

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA PLUT

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA PLUT

**PREUČEVANJE REAKTIVNIH METABOLITOV IN ESTROGENE
AKTIVNOSTI BISFENOL A DIGLICIDILETRA**

**EVALUATION OF REACTIVE METABOLITES AND ESTROGENIC ACTIVITY
OF BISPHENOL A DIGLICIDILETHER**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. Meritve so bile izvedene na Katedri za farmacevtsko kemijo in Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. in somentorici izr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm. za vso strokovno pomoč, svetovanje in potrpežljivost pri izdelavi magistrske naloge. Iskrena zahvala gre tudi asist. Anji Fic, mag. farm. za skrbno vodenje skozi laboratorijsko delo.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem, ki so mi omogočili študij, ter fantu, prijateljem in sošolcem za vso podporo in pomoč med študijem.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Janja Plut

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

Ljubljana, julij 2014

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 METABOLIZEM IN REAKTIVNI METABOLITI.....	1
1.1.1 Reaktivni metaboliti	3
1.1.2 <i>In vitro</i> določanje reaktivnih metabolitov	5
1.2 HORMONSKI MOTILCI.....	6
1.2.1 Endogeni estrogene in estrogenski receptorji	7
1.2.2 Ksenoestrogeni	8
1.2.3 <i>In vitro</i> testi določanja estrogene aktivnosti	9
1.3 BISFENOL A	11
1.4 BISFENOL A DIGLICIDIL ETER.....	11
1.4.1 Lastnosti spojine	11
1.4.2 Prisotnost spojine v bioloških vzorcih.....	13
1.4.3 Toksikokinetika spojine.....	13
1.4.4 Toksikodinamika spojine.....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 <i>IN VITRO</i> PREUČEVANJE METABOLIZMA IN NASTANKA REAKTIVNIH METABOLITOV	19
3.2.1 <i>In vitro</i> inkubacija s humanimi jetrnimi mikrosomi in rekombinantnimi CYP izoenzimi	21
3.2.2 Časovno spremljanje reaktivnosti spojine BADGE z GSH	23
3.2.3 Detekcija z metodo LC-MS/MS	24
3.3 CELIČNA LINIJA BG1Luc4E ₂	25
3.3.1 Priprava delovnih raztopin in gojitvenih medijev	26
3.3.2 Delo s celično linijo BG1Luc4E ₂	26
3.4 UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNIH KONCENTRACIJ.....	29

3.4.1	MTS test	31
3.5	DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI	32
3.5.1	Test LUMI-CELL [®] ER.....	34
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	38
4.1	<i>IN VITRO</i> PREUČEVANJE METABOLIZMA IN NASTANKA REAKTIVNIH METABOLITOV	38
4.1.1	Inkubacija s humanimi jetrnimi mikrosomi	38
4.1.2	Inkubacija z rekombinantnimi CYP450 izoencimi	43
4.1.3	Časovno spremljanje reaktivnosti spojine BADGE z GSH	44
4.2	REZULTATI MTS TESTA Z RAZPRAVO.....	46
4.3	DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI	49
4.3.1	Rezultati LUMI CELL [®] ER	49
4.3.2	YES test (ang. Yeast estrogen screen).....	52
4.3.3	Vrednotenje rezultatov estrogenosti	57
5	SKLEP.....	59
6	LITERATURA	60

POVZETEK

Bisfenol A diglicidil eter (BADGE) je derivat znanega hormonskega motilca bisfenola A (BPA) in je glavna sestavina epoksidnih smol, ki se uporabljajo kot zaščita pred stikom živil z notranjo stranjo pločevink. Nepolimeriziran BADGE se lahko iz teh oblog sprošča v hrano, kjer se pretvori v različne derivate ali nespremenjen vstopi v prehransko verigo. V magistrski nalogi smo z *in vitro* metodami preučevali nastanek reaktivnih metabolitov v procesu metabolizma in estrogeno aktivnost spojine.

Nastanek reaktivnih metabolitov smo preučevali v inkubacijskih raztopinah s humanimi jetrnimi mikrosomi in različnimi rekombinantnimi CYP450 izoencimi. Spojino smo v fosfatnem pufru inkubirali skupaj z encimi, glutationom (GSH) in kofaktorjem NADPH. Pri iskanju prekursorskih ionov tipičnega fragmenta glutationa, m/z 272, z LC-MS/MS metodo, smo opazili pojav dveh spojin, z m/z 648 in m/z 610.7. Prva spojina (m/z 648) predstavlja produkt encimske redukcije obeh epoksidov ter konjugacije z glutationom. Spojine z m/z 610.7 sicer nismo dokončno identificirali, najverjetneje pa gre za dimer glutationa. Ob inkubacijah z rekombinantnimi izoencimi nismo opazili povišanih odzivov glede na slepi vzorec (fosfatni pufer). Ob spremljanju reaktivnosti spojine BADGE z GSH, v odsotnosti mikrosomalnih encimov, pa smo dokazali tudi počasni neencimski nastanek spojine z m/z 648 ter veliko hitrejši in obsežnejši nastanek spojine z m/z 610.7.

Kot *in vitro* model za testiranja estrogenosti smo uporabili celično linijo BG1Luc4E₂, ki je bila stabilno transfecirana z reporterskim plazmidom pGudLuc7.ere, na katerem se nahaja luciferazni gen kresničke (*luc*). Najprej smo z MTS testom preverili citotoksičnost 11 različnih koncentracij BADGE, od katerih sta le najvišji (50 in 100 µg/mL) povzročili manj kot 80 % preživetje celic. Estrogeno aktivnost smo preverili z LUMI CELL[®]ER testom, le pri necitotoksičnih koncentracijah. Z rezultati smo sicer dokazali šibko estrogeno aktivnost spojine, ki pa jo je potrebno še potrditi. Spojina namreč v svoji strukturi nima prostih hidroksilnih skupin na benzenovem obroču, ki so potrebne za estrogene učinek. Rezultate naše študije smo primerjali tudi z rezultati YES testa, kjer pa je bilo dokazano antagonistično delovanje višjih koncentracij. Razlog za razlike je najverjetneje uporaba različnih celičnih linij, vendar za dokončno potrditev delovanja na estrogenih receptorjih priporočamo ponovitve LUMI CELL[®]ER testa.

Ključne besede: bisfenol A diglicidil eter, estrogena aktivnost, bioaktivacija, citotoksičnost, *in vitro* testi

ABSTRACT

Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is a derivative of bisphenol A (BPA), a known endocrine-disrupting chemical. It is a major component of epoxy resins, which are widely used as a protective coating for inner sides of food cans. Unpolymerized monomer of BADGE may be released from these resins into food, where it is either converted to various derivatives or enters the food chain unmodified. Using *in vitro* methods we studied formation of reactive metabolites and the estrogenic activity of the compound.

We have studied the formation of reactive metabolites in incubation solutions with human liver microsomes and various recombinant CYP450 isozymes. The compound was incubated in phosphate buffer, with the enzymes, glutathione, and NADPH as cofactors. In searching of precursor ions of a typical fragment of glutathione, m/z 272, with LC-MS/MS method, we detected the formation of two compounds, with m/z 648 and m/z 610.7. The first compound (m/z 648) probably represents the product of enzymatic reduction of both epoxide rings and conjugation with glutathione. We didn't completely resolve the second compound, but most likely it represents an adduct two glutathione molecules. None of the recombinant isozymes formed significant higher responses in comparison with the blank solution. By monitoring the reactivity of BADGE with GSH we confirmed slow non-enzymatic formation of the first compound and a much faster formation rate of the second. As an *in vitro* model for testing estrogenicity we used BG1Luc4E₂ cell line. The cells were stably transfected with the reporter plasmid pGudLuc7.ere, with the firefly luciferase gene (*luc*). First, we evaluated the cytotoxicity of 11 different BADGE concentrations with MTS assay. Only two concentrations (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) caused less than 80 % cell viability. We studied estrogenicity of non-cytotoxic concentrations with LUMI CELL[®]ER assay. We detected a weak estrogenic activity, which needs yet to be confirmed. The structure of BADGE does not have free hydroxyl groups on the benzene ring, which are necessary for estrogen effect. We compared our results with the results of the screening YES assay, where antagonistic effects of higher doses have been detected. The difference is probably due the use of various cell lines. For definite confirmation of the action on the estrogenic receptors we recommend further testing with LUMI CELL[®]ER assay.

Keywords: bisphenol A diglycidyl ether, estrogenic activity, bioactivation, cytotoxicity, *in vitro* assays

KAZALO SLIK

Slika 1. Struktura glutationala.....	3
Slika 2. Struktura 17 β -estradiola (E ₂).	8
Slika 3. Struktura spojine bisfenol A (BPA).....	11
Slika 4. Struktura spojine BADGE.	12
Slika 5. Sinteza BADGE.....	12
Slika 6. Strukturne formule najpogostejših razgradnih produktov BADGE.....	13
Slika 7. Metabolizem BADGE do glicidaldehida in gliceraldehida.	14
Slika 8. a) Celice BG1Luc4E ₂ z normalno morfologijo v monosloju; b) Plazmid pGudLuc7.ere v BG1Luc4E ₂ celični liniji	25
Slika 9. Struktura MTS reagenta in njegovega obarvanega produkta, formazana, ki nastane v metabolično aktivnih celicah.	30
Slika 10. Bioluminescenčna reakcija, katalizirana s strani encima luciferaza (53).	33
Slika 11. Rezultati detekcije spojine z m/z 648 v različnih inkubacijskih raztopinah. Vrednosti so predstavljene v obliki povprečja $\pm$ SD odzivov, posnetih z LC-MS/MS metodo v negativni ionizaciji.	39
Slika 12. Strukturna formula spojine z m/z 648 in molsko maso 649 g/mol.	40
Slika 13. Rezultati detekcije spojine z m/z 610.7 v različnih inkubacijskih raztopinah. Vrednosti so predstavljene v obliki povprečja $\pm$ SD odzivov, posnetih z LC-MS/MS metodo v negativni ionizaciji.	41
Slika 14. Strukturna formula spojine z m/z 610.7 in z molsko maso 612 g/mol.....	42
Slika 15. Odziv spojine z m/z 648, v odvisnosti od časa, pri 120 minutnem spremljanju reaktivnosti BADGE ob prisotnosti GSH.....	44
Slika 16. Odziv fragment m/z 610.7, v odvisnosti od časa, pri 120 minutnem spremljanju reaktivnosti BADGE ob prisotnosti GSH.....	45
Slika 17. Rezultati 1. paralele MTS testa po 24-urni inkubaciji 10. pasaže BG1Luc4E ₂ celične linije skupaj z 11 različnimi koncentracijami BADGE v primerjavi s kontrolo. Vrednosti predstavljajo povprečje $\pm$ SD preživetja celic, podano v odstotkih.....	46
Slika 18. Rezultati 2. paralele MTS testa po 24-urni inkubaciji 18. pasaže BG1Luc4E ₂ celične linije skupaj z 11 različnimi koncentracijami raztopin BADGE. Vrednosti predstavljajo povprečje $\pm$ SD preživetja celic, podano v odstotkih.	47

Slika 19. Obarvana mikrotiterska plošča po izvedbi MTS testa s koncentracijsko različnimi raztopinami BADGE. Na sliki je prikazana plošča 2. paralele, izvedena na 18. pasaži BG1Luc4E ₂ celične linije. V prvih 5 vdolbinicah vrstice A je bil nanešen slepi vzorec, v vrstici B pa kontrola. Nato sledijo raztopine različnih koncentracij, od najmanjše proti najvišji.	47
Slika 20. Rezultati testa iskanja območja koncentracij po 24-urni inkubaciji 18. pasaže BG1Luc4E ₂ celične linije s 7 različnimi koncentracijami raztopin BADGE in 4 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E ₂ . Vse vrednosti so prilagojene na normalizirano vrednost 10,000 RLU, ki velja za najvišjo vrednost E ₂ . Vrednosti predstavljajo povprečje ± SD, podano v RLU.	50
Slika 21. Rezultati celostnega testa po 24-urni inkubaciji 10. pasaža BG1Luc4E ₂ celične linije z 11 različnimi koncentracijami raztopin BADGE, 11 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E ₂ in pozitivno kontrolo metoksiklor. Vse vrednosti so prilagojene na normalizirano vrednost 10000 RLU, ki velja za najvišjo vrednost E ₂ . Vrednosti predstavljajo povprečje ± SD, podano v RLU.	51
Slika 22. Indukcija celic kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v odvisnosti od koncentracije. Celice so bile 18 ur inkubirane ob prisotnosti različnih koncentracij spojine BADGE (vijolična) in pozitivne antagonistične kontrole 4-hidroksitamoksifen (modra). Rezultati so prikazani kot povprečje ± SD, podani v odstotkih.	55
Slika 23. Test kontrole obnovitve indukcije pri stalni koncentraciji spojine BADGE (1.00 x 10 ⁻⁴ M). Koncentracija agonista E ₂ je bila postopno povišana vse do najvišje koncentracije (vrednosti prikazane v Preglednici IX), s čimer smo prikazali obnovitev signala indukcije. Indukcija je prikazana s povprečjem ± SD, izražena v odstotkih.	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I. Bolezni, ki so posledica izpostavitve določenim hormonskim motilcem v otroštvu	7
Preglednica II. Reagenti in njihova vloga v <i>in vitro</i> inkubacijskih raztopinah.	22
Preglednica III. Volumni 2.5 mM raztopine BADGE, 25 mM raztopine GSH, 5 mM raztopine NADPH in suspenzije HLM v različnih mikroepruvetah.	22
Preglednica IV. Volumni 2.5 mM raztopine BADGE, 25 mM raztopine GSH, 5 mM raztopine NADPH in rekombinantnih CYP450 izoencimov v različnih mikroepruvetah. .	23

Preglednica V. Nastavitve masnega spektrometra za način opazovanja izbranih reakcij prehoda (MRM).....	24
Preglednica VI. Koncentracije BADGE testnih raztopin za MTS test.	31
Preglednica VII. Odzivi spojin z m/z 648 in m/z 610.7, posnetih z metodo LC-MS/MS, po inkubaciji z različnimi rekombinantnimi CYP izoencimi.	43
Preglednica VIII. Rezultati presejalnega YES testa za agonistično aktivnost spojine BADGE.	54
Preglednica IX. Vrednosti koncentracij agonista E_2 in testne spojine BADGE za posamezen stolpec na Sliki 23.....	56

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
BADGE	bisfenol A diglicidil eter
BPA	bisfenol A
CYP450	citokromi P450
DMEM	Eaglovo gojišče, prilagojeno po Dulbecco-u
DMEM+	Eaglovo gojišče, prilagojeno po Dulbecco-u z dodatkom reagentov
DMSO	N,N-dimetilsulfoksid
DPBS	Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufru
E₂	17 β -estradiol
ER	estrogenski receptorji
ERα	estrogenski receptorji tipa alfa
ERβ	estrogenski receptorji tipa beta
GSH	reducirana oblika L-glutationa
HLM	humani jetrni mikrosomi
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolijeva sol
m/z	razmerje med maso in nabojem
NADPH	β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reduciran
OH	hidroksilna skupina
PES	fenazin etosulfat
PPAR-γ	peroksisom proliferator aktivirajoči receptorji tipa gama
RLU	relativna svetlobna enota (ang. relative light unit)
RPMI 1640	medij Roswell Park Memorial inštituta 1640
SD	standardna deviacija
T25	plastenka za gojenje celičnih kultur, velikost 25 cm ²
T75	plastenka za gojenje celičnih kultur, velikost 75 cm ²
T150	plastenka za gojenje celičnih kultur, velikost 150 cm ²
YES	presejalni test (anti)-estrogenosti na kvasovkah (ang. yeast anti-estrogen screen)

1 UVOD

1.1 METABOLIZEM IN REAKTIVNI METABOLITI

Metabolizem ali biotransformacija je mehanizem odstranjevanja ksenobiotikov iz telesa. Ksenobiotiki so telesu tuje snovi, ki smo jim v okolju izpostavljeni in nimajo hranilne vrednosti, kot so npr. zdravila, pesticidi, industrijske kemikalije, dodatki v hrani... Večina teh spojin je lipofilnih, zato se težko izločajo iz organizma, saj se v ledvicah ali prebavnem traktu ponovno reabsorbirajo in krožijo po telesu. Proces biotransformacije je pretvorba lipofilne molekule v bolj polarno, najpogosteje z uvedbo polarne skupine, pri čemer se povečata molska masa in velikost molekule. Kot produkt nastane spojina, ki se iz telesa lažje izloča. Posledice tega so: krajši razplovni čas in čas izpostavljenosti, manjša verjetnost zadrževanja spojine v telesu in spremenjena biološka aktivnost ter čas delovanja (1, 2).

Jetra so najpomembnejši organ metabolizma, zaradi njihovega telesnega položaja, obtoka krvi in telesne funkcije. Večina ksenobiotikov v telo vstopa preko prebavnega trakta, po absorpciji v kri pa s krvjo po portalni veni do jeter. Jetra so tako najbolj izpostavljena tujim snovem, zato sta razstrupljanje in nadaljno izločanje v žolč pomembna zaščitna mehanizma organizma. Metabolizem je običajno kataliziran s strani encimov. Največ encimov se nahaja v jetrih, vendar jih najdemo tudi v živčnem sistemu, ledvicah, pljučih, krvi in prebavnem traktu. Znotrajcelično se encimi v največjem obsegu nahajajo na gladkem endoplazemskem retikulumu, vendar jih najdemo tudi v citosolu ali na notranji membrani mitohondrija (2, 3).

Metabolizem ksenobiotikov je običajno dvostopenjski proces, razdeljen na fazo I, kjer se v molekulo uvede polarna funkcionalna skupina, in fazo II, kjer poteče konjugacija z endogeno spojino. Vendar se včasih zgodi, da so določeni produkti faze II podvrženi nadaljnim reakcijam, kar lahko imenujemo III. faza metabolizma (4).

Reakcije I. faze

Lahko jih imenujemo tudi reakcije funkcionalizacije, ker se v strukturo uvede polarna funkcionalna skupina, na katero se lahko v nadaljnjih fazah veže endogena molekula. Glavne vrste reakcij te faze so redukcije, hidrolize in oksidacije, med katerimi prevladujejo slednje. Oksidacijo katalizirajo membranske monooksidaze, ki se nahajajo na gladkem

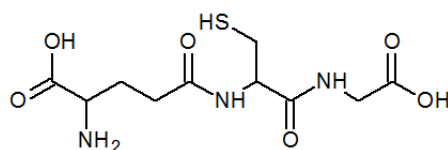
endoplazemskem retikulumu v jetrih in ostalih enterohepatičnih tkivih. Te encime imenujemo citokromi P450 (CYP450) in katalizirajo približno 90 % vseh reakcij prve faze in kar 40 različnih tipov vseh metaboličnih reakcij (1, 3, 4). Encimi CYP450 so večkomponentni elektronski transportni sistem, odgovoren za oksidativni metabolizem številnih endogenih in eksogenih molekul. Spadajo v družino hemoproteinov in v svoji strukturi vsebujejo železov protoporfirin IX (hem) kot prostetično skupino ter NADPH citokromno P450 reduktazo. Hemoprotein je vezavno mesto za substrat in kisik. Reduktaza pa služi kot donor elektronov. Tretja pomembna komponenta so fosfolipidi, ki lajšajo prenos elektronov iz NADPH citokromne P450 reduktaze na hemoprotein CYP450. Encimi CYP450 so zmožni aktivirati molekularni kisik, kar dovoljuje da se en atom kisika vgradi v molekulo substrata, medtem ko se drugi atom reducira do vode. Vgradnja hidroksilne skupine v hidrofobno molekulo omogoči vezavno mesto za hidrofilno molekulo v reakcijah konjugacije. Najpomembnejše reakcije, ki jih katalizirajo so: hidroksilacija alifatskih in aromatskih spojin, dealkiliranje (N-, O-, S-), N-, S- oksidacija, oksidativna deaminacija in dehalogeniranje (2, 3).

Reakcije II. faze

Imenujemo jih tudi reakcije konjugacije, saj se na polarno funkcionalno skupino ksenobiotika kovalentno veže endogena molekula s polarnim značajem. Za večino primerov velja, da je rezultat bolj polarna molekula, kot je bila pred vezavo, izjema sta le reakciji metilacije in acetilacije, ki polarnost molekule zmanjšata. Te reakcije običajno potekajo hitreje kot reakcije prve faze. Konjugacijo katalizirajo encimi, imenovani transferaze, ki imajo nase vezan kofaktor, ki je nosilec endogene molekule. V to fazo uvrščamo naslednje reakcije: glukuronidacijo, sulfatiranje, konjugacijo z aminokislinami, konjugacijo z glutationom, acetiliranje in metiliranje (2, 4).

Glutation (Slika 1) je tripeptid, ki ga sestavljajo naslednje aminokisline - glutaminska kislina, cistein in glicin (Glu-Cys-Gly). V telesu se nahaja v redoks ravnotežju med reducirano (GSH) in oksidirano (GS-SG) obliko. V procesu razstrupljanja ima pomembno vlogo predvsem zaradi prisotnosti v visokih koncentracijah, reaktivne nukleofilne sulfhidrilne (SH) skupine in posebnih vezi, ki preprečujejo razgradnjo s peptidazami. Sulfhidrilna skupina se po deprotonizaciji pretvori v tiolatni ion (GS^-), ki lahko reagira z številnimi elektrofilnimi molekulami. Znotraj celic se GSH nahaja v citosolu, na

mitohondriju in v jedru. Največ ga je v jetrih, čeprav ga najdemo tudi v drugih organih. Konjugacije z GSH so lahko katalizirane encimsko (z glutathion-S-transferazami) ali potečejo kot kemijske reakcije. Konjugati se lahko izločijo iz telesa skozi žolč ali urin, ali pa vstopijo v naslednjo fazo biotransformacije, imenovano faza III, kjer nastane merkapturna kislina. Konjugacija z GSH predstavlja najpomembnejši obrambni mehanizem celic pred toksičnimi spojinami saj lahko reagira s številnimi molekulami kot so: aliciklični ali aromatski epoksidi, aromatske nitro spojine, nenasičene alifatske spojine, ter aromatske in heterociklične spojine (2, 4).



Slika 1. Struktura glutathiona (povzeto po 5).

1.1.1 Reaktivni metaboliti

Običajno vodi metabolizem ksenobiotikov v izgubo farmakoloških ali bioloških aktivnosti. Takrat govorimo o reakcijah detoksifikacije. Vendar pa se v nekaterih primerih ksenobiotik biotransformira v toksične in reaktivne metabolite, kar imenujemo metabolična aktivacija ali bioaktivacija (6).

Glavni encimi v procesu bioaktivacije so CYP450 izoencimi, vendar pa pri procesu lahko sodelujejo tudi flavin monooksidaza (FMO), kinon oksidoreduktaza, monoamin oksidaza (MAO), peroksidaze, prostaglandin H-sintetaza, encimi črevesne mikroflore ter encimi druge faze metabolizma (npr.: uridin glukuronil transferaza- UGT) (6, 7, 8, 9). Reaktivni metaboliti v svoji strukturi vsebujejo različne elemente kot so epoksidi, kinoni, radikali, reaktivne kisikove zvrsti in nestabilni konjugati. Glede na njihov razpolovni čas pri fizioloških pogojih in zmožnost prenosa stran od mesta aktivacije, pa jih delimo na: ultra kratko-živeče, kratko-živeče in dolgo-živeče metabolite (8). V organizmu se reaktivni metaboliti lahko deaktivirajo z vodo (npr.: hidroliza epoksida z epoksid hidrolazo) ali s konjugacijo z GSH (kemijsko ali encimsko z glutathion-S-transferazo). Predvsem konjugacija s celičnimi antioksidanti, kot je GSH, predstavlja prvo in najpomembnejšo stopnjo celične obrambe proti produktom bioaktivacije. Vendar se deaktivaciji metaboliti velikokrat izognejo, difundirajo po celici, izven nje ali celo izven tkiva, kar pa vodi v toksičnost organizma (6, 9).

Reaktivni metaboliti reagirajo s celičnimi proteini, lipidi, nukleinskimi kislinami, kar lahko pripelje do motenj v delovanju proteinov, lipidne peroksidacije, poškodbe DNK, oksidativnega stresa in celo do imunskega odziva organizma. Sprožijo lahko motnjo ionskega gradienta in znotrajceličnih zalog kalcija, kar se kaže v celični disfunkciji in izgubi produkcije energije. Prizadetost celične funkcije vodi v njeno smrt ali apoptozo in celo okvaro organov (6, 7).

Reaktivne metabolite v grobem delimo na elektrofile in radikale. Elektrofile so najpogostejša skupina reaktivnih metabolitov. V molekuli imajo primankljaj enega elektrona, zato so pozitivno nabiti. Zaradi pozitivnega naboja težijo k delitvi elektrona z molekulami kot so nukleofili. Najpogostejše nastanejo tekom oksidacije v I. fazi, ki jo katalizirajo CYP450 izoencimi, peroksidaze ali alkohol dehidrogenaza, vendar tudi druga faza metabolizma ni izjema pri njihovem nastanku. Poznamo dve vrsti elektrofilov: trde, ki imajo lokaliziran pozitivni naboj in mehke elektrofile z delokaliziranim pozitivnim nabojem. V splošnem velja, da se trdi elektrofile vežejo s trdimi nukleofili ter mehki elektrofile z mehkiimi nukleofili. Trdi elektrofile tako težijo k reakcijam z nukleofilnimi deli molekule kot so kisik, dušik, ogljik, nukleinske kisline in žveplo v metioninu in ponavadi povzročajo genotoksične učinke. Mehki elektrofile so navadno citotoksični in najpogostejše reagirajo z nukleofilno sulfhidrilno skupino v GSH in proteinih (10, 11).

Radikali so molekule ali molekulski fragmenti, ki imajo enega ali več nesparjenih elektronov, lahko so nabiti ali ne. Zaradi nesparjenega elektrona so v večini primerov izredno reaktivni. Nastanejo lahko s sprejetjem, izgubo elektrona ali hemolitično razgradnjo kovalentne vezi. Najpogostejše odzamejo vodikov atom iz molekule, kar vodi v nastanek novega radikala in sprožitev verižne reakcije. Najreaktivnejši radikal je hidroksilni radikal ($\text{OH}^\bullet$), ki lahko reagira skoraj z vsemi molekulami *in vivo*, saj lahko odzame vodikov atom iz različnih spojin ali se veže na dvojno vez. Prisotnost radikalov lahko pripelje tudi do lipidne peroksidacije, ki vodi v uničenje lipidnih membran (jedrne, mitohondrijske ali lizosomske) in je ključen dogodek pri celični nekrozi (2, 8, 10, 11, 12).

1.1.2 *In vitro* določanje reaktivnih metabolitov

Reaktivni metaboliti so običajno kratko-živeči in jih zato ni možno detektirati v cirkulirajoči krvi oziroma plazmi. *In vitro* testi so pogosto uporabljena metoda za preiskovanje bioaktivacijskega potenciala, saj kljub indirektni informaciji dajo pomembne podatke o toksičnosti spojine (10). Na voljo so naslednje *in vitro* tehnike za določanje reaktivnih metabolitov: test kovalentne vezave na proteine, test zajetja reaktivnih metabolitov in test inhibicije CYP450 izoencimov.

Pri **testu kovalentne vezave na proteine** inkubiramo radioaktivno označeno testno spojino skupaj z jetrnimi mikrosomi ob prisotnosti ustreznega kofaktorja ali sveže izoliranimi hepatociti. Test meri ireverzibilno vezavo reaktivnih metabolitov, ki izhajajo iz radioaktivno označene testne spojine, na celične makromolekule, ki jo določimo na osnovi količine neodstranjene radioaktivnosti v proteinski usedlini. Test zagotavlja kvantitativno oceno ireverzibilno vezanih metabolitov na tkivo, vendar ne da informacije o naravi kovalentno modificiranih proteinov (9, 10). Kemično **zajetje reaktivnih metabolitov** je pogosto uporabljena tehnika za določanje metabolitov, ki tvorijo stabilne konjugate z lovilnim reagentom. Najpogostejši reaktivni metaboliti so elektrofilni, ki jih lahko glede na njihovo vrsto (ali so mehki ali trdi) lovimo z različnimi reagenti. Mehki elektrofilni reagirajo z mehkiimi nukleofili, zato lahko za njihovo zajetje uporabimo tiole, kamor spadajo GSH, etinil esterni derivat GSH ali N-acetilcistein. Za zajetje trdih elektrofilov pa uporabimo amine (npr.: semikarbazid, metoksilamin) ali cianidne anione. Eksperiment izvedemo z inkubacijo testne spojine skupaj z jetrnimi mikrosomi, NADPH in ustreznim lovilnim reagentom. Nastale konjugate nato detektiramo z uporabo LC-MS/MS ali nuklearne magnetne resonance (NMR) (10). Pri **testu encimske inhibicije CYP450 izoencimov** izvedemo inkubacijo testne spojine skupaj s humanimi jetrnimi mikrosomi (HLM) in specifičnim substratom izoencima. Po inkubaciji metabolite specifičnega substrata detektiramo z LC-MS/MS ali fluorescenco, s čimer določimo vpliv testne spojine na metabolizem substrata. V nekaterih primerih namreč bioaktivacija s CYP450 izoencimi vodi do nastanka reaktivnih metabolitov, ki se zaradi velike reaktivnosti vežejo kar na aktivni center encima in ga tako inhibirajo (10).

1.2 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci so eksogene snovi, ki motijo normalno delovanje endokrinega sistema in lahko povzročajo neželene učinke na izpostavljenih organizmih (13, 14). V splošnem jih delimo na:

- sintetične hormone (npr.: 17 α -etinilestradiol),
- naravne spojine (npr.: izoflavon genistein) in
- kemikalije (npr.: pesticidi, BPA) (15).

Ker so v naravi vesplošno prisotni, vstopajo v naše telo po različnih poteh - s prehrano, vdihavanjem onesnaženega zraka, z absorpcijo skozi kožo ali pitjem onesnažene vode (16, 17). Mehanizem njihovega delovanja, zaradi kompleksnosti endokrinega sistema, poteka na večih stopnjah. Motijo sintezo, presnovo, prenos, izločanje ali vezavo hormonov na specifične receptorje. Te učinke izzovejo preko interakcij z encimi, ki sodelujejo pri biosintezi, presnovi ali izločanju endogenih hormonov, z neposredno vezavo na steroidne ali nesteroidne receptorje ter preko ostalih mehanizmov, ki lahko na kakršenkoli način prizadenejo endokrini sistem. Povzročijo lahko tudi spremembe v izražanju genov z negenomsko modifikacijo preko metilacije DNK in acetilacije histonov. Posledice le-teh se lahko izrazijo šele skozi leta ali se prenesejo celo na potomce. Hormonski motilci najpogosteje delujejo preko vezave na jedrne receptorje. Če nanje delujejo agonistično, povzročijo njihovo aktivacijo. V primeru antagonističnega delovanja, pa preprečijo vezavo endogenega hormona, kar povzroči receptorsko inaktivacijo. Najpogostejše tarče so androgenski, estrogenski, tiroidni, glukokortikoidni, PPAR- γ in progesteronski receptorji (13, 15, 16, 18).

Pomembno vlogo igra starost, pri kateri smo hormonskim motilcem izpostavljeni. Raziskave kažejo, da izpostavljenost pred rojstvom ali v zgodnjem otroštvu prinaša bistveno večje posledice kot izpostavljenost v odrasli dobi zaradi nepopolnoma razvitih obrambnih mehanizmov telesa. Tako lahko izpostavljenost pred rojstvom vodi do motenj v reproduktivnem, metaboličnem in hormonskem sistemu, ki se pokažejo šele v odrasli dobi. Dokazana je bila tudi povezava med izpostavljenostjo določenim hormonskim motilcem v otroštvu in nekaterimi pogostimi boleznimi današnjega časa (Preglednica I). V primerjavi z otroci, so pri odraslih za nastop toksičnih učinkov potrebne višje koncentracije, učinki pa so vezani le na čas izpostavitve (18).

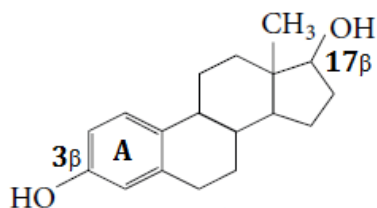
Preglednica I. Bolezni, ki so posledica izpostavitve določenim hormonskim motilcem v otroštvu (prirejeno po 18).

Sistem	Bolezen	Hormonski motilec
Reprodukativni/ endokrini sistem	Rak prsi in prostate	BPA
	Endometrioza	Dioksin, PCB
	Neplodnost	Estrogeni, pesticidi, ftalati
	Diabetes, metabolni sindrom	BPA
	Zgodnja puberteta	Estrogeni, BPA
	Debelost	BPA, organokloridni pesticidi, organotini
Imunski/ avtoimunski sistem	Dovzetnost za okužbe	Dioksin
	Avtoimunske bolezni	Dioksin
Pljučno-kardiovaskularni sistem	Astma	Zračni onesnaževalci
	Srčna bolezen/ hipertenzija	BPA
	Srčna kap	PCB
Možgani/ živčni sistem	Alzheimerjeva bolezen	Svinec
	Parkinsonova bolezen	Pesticid
	Težave učenja	PCB, svinec, etanol, organokloridni pesticidi

Učinek hormonskih motilcev lahko nastopi že pri zelo nizkih koncentracijah (pM, nM). Odziv pa ni linearen s koncentracijo hormonskega motilca, najverjetneje zaradi kompleksne dinamike zasedenosti in nasičenosti hormonskih receptorjev. Nižji odmerki imajo lahko močnejši ali celo drugačen vpliv na organizem kot višji (18).

1.2.1 Endogeni estrogeni in estrogenski receptorji

Trije glavni estrogeni v telesu so estron (E_1), 17β -estradiol (E_2) in estriol (E_3). Njihova sinteza pri ženskah poteka z encimsko modifikacijo holesterola v jajčnikih. Najpomembnejši estrogen v ženskem telesu je 17β -estradiol (Slika 2), ki ga encim aromataza sintetizira iz testosterona (3, 18).



Slika 2. Struktura 17 β -estradiola (E_2) (prirejeno po 13).

Naravni estrogeni imajo vpliv na številna tkiva v ženskem telesu, predvsem na reprodukivni sistem, dojke in centralni živčni sistem. V reprodukivnem sistemu uravnavajo menstrualni cikel, nosečnost in laktacijo. Spodbujajo celično proliferacijo in hipertrofijo ženskih sekundarnih spolnih znakov ter sintezo in sekrecijo celično specifičnih proteinov. Na telo imajo lahko tudi negativen vpliv, saj lahko pri povečani aktivnosti stimulirajo rast in razmnoževanja celic ter tako povzročijo nastanek estrogensko odvisnega raka (npr.: rak endometrija in dojke) (3, 19). V največjem obsegu našete učinke izzovejo preko vezave na estrogenske receptorje, ki jih v splošnem razdelimo na:

- jedrne estrogenske receptorje ($ER\alpha$, $ER\beta$)
- membranske estrogenske receptorje ($mER\alpha$, $mER\beta$) in
- z G-proteinom sklopljene estrogenske receptorje (GPR30), ki prav tako spadajo med membranske (18).

Najpomembnejši med njimi so jedrni estrogenski receptorji, katerih aktivacija je sprožena ob vezavi hormona na ligand vezavno domeno receptorja. Spremeni se konformacija receptorja, temu sledi dimerizacija, fosforilacija ter premik receptorja v jedro. Kompleks ligand-ER se poveže s transkripcijskimi ko-regulatorji, bodisi ko-aktivatorji ali ko-represorji, vsi skupaj pa se vežejo na specifično zaporedje DNK, imenovano od estrogena odziven element (ERE). To omogoči ali prekine gensko transkripcijo v jedru (13, 20). Zapis za ER nosita dva različna gena, zato poznamo $ER\alpha$ in $ER\beta$, ki se izražata v različnih organih. $ER\alpha$ se nahaja predvsem v jajčnikih, maternici in mlečnih žlezah pri ženskah, ter testisih pri moških. Medtem, ko se $ER\beta$ močneje izraža v jajčnikih, manj pa v mlečnih žlezah, prostati, germinalnih celicah in obmodku. Obe vrsti ER najdemo še v pljučih, jetrih, maščobah, živčnem sistemu in vaskularnih endotelijskih celicah (13).

1.2.2 Ksenoestrogeni

Ksenoestrogeni so spojine, ki posnemajo učinke endogenih estrogenov ali se vmešavajo v njihove signalne poti. Ločimo naravne in sintezne ksenoestrogene. Med naravne uvrščamo

fitoestrogene (npr.: izoflavona genistein in daidzein), ki jih najdemo v rastlinah in mikoestrogene (npr.: zearalenon), ki nastajajo v glivah, nekaterih gobah in mahu. Med sintezne spadajo nekatere industrijske kemikalije (npr.: bisfenol A, ftalati), zdravilne učinkovine (npr.: 17α -etinilestradiol, dietilstilbestrol - DES), insekticidi (npr.: diklorodifeniltrikloroetan - DDT), pesticidi (npr.: metoksiklor) in sestavine kozmetičnih izdelkov (npr.: benzofenon-2 v kremah za sončenje) (13, 16, 18).

Delujejo lahko po številnih poteh, med katerimi prevladuje vezava na jedrne ER. Ob vezavi na receptorje sprožijo njihovo aktivacijo (estrogeni učinek) ali inaktivacijo (anti-estrogeni učinek). Zaradi dveh tipov receptorjev ($ER\alpha$ in $ER\beta$), z različno tkivno porazdelitvijo in fiziološko funkcijo, lahko izkazujejo agonistično ali antagonistično aktivnost tkivno specifično. Običajno imajo nizko vezavno afiniteto za ER, včasih celo 10,000-krat nižjo od E_2 , vendar lahko neželene učinke povzročijo že pri nizkih koncentracijah. Poleg tega je njihov učinek na gensko transkripcijo, v številnih primerih, drugačen od endogenih estrogenov (13, 20).

Raziskave so pokazale, da sta za ksenoestrogeno delovanje na ER potrebni dve prosti hidroksilni skupini, ki sta zmožni tvoriti vodikovo vez z receptorskim mestom. Prva posnema 3β -OH, druga pa 17β -OH skupino na E_2 . Kisika hidroksilnih skupin morata biti na ustrezni razdalji, ki znaša med 10.3-12.1 Å. Spojina mora imeti hidrofobne centre, s katerimi zapolni prazne žepke na ER in z njim tvori hidrofobne interakcije. Celotna spojina mora izkazovati hidrofoben značaj s planarno, obročno strukturo (3, 21).

1.2.3 *In vitro* testi določanja estrogene aktivnosti

Zaradi vse večje problematike odkrivanja hormonskih motilcev, se je povečala potreba po hitrih in cenovno ugodnih testih za detektiranje in karakterizacijo spojin s hormonsko aktivnostjo, zato so na voljo številni *in vivo* ter *in vitro* biološki testi. Predvsem *in vitro* testi imajo številne prednosti, kot so visoka specifičnost odziva, dobra občutljivost pri nizkih koncentracijah, hitrost, možnost avtomatizacije, združitev z QSAR modeli, ugodna cena in predstavljajo zelo dober način identifikacije hormonskih motilcev ter razumevanja mehanizma njihovega delovanja. Zato so primerni za presejalne teste velikega števila spojin in okoljskih vzorcev v kratkem časovnem obdobju. Pomankljivost teh testov je, da nekateri ne pojasnijo splošnega učinka biotransformacije ali farmakokinetike spojine, zato

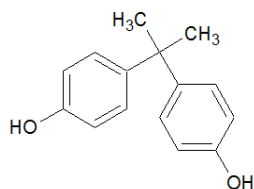
lahko podajo lažno negativne rezultate. V tem primeru test ni primerena izključitvena metoda za *in vivo* teste (13, 22, 23). Najpogosteje uporabljeni *in vitro* testi so naslednji: test vezave liganda na receptor, test celične proliferacije in test z reporterskim genom.

Test vezave liganda na receptor temelji na kompeticiji med radioaktivno označenim E₂ in testno substanco za ER in meri vezavno afiniteto liganda za receptor. Glavna pomanjkljivost te metode je, da nam ne poda podatka o aktivnosti receptorja, zato ne loči med agonisti in antagonistami (22, 24). V **testu celične proliferacije** je prisotnost estrogene spojine zaznana s povečanjem celične proliferacije (pospešena rast in razmnoževanje celic) v primerjavi s pozitivno kontrolo, kar nam omogoča ločevanje agonistov od antagonistov. Metoda velja za eno najpogosteje uporabljenih *in vitro* testov zaradi visokega odziva. Najpogosteje se izvaja na celičnih linijah raka prsi kot sta MCF-7 in T47D (13, 22, 24). **Test z reporterskim genom** meri indukcijo ali inhibicijo genske transkripcije po vezavi testne spojine na receptor. Pri testu najpogosteje uporabljamo sesalske celične linije ali celice kvasovk (npr.: *Saccharomyces cerevisiae*), ki so prehodno ali stabilno transfecirane z reporterskim plazmidom, na katerem se nahaja na estrogen odzven element (ERE), povezan z reporterskim genom, ki nosi zapis za reporterski protein (β -galaktozidaza, kloramfenikol aciltransferaza ali luciferaza). Ob vezavi agonista na receptor se sproži transkripcija reporterskega gena, translacija v mRNK in sinteza reporterskega proteina, ki ga enostavno detektiramo in kvantificiramo z ustreznim substratom (15, 22, 23, 24).

V magistrski naloge smo za določanje estrogene aktivnosti bisfenol A diglicidiletra (BADGE) uporabili test z reporterskim genom, LUMI CELL[®]ER (BG1Luc ER transaktivacijska testna metoda – BG1Luc ER TA), ki je bil validirana s strani Nacionalnega toksikološkega programa (NTP) Medagencijskega centra za oceno alternativnih toksikoloških metod (NICEATM) in s strani Medagencijskega usklajevalnega odbora za validacijo alternativnih metod (ICCVAM). V oktobru 2012 pa ga je sprejela tudi Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) kot metodo za prepoznavanje spojin z agonistično in antagonistično aktivnostjo na estrogenskih receptorjih. Pri izvedbi eksperimenta smo za detekcijo uporabili Promega luciferazni substrat, pufer in lizirno raztopino (25).

1.3 BISFENOL A

Bisfenol A (BPA) (Slika 3) je plastifikator v proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksidnih smol. Predstavlja izhodno spojino številnih BPA derivatov, med katere sodi tudi bisfenol A diglicidil eter, ki smo ga preučevali v naši magistrski nalogi. Preprosta struktura z dvema benzenovima obročema, ločenima z ogljikovim atomom, in hidroksilnima skupinama na para mestih, omogoča molekuli vezavo na oba tipa estrogenskih receptorjev, z 10-krat večjo afiniteto do ER β . Prvič je bilo njegovo šibko estrogeno delovanje opisano že leta 1936, vendar se še danes izvajajo številne študije na to temo. Ob nepopolni polimerizaciji ali razpadu polimera, pri povišani temperaturi, se odpušča iz polikarbonatne plastike v živila. Zato so leta 2011 z evropsko direktivo prepovedali njegovo uporabo v proizvodnji otroških stekleničk. V epidemioloških študijah je bilo ugotovljeno, da lahko negativno vpliva na razvoj živčnega sistema, vedenje, zmanjšuje kvaliteto semenske tekočine, povečuje pojavnost spontanih splavov, disfunkcijo jajčnikov, debelost in težave prostate. Na endokrini sistem lahko deluje tudi preko ostalih receptorjev, saj se poleg estrogenskih veže še na ščitnične, glukokortikoidne in aril ogljikovodikove receptorje (AhR). Poleg tega je bila v *in vitro* študiji, ob inkubaciji s HLM ugotovljena njegova bioaktivacija in pretvorba v reaktivne metabolite (18, 19, 20, 26, 27, 28).



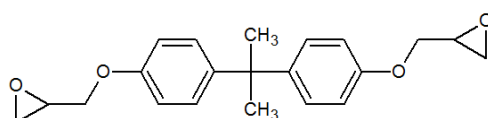
Slika 3. Struktura spojine bisfenol A (BPA).

1.4 BISFENOL A DIGLICIDIL ETER

1.4.1 Lastnosti spojine

Bisfenol A diglicidil eter (BADGE) (Slika 4) je brezbarvna, lepljiva, viskozna spojina brez vonja. Monomer z molekulsko maso 340.42 g/mol in formulo C₂₁H₂₄O₄, se po IUPAC imenuje 2-[[4-[2-[4-(oksiran-2ilmetoksi)fenil]propan-2-il]fenoksi]metil]oksiran. Njegova struktura spominja na strukturo BPA, z razliko, da sta obe hidroksilni skupini zaetreni z glicidilno skupino. Spojina je lipofilna, z vrednostjo logP_{ow} okoli 3.8 in je v vodi zelo slabo

topna (0.5 mg/L pri 20°C). Tališče spojine je med 8-12 °C, vrelišče pa je relativno visoko (> 200 °C). Ima nizek parni tlak (<0.0001 hPa pri 25 °C), zato je njegova prisotnost v zraku nizka. Slaba topnost v vodi, nizek parni tlak in precej visok $\log P_{ow}$ nakazujejo, da ima BADGE potencial za adsorpcijo na zemljo ali sediment, zato je pričakovana počasna biorazgradnja v okolju (29, 30, 31, 32, 33).

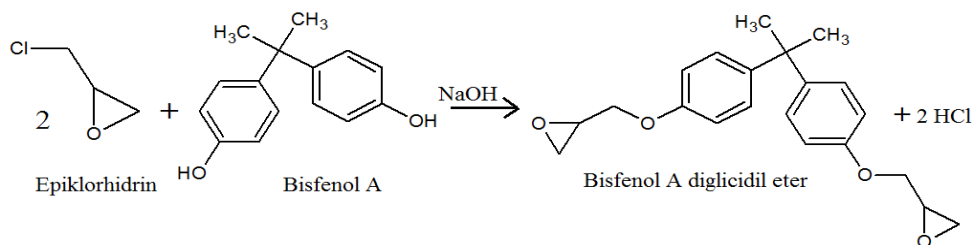


Slika 4. Struktura spojine BADGE.

V industriji se BADGE uporablja predvsem kot glavna surovina epoksidnih smol, ki so pogosta zaščitna sredstva notranjih strani pločevink za živila. Namen teh oblog je preprečiti neposreden stik med kovino in živilom, s čimer zaustavijo korozijo pločevink ter preprečijo kontaminacijo živil z raztopljenimi kovinami ter okužbe z mikroorganizmi.

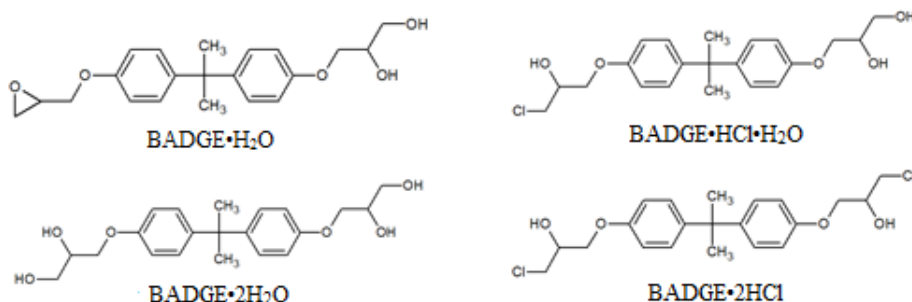
Poleg proizvodnje epoksidnih smol pa se BADGE uporablja tudi kot dodatek za eliminacijo klorovodikove kisline pri sintezi polivinil klorida (PVC) ter kot stabilizator poliesterfenolnih premazov. V letu 2003 je njegova letna proizvodnja znašala kar 957 000 ton (33, 34, 35, 36).

Sinteza spojine poteka s kondenzacijo dveh molekul epiklorhidrina in ene molekule BPA, ob prisotnosti NaOH (Slika 5). Z nadzorom reakcije lahko uravnavamo nastanek spojine z različnimi molskimi masami. Nizkomolekularne spojine (monomeri) so viskozne tekočine, z naraščanjem mase (oligomeri) pa viskoznost narašča vse do trdnega produkta (30, 31).



Slika 5. Sinteza BADGE (prirejeno po 30, 31).

Raziskave so pokazale, da prosti BADGE migrira iz zaščitnih premazov v živila z visoko vsebnostjo maščob in v vodne raztopine, kjer pride do nastanka hidroliziranih in klorhidrinskih derivatov (Slika 6). Zato je Znanstvena komisija za živila Evropske unije (ang. Scientific committee for food of the European Commission) določila najvišjo dovoljeno migracijsko mejo, 1 mg/kg živila, ki velja za vsoto BADGE in njegovih razgradnih produktov (Slika 6) (35).



Slika 6. Strukturne formule najpogostejših razgradnih produktov BADGE (prirejeno po 36, 37).

1.4.2 Prisotnost spojine v bioloških vzorcih

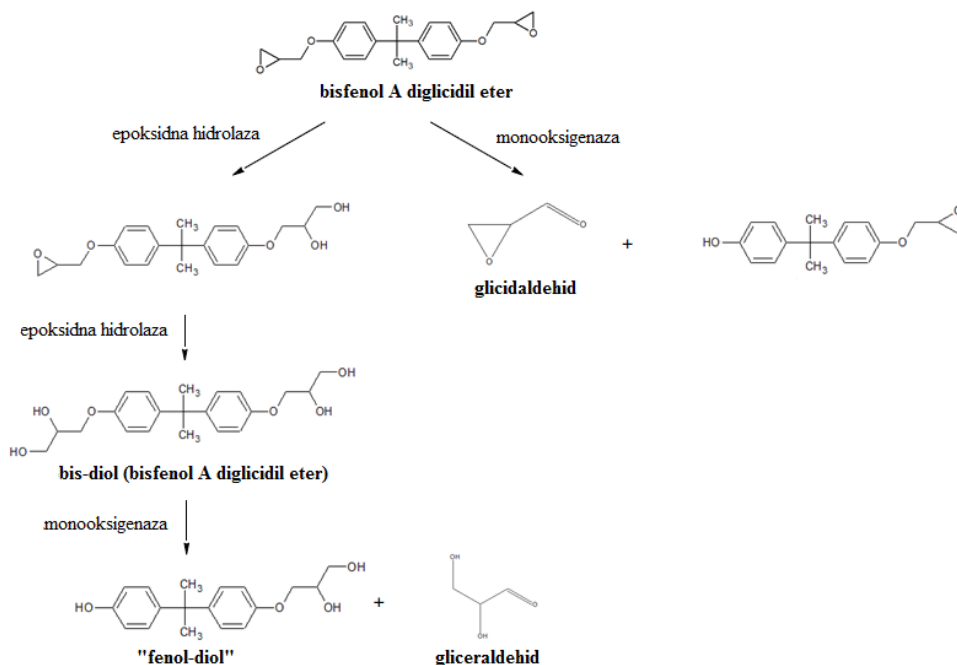
Leta 2012 Wang s sodelavci objavil prvo študijo na temo prisotnosti spojine in njenih razgradnih produktov v telesnih tekočinah pri ljudeh. V študiji so pregledali 127 urinskih vzorcev zbranih v ZDA in na Kitajskem, kjer so iskali prosti in totalni BADGE (prosti in konjugiran BADGE) ter njegove 3 razgradne derivate ([BADGE•H₂O], [BADGE•HCl•H₂O] in [BADGE•2H₂O]). BADGE in derivate so odkrili pri 100 % urinskih vzorcev. Celotna urinska koncentracija v ZDA je znašala med 1.24 do 9.03 ng/mL, medtem ko je bila pri Kitajcih v povprečju trikrat nižja. V urinu so zaznali tako prosti kot konjugiran BADGE. Prevladoval je derivat BADGE•2H₂O s 45 - 60 % deležem celote, ki mu je sledil prosti BADGE (17 - 24 %), vendar so se razmerja in deleži razlikovali glede na starost, spol in etnično skupino. Na podlagi urinske koncentracije so ocenili tudi dnevni vnos, ki je za prebivalce ZDA znašal med 69.4 - 9.14 ng/kg telesne teže, za prebivalce Kitajske pa 28.4 - 5.69 ng/kg telesne teže (36).

1.4.3 Toksikokinetika spojine

Leta 1981 je Climie s sodelavci naredil temeljito študijo metabolizma [¹⁴C]BADGE na miših z namenom določitve splošne usode spojine v procesu metabolizma in ovrednotenja obsega O-dealkiliranja do glicidaldehida, ki je bakterijski mutagen, ali do gliceraldehida, ki

je relativno nenevaren. Ugotovili so, da se spojina v miših hitro metabolizira. Glavna pot metabolizma je hidroliza epoksidnega obroča, ki lahko poteče neencimsko ali encimsko s katalizo epoksidne hidrolaze in vodi do nastanka bis-diola (Slika 7). Hidrolizi sledi oksidativno dealkiliranje, ki ga katalizira monooksigenaza do fenola in gliceraldehida. Stranska pot metabolizma lahko poteče z direktno oksidacijo do mutagenega glicidaldehida (Slika 7) (33, 34).

BADGE se je izločil z urinom in fecesom. Profil metabolitov v fecesu je bil neodvisen od poti zaužitja. Glavni metabolit je bil bis-diol, ki se je izločil v prosti ali konjugirani obliki ali pa se je pretvoril do karboksilne kisline. Tako v urinu kot fecesu so prevladovali glukuronidni in sulfatni konjugati (31).



Slika 7. Metabolizem BADGE do glicidaldehida in gliceraldehida (prirejeno po 29).

1.4.4 Toksikodinamika spojine

Monomer spojine povzroča kontaktno alergijo, saj neposreden stik s kožo vodi v razvoj srbečega vnetja kože. Oligomeri s srednje visoko molekulsko maso lahko povzročijo depresijo centralnega živčnega sistema, močno draženje kože, preobčutljivost in sprožitev astmatičnega napada (31).

Zaradi dveh epoksidnih skupin, velja BADGE za zelo reaktivnega, saj se lahko kovalentno veže na DNK in povzroči mutacije (38). Mutagenost spojine je bila dokazana že v številnih

in vitro testih. Z Amesovim testom na *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*, so ob odsotnosti ali prisotnosti jetrne metabolične frakcije S9 potrdili mutagene učinke. Pri inkubaciji celic podganjih jeter z različnimi koncentracijami spojine (3.75 - 15 µg/mL) so pri višjih odmerkih detektirali povečano frekvenco kromosomskih aberacij. V eni izmed študij so ugotovili, da je BADGE *in vitro* zmožen povzročiti citotoksične in genotoksične učinke tudi na človeških limfocitih. Potrdili so, da je stopnja toksičnosti BADGE odvisna predvsem od nezreagiranih epoksidnih skupin, saj so genotoksični učinki spojine bistveno močnejši kot učinki njenih hidroliziranih derivatov. Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC), pa ga zaradi omejenih podatkov o karcinogenosti na eksperimentalnih živalih in odsotnosti podatkov o učinkih na ljudeh, ni razvrstila na listo človeških karcinogenov (skupina 3) (37, 38).

BADGE je bil sprva prepoznan kot antagonist receptorjev PPAR γ . PPAR γ receptorji spadajo v družino treh jedrnih receptorjev PPAR in se nahajajo predvsem v adipoznem tkivu, kjer igrajo pomembno vlogo v diferenciaciji pre-adipocitov v adipocite. Zato BADGE kot antagonist inhibira transkripcijsko aktivacijo v NIH-3T3 celicah (fibroblastna celična linija) in diferenciacijo 3T3-L1 in 3T3-F422A preadipocitov v adipocite. V eni izmed poznejših raziskav pa je Bishop-Bailey s sodelavci poročal o agonistični aktivnosti na ECV304 (humana celična linija epitelijska), kjer je spojina povzročila aktivacijo in jedrno premestitev receptorja ter apoptozo celic. Raziskovalci so si te nasprotujoče rezultate razložili z dejstvom, da spojina na PPAR γ receptorje najverjetneje deluje celično specifično (39).

Agonistično delovanje BADGE na PPAR γ receptorjih vodi v celično smrt, vendar to ni edini mehanizem preko katerega jo povzroči. Fehlberg in sodelavci so preučevali vpliv spojine na celicah, ki so izražale receptorje PPAR γ in na celicah, ki teh receptorjev niso izražale. Pri HCT-166 celicah (celice raka debelega črevesa), ki so izražale PPAR γ receptorje, je spojina povzročila koncentracijsko odvisno celično smrt in ojačala z indometacinom sproženo apoptozo. Pri celicah, ki PPAR γ niso izražale, so prav tako opazili od koncentracije odvisen nastanek celične smrti. V študiji je bilo potrjeno, da celično smrt povzroča preko programirane celične smrti- apoptoze, po poti odvisni od kaspaz, ki imajo glavno vlogo pri apoptozi, kot tudi od po kaspaze neodvisni poti (40).

2 NAMEN DELA

Spojina bisfenol A diglicidil eter (BADGE) je osnovna industrijska kemikalija za izdelavo epoksidnih smol, ki se pogosto uporabljajo kot zaščitni premazi notranjih strani pločevink, z namenom preprečitve neposrednega stika med kovino in živili. V primeru nepopolne polimerizacije lahko prosti BADGE prehaja v živila in posledično pride do njegovega zaužitja. V magistrski nalogi se bomo osredotočili na nastanek reaktivnih metabolitov v procesu metabolizma in estrogeno delovanje spojine.

Spojina v svoji strukturi vsebuje dve reaktivni epoksidni skupini, zato bomo z *in vitro* inkubacijo preverili morebitni nastanek reaktivnih metabolitov oziroma konjugatov z glutationom. Spojino bomo inkubirali skupaj s humanimi jetrnimi mikrosomi ali različnimi rekombinantnimi CYP450 izoencimi, ob prisotnosti glutationa in NADPH kot kofaktorja encimov. Pri inkubaciji z različnimi CYP450 izoencimi bomo določili, kateri izoencim ima pri metabolizmu spojine najpomembnejšo vlogo. Pri preverjanju reaktivnosti samega BADGE bomo spojino 120 minut inkubirali skupaj z glutationom v pufru, kjer bom na vsakih 10 minut z avtomatskim injektorjem odvzeli vzorec in ga pomerili. Vse meritve bomo izvedli z metodo LC-MS/MS.

Kot *in vitro* model za testiranje estrogene aktivnosti bomo uporabili celično linijo BG1Luc4E₂, na kateri bomo najprej, z MTS testom, določili citotoksične koncentracije BADGE, ki povzročajo manj kot 80 % preživetje celic. Prav tako bomo citotoksičnost koncentracij preverili tudi med samo izvedbo testa estrogenosti, kjer bomo z vizualnim pregledom ocenili prisotnost morfoloških sprememb na celicah.

BADGE je derivat znanega hormonskega motilca bisfenola A, zato bomo v magistrski nalogi estrogenost spojine preverili s testom LUMI CELL[®] ER. Pri analizi rezultatov bomo upoštevali le necitotoksične koncentracije za celično linijo BG1Luc4E₂, določene z MTS testom in vizualno oceno živosti celic. Rezultate bomo nato primerjali s presejalnim YES testom za (anti-) estrogeno aktivnost, ki so ga opravili na Katedri za farmacevtsko kemijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Kemikalije in reagenti:

- 2M NaOH
- 17 β -estradiol, Sigma-Aldrich
- β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reduciran - NADPH, Sigma-Aldrich
- acetonitril za HPLC
- bidestilirana voda (Milli-Q voda), proizvedena z A10 Advantage in Milli Q, Millipore
- bisfenol A diglicidil eter, TCI America
- dimetilsulfoksid, 100 % - DMSO, Sigma-Aldrich
- Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (ang. Dulbecco's phosphate buffered saline) - DPBS, Gibco
- Eaglovo gojišče, prilagojeno po Dulbecco-u (ang. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) – DMEM, Gibco
- fetusni goveji serum (ang. Fetal Bovine Serum) - FBS, Gibco
- fetusni goveji serum z nizko vsebnostjo hormonov (ang. dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum) - FBS-CS, Biological industries
- gentamicinijev sulfat - G418, Biological industries
- Hanksova uravnotežena raztopina soli, 1x - HBSS, Gibco
- kalijev dihidrogenfosfat - KH_2PO_4 , Kemika
- L-glutamin, Sigma
- L-glutation, reduciran – GSH, Sigma-Aldrich
- liofiliziran luciferazni substrat, Promega
- luciferazni pufer, Promega
- lizirna raztopina, 5x, Promega
- magnezijev klorid - MgCl_2 , Sigma-Aldrich
- medij Roswell Park Memorial inštituta 1640 - RPMI, Sigma-Aldrich
- metoksiklor, Sigma-Aldrich
- natrijev piruvat, Invitrogen
- raztopina penicilin/ streptamicin - (penicilin 5000 I.U, streptamicin 5000 $\mu\text{g/ml}$), Sigma
- raztopina triptanskega modrega 0.4 %, Life technologies
- reagent MTS, Promega

- tripsin, 10x, Gibco

Celična linija:

- celična linija humanih celic rakavega jajčnika - BG1Luc4E₂, Michael S. Denison, Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis

Mikrosomi:

- človeški jetrni mikrosomi, Sigma-Aldrich

Citokromi P 450:

- CYP 2C19, Sigma-Aldrich
- CYP 1A2, Sigma-Aldrich
- CYP 3A4, Sigma-Aldrich
- CYP 2E1, Sigma-Aldrich
- CYP 2C9, Sigma-Aldrich
- CYP 2C8, Sigma-Aldrich

Laboratorijska oprema in aparature

- analitska tehtnica AG 245, Mettler Toledo
- centrifuga
- centrifuga Centrifuge 5415 R, Eppendorf
- centrifugirka, 15 in 50 mL, TPP
- mikroeprovete (epice) s pokrovčkom 200 µL in 1.5 mL, Plastibrand
- spektrofotometer, čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2, Tecan
- program Magellan, Tecan
- detektor luminescence Synergy N4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, Biotek
- hemocitometer
- avtomatski števec celic Countess, Invitrogen
- celični inkubator Incusafe, Sanyo
- invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41, Olympus
- krioviala, 2 mL, Fisher Scientific
- komora z laminarnim pretokom zraka - LAF, Iskara Pio
- mikrotiterska plošča z 96 vdolbinicami, TPP
- bela nalepka za mikrotitersko ploščo, TPP
- večkanalna pipeta e300 (10-300 µL), Kemomed
- avtoklavirani nastavki za polavtomatske pipete 10 µL, 200 µl, 300 µl, 1000 µl
- polavtomatske pipete 0.5-10 µL, 100-1000 µL, Kemomed

- polavtomatske pipete 2-20 μL , 20-200 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL , Gilson
- pH meter MP 220, Mettler Toledo
- elektroda InLab[®] 413, Mettler Toledo
- platenke za gojenje celičnih kultur, 25 cm^2 , 75 cm^2 in 150 cm^2 - (T25, T75, T150), TPP
- pripomoček za pipetiranje Midi Plus, Biohit
- serološke pipete 5, 10, 25 in 50 mL, TPP
- stresalnik VORTEMP 56, Labnet
- vibracijski stresalnik Combi-Spin, Biosan
- viala z vložki, Agilent Technologies
- zamaški za viala, Agilent Technologies
- hladilnik 4 $^{\circ}\text{C}$ in zamrzovalnik -20 $^{\circ}\text{C}$, Gorenje
- hladilnik 4 $^{\circ}\text{C}$ in zamrzovalnik -20 $^{\circ}\text{C}$, Bosch
- zamrzovalna omara -80 $^{\circ}\text{C}$, Sanyo
- Agilent 1290 Infinity LC, sestavljen iz: razplinjevalca, binarne črpalke, avtomatskega vzorčevalnika, termostata za kolono in UV-VIS detektorja, Agilent Technologies
- Agilent 6460 Triple Quadropole Jetstream[®] LC/MS, Agilent Technologies
- Program za obdelavo podatkov MassHunter Workstation B.03.01
- Kromatografska kolona Phenyl Hexyl, Phenomenex
- Sistem za pripravo Mili Q vode 30 L, Millipore
- Steklovina: merilna bučka (100 mL), erlenmajerica (100 mL), merilni valj, lij, steklena palčka za mešanje, steklena kapalka
- Ostali inventar: spatule, tehtalni čolnicek, magnet za mešanje, filter papir, Parafilm[®] M

3.2 IN VITRO PREUČEVANJE METABOLIZMA IN NASTANKA REAKTIVNIH METABOLITOV

In vitro eksperimentalni modeli, ki izhajajo iz človeških tkiv, predstavljajo največkrat uporabljen sistem za preučevanje metabolizma spojin. Nudijo nam boljšo napovedno vrednost kot živalski modeli ter so etično manj sporni. Te modele, ki poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu, delimo na: subcelične, celične, tkivne in organske. Izmed naštetih modelov so subcelične frakcije glavni sistem za *in vitro* preučevanje metabolizma, saj jih odlikujeta enostavna uporaba in fleksibilnost inkubacijskih pogojev. Med jetrne subcelične frakcije spadajo: citosol, S9 frakcija, jetrni homogenat, mitohondriji,

mikrosomi, rekombinantni encimi, peroksisomi, jedrne frakcije in lizosomi. V eksperimentalnem delu naše magistrske naloge smo za raziskovanje metabolizma spojine BADGE uporabili mikrosome in rekombinantne encime (41).

Mikrosomi so glavni model *in vitro* študij metabolizma. To so membranski vezikli endoplazemskega retikuluma celic hepatocitov, veliki od 20-200 nm, ki jih izoliramo s homogenizacijo tkiva in diferencialno ultracentrifugacijo. Vsebujejo tako encime prve kot tudi druge faze metabolizma (CYP450, epoksid hidrolaze, flavin monooksigenaze (FMO), esteraze, uridindifosfat glukuronozil transferaze (UGT), amidaze, metiltransferaze in glutation-S-transferaze). Poleg visoke vsebnosti metabolnih encimov so njihove prednosti tudi majhna nespecifična vezava testnih spojin nanje, nizka cena, enostavna uporaba in ponovljivost rezultatov tudi po njihovem večkratnem zamrzovanju in odtajevanju (41, 42). Rekombinantni encimi so pridobljeni iz oocitov insektov, ki so bili predhodno transfecirani z bakulovirosom kot vektorjem za rekombinantni vnos encimov (CYP450), ki se pri insektih endogeno ne izražajo. Z njihovo pomočjo lahko, ob dodatku ustreznih kofaktorjev, preučujemo vpliv posameznega izoencima na metabolizem testne spojine (41).

Kot *in vitro* test za določanje reaktivnih metabolitov smo uporabili test zajetja reaktivnih metabolitov, kjer smo kot lovilni reagent uporabili GSH. GSH je tripeptid, s prosto sulfhidrilno skupino, ki lahko tvori stabilne konjugate z različnimi spojinami (kinoni, kinonimini, Michaelovi akceptorji, epoksidi, α,β -nenasičenimi karboksilnimi spojinami...) po mehanizmu substitucije ali nukleofilne adicije. Pri testu smo izvedli inkubacijo testne spojine skupaj s humanimi jetrnimi mikrosomi (HLM) ali različnimi izoencimi CYP450, NADPH kot kofaktorjem in eksogeno dodanim GSH (5, 10).

Kot metodo za detekcijo GSH in njegovih konjugatov smo, zaradi visoke občutljivosti in selektivnosti, uporabili tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Prednost metode je zmožnost ločitve, detekcije in in identifikacije metabolitov ob prisotnosti endogenih snovi. Dieckhaus in sodelavci so dokazali, da ima deprotonirana molekula GSH ali konjugati z GSH skupen fragment pri m/z 272 (deprotoniran γ -glutamil-dehidroalanil-glicin), ki nastane z izgubo H_2S iz molekule GSH. Tako iskanje prekursorskega iona m/z 272, v negativni ionizaciji, zagotavlja splošno uporabno tehniko za detekcijo konjugatov z GSH (10).

3.2.1 *In vitro* inkubacija s humanimi jetrnimi mikrosomi in rekombinantnimi CYP izoencimi

a) Priprava fosfatnega pufru

V 100 mL erlenmajerico smo natehtali 680.45 mg KH_2PO_4 (molska masa 136.09 g/mol) in 47.6 mg MgCl_2 (molska masa 95.21 g/mol), ter dolili 90 mL bidestilerane vode. Na pH metru smo s pomočjo magnetnega mešala in 2 M NaOH naravnali pH pufru na pH 7.4. Pred tem smo pH meter umerili z raztopinama s pH 1.5 in 7.0. Nato smo pufer prenesli v 100 mL bučko in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Za boljšo čistost smo pufer prefiltrirali s podtlakom. Do uporabe smo ga hranili v hladilniku pri 4 °C. Končna koncentracija KH_2PO_4 v pufru je znašala 50 mM, koncentracija MgCl_2 pa 5 mM.

b) Priprava osnovnih raztopin spojine BADGE, GSH in NADPH

Pri pripravi osnovnih raztopin smo upoštevali 5 x redčenje v testnih raztopinah, zato smo osnovne raztopine pripravili v ustrezno višjih koncentracijah. Vse pripravljene raztopine smo pred nadaljno uporabo dobro premešali na vibracijskem stresalniku.

- Priprava 2.5 mM raztopine spojine BADGE: 1.28 mg BADGE (molska masa 340.42 g/mol) smo raztopili v 1.5 mL DMSO.
- Priprava 25 mM raztopine GSH: 7.7 mg GSH (molska masa 307.3 g/mol) smo raztopili v 1 mL bidestilirane vode.
- Priprava 5 mM raztopine NADPH: 8 mg NADPH (molska masa 1142.12 g/mol) smo raztopili v 1.4 mL bidestilirane vode.

c) Priprava testnih raztopin in *in vitro* inkubacija

Pred pripravo testnih raztopin smo humane jetrne mikrosome in rekombinantne CYP450 izoencime vzeli iz zamrzovalnika (-80 °C) in jih ogreli na sobno temperaturo. V mikroepruvetah smo pripravili raztopine z različno vsebino. Vloga posameznih reagentov je predstavljena v Preglednici II.

Preglednica II. Reagenti in njihova vloga v *in vitro* inkubacijskih raztopinah.

Reagent	Vloga
Fosfatni pufer s pH 7.4	Medij reakcije
HLM/CYP450 izoencimi	<i>In vitro</i> testni model
GSH	Lovilec reaktivnih metabolitov
NADPH	Kofaktor CYP encimov
BADGE	Preučevana spojina
Acetonitril	Prekinitev reakcije z oboritvijo encimov

○ **Testne raztopine s humanimi jetrnimi mikrosomi:**

Pripravili smo več vsebinsko različnih mikroepruvet (epic). Z mikroepruveto, ki je vsebovala vse zgoraj navedene reagente, smo preučevali metabolizem spojine BADGE. V mikroepruveti brez NADPH smo preučevali kemijsko reaktivnost BADGE z GSH ob odsotnosti kofaktorja encimov. V mikroepruveti brez GSH pa oksidativni metabolizem spojine brez nastanka konjugatov z GSH. Slepno raztopino je predstavljala mikroepruveta s fosfatnim pufrom. Končne koncentracije reagentov v raztopinah so bile 5 mM GSH, 1 mM NADPH in 50 μ M BADGE. Dodani volumni osnovnih raztopin so prikazani v Preglednici III.

Preglednica III. Volumni 2.5 mM raztopine BADGE, 25 mM raztopine GSH, 5 mM raztopine NADPH in suspenzije HLM v različnih mikroepruvetah.

Številka mikroepruvete	Volumen BADGE [μ L]	Volumen GSH [μ L]	Volumen NADPH [μ L]	Volumen mikrosomov [μ L]	Volumen pufru [μ L]
1	2	20	20	5	55
2	2	20	/	5	75
3	2	/	20	5	75
4	/	/	/	/	100

○ **Testne raztopine z različnimi rekombinantnimi CYP450 izoencimi:**

Za vsak izoencim smo pripravili 3 mikroeprove. Prva mikroepruveta je vsebovala vse reagente. Medtem, ko v drugo in tretjo nismo dodali GSH ali NADPH in sta služili kot kontroli. Tudi tukaj je slepo raztopino predstavljal sam fosfatni pufer. Končne koncentracije reagentov, po pripravi inkubacijskih raztopin, so bile 5 mM za GSH, 1 mM za NADPH in 50 μ M BADGE. Dodani volumni osnovnih raztopin so prikazani v Preglednici IV.

Preglednica IV. Volumni 2.5 mM raztopine BADGE, 25 mM raztopine GSH, 5 mM raztopine NADPH in rekombinantnih CYP450 izoencimov v različnih mikroeprevetah.

Številka mikroeprevete	Volumen BADGE [μ L]	Volumen GSH [μ L]	Volumen NADPH [μ L]	Volumen CYP450 izoencima [μ L]	Volumen pufra [μ L]
1	2	20	20	5	55
2	2	20	/	5	75
3	2	/	20	5	75
4	/	/	/	/	100

Uporabili smo naslednje rekombinantne izoencime: CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C9 in CYP2C8. Pri inkubaciji BADGE z različnimi izoencimi, smo ugotavljali, kateri izoencim ima najpomembnejšo vlogo pri metabolizmu spojine oziroma tvorbi GSH konjugata.

- Standardna raztopina: Kot standardno raztopino, za umeritev inštrumenta, smo uporabili raztopino BADGE v metanolu za HPLC, s koncentracijo 5 mg/L.

Najprej smo izvedli predinkubacijo (5 minut, 37 °C in 20 obratov/minuto) v inkubacijskem stresalniku. To pomeni, da smo raztopine pripravili po protokolu, nismo pa dodali NADPH v mikroeprevete, kjer je bilo to potrebno. Po 5 minutah smo v mikroeprevete dodali še 5 mM raztopino NADPH in nadaljevali z enurno inkubacijo pri 37 °C in 20 obratih/minuto. Po koncu inkubacije smo v vse mikroeprevete dodali 25 μ L acetonitrila za HPLC, z namenom prekinitve reakcije. Nato je sledilo 20 minutno centrifugiranje vzorcev pri 4 °C in 1300 g. Supernatant smo previdno odpipetirali v 0.5 mL vial z inserti, ki smo jih do analize z LC-MS/MS hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2 Časovno spremljanje reaktivnosti spojine BADGE z GSH

Po zgoraj opisanih postopkih smo pripravili osnovni raztopini BADGE in GSH ter fosfatni puffer s pH 7.4. Tukaj predhodna inkubacije na stresalniku ni bila potrebna, saj je potekala kar v viali, v aparaturi LC-MS/MS pri 37 °C. V viali (brez inserta) smo združili 780 μ L fosfatnega pufra in 20 μ L BADGE, ter ju dobro premešali. Pred pričetkom merjenja pa smo dodali še 200 μ L GSH. Tako je bila končna koncentracija GSH 5 mM in BADGE 50 μ M. Na vsakih 10 minut je avtomatski injektor odvzel vzorec. Reaktivnost spojine in nastanek potencialnih konjugatov z GSH smo spremljali 120 minut, pri 37 °C.

3.2.3 Detekcija z metodo LC-MS/MS

Analizo raztopin smo izvedli s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS), z uporabo Agilent 1290 Infinity UPLC sistema združenega z Agilent 6460 trojnimi kvadrupolnim MS/MS analizatorjem, opremljenim z JetStream™ ionizacijskim izvorom. Kromatografska ločba je potekala na koloni Phenyl Hexyl 50 x 3.0 mm Phenomenex (3 μ m delci), s predkolono Gemini C6-Phenyl (4 x 2.0 mm) Phenomenex, pri 50 °C. Volumen injiciranja je znašal 1 μ L. Vodno mobilno fazo A je predstavljal 15 mM amonijev acetat v bidestilirani vodi, organsko mobilno fazo B pa metanol. Separacijo smo izvedli po sistemu gradientnega izpiranja, s katero smo dosegli krajši čas zadrževanja močno vezanih komponent na koloni. Hitrost toka mobilnih faz je bila 0.5 mL/min, z naslednjim gradientom (čas [min] % B): (0, 3); (0.5, 7); (1.2, 15); (2, 90); (2.1, 50); (2.2, 3).

Kot vir ionizacije smo uporabili negativen ESI (ang. electrospray ionization), kjer je prišlo do nastanka anionov. Nastavitve masnega analizatorja so bile sledeče: temperatura sušilnega plina 275 °C, pretok sušilnega plina 5 L/min, pritisk razpršilnega plina 45 PSI, temperatura plaščnega plina 320 °C, pretok plaščnega plina 11 L/min, napetost na kapilari 4000 V, napetost na šobi 2000 V in deltaEMV 0 V.

Nastanek konjugatov z GSH smo ugotavljali z iskanjem prekursorskih ionov tipičnega fragmenta GSH, m/z 272, v negativni ionizaciji. Za točno določitev konjugatov smo uporabili način izbranih reakcij prehoda (MRM, ang. multiple reaction monitoring). Pogoji meritve so predstavljeni v Preglednici V. Za kontrolo inštrumenta, zbiranje rezultatov in kvantifikacijo rezultatov smo uporabili programsko opremo MassHunter Workstation software B.03.01.

Preglednica V. Nastavitve masnega spektrometra za način opazovanja izbranih reakcij prehoda (MRM).

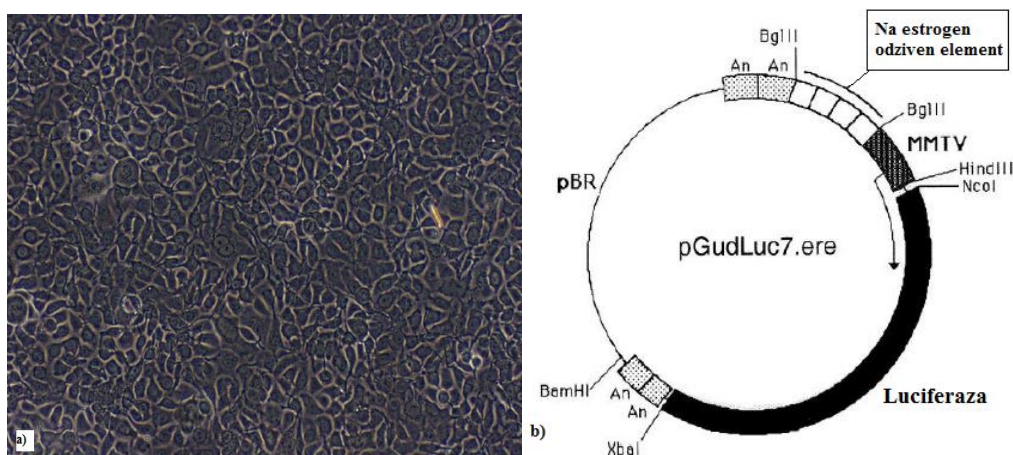
	MRM prehod	Razdelilni čas [ms]	Fragmentator [V]	Kolizijska energija [eV]
BADGE-GSH konjugat(m/z 648)	648- 272	50	135	16
Neznani konjugati (m/z 610,7)	610.7- 272	50	135	12

Pri spremljanju reaktivnosti spojine, v odvisnosti od časa, smo zaradi slabega odziva, po 25 minutah inkubacije povečali injekcijski volumen na 5 μ L in povečali elektromagnetno

valovanje (Δ EMV) na 200 V. Ostali parametri so ostali enaki kot pri analizi supernatanta inkubacij s HLM ali rekombinantnimi CYP450 izoencimi, z razliko temperature, ki je bila v tem primeru 37 °C.

3.3 CELIČNA LINIJA BG1Luc4E₂

Pri testiranju citotoksičnosti in estrogenosti BADGE smo uporabili celično linijo BG1Luc4E₂ (Slika 8a), ki sta jo razvila Rogers in Denison. Omenjena celična linija je bila pridobljena iz nesmrtna človeške celične linije raka jajčnika BG-1, ki so jo stabilno transfecirali z na estrogen odzivnim reporterskim plazmidom pGudLuc7.ere (Slika 8b) (43, 44, 45).



Slika 8. a) Celice BG1Luc4E₂ z normalno morfologijo v monosloju; **b)** Plazmid pGudLuc7.ere v BG1Luc4E₂ celični liniji (prirejeno po 43, 46).

Plazmid pGudLuc7.ere vsebuje štiri kopije sintetičnega oligonukleotida na katerem se nahajajo: na estrogen odziven element (ERE), tumorski virusni promotor mišje mlečne žleze (MMTV) in luciferazni gen kresničke (*luc*). Celična linija BG-1 v večji meri izraža ER α (90 %), ER β pa le v manjši meri (10 %). Rast teh celic je močno hormonsko odvisna, saj pri daljši rasti v mediju brez estrogena odmrejo. Morfološko gledano celice rastejo v enem sloju in so poligonalne oblike. Vsebnost citoplazme se med celicami razlikuje, pri vseh pa je prisotno le eno jedro. Rastejo hitro, saj pride do njihove podvojitve že v roku 20 - 24 ur, plato rasti pa dosežejo po 6 dneh gojenja. Pred pričetkom testiranja, je za ohranjanje stabilnosti in neokrnjenosti celične linije, priporočljivo gojenje začetnih pasaj v RPMI 1640 rastnem mediju, v inkubatorju pri standardnih pogojih (37 °C $\pm$ 1 °C, 90 % $\pm$ 5 % vlažnosti in atmosferi z 5.0 % $\pm$ 1 % CO₂). Celice so med gojenjem stabilne do 30.

pasaže, kar pomeni da se njihova aktivnost do te pasaže naj ne bi zmanjšala. Celična linija BG1Luc4E₂ se na prisotnost estrogene spojine odzove s povečno ekspresijo luciferaznega reporterskega gena (*luc*), kar se kaže v sintezi encima luciferaza, ki ga zaznamo z merjenjem luminescence. Linija je zelo občutljiva, saj lahko zazna prisotnost E₂ že pri koncentraciji 0.1 pM (25, 45, 47, 48, 49).

3.3.1 Priprava delovnih raztopin in gojitvenih medijev

○ Priprava raztopine 1x tripsina:

- 5 mL 10x tripsina
- 45 mL Hanksove uravnotežene raztopine soli (HBSS)

Pripravljeno raztopino smo shranjevali pri -20°C.

○ Priprava 1x DPBS:

- 5 mL 10x DPBS
- 45 mL strilizirane vode

○ Priprava rastnega medija RPMI 1640:

- 250 mL RPMI medija
- 2.5 mL 0.9 % raztopina penicilina in streptamicina
- 22 mL 8.0 % raztopina fetalnega govejega seruma

Medij smo shranjevali v hladilniku pri 4°C.

○ Priprava DMEM medija brez estrogena (DMEM+):

- 250 mL DMEM medija
- 5 mL 1.9 % L-glutamin
- 2.5 mL 0.9 % raztopina penicilina in streptamicina
- 2.5 mL natrijev piruvat
- 12 mL 4.5 % fetusni goveji serum z nizko vsebnostjo hormonov (FBS-CS)

DMEM+ medij smo shranjevali v hladilniku pri 4°C.

3.3.2 Delo s celično linijo BG1Luc4E₂

Celice BG1Luc4E₂ smo po odmrznitvi sprva gojili v rastnem RPMI 1640 mediju. V tem mediju smo jih presadili še vsaj dvakrat, oziroma dokler nismo dobili dovolj celic za izvedbo testa. Za potrebe testiranja smo jih prenesli v DMEM+ medij brez estrogena. Pri delu s celično linijo smo morali zagotoviti aseptične pogoje, zato smo za delo s celicami in pripravo raztopin vedno uporabljali brezprašno komoro z laminarnim pretokom filtriranega

zraka, ki smo jo pred pričetkom dela prebrisali s 70 % etanolom. Uporabljen pribor smo sterilizirali ali prebrisali z etanolom. Med delom smo uporabljali rokavice.

Inkubacija celic je vedno potekala pri standardnih pogojih gojenja. To je pri $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $90\text{ }\% \pm 5\text{ }\%$ vlažnosti in atmosferi z $5.0\text{ }\% \pm 1\text{ }\%$ CO_2 . Reagente in medije smo pred vsakim delom s celicami ogreli na približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gojitveno platenko smo vsakodnevno spremljali s svetlobnim mikroskopom in si sproti zapisovali morfološke spremembe na celicah. Pri 80 % preraščenosti gojitvene platenke smo celice, po spodaj opisanem postopku, preselili v večjo. Njihova pasaža se je z vsakim presajanjem povečala za 1.

a) Odmrzovanje celic

Celično linijo, shranjeno v tekočem dušiku, smo na hitro odtalili s toploto rok in tako preprečili toksične učinke DMSO v zamrznjenem gojišču. Med odtajanjem smo narahlo odvili pokrovček krioviale za nemoteno izhajanje nastalih plinov. Odmrznjene celice smo prenesli v 50 mL centrifugirko, kamor smo dodali še 20 mL RPMI 1640 rastnega medija in suspenzijo centrifugirali 8 minut pri 2.400 obratih/minuto oziroma do nastanka celične usedline. Supernatant smo zavrgli, celice pa smo resuspendirali v 5 mL RPMI medija. Celice smo prenesli v platenko T25, ki smo jo položili v inkubator s standardnimi pogoji.

b) Presajanje celic v rastnem mediju RPMI 1640

Po 2 - 3 dneh so celice dosegle 80 - 90 % preraščenost, zato je bila potrebna presaditev v večjo platenko (T75). Iz platenke T25 smo izsesali RPMI medij in dodali 5 mL 1x DPBS s katerim smo celice sprali. Po odstranitvi DPBS smo k celicam dodali 1x tripsin. Gojitveno platenko smo položili v inkubator za 5 do 10 minut oziroma do večinske odcepite celic od dna. Tripsin je encim, ki povzroči odlepitev celic od podlage, vendar jih lahko poškoduje, zato čas tripsinizacije ne sme biti predolg. Odlepljanje smo spremljali z invertnim mikroskopom. Ko se je večina celic odlepila, smo v platenko dodali še 5 mL 1x DPBS in celično suspenzijo prenesli v centrifugirko, kamor smo predhodno odpipetirali RPMI medij. Da smo zagotovili čim manjšo izgubo celic, smo platenko sprali še enkrat s 5 mL 1x DPBS. Nato smo pri 2.400 obratih/minuto centrifugirali 8 minut oziroma do nastanka celične usedline. Po odstranitvi supernatanta smo celice resuspendirali v 5 mL RPMI medija. Pred nanosom celic na novo gojitveno ploščo smo jih prešteli na hemocitometru. Tako smo dobili volumen suspenzije, ki smo ga morali prenesti v novo platenko za gojenje.

Postopek presajanja je bil vedno enak. Razlikovali so se le dodani volumni reagentov in medija, zaradi različnih velikosti gojitvenih plastenkov. Dodatek tripsina v T25 je znašal 1-2 mL, v T75 2 mL in 4 mL v T150. V centrifugirko s celično suspenzijo smo vedno dodali medij, s katerim smo prekinili delovanje tripsina. Če smo presajali celice iz T25, smo dodali 3 mL RPMI, pri T75 5 mL in pri T150 8 mL medija. Ob koncu presajanja smo celice vedno naselili na novo gojitveno plastenko. Njena velikost in dodatek rastnega medija sta bila odvisna od celičnega števila. Celicam na plošči T25 smo dodali 5 mL, na T75 10 mL in na plošči T150 20 mL medija RPMI. Med vsakim presajanjem smo celice prešteli na hemocitometru, s čimer smo dobili vpogled v hitrost celične rasti in volumen celične suspenzije za prenos v novo gojitveno plastenko.

c) Štetje celic

Med presajanjem smo celice šteli s hemocitometrom in invertnim svetlobnim mikroskopom. V mikroepreveti smo pripravili 40 μL triptan modrega barvila, h kateremu smo dodali 10 μL centrifugirane in resuspendirane celične suspenzije ter dobro premešali na vibracijskem stresalniku. 10 μL celične suspenzije s triptan modrim barvilom smo prenesli na hemocitometer, kjer smo šteli le žive, neobarvane celice. Na hemocitometru je 9 kvadratov, mi smo celice šteli le v štirih (v zgornjem levem in desnem ter spodnjem levem in desnem kvadratu). Če so bile celice na stranici kvadrata, smo šteli le tiste na zgornji in desni. Volumen 1 kvadrata hemocitometra je 10^{-4} mL, redčenje celic v triptan modrem pa je bilo 5x. Število celic v 1 mL suspenzije smo izračunali po spodnji enačbi (*Enačba 1*).

$$\text{Št. celic/mL} = (\text{povprečno št. celic v kvadratih} \times 5) / 10^{-4} \quad (\text{Enačba 1})$$

Preden smo celice naselili na mikrotitersko ploščo za test, smo jih prešteli z avtomatskim števcem. V mikroepreveto smo odpipeterali 10 μL triptan modrega barvila in 10 μL celične suspenzije. 10 μL suspenzije z barvilom smo nanegli na merilno ploščico avtomatskega števca. Števec nam je poleg podatka o številu živih celic ($C_{\text{celic začetna}}$), dal tudi podatek o celotnem številu celic (žive in mrtve) in odstotku njihovega preživetja. Z *Enačbo 2* smo izračunali začetni volumen suspenzije celic ($V_{\text{suspenzije začetni}}$), ki smo ga morali redčiti do končnega volumna ($V_{\text{suspenzije končni}}$), da smo dobili suspenzijo s potrebno koncentracijo celic za test ($C_{\text{celic končna}}$). Po *Enačbi 3* pa smo izračunali volumen DMEM+,

s katerim smo redčili začetno celično suspenzijo ($V_{\text{suspenzije začetni}}$) do končnega volumna ($V_{\text{suspenzije končni}}$).

$$C_{\text{celic končna}} (\text{št. celic/mL}) \times V_{\text{suspenzije končni}} (\text{mL}) \\ = C_{\text{celic začetna}} (\text{št. celic/mL}) \times V_{\text{suspenzije začetni}} (\text{mL}) \quad (\text{Enačba 2})$$

$$V_{\text{medija}} = V_{\text{suspenzije končni}} (\text{mL}) - V_{\text{suspenzije začetni}} (\text{mL}) \quad (\text{Enačba 3})$$

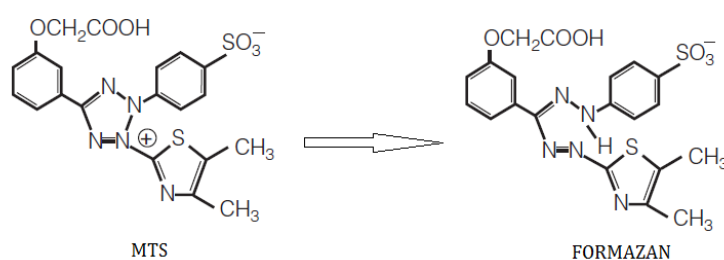
d) Priprava celic na testiranje

Pred izvedbo testa, smo morali celice presaditi v medij brez estrogena, DMEM+ medij. Iz gojitvene plastenke smo izsesali medij RPMI in celice sprali z 1x DPBS. 1x DPBS smo izsesali in dodali 1x tripsin. Celice smo položili v inkubator za toliko časa, da se jih je večina odlepila od podlage. Odlepljanje celic smo spremljali z invertnim svetlobnim mikroskopom. Ko se je večina celic odcepila, smo dodali 1x DPBS in prenesli suspenzijo v centrifugirko, kjer pa je bil tokrat DMEM+ medij. Gojitveno platenko smo ponovno sprali z 1x DPBS ter ponovno prenesli v centrifugirko. Centrifugirali smo 8 minut pri 2.400 obratih/minuto. Nato smo izsesali supernatant nad skupkom celic in celicam dodali svež DMEM+ medij. Pri tem smo pazili, da smo razdrli večje skupke celic in tako dobili suspenzijo posameznih celic. Po štetju celic, smo ustrezen volumen celične suspenzije prenesli na novo gojitveno ploščo in celicam dodali ustrezen volumen medija (glej točko b). Za selekcijo celic, ki so izražale reporterski plazmid, od tistih ki ga niso, smo dodali gentamicinijev sulfat (G418). Zaradi odmrtnosti celic, ki reporterskega plazmida niso izražale, je bilo medij potrebno po 24 urah zamenjati. Pri čemer pa nismo dodali več gentamicina, temveč sam DMEM+. Pred naselitvijo na mikrotitersko ploščo s 96 vdolbinicami, smo celice ob ustrezni preraščenosti še enkrat preselili v DMEM+ mediju.

3.4 UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNIH KONCENTRACIJ

Citotoksičnost je nastanek celične poškodbe ali smrti s sprožitvijo imunskega sistema ali toksične spojine, ki ji je celica izpostavljena (8). Tetrazolijeve soli so pogosta, hitra in enostavna testna metoda za določanje celične živosti in citotoksičnosti spojin. Test temelji na reduktivni pretvorbi tetrazolijeve soli v obarvan formazan. Prva tetrazolijeva sol na tržišču je bila 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT), pri kateri je

pred meritvijo absorbance potrebno raztopiti nastale formazanove kristale. Kasneje je šel razvoj v smeri tetrazolijevih soli kot sta 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil-2*H*-tetrazolijev-5-karboksanilid) (XTT) in 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolijeva sol (MTS), ki tvorita vodotopen formazan. Pri obeh je za boljšo občutljivost potreben še dodatek elektron prenašalnega reagenta kot so menadion, fenazin metosulfat (PMS) ali fenazin etosulfat (PES). Vendar tudi pri XTT niso odpravili vseh slabosti zaradi omejene topnosti in stabilnost, kar zahteva pripravo sveže raztopine pred vsakim testom. MTS tetrazolijeva sol ali Oownov reagent teh slabosti nima, saj raztopina ostane stabilna več mesecev, kar omogoča večkratno uporabo za številne teste. V testih se uporablja v kombinaciji z elektron prenašalnim reagentom PES. Po izpostavitvi metabolno aktivnim celicam, ki z encimom dehidrogenazo tvorijo NADPH, pride do prenosa elektronov na PES. Reduciran PES pa direktno reducira MTS do vodotopnega, vijolično obarvanega formazana (Slika 9), katerega absorbanco posnamemo pri 490 nm, kar direktno iz testne mikrotiterske plošče (50, 51, 52).



Slika 9. Struktura MTS reagenta in njegovega obarvanega produkta, formazana, ki nastane v metabolično aktivnih celicah (52).

V magistrski nalogi smo za določitev citotoksičnih koncentracij spojine BADGE uporabili testni protokol CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), ki je kolorimetrična metoda za določanje števila aktivnih celic v testu njihove rasti ali citotoksičnosti spojine. Reagent vsebuje tetrazolijevu sol MTS in elektron prenašalni reagent PES, ki ima hkrati tudi vlogo kemičnega stabilizatorja, kar omogoča da skupaj tvorita stabilno raztopino, obstojno več mesecev. Test odlikujeta enostavna uporaba in priročnost, saj sta že pripravljena v obliki enega reagenta, ki ga shranjujemo pri -20°C. Paziti moramo le, da reagenta neposredno ne izpostavimo svetlobi, saj lahko to povzroči povišano absorbanco ozadja (52).

3.4.1 MTS test

a) Naselitev celic na mikrotitersko ploščo

Pred naselitvijo celic v vdolbinice mikrotiterske plošče, smo celice prešteli z avtomatskim števcem, ki nam je dal podatek o začetni koncentraciji celic v suspenziji. Nato smo po *Enačbi 2* in *Enačbi 3* izračunali volumen DMEM+ medija, ki smo ga dodali k začetnemu volumnu suspenzije, da smo dobili, za test potrebno, koncentracijo 50,000 celic/mL. V vsaki vdolbinici smo potrebovali 10,000 celic, ki smo jih na ploščo nanegli z večkanalno pipeto po 200 μ L. V vdolbinice, namenjene slepemu vzorcu, celic nismo nanegli. Gojitveno ploščo smo nato položili v inkubator za 24 ur, s 37 °C in atmosfero s 5 % CO₂. V tem času so celice prerasle dno vdolbinic.

b) Priprava začetnih raztopin

- BADGE začetna raztopina: Raztopino s koncentracijo 10 mg/mL smo pripravili v 100 % DMSO.
- Redčenje raztopin BADGE v DMSO: Redčenje raztopin je potekalo v razmerju 1 : 2. 200 μ L mikroeprovete smo predhodno označili od C₂ - C₁₁ (namesto C₁ smo uporabili kar mikroeproveto z začetno raztopino), ter redčili tako, da smo iz predhodne mikroeprovete v naslednjo prenesli 10 μ L in ji dodali 10 μ L 100 % DMSO.

c) Priprava testnih raztopin

Pripravili smo jih s 100-kratnim redčenjem v DMEM+ mediju. Iz začetnih raztopin smo prenesli 6 μ L in jim dodali 594 μ L medija (Preglednica VI).

Preglednica VI. Koncentracije BADGE testnih raztopin za MTS test.

Mikroeproveta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Koncentracija [μ g/mL]	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.19	0.01

- Priprava raztopine 1 % DMSO v DMEM+ mediju: K 40 μ L 100 % DMSO smo dodali 3960 μ L DMEM+ medija in vsebino premešali. Ta raztopina je pri testu služila za kontrolo in slepi vzorec.

d) Tretiranje celic

Celice na mikrotiterski plošči smo po 24 urni inkubaciji vzeli iz inkubatorja in jih pregledali pod mikroskopom. Preden smo k celicam dodali pripravljene raztopine, smo z reverznim pipetiranjem odsesali medij in pri tem pazili, da celic nismo poškodovali. V 5 vdolbinic, kjer celice niso bile naseljene, smo nanесли 1 % DMSO v DMEM+ mediju, kjer je raztopina služila kot slepi vzorec. Enako raztopino smo nanесли še v vdolbinice s celicami, kjer je imela raztopina vlogo negativne kontrole. Nato smo nanесли v vdolbinice s celicami še po 100 μ L vsake posamezne koncentracije. Vsako koncentracijo, in kontrolo smo nanесли v 5 vdolbinic. Mikrotitersko ploščo smo nato položili v inkubator do naslednjega dne, za približno 24 ur.

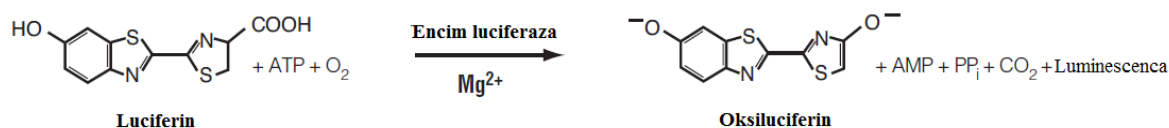
e) Dodatek MTS reagenta

Ker MTS reagent shranjujemo pri -20°C , smo ga morali uro pred izvedbo testa vzeti iz zamrzovalnika, da se je ogrel na sobno temperaturo. Zaradi svetlobne občutljivosti smo ga zaščitili z aluminijasto folijo. Pred nanosom reagenta smo vizualno ocenili viabilnost celic in si zapisali morebitne nepravilnosti, da smo jih lahko kasneje upoštevali pri vrednotenju rezultatov. Nato smo pri ugasnjeni luči v vdolbinice s testnimi raztopinami, slepim vzorcem in kontrolo dodali 20 μ L MTS reagenta. Po nanosu reagenta smo celotno ploščo zavili v aluminijasto folijo in jo položili v inkubator za 2 uri. Po končani inkubaciji, smo v vsaki vdolbinici, s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 490 nm. Rezultate smo prenesli v Excel-ov dokument, kjer smo jih ustrezno obdelali. Absorbanco slepe raztopine smo odšteli od vrednosti absorbanco testne spojine in kontrole.

3.5 DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI

Za določanje estrogene aktivnosti smo uporabili metodo LUMI CELL[®]ER (BG1Luc ER transaktivacijska testna metoda – BG1Luc ER TA), ki je bila validirana s strani Nacionalnega toksikološkega programa (NTP) Medagencijskega centra za oceno alternativnih toksikoloških metod (NICEATM) in s strani Medagencijskega usklajevalnega odbora za validacijo alternativnih metod (ICCVAM). V letu 2012 pa jo je sprejela še Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), kot metodo za prepoznavanje spojin z agonistično in antagonistično aktivnostjo na estrogenskih receptorjih (25). Test uvrščamo med teste z reporterskim genom, ki se izvaja na transfeciranih celicah

BG1Luc4E₂. Ob vezavi estrogene spojine na ER (ER α in ER β), nastane kompleks med ligandom in receptorjem, ki se po prehodu v jedro veže na estrogen odziven element (ERE) na DNK, kar sproži transkripcijo reporterskega gena (*luc*). Le-ta se nato izrazi v produkciji encima luciferaze, katerega aktivnost lahko izmerimo po dodatku ustreznega luciferaznega substrata (luciferin). Luminescenco, ki je posledica aktivnosti encima (Slika 10), detektiramo z luminometrom in programsko opremo. Pri testu na mikrotiterski plošči je emisija svetlobe podana v relativnih svetlobnih enotah (RLU) za posamezno vdolbinico (43).



Slika 10. Bioluminescenčna reakcija, katalizirana s strani encima luciferaza (53).

Metoda je primerna za spojine, ki so popolnoma topne v uporabljenem topilu. V našem primeru je bil to 100 % DMSO, katerega prisotnost v končnih testnih raztopinah sme znašati največ 1 %. Testne koncentracije ne smejo izkazovati citotoksičnih učinkov, kar pomeni, da mora biti odstotek preživetja celic večji od 80 %. Zato smo pred izvedbo testa določili preživetje celic z MTS testom, kot tudi z vizualno oceno živosti celic.

Pri metodi LUMI CELL[®]ER smo izvedli dva različna testa: test iskanja območja koncentracij (ang. range finder) in celostni testa (ang. comprehensive test). Test iskanja območij služi za določitev začetne koncentracije in režima redčenja, ki ju upoštevamo pri celostnem testu. Na izbiro imamo dva režima redčenja, redčenje v razmerju 1 : 2, ki zajema 3.5 logaritemske razrede, in redčenje v razmerju 1 : 5, s katerim zajamemo 7.5 logaritemskih razredov. Prvi način redčenja (1 : 2) uporabimo takrat, ko je spojina negativna za agonistično aktivnost, če so višje koncentracije citotoksične ali ko s tremi velikostnimi razredi zajamemo celotno območje odzivov. Drugi način redčenja (1 : 5) pa uporabimo, ko z redčenjem 1 : 2 ne zajamemo vseh odzivov in ko spojina izkazuje bifazni koncentracijski odziv. Pri testu iskanja območja celice tretiramo s 7 različnimi koncentracijami testne spojine (redčene v razmerju 1 : 10), 4 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E₂ ter z 1 % DMSO v mediju, ki služi kot negativna kontrola podlage. Pri celostnem testu, s katerim ovrednotimo agonistično aktivnost spojine na ER,

uporabimo 11 različnih koncentracij testne spojine, redčene v razmerju, ki ga določimo z testom iskanja območij. Poleg tega pa celice tretiramo še z 11 koncentracijami referenčnega standarda E₂, 1 % DMSO v mediju in metoksiklorom, ki služi kot pozitivna kontrola. Metoksiklor je namreč pesticid, s šibkim agonističnim delovanjem na ER. Z negativno kontrolo preverimo obseg transkripcijske aktivnosti ob odsotnosti referenčnega standarda, šibke pozitivne kontrole in testne spojine. Izračunano povprečno vrednost RLU za negativno kontrolo odštejemo od RLU vrednosti za referenčni standard, pozitivno kontrolo in testno substanco.

3.5.1 Test LUMI-CELL[®]ER

a) Naselitev celic na mikrotitersko ploščo

Celice smo pred naselitvijo na mikrotitersko ploščo najprej prešteli z avtomatskim števcem celic, da smo dobili začetno koncentracijo celic v suspenziji. S pomočjo *Enačb 2 in 3* smo izračunali volumen DMEM+ medija, ki smo ga dodali k začetnemu volumnu suspenzije, da smo dobili testno koncentracijo 200,000 celic/mL. V vsako vdolbinico smo z večkanalno pipeto nanесли 40,000 celic. Mikrotitersko ploščo z nasejenimi celicami smo položili za 24 ur v inkubator s 37 °C in atmosfero s 5 % CO₂. V tem času so se celice pričvrstile in prerasle dno vdolbinic.

b) Priprava osnovnih raztopin in reagentov

Pri pripravi smo raztopine vedno dobro premešali z vibracijskim stresalnikom. Kot topilo smo uporabili 100 % DMSO, ki so ga vse končne testne raztopine vsebovale največ 1 %, saj višja koncentracijska vsebnost ni primerna zaradi njegovega citotoksičnega delovanja. Za vsako ponovitev testa smo pripravili sveže raztopine.

- Priprava izhodne raztopine E₂ s koncentracijo 1.0×10^{-2} µg/mL: Raztopino s koncentracijo 10 mg/mL v 100 % DMSO smo trikrat redčili v razmerju 1 : 100, prav tako s 100 % DMSO. Tako smo dobili končno raztopino E₂ s koncentracijo 1.0×10^{-2} µg/mL. Ta raztopina nam je služila kot izhodna raztopina za pripravo testnih raztopin referenčnega standarda pri testu iskanja območja koncentracij in celostnem testu.
- Priprava DMSO kontrole: K 10 µL 100 % DMSO smo dodali 990 µL DMEM+ medija ter dobro premešali. Dobili smo raztopino z 1 % DMSO v mediju DMEM+.

- Priprava 1x lizirne raztopine: Raztopino smo pripravili z redčenjem 5x lizirne raztopine. Najprej smo 5x lizirno raztopino ogreli na sobno temperaturo, saj je sicer shranjena pri -20°C . Nato smo v centrifugirko odpipetirali 6 mL te raztopine, dodali še 24 mL deionizirane vode in premešali. Preostanek pripravljene raztopine smo shranili v zamrzovalniku pri -20°C .
- Priprava luciferaznega reagenta: Luciferazni reagent smo pripravili z združitvijo liofiliziranega luciferaznega substrata in luciferaznega pufa, ki sta bila shranjena pri -70°C , zato smo pred pripravo reagenta najprej obe sestavini ogreli na sobno temperaturo. Zaradi občutljivost na svetlobo smo ju zavili v aluminijasto folijo in položili v temen prostor. Pri ugasnjeni luči smo prenesli 10 mL luciferaznega pufra k luciferaznemu substratu in nežno pomešali. Do nanosa na mikrotitersko ploščo smo reagent hranili na temnem. Preostanek pripravljene reagent smo shranili v zamrzovalniku pri -20°C .

c) Priprava raztopin za test iskanja območij koncentracij

- Priprava raztopin referenčnega standarda E_2 : Raztopino E_2 s koncentracijo $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ smo redčili s 100 % DMSO, najprej enkrat v razmerju 1 : 2, nato pa še trikrat v razmerju 1 : 4. V štiri 1.5 mL mikoepruvete, kamor smo predhodno odpipetirali 600 μL DMEM+ medija, smo prenesli po 6 μL redčenih raztopin. Dobili smo raztopine s koncentracijami: 5.00×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 3.13×10^{-6} in $7.83 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$.
- Priprava testnih raztopin spojine BADGE: Najprej smo pripravili izhodno raztopino, s koncentracijo 10 mg/mL v 100 % DMSO. Nato smo v 200 μL mikroepruvetah, izhodno raztopino šestkrat zapored redčili, v razmerju 1 : 10. V sedem 1.5 mL mikroepruvet smo odpipetirali 600 μL DMEM+ medija in mu dodali po 6 μL predhodno redčenih raztopin. Dobili smo raztopine s koncentracijami: 1.00×10^2 , 1.00×10^1 , 1.00×10^0 , 1.00×10^{-1} , 1.00×10^{-2} , 1.00×10^{-3} in $1.00 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$.

d) Priprava raztopin za celostni test

- Priprava raztopine metoksiklora: Z redčenjem v 100 % DMSO smo najprej pripravili raztopino s koncentracijo 10 mg/mL. 94 μL te raztopine smo nato prenesli k 2.906 mL 100 % DMSO. 10 μL te raztopine (s koncentracijo 313 $\mu\text{g/mL}$) smo prenesli k 990 μL medija DMEM+. Dobili smo testno raztopino s koncentracijo 3.13 $\mu\text{g/mL}$.
- Priprava raztopin referenčnega standarda E_2 : Osnovno pripravljeno raztopino E_2 s koncentracijo $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ smo desetkrat zapored redčili s 100 % DMSO, v 200 μL

mikroeppruvetah, v razmerju 1 : 2. V enajst 1.5 mL epruvet smo odpipetirali 990 μ L medija DMEM+, ki smo mu dodali po 10 μ L osnovne raztopine in deset predhodno redčenih raztopin. Dobili smo raztopine s koncentracijami: 1.00×10^{-4} , 5.00×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 6.25×10^{-6} , 3.13×10^{-6} , 1.56×10^{-6} , 7.83×10^{-7} , 3.92×10^{-7} , 1.95×10^{-7} in 9.78×10^{-8} μ g/mL.

- Priprava testnih raztopin spojine BADGE: Na podlagi testa iskanja območij koncentracij smo določili redčitveni režim v razmerju 1 : 5. Izhodno raztopino BADGE, s koncentracijo 10 mg/mL, smo redčili v 100 % DMSO, v razmerju 1 : 5, desetkrat zapored. V enajst 1.5 mL epruvet smo predhodno odpipetirali 800 μ L medija DMEM+ in vanje dodali 8 μ L vsebine iz izhodne raztopine in predhodno redčenih raztopin v DMSO. Dobili smo raztopine s koncentracijami: 1.00×10^2 , 2.00×10^1 , 4.00×10^0 , 8.00×10^{-1} , 1.60×10^{-1} , 3.20×10^{-2} , 6.40×10^{-3} , 1.28×10^{-3} , 2.56×10^{-4} , 5.12×10^{-5} in 1.02×10^{-5} μ g/mL.

e) Tretiranje celic

Celice na mikrotiterski plošči smo po 24 urni inkubaciji v mediju vzeli iz inkubatorja in jih pregledali pod mikroskopom. Pri pregledu smo bili pozorni predvsem na enakomerno preraščenost celic v vdolbinici. Preden smo k celicam dodali pripravljene raztopine, smo z reverznim pipetiranjem odstranili medij in pri tem pazili, da celic nismo poškodovali. Za test iskanja območja smo na mikrotitersko ploščo, v duplikatih, nanegli 4 pripravljene koncentracije referenčnega standarda E_2 in 7 koncentracij testne spojine. Kontrolo 1 % DMSO v mediju smo nanegli v štiri vdolbinice. Pri celostnem testu smo v vdolbinice nanegli 11 različnih koncentracij E_2 , v duplikatih, in 11 koncentracij BADGE v triplicatih. Kontrolo z 1 % DMSO v mediju smo nanegli v štiri vdolbinice, prav tako smo nanegli v štiri vdolbinice tudi pozitivno kontrolo metoksiklor s koncentracijo 3.13 μ g/mL. Pri obeh testih smo ploščo s tretiranimi celicami postavili v inkubator s standardnimi pogoji za 24 ur. V tem času je prišlo do maksimalne indukcije encima luciferaze.

f) Vizualna ocena živosti celic

Po 24 urni inkubaciji celic z raztopinami, smo mikrotitersko ploščo vzeli iz inkubatorja. Iz vdolbinic smo z reverznim pipetiranjem odstranili raztopine in vdolbinice dodatno sprali z 1x DPBS. Z invertnim svetlobnim mikroskopom smo naredili vizualni pregled celic in ocenili njihovo živost. Živost celic smo ovrednotili z ocenami od 1 do 4 ter z oznako P.

Ocena s številko **1** opisuje celice z normalno celično morfologijo in gostoto (vsaj 80 %). Pod oceno **2** smo uvrstili celice z spremenjeno celično morfologijo in malo zmanjšano gostoto (60-80 %), medtem ko smo pod oceno **3** uvrstili celice s spremenjeno morfologijo in zelo zmanjšano gostoto (40-60 %). Pri oceni s številko **4** celic skoraj ni, ali pa jih je zelo malo. Oznaka **P** pa opisuje prisotnost precipitativ med celicami.

Pri pregledu celic tretiranih z raztopinami spojine BADGE, smo ugotovili, da ima koncentracija $1.00 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ toksične učinke na celice, zato smo živost celic pri tej koncentraciji ocenili s 4. Citotoksičnost te koncentracije smo dokazali tudi pri MTS testu. Pri ostalih koncentracijah nismo zaznali spremenjene morfologije celic, zmanjšane gostote ali prisotnosti precipitativ.

g) Liza celic

Pred začetkom testa smo na spodnjo stran mikrotiterske plošče nalepili belo nalepko, katere vloga je bila povečanje učinkovitosti luminometra. Za lizo celic smo v vsako vdolbinico dodali 50 μL pripravljene 1x lizirne raztopine in nato nežno, s kroženjem, mikrotitersko ploščo stresali približno 1 minuto. S tem smo celice pripravili na merjenje luminescence.

h) Merjenje luminescence

Luminescenco smo merili v območju od 300 do 650 nm z uporabo injekcijskega luminometra in programske opreme, s katero smo nadzorovali injekcijski volumen in merilni interval. Pred pričetkom nanosa reagenta smo v prostoru ugasnili luči, zaradi svetlobne občutljivosti reagenta. V vsako vdolbinico smo nanесли 50 μL luciferaznega reagenta, nato pa smo ploščo položili v luminometer. Luminescenco smo merili pri času stresanja 5 sekund, intervalnem času 1 sekunde in občutljivosti 180.

Emitirano svetlobo smo podali v RLU za posamezno vdolbinico. Podatke iz luminometra smo nato prenesli v Excel-ovo predlogo, kjer smo jih ustrezno obdelali. Luminescenco ozadja (povprečne RLU vrednosti DMSO kontrole) smo odšteli od ostalih vdolbinic z referenčnim standardom, pozitivno kontrolo in raztopinami s preučevano spojino. Najvišje RLU vrednosti referenčnega standarda E_2 smo prilagodili in normalizirali na 10,000 RLU, čemur smo nato prilagodili še odzive ostalih raztopin.

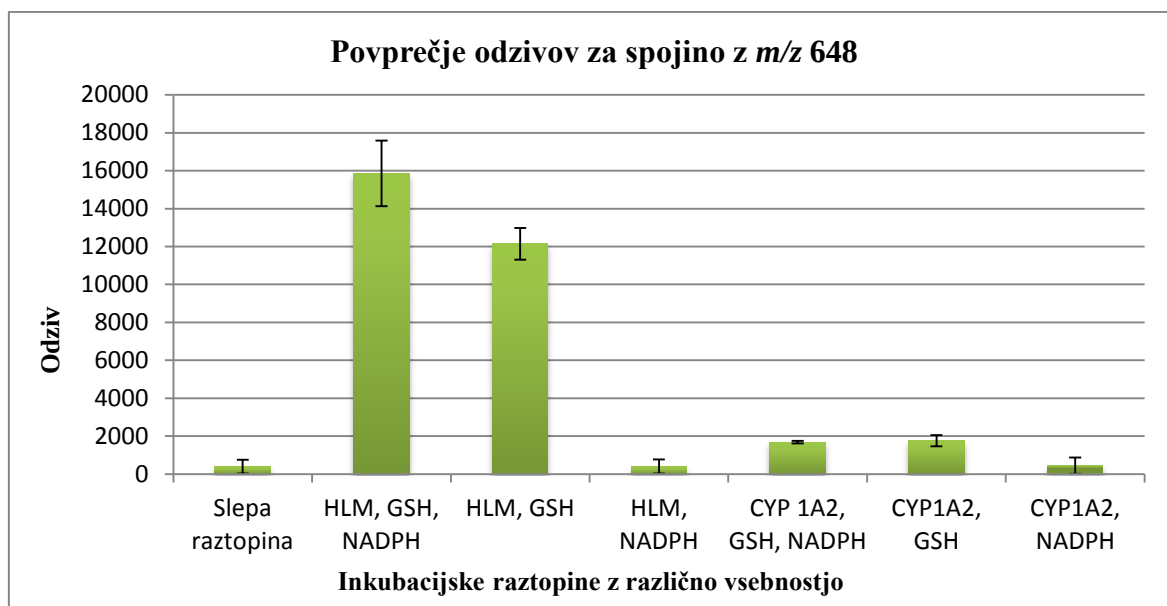
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 *IN VITRO* PREUČEVANJE METABOLIZMA IN NASTANKA REAKTIVNIH METABOLITOV

4.1.1 Inkubacija s humanimi jetrnimi mikrosomi

Med razvojem LC-MS/MS metode za detekcijo BADGE in konjugatov z GSH smo uporabili različne separacijske kolone (Kinetex 50 x 2.1 mm, Phenomenex; Kinetex 30 x 2.1 mm, Phenomenex; Hilic kolona, Phenomenex; Phenyl Hexyl 50 x 3 mm, Phenomenex; in Kinetex Pentafluorophenyl kolona, Phenomenex), mobilne faze (0.1 % formična kislina (A) in MeOH (B); 15 mM amonijev acetat (A) in MeOH (B); 15 mM amonijev acetat (A) in 98 % acetonitril (B); 0.1 % formična kislina (A) in 98 % acetonitril (B); 15 mM amonijev acetat (A) in MeOH(B)) in različne načine ionizacije (pozitiven in negativen ESI- ang. electrospray ionization). Najboljšo ločbo smo dosegli s kolono Phenyl Hexyl 50 x 3 mm in mobilno fazo sestavljeno iz 15 mM amonijevega acetata (A) in MeOH (B). Za ionizacije smo uporabili negativni način, kjer je prišlo do nastanka anionov in tipičnega fragmenta GSH, m/z 272. Spojine BADGE nam ni uspelo detektirati, najverjetneje zaradi slabe ionizacije, saj spojina v strukturi nima ionizirajočih skupin (glej Slika 4). Ob iskanju prekursorskih ionov fragmenta m/z 272 smo zaznali nastanek dveh $[M-H]^-$ ionov, m/z 648 in m/z 610.7. Spojina z m/z 648 predstavlja konjugat spojine BADGE z GSH, z obema odprtima epoksidnima obročema ter molsko maso 649 g/mol. Druge spojine, z m/z 610.7, nam ni upelo popolnoma pojasniti, vendar gre najverjetneje za GSH dimer, z molsko maso 612 g/mol. Ob inkubaciji spojine z različnimi rekombinantnimi CYP450 izoencimi, smo ugotovili, da v primerjavi s slepim vzorcem (fosfatni pufer), posamezni izoencimi ne daje bistveno višjih odzivov (glej 4.1.2), kar nakazuje, da te encimi ne katalizirajo nastanka detektiranih konjugatov z GSH. Vendar, ker smo v inkubacijskih raztopinah z mikrosomi hoteli imeti primerjalni *in vitro* sistem, smo zato naključno izbrali izoencim CYP1A2. Slepо raztopino je predstavljal fosfatni pufer. Naredili smo dve neodvisni paraleli, ki sta nam podali med seboj primerljive rezultate. Na spodnjih slikah (Slika 11 in Slika 13) so prikazana povprečja odzivov obeh ponovitev za obe spojini.

a) Spremljanje nastanka spojine z m/z 648



Slika 11. Rezultati detekcije spojine z m/z 648 v različnih inkubacijskih raztopinah. Vrednosti so predstavljene v obliki povprečja $\pm$ SD odzivov, posnetih z LC-MS/MS metodo v negativni ionizaciji.

Na Sliki 11 vidimo bistveno večji odziv v raztopinah, kjer smo kot *in vitro* model uporabili mikrosome. Največji odzivi so bili detektirani v raztopinah, kjer smo BADGE inkubirali skupaj s HLM, GSH in NADPH. Njihova povprečna vrednost je znašala 15858. Do nekoliko nižjih odzivov (v povprečju 12151) pa je prišlo v raztopinah brez dodanega NADPH. V raztopinah s primerjalnim *in vitro* modelom, izoencimom CYP1A2, pa so bili odzivi vseh raztopin bistveno manjši. Pri CYP1A2 velikih razlik, v raztopinah z dodanim kofaktorjem NADPH, v primerjavi z raztopinami brez dodanega NADPH, ni bilo opaziti. Povprečna vrednost odzivov v raztopinah s kofaktorjem NADPH je tako znašala 1683, v raztopinah brez kofaktorja pa je bil povprečen odziv 1760. Pri raztopinah obeh *in vitro* testnih modelov, mikrosomov in izoencima CYP1A2, kjer GSH eksogeno nismo dodali, je bil odziv nizek. Pri mikrosomih je bilo povprečje odzivov tako le 396, pri izoencimu CYP1A2 pa 444.

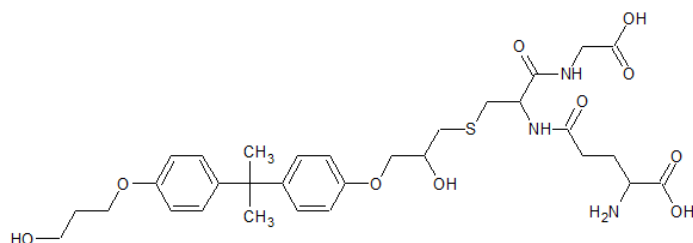
Na podlagi zgornjih rezultatov, prikazanih na Sliki 11, sklepamo da je nastanek spojine z m/z 648 posledica encimsko katalizirane reakcije. Na encimsko katalizo kaže predvsem velika razlika v odzivih med obema *in vitro* testnima modeloma, saj je bil odziv v raztopinah z mikrosomi bistveno višji, kot v inkubacijskih raztopinah z rekombinantnim izoencimom CYP1A2. Encima z najpomembnejšo vlogo pri metabolični pretvorbi spojine,

nam ni uspelo določiti, saj mikrosomi vsebujejo širok nabor encimov, tako prve kot tudi druge faze (41). Z inkubacijo spojine BADGE ob prisotnosti različnih rekombinantnih CYP450 izoencimov (glej 4.1.2), pa smo dokazali, da nobeden izmed testiranih izoencimov, nima bistvene vloge pri tvorbi detektirane spojine.

Prav tako lahko zaključimo, da je nastala spojina produkt reakcije med spojino BADGE in eksogeno dodanim GSH, saj so odzivi v raztopinah brez dodanega GSH bistveno nižji od odzivov raztopin z dodanim GSH.

Poleg zgoraj omenjenih razlogov pa encimski nastanek spojine z m/z 648 nakazuje tudi primerjava odzivov zgornjih rezultatov, prikazanih na Sliki 11, in rezultatov na Sliki 15, kjer smo spremljali časovno reaktivnost same spojine BADGE z GSH (glej 4.1.3), v odsotnosti encimov. V inkubacijskih raztopinah z mikrosomi je po samo 1 urni inkubaciji nastalo kar desetkrat več spojine, kot po 20 urni inkubaciji brez prisotnosti encimov.

Na podlagi molske mase spojine (649 g/mol), ki ji ustreza molekulska formula spojine z monohidroksilnima skupinama na epoksidnih mestih, konjugirana z molekulo GSH (Slika 12), sklepamo da je najverjetneje potekla redukcija obeh epoksidnih obročev. To podpira tudi dejstvo, da je več konjugata nastalo v raztopinah z dodanim kofaktorjem encimov NADPH, ki ima reducirajoče lastnosti (12). Vendar nam točnega mehanizma te pretvorbe ni uspelo razjasniti.

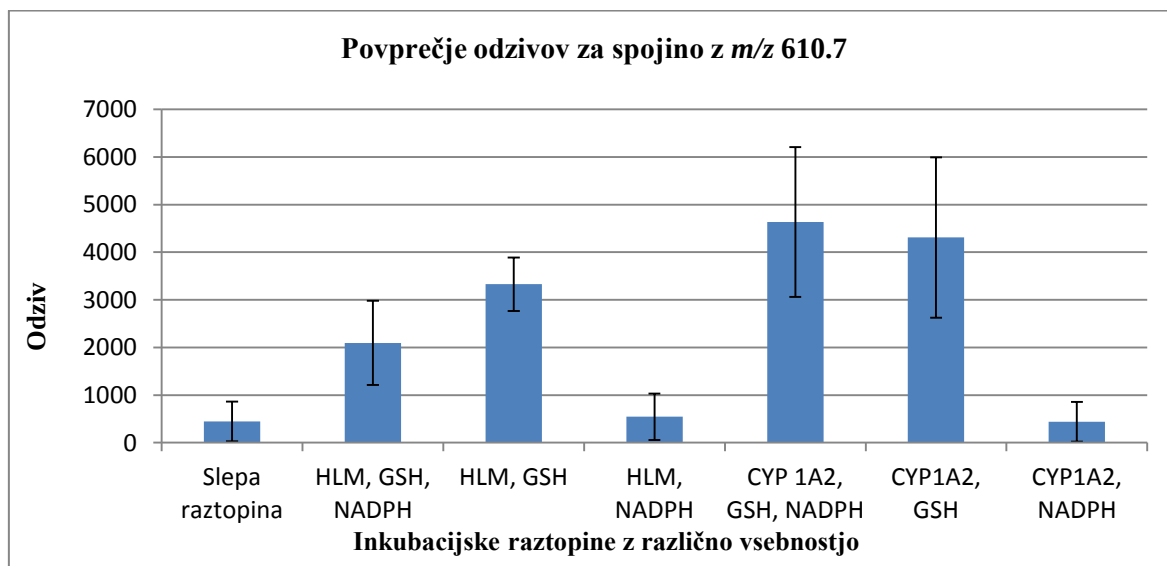


Slika 12. Strukturna formula spojine z m/z 648 in molsko maso 649 g/mol.

Potek *in vitro* redukcije, ob prisotnosti različnih sesalskih celic so dokazali tudi v študiji, ki so jo izvedli Fleck in sodelavci. V študiji so namreč raziskovali metabolizem spojine alterotoksina II, ki se nahaja v glivah rodu *Alternia*. Spojina v strukturi vsebuje epoksidno skupino, za katero so dokazali, da se ob prisotnosti različnih sesalskih celic, Caco-2 (celice človeškega kolorektalnega adenokarcinoma), HCT-116 (celice človeškega raka debelega črevesa), HepG2 (celice človeškega jetrnega karcinoma) in V79 (fibroblasti pljuč

kitajskega hrčka), lahko reducira do monohidroksilne skupine. Točnega molekularnega mehanizma te redukcijske pretvorbe pa jim tudi v študiji ni uspelo razrešiti (54).

b) Spremljanje nastanka spojine z m/z 610.7

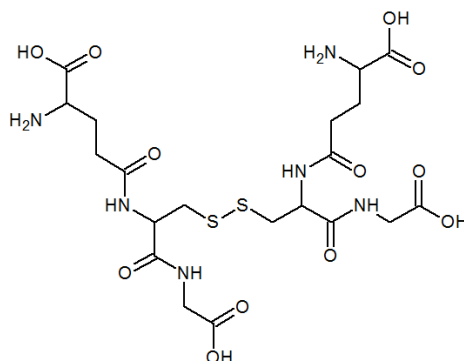


Slika 13. Rezultati detekcije spojine z m/z 610.7 v različnih inkubacijskih raztopinah. Vrednosti so predstavljene v obliki povprečja $\pm$ SD odzivov, posnetih z LC-MS/MS metodo v negativni ionizaciji.

Na Sliki 13, ki prikazuje odzive spojine z m/z 610.7, v različnih inkubacijskih raztopinah, lahko vidimo, da je prišlo do višjih odzivov ob prisotnosti rekombinantnega izoencima CYP1A2. Najvišji odziv so dale raztopine z vsemi reagenti in je v povprečju znašal 4636. Zelo podoben odziv smo dobili tudi v raztopini brez dodanega NADPH, kjer je bil povprečen odziv 4310. Raztopine z mikrosomi so dale v primerjavi s CYP1A2 raztopinami nekoliko nižje odzive. Na Sliki 13 lahko vidimo, da je več spojine nastalo v mikrosomskih raztopinah brez NADPH, kjer je bil povprečen odziv 3329, v primerjavi z raztopino z vsemi reagenti, kjer je bil odziv v povprečju 2095.

Iz rezultatov na Sliki 13 lahko sklepamo, da je spojina z m/z 610.7, posledica reakcije, ki ni vodena encimsko. Točne strukture te spojine nam ni uspelo dokončno razjasniti, vendar rezultati nakazujejo, da bi lahko šlo za GSH dimer. Molska masa dimera GSH namreč znaša 612 g/mol, ki ustreza $[M-H]^-$ ionu z m/z 611 (55). Z zaokrožitvijo m/z 610.7 na m/z 611 ter upoštevanjem morebitne masne napake LC-MS/MS metode, pa bi lahko prišli do zaključka, da je detektirana spojina dimer dveh molekul GSH (Slika 14). Za GSH dimer je

bilo namreč že ugotovljeno, da lahko v *in vitro* pogojih spontano nastane (55), kar smo dokazali tudi mi pri spremljanju reaktivnosti spojine BADGE z GSH (Slika 16), v odsotnosti encimov. Poleg tega je več konjugata nastalo v raztopinah, kjer se je manj GSH porabilo za tvorbo konjugata z m/z 648, in ga je bilo tako več na voljo za domnevno dimerizacijo.



Slika 14. Strukturna formula spojine z m/z 610.7 in z molsko maso 612 g/mol.

Vendar kljub temu, da rezultati in dosedanje ugotovitve v raziskavah (55) nakazujejo, da gre za dimer GSH, vseeno za dokončno potrditev priporočamo nadaljne analize. Inkubacije bi tako morali izvesti pri višjih volumnih, kar nam bi omogočilo lažjo izolacijo in kemijske analize za potrditev strukture.

Metabolizem spojine BADGE še danes velja za precej neraziskano področje, saj je bila do sedaj opravljena zgolj ena podrobna študija na to temo. Leta 1981 je Climie s sodelavci preučeval metabolizem [^{14}C]BADGE na miših, kjer so ugotovili, da je glavna pot metabolizma hidroliza, ki vodi do nastanka bis-diola. Le-ta lahko poteče tako encimsko z epoksidno hidrolazo kot tudi neencimsko, z nadaljno dealkilacijo do gliceraldehida. Poleg tega je bila ugotovljena tudi direktna oksidacija do mutagenega glicidaldehida (33, 34). O prisotnosti hidroliziranih derivatov BADGE v urinu, pa so poročali tudi v raziskavi, ki so jo izvedli Wang in sodelavci (36).

Pri naši študiji smo med razvojem metode opazili povečan nastanek dveh spojin, spojine z m/z 648 ter spojine z m/z 610.7. Strukturo prve nam je uspelo pojasniti in gre za konjugat spojine BADGE z GSH, z monohidroksilnima skupinama na epoksidnih mestih. Nastanek spojine je bil v večjem obsegu najverjetneje posledica encimske katalize, natančneje encimske redukcije, vendar nam točnega mehanizma poteka redukcije ni uspelo razrešiti. Za drugo spojino (m/z 610.7), pa smo sklenili, da gre najverjetneje za GSH dimer, ki je

posledica neencimske reakcije in poteka spontano. Za dokončno potrditev te domneve pa priporočamo nadaljne kemijske analize.

4.1.2 Inkubacija z rekombinantnimi CYP450 izoencimi

Glavna skupina encimov, ki sodelujejo pri nastanku reaktivnih metabolitov, so CYP450 encimi (6). Spojino BADGE smo inkubirali s šestimi najpogostejšimi predstavniki, s čimer smo hoteli ugotoviti najpomembnejši izoecim v metabolizmu spojine BADGE. V Preglednici VII so prikazani uporabljeni encimi in odzivi za spojini z m/z 648 in m/z 610.7 v različnih inkubacijskih raztopinah.

Preglednica VII. Odzivi spojin z m/z 648 in m/z 610.7, posnetih z metodo LC-MS/MS, po inkubaciji z različnimi rekombinantnimi CYP izoencimi.

<i>In vitro</i> testni model	Vsebina v mikroepreveti*	Spojina z m/z 648 [odziv]	Spojina z m/z 610.7 [odziv]
	Slepa raztopina (fosfatni pufer)	76	293
CYP2C19	Vse	42	12413
	Brez NADPH	92	13538
	Brez GSH	46	35
CYP1A2	Vse	784	10134
	Brez NADPH	907	10508
	Brez GSH	41	34
CYP3A4	Vse	45	13223
	Brez NADPH	121	14549
	Brez GSH	18	151
CYP2E1	Vse	61	10437
	Brez NADPH	100	12872
	Brez GSH	41	189
CYP2C9	Vse	24	13300
	Brez NADPH	59	14053
	Brez GSH	10	88
CYP2C8	Vse	7	14057
	Brez NADPH	25	14987
	Brez GSH	61	35

*Mikroepreveta z oznako VSE je vsebovala fosfatni pufer, BADGE, encime, GSH in NADPH, v ustreznih koncentracijah. Mikroepreveta Brez NADPH je vsebovala vse zgoraj naštetе reagente, razen NADPH. Mikroepreveta Brez GSH je vsebovala vse zgoraj naštetе reagente, razen GSH.

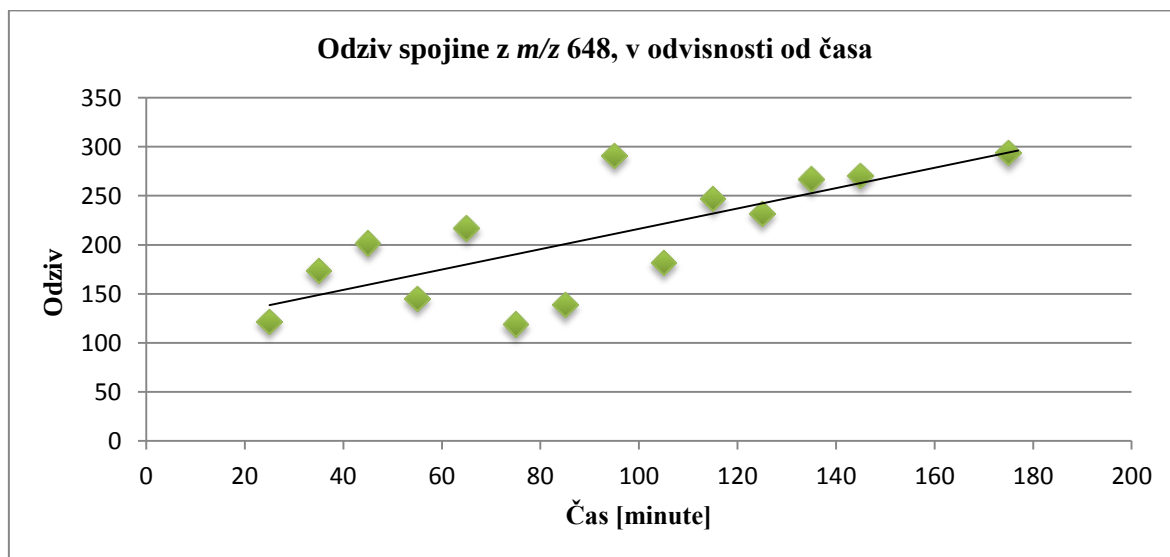
Ob pregledu rezultatov za spojino z m/z 648 vidimo, da glede na slepi vzorec (fosfatni pufer) v nobeni raztopini izoencimov ni prišlo do bistveno povišanega odziva. To kaže na potek reakcije, ki je ne katalizira nobeden izmed testiranih CYP450 izoencimov.

Odzivi spojine z m/z 610.7 so bili sicer bistveno višji v primerjavi z m/z 648, vendar pa se med seboj niso veliko razlikovali. Zato smo tukaj zaključili, da je spojina posledica neencimske reakcije. Do enakih zaključkov smo prišli tudi v inkubacijskih raztopinah z mikrosomi (glej 4.1.1) ter pri spremljanju časovne neencimske reaktivnosti spojine BADGE z GSH (glej 4.1.3). Na podlagi rezultatov smo sklenili, da spojino najverjetneje predstavlja GSH dimer, z molsko maso 612 g/mol.

4.1.3 Časovno spremljanje reaktivnosti spojine BADGE z GSH

V spojini BADGE se nahajata dva epoksidna obroča, ki veljata za zelo reaktivna strukturna fragmenta. Zato smo se odločili za neencimsko spremljanje reaktivnosti spojine, ob prisotnosti GSH in v odvisnosti od časa. Ker zaradi slabe ionizacije nismo uspeli detektirati BADGE z LC-MS/MS metodo, smo tudi tokrat spremljali nastanek spojin z m/z 648 in m/z 610.7.

Ker so se začetni pogoji detekcije izkazali za neustrezne, saj je bil zaznan zelo slab odziv, smo po 25 minutah povečali injekcijski volumen iz 1 μL na 5 μL , ter delta EMV na 200 V. Rezultate časovnega spremljanja reaktivnosti spojine BADGE smo podali z odzivi, prikazanih na Sliki 15 in Sliki 16, od 25 minute naprej.

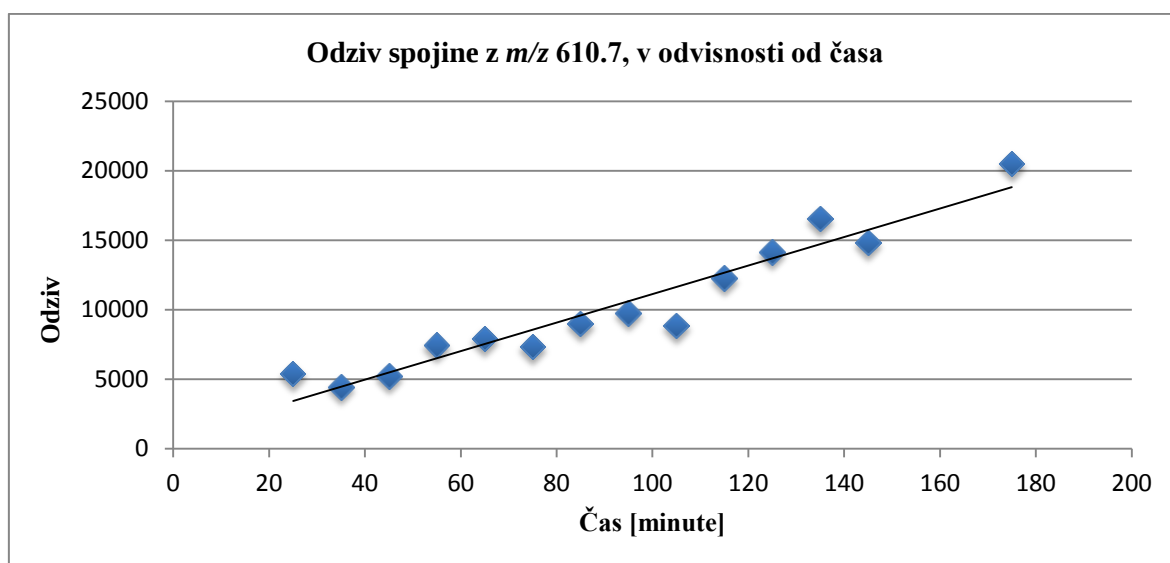


Slika 15. Odziv spojine z m/z 648, v odvisnosti od časa, pri 120 minutnem spremljanju reaktivnosti BADGE ob prisotnosti GSH.

Na Sliki 15 vidimo, da je pri spremljanju odzivov spojine z m/z 648 sprva vidno nihanje odzivov v območju od 100 do 300. Na prvi pogled je delovalo, kot da reakcija ne poteka,

zato smo se odločili vzorec pomeriti še naslednji dan, po približno 20 urni inkubaciji v LC-MS/MS aparaturi. Takrat smo zaznali nekoliko višji odziv, ki je znašal 1227.

Iz rezultatov lahko povzamemo, da ima kemijska reaktivnost spojine BADGE, pri nastanku opazovane spojine, majhen pomen. Dobljeni odzivi so bili tudi po 20 urni inkubaciji še vedno 10x nižji, v primerjavi z odzivi raztopin, ki smo jih inkubirali 1 uro ob prisotnosti mikrosomov.



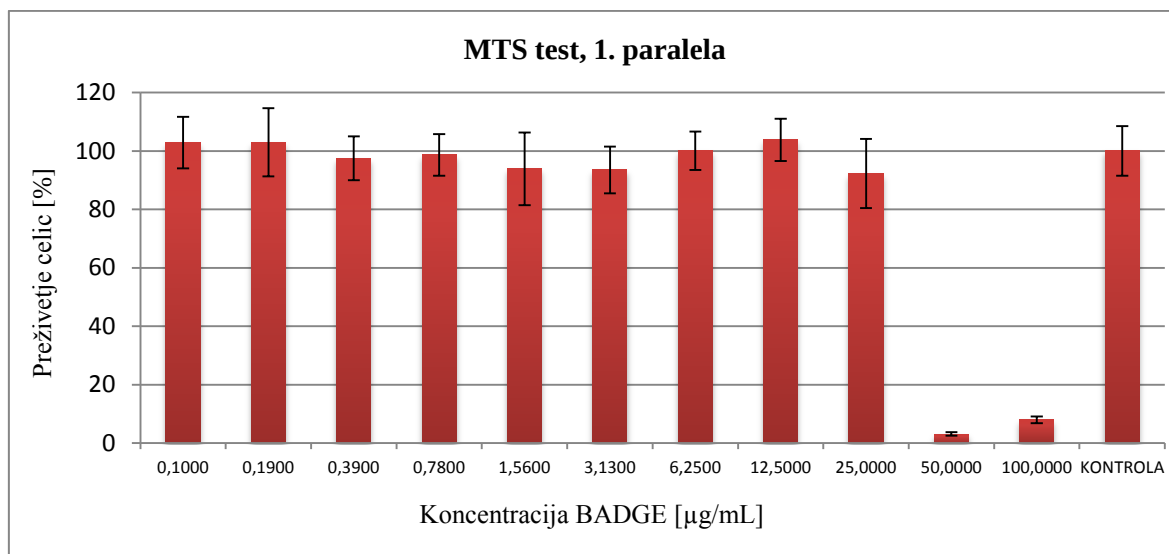
Slika 16. Odziv fragment m/z 610.7, v odvisnosti od časa, pri 120 minutnem spremljanju reaktivnosti BADGE ob prisotnosti GSH.

Na Sliki 16 vidimo počasno naraščanje odzivov spojine z m/z 610.7 skozi čas. Že od samega začetka vidimo veliko višje odzive, v primerjavi z m/z 648, kar lahko pomeni, da reakcija sprva poteče izredno hitro, nato pa se upočasni. Po 20 urah inkubacije se je odziv še povečal in je znašal 37707.

Že na podlagi odzivov, pridobljenih v inkubacijskih raztopinah z mikrosomi in različnimi rekombinantnimi CYP450 encimi, smo sklepali na neencimski izvor spojine, ki najverjetneje predstavlja dimer GSH. S spremljanjem neencimske časovne reaktivnosti spojine, pa smo še dodatno potrdili našo domnevo, saj smo z visokimi odzivi dokazali obsežen neencimski nastanek te spojine.

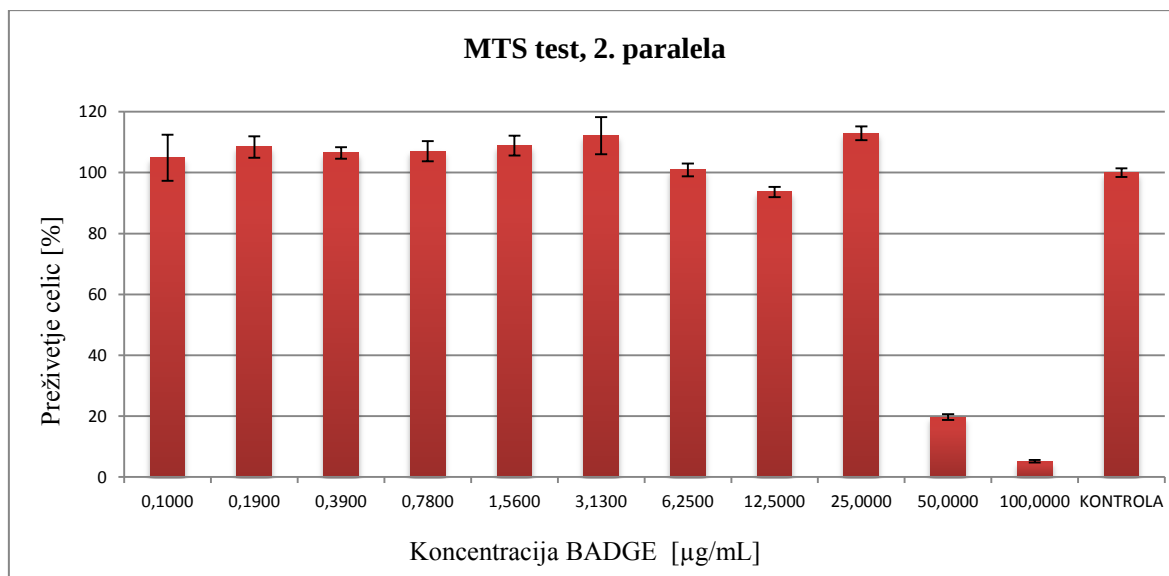
4.2 REZULTATI MTS TESTA Z RAZPRAVO

Citotoksičen učinek spojine BADGE smo na celični liniji BG1Luc4E₂ določali z MTS testom. Test smo izvedli v dveh neodvisnih paralelah (Slika 17 in Slika 18), kjer smo celice na mikrotitrski plošči izpostavili 11 različnim koncentracijam BADGE. Testne koncentracije so prikazane v Preglednici II. Za kontrolo in slepi vzorec smo uporabili DMEM+ medij z 1 % DMSO.



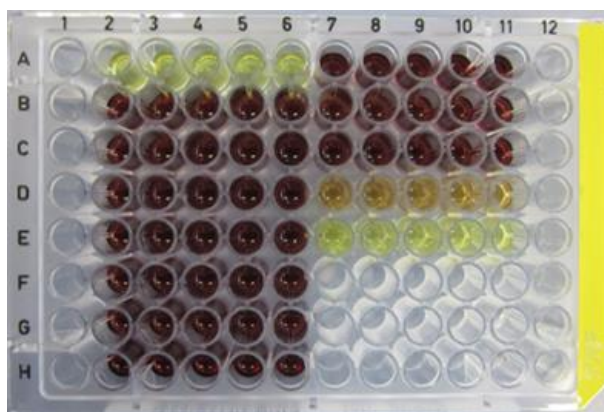
Slika 17. Rezultati 1. paralele MTS testa po 24-urni inkubaciji 10. pasaže BG1Luc4E₂ celične linije skupaj z 11 različnimi koncentracijami BADGE v primerjavi s kontrolo. Vrednosti predstavljajo povprečje ± SD preživetja celic, podano v odstotkih.

Iz rezultatov 1. paralele MTS testa (Slika 17) lahko vidimo, da je bilo preživetje celic v primerjavi s kontrolo, pri koncentracijah 50 µg/mL in 100 µg/mL bistveno znižano. Preživetje celic pri 50 µg/mL je znašalo 3.1 %, pri 100 µg/mL pa 8%. Pri vseh ostalih koncentracijah (0.1, 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 in 25 µg/mL) je bilo preživetje nad 80 % in se je gibalo okoli 100 %. Pri koncentracijah 0.1 µg/mL (102.9 %), 0.19 µg/mL (103 %) in 12.5 µg/mL (103.8 %) je bilo preživetje celo višje kot 100 %, kar je posledica dodatne proliferacije celic. Iz podatkov prve paralele MTS testa sklepamo na citotoksičnost raztopin s koncentracijama 50 µg/mL in 100 µg/mL.



Slika 18. Rezultati 2. paralele MTS testa po 24-urni inkubaciji 18. pasaže BG1Luc4E₂ celične linije skupaj z 11 različnimi koncentracijami raztopin BADGE. Vrednosti predstavljajo povprečje ± SD preživetja celic, podano v odstotkih.

Tudi na podlagi rezultatov 2. paralele MTS testa (Slika 18) vidimo da je prišlo do citotoksičnega učinka (manj kot 80 % preživetje) le pri koncentracijah 50 µg/mL in 100 µg/mL. Preživetje pri 50 µg/mL je bilo 19.7 %, pri 100 µg/mL pa zgolj 5.2 %. Tudi pri tej paraleli je bil pri nekaterih koncentracijah odstotek preživetja večji od 100 %: 0.1 µg/mL (104.9 %), 0.19 µg/mL (108.4 %), 0.39 µg/mL (106.5 %), 0.78 µg/mL (107.7 %), 1.56 µg/mL (109.8 %), 3.13 µg/mL (113.3 %), 6.25 µg/mL (100.9 %) in 25 µg/mL (112.9 %). To lahko ponovno pripišemo dodatni proliferaciji celic. Torej lahko tudi iz druge ponovitve MTS testa koncentraciji 50 µg/mL in 100 µg/mL ovrednotimo za citotoksični.



Slika 19. Obarvana mikrotiterska plošča po izvedbi MTS testa s koncentracijsko različnimi raztopinami BADGE. Na sliki je prikazana plošča 2. paralele, izvedena na 18. pasaži BG1Luc4E₂ celične linije. V prvih 5 vdolbinicah vrstice A je bil nanešen slepi vzorec, v vrstici B pa kontrola. Nato sledijo raztopine različnih koncentracij, od najmanjše proti najvišji.

Tudi na podlagi Slike 19, posnete po dve urni inkubaciji z MTS reagentom lahko jasno ločimo citotoksične in necitotoksične koncentracije. Do nastanka vijolično obarvanega formazana ni prišlo pri slepem vzorcu ter pri koncentracijah 50 in 100 $\mu\text{g/mL}$. Pri slepem vzorcu ni prišlo do obarvanja, saj ni bilo prisotnih celic, ki bi z oksidativnim metabolizmom povzročile nastanek formazana. Pri koncentracijah 50 in 100 $\mu\text{g/mL}$ pa je bilo preživetje celic premajhno, da bi lahko vizualno zaznali njegov nastanek.

Pri testu LUMI CELL[®]ER lahko upoštevamo le koncentracije spojin, ki ne izkazujejo citotoksičnega potenciala. Zato smo le-to preverili z MTS testom, kasneje pa še z vizualno oceno živosti celic. Pri obeh paralelah smo pri nekaterih koncentracijah opazili proliferacijo celic, zato je bila tam viabilnost celic celo višja od kontrole, ki jo je predstavljal 1 % DMSO v DMEM+ mediju. Za citotoksično je veljala koncentracija, ki je povzročila preživetje celic nižje od 80 % v primerjavi s kontrolo. V obeh paralelah smo ugotovili, da sta to raztopini s koncentracijo 50 $\mu\text{g/mL}$ (150 μM) in 100 $\mu\text{g/mL}$ (300 μM). Pri koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ je pri prvi paraleli viabilnost znašala zgolj 3.1 %, pri drugi pa 19.7 %. Pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ je bila živost celic pri prvi paraleli 8 % in 5.2 % pri drugi. Vse ostale koncentracije so izkazovale živost celic veliko višjo od 80 % zato jih nismo ovrednotili za citotoksične.

Rezultati MTS testa so se ujemali tudi z vizualno oceno živosti celic, ki smo jo izvedli med testom LUMI CELL[®]ER. Pri vizualni oceni živosti celic smo z oceno 4 ocenili le koncentracijo 100 $\mu\text{g/mL}$, kar pomeni, da v vdolbinici skoraj ni bilo celic. Ostale koncentracije niso izkazovale sprememb v celični morfologiji ali njihovi gostoti, zato smo jih ocenili z oceno 1. Na podlagi rezultatov MTS testa in vizualne ocene živosti celic, pri LUMI CELL[®]ER testu nismo upoštevali le koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$.

Da lahko BADGE povzroči celično smrt pri višjih koncentracijah, na različnih celičnih linijah (npr.: ECV304 celice - humana celična linija epitelija), so poročali že v nekaterih študijah (39, 40). V študiji, ki so jo izvedli Ramilo in sodelavci, so preučevali citotoksične učinke BADGE (1 μM in 200 μM) na Caco-2 celični liniji (humana rakava kolorektalna celična linija). Raztopina BADGE, s koncentracijo 200 μM , je po 24 urni inkubaciji s celicami, povzročila približno 80 % odcepitev od podlage in spremembo njihove morfologije. Vpliv na proliferacijo celic je bil časovno in koncentracijsko odvisen.

Raztopina s koncentracijo 200 μM je povzročila inhibicijo proliferacijo že po 6 urah skupne inkubacije. Pri koncentraciji 1 μM učinkov na celični kulturi ni bilo (56).

Kot smo že omenili, se BADGE lahko sprošča iz notranjih premazov pločevink v hrano. Vendar, ali lahko to resnično pripelje do *in vivo* toksičnosti, ne vemo, saj do sedaj še ni bilo narejenih študij, ki bi merile plazemsko oziroma krvno koncentracijo spojine BADGE pri ljudeh ali živalih. Na podlagi študije, ki so jo naredili Wang in sodelavci, kjer so ocenili dnevni vnos spojine BADGE za prebivalce ZDA, pa je to le malo verjetno, saj so ocenjene zaužite doze (69.4 – 9.14 ng/kg telesne teže) (36), bistveno nižje od dokazanih citotoksičnih koncentracij (50 in 100 $\mu\text{g/mL}$) v MTS testu. Kljub vsemu pa škodljivih učinkov ne moremo povsem izključiti brez trdnih *in vivo* dokazov.

4.3 DOLOČANJE ESTROGENE AKTIVNOSTI

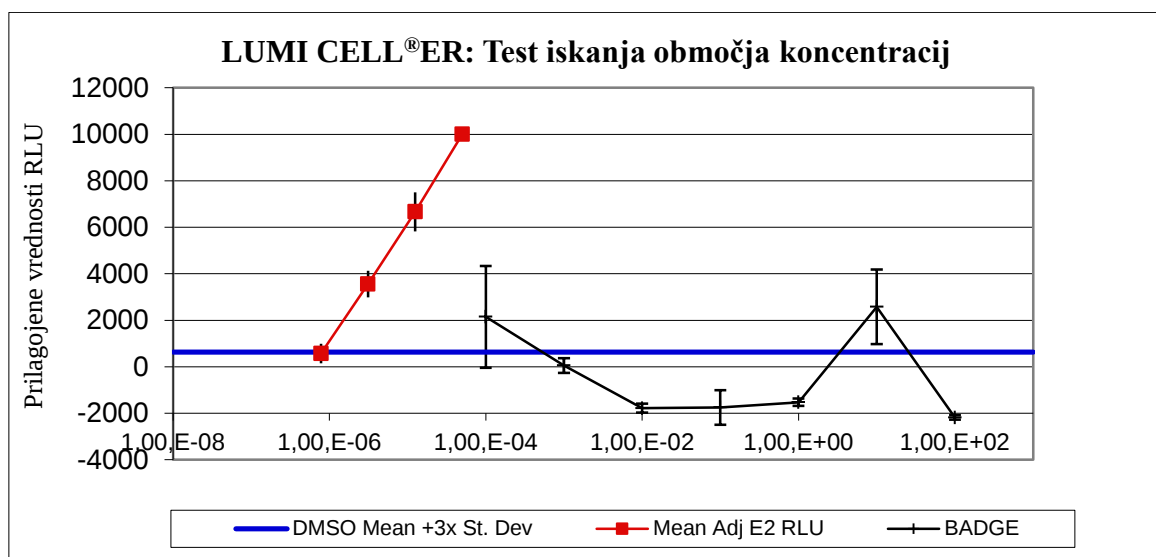
4.3.1 Rezultati LUMI CELL[®]ER

Estrogeno aktivnost spojine BADGE smo testirali na humani celični liniji raka jajčnika, BG1Luc4E₂. Te celice imajo vgrajen reporterski plazmid pGudLuc7.ere, na katerem se nahaja gen (*luc*) za protein luciferazo, ki ga ob dodatku ustreznega substrata detektiramo z luminometrom. Testna metoda LUMI CELL[®]ER je sestavljena iz dveh testov. Prvi je test iskanja območja koncentracij, s katerim smo določili začetno koncentracijo in redčitveni režim, drugi pa je celostni test, s katerim smo ovrednotili agonistično aktivnost BADGE na ER.

a) Test iskanja območja koncentracij

S testom iskanja območij koncentracij (Slika 20) smo določili najvišjo začetno koncentracijo in redčitveni režim (razmerje 1 : 2 ali 1 : 5), ki smo ju upoštevali pri celostnem testu. S tem smo zagotovili, da smo pri testiranju agonistične aktivnosti na ER zajeli ustrezno koncentracijsko območje in vse odzive spojine. Pri testu smo celice tretirali s 7 različnimi koncentracijami spojine BADGE, redčenih v razmerju 1 : 10 (1.00×10^{-4} , 1.00×10^{-3} , 1.00×10^{-2} , 1.00×10^{-1} , 1.00×10^0 , 1.00×10^1 in $1.00 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$), 4 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E₂ (5.00×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 3.13×10^{-6} in $7.83 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) in kontrolo podlage (1% DMSO v mediju). Najvišjo izmerjeno

vrednost referenčnega standarda E₂, smo normalizirali na 10,000 RLU, čemur smo potem prilagodili ostale rezultate.



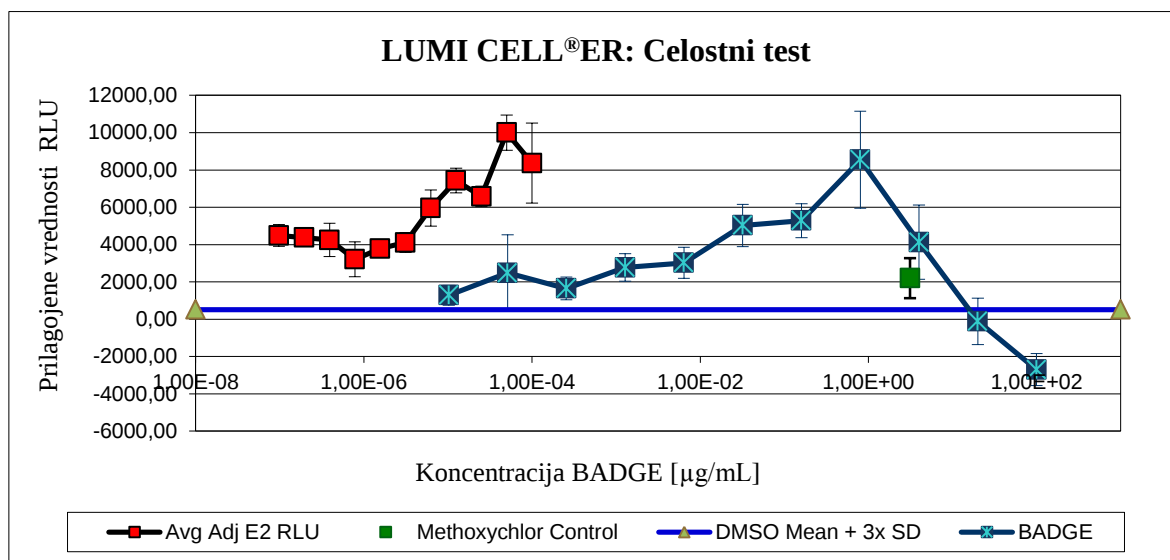
Slika 20. Rezultati testa iskanja območja koncentracij po 24-urni inkubaciji 18. pasaže BG1Luc4E₂ celične linije s 7 različnimi koncentracijami raztopin BADGE in 4 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E₂. Vse vrednosti so prilagojene na normalizirano vrednost 10,000 RLU, ki velja za najvišjo vrednost E₂. Vrednosti predstavljajo povprečje ± SD, podano v RLU.

Za sprejemljivost testa mora biti indukcija E₂ (določimo jo z deljenjem najvišje povprečne RLU vrednosti referenčnega standarda E₂, s povprečjem RLU DMSO kontrole) vsaj 3-kratna, RLU vrednost kontrole topila pa znotraj 2.5-kratne SD že obstoječih RLU podatkov za to kontrolo. Ker so bili pri našem testu ti kriteriji izpolnjeni (indukcija je 3.6-kratna, RLU vrednost za kontrolo je znotraj 2.5-kratne SD), je bil test veljaven.

Pri testu sta agonistično aktivnost na ER pokazali samo dve koncentraciji (1.00×10^1 in 1.00×10^{-4} µg/mL), ostale pa so bile negativne. Zato smo se odločili pri celostnem testu za redčitveni režim 1 : 5, kjer smo zajeli kar 7.5 logaritemskih razredov. Pri režimu redčenja 1 : 2 pa bi zajeli samo 3.5 logaritemske velikostne razrede in bi tako lahko izpustili nekatere pomembne odzive spojine. Kot začetno koncentracijo za celostni test smo določili 1.00×10^2 µg/mL. Koncentracija je sicer po rezultatih MTS testa in vizualni oceni celic, citotoksična (povzroča več kot 20 % zmanjšanje preživetja celic), tako da je pri vrednotenju rezultatov nismo upoštevali. Ampak ker nam je izbrani redčitveni režim omogočal zelo široko koncentracijsko območje, nam to ni predstavljalo težave.

b) Celostni test

Pri celostnem testu (Slika 21) smo preučevali estrogeno aktivnost na ER. Pri testu smo celice tretirali z 11 različnimi koncentracijami testne spojine, redčenih v razmerju 1 : 5 (1.02×10^{-5} , 5.12×10^{-5} , 2.56×10^{-4} , 1.28×10^{-3} , 6.40×10^{-3} , 3.20×10^{-2} , 1.60×10^{-1} , 8.00×10^{-1} , 4.00×10^0 , 2.00×10^1 in 1.00×10^2 $\mu\text{g/mL}$), 11 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E_2 (1.00×10^{-4} , 5.00×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 6.25×10^{-6} , 3.13×10^{-6} , 1.56×10^{-6} , 7.83×10^{-7} , 3.92×10^{-7} , 1.95×10^{-7} in 9.78×10^{-8} $\mu\text{g/mL}$), s kontrolo topila (1 % DMSO v DMEM+) in pozitivno kontrolo metoksiklora (3.13 $\mu\text{g/mL}$). Najvišjo izmerjeno vrednost referenčnega standarda E_2 , smo normalizirali na 10,000 RLU, čemur smo potem prilagodili tudi rezultate vseh ostalih meritev. Narejene so bile 4 neodvisne paralele, kriterijem sprejemljivosti pa je ustrezala le zadnja, zato so prikazani rezultati slednje.



Slika 21. Rezultati celostnega testa po 24-urni inkubaciji 10. pasaža BG1Luc4E₂ celične linije z 11 različnimi koncentracijami raztopin BADGE, 11 različnimi koncentracijami referenčnega standarda E_2 in pozitivno kontrolo metoksiklor. Vse vrednosti so prilagojene na normalizirano vrednost 10000 RLU, ki velja za najvišjo vrednost E_2 . Vrednosti predstavljajo povprečje $\pm$ SD, podano v RLU.

Za sprejemljivost testa mora biti indukcija E_2 (določimo jo z deljenjem najvišje povprečne RLU vrednosti referenčnega standarda E_2 , z povprečjem RLU DMSO kontrole) vsaj 3-kratna, RLU vrednost kontrole topila pa znotraj 2.5 kratne SD že obstoječih RLU podatkov za to kontrolo. Koncentracijska krivulja referenčnega standarda E_2 mora biti sigmoidne oblike, z vsaj 3 linearnimi vrednostmi. RLU vrednosti za metoksiklor pa morajo biti nad črto, ki jo predstavlja DMSO+ 3 SD povprečja DMSO. Pri testu so bili vsi kriteriji

izpolnjeni, zato je bil test veljaven. Indukcija E₂ je bila 3.1 in koncentracijska krivulja sigmoidne oblike, s tremi linearnimi točkami (1.25×10^{-5} , 6.25×10^{-6} in 3.13×10^{-6} µg/mL). RLU vrednost za metoksiklor je nad črto DMSO+ 3 SD in RLU vrednosti za DMSO so bile znotraj 2.5-kratne SD.

Krivulja spojine najprej položno narašča vse do koncentracije 1.00×10^0 µg/mL, nato pa strmo pade. Vse necitotoksične koncentracije, razen 2.00×10^1 in 4.00×10^0 µg/mL, imajo RLU vrednost nad DMSO+ 3 SD (modra črta). Koncentracije 1.00×10^2 µg/mL pa, kot že omenjeno, nismo upoštevali zaradi njenih citotoksičnih učinkov.

Glede na rezultate lahko spojino ocenimo za šibkega agonista na estrogenskih receptorjih, saj ustreza potrditvenim kriterijem. Spojina namreč izkazuje bazno linijo, ki počasi narašča, se konča z vrhom, nato pa strmo pade pod modro črto. Tudi amplituda odziva je ustrezna, saj znaša več kot 20 % maksimalne vrednosti referenčnega standarda (nad 2000 RLU, če je maksimalen odziv za E₂ normaliziran na 10,000 RLU). Spojino bi ovrednotili za antagonist na ER, če kriteriji za agonizem ne bi bili izpolnjeni in če bi bili vsi odzivi pod 20 % maksimalne vrednosti referenčnega standarda E₂ (2000 RLU, če je maksimalen odziv za E₂ normaliziran na 10,000 RLU).

Zgoraj prikazani rezultati pripadajo 4. izvedeni paraleli, saj so bili prvi trije neodvisni poskusi neuspešni, ker niso izpolnjevali pogojev sprejemljivosti. Četrty neodvisen poskus je bil izveden na nižji celični pasaži (10.) kot predhodni eksperimenti (18., 20. in 21.), zato bi lahko bila vzrok za neuspeh previsoka pasaža, čeprav je v literaturi navedena stabilnost in aktivnost BG1Luc4E₂ celic vse do 30. pasaže (25).

4.3.2 YES test (ang. Yeast estrogen screen)

Presejalni test (anti)-estrogenosti na celicah kvasovk (YES) je bil opravljen na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo.

a) Princip testa

Test YES uvrščamo med teste z reporterskim genom. Poteka na gensko modificiranih kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae*, katere imajo v glavni kromosom vključeno DNK sekvenco za humani ERα (hERα) in ekspresijski plazmid, na katerem se nahaja zapis za

reporterski gen *lac-Z*. Ta gen kodira encim β -galaktozidazo, s katerim določamo receptorsko aktivnost. Vezava agonista na ER, aktivacija transkripcijskih faktorjev in ostalih transkripcijskih komponent, namreč sproži prepisovanje genov, kar pripelje do sinteze encima β -galaktozidaze. Encim se izloča v medij, kjer metabolizira kromogeni substrat klorofenol rdeče- β -D-galaktopiranozid (CPRG) in ga pretvori iz rumene v rdeče obarvan produkt, ki ga lahko kolorimetrično določimo pri 540 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna količini izločenega encima kot tudi aktivnosti testne spojine, ki se veže na receptor. S testom lahko identificiramo agoniste (aktivacija receptorja) in antagoniste (inhibicija receptorja) na ER. Kot pozitivna kontrola za agonistično aktivnost služi E_2 , kot kontrola za antagonizem pa se uporablja 4-hidroksitamoksifen. Test velja za visoko občutljivega, saj lahko kvasovke zaznajo prisotnost E_2 že pri koncentraciji 2 ng/L (57).

b) Opis izvedbe testa

Rastoča celična linija kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* je bila pri testiranju agonistične aktivnosti izpostavljena seriji različnih koncentracij BADGE, pozitivne kontrole (E_2) in negativni kontroli (1% DMSO v mediju). Pri testiranju antagonizma na ER pa so bile celice izpostavljene različnim koncentracijam spojine BADGE, pozitivne kontrole (4-hidroksitamoksifen) in negativni kontroli (1 % DMSO v mediju). Poleg tega je bila pri testiranju antagonizma v vse vdolbinice nanešena še bazna raztopina E_2 s koncentracijo 2.00×10^{-10} M. Kot topilo je bil v obeh testih uporabljen 100 % DMSO. Celice so bile inkubirane 18 ur pri 31 °C, s stalnim stresanjem (100 rpm). Po inkubaciji so celice lizirali ob prisotnosti rumenega substrata klorofenol rdeče- β -D-galaktopiranosid (CPRG), ki se ob prisotnosti β -galaktozidaze obarva rdeče. Pred dodatkom lizirnega pufra so rast celic določili z merjenjem absorbance pri 690 nm. Po lizi kvasovk pa so pri 570 nm določili nastanek rdeče obarvanega substrata. Absorbanco pri tej valovni dolžini so odšteli od absorbance pri 690 nm, ter tako zmanjšali napako, ki bi sicer nastala zaradi uklona svetlobe in mrtvih celic.

c) Rezultati

• Agonistična aktivnost

Najprej je bil narejen presejalni (ang. screening) test za določitev agonistične aktivnosti na $ER\alpha$ (Preglednica VIII). Osem različnih koncentracij spojine (3.00×10^{-12} , 3.00×10^{-11} , 3.00×10^{-10} , 3.00×10^{-9} , 3.00×10^{-8} , 3.00×10^{-7} , 3.00×10^{-6} , 3.00×10^{-5} , 6.00×10^{-5} in 1.00

$\times 10^{-4}$ M) je bilo inkubiranih skupaj s celicami kvasovk. Kot pozitivna kontrola je služil E_2 v osmih različnih koncentracijah (2.1×10^{-13} , 6.7×10^{-13} , 2.1×10^{-12} , 6.7×10^{-12} , 2.1×10^{-11} , 6.7×10^{-11} , 2.1×10^{-10} in 6.7×10^{-10} M).

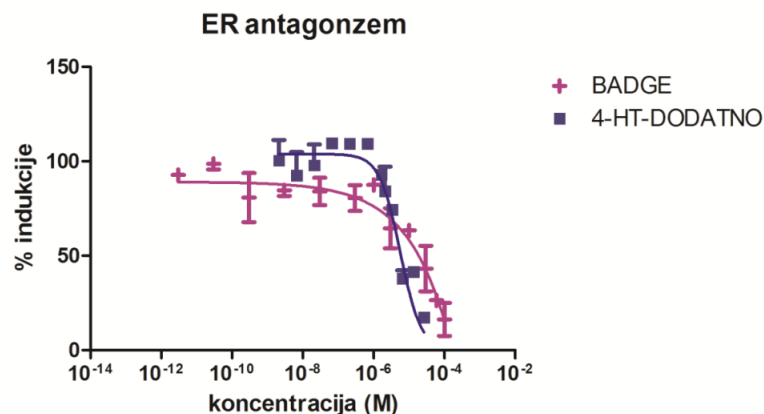
Preglednica VIII. Rezultati presejalnega YES testa za agonistično aktivnost spojine BADGE.

Koncentracija spojine BADGE [M]	Razmerje indukcije [IR]
3.00×10^{-12}	1.03
3.00×10^{-11}	0.89
3.00×10^{-10}	0.51
3.00×10^{-9}	1.04
3.00×10^{-8}	0.85
3.00×10^{-7}	0.55
3.00×10^{-6}	0.51
3.00×10^{-5}	68.95

Rezultate smo izrazili v obliki razmerja indukcije (IR) za posamezno koncentracijo. Za agonistično aktivnost mora biti IR_{vzorca} večji od IR 10. IR10, ki predstavlja 10 % maksimalne indukcije celic, je v našem primeru znašal 12.98. Le-tega smo določili iz rezultatov za pozitivno kontrolo (E_2) in kontrolo topila (1 % DMSO v mediju). Iz vrednosti, ki so prikazane v Preglednici VIII, vidimo da je BADGE izkazoval ustrezno visoko razmerje indukcije zgolj pri koncentraciji 30 μ M, vse ostale koncentracije pa bistveno nižje. Zato za spojino agonistično delovanje na $ER\alpha$ ni bilo dokazano.

• Antagonistična aktivnost

Ker agonistično delovanje na ER, izraženih na celicah kvasovk, za spojino BADGE, ni bilo dokazano, je bil izveden tudi presejalni test za antagonizem. Tokrat so bile celice kvasovk izpostavljene kar 12 različnim koncentracijam spojine (3.00×10^{-12} , 3.00×10^{-11} , 3.00×10^{-10} , 3.00×10^{-9} , 3.00×10^{-8} , 3.00×10^{-7} , 1.00×10^{-6} , 3.00×10^{-6} , 1.00×10^{-5} , 3.00×10^{-5} , 6.00×10^{-5} in 1.00×10^{-4} M). Kot pozitivna kontrola za antagonistično delovanje pa je bil uporabljen 4-hidroksitamoksifen (4-HT) v osmih različnih koncentracijah (2.1×10^{-9} , 6.7×10^{-9} , 2.1×10^{-8} , 6.7×10^{-8} , 2.1×10^{-7} , 6.7×10^{-7} , 2.1×10^{-6} in 6.7×10^{-6} M). V vse testne vdolbinice na mikrotitrski plošči je bila nanešena tudi osnovna koncentracija estrogenskega agonista E_2 2.00×10^{-10} M. Pri testiranju antagonistične aktivnosti smo iz rezultatov določili, da spojina BADGE deluje antagonistično na $hER\alpha$, kar prikazuje Slika 22.



Slika 22. Indukcija celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v odvisnosti od koncentracije. Celice so bile 18 ur inkubirane ob prisotnosti različnih koncentracij spojine BADGE (vijolična) in pozitivne antagonistične kontrole 4-hidroksitamoksifen (modra). Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SD, podani v odstotkih.

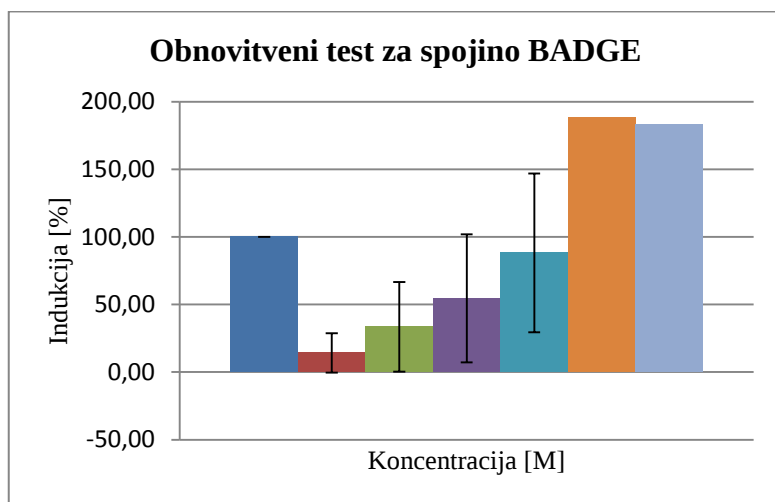
Antagonistično delovanje spojine na ER, se je izrazilo z zmanjšanjem sinteze β -galaktozidaze, v odvisnosti od koncentracije, ki smo jo prikazali z zmanjšanjem % indukcije. Kot vidimo na Sliki 22, spojina BADGE pri nižjih koncentracijah ni povzročila bistvene inhibicije ER. Vse od najnižje koncentracije, 3.00×10^{-12} M, pa vse do 1.00×10^{-6} M je indukcija nihala med 100 % in 80 %. Z višanjem koncentracije pa je indukcija padala. Pri 3.00×10^{-6} M je znašala 64.6 %, pri 1.00×10^{-5} M 63.4 %, pri 3.00×10^{-5} M 43.1%, pri 6.00×10^{-5} M 25.9 %, pri 1.00×10^{-4} M pa le 16.3 %. Torej je bila maksimalna inhibicija ER α pri najvišji upoštevani koncentraciji (višje koncentracije so bile namreč motne). Inhibicija je pri tej koncentraciji znašala kar 83.7 %. Za pozitiven rezultat pa bi zadostovalo že 50 % maksimalne inhibicije določene s pozitivno kontrolo. S tem presejalnim testom smo torej dokazali antagonistično aktivnost višjih koncentracij spojine na ER.

• Obnovitveni (ang. recovery) test

Za spojino BADGE smo s testom dokazali antagonistično aktivnost na ER. Prav tako je bila spojina testirana tudi za delovanje na androgenskih receptorjih (rezultati niso prikazani), kjer je BADGE prav tako deloval kot antagonist. V takšnih primerih je ocena antagonističnega delovanja otežena, saj je lahko le-ta posledica nespecifičnih inhibitornih učinkov, ki niso vodeni preko steroidnih receptorjev in dajo lažno pozitivne rezultate. Zato je bil izveden obnovitveni (ang. recovery) test na celicah kvasovk, s katerim smo preverili ali je mehanizem antagonističnega delovanja spojine BADGE resnično voden preko ER

(Slika 23), saj agonist z višanjem koncentracije izpodrine antagonista iz receptorja in povzroči povečanje indukcije.

Pri testu je bila uporabljena stalna koncentracija testne spojine BADGE, ki je znašala 1.00×10^{-4} M. Osnovno koncentracijo agonista E_2 smo postopoma povečevali (vrednosti so prikazane v Preglednici IX), do končne koncentracije, ki je bila 10 x višja od začetne.



Slika 23. Test kontrole obnovitve indukcije pri stalni koncentraciji spojine BADGE (1.00×10^{-4} M). Koncentracija agonista E_2 je bila postopno povišana vse do najvišje koncentracije (vrednosti prikazane v Preglednici IX), s čimer smo prikazali obnovev signala indukcije. Indukcija je prikazana s povprečjem $\pm$ SD, izražena v odstotkih.

Preglednica IX. Vrednosti koncentracij agonista E_2 in testne spojine BADGE za posamezen stolpec na Sliki 23.

Barva stolpca	Koncentracija E_2 [M]	Delež E_2 [%]	Koncentracija spojine BADGE [M]	Indukcija [%]
Temno modra	2.00×10^{-10}	100	0	100
Rdeča	2.0×10^{-10}	100	1.00×10^{-4}	14.22
Zelena	3.0×10^{-10}	150	1.00×10^{-4}	33.49
Temno vijolična	4.0×10^{-10}	200	1.00×10^{-4}	54.67
Modra	6.0×10^{-10}	300	1.00×10^{-4}	88.22
Oranžna	1.2×10^{-9}	600	1.00×10^{-4}	188.57
Vijolična	2.0×10^{-9}	1000	1.00×10^{-4}	153.52

Z obnovitvenim testom smo dokazali, da spojina antagonistično deluje res preko receptorjev, saj se je z večanjem koncentracije agonista E_2 večal tudi odstotek indukcije. Pri YES testu je bila spojina BADGE testirana za njeno (anti-) estrogeno aktivnostjo na rekombinantnih celicah kvasovk, kjer smo dokazali, da spojina deluje antagonistično na ER. Vendar je pri vrednotenju rezultatov potrebno upoštevati, da so rezultati lahko v

nekaterih primerih lažno pozitivni ali negativni za *in vivo* pogoje. Kvasovke namreč normalno ne izražajo estrogenskih receptorjev, kot tudi ne ostalih receptorjev, ki lahko sicer vplivajo na aktivacijo endogenih ER (57). Poleg tega pa so koncentracije z dokazanim antagonističnim učinkom ($3.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$), bistveno višje od ocenjenih zaužitih koncentracij prebivalcev ZDA ($69.4 - 9.14 \text{ ng/kg}$ telesne teže) (36), zato ne vemo, če bi se antagonističen učinek resnično izražal tudi *in vivo* pri živalih ali ljudeh.

4.3.3 Vrednotenje rezultatov estrogenosti

Z izvedenima testoma nismo prišli do enakih zaključkov o delovanju spojine na ER. Z YES testom, ki je bil izveden na celicah kvasovk, smo dokazali antagonistično delovanje na hER α , medtem ko smo z LUMI CELL[®]ER testom dobili pozitiven rezultat za šibko agonistično aktivnost spojine na ER α in ER β . Kar pa bi morali, zaradi zelo šibkega odziva, potrditi še z dodatnimi ponovitvami.

Ob pogledu na strukturo spojine BADGE agonističnega delovanja na ER ne bi pričakovali, saj struktura nima tipičnih lastnosti estrogenskih agonistov (glej poglavje 1.2.2). Hidroksilni skupini na para mestu obeh benzenovih obročev sta namreč zaetreni z glicidilno skupino, za estrogeno delovanje pa bi morali biti prosti. Razdalja med obema hidroksilnima skupinama (C3 in C17) pa je manjša od optimalne, saj znaša zgolj 9.31 Å.

Tudi nekatere *in vitro* raziskave estrogenosti spojine BADGE, narejene na različnih celičnih linijah in z različnimi testi, si v rezultatih niso enotne (56, 57, 58, 60). Olea je s sodelavci preučeval spojino BADGE v testu proliferacije na celicah MCF-7 (celice raka dojke) in v testu kompetativne vezave na ER. Ugotovili so, da spojina sicer spodbuja proliferacijo celic pri koncentraciji 10 μM , vendar za vezavo na ER ne tekmuje z radioaktivno označenim E₂ (58). Enaki rezultati so bili navedeni tudi v študiji, ki so jo izvedli Perez in sodelavci, kjer so potrdili, da ima pri estrogenosti pomembno vlogo razdalja med obema hidroksilnima skupinama na para mestu fenolnega obroča. Glede na to, da je spojina BADGE izkazovala estrogeno aktivnost kljub zaetrenim hidroksilnim skupinam, pa so sklenili, da so MCF-7 celice najverjetneje zmožne razcepiti eterno vez (59). Terasaki in sodelavci so testirali estrogeno aktivnost spojine BADGE s testom reporterskega gena na rekombinantnih celicah kvasovk SC Y190, kjer so ugotovili šibko

antagonistično delovanje spojine na hER α pri koncentraciji 2.8×10^{-4} M, odstotek inhibicije pa je bil manjši od 20 % (60).

V nekaterih študijah so se posvetili tudi preučevanju estrogene aktivnosti derivatov BADGE (BADGE• 2H₂O in BADGE• 2HCl), ki prav tako lahko povzročijo hormonske motnje v telesu. Derivata sta namreč izkazala pozitivne učinke v testu proliferacije na T47D celicah (celična linija raka dojke). Teh učinkov derivatov pa nikakor ne gre zanemariti, saj po sprostitvi monomera BADGE v hrano, iz epoksidnih oblog na pločevinkah, hitro poteče odprtje epoksidnega obroča, ki vodi do nastanka le-teh (61). Satoh in sodelavci pa v testu proliferacije na MCF-7 celicah niso detektirali estrogene aktivnosti ne za BADGE kot tudi ne za derivate spojine (62).

Za različne rezultate testov YES in LUMI CELL[®]ER je lahko razlog tudi uporaba različnih celičnih linij (celice kvasovk pri YES in tumorske celice pri LUMI CELL[®]ER), saj lahko pride do različnih odzivov zaradi razlik v njihovem metabolizmu, izraženih receptorjih, transkripcijskih faktorjih in aktivnosti spojine (45). V zgoraj omenjenih rezultatih smo namreč videli, da so nekatere tumorske celične linije celo zmožne cepiti eterno vez zaradi prisotnosti encimskega sistema (59). Poleg tega *in vitro* testni modeli predstavljajo le del metaboličnega sistema in ne nujno odražajo resničnega toksikološkega ali biološkega potenciala spojin *in vivo* (45, 57).

Ker s testoma LUMI CELL[®]ER in YES nismo uspeli skladno dokazati delovanja spojine BADGE na ER, je potrebna izvedba dodatnih *in vitro* testov. Predvsem pa je potrebno izvesti še ponovitve testa LUMI CELL[®]ER, s katerimi bi dokončno potrdili ali zavrgli šibko estrogeno delovanje na ER. Le-temu pa morajo slediti tudi *in vivo* raziskave, ki bodo zajele celoten metaboličen sistem in ostale pomembne celične mehanizme.

Kaj rezultati obeh študij pomenijo za ljudi, težko ocenimo, saj nismo zasledili študij, ki bi merile *in vivo* krvno oziroma plazemsko koncentracijo BADGE pri ljudeh ali živalih. Glede na ocenjeno dnevno zaužitje spojine (69.4 – 9.14 ng/kg telesne teže) v eni izmed študij (36), pa so te koncentracije bistveno nižje od testiranih, zato najverjetneje do toksičnega učinka v *in vivo* pogojih ne bi prišlo. Vendar kljub vsemu škodljivih učinkov ne moremo povsem izključiti brez trdnih *in vivo* dokazov.

5 SKLEP

BADGE je derivat znanega hormonskega motilca BPA in je glavna sestavina epoksidnih smol, ki se uporabljajo kot zaščitne obloge na notranjih straneh pločevink za živila. Nepolimeriziran BADGE se lahko iz teh oblog sprošča v hrano, kjer se pretvori v različne derivate ali pa nespremenjen vstopi v prehransko verigo.

Pri preučevanju nastanka reaktivnih metabolitov, smo ob iskanju prekurzorjev tipičnega fragmenta GSH, m/z 272, detektirali povišan odziv dveh spojin, z m/z 648 in z m/z 610.7. Prva spojina, z m/z 648, predstavlja konjugat spojine z GSH, z monohidroksilnima skupinama na epoksidnih mestih in je najverjetneje produkt redukcije, katalizirane z mikrosomalnimi encimi. Pri spremljanju časovne reaktivnosti BADGE z GSH, v odsotnosti mikrosomov, pa smo dobili bistveno nižje odzive, kar dodatno kaže, da spojina nastaja predvsem z encimsko katalizo. Za spojino z m/z 610.7 predvidevamo, da najverjetneje predstavlja GSH dimer, katerega nastanek poteka spontano v raztopino, pri 37 °C. Spojina je namreč nastala v bistveno večjem obsegu v raztopinah, kjer se je manj GSH porabilo za tvorbo prve. Poleg tega je bil nastanek konjugata zelo obsežen v raztopinah brez encimov. Vendar pa za dokončno potrditev domneve priporočamo nadaljnje kemijske analize.

Pred testiranjem estrogene aktivnosti na celicah BG1Luc4E₂, smo opravili MTS test, s katerim smo določili citotoksične koncentracije. Manj kot 80 % preživetje celic sta izkazovali le koncentraciji 50 in 100 µg/mL, kar smo potrdili tudi z vizualno oceno celic na mikrotiterski plošči. Z uporabo LUMI CELL[®]ER testa smo dobili rezultate za šibko agonistično delovanje spojine na ER, ki bi ga morali še dodatno potrditi z uspešnimi ponovitvami. Spojina namreč v svoji strukturi, na benzenovih obročih, nima prostih hidroksilnih skupin, ki sta ključni za estrogen učinek. V YES testu, ki so ga izvedli na Katedri za farmacevtsko kemijo, pa so dokazali antagonističen učinek višjih koncentracij. Tudi ob prebiranju literature smo naleteli na različne zaključke. Razlog za to je najverjetneje uporaba različnih celičnih linij z različno metabolično aktivnostjo ter različnim izražanjem receptorjev in transkripcijskih faktorjev. Zato, za potrditev delovanja na ER, predlagamo ponovitev LUMI CELL[®]ER testa z več uspešnimi poskusi.

6 LITERATURA

1. Frlan R, Sollner Dolenc M: Induktorji citokromov P 450. Farmacevtski vestnik 2007; 58: 92-5.
2. Timbrell JA: Principles of Biochemical Toxicology, 4. izdaja, Informa Healthcare USA, New York, 2009:1-5, 75-125.
3. Lemke TL, Williams DA: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 174-179; 202-209; 685-697.
4. Wermuth CG, Testa B: The practice of medicinal chemistry: Biotransformation Reactions and Their Enzymes, 3. izdaja, Elsevier, London, 2008: 655-83.
5. Korfmacher WA: Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies, 2. izdaja, CRC Press, Boca Raton, 2010: 148-9; 210.
6. Park BK, Lavery H, Srivastava A, Antoine DJ, Naisbitt D, Williams DP: Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. Chemico-Biological Interactions 2011; 192: 30-6.
7. Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M, Chen YZ: Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. Drug Metabolism Reviews 2005; 1: 41-5, 146-51.
8. Hodgson E: A textbook of modern toxicology, 3. izdaja, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2004, 149-161, 529.
9. Leung L, Kalgutkar AS, and Obach RS: Metabolic activation in drug-induced liver injury. Drug Metabolism Reviews 2012; 44(1): 18-33.
10. Ma S, Subramanian R: Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Mass spectrometry 2006; 41: 1121-39.
11. Testa B, Krämer SD: The Biochemistry of Drug Metabolism: Conjugations, Consequences of Metabolism, Influencing Factor, 1. Izdaja, Wiley-WCH 2008: 204-206.
12. Farmacevtska kemija III: Vaje in seminarji - Antioksidanti. Dostopano 9.12.2013, na:
http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf

13. Kerdivel G, Habauzit D, Pakdel F: Assessment and Molecular Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals That Interfere with Estrogen Receptor Pathways, Review Article. *International Journal of Endocrinology* 2013; 2013: 1-14.
14. Zoeller TR, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ, Vom Saal FS: Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 2012; 153(9): 4097-110.
15. Baker VA: Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro* 2001; 15: 413-9.
16. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D: Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals, Mini Review. *Hormones* 2010; 9 (1): 9-15.
17. Endocrine Disruptors, National Institute of Environmental Health Science (NIEHS)
Dostopno dne 16.10.2013, na:
http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf
18. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ: Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility, Review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127: 204-15.
19. Sonnenschein C, Soto AM: An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1998; 65: 143-50.
20. Marino M, Pellegrini M, La Rosa P, Acconcia F: Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes, Review. *Steroids* 2012; 77: 910-7.
21. Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM: Structure-Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens. *Chemical Research in Toxicology* 2001; 14 (3): 280-94.
22. Eertmans F, Dhooge W, Stuyvaert S, Comhaire F: Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 515-24.
23. Gray LE Jr et al.: Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act

- via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproductive Toxicology* 1997;11 (5): 719-50.
24. Streck G: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 2009; 28 (6): 635-52.
 25. OECD, Test No. 457: OECD guidelines for the testing of chemicals – BG1Luc estrogen receptor transactivation test method for identifying estrogen receptor agonists and antagonists, OECD Publishing 2012, Section 4: Health Effects.
 26. Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Ž, Peterlin Mašič L: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in Vitro* 2013; 27: 1267–76.
 27. Viñas R and Watson CS: Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced non genomic signaling and downstream functions in pituitary cells. *Environmental Health* 2013; 12 (26): 1-11.
 28. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A: Endocrine Disruptors in the Environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 2003; 75 (5): 664-6.
 29. Bisphenol A diglycidyl ether (Wiley Online Library). Dostopano dne 22.11.2012, na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb167554e0019/pdf>
 30. Bisphenol A diglycidyl ether (DOW Product Safety Assessment). Dostopano dne 22.11.2012, na: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0056/0901b80380056968.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00241.pdf&fromPage=GetDoc
 31. PubChem (Compound Summary). Dostopano dne 23.10.2013, na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2286>
 32. Hazardous Substances Data Bank: Bisphenol A diglycidyl ether- Chemical/Physical Properties. Dostopano dne 12.12.2013, na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+1675-54-3>
 33. Bisphenol A diglycidyl ether (IARC Monographs volume 71). Dostopano dne 22.11.2012, na: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-71.pdf>
 34. Hutson DH: Bisphenol A Diglycidyl Ether as a Potential Metabolic source of Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106 (10): 473.

35. Slovensko kemijsko društvo: Zbornik referatov s posvetovanja, 2. del, FKKT Maribor 2000: 560-64.
36. Wang L, Wu Y, Zhang W, Kannan K: Widespread Occurrence and Distribution of Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) and its Derivatives in Human Urine from the United States and China. *Environmental Science & Technology* 2012; A-I.
37. Suárez S, Sueiro RA, Garrido J: Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and chlorohydrin of BADGE. *Mutation Research* 2000; 470: 221-8.
38. Sueiro RA, Suárez S, Araujo M, Garrido, MJ: Study on mutagenic effects of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in the *Escherichia coli* tryptophan reverse mutation assay. *Mutation Research* 2006; 609: 11-6.
39. Bishop-Bailey D, Hla T, Warner TD: Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is PPAR γ agonist in an ECV304 cell line. *British Journal of Pharmacology* 2000; 131: 651-4.
40. Fehlberg S, Trautwein S, Göke A, Göke R: Bisphenol A diglycidyl ether induces apoptosis in tumour cells independently of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , in caspase-dependent and -independent manners. *Biochemical Society* 2002; 362: 573-8.
41. Trontelj J, Lušin TT: In vitro modeli za preučevanje metabolizma učinkovin v jetrih. *Farmacevtski vestnik*, 2011; 62: 2-5.
42. Fasinu P, Bouic PJ, Rosenkranz B: Liver-Based *In Vitro* Technologies for Drug Biotransformation Studies - A Review. *Current Drug Metabolism*, 2012; 13: 1-10.
43. National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM): BG1Luc ER TA TEST METHOD AGONIST PROTOCOL: 1-36. Dostopan dne 23.11.2012, na: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48660864.pdf>
44. Baldwin WS, Curtis SW, Cauthen CA, Risinger JI, KORACH KS, Barrett JC: BG-1 ovarian cell line: An alternative model for examining estrogen dependent growth *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* 1998; 34: 649-54.
45. Rogers JM, Denison MS: Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals. *In vitro & molecular toxicology* 2000; 13 (1): 67-82.

46. Annex G1: ICCVAM/NICEATM BG1Luc4E2 ER TA – Cell Viability Manual: G1-6. Dostopano dne 23.11.2012, na: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxC/AnnexG/G1-Cell-Viab-Manual.pdf
47. Geisinger KR et al.: Characterization of a Human Ovarian Carcinoma Cell Line With Estrogen and Progesterone Receptors. Cancer 1989; 63: 280-8.
48. Appendix C: Final Background Review Document - Validation Study of the BG1Luc4E2 Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method: C39–C41. Dostopano dne 28.11.2013, na: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxC/BRD.pdf
49. Gordon JD, Chu AC, Chu MD, Taylor CL, Denison MS, Clark GC: Validation of the LUMI-CELL™ ER recombinant bioassay for rapid evaluation of chemicals for potential estrogenic. Organohalogen Compounds, Dioxin 2003; 65: 78-81.
50. Riss T and Moravec R: Improved Non-Radioactive Assay to Measure Cellular Proliferation or Toxicity: The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Promega Notes Magazine Number 1996; 59: 1-5.
51. Stoddart MJ: Cell Viability Assays: Introduction. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 2011; 740: 1-6.
52. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega. Dostopano dne 16.10.2012, na: <http://www.promega.com.br/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf>
53. Luciferase Assay System, Promega. Dostopano dne 16.10.2012, na: <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf>
54. Fleck Scet al.: Epoxide Reduction to an Alcohol: A Novel Metabolic Pathway for Perylene Quinone- Type Alternaria Mycotoxins in Mammalian Cells. Chemical Research in Toxicology 2014; 27: 247-53.
55. Dieckhaus C et al.: Negative Ion Tandem Mass Spectrometry for the Detection of Glutathione Conjugates. Chemical Research in Toxicology 2005; 18: 630-8.

56. Ramilo G, Valverde I, Lago J, Vieites JM, Cabado AG: Cytotoxic effects of BADGE (bisphenol A diglycidyl ether) and BFDGE (bisphenol F diglycidyl ether) on Caco-2 cells in vitro. *Molecular Toxicology* 2006; 80: 748-55.
57. Routledge EJ, Sumpter JP: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1996; 15 (3): 241-8.
58. Olea N et al.: Estrogenicity of Resin-based Composites and Sealants Used in Dentistry. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104 (3): 298-305.
59. Perez P et al.: The Estrogenicity of Bisphenol A-related Diphenylalkanes with Various Substituents at the Central Carbon and the Hydroxy Groups. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106 (3): 167-74.
60. Terasaki M, Kazama T, Shiraishi F, Makino M: Identification and estrogenic characterization of impurities in commercial bisphenol A diglycidyl ether (BADGE). *Chemosphere* 2006; 65: 873–80.
61. Nakazawaa H, Yamaguchia A, Inouea K, Yamazakib T, Katoa K, Yoshimuraa Y, Makinoc T: In vitro assay of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40: 1827–32.
62. Satoh K, Ohyama K, Aoki N, Iida M, Nagai F: Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42: 983-93.