,1	-7,0	-6,7	-6,8	-6,6
<u>48</u>	-7,3	-7,0	-7,0	-6,5	-6,9	-6,4	-6,5	-5,7	-6,5	-7,0	-6,7	-6,4	-7,0	-7,2	-7,0	-6,7
<u>49</u>	-7,0	-6,7	-6,9	-6,5	-6,7	-6,5	-6,9	-6,1	-6,9	-6,6	-6,6	-6,6	-6,8	-7,5	-7,5	-7,5
<u>50</u>	-4,3	-4,4	-3,8	-3,8	-4,2	-4,0	-4,3	-4,1	-4,1	-4,0	-4,0	-4,3	-4,3	-4,7	-4,1	-4,0
<u>51</u>	-7,3	-7,1	-6,9	-6,8	-7,0	-6,8	-6,0	-6,0	-6,9	-6,9	-6,5	-6,6	-6,6	-7,2	-7,0	-6,9
<u>52</u>	-4,3	-4,2	-4,2	-4,3	-4,1	-4,2	-4,2	-4,1	-4,1	-3,9	-4,1	-4,3	-4,0	-4,4	-4,3	-4,7
<u>53</u>	-4,1	-3,8	-4,1	-4,0	-4,0	-4,0	-4,2	-4,1	-4,1	-3,9	-3,9	-4,3	-4,0	-4,3	-4,4	-4,7
<u>54</u>	-7,1	-6,9	-6,9	-7,0	-7,2	-7,0	-6,0	-6,1	-7,0	-7,0	-6,6	-6,5	-6,7	-7,5	-7,0	-7,0
<u>55</u>	-7,2	-6,5	-6,8	-6,6	-6,9	-6,8	-6,6	-5,9	-6,7	-7,1	-6,8	-6,7	-6,9	-7,3	-7,0	-7,0
<u>56</u>	-4,5	-4,2	-4,1	-4,5	-4,2	-4,2	-4,3	-4,0	-4,3	-4,1	-4,1	-4,0	-4,0	-4,3	-4,4	-4,6
<u>57</u>	-4,8	-4,8	-4,5	-4,5	-4,6	-4,5	-4,7	-4,4	-4,7	-4,5	-4,3	-4,5	-4,8	-4,8	-4,8	-4,8
<u>58</u>	-7,2	-6,9	-7,4	-7,0	-7,2	-7,0	-6,3	-5,8	-7,2	-7,2	-6,6	-6,6	-7,1	-7,6	-7,5	-7,1
<u>59</u>	-6,4	-6,8	-7,1	-6,7	-6,9	-7,0	-6,6	-5,7	-6,8	-6,9	-6,5	-6,8	-6,8	-7,4	-6,6	-6,9
<u>60</u>	-7,4	-7,0	-7,3	-7,3	-7,4	-7,0	-6,5	-5,9	-6,8	-7,3	-6,5	-7,0	-6,9	-7,3	-7,4	-7,2
<u>61</u>	-6,8	-6,8	-7,1	-7,1	-6,8	-6,9	-7,0	-6,5	-7,1	-6,8	-6,1	-6,7	-7,1	-7,6	-7,8	-7,8
<u>62</u>	-5,3	-5,1	-4,4	-4,4	-4,7	-4,5	-5,1	-4,5	-4,8	-4,9	-4,6	-4,7	-5,0	-5,5	-5,0	-4,8
<u>63</u>	-4,8	-4,6	-4,6	-4,7	-4,7	-4,7	-4,9	-4,5	-4,9	-4,8	-4,5	-4,8	-4,9	-4,8	-4,9	-5,0
<u>64</u>	-7,2	-6,9	-7,1	-7,1	-7,5	-7,1	-6,2	-5,9	-7,1	-7,3	-6,8	-6,8	-6,9	-7,5	-6,8	-7,5

Preglednica VIII (nadaljevanje): Rezultati s programom Endocrine disruptome napovedane toksičnosti zbranih metabolitov parabenov.

SPOJINA	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
64	-7,2	-6,9	-7,1	-7,1	-7,5	-7,1	-6,2	-5,9	-7,1	-7,3	-6,8	-6,8	-6,9	-7,5	-6,8	-7,5
65	-7,1	-7,0	-7,0	-7,0	-7,4	-7,0	-7,1	-6,0	-7,0	-7,2	-6,0	-6,8	-6,9	-7,6	-7,0	-7,5
66	-4,4	-4,6	-4,8	-4,6	-4,6	-4,5	-4,8	-4,2	-4,8	-4,5	-4,4	-4,7	-5,0	-4,6	-4,9	-4,8
67	-4,8	-5,0	-4,6	-4,6	-4,7	-4,7	-4,8	-4,4	-4,9	-4,7	-4,4	-4,7	-5,0	-4,8	-4,8	-4,8
68	-7,4	-7,0	-7,0	-7,0	-7,4	-7,0	-6,3	-6,1	-6,7	-7,3	-6,9	-7,1	-6,8	-7,8	-7,3	-7,3
69	-7,9	-8,0	-8,1	-8,2	-7,9	-8,1	-7,5	-7,0	-7,9	-7,8	-7,6	-7,5	-7,4	-8,7	-8,0	-8,2
70	-8,1	-8,1	-8,1	-7,8	-7,9	-8,0	-7,5	-7,1	-8,1	-8,1	-7,7	-7,7	-7,7	-8,6	-8,1	-8,2
71	-8,1	-8,0	-8,0	-7,9	-7,9	-7,9	-7,8	-7,7	-8,1	-7,9	-8,0	-7,3	-7,5	-8,5	-8,3	-8,5
72	-5,3	-5,0	-5,0	-4,9	-4,9	-4,9	-4,8	-4,7	-4,8	-5,0	-4,7	-4,9	-4,8	-5,8	-5,3	-4,8
73	-5,5	-5,5	-5,3	-5,1	-5,3	-5,1	-5,1	-5,1	-5,3	-5,6	-5,0	-5,4	-5,1	-5,7	-5,3	-5,1
74	-8,2	-8,1	-8,4	-8,3	-7,9	-7,5	-7,1	-6,7	-7,6	-8,1	-7,8	-7,7	-7,7	-8,4	-8,1	-8,2
75	-8,5	-8,4	-8,2	-7,9	-8,0	-7,7	-7,7	-7,1	-8,4	-8,2	-7,9	-7,7	-8,4	-8,4	-8,4	-8,4
76	-8,1	-8,0	-8,3	-8,3	-8,0	-7,8	-8,2	-7,7	-8,1	-8,3	-8,1	-7,4	-8,3	-8,8	-8,4	-8,7
77	-5,9	-5,2	-5,3	-5,1	-5,3	-5,2	-5,5	-5,2	-5,5	-5,7	-5,3	-5,8	-5,6	-6,2	-5,7	-5,3
78	-5,6	-5,5	-5,5	-5,2	-5,3	-5,3	-5,3	-5,4	-5,4	-5,7	-5,4	-5,3	-5,1	-6,0	-5,4	-5,6
79	-5,4	-5,7	-5,6	-5,6	-5,6	-5,3	-5,5	-5,3	-5,6	-5,6	-5,0	-5,3	-5,4	-6,1	-5,5	-5,6

OPOMBA: Rezultati so obarvani glede na verjetnost vezave od rdeče (največja verjetnost vezave) preko oranžne in rumene do bele (najmanjša verjetnost vezave).

4.3.3 RAZPRAVA

Od vplivov parabenov na endokrini sistem je trenutno najbolj raziskana njihova **estrogenska aktivnost**. Eksperimentalno jo preučujejo predvsem z različnimi *in vitro* ter *in vivo* metodami. *In vitro* estrogensko aktivnost dokazujejo v študijah s pomočjo rekombinantnih gliv kvasovk, izoliranih estrogenskih receptorjev ter različnih celičnih linij, kot so človeške celice hormonsko odvisnega raka dojke MCF-7 in ZR-75-1 ter ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO). Znano je, da so parabeni kompetitivni agonisti ER in tekmujejo z endogenim ligandom 17 β -estradiolom za vezavo na ER ter da lahko povečajo proliferacijo človeških MCF-7 celic in ekspresijo od estrogena odvisnih genov. Afiniteta parabenov do ER se veča z daljšanjem in razvejanostjo stranske alkilne verige, vendar je še vedno vsaj 1000-krat pa tudi do 1000000-krat manjša od 17 β -estradiola. Kratek povzetek do sedaj znanih raziskav o vezavi parabenov na ER se nahaja v preglednicah II-VI v Prilogi II (128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141). Parabeni se torej kljub drugačni napovedi programa Endocrine disruptome vežejo na ER, program pa je pravilno napovedal povečevanje vezavne afinitete z daljšanjem in razvejanostjo stranske alkilne verige parabena oz. s prisotnostjo aromatskega obroča v stranski skupini. Neujemajoče rezultate programa pripisujemo temu, da je bil program validiran na podlagi močnih ligandov, parabeni pa so v primerjavi z 17 β -estradiolom šibki ligandi. Nasprotno je program VegaNIC za parabene, ki se nahajajo znotraj območja uporabnosti modela, z izjemo MP, napovedal preko ER posredovano endokrino toksičnost parabenov. K ustrezni napovedi programa je pripomoglo tudi, da se več parabenov s pozitivnimi eksperimentalnimi vrednostmi nahaja v podatkovni bazi modela ter so bili uporabljeni za izgradnjo modela. Negativna napoved za MP je

posledica tega, da pri napovedi prevlada podobnost s spojinami z negativnimi eksperimentalnimi vrednostmi (ortohidroksibenzojska kislina, PHBA) v setu za izgradnjo modela.

Pri ugotavljanju estrogenske aktivnosti metabolitov je zelo pomembna aktivnost PHBA kot ključnega metabolita parabenov. Rezultati *in vitro* raziskav njene estrogenske aktivnosti so neenotni. V večini raziskav estrogenske aktivnosti PHBA na hibridnih glivah kvasovkah niso zaznali (133, 141), ugotovili so tudi, da ne povzroča proliferacije človeških MCF7 celic (138) in ni aktivna na ER v rekombinantnih celicah CHO (135). Nasprotno pa so nekateri poročali o vezavi PHBA na ER, povečanju ekspresije od estrogena odvisnih genov in povečanju proliferacije človeških MCF7 celic (140). Uporabljeni programi nista napovedala preko ER posredovane endokrine toksičnosti PHBA, niti njenih dveh metabolitov. Prav tako glede na napoved estrogenske toksičnosti ne izkazujejo metabolni ostanki različnih stranskih skupin parabenov. Čeprav je program Endocrine disruptome napovedal večjo verjetnost vezave na ER α le za dva metabolita, je mogoče, da so tudi nekateri drugi metaboliti šibki ligandi na ER α in/ali ER β . Vsi metaboliti, za katere je program VegaNIC napovedal endokrino toksičnost, so produkti hidrosilacije stranske skupine parabena ter v nekaterih primerih še nadaljnje oksidacije do ustreznih karboksilnih skupin. Glavna težava napovedi s tem programom je, da je več kot polovica metabolitov izven območja uporabnosti modela, zato napovedi za njih niso zanesljive.

Poleg preko ER posredovane endokrine toksičnosti, ki smo jo napovedali s programoma, obstaja tudi drugačen mehanizem, ki naj bi posredoval estrogensko delovanje parabenov. V *in vitro* študijah so dokazali, da parabeni inhibirajo delovanje človeških sulfotransferaz, ki sodelujejo v inaktivaciji 17 β -estradiola, kar posledično poveča koncentracijo aktivne oblike estradiola v telesu (142, 143).

Tudi preko drugih jedrnih receptorjev povzročeno endokrino aktivnost parabenov in njihovih metabolitov preučujejo na izoliranih receptorjih ter različnih rekombinantnih celičnih linijah. Raziskav je malo, njihovi rezultati pa se med seboj razlikujejo. Enoznačnih rezultatov *in vitro* raziskav **antiandrogenske aktivnosti** ni, saj so v določenih študijah poročali o šibki antiandrogenski aktivnosti parabenov (144, 145, 146), druge pa so antiandrogenski učinek parabenov ovrgle (135). Kratek povzetek raziskav se nahaja v preglednici VII v Prilogi II. PHBA kot glavni metabolit parabenov nima antiandrogenskega učinka (135, 144), le pri zelo visokih odmerkih je izkazala šibko antiandrogensko aktivnost (135). Pri napovedi s programom Endocrine disruptome je postavljeni interval za srednjo

verjetnost vezave na AR an precej širok in se začne pri nizki prosti energiji vezave, zato je program vanj uvrstil vse izbrane parabene, večino njihovih metabolitov ter celo timol (-kontrola). Posledično se pojavlja vprašanje ali je napoved vezave na AR an dovolj specifična. Program je pričakovano napovedal, da je najbolj verjetna vezava na AR in AR an za oba parabena z dvema aromatskima obročema ter njune hidroksilirane metabolite.

V *in vitro* študijah **glukokortikoidne aktivnosti** so ugotovili, da parabeni izkazujejo agonistično aktivnost na glukokortikoidne receptorje, pri čemer aktivacija GR narašča z daljšanjem stranske verige parabenov. Preko aktivacije GR parabeni povzročajo tudi diferenciacijo adipocitov, kar vpliva na debelost (147, 148). PHBA nima nikakršnega glukokortikoidnega učinka ter ne promovira *in vitro* adipogeneze (148). Program Endocrine disruptome je za vse izbrane parabene z izjemo BzP ter za večino metabolitov napovedal majhno verjetnost vezave na GR. Tudi v tem primeru je lahko vzrok, da so parabeni šibki ligandi, program pa je bil validiran na podlagi močnih ligandov.

Čeprav je za BP dokazana **aktivnost na PPAR γ** ter minimalna aktivnost tudi na PPAR α , je program za vse izbrane parabene in njihove metabolite na vseh treh različnih tipih PPAR napovedal majhno verjetnost vezave (148, 149).

Šibko *in vitro* **tiroidno aktivnost** parabenov so dokazali za BP, medtem ko za EP tak učinek ni bil potrjen (150). Program Endocrine disruptome je napovedal srednjo verjetnost vezave na TR za vse parabene z večjimi stranskimi skupinami (iPP, iBP, PentP, HP, FP in BzP). Metaboliti, za katere je bila napovedana srednja verjetnost vezave, so parabeni z dodatno hidroksilno skupino na aromatskem obroču ali stranski skupini. Napoved tiroidne aktivnosti za FP, BzP in njune metabolite, smo pričakovali, saj sta za tiroidne agoniste značilna planarna obroča povezana s kratkim mostom ter polarni substituenti na mestih 1 ter 4'.

Delovanje parabenov preko **LXR ter RXR** je še slabo raziskano. Program Endocrine disruptome je tako za parabene kot vse metabolite napovedal majhno verjetnost vezave na LXR α , LXR β in RXR α .

Če povzamemo, so parabeni in nekateri njihovi metaboliti šibki ligandi določenih jedrnih receptorjev (ER, AR, GR, TR), vendar je njihovo delovanje še precej slabo raziskano. Ker gre za šibke ligande, *in silico* rezultati ne kažejo velike verjetnosti vezave na receptorje. Kljub temu se tudi pri *in silico* analizi kaže trend večanja endokrine toksičnosti parabenov in pripadajočih metabolitov z daljšanjem in razvejanostjo stranske alkilne skupine oz. prisotnostjo aromatskega obroča v stranski skupini.

Pomembno vprašanje je, ali vezava parabenov na jedrne receptorje, ki je nakazana v *in silico* ter *in vitro* pogojih, dejansko poteka tudi *in vivo*, ko na učinek vplivajo tudi njihove ADME lastnosti, ter kako rezultate vseh teh raziskav prenesti na delovanje HM na ljudi. Le majhen delež parabenov se v telesu nahaja v nespremenjeni obliki, medtem ko se jih večina hitro hidrolizira, zato je za varnost parabena najbolj pomembno, da bistvenega endokrinega učinka ne izkazujeta PHBA in alkoholni ostanek stranske skupine. Za druge potencialno endokrino toksične metabolite še ni povsem znano ali v telesu sploh nastajajo in ali se pojavljajo v zadostni količini ter za dovolj dolgo, da bi na organizem dejansko lahko vplivali. Poleg preko jedrnih receptorjev posredovane endokrine toksičnosti parabenov in metabolitov ne smemo zanemariti tudi možnosti njihovega delovanja preko drugih mehanizmov endokrine toksičnosti.

In vivo študij o vplivu parabenov na endokrini sistem je malo, še te pa so osredotočene predvsem na estrogensko aktivnost parabenov. Le-to običajno ugotavljajo s spremljanjem kvalitativnih in kvantitativnih sprememb na ženskih spolnih organih CD1 miši, Wistar podgan in drugih sesalcev. Spolno še ne popolnoma razvitim sesalcem ali pa sesalcem z odstranjenimi jajčniki določen čas, običajno nekaj dni, aplicirajo parabene. Uporablja se predvsem uterotrofični test, pri katerem ugotavljajo spremembe v teži maternice. Tudi rezultati *in vivo* študij niso enoznačni in so odvisni od vrste živali ter načina aplikacije. Estrogenski učinek se, podobno kot pri *in vitro* študijah, večja z daljšanjem in razvejanostjo stranske verige parabenov, zanj pa so običajno potrebne količine parabenov med 10 pa do nekaj 100 mg/kg telesne teže dnevno, kar je precej več od ocenjene dnevne povprečne celokupne izpostavljenosti parabenom pri ljudeh, ki znaša 76 mg (77, 133, 151). Estrogenskega učinka PHBA *in vivo* na podganah, miših in ribah niso zaznali oz. so zaznali šibek estrogenski učinek pri dnevno zelo velikih količinah PHBA (151, 152, 153).

Glede na znane podatke endokrine toksičnosti parabenov pri ljudeh ne moremo izključiti. Na tem področju so potrebne še številne raziskave, ne le o njihovem vplivu na estrogenski in androgenski sistem, temveč tudi na vse ostale hormonske sisteme. Pomembno je, da njihovo potencialno endokrino toksičnost obravnavamo celostno. Pri tem je treba upoštevati, da je hormonski sistem precej kompleksen, da se HM obnašajo bolj kot hormoni in ne kot splošni toksikanti ter da tudi zelo majhne količine HM povzročajo učinke, ki se lahko razlikujejo od tistih, ki jih povzročajo velike količine HM. Prav tako je pomembno, da podobno delujoči HM v kombinaciji pripomorejo k skupni mešanici učinkov. Učinki so odvisni od moči, količine in števila HM, ki jim je organizem hkrati izpostavljen, kar pomeni

tudi, da učinki parabenov ne morejo biti zanemarjeni zato, ker je njihova moč v primerjavi z endogenimi hormoni nizka. Za učinek parabenov je odločilno tudi, v katerem obdobju v življenju jim je človek izpostavljen, saj je ranljivost v določenih obdobjih večja.

4.4 NAPOVED RAZLIČNIH VIDIKOV REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

Različne vidike reproduktivne toksičnosti smo napovedali z ekspertnim sistemom in tremi različnimi QSAR modeli. Vsak od njih je podal rezultat na drugačen način.

4.4.1 DEREK NEXUS

Derek Nexus je kot rezultat podal opozorilo v primeru, da obstaja verjetnost za testikularno toksičnost, teratogenost ali razvojno toksičnost. Verjetnost je opredelil kot dvomljivo (equivocal), možno (plausible) ali verjetno (probable).

Za izbrane parabene smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici IX:

- Program ni podal opozorila za **timol** (- kontrola).
- Za **BPA** (+ kontrola) je podal opozorilo, da obstaja **dvomljiva verjetnost za testikularno toksičnost**.
- Program ni podal opozorila za nobenega od parabenov.

Za zbrane metabolite izbranih parabenov smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici X:

- Program je podal opozorilo, da je za metabolita PHBA **2** (**fenol**) in **4** (**katehol**) ter kratkoverižna alkohola **6** (**etanol**) in **32** (**izopropanol**) **verjetna teratogenost**.
- Program je podal opozorilo, da je za kratkoverižne alkohole **12** (**propanol**), **20** (**butanol**), **45** (**pentanol**) in **57** (**heptanol**) ter produkt hidrolize FP **72** (**hidrokinon**) **možna teratogenost**.
- Za ostale metabolite program ni podal opozoril.

4.4.2 VEGANIC (Developmental Toxicity (CAESAR) 2.1.7)

Model **Developmental Toxicity (CAESAR) 2.1.7** programa **VegaNIC** je za vsako spojino napovedal, ali je le-ta razvojni toksikant in ob tem z zvezdicami ocenil zanesljivost napovedi.

Za izbrane parabene smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici IX:

- Program je za **timol** (- kontrola) z visoko zanesljivostjo (***/***) napovedal **razvojno toksičnost**.
- Za **BPA** (+ kontrola) je z visoko zanesljivostjo (***/***) napovedal **razvojno toksičnost**.

- Za **iPP** in **FP** je napovedal razvojno toksičnost.
- Vsi ostali parabeni bi se lahko nahajali ali se nahajajo izven območja uporabnosti modela, zato njihovi rezultati niso zanesljivi.

Za zbrane metabolite izbranih parabenov smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici X:

- Program je za metabolne ostanke alkilnih stranskih skupin parabenov **6** (etanol), **10** (etilenglikol), **18** (propilenglikol), **20** (butanol), **25** (butanojska kislina), **29** (1,4-butandiol), **30** (1,2-butandiol), **50** (pentanojska kislina) in **52** (1,4-pentandiol) ter za nekatere produkte hidrosilacije parabenov **8**, **24**, **34**, **69**, **70** in **71** napovedal razvojno toksičnost. Za metabolit **6** razvojno toksičnost potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.
- Za **katehol** (**4**), **hidrokinon** (**72**) ter produkta hidrosilacije HP **58** in **60** je napovedal, da niso razvojno toksični.
- Več kot polovica metabolitov (60 od 79) bi se lahko nahajala ali se nahaja izven območja uporabnosti modela, zato njihovi rezultati niso zanesljivi.

4.4.3 VEGANIC (Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0)

Model **Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0** programa **VegaNIC** je za vsako spojino napovedal, ali je le-ta razvojni/reproduktivni toksikant in ob tem z zvezdicami ocenil zanesljivost napovedi. Za izbrane parabene smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici IX:

- **Timol** (- kontrola) se nahaja izven območja uporabnosti modela, zato njegov rezultat (spojina ni razvojni/reproduktivni toksikant) ni zanesljiv.
- Program je za **BPA** (+ kontrola) z visoko zanesljivostjo (***/***) napovedal razvojno/reproduktivno toksičnost.
- Za **HP** je napovedal razvojno/reproduktivno toksičnost.
- Vsi ostali parabeni bi se lahko nahajali ali se nahajajo izven območja uporabnosti modela, zato njihovi rezultati niso zanesljivi.

Za zbrane metabolite izbranih parabenov smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici X:

- Program je za metabolne ostanke alkilnih stranskih skupin parabenov **6** (etanol), **12** (propanol), **18** (propilenglikol), **20** (butanol), **29** (1,4-butandiol), **32** (izopropanol), **35** (aceton), **37** (izobutanol) in **53** (1,5-pentandiol) napovedal razvojno/reproduktivno

toksičnost. Za metabolite **6**, **12**, **20** in **29** razvojno toksičnost potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.

- Velika večina metabolitov (70 od 79) bi se lahko nahajala ali se nahaja izven območja uporabnosti modela, zato njihovi rezultati niso zanesljivi.

4.4.4 TEST

Program **TEST** je podal številčno vrednost napovedi, pri kateri gre za verjetnost, da je spojina razvojni toksikant. Število 0 pomeni najnižjo verjetnost, število 1 pa najvišjo. Na podlagi verjetnosti je program napovedal, ali spojina je razvojni toksikant (0,50-1,00) ali **ni razvojni toksikant (0-0,49)**. Za izbrane parabene smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici IX:

- Za **timol** (- kontrola) je program napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **0,99**.
- Za **BPA** (+ kontrola) je napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **0,68**.
- Za **MP** in **HP** je napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **nižja od 0,50**.
- Za ostale parabene je napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **večja od 0,50**, za **iPP** ter **PP** pa kar **večja od 0,80**.

Za zbrane metabolite izbranih parabenov smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani v preglednici X:

- Program je za metabolit **1 (PHBA)** napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **0,31**.
- Za metabolne ostanke alkilne stranske skupine parabenov **6 (etanol)**, **10 (etilenglikol)**, **27 (1,3-butandiol)**, **50 (pentanojska kislina)**, **56 (1,3-pentandiol)**, metabolne ostanke stranske skupine BzP **73 (benzil alkohol)**, **77 (benzojska kislina)**, **78 (4-hidroksibenzil alkohol)** in **79 (2-hidroksibenzil alkohol)** ter produkte hidroksilacije in nadaljnje oksidacije parabenov **19**, **21**, **23**, **46**, **54**, **55**, **65** in **74** je napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **0,50 ali manj**. Za metabolit **6** program ni napovedal razvojne toksičnosti, čeprav je spojina glede na eksperimentalne podatke v podatkovni bazi modela razvojni toksikant.
- Za vse ostale metabolite je program napovedal, da je verjetnost razvojne toksičnosti **večja od 0,50**, največjo verjetnost pa je napovedal za nekatere metabolne ostanke alkilne stranske skupine parabenov **25 (butanojska kislina)**, **41 (2-metilpropanojska kislina)**, **57 (heptanol)** in **63 (1,6-heptandiol)** ter produkte hidroksilacije parabenov **13**, **34**, **71** in **76**.

Preglednica IX: Rezultati napovedi različnih vidikov reproduktivne toksičnosti izbranih parabenov s pomočjo programov Derek Nexus, VegaNIC (Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7, Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0) in TEST.

SPOJINA	Derek Nexus ^a	Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7 ^b	Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0 ^b	TEST ^c
timol (-)	-	+++	-	0,99
BPA (+)	Dvomljiva testikularna toksičnost	+++	+++	0,68
MP	-	-	+	0,48
EP	-	-	+	0,75
PP	-	-	+	0,87
BP	-	--	+	0,62
iPP	-	+++	+	0,88
iBP	-	--	+	0,59
PentP	-	--	++	0,70
HP	-	--	+++	0,46
FP	-	+++	-	0,69
BzP	-	++	-	0,73

OPOMBA: **a** – kot rezultat je zapisano opozorilo, če ga je program podal oz. -, če opozorila ni bilo; **b** - kot rezultat je zapisan + (napovedana je bila reproduktivna/razvojna toksičnost) ali – (reproduktivna/razvojna toksičnost ni bila napovedana), število znakov pomeni zanesljivost napovedi (en znak-*/***, dva znaka-**/***, trije znaki ***/***); **c** - kot rezultat je zapisana številčna vrednost napovedi; zaradi večje preglednosti je negativna napoved osenčena zeleno, pozitivna napoved pa rdeče.

Preglednica X: Rezultati napovedi različnih vidikov reproduktivne toksičnosti zbranih metabolitov izbranih parabenov s pomočjo programov Derek Nexus, VegaNIC (Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7, Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0) in TEST.

SPOJINA	Derek Nexus ^a	Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7 ^b	Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0 ^b	TEST ^c
timol (-)	-	+++	-	0,99
BPA (+)	Dvoumna testikularna toksičnost	+++	+++	0,68
<u>1</u>	-	+	-	0,31
<u>2</u>	Verjetna teratogenost	+	-	0,67
<u>3</u>	-	+	-	0,59
<u>4</u>	Verjetna teratogenost	---	-	0,66
<u>5</u>	-	+	-	0,67
<u>6</u>	Verjetna teratogenost	+++ (E)	+++ (E)	0,45 (+ E)
<u>7</u>	-	--	-	0,67
<u>8</u>	-	+++	-	0,75
<u>9</u>	-	+	-	0,60
<u>10</u>	-	+++	-	0,27
<u>11</u>	-	--	-	0,80
<u>12</u>	Možna teratogenost	-	+++ (E)	0,66
<u>13</u>	-	--	-	0,85
<u>14</u>	-	--	-	0,75
<u>15</u>	-	-	-	0,75
<u>16</u>	-	+	-	0,70
<u>17</u>	-	++	-	0,73
<u>18</u>	-	+++	+++	0,52
<u>19</u>	-	--	-	0,28
<u>20</u>	Možna teratogenost	+++	+++ (E)	0,67
<u>21</u>	-	--	-	0,47
<u>22</u>	-	--	-	0,77
<u>23</u>	-	--	-	0,47
<u>24</u>	-	+++	-	0,68
<u>25</u>	-	+++	-	0,91
<u>26</u>	-	--	-	0,72
<u>27</u>	-	-	-	0,37
<u>28</u>	-	--	-	0,73
<u>29</u>	-	+++	+++ (E)	0,66
<u>30</u>	-	+++	-	0,65
<u>31</u>	-	--	-	0,78
<u>32</u>	Verjetna teratogenost	--	+++	0,55
<u>33</u>	-	--	-	0,73
<u>34</u>	-	+++	-	0,90

35	-	--	+++	0,52
36	-	--	-	0,55
37	-	+	+++	0,84
38	-	--	-	0,71
39	-	--	-	0,58
40	-	--	-	0,56
41	-	+	-	0,82
42	-	++	-	0,51
43	-	+	-	0,79
44	-	-	-	0,67
45	Možna teratogenost	-	-	0,52
46	-	--	-	0,50
47	-	--	-	0,52
48	-	--	-	0,65
49	-	--	-	0,61
50	-	+++	-	0,47
51	-	--	-	0,51
52	-	+++	-	0,62
53	-	-	+++	0,51
54	-	--	-	0,47
55	-	--	-	0,48
56	-	-	-	0,33
57	Možna teratogenost	-	-	0,86
58	-	---	-	0,54
59	-	-	-	0,50
60	-	---	-	0,65
61	-	--	-	0,51
62	-	-	--	1,00
63	-	-	-	0,60
64	-	-	-	0,53
65	-	--	-	0,46
66	-	-	-	0,66
67	-	-	-	0,65
68	-	-	-	0,61
69	-	+++	-	0,66
70	-	+++	-	0,71
71	-	+++	-	0,80
72	Možna teratogenost	---	-	0,63
73	-	+	-	0,21
74	-	++	-	0,48
75	-	++	-	0,73
76	-	++	-	0,82
77	-	+	-	0,36
78	-	+	-	0,16
79	-	+	-	0,26

OPOMBA: **a** – kot rezultat je zapisano opozorilo, če ga je program podal oz. -, če opozorila ni bilo; **b** - kot rezultat je zapisan + (napovedana je bila reproduktivna/razvojna toksičnost) ali – (reproduktivna/razvojna toksičnost ni bila napovedana), število znakov pomeni zanesljivost napovedi (en znak-*/***, dva znaka-*/***, trije znaki ***/***); **c** - kot rezultat je zapisana številčna vrednost napovedi; zaradi večje preglednosti je negativna napoved osenčena zeleno, pozitivna napoved pa rdeče.

4.4.5 RAZPRAVA

Reproduktivna toksičnost je širok pojem, ki zajema tako vpliv na sposobnost razmnoževanja, kot tudi vpliv na razvoj zarodka v maternici in na spremembe v telesu, ki so izzvane pred rojstvom ter se izrazijo po rojstvu. Vprašanje ali estrogenski ter antiandrogenski potencial parabenov vplivata tudi na razmnoževanje in razvoj živali in ljudi, ostaja odprto. Do sedaj izvedene raziskave so precej raznolike in preučujejo različne vidike reproduktivne toksičnosti, njihovi rezultati pa niso vedno povsem enotni. Večina do sedaj izvedenih *in vivo* raziskav reproduktivne toksičnosti parabenov (preglednica VIII v Prilogi II) je proučevalo

vpliv štirih najpogosteje uporabljenih parabenov (MP, EP, PP in BP), medtem ko za druge parabene še ni podatkov. Nekatere predvsem starejše raziskave, v katerih so proučevali razvojno toksičnost parabenov (MP, EP), niso odkrile nikakršnega vpliva le-teh na reprodukcijo podgan, miši, zajcev in hrčkov. (154, 155) Tudi nekatere novejše raziskave potrjujejo, da parabeni (MP, EP, BP) na različne vidike reproduktivne toksičnosti nimajo vpliva (150, 156, 157, 158, 159, 160). Kljub temu ne moremo zanemariti raziskav, ki dokazujejo nasprotno, torej da izpostavljenost predvsem PP in BP zmanjša odstotek živorojenih potomcev, vpliva na količino spermijev, težo testisov, semenskih mešičkov in prostate pri moških potomcih ter na čas do vaginalnega odprtja pri ženskih potomcih (161, 162, 163) ter da upad količine testosterona pri podganah moškega spola, povzročen s PP in BP, vpliva na njihovo reproduktivno funkcijo (161, 162). Reprodukativna toksičnost naj bi se večala z daljšanjem stranske alkilne verige parabena. Obstaja celo verjetnost, da prenatalna izpostavljenost parabenom povzroča razvoj avtizma pri potomcih, saj so podgane in miši, ki so bile prenatalno izpostavljene BP kazale spremembe v socialnem vedenju in imele motnje v razvoju živčevja (164). Na področju reproduktivne toksičnosti parabenov so torej potrebne še obširne raziskave. Zaenkrat na listo snovi strupenih za razmnoževanje v skladu z Direktivo Komisije 2001/59/ES parabeni niso uvrščeni. PHBA kot glavni metabolit parabenov dokazano ni reprodukativno toksična v odmerkih do 1000 mg/kg telesne teže (165, 166, 167).

Pričakovanja, da bodo rezultati vseh *in silico* analiz podali podobne rezultate ter pomagali postaviti vsaj približen okvir reproduktivne toksičnosti parabenov in njihovih metabolitov, se niso izpolnila. Rezultati programov za napoved reproduktivne/razvojne toksičnosti so precej neenotni, vprašljiva pa je tudi njihova zanesljivost, saj sta kar dva programa za negativno kontrolo timol z veliko zanesljivostjo oz. verjetnostjo podala pozitiven rezultat. Vzrok za to je najverjetneje prisotnost aromatskega obroča ter fenolne hidroksilne skupine v spojini, ki sta pogosto prisotna tudi v reprodukativno/razvojno toksičnih spojinah v podatkovnih bazah modelov. Pričakovanega odnosa večanja razvojne/reprodukativne toksičnosti z daljšanjem stranske verige parabenov nismo zaznali. Glede na dobljene rezultate lahko sklenemo le, da reprodukativne/razvojne toksičnosti parabenov ne moremo niti povsem potrditi niti ovreči. Zaradi nasprotujočih si rezultatov različnih programov pri napovedi reprodukativne/razvojne toksičnosti metabolitov, tudi tukaj ne moremo postaviti gotovih zaključkov. Za PHBA ni reprodukativne/razvojne toksičnosti napovedal noben od programov, kar se ujema tudi z rezultati *in vivo* raziskav. Pri nekateri drugih metabolitih

(katehol, etanol, etilenglikol) je pri napovedi reproduktivne/razvojne toksičnosti prišlo do nasprotujočih si rezultatov, čeprav so spojine reproduktivno toksične. Če spregledamo nekatera odstopanja, lahko s pomočjo programov ocenimo, da so razvojno/reproduktivno toksični alifatski alkoholi in njihovi nadaljnji metaboliti, kar potrjujejo tudi *in vivo* raziskave. Glede na napovedi programov bi bila možna tudi reproduktivna/razvojna toksičnost produktov hidroksilacije parabenov, kar pa do sedaj še ni raziskano.

Pri napovedi reproduktivne toksičnosti se na *in silico* metode zaenkrat še ne moremo zanašati, lahko pa jih uporabimo kot pomoč pri postavljanju smernic ter prioritet za nadaljnje raziskave. Potreben bo še precejšnji napredek tako v razvoju podatkovnih baz kot *in silico* metod, da bomo z njimi lahko vsaj deloma nadomestili druge načine določanja reproduktivne toksičnosti. V prihodnosti bi bilo dobro z raziskavami odpraviti dvome o reproduktivni toksičnosti domnevno varnih parabenov (MP, EP, PP), določiti NOAEL vrednosti tudi za ostale parabene ter raziskati reproduktivno toksičnost produktov hidroksilacije parabenov.

5. SKLEP

- *In silico* napoved metabolizma parabenov kaže v 1. stopnji v smer hidrolize na PHBA ter pripadajoči alkohol, manj verjetni pa so produkti hidrosilacije na aromatskem obroču ali stranski skupini parabena ter produkti konjugacij. V 2. stopnji metabolizma parabenov je najbolj verjeten nastanek različnih konjugatov, manj verjeten pa je nastanek nekaterih drugih metabolitov, kot so fenol, katehol idr. Izsledki so primerljivi z *in vitro* ter *in vivo* raziskavami, nekaterih *in silico* napovedanih manj verjetnih metabolitov pa do sedaj še niso dokazali, zato bi bilo smiselno raziskati, če oz. v kakšnih količinah v telesu dejansko nastanejo.
- Glede na *in silico* napovedi endokrine toksičnosti parabenov in nekaterih njihovih metabolitov lahko zaključimo, da obstaja potencial za endokrino toksičnost parabenov, povzročeno predvsem preko ER, AR, GR ter TR, ki se povečuje z daljšanjem alkilne stranske verige parabena oz. s prisotnostjo aromatskega obroča v stranski skupini. Aktivnost parabenov preko naštetih receptorjev je potrjena tudi z *in vivo* ter *in vitro* raziskavami, vendar rezultati niso povsem enotni, zato so potrebne še nadaljnje raziskave.
- Pri ugotavljanju reproduktivne toksičnosti parabenov in njihovih metabolitov nam rezultati *in silico* raziskave ne pomagajo veliko. Reprodukativne toksičnosti na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo povsem potrditi niti zavreči. Tudi *in vitro* ter *in vivo* raziskave ne dajejo enoznačnega odgovora, obstaja pa verjetnost, da so parabeni predvsem v večjih koncentracijah reproduktivno toksični.
- Na podlagi vseh do sedaj znanih podatkov ugotavljamo, da je pri uporabi izdelkov, ki vsebujejo parabene, še posebej pri otrocih in nosečnicah potrebna previdnost dokler ne pride do jasnih zaključkov o njihovem celostnem vplivu na organizem. Prav je tudi, da parabeni z večjimi stranskimi skupinami v kozmetiki, hrani in farmacevtskih proizvodih niso dovoljeni, saj je njihova varnost še posebej vprašljiva.
- *In silico* metode napovedovanja metabolizma, endokrine in reproduktivne toksičnosti trenutno še upravičeno niso namenjene samostojnemu testiranju spojin, ampak le kot usmeritev za nadaljnje raziskave. Zaenkrat se zdi nemogoče, da bi lahko pri določanju toksikoloških lastnosti kemikalij povsem nadomestile *in vivo* testiranja na živalih, vsekakor pa je na tem področju potreben nadaljnji razvoj, predvsem v smeri izgradnje obširnih ter zanesljivih podatkovnih baz ter izboljšanju algoritmov.

6. VIRI IN LITERATURA

1. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G: Global assessment of the science of endocrine disruptors, An assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme, WHO, 2002.
2. Goodman HM: Basic Medical Endocrinology, Fourth Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam etc., 2009: 1-26.
3. McDowell J: Encyclopedia of Human Body Systems, Greenwood, Santa Barbara, 2011: 151-207.
4. Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT: State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012, An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization, UNEP in WHO, 2013.
5. Bolander FF: Molecular Endocrinology, Third Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, 2004: 101-233.
6. Jobling S, Gomes R, Toppari J, Andersson AM, Söder O, Oehlmann J, Pottinger T, Sumpter J, Gray LE, Sharpe RM, Vinggaard AM, Kortenkamp A: The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments, The Weybridge+15 (1996–2011) report, EEA, Copenhagen, 2012.
7. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM: Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common development disorder with environmental aspects. *Human reproduction* 2001; 16: 972-8.
8. Sharpe RM, Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993; 341: 1392-5.
9. McLachlan JA, Simpson E, Martin M: Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 20: 63-75.
10. Spencer PS, Schaumburg H, Ludolph AC: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, Second Edition, Oxford University Press, New York, 2000: 3-83.
11. Sawai C, Anderson K, Walser-Kuntz D: Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1883-7.

12. Inadera H: The immune system as a target for environmental chemicals: Xenoestrogens and other compounds. *Toxicology Letters* 2006; 164: 191-206.
13. Ahmed SA: The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology* 2000; 150: 191–206.
14. Gibson DA, Saunders PTK: Endocrine disruption of oestrogen action and female reproductive tract cancers. *Endocrine-Related Cancer* 2014; 21: T13–T31.
15. Knez J: Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; 26: 440-8.
16. Singh S, Shoen-Lung Li S: Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. *International journal of molecular sciences* 2012; 13: 10143-53.
17. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf (dostop: maj 2015)
18. Van Leeuwen CJ, Vermeire TG: *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction, Second Edition*, Springer, Dordrecht, 2007: 336, 427-55.
19. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/Final_report_Mario_Negri.pdf (dostop: maj 2015)
20. Gelbke HP, Kayser M, Poole A: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 2004; 205: 17-25.
21. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003307.pdf (dostop: maj 2015)
22. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/doc/EUR_24522_EN.pdf (dostop: maj 2015)
23. Jensen GE, Niemelä JR, Wedebye EB, Nikolov NG: QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use – a preliminary investigation. *SAR and QSAR in Environmental Research* 2010; 19: 631-641.
24. Cassano A, Manganaro A, Martin T, Young D, Piclin N, Pintore M, Bigoni D, Benfenati E: CAESAR models for developmental toxicity. *Chemistry Central Journal* 2010; 4 (Suppl 1): S4.
25. Novič M, Vračko M: QSAR Models for Reproductive Toxicity and Endocrine Disruption Activity. *Molecules* 2010; 15: 1987-99.
26. Raunio H: In silico toxicology – non-testing methods. *Frontiers in pharmacology* 2011; 2: Article 33.

27. Peach ML, Zakharov AV, Liu R, Pugliese A, Tawa G, Wallqvist A, Nicklaus MC: Computational tools and resources for metabolism-related property predictions. Overview of publicly available (free and commercial) databases and software. *Future medicinal chemistry* 2012; 4: 1907-32.
28. Benfenati E, Manganaro A, Gini G: VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology. *CEUR Workshop Proceedings* 2013; 1107: 21-8.
29. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_en.htm (dostop: junij 2015)
30. http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_sl.pdf (dostop: junij 2015)
31. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm> (dostop: september 2015)
32. <http://molsoft.com/icm-chemist-pro.html> (dostop: september 2015)
33. <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-qsar-workbench/> (dostop: oktober 2015)
34. http://external.informer.com/akosgmbh.de/Archive%2Fmdl_qsar.htm, (dostop: oktober 2015)
35. <http://www.opentox.org/tutorials/build-a-qsar> (dostop: september 2015)
36. Long A: Drug metabolism in silico – the knowledge-based expert system approach. Historical perspectives and current strategies. *Drug discovery today. Technologies* 2013; 10: 147-53.
37. <http://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm> (dostop: september 2015)
38. <http://www.lhasalimited.org/products/meteor-nexus.htm> (dostop: september 2015)
39. http://www.compudrug.com/publications_about_hazardexpert (dostop: september 2015)
40. <http://www.compudrug.com/metabolexpert> (dostop: september 2015)
41. <http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools/oncologictm-computer-system-evaluate-carcinogenic-potential-chemicals> (dostop: september 2015)
42. <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/qsar-admet-and-predictive-toxicology.html> (dostop: september 2015)
43. <http://www.multicase.com/products> (dostop: september 2015)
44. Kirchmair J, Williamson MJ, Tyzack JD, Tan L, Bond PJ, Bender A, Glen RC: Computational Prediction of Metabolism: Sites, Products, SAR, P450 Enzyme

- Dynamics, and Mechanisms. *Journal of Chemical Information and Modelling* 2012; 52, 617–48.
45. Benfenati E, Gini G: Computational predictive programs (expert systems) in toxicology. *Toxicology* 1997; 119: 213-25.
 46. Marchant CA, Briggs KA, Long A: In Silico Tools for Sharing Data and Knowledge on Toxicity and Metabolism: Derek for Windows, Meteor, and Vitic. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2008; 18: 177-87.
 47. Chen Y, Cheng F, Sun L, Li W, Liu G, Tang Y: Computational models to predict endocrine-disrupting chemical binding with androgen or oestrogen receptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2014; 110: 280-7.
 48. Nowak P, Wozniakiewicz M, Koscielniak P: Simulation of drug metabolism. *Trends in Analytical Chemistry* 2014; 59: 42-9.
 49. <http://accelrys.com/products/datasheets/metabolism.pdf> (dostop: september 2015)
 50. <http://lsresearch.thomsonreuters.com/pages/solutions/10/metabase> (dostop: september 2015)
 51. <http://www.fujitsu.com/jp/group/kyushu/en/solutions/industry/lifescience/admedatabase/index.html> (dostop: september 2015)
 52. <http://www.drugbank.ca/> (dostop: september 2015)
 53. <http://www.acdlabs.com/products/percepta/> (dostop: september 2015)
 54. <http://cacheresearch.com/cepos.html> (dostop: september 2015)
 55. <http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/> (dostop: september 2015)
 56. <http://www.simulations-plus.com/Products.aspx?pID=13> (dostop: september 2015)
 57. <http://www.moldiscovery.com/software/metasite/> (dostop: september 2015)
 58. <http://www.compudrug.com/metabolexpert> (dostop: september 2015)
 59. <https://www.chemaxon.com/products/metabolizer/> (dostop: september 2015)
 60. <http://lsresearch.thomsonreuters.com/pages/solutions/18/metadrug> (dostop: september 2015)
 61. <http://oasis-lmc.org/products/software/times.aspx> (dostop: september 2015)
 62. <http://www.biograf.ch/index.php?id=projects&subid=virtualtoxlab> (dostop: september 2015)
 63. <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/> (dostop: september 2015)
 64. <http://www.compudrug.com/mexalert> (dostop: september 2015)

65. Zhang L, Sedykh A, Tripathi A, Zhu H, Afantiti A, Mouchlis VD, Melagraki G, Rusyn I, Tropsha A: Identification of putative estrogen receptor-mediated endocrine disrupting chemicals using QSAR- and structure-based virtual screening approaches. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 272: 67–76.
66. Vuorinen A, Odermatt A, Schuster D: *In silico* methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2013; 137: 18-26.
67. <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/default.htm> (dostop: september 2015)
68. <http://edcs.unicartagena.edu.co/> (dostop: september 2015)
69. <http://cascade.projectcoordinator.net/projectweb/portalproject/Cascade%20Research.html> (dostop: september 2015)
70. <http://ctdbase.org/> (dostop: september 2015)
71. http://www.compudrug.com/molcode_toolbox (dostop: september 2015)
72. <http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm> (dostop: september 2015)
73. <http://www2.epa.gov/aboutepa/about-national-center-computational-toxicology-ncct> (dostop: september 2015)
74. <http://www.vega-qsar.eu/index.php> (dostop: september 2015)
75. <http://www2.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (dostop: september 2015)
76. <http://www.leadscope.com/index.php> (dostop: september 2015)
77. Soni MG, Carabin IG, Burdock GA: Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 985–1015.
78. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn M: *Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition*, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, Grayslake, Washington, 2009.
79. Elder RL: Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *Journal of the American College of Toxicology* 1984; 3: 147–209.
80. Rastogi SC, Schouten A, De Kruijf, N, Weijland JW: Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* 1995; 32: 28–30.

81. Soni MG, Burdock GA, Taylor SL, Greenberg NA: Safety assessment of propylparaben: a review of the published literature. *Food Chemical Toxicology* 2001; 39: 513-32.
82. Bledzka D, Gromadzinska J, Wasowicz W: Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International* 2014; 67: 27-42.
83. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_132.pdf (dostop: maj 2015)
84. https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/butylparaben_508.pdf (dostop: maj 2015)
85. Eriksson E, Andersen HR, Ledin A: Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *Journal of Hazardous Materials* 2008; 156: 240-59.
86. Hojerova J, Pazourekova S, Klimova Z, Kubicova D: Zdravotne rizika parabenov v topickyh pripravkoch (in Slovak, abstract in English. Health risks of parabens in topical products). *Farm. Obzor* 2013; 82: 42-7.
87. Guo Y, Kannan K: A Survey of Phthalates and Parabens in Personal Care Products from the United States and Its Implications for Human Exposure. *Environmental and Science Technology* 2013; 47: 14442-9.
88. CIR. US Cosmetic Ingredient Review: Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben and benzylparaben as used in cosmetic products. *International Journal of Toxicology* 2008; 27: 1-82 (Suppl. 4).
89. Gosens I, Delmaar CJE, Burg W, de Heer C, Schuur AG: Aggregate exposure approaches for parabens in personal care products: a case assessment for children between 0 and 3 years old. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 2014; 24, 208-14.
90. Cowan-Ellsberry CE, Robison SH: Refining Aggregate Exposure: Example using Parabens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009; 55: 321-9.
91. Liao C, Liu F, Kannan K: Occurrence of and Dietary Exposure to Parabens in Foodstuffs from the United States. *Environmental and Science Technology* 2013; 47: 3918-25.
92. Liao C, Liu F, Kannan K: Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environment International* 2013; 57-58: 68-74.

93. Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and materials: Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E 214-219). *The EFSA Journal* 2004; 83: 1-26
94. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/foodadditives/index.html> (dostop: maj 2015)
95. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/11/WC500196733.pdf (dostop: oktober 2015)
96. Jewell C, Bennett P, Mutch E, Ackermann C, Williams FM: Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochemical Pharmacology* 2007; 74: 932-9
97. Aubert N, Ameller T, Legrand JJ: Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50: 445-54.
98. Caon T, Oliveira Costa AC, de Oliveira MAL, Micke GA, Oliveira Simoes CM: Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 391:1-6.
99. Waters LJ, Dennis L, Bibi A, Mitchell JC: Surfactant and temperature effects on paraben transport through silicone membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013. 108; 23-8.
100. Mathews JM, Brown SS, Patel PR, Black SR, Banks TT, Etheridge AS, Fennell TR, Snyder RW, Blystone CR, Waidyanatha S: Metabolism and disposition of [14C]n-butyl-*p*-hydroxybenzoate in male and female Harlan Sprague Dawley rats following oral administration and dermal application. *Xenobiotica* 2013; 43: 169-81.
101. van Ravenzwaay B, Leibold E: The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment. *Toxicology in Vitro* 2004; 18: 219-25.
102. El Hussein S, Muret P, Berard M, Makki S, Humbert P: Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (ex-vivo study). *Experimental Dermatology* 2007; 16: 830-6.
103. Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T: Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology* 2007; 27: 1-9.
104. Harville HM, Voorman R, Prusakiewicz JJ: Comparison of paraben stability in human and rat skin. *Drug Metabolism Letters* 2007; 1: 17-21.

105. Fujino C, Watanabe Y, Uramaru N, Kitamura S: Transesterification of a series of 12 parabens by liver and small-intestinal microsomes of rats and humans. *Food and Chemical Toxicology* 2014; 64: 361-8.
106. Tsukamoto H, Terada S: Metabolism of Drugs. XLVII. Metabolic Fate of p-Hydroxybenzoic Acid and its Derivatives in Rabbit. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1964; 12: 765-9.
107. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O: Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology* 2005; 70: 1673-84.
108. Greige-Gergesa H, Kaissia R, Magdaloub J, Jraij A: Reviewing the binding of a series of parabens to human serum albumin. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2013; 34: 186-94.
109. Frederiksen H, Taxvig C, Hass U, Vinggaard AM, Nellemann C: Higher Levels of Ethyl Paraben and Butyl Paraben in Rat Amniotic Fluid than in Maternal Plasma after Subcutaneous Administration. *Toxicological Sciences* 2008; 106: 376-83.
110. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS: Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. *Journal of Applied Toxicology* 2004; 24: 5–13.
111. http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-9d844046-b0c4-4317-e044-00144f67d249/AGGR-f511a57d-434a-4297-918e-73b0738999aa_DISS-9d844046-b0c4-4317-e044-00144f67d249.html#AGGR-f511a57d-434a-4297-918e-73b0738999aa (dostop: november 2015)
112. <http://vina.scripps.edu/> (dostop: november 2015)
113. <https://web.chemdoodle.com/demos/sketcher/> (dostop: november 2015)
114. Kolšek K, Mavri J, Sollner Dolenc M, Gobec S, Turk S: Endocrine disruptome-an open source prediction tool for assessing endocrine disruption potential through nuclear receptor binding. *Journal of Chemical Information and Modelling* 2014; 54: 1254-67.
115. <http://endocrinedisruptome.ki.si/> (dostop: maj 2015)
116. <http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf> (dostop: november 2015)
117. VegaNIC User's guide, navodila vključuje program, ki je prosto dostopen na strani: <http://www.vega-qsar.eu/download.html> (dostop: maj 2015)
118. Roncaglioni A, Piclin N, Pintore M, Benfenati E: Binary classification models for endocrine disrupter effects mediated through the estrogen receptor. *SAR and QSAR in Environmental Research* 2010; 19: 697-733.

119. <http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/index.html> (dostop: november 2015)
120. User's Guide for T.E.S.T. (version 4.1) (Toxicity Estimation Software Tool), navodila vključuje program, ki je prosto dostopen na strani: <http://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (dostop: maj 2015)
121. Derache R, Gouardon J: Metabolism of a food preservative: phydroxybenzoic acid and its esters. *Food and Cosmetics Toxicology* 1963; 1: 189-95.
122. Jones PS, Thigpen D, Morrison JL, Richardson AP: p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters. *Journal of American Pharmaceutical Association* 1956; 45: 265-73.
123. Phillips JC, Topp CS, Gangolli SD: The metabolism of ethyl and n-propyl-p-hydroxybenzoate ("parabens") in male cats. *Toxicology Letters* 1978; 2: 237-42.
124. Sabalitschka T, Neufeld-Crzellitzer R: Behavior of p-hydroxybenzoic acid in human body. *Arzneimittel-Forsch* 1954; 4: 575-9.
125. Tasukamoto H, Terade S: Metabolism of drugs. XXIII. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1960; 8: 1066-70.
126. Tasukamoto H, Terada S: Metabolism of drugs. XXVI. Metabolic fate of hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1962; 10: 86-90.
127. Tasukamoto H, Terada S: Metabolism of drugs. XLVII. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1964; 12: 765-9.
128. Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM: The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 2000; 54: 138-53.
129. Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD: Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2002; 80: 49-60.
130. Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Horton RA, Pope GS, Sauer MJ: Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and *in vivo*. *Journal of Applied Toxicology* 2002; 22: 219-26.

131. Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Hall S, Coldham NG, Pope GS: Oestrogenic activity of benzylparaben. *Journal of Applied Toxicology* 2003; 23: 43-51.
132. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I: ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39: 1225-32.
133. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP: Some alkyl hydroxy benzoate preservative (parabens) are estrogenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 153: 12-9.
134. Vo TTB, Yoo YM, Choi KC, Jeung EB: Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive Toxicology* 2009; 29: 306-16.
135. Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Ohta S, Kitamura S: Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β and androgen receptor. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 57: 227-34.
136. Miller D, Wheals BB, Beresford N, Sumpter JP: Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 133-8.
137. Park JS, Lee BJ, Kang KS, Tai JH, Cho JJ, Cho MH, Inoue T, Lee YS: Hormonal effects of several chemicals in recombinant yeast, MCF-7 cells and uterotrophic assays in mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2000; 10: 293-9.
138. van Meeuwen JA, van Son O, Piersma AH, de Jong PC, van den Berg M: Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 230: 372-82.
139. Wróbel AM, Gregoraszczyk EL: Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor- α and - β and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells. *Toxicology Letters* 2014; 230: 375-81.
140. Pugazhendhi D, Pope GS, Darbre PD: Oestrogenic activity of *p*-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *Journal of Applied Toxicology* 2005; 25: 301-9.
141. Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H: Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. *Journal of Health Science* 2000; 46: 282-98.

142. Harris RM, Kirk CJ, Waring RH: Non-genomic effects of endocrine disrupters: Inhibition of estrogen sulfotransferase by phenols and chlorinated phenols. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 244: 72-4.
143. Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL: Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology* 2007; 232: 248-56.
144. Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL: Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 985-1015.
145. Ma D, Chen L, Zhu X, Li F, Liu C, Liu R: Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay. *Environmental Science and Pollution Research* 2014; 21: 6482-94.
146. Satoh K, Nonaka R, Ohyama K, Nagai F: Androgenic and antiandrogenic effects of parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen System). *Journal of Health Science* 2005; 51: 557-68.
147. Kolšek K, Gobec M, Mlinarič Raščan I, Sollner Dolenc M: Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of the glucocorticoid and androgen receptor activities. *Toxicology in Vitro* 2015; 29: 8–15.
148. Hu P, Chen X, Whitener RJ, Boder ET, Jones JO, Porollo A, Chen J, Zhao L: Effects of Parabens on Adipocyte Differentiation. *Toxicological Sciences* 2013; 131: 56-70.
149. Taxvig C, Dreisig K, Boberg J, Nellemann C, Blicher Schelde A, Pedersen D, Boergesen M, Mandrup S, Vinggaard AM: Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR γ activation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012; 361: 106-15.
150. Taxvig C, Vinggaard AM, Hass U, Axelstad M, Boberg J, Reimer Hansen P, Frederiksen H, Nellemann C: Do Parabens Have the Ability to Interfere with Steroidogenesis? *Toxicological Sciences* 2008; 106: 206-13.
151. Hossaini A, Larsen JJ, Larsen JC: Lack of Oestrogenic Effects of Food Preservatives (Parabens) in Uterotrophic Assays. *Food and Chemical Toxicology* 2000; 38: 319-23.
152. Lemini C, Silva G, Timossi C, Luque D, Valverde A, González-Martínez M, Hernández A, Rubio-Póo C, Chávez Lara B, Valenzuela F: Estrogenic Effects of p-Hydroxybenzoic Acid in CD1 Mice. *Environmental Research* 1997; 75: 130-4.

153. Pedersen KL, Pedersen SN, Christiansen LB, Korsgaard B, Bjerregaard P: The Preservatives Ethyl-, Propyl- and Butylparaben are Oestrogenic in an *in vivo* Fish Assay. *Pharmacology & Toxicology* 2000; 86: 110-3.
154. http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-9d84107f-0622-1eea-e044-00144f67d249/AGGR-1e4fbe9a-311a-4e6f-9763-886d9a5d0db0_DISS-9d84107f-0622-1eea-e044-00144f67d249.html#GEN_APPL_SUM_HD (dostop: september 2015)
155. http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-dcee52a2-a4df-078e-e044-00144f67d031/AGGR-37757fe5-640f-47f3-9296-53f504910da5_DISS-dcee52a2-a4df-078e-e044-00144f67d031.html#L-85e0f3fe-67c3-42b7-8b46-24150c56b6dc (dostop: september 2015)
156. Shaw J, deCatanzaro D: Estrogenicity of parabens revisited: Impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice. *Reproductive Toxicology* 2009; 28: 26-31.
157. Daston GP: Developmental Toxicity Evaluation of Butylparaben in Sprague-Dawley Rats. *Birth Defects Research* 2004; 71(Part B): 296–302.
158. Oishi S: Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42: 1845-9.
159. Fisher JS, Turner KJ, Brown D, Sharpe RM: Effect of Neonatal Exposure to Estrogenic Compounds on Development of the Excurrent Ducts of the Rat Testis through Puberty to Adulthood. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 397-405.
160. Hoberman AM, Schreur DK, Leazer T, Daston GP, Carthew P, Re T, Loretz L, Mann P: Lack of Effect of Butylparaben and Methylparaben on the Reproductive System in Male Rats. *Birth Defects Research* 2008; 83(Part B):123-33.
161. Oishi S: Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicology and Industrial Health* 2001; 17: 31-9.
162. Oishi S: Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40: 1807-13.
163. Kang KS, Che JH, Ryu DY, Kim TW, Li GX, Lee YS: Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *The Journal of veterinary medical science* 2002; 64: 227-35.
164. Ali EH, Elgoly AH: Combined prenatal and postnatal butyl paraben exposure produces

- autism-like symptoms in offspring: Comparison with valproic acid autistic model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2013; 111: 102-10.
165. Kavlock RJ: Structure-Activity Relationships in the Developmental Toxicity of Substituted Phenols: In Vivo Effects. *Teratology* 1990; 41: 43-59.
166. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/99967.pdf> (dostop: november 2015)
167. Koshakji RP, Schulert AR: Biochemical Mechanisms of Salicylate Teratology in the Rat. *Biochemical Pharmacology* 1973; 22: 407-16.

7. PRILOGA I

Preglednica I: Jedrni receptorji, njihovi ligandi in funkcija.

DRUŽINA	IME RECEPTORJA	LIGAND	FUNKCIJA
1A	tiroidni receptor	trijodotironin	delovanje ščitničnih hormonov
1B	receptor retinojske kisline	vse-trans retinojska kislina	retinoidna aktivnost
1C	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor α	polinenasičene maščobne kisline, eikozanoidi, levkotrien B ₄ , oleiletanolamid	metabolizem maščobnih kislin, negativna povratna zanka izločanja LTB ₄ in inhibicija vnetja
	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor β	neznan	implementacija placente, decidualizacija
	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor γ	prostaglandin J ₂ , PUFA, lizofosfatidna kislina	adipogeneza
	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor δ	prostaciklin	implantacija blastocist, inhibicija PPAR α in PPAR γ
1F	z RAR povezan receptor sirota	holesterol	homeostaza holesterola
1H	jetrni X receptor	oksisteroli	metabolizem holesterola
	farnezoinski X receptor	žolčne kisline, lanosterol	metabolizem žolčnih kislin in holesterola
1I	receptor vitamina D	1,25-dihidroksiholekalciferol	absorpcija intestinalnega kalcija
	pregnanski X receptor	pregnani, litoholna kislina	metabolizem steroidov in ksenobiotikov
	steroidni X receptor	kortikosteron	metabolizem steroidov in ksenobiotikov
	benzoatni X receptor	alkilni estri benzojske kisline	metabolizem steroidov in ksenobiotikov
	konstitutivni androstanski receptor	androstenol, androstenal	metabolizem steroidov in ksenobiotikov
2A	hepatocitni jedrni faktor 4 α	maščobne kisline	metabolizem lipidov in ogljikovih hidratov
2B	retinoidni X receptor	9-cis retinojska kislina, dokozaheksanejska kislina	pogost partner pri dimerizaciji receptorjev, embriogeneza
3A	estrogenski receptor α	estradiol	estrogenska aktivnost
	estrogenski receptor β	estradiol, fitoestrogeni, 5 α -androstan-3 β ,17 β diol	estrogenska aktivnost
3C	androgenski receptor	dihidrottestosteron, testosteron	androgenski učinki
	glukokortikoidni receptor	kortizol	glukokortikoidna aktivnost
	mineralokortikoidni receptor	aldosteron, kortizol	resorpcija renalnega natrija, glukokortikoidna aktivnost
	progesteronski receptor	progesteron	progesteronska aktivnost

8. PRILOGA II

8.1 METABOLIZEM PARABENOV

Preglednica I: In vivo raziskave metabolizma parabenov.

AVTOR, LETO, NASLOV	PROUČEVANI PARABENI	TESTNI MATERIAL	NAJDENI METABOLITI
Derache et al., 1963, Metabolism of a food preservative: phydroxybenzoic acid and its esters	MP, EP, PP (peroralna aplikacija)	kri, urin podgan	PHBA, konjugat PHBA z glicinom, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na aromatski hidroksilni skupini, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na karboksilni skupini, konjugat PHBA s sulfatom
Jones et al., 1956, p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters	MP, EP, PP, BP (intravenska ali peroralna aplikacija)	kri, urin psa	PHBA, konjugat PHBA z glukuronsko kislino
Phillips et al., 1978, The metabolism of ethyl and n-propyl-p-hydroxybenzoate ("parabens") in male cats	EP, PP (peroralna aplikacija)	urin mačk	PHBA, konjugat PHBA z glicinom
Sabalitscka et al., 1954, Behavior of p-hydroxybenzoic acid in human body	PP (peroralna aplikacija)	urin človeka	PHBA, konjugat PHBA z glicinom, konjugat PHBA s sulfatom
Tsakamoto et al., 1960, Metabolism of drugs. XXIII. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits	MP (peroralna aplikacija)	urin zajca	konjugat PHBA z glukuronsko kislino na aromatski hidroksilni skupini, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na karboksilni skupini
Tsakamoto et al., 1962, Metabolism of drugs. XXVI. Metabolic fate of hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits	MP (peroralna aplikacija)	urin zajca	PHBA, konjugat PHBA z glicinom, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na aromatski hidroksilni skupini, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na karboksilni skupini, konjugat PHBA s sulfatom
Tsakamoto et al., 1962, Metabolism of drugs. XLVII Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits	MP, EP, PP, BP, iPP, iBP (peroralna aplikacija)	urin zajca	PHBA, konjugat PHBA z glicinom, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na aromatski hidroksilni skupini, konjugat PHBA z glukuronsko kislino na karboksilni skupini, konjugat PHBA s sulfatom

8.2 ESTROGENSKA AKTIVNOST PARABENOV

Preglednica II: Raziskave vezave parabenov na ER.

AVTOR, LETO, NASLOV	VIR ER	PARABEN, KONTROLA	POVPREČNA IC ₅₀ ^a (M)	POVPREČNA REC ₂₀ ^b (M)	MOLARNI PRESEŽEK PARABENA GLEDE NA 17β-ESTRADIOL (ODSTOTEK INHIBICIJE VEZAVE ESTRADIOLA(%))
Blair et al., 1999, The Estrogen Receptor Relative Binding Affinities of 188 Natural and Xenochemicals: Structural Diversity of Ligands	maternica podgan	MP EP PP BP HP BzP 17β-estradiol	2,45 * 10 ⁻⁴ 1,50 * 10 ⁻⁴ 1,50 * 10 ⁻⁴ 1,05 * 10 ⁻⁴ 1,10 * 10 ⁻⁵ 3,15 * 10 ⁻⁵ 8,99 * 10 ⁻¹⁰	/	/
Byford et al., 2002, Oestrogenic activity of parabens in MCF-7 human breast cancer cells	MCF-7	MP EP PP BP	/	/	1000000 x (21) 1000000 x (54) 100000 x (26) 1000000 x (77) 100000 x (49) 1000000 x (86)
Darbre et al., 2003, Oestrogenic Activity of Benzylparaben	MCF-7	BzP	/	/	1000 x (22) 10000 x (40) 100000 x (57) 1000000 x (100)
Darbre et al., 2002, Oestrogenic Activity of Isobutylparaben <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i>	MCF-7	iBP	/	/	100000x(81) 500000x(86) 1000000x(87)
Okubo, 2001, ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERα and PR	MCF-7	EP PP BP iPP iBP diethylstilbestrol	2,7*10 ⁻⁴ (ERα) 2,4*10 ⁻⁴ (ERβ) 9,0*10 ⁻⁵ (ERα) 6,0*10 ⁻⁵ (ERβ) 5,6*10 ⁻⁵ (ERα) 2,1*10 ⁻⁵ (ERβ) 7,5*10 ⁻⁵ (ERα) 4,9*10 ⁻⁵ (ERβ) 2,7*10 ⁻⁵ (ERα) 2,8*10 ⁻⁵ (ERβ) 3,0*10 ⁻⁸ (ERα) 2,6*10 ⁻⁸ (ERβ)	/	/
Routledge, 1998, Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic	maternica podgan	BP diethylstilbestrol	~ 1*10 ⁻⁵ ~ 1*10 ⁻⁹	/	/
Vo, 2010, Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model	maternica podgan	EP PP BP iPP iBP 17β-estradiol	4,63*10 ⁻⁵ (ERα) 5,55*10 ⁻⁵ (ERβ) 1,87*10 ⁻⁵ (ERα) 1,65*10 ⁻⁵ (ERβ) 4,98*10 ⁻⁵ (ERα) 5,24*10 ⁻⁶ (ERβ) 1,52*10 ⁻⁵ (ERα) 1,69*10 ⁻⁵ (ERβ) 2,07*10 ⁻⁶ (ERα) 2,75*10 ⁻⁶ (ERβ) 2,99*10 ⁻⁹ (ERα) 3,03*10 ⁻⁹ (ERβ)	/	

Preglednica II (nadaljevanje): Raziskave vezave parabenov na ER.

AVTOR, LETO, NASLOV	VIR ER	PARABEN, KONTROLA	POVPREČNA IC ₅₀ ^a (M)	POVPREČNA REC ₂₀ ^b (M)	MOLARNI PRESEŽEK PARABENA GLEDE NA 17β-ESTRADIOL (ODSTOTEK INHIBICIJE VEZAVE ESTRADIOLA(%))
Watanabe, 2013, Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β and androgen receptor	CHO-K1	MP	/	/	/
		EP		4,3*10 ⁻⁶ (ERα)	
		PP		1,2*10 ⁻⁶ (ERβ)	
				6,1*10 ⁻⁷ (ERα)	
				1,7*10 ⁻⁷ (ERβ)	
		BP		2,9*10 ⁻⁷ (ERα)	
				1,5*10 ⁻⁷ (ERβ)	
		PentP		2,7*10 ⁻⁷ (ERα)	
				9,4*10 ⁻⁸ (ERβ)	
		iPP		3,0*10 ⁻⁷ (ERα)	
				1,6*10 ⁻⁷ (ERβ)	
		iBP		1,2*10 ⁻⁷ (ERα)	
		4,3*10 ⁻⁸ (ERβ)			
iPentP		1,3*10 ⁻⁷ (ERα)			
		7,3*10 ⁻⁷ (ERβ)			
HP		2,0*10 ⁻⁷ (ERα)			
		2,2*10 ⁻⁷ (ERβ)			
FP		1,8*10 ⁻⁷ (ERα)			
		3,5*10 ⁻⁸ (ERβ)			
BzP		1,1*10 ⁻⁷ (ERα)			
		3,0*10 ⁻⁷ (ERβ)			

OPOMBA: a - koncentracija, ki povzroči inhibicijo vezave 50% 17β-estradiola; b - koncentracija, ki povzroči agonistično aktivnost enako 20% agonistične aktivnosti povzročene z 10⁻⁹M 17β-estradiolom.

Preglednica III: Raziskave estrogene aktivnosti parabenov na rekombinantnih glivah kvasovkah.

AVTOR, LETO, NASLOV	PARABEN, KONTROLA	RELATIVNA ESTROGENA AKTIVNOST GLEDE NA ESTRADIOL (%)
JinSung, 2000, Hormonal effects of several chemicals in recombinant yeast, MCF-7 cells and uterotrophic assays in mice	BP	0,02
Miller, 2001, Estrogenic Activity of Phenolic Additives Determined By an In Vitro Yeast Bioassay	MP	0,00003
	EP	0,0005
	PP	0,003
	BP	0,013
	BzP	0,025
	17β-estradiol	100
Nishihara et al., 2000, Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay	MP	0,00005
	EP	0,0006
	BP	0,002
	PP	0,007
	17β-estradiol	100
Routledge, 1998, Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic	MP	0,00004
	EP	0,0007
	PP	0,003
	BP	0,01

Preglednica IV: Raziskave vpliva parabenov na proliferacijo celic.

AVTOR, LETO, NASLOV	PARABEN, KONTROLA	C _{min} ^a (M)	C _{max} ^b (M)	EC ₅₀ ^c (M)
Byford et al., 2002, Oestrogenic activity of parabens in MCF-7 human breast cancer cells	MP	10 ⁻⁵	2*10 ⁻⁴	/
	EP	5*10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	
	PP	10 ⁻⁶	5*10 ⁻⁵	
	BP	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	
	17-βestradiol	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	
Darbre et al., 2003, Oestrogenic Activity of Benzylparaben	BzP	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	/
Darbre et al., 2002, Oestrogenic Activity of Isobutylparaben <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i>	iBP	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	/

Preglednica IV (nadaljevanje): Raziskave vpliva parabenov na proliferacijo celic.

AVTOR, LETO, NASLOV	PARABEN, KONTROLA	C _{min} ^a (M)	C _{max} ^b (M)	EC ₅₀ ^c (M)
Okubo, 2001, ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERα and PR	MP, EP, PP, BP, iPP, iBP diethylstilbestrol 17-β-estradiol	/	2*10 ⁻⁴ 2*10 ⁻⁵ 2*10 ⁻⁵ 2*10 ⁻⁵ 5*10 ⁻⁶ 5*10 ⁻⁶ 10 ⁻⁹ 3*10 ⁻¹¹	3,1*10 ⁻⁵ 3,2*10 ⁻⁶ 1,9*10 ⁻⁶ 1,6*10 ⁻⁶ 5,7*10 ⁻⁷ 6,8*10 ⁻⁷ / 1,6*10 ⁻¹²
Van Meeuwen, 2008, Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics	MP, EP, PP, BP, iPP, iBP, BzP	/	/	1,6*10 ⁻⁵ 3,1*10 ⁻⁶ 1,6*10 ⁻⁶ 7,9*10 ⁻⁷ 1*10 ⁻⁶ 7,9*10 ⁻⁷ 7,9*10 ⁻⁷
Wróbel, 2013, Effects of single and repeated in vitro exposure of three forms of parabens, methyl-, butyl- and propylparabens on the proliferation and estradiol secretion in MCF-7 and MCF-10A cells	MP, PP, BP	Koncentracija parabenov med 2*10 ⁻¹⁰ in 2*10 ⁻⁷ signifikantno poveča proliferacijo MCF-7 celic v primerjavi s kontrolo.		

OPOMBA: a – najnižja koncentracija parabena, ki povzroči spremembo proliferacije celic glede na kontrolo; b – najnižja koncentracija parabena, ki povzroči maksimalno proliferacijo celic; c - povprečna koncentracija parabena, pri kateri je dosežena 50 % proliferacija celic glede na maksimalno.

Preglednica VI: Raziskave vpliva parabenov na izražanje od estrogena odvisnih genov.

AVTOR, LETO, NASLOV	PARABEN, KONTROLA	POVEČANJE EKSPRESIJE ER-CAT GENA V 24 URAH (KONC. (M))	POVEČANJE EKSPRESIJE ER-CAT GENA V 7 DNEH	POVEČANJE EKSPRESIJE pS2 GENA
Byford et al., 2002, Oestrogenic activity of parabens in MCF-7 human breast cancer cells	MP EP PP BP 17β-estradiol	/ 1,4 x (10 ⁻⁴) 1,3 x (10 ⁻⁵) 1,2 x (10 ⁻⁵) 2,6 x (10 ⁻⁸)	1,4 x (10 ⁻⁴) 1,4 x (10 ⁻⁴) 1,4 x (10 ⁻⁵) 1,1 x (10 ⁻⁵) 2,9 x (10 ⁻⁸)	+ + + + +
Darbre et al., 2003, Oestrogenic Activity of Benzylparaben	BzP 17β-estradiol	1,83 x (10 ⁻⁵) 1,26 x (10 ⁻⁴) 1,89 x (10 ⁻⁸)	1,89 x (10 ⁻⁵) 1,42 x (10 ⁻⁴) 2,20 x (10 ⁻⁸)	/
Darbre et al., 2002, Oestrogenic Activity of Isobutylparaben <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i>	iBP	učinek 10 ⁻⁵ M iBP enak učinku 10 ⁻⁸ M estradiola	/	+
Pugazhendhi, 2005, Oestrogenic activity of <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines	MP 17β-estradiol	1,50 x (5*10 ⁻⁴) 2,07 x (10 ⁻⁸)	4,3 x (5*10 ⁻⁴) 13,8 x (10 ⁻⁸)	/

Preglednica VI: In vivo raziskave estrogene aktivnosti parabenov.

AVTOR, LETO, NASLOV	ŽIVAL	PARABEN	UGOTOVITVE
Darbre et al, 2002, Oestrogenic Activity of Isobutylparaben <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i>	miš	iBP	Subkutano apliciran iBP v odmerkih pribl. 94,5 in 945 mg/kg tt ima uterotrofičen učinek.
Hossaini et al, 2000, Lack of Oestrogenic Effects of Food Preservatives (Parabens) in Uterotrophic Assays	miš, podgana	MP EP PP BP	Nobeden od parabenov apliciran subkutano ali peroralno v odmerku do 100 mg/kg tt ter peroralno EP apliciran v odmerku 1000 mg/kg tt nima uterotrofičnega učinka pri miših. Subkutano apliciran BP v odmerkih 400 in 600 mg/kg tt dnevno ima uterotrofičen učinek.
Lemini et al., 2003, In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens	podgana	MP EP PP BP	Uterotrofičen učinek parabenov se povečuje z daljšanjem stranske alkilne verige parabenov. Subkutano aplicirani parabeni imajo uterotrofičen učinek že v odmerkih nekaj deset g/kg tt dnevno.
Routledge et al., 1998, Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic	podgana	MP BP	Peroralno ali subkutano apliciran MP v odmerku do 800 mg/kg tt dnevno nima uterotrofičnega učinka. Peroralna aplikacija BP v odmerku 800 in 1000 mg/kg tt dnevno povzroči majhno, ampak statistično nepomembno povečanje teže maternice. Subkutano apliciran BP v odmerku od 400 do 1200 mg/kg tt dnevno povzroči signifikantno povečanje teže maternice.
Shaw et al., 2009, Estrogenicity of parabens revisited: Impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice	miš	BP	Subkutana aplikacija BP v koncentraciji do 950 mg/kg tt dnevno nima signifikantnega vpliva na težo maternice.
Vo et al., 2010, Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model	podgana	MP EP PP BP iPP iBP	Peroralno aplicirani parabeni v odmerku do 1000 mg/kg tt dnevno ne vplivajo na težo maternice.

8.3 (ANTI)ANDROGENSKA AKTIVNOST PARABENOV

Preglednica VII: Raziskave antiandrogenske aktivnosti parabenov.

AVTOR, LETO, NASLOV	REKOMBINANTNA CELIČNA LINIJA	PARABEN	UGOTOVITVE
Chen et al., 2007, Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products	CHO 293	MP PP BP	Parabeni v konc. $1 \cdot 10^{-5}$ M zmanjšajo luciferazno aktivnost povzročeno z $1,25 \cdot 10^{-10}$ M testosteronom za 40 % (MP), 33 % (PP) ter 19 % (BP).
Fang et al., 2003, Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor	rekombinantni podganji AR	MP PP	MP se na AR ne veže, PP pa se, pri čemer povzroči 50 % inhibicijo vezave močnega androgena metribolona pri koncentraciji $3,10 \cdot 10^{-4}$ M.
Košek et al, 2015, Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of the glucocorticoid and androgen receptor activities	MDA-kb2	MP EP PP BP	MP in EP sta zmerna antagonista testosterona.
Ma et al., 2014, Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay	rekombinantne kvasovke	MP PP iPP	Vsi izkazujejo signifikanten antiandrogenski učinek. Do popolnega zasičenja človeških AR pride pri koncentracijah 10^{-3} M (MP) ter $5 \cdot 10^{-4}$ M (PP in iPP).
Satoh et al, 2005, Androgenic and antiandrogenic effects of parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells	CHO-K1	MP EP PP BP iPP iBP	PP, BP, iPP in iBP v koncentraciji $1,9 \cdot 10^{-4}$ M inhibirajo vezavo $1,7 \cdot 10^{-10}$ M testosterona za 40 %. Koncentracije parabenov, ki povzročijo 50% zmanjšanje luciferazne aktivnosti povzročene z $1,7 \cdot 10^{-10}$ M testosteronom so $> 1,0 \cdot 10^{-10}$ M (MP in EP), $8,6 \cdot 10^{-5}$ M (PP), $6,8 \cdot 10^{-5}$ M (BP), $4,2 \cdot 10^{-5}$ M (iPP) in $7,6 \cdot 10^{-5}$ M (iBP).
Watanabe et al, 2013, Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor and androgen receptor	CHO-K1	17 različnih parabenov (tudi MP, EP, PP, BP, iPP, iBP, PentP, HP, FP, BzP)	20% zmanjšanje luciferazne aktivnosti povzročene z $1 \cdot 10^{-10}$ M testosteronom ni doseženo pri nobenem od parabenov v konc. od 10^{-8} do 10^{-5} M.

8.4 REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST PARABENOV

Preglednica VIII: Raziskave reproductivne toksičnosti parabenov.

AVTOR, LETO, NASLOV	TESTNA ŽIVAL	PARABEN	UGOTOVITVE
Daston et al., 2004, Developmental Toxicity Evaluation of Butylparaben in Sprague-Dawley Rats	podgana	BP	Peroralno apliciran BP v odmerkih do 1000 mg/kg tt na dan ne vpliva na preživetje, težo in spremembe na zarodku.
Fisher et al., 1999, Effect of Neonatal Exposure to Estrogenic Compounds on Development of the Excurrent Ducts of the Rat Testis through Puberty to Adulthood	podgana	BP	Subkutano apliciran BP v odmerku 2 mg/kg tt na dan ne vpliva na težo testisov.
Hoberman et al., 2008, Lack of Effect of Butylparaben and Methylparaben on the Reproductive System in Male Rats	podgana	MP, BP	Peroralno apliciran MP ali BP v odmerku do približno 1000 mg/kg tt na dan nima učinka na težo in histopatologijo spolnih organov ter proizvodnjo, motilnost in morfologijo sperme.
Kang et al., 2001, Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid	podgana	BP	Brejim podganam subkutano apliciran BP v odmerku 200 mg/kg tt na dan zmanjša odstotek živorojenih mladičev ter njihovo nadaljnje preživetje. Brejim podganam subkutano apliciran BP v odmerku 100 mg/kg tt na dan signifikantno zmanjša težo testisov, semenskih mešičkov in prostate. Brejim podganam subkutano apliciran BP v odmerku 100 ali 200 mg/kg tt na dan signifikantno zmanjša število spermijev in motilnost sperme.
Oishi, 2001, Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats	podgana	BP	0,01 % (pribl. 10 mg/kg tt), 0,10 % (pribl. 100 mg/kg tt) in 1,00 % (pribl. 1000 mg/kg tt) BP v hrani podgan v 8 tednih povzroči zmanjšanje dnevne produkcije sperme in števila spermijev. 0,10 % in 1,00 % BP v hrani podgan v 8 tednih povzroči signifikantno zmanjšanje teže obmodka pri podganah ter zmanjšanje koncentracije testosterona v serumu.
Oishi, 2002, Effects of propyl paraben on the male reproductive system	podgana	PP	0,01 % (pribl. 12 mg/kg tt), 0,10 % (pribl. 125 mg/kg tt) in 1,00 % (pribl. 1250 mg/kg tt) PP v hrani podgan v 4 tednih povzroči zmanjšanje dnevne produkcije sperme. 1,00 % PP v hrani podgan v 4 tednih povzroči signifikantno zmanjšanje koncentracije testosterona v serumu.
Oishi, 2004, Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats	podgana	MP, EP	Peroralno apliciran MP ali EP v odmerku do približno 1000 mg/kg tt na dan nima učinka na težo testisov, količino spermijev in nivo testosterona v krvi.
Shaw et al., 2009, Estrogenicity of parabens revisited: Impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice	miš	PP, BP	Subkutano apliciran BP v odmerku do 35 mg/kg tt na dan ne vpliva na število živorojenih potomcev in na njihovo nadaljnje preživetje. Subkutano apliciran PP v odmerku do 40 mg/kg tt na dan ne vpliva na ugnezdenje oplojenega jajčeca.
Taxvig et al., 2008, Do Parabens Have the Ability to Interfere with Steroidogenesis?	podgana	EP, BP	Subkutano apliciran EP ali BP v odmerku 200 in 400 mg/kg tt na dan nima učinka na ugnezdenje oplojenega jajčeca, število potomcev, nivo hormonov v telesu in anogenitalno razdaljo pri potomcih. Subkutano apliciran BP v odmerku 200 in 400 mg/kg tt na dan povzroča signifikantno zmanjšanje izražanja ER β pri ženskih potomcih.
Vo et al., 2010, Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model	Sprague-Dawley podgana	MP EP PP BP iPP iBP	Peroralno aplicirani parabeni v odmerku do 1000 mg/kg tt dnevno povzročajo histopatološke spremembe v reproductivnih organih.