

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA ŽEROVNIK

**PREUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* IN
TNFRSF11B V ČLOVEŠKIH OSTEOSARKOMSKIH CELICAH, IZPOSTAVLJENIH
BISFENOLOM A, S IN AF**

**THE STUDY OF *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* AND *TNFRSF11B* GENE
EXPRESSION IN HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS EXPOSED TO BISPHENOL A,
S AND AF**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

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

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm., in somentorja asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	III
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
1.1 HORMONSKI MOTILCI.....	1
1.1.1 IZPOSTAVLJENOST BISFENOLOM A, S IN AF.....	2
1.1.1.1 Bisfenol A (BPA).....	2
1.1.1.2 Bisfenol S (BPS).....	3
1.1.1.3 Bisfenol AF (BPAF)	4
1.2 GENI.....	5
1.2.1 Šibko povezan transkripcijski faktor 2 (<i>RUNX2</i>).....	5
1.2.1.1 Kleidokranialna displazija	6
1.2.2 Zaviralec vezave DNK 1, dominantni negativni protein vijačnica-zanka- vijačnica (<i>ID1</i>).....	7
1.2.2.1 Adenoid cistični karcinom	7
1.2.2.2 Rak ščitnice.....	7
1.2.3 Zaviralec vezave DNK 3, dominantni negativni protein vijačnica-zanka- vijačnica (<i>ID3</i>).....	8
1.2.3.1 Progressivna osifikantna fibrodisplazija.....	8
1.2.3.2 Rettov sindrom.....	8
1.2.4 Lipoproteinski receptor z nizko gostoto – sorodni protein 5 (<i>LRP5</i>).....	8
1.2.4.1 Družinska eksudativna vitreoretinopatija	9
1.2.4.2 Osteoporoza-pseudoglioma sindrom	9
1.2.5 Kolagen tipa I, alfa 2 (<i>COL1A2</i>)	9
1.2.5.1 Ehlers-Danlosov sindrom	10
1.2.5.2 Osteogenesis imperfecta	10
1.2.6 Naddružina receptorja tumornekroznega faktorja, člana 11b (<i>TNFRSF11B</i>)	11
1.2.6.1 Bolezni žil	11
1.2.6.2 Rak	12

1.3	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU.....	12
1.3.1	Študije genskega izražanja.....	13
2	NAMEN DELA.....	14
3	MATERIALI IN METODE.....	15
3.1	MATERIALI IN NAPRAVE.....	15
3.1.1	Celične kulture.....	15
3.1.2	Izolacija RNK.....	15
3.1.3	Analiza na mikromrežah.....	16
3.1.4	Reverzna transkripcija.....	16
3.1.5	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	16
3.1.6	Ostalo.....	17
3.2	METODE.....	17
3.2.1	Celične kulture.....	17
3.2.2	Izolacija RNK.....	18
3.2.3	Analiza na mikromrežah.....	18
3.2.4	Reverzna transkripcija.....	19
3.2.5	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	19
3.2.6	Obdelava podatkov.....	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	21
4.1	PRIMERJANJE UČINKOV BISFENOLOV NA IZRAŽENOST <i>RUNX2</i> , <i>ID1</i> , <i>ID3</i> , <i>LRP5</i> , <i>COL1A2</i> IN <i>TNFRSF11B</i>	21
4.2	MODULIRANJE UČINKOV BISFENOLOV S STRANI ESTROGENA NA IZRAŽENOST <i>RUNX2</i> , <i>ID1</i> , <i>ID3</i> , <i>LRP5</i> , <i>COL1A2</i> IN <i>TNFRSF11B</i>	26
4.3	UČINEK BPA-3,4-Q NA IZRAŽENOST <i>RUNX2</i> , <i>ID1</i> , <i>ID3</i> , <i>LRP5</i> , <i>COL1A2</i> IN <i>TNFRSF11B</i>	33
4.4	UČINEK BISFENOLOV, ESTROGENA IN KOMBINACIJ NA IZRAŽENOST <i>RUNX2</i> , <i>ID1</i> , <i>ID3</i> , <i>LRP5</i> , <i>COL1A2</i> IN <i>TNFRSF11B</i> TER MOREBITNI VPLIVI NA ZDRAVJE PREK SPREMENJENEGA IZRAŽANJA GENOV.....	35
4.4.1	<i>RUNX2</i>	35
4.4.2	<i>ID1</i>	37
4.4.3	<i>ID3</i>	38
4.4.4	<i>LRP5</i>	40
4.4.5	<i>COL1A2</i>	41
4.4.6	<i>TNFRSF11B</i>	43

5	SKLEP.....	45
6	LITERATURA.....	47

KAZALO SLIK

Slika 1:	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (povzeto po 11)	13
Slika 2:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPA.....	22
Slika 3:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPS	23
Slika 4:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPAF.....	24
Slika 5:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic estrogenu	27
Slika 6:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom	28
Slika 7:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom	30
Slika 8:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom	31
Slika 9:	Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPA-3,4-Q	34
Slika 10:	Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost <i>RUNX2</i> pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah.....	36
Slika 11:	Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost <i>IDI</i> pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah.....	38
Slika 12:	Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost <i>ID3</i> pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah.....	39
Slika 13:	Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost <i>LRP5</i> pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah	41
Slika 14:	Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost <i>COLIA2</i> pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah	42
Slika 15:	Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost <i>TNFRSF11B</i> pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: BPA in njegovi strukturni analogi.....	2
Preglednica II: Istosmerni in obratnosmerni začetniki, uporabljeni v verižni reakciji s polimerazo v realnem času.....	17
Preglednica III: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPA	21
Preglednica IV: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPS.....	22
Preglednica V: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPAF.....	24
Preglednica VI: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic estrogenu ...	26
Preglednica VII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom	28
Preglednica VIII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom	29
Preglednica IX: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom	31
Preglednica X: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPA-3,4-Q	33
Preglednica XI: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri <i>RUNX2</i>	36
Preglednica XII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri <i>ID1</i>	37
Preglednica XIII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri <i>ID3</i>	39
Preglednica XIV: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri <i>LRP5</i>	40
Preglednica XV: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri <i>COL1A2</i>	42
Preglednica XVI: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri <i>TNFRSF11B</i>	43

POVZETEK

Okoljski hormonski motilci bisfenol A in njegovi analogi so razširjeni v našem bivalnem okolju. Ker njihova proizvodnja in uporaba naraščata, je vse pomembneje ovrednotiti njihov vpliv na zdravje ljudi.

V nalogi smo raziskovali učinke izbranih bisfenolov na izraženost genov *RUNX2*, *IDI*, *ID3*, *LRP5*, *COLIA2* in *TNFRSF11B* v človeških osteosarkomskih celicah, ki so bile 8 ur, 24 ur, 72 ur in 45 dni izpostavljene bisfenolom s koncentracijo 10 nM. Raziskovali smo tudi učinek bisfenolov v kombinaciji z estrogenom, učinek samega estrogena in BPA-3,4-kinona na izraženost preiskovanih genov. Izražanje genov smo določili z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Geni so bili izbrani na podlagi rezultatov, pridobljenih z uporabo DNK mikromrež in njihove možne funkcije v kostnem metabolizmu. Pri zmanjšani izraženosti šibko povezanega transkripcijskega faktorja 2 se lahko pojavi kleidokranialna displazija, medtem ko ima povečana izraženost *RUNX2* lahko pozitivne učinke na razvoj kosti in hrustanca. Zaviralec vezave DNK 1, dominantni negativni protein vijačnica-zanka-vijačnica in zaviralec vezave DNK 3, dominantni negativni protein vijačnica-zanka-vijačnica sta DNK vezavna proteina, ki vsebujeta negativni vijačnica-zanka-vijačnica motiv in sta vključena v vezavo DNK. Povečana izraženost *IDI* lahko vodi v adenoid cistični karcinom in raka ščitnice, medtem ko se pri povečani izraženosti *ID3* lahko pojavita progresivna osifikantna fibrodisplazija in Rettov sindrom. Lipoproteinski receptor z nizko gostoto-sorodni protein 5 in naddružina receptorja tumornekroznega faktorja, člana 11b sta membranski oziroma zunajcelični signalni molekuli vključeni v kostni remodelaciji. Kolagen tipa I, alfa 2 je pomembna kostna struktura proteina.

Rezultati so pokazali, da se izraženost *RUNX2* po 72-urni izpostavljenosti celic BPA poveča. Bisfenoli v kombinaciji z estrogenom v večini primerov zmanjšajo izraženost *RUNX2*. Izraženost *IDI* je po 72-urni izpostavljenosti celic BPA povečana, po 45-dnevni izpostavljenosti celic BPA in BPAF pa zmanjšana. Bisfenoli v kombinaciji z estrogenom zmanjšajo izraženost *IDI* pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 45 dni. Izraženost *ID3* je po 24-urni izpostavljenosti celic BPS povečana, po 45-dnevni izpostavljenosti celic BPA in BPAF pa zmanjšana. BPS v kombinaciji z estrogenom poveča izraženost *ID3* pri celicah, ki so mu bile izpostavljene 72 ur. Na *LRP5* bisfenoli vplivajo le pri 24-urni izpostavljenosti celic BPS, ko je izraženost gena povečana. BPS v kombinaciji z estrogenom poveča izraženost *LRP5* pri

celicah, ki so mu bile izpostavljene 72 ur. Na izraženost *COL1A2* in *TNFRSF11B* bisfenoli in bisfenoli v kombinaciji z estrogenom nimajo učinka.

Bisfenoli lahko vplivajo na izraženost pomembnih genov vključenih v kostno remodelacijo. Čeprav je njihov učinek manjši od učinka znanih hormonov, kot je estrogen, lahko pride do neželenih učinkov zlasti po dolgotrajni izpostavljenosti, kar kažejo podatki iz 45 dnevne izpostavljenosti.

Ključne besede: bisfenoli, preiskovani geni, verižna reakcija s polimerazo v realnem času, vpliv na zdravje

ABSTRACT

The environmental endocrine disruptors bisphenol A and its analogues are widened in our living environment. Their production and usage is growing, therefore it is important to evaluate their influence on people's health.

In this study the effects of selected bisphenols on the expression of the genes *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* and *TNFRSF11B* in human osteosarcoma cells was investigated. Cells were exposed to 10 nM concentrations of bisphenols for 8 hours, 24 hours, 72 hours and 45 days. In addition, effects of the bisphenols were investigated in the combination with oestrogen, the effect of the oestrogen itself and BPA-3,4-quinone. Expression of the genes was determined with the use of the real-time PCR. Genes were chosen on the basis of the results acquired with the usage of the DNK microarray and their possible function in bone metabolism. *RUNT*-related transcription factor 2 is known to be involved in cleidocranial dysplasia when repressed, while increased expression of the *RUNX2* gene has positive effects on the growth of bones and cartilage. Inhibitor of DNK binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein and inhibitor of DNK binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein are DNK binding proteins containing negative helix-loop-helix motive and are involved in binding of DNK. Increased expression of *ID1* are known to be involved in adenoid cystic carcinoma and thyroid cancer, while increased expression of *ID3* leads to fibrodysplasia ossificans progressiva and Rett syndrome. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 and tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b are both known membrane and extracellular signalling molecules respectively, involved in bone turnover. Collagen type I, alpha 2 is important bone structure protein.

Results show increased expression of the *RUNX2* after 72 hours exposure to BPA. The bisphenols in the combination with oestrogen in most cases decrease the expression of the *RUNX2* gene. 72 hours expression of the *ID1* increased after exposure to BPA, and showed significant decrease in cells exposed to BPA and BPAF for 45 days. Bisphenols in the combination with oestrogen decrease the expression of the *ID1* gene in cells exposed for 45 days. 24 hours expression of the *ID3* increased after exposure to BPS, and showed significant decrease in cells exposed to BPA and BPAF for 45 days. BPS in combination with oestrogen increase the expression of the *ID3* gene in cells that were exposed to it for 72 hours. Bisphenols have an impact on the *LRP5* only after 24 hours to the BPS by increasing it's expression. BPS in combination with oestrogen also increased the expression of the *LRP5* gene in cells that were exposed for 72 hours. Bisphenols and bisphenols in the combination with oestrogen don't have an effect on the expression of the *COL1A2* and *TNFRSF11B*.

In conclusion, bisphenols can have an impact on expression of important genes involved in bone turnover. Although their impact is smaller than the impact of known hormones such as oestrogen it could still lead to adverse effects after long term exposure as suggested by data on 45 day exposure.

Keywords: bisphenols, examined genes, chain reaction with the polymerase in real-time, impact on health

SEZNAM OKRAJŠAV

BPA – bisfenol A

BPF – bisfenol F

BPS – bisfenol S

BPAF – bisfenol AF

BPA-3,4-Q – bisfenol-3,4-kinon

COL1A2 – kolagen tipa I, alfa 2

DNK – dezoksiribonukleinska kislina

HLH – vijačnica-zanka-vijačnica

ID1 – zaviralec vezave DNK 1, dominantni negativni protein vijačnica-zanka-vijačnica

ID3 – zaviralec vezave DNK 3, dominantni negativni protein vijačnica-zanka-vijačnica

LRP5 – lipoproteinski receptor z nizko gostoto – sorodni protein 5

OPG – osteoprotegerin

RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B

RNK – ribonukleinska kislina

RPLP0 – ribosomalni protein, veliki, P0

RUNX2 – šibko povezan transkripcijski faktor 2

TNF – tumor nekroza faktor

TNFRSF11B – naddružina receptorja tumor nekroznega faktorja, člana 11b

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci so naravne spojine ali umetne snovi, ki lahko posnemajo ali motijo delovanje hormonov v telesu. Znani so tudi kot hormonski modulatorji, okoljski hormoni ali hormonsko aktivne spojine (1).

Povzročajo motnje v delovanju endokrinega sistema in imajo lahko negativne razvojne, reproduktivne, nevrološke in imunske učinke na laboratorijske živali, ljudi in prostoživeče živali (2). Fiziološki endokrini hormoni delujejo pri zelo nizkih koncentracijah v plazmi in nekatere kemikalije, znane kot hormonski motilci, spreminjajo endokrine funkcije pri podobno nizkih koncentracijah. Veliko znanih hormonskih motilcev deluje prek vpliva na estrogenske receptorje, zato jih imenujemo okoljski estrogeni. Vplivajo na signalizacijo estrogena neposredno prek interakcije z estrogenskimi receptorji, lahko pa tudi posredno prek transkripcijskih faktorjev ali z modulacijo kritičnih presnovnih encimov v biosintezi in presnovi estrogena (3).

Najdemo jih v hrani, okolju in različnih izdelkih. Med hormonske motilce spadajo pesticidi, snovi, ki se uporabljajo v plastični industriji, in drugi industrijski proizvodi, onesnaževala, farmacevtski izdelki, plastenke, kovinske pločevinke za prehranske izdelke, detergenti. Mnoga so močno razširjena v okolju in jih lahko najdemo v višjih koncentracijah pri prostoživečih živalih zaradi akumulacije (2).

Poskusi na živalih so pokazali, da hormonski motilci, kot so pesticidi, fungicidi, mehčala, bisfenol A in organokositrove spojine, motijo endokrini sistem. Pri človeku je težko pripisati takšne spremembe specifičnim hormonskim motilcem, saj smo ljudje običajno izpostavljeni več hormonskim motilcem hkrati. Številne klinične študije so pokazale, da so lahko prizadeti tudi ljudje, vključno z reproduktivnimi motnjami, kot so zmanjšanje spermatogeneze, zmanjšana proizvodnja testosterona, malformacije na genitalijah ali tvorba tumorjev, kot je rak dojke (4).

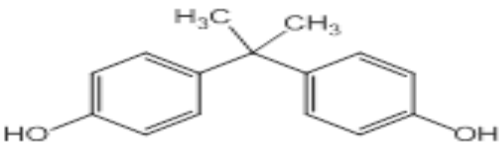
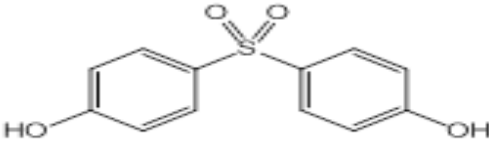
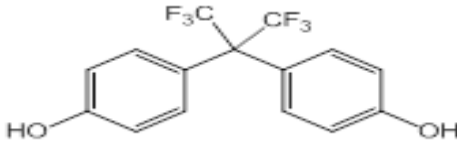
Poleg tega so raziskave pokazale tudi nasprotno. Laboratorijske živali so bile izpostavljene nizkim odmerkom nekaterih hormonsko aktivnih spojin. In čeprav so učinki odvisni od

preučevanih spojin in izmerjene končne točke, so bili rezultati med sabo neponovljivi. To pomeni, da je njihovo določanje zapleteno bolj, kot si lahko predstavljamo (5).

1.1.1 IZPOSTAVLJENOST BISFENOLOM A, S IN AF

Okoljski estrogen BPA (preglednica I) in njegovi analogi so razširjeni v našem bivalnem okolju. Ker njihova proizvodnja in uporaba naraščata, je vse pomembneje ovrednotiti njihov vpliv na zdravje ljudi (6).

Preglednica I: BPA in njegovi strukturni analogi

Vrsta bisfenola	Strukturna formula
Bisfenol A (BPA)	
Bisfenol S (BPS)	
Bisfenol AF (BPAF)	

1.1.1.1 Bisfenol A (BPA)

BPA se proizvaja po vsem svetu. Trenutne ocene kažejo, da se več kot 9,8 milijarde evrov BPA proizvaja letno in približno 100 ton se lahko vsako leto sprosti v ozračje (7). Uporablja se pri proizvodnji materialov, ki pridejo v stik z živili, kot so posode za hrano, zaščitni premazi za konzervirano hrano in pijačo ter kovinski pokrovi za kozarce in steklenice. Pri višjih temperaturah, daljšem stiku z BPA in pri višjem pH-ju kontaktnega medija lahko BPA monomer hidrolizira ter prodre v hrano in pijačo. Medtem ko so bili mehanizmi toksičnosti BPA obsežno preučevani, mehanizmi toksičnosti njegovih analogov niso bili, kljub temu da obstaja možnost, da postanejo prevladujoči onesnaževalci okolja v

bližnji prihodnosti ter bo njihov vpliv na okolje in zdravje ljudi zahteval posebno pozornost. Močan hormonski motilec, ki je dokazano rakotvoren, je dietilstilbestrol in je strukturno soroden BPA. Oba imata hidrofobno jedro z dvema OH-skupinama na vsakem koncu ogrodja, katerih razdalja je podobna (6).

Raziskava, ki so jo izvedli v Združenih državah Amerike, je pokazala, da je BPA pri 93 % populacije prisoten v urinu, njegove koncentracije pa so bile 4,5 ng/mL pri otrocih, 3,0 ng/mL pri najstnikih in 2,5 ng/mL pri odraslih. To so koncentracije, o katerih so poročali tudi v drugih študijah. Tudi statistična analiza je pokazala, da so imeli otroci višje ravni BPA kot mladostniki, ki so imeli višjo stopnjo kot odrasli. To je pomembna ugotovitev, saj so študije na živalskih modelih pokazale povečano ranljivost za izpostavljenost BPA med razvojem. BPA je bil odkrit tudi pri nosečnicah, v človeški plodovnici, neonatalni krvi, placenti, popkovnični krvi in materinem mleku. Prvi varnostni standard, ki ga je leta 1988 določila agencija, ki se ukvarja z varstvom okolja (Environmental Protection Agency – EPA), je bil prilagojen s strani ameriške vladne ustanove za nadzorovanje hrane in zdravil (Food and Drug Administration – FDA) in znaša 50 µg/kg telesne teže/dan. Ta odmerek še danes velja za varnostni standard, kljub novim znanjem o BPA in številnim raziskavam, ki niso pokazale enakomernih učinkov (7).

1.1.1.2 Bisfenol S (BPS)

Bisfenoli so razred kemikalij, znani kot difenilmetani, ki vsebujejo 2 benzenova obroča, ločena z enim centralnim ogljikovim atomom, navadno s 4-OH substituentom na obeh obrocih benzena. V BPS je osrednji atom ogljika nadomeščen z žveplovim atomom. Proizvodnja BPS, ki je stabilen pri visokih temperaturah in odporen proti sončni svetlobi, se povečuje iz leta v leto. Medtem ko je BPA zmerno dovzeten na vplive iz okolja, je lahko BPS obstojnejši (6).

V letu 2011 je Evropska komisija omejila uporabo BPA v plastičnih stekleničkah za dojenčke. Zaradi prepovedi BPA je bil BPS uveden na trg kot sestavni del plastičnih nadomestkov za proizvodnjo otroških stekleničk (8).

V študiji o endokrinih lastnostih BPS so se osredotočili na interakcije s človeškim estrogenskim receptorjem alfa. BPS, bisfenol F in BPA učinkovito aktivirajo oba estrogenska receptorja. Za razliko od BPF in BPA je BPS aktivnejši v človeškem estrogenskem receptorju beta v primerjavi s človeškim estrogenskim receptorjem alfa.

BPS, BPF in BPA so testirali na celični liniji pod kontrolo endogenega človeškega estrogenskega receptorja alfa, ki stabilno izraža estrogenski odgovor na luciferazni reporter. V celični liniji so vse spojine inducirale luciferazno izražanje v odvisnosti od koncentracije, vendar z različnimi aktivnostmi, v zaporedju BPA > BPF > BPS, kot se kaže z njihovo vrednostjo EC50 (9).

BPS je bil pogosto odkrit v okolju in živih organizmih, vendar je na voljo malo informacij o njegovih učinkih na endokrini sistem. V eni izmed študij, ki so jo preučevali, so bili pari odraslih rib 21 dni izpostavljeni 0,5, 5 in 50 µg/L BPS. Raziskali so učinke na reprodukcijo, spolne steroidne hormone in učinek transkripcije genov, ki pripadajo osi hipotalamus-hipofiza-gonade. Škodljivi učinki na uspešnost generacije F1 so bili dodatno preučevani z ali brez naknadne izpostavljenosti BPS. Proizvodnja jajc in gonado-somatski indeks v samicah rib sta bila občutno znižana pri $\geq 0,5$ µg/L BPS. Starševska izpostavljenost BPS je povzročila zamudo in manjše valjenje jajc tudi takrat, ko so se izvalili v čisti vodi. Stalna izpostavljenost BPS v zarodkih F1 je povzročila slabše valjenje in povečano stopnjo deformiranosti v primerjavi s tistimi brez izpostavljenosti BPS. Ugotovitve so pokazale, da lahko BPS z nizko stopnjo izpostavljenosti ovira razvoj potomcev (8).

1.1.1.3 Bisfenol AF (BPAF)

BPAF je struktura dveh fenolnih obročev, spojenih prek ogljikovega mostu. Je analog BPA, v katerem sta metilni skupini zamenjani s trifluorometilnima skupinama (10).

Zaradi svoje odlične stabilnosti se veliko uporablja na področjih, kot so oprema za obdelavo hrane, elektronske naprave in optična vlakna, zlasti v fluoroelastomerih, kot je vulkanizerstvo. Čeprav se je industrijska proizvodnja BPAF znatno povečala, ni na voljo podatkov o letni proizvodnji ali pojavu BPAF v okolju in s tem povezanim potencialnim tveganjem. Kot fluoriran analog BPA, ki dokazano deluje kot hormonski motilec, obstaja sum, da je BPAF potencialno škodljivejši za zdravje ljudi, saj je skupina CF₃ veliko bolj elektronegativna in reaktivna od skupine CH₃ pri BPA. Trenutno so študije v glavnem osredotočene na njegov mehanizem delovanja kot hormonskega motilca *in vitro* (10).

1.2 GENI

Genetska informacija je shranjena v dezoksiribonukleinski kislini. Njena glavna vloga je shranjevanje in prenašanje genetske informacije na naslednje generacije. Molekula je sestavljena iz dveh polinukleotidnih verig, ki sta zviti v dvojno vijačnico. Osnovna enota DNK je nukleotid. Ogradje vsake verige, sestavljeno iz sladkorjev in fosfatov, med sabo povezujejo vodikove vezi, ki se tvorijo med baznimi pari (11). Ker so baze obeh nasprotnih verig dovolj blizu, nastanejo tako imenovani komplementarni bazni pari. Tu se baze povežejo s specifičnimi vodikovimi vezmi. Vse dušikove baze v DNK izhajajo iz purina (adenin, gvanin) in pirimidina (citozin, timin) (12). Zelo redko se v molekuli DNK pojavlja tudi uracil, ki je pirimidinska baza in je značilna za ribonukleinsko kislino (11). Ena izmed glavnih značilnosti dvojne vijačnice je komplementarno parjenje baz, ki ji omogoča, da shranjuje in prenaša genetsko informacijo (12). V paru sta purinska in pirimidinska baza. Adenin se poveže s timinom, gvanin pa s citozinom (11). Ta kombinacija omogoča baznim parom največjo stabilnost in dopušča največje možno število vodikovih vezi (12).

Genetski kod je skupek pravil, ki za kodiranje aminokislin uporabljajo kodone. Kodon je zaporedje treh nukleotidov. V genetskem kodu je posamezna aminokislina kodirana s tremi kodoni. Ti se med prevajanjem s strani tRNK v aminokislinsko zaporedje prebirajo in dekodirajo. Aminokislinske so osnovni gradniki proteinov. Zaporedje kodonov, ki kodirajo za protein, imenujemo gen (11).

V okviru izražanja genov, ki poteka v celici, sta ključni transkripcija in translacija. Prepisovanje genske informacije poteka v celičnem jedru DNK in nosi zapis za določeno gensko informacijo. Na treh različnih mestih (v citoplazmi, mitohondrijih in plastidih) pa poteka prevajanje genske informacije. Mesto prevajanja je odvisno od genoma, na katerem se informacija nahaja (11).

1.2.1 Šibko povezan transkripcijski faktor 2 (*RUNX2*)

Gen *RUNX2* se nahaja na kratkem (p) kraku kromosoma 6 na poziciji 21 in je znan tudi pod drugimi imeni, kot so na primer *PEA2-alfa A*, *PEBP2-alfa A*, *onkogen AML-3*. Je član družine transkripcijskih faktorjev *RUNX* in kodira jedrni protein s šibko vezavno domeno DNK. Protein je bistvenega pomena za diferenciacijo osteoblastov in skeletno morfogenezo ter deluje kot nosilec za nukleinske kisline in regulatorne faktorje, ki so

vključeni v skeletno gensko ekspresijo (13). Iz napisanega lahko sklepamo, da gen *RUNX2* vsebuje navodila za izdelavo proteina, ki je vključen v kosti in razvoj ter vzdrževanje hrustanca (14).

Raziskovalci menijo, da protein *RUNX2* deluje kot "glavno stikalo", ki regulira več drugih genov, vključenih v razvoj celic, ki gradijo kosti (osteoblaste) (14).

1.2.1.1 **Kleidokranialna displazija**

Mutacije v genu *RUNX2* so povezane z razvojno boleznijo kosti, tako imenovano kleidokranialno displazijo. Najdenih je bilo več kot 70 mutacij v genu *RUNX2* pri posameznikih s to boleznijo. Nekatere mutacije spremenijo aminokislino v proteinu *RUNX2*, druge uvedejo prezgodnji stop signal, ki ima za posledico nenormalno kratek protein. Občasno manjka tudi celoten gen. Te genetske spremembe zmanjšajo ali odpravijo aktivnost proteina, proizvedenega iz ene kopije gena *RUNX2* v vsaki celici, in zmanjšujejo funkcionalni protein *RUNX2*. Pomanjkanje funkcionalnega proteina *RUNX2* ovira normalen razvoj kosti in hrustanca ter se kaže kot kleidokranialna displazija. V redkih primerih lahko prizadeti posamezniki doživljajo dodatne, nenavadne simptome, ki izhajajo iz izgube drugih genov v bližini *RUNX2* (14).

Kleidokranialna displazija je stanje, ki najprej vpliva na razvoj kosti in zob. Znaki in simptomi se lahko razlikujejo po resnosti, tudi znotraj iste družine. Posamezniki imajo običajno manj razvito ključnico ali pa je sploh nimajo. Ramena so ozka. Značilnost tega stanja je tudi zapoznelo zapiranje prostorov med kostmi lobanje. Prizadeti posamezniki so lahko 3–6 cm manjši od drugih članov svoje družine in lahko imajo kratke, koničaste prste in širše palce, kratke podlakti, ploska stopala ter nenormalno ukrivljenost hrbtenice. Značilne obrazne poteze lahko vključujejo široko, kratko lobanjo, vidno čelo in majhno zgornjo čeljust. Posameznikom se lahko zmanjša gostota kosti in lahko se razvije osteoporoza. Obenem je to pogoj, da kosti postopoma postajajo vse krhkejše in nagnjene k zlomom. Zobne anomalije lahko vključujejo zamudo v izgubi mlečnih zob, zamudo v pojavu stalnih zob, nenavadno oblikovanje, neujemanje zob in čeljusti ter pojav dodatnih zob, ki jih včasih spremljajo ciste v dlesnih (15).

1.2.2 Zaviralec vezave DNK 1, dominantni negativni protein vijačnica-zanka-vijačnica (*IDI*)

Gen *IDI* se nahaja na dolgem (q) kraku kromosoma 20 na poziciji 11. Protein, kodiran z genom *IDI*, je protein vijačnica-zanka-vijačnica, ki lahko tvori heterodimere s člani osnovne družine transkripcijskih faktorjev HLH. Kodirani protein nima aktivnosti za vezavo DNK ter zato lahko zavira sposobnost vezave in aktivacije transkripcije DNK osnovnih proteinov HLH, s katerimi interagira. Ta protein lahko igra vlogo pri rasti celic, staranju in diferenciaciji. Bolezni, povezani z *IDI*, sta adenoid cistični karcinom in rak ščitnice (16).

1.2.2.1 Adenoid cistični karcinom

Adenoid cistični karcinom je redka oblika adenokarcinoma. Najdemo ga predvsem v glavi in vratu, vendar se lahko občasno pojavi v ženski maternici ali na drugih mestih v telesu. Najpogosteje se pojavlja v žlezah slinavkah, na mestih, kot so usta, notranja ustna sluznica, grlo ali sapnik. Simptomi lahko vključujejo težave pri požiranju, hripavost, otrplost ali otipljive zatrdline. Ne glede na njegovo lokacijo se adenoid cistični karcinom večinoma širi po živcih ali skozi krvni obtok. Majhen odstotek primerov se razširi v bezgavke. Najpogostejše mesto za metastazo so pljuča. Adenoid cistični karcinom je pogosto nepredvidljiv, z dolgimi obdobji brez sledi o hitri rasti. Zdravljenje je odvisno od velikosti in lokacije tumorja, od tega, ali se je rak razširil, in od splošnega zdravja bolnika, vendar lahko vključuje operacijo, obsevanje ali kemoterapijo (17).

1.2.2.2 Rak ščitnice

Rak ščitnice je maligna neoplazma, ki izvira iz folikularnih ali parafolikularnih ščitničnih celic. Obstaja več vrst raka ščitnice. Najpogostejši simptom raka ščitnice je prisotnost bule ali otekline na vratu. Zdravljenje je odvisno od vrste raka in od tega, kako daleč se je rak razširil. Mnogi bolniki prejema kombinacijo zdravljenja. To zdravljenje lahko vključuje operacijo, radioaktivni jod, hormonsko terapijo, radioterapijo, kemoterapijo ali ciljno usmerjeno zdravljenje, ki uporablja snovi, ki napada rakave celice brez povzročene škode za normalne celice (18).

1.2.3 Zaviralec vezave DNK 3, dominantni negativni protein vijačnica-zanka-vijačnica (*ID3*)

Gen *ID3* se nahaja na kratkem (p) kraku kromosoma 1 na poziciji 36. Protein, kodiran z genom *ID3*, je protein HLH, ki lahko tvori heterodimere z drugimi proteini HLH. *ID3* nima dovolj velike DNK-vezavne domene, zato zavira vezavo katerega koli proteina HLH na DNK, s katerim interagira. Bolezni, povezani z *ID3*, sta progresivna osifikantna fibrodisplazija in Rettov sindrom (19).

1.2.3.1 Progresivna osifikantna fibrodisplazija

To je bolezen, pri kateri se mišice in vezivno tkivo, kot so kite in vezi, postopoma nadomestijo s kostmi. Ta pogoj vodi do tvorbe kosti zunaj skeleta, ki omejujejo gibanje. Proces postane opazen v zgodnjem otroštvu, z začetkom na vratu in ramenih, nato se premika po telesu navzdol vse do okončin. Ljudje s to boleznijo se običajno rodijo z nenormalno velikimi prsti na nogah, kar je lahko v pomoč pri razjasnitvi diagnoze. Pri bolnikih, ki imajo poškodbo mišic (padec), invazivni medicinski postopek ali virusno bolezen, lahko sproži mišično oteklino, vnetje, temu pa sledi hitrejša rast kosti v ranjenih območjih (20).

1.2.3.2 Rettov sindrom

Gre za redko genetsko bolezen, ki povzroča razvojne in živčne sistemske težave, predvsem pri dekletih. Povezana je z avtizmom. V obdobju med 3. mesecem in 3. letom se prenehajo razvijati ter celo izgubijo nekaj spretnosti. Simptomi vključujejo izgubo govora, težave z ravnotežjem, dihanjem, učenjem, vedenjske težave. Nekateri simptomi se lahko pozdravijo z zdravljenjem, telesno in govorno terapijo (21).

1.2.4 Lipoproteinski receptor z nizko gostoto – sorodni protein 5 (*LRP5*)

Gen *LRP5* se nahaja na dolgem (q) kraku kromosoma 11 na poziciji 13.4. Vsebuje navodila za izdelavo proteina, ki je vgrajen v zunanjo membrano številnih tipov celic. Poleg tega ima protein pomembno vlogo pri razvoju in ohranitvi več različnih tkiv. V zgodnji fazi razvoja pomaga voditi celično specializacijo v mrežnici, ki je občutljiva na svetlobo tkiva na zadnjem delu očesa. Protein *LRP5* je vpleten tudi v vzpostavitev

prekrvavitve mrežnice in notranjega ušesa. Pomaga pa uravnovati tudi mineralno kostno gostoto, ki je merilo za količino kalcija in drugih mineralov v kosteh (22).

1.2.4.1 Družinska eksudativna vitreoretinopatija

Ugotovljenih je bilo več kot 15 mutacij v genu *LRP5* pri ljudeh z boleznijo oči, in sicer tako imenovano družinsko eksudativno vitreoretinopatijo. Nekatere izmed teh mutacij spremenijo aminokislino v proteinu *LRP5*, medtem ko druge vstavijo ali izbrišejo genski material v genu. Večina teh mutacij zmanjša količino funkcionalnega proteina *LRP5*. Zmanjšanje količine proteina *LRP5* moti kemično signalizacijo v razvoju očesa in tvorbo krvnih žil na robovih mrežnice. Rezultat nenormalnega dotoka krvi v tkivo lahko povzroči poškodbo mrežnice in izgubo vida. Ker protein *LRP5* igra vlogo tudi pri oblikovanju kosti, mutacije gena *LRP5* povzročajo zmanjšanje mineralne kostne gostote pri nekaterih ljudeh s to boleznijo (22).

1.2.4.2 Osteoporoza-pseudoglioma sindrom

Ljudje s tem sindromom imajo izredno nizko mineralno kostno gostoto in osteoporozo, kar vodi do več zlomov kosti. Prizadeti posamezniki imajo boleznijo oči, kar povzroča okvaro vida od rojstva ali zgodnjega otroštva naprej. Nekatere mutacije spremenijo posamezne aminokislino v proteinu *LRP5*. Taki proteini se ne vstavijo v zunanjo membrano celic, zaradi česar ne morejo opravljati svoje funkcije. Izguba proteina *LRP5* moti kemične signalne poti, ki so potrebne za oblikovanje kosti in normalen razvoj mrežnice. Ni pa jasno, zakaj nekatere mutacije gena *LRP5* vplivajo na razvoj oči, druge pa ne (22).

1.2.5 Kolagen tipa I, alfa 2 (*COL1A2*)

Gen *COL1A2* se nahaja na dolgem (q) kraku kromosoma 7 na položaju 22.1. Vsebuje navodila za izdelavo komponente velike molekule, imenovane kolagen tipa I. Kolageni sestavljajo družino proteinov, ki okrepijo in podpirajo mnogo tkiv v telesu, vključno s hrustancem, kostmi, kitam, kožo in beločnico. Kolagen tipa I je najpogostejša oblika kolagena v človeškem telesu. Gen proizvaja komponento kolagena tipa I, imenovano veriga pro-alfa2 (I). Tri verige skupaj (dve verigi pro-alfa1 (I), ki sta proizvedeni iz gena *COL1A1*, in ena veriga pro-alfa2 (I), ki je proizvedena iz gena *COL1A2*) tvorijo molekulo prokolagena tipa I. Te trojnovijačne molekule prokolagena, ki so podobne vrvi, morajo biti obdelane z encimi zunaj celic, pri čemer se te molekule uredijo v dolge, tanke fibrile, ki se

med sabo navzkrižno prepletajo v prostoru okrog celic. Rezultat navzkrižnega prepletanja pa so zelo močna, zrela vlakna kolagena tipa I (23).

1.2.5.1 Ehlers-Danlosov sindrom

Ta sindrom je skupina motenj, ki vplivajo na vezivno tkivo. To so tkiva, ki podpirajo kožo, kosti, krvne žile in druge organe. Napake v vezivnem tkivu povzročijo znake in simptome Ehlers-Danlosovega sindroma, ki se razlikujejo od rahlo ohlapnih sklepov do življenjsko nevarnih zapletov. V preteklosti je bilo prepoznanih več kot 10 vrst Ehlers-Danlosovega sindroma. Čeprav vse vrste vplivajo na sklepe in mnoge tudi na kožo, se značilnosti razlikujejo glede na vrsto (24). Vzrok za Ehlers-Danlosov sindrom tipa arthrochalasia so mutacije v genu *COL1A2*. Te mutacije, ki vplivajo na eno kopijo gena *COL1A2* v vsaki celici, odstranijo segment verige pro-alfa2 (I), ki povezuje eno kolagensko molekulo z drugo. Odsotnost tega segmenta preprečuje normalen sklop fibrilov kolagena tipa I in spreminja zamreženje med kolagenskimi molekulami. Te spremembe vplivajo predvsem na tkiva, ki so bogata s kolagenom tipa I, kot so koža, kosti in kite. Redko so zaznali tudi mutacije v obeh kopijah gena *COL1A2*, pri čemer nastane nefunkcionalna veriga pro-alfa2 (I). Zaradi tega se kolagenski fibrili ne morejo ustrezno oblikovati. Prisotnost nenormalnega kolagena je povezana z različnimi znaki in simptomi, vključno z ohlapnimi sklepi, srčnimi težavami in drugimi zapleti, ki so povezani z Ehlers-Danlosovim sindromom (23).

1.2.5.2 Osteogenesis imperfecta

Mutacije gena *COL1A2* občasno povzročijo osteogenesis imperfecta I, večina teh mutacij pa povzroči hujše oblike osteogenesis imperfecta, vključno z vrstami II, III in IV. Nekatere mutacije *COL1A2* odstranijo dele gena, kar vodi v verigo pro-alfa2 (I), ki manjka v kritičnih regijah. Druge genetske spremembe spremenijo zaporedje aminokislin v verigi pro-alfa2 (I), pri čemer je običajno glicin zamenjan z drugo aminokislino (23). Osteogenesis imperfecta je skupina genetskih motenj, ki prizadenejo predvsem kosti. Izraz "osteogenesis imperfecta" pomeni tvorbo nepopolnih kosti. Osebe s to boleznijo imajo kosti, ki se hitro zlomijo, pogosto zaradi blage travme ali brez očitnega vzroka. Za lažje oblike te bolezni, vključno z vrsto I, so značilni zlomi kosti v otroštvu in med odrasčanjem, ki so pogosto posledica manjše poškodbe. Imajo značilen moder ali siv odtenek dela očesa, ki je običajno bel (beločnica), v odrasli dobi pa lahko izgubijo sluh. Druge vrste so hujše in

povzročajo pogoste zlome kosti, ki se lahko začnejo že pred rojstvom. So nizke rasti, imajo težave z dihanjem, motnje v razvoju zob. Najhujše oblike osteogenesis imperfecta, predvsem vrsta II, lahko vključujejo nenormalno majhen prsni koš in nerazvita pljuča. Dojenčki s temi nepravilnostmi imajo smrtno nevarne težave z dihanjem in pogosto umrejo kmalu po rojstvu (25).

1.2.6 Naddružina receptorja tumornekroznega faktorja, člana 11b (*TNFRSF11B*)

TNFRSF11B je protein, ki je pri ljudeh kodiran z genom *TNFRSF11B*, in se nahaja na dolgem (q) kraku kromosoma 8 na poziciji 24.12. Osteoprotegerin ali TNFRSF11B je član naddružine receptorja tumornekroznega faktorja, ki je sestavljena iz proteinov in posreduje več bioloških odgovorov, kot so citotoksičnost, apoptoza, preživetje celic, proliferacija in diferenciacija. OPG ima dva znana družinska liganda TNF. Najbolj znan je ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, ki se običajno veže na njegov membranski receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (receptor activator of nuclear factor κ B-RANK). Pospešijo se procesi diferenciacije, aktivacije in preživetje osteoklastov. To poveča razgradnjo kostnine, kar vodi do zmanjšanja kostne mase in osteoporoze. OPG z vezavo na RANKL prepreči učinke RANKL. S tem zmanjša razgradnjo kostnine, kar vodi do povečanja kostne mase in osteopetroze (26).

Poleg osrednje vloge OPG pri kosteh so tudi v okviru ožilja poročali, da izpostavljenost mikro- in makro-vaskularnih endotelijskih celic vnetnim citokinom poveča izražanje in sproščanje OPG ter v zameno spodbuja adhezijo levkocitov in deluje kot kemotaktični faktor za monocite. Te ugotovitve močno podpirajo modulatorno vlogo OPG v hemostazi, vaskularne poškodbe in vnetja, kar kaže na vpletenost OPG pri vnetnih funkcijah endotelijskih celic (26).

1.2.6.1 Bolezni žil

Vedno večje število eksperimentalnih podatkov dokazuje, da so se serumske vrednosti OPG znatno zvišale pri bolnikih s sladkorno boleznijo in tistih brez nje zaradi boleznih koronarnih arterij z močnim povezovanjem med vrednostjo OPG ter prisotnostjo in resnostjo boleznih koronarnih arterij. Serumske vrednosti OPG so pokazale, da imajo napovedno vrednost pri srčnem popuščanju po akutnem miokardnem infarktu, enako pri

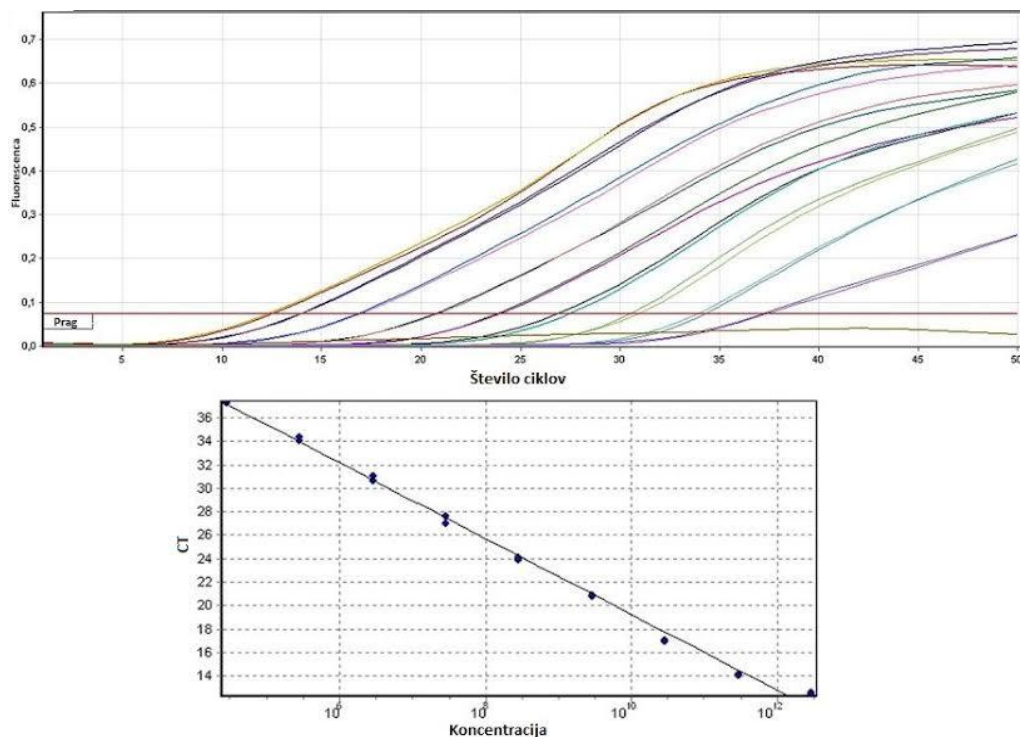
bolnikih s periferno arterijsko boleznijo. Trenutno ni jasno, ali ima OPG patogenetsko ali kompenzacijsko vlogo pri žilni disfunkciji in aterosklerozi (26).

1.2.6.2 Rak

Pokazalo se je, da so serumske vrednosti OPG zvišane pri različnih človekovih malignih obolenjih, zlasti pri bolnikih z napredovanjem raka. Pomembno je omeniti, da so bile vrednosti OPG zvišane v serumu pacientov z rakom prostate ali rakom dojke, ki metastazirajo do kosti. Presenetljivo so bile serumske vrednosti OPG zvišane pri vrstah tumorja, ki ne kažejo preferenčnega tropizma za kosti, kot so B-celice limfomov. Pri bolnikih z rakom mehurja pa je bilo ugotovljeno, da so vrednosti OPG povezane z visoko stopnjo in razredom tumorja (26).

1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (slika 1) je ena izmed zelo uporabnih metod in jo lahko uporabimo za absolutno kvantifikacijo, kot na primer določanje števila genov ali števila plazmidov na celico, in tudi v diagnostiki. Poleg tega metodo lahko uporabimo za relativno kvantifikacijo za študije genskega izražanja. Omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med reakcijo. Najpomembnejše pri tej metodi je, da pomnoževanje in detekcija potekata sočasno ter temeljita na merjenju fluorescence. Merimo nastali produkt v eksponentni fazi reakcije. Določimo prazno fluorescenco. To je fluorescenca, ki predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Ct-cikel je cikel, v katerem vzorec preide to mejo. Temu sledi, da so vrednosti Ct tako obratno sorazmerne z začetnim številom kopij matrične DNK (11).



Slika 1: Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (povzeto po 11)

Iz omenjenega izhaja, da detekcija verižne reakcije s polimerazo v realnem času temelji na merjenju fluorescence. Ločimo specifični in nespecifični način detekcije. Specifični način detekcije temelji na fluorescentnem resonančnem prenosu energije. Uporabljajo se označene sonde, ki se vežejo na tarčno DNK in v intaktnem stanju ne fluorescirajo. Pri nespecifični detekciji gre za detekcijo, ki temelji na vezavi barvil (SYBRGreen I® ali EvaGreen™) v nastajajočo dvojnovijačno DNK in povečanju fluorescence (11).

1.3.1 Študije genskega izražanja

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času je metoda, ki jo lahko uporabimo tudi za relativno kvantifikacijo, se pravi za študije genskega izražanja. Primerjamo izražanje genov med dvema neodvisnima populacijama. Iz tega razloga moramo uporabiti notranje kontrole, s pomočjo katerih rezultate najprej normaliziramo, šele nato jih primerjamo med sabo. Uporabljamo endogene kontrole, hišne gene, ki naj bi se ne glede na vplive izražali enako. Pri njihovi izbiri moramo biti pazljivi, saj je tudi za njih značilno, da so regulirani in da v določenih pogojih njihovo izražanje ni stabilno glede na različne vplive. Pozorni moramo biti tudi na izbiro predela, ki ga bomo pomnožili, saj ima veliko genov tudi svojo psevdogensko različico in lahko predstavlja lažno pozitiven signal (11).

2 NAMEN DELA

Hormonski motilci lahko posnemajo ali motijo delovanje hormonov v telesu in iz tega razloga imajo lahko negativne razvojne, reproduktivne, nevrološke in imunske učinke na živali in ljudi. Med hormonske motilce spadajo tudi bisfenoli, ki so razširjeni v našem bivalnem okolju.

Namen naloge je raziskati učinke bisfenolov na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COLIA2* in *TNFRSF11B*. Celice so bile bisfenolom s koncentracijo 10 nM izpostavljene največ 45 dni. Izbrana koncentracija je primerljiva z izpostavljenostjo ljudem. Raziskovali bomo tudi učinek bisfenolov v kombinaciji z estrogenom, učinek samega estrogena in bisfenol-3,4-kinona na izraženost preiskovanih genov.

Gene, katerih izražanje bomo raziskovali z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času, smo izbrali na osnovi rezultatov, pridobljenih z uporabo mikromrež. Časovno bomo izraženost genov preverjali po 8 urah, 24 urah, 72 urah in 45 dneh. Izjema so BPA, BPS in BPAF. Pri BPA-3,4-Q pa bomo izraženost genov preverjali krajše časovno obdobje, in sicer po 1 uri, 4 urah, 8 urah, 24 urah ter 72 urah.

Zanimali nas bodo učinek bisfenolov na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COLIA2* in *TNFRSF11B* ter razlike med učinki določenih bisfenolov. Poleg tega pa bomo raziskovali še učinke bisfenolov v kombinaciji z estrogenom, učinek samega estrogena in BPA-3,4-Q na izraženost preiskovanih genov ter določili morebitne vplive bisfenolov na zdravje prek spremenjenega izražanja teh genov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN NAPRAVE

3.1.1 Celične kulture

- ✓ Celične kulture; ATCC, CRL-1543, HOS, Manassas, USA
- ✓ Vsebniki za celične kulture in plastični potrošni material; TPP, Techno Plastic Products AG, CH
- ✓ Inkubator (37 °C, 5 % CO₂)
- ✓ Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM); Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Gojišče vsebuje:

- ✓ Aminokisliline
 - ✓ Soli (kalcijev klorid, kalijev klorid, magnezijev sulfat, natrijev klorid, mononatrijev fosfat)
 - ✓ Glukozo
 - ✓ Vitamine (folna kislina, nikotinamid, riboflavin, B12)
-
- ✓ 10-odstotni goveji serum (FBS); Invitrogen, Life Technologies, Gibco, Paisley, UK
 - ✓ L-glutamin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ Tripsin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ Penicilin-G; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ Streptomycin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ BPA 99 %; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ BPS 98 %; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ BPAF 97 %; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ Estrogen; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 - ✓ BPA-3,4-Q (sintetiziran na Fakulteti za farmacijo)

3.1.2 Izolacija RNK

- ✓ QIAzol Lysis reagent (reagent za izolacijo RNK); Qiagen, Valencia, CA, USA
- ✓ QIAcube; Qiagen, Valencia, CA, USA

- ✓ Čistilni kit RNeasy MinElute Clean-up kit; Qiagen, Valencia, CA, USA
- ✓ Agilent Bioanalyzer2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
- ✓ NanoDrop spektrofotometer; NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA

3.1.3 Analiza na mikromrežah

- ✓ Illumina TotalPrep™-96 RNA Amplification kit; Life Technologies
- ✓ T7 Oligo(dT) začetnik
- ✓ Čip DirectHyb HumanHT-12 v4 Expression BeadChip; Illumina, San Diego, CA, USA
- ✓ Streptavidin-Cy3 (barvilo)
- ✓ Illumina iScan reader

3.1.4 Reverzna transkripcija

- ✓ NanoDrop spektrofotometer; NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA
- ✓ High Capacity cDNA Reverse Transcription kit; Applied Biosystems, Foster City, CA
- ✓ Termoblok

3.1.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

- ✓ SYBR Select Master Mix; Applied Biosystems, USA
- ✓ Deionizirana H₂O (dH₂O)
- ✓ 200 nM istosmernih in obratnosmernih začetnikov za gene *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2*, *TNFRSF11B*, ribosomalni protein, veliki, P0; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
- ✓ LightCycler 480 II; Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA

Preglednica II: Istosmerni in obratnosmerni začetniki, uporabljeni v verižni reakciji s polimerazo v realnem času

Gen	Istosmerni začetnik	Obratnosmerni začetnik
<i>RUNX2</i>	5'- AGGCGGTCAGAGAACAAAC -3'	5'- CTCACAAATCCTCCCAAGT -3'
<i>ID1</i>	5'- CCTGATGTAGTCGATGACGTG -3'	5'- GCTGTTACTCACGCCTCAAG -3'
<i>ID3</i>	5'- GCGGATTCAAAGAATGAGGAAG -3'	5'- CTGGAAGTTAATGGTTTTGAGTGA -3'
<i>LRP5</i>	5'- GCTGTAGATGTCGATGCTGAG -3'	5'- AGAACATCAAGCGAGCCAA -3'
<i>COL1A2</i>	5'- CCTTCAATCCATCCAGACCAT -3'	5'-GTGAGAGAGGAGTTGTTGGAC -3'
<i>TNFRSF11B</i>	5'- CTACCAAGACACTAAGCCAGT -3'	5'- AAACAGTGAATCAACTCAAAAATGTG -3'
<i>RPLP0</i>	5'- TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT -3'	5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG -3'

3.1.6 Ostalo

- ✓ Ploščice s 96 vdolbinicami za reverzno transkripcijo
- ✓ Pokrovčki za ploščice za reverzno transkripcijo
- ✓ Tipsi za pipete
- ✓ Ročne pipete; Eppendorf, Hamburg, Germany
- ✓ Elektronska pipeta; Transferpette® electronic
- ✓ Elektronska multikanalna pipeta; Eppendorf, Hamburg, Germany
- ✓ Ploščice s 384 vdolbinicami za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času
- ✓ Epruvete; Eppendorf, Hamburg, Germany
- ✓ Folija za zapiranje ploščice za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času
- ✓ Rokavice
- ✓ Centrifuga

3.2 METODE

3.2.1 Celične kulture

Asistentka Anja Fic, mlada raziskovalka, je pripravila celične kulture in uporabila človeške osteosarkomske celice (HOS-celice). Gojila jih je v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in atmosferi s 5-odstotnim CO₂. Z medijem DMEM, 10-odstotnim govejim serumom (FBS),

2-milimolarnim L-glutaminom ter raztopino antibiotika in antimikotika, ki je vsebovala 100 enot/mL penicilina-G in 100 µg/mL streptomicina, je redno vzdrževala celice, ki so bile nato izpostavljene BPA, BPS, BPAF, kombinacijam BPA, BPS, BPAF z estrogenom, estrogenu in BPA-3,4-Q. Koncentracije bisfenolov so bile v vseh primerih 10 nM. Kot kontrola so služile celice, ki niso bile izpostavljene nobenemu izmed teh dejavnikov. Vse vzorce, vključno s kontrolo, je pripravila v treh bioloških ponovitvah. Časi izpostavljenosti so bili, razen pri izpostavljenosti BPA, BPS in BPAF, 8 ur, 24 ur, 72 ur in 45 dni. Pri BPA-3,4-Q so bili časi izpostavljenosti 1 ura, 4 ure, 8 ur, 24 ur in 72 ur (27).

3.2.2 Izolacija RNK

Z reagentom QIAzol Lysis reagent je izvedla izolacijo RNK. Sledilo je avtomatsko čiščenje na QIAcube s čistilnim kitom RNeasy MinElute Clean-up kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Agilent Bioanalyzer2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) in NanoDrop spektrofotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) pa je uporabila za kvantifikacijo in oceno kakovosti izolirane RNK (27).

3.2.3 Analiza na mikromrežah

Za biotinizacijo in pomnožitev cRNK za hibridizacijo je uporabila Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification kit (Life Technologies). Z uporabo T7 Oligo(dT) začetnika, ki vsebuje T7-promotorsko zaporedje je izolirano RNK iz vsakega vzorca prevedla v dvojnovijačno cDNK. Nato je dvojnovijačno cDNK očistila in uporabila za *in vitro* transkripcijo, ki vključuje z biotinom označene nukleotide. Na koncu je z biotinom označeno cRNK očistila in hibridizirala na mikromreže po navodilih proizvajalca (27).

Čip DirectHyb HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), ki pokrije 47,231 transkripcij, je uporabila za analizo genskega izražanja celotnega genoma. Po neposredni hibridizaciji je mikromreže sprala, obarvala z barvilom streptavidin-Cy3 in skenirala (detektirala) z uporabo Illumina iScan reader (27).

Pridobljene rezultate z uporabo mikromrež je obdelala, da so bili skladni s standardi MIAME. Nato jih je posredovala GEO-bazi podatkov. Na koncu je izvedla še verižno reakcijo s polimerazo v realnem času in na ta način rezultate potrdila (validirala) (27).

Zaradi visoke cene analize na mikromrežah je analizirala samo kontrole po 8 urah in 3 mesecih ter vzorce, ki so bili tretirani z BPA, BPS in BPAF po 8 urah in 3 mesecih. Z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo nato analizirali vse ostale vzorce. Gene, katerih izražanje smo preučevali z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času, smo izbrali na osnovi rezultatov, pridobljenih z uporabo mikromrež.

3.2.4 Reverzna transkripcija

Z uporabo High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) smo RNK iz vzorcev prevedli v cDNK. Šele nato smo lahko izvedli verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Z NanoDrop spektrofotometrom (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) smo najprej pomerili vzorčke in tako dobili koncentracije RNK v njih. V ploščici s 96 vdolbinicami smo te vzorčke razredčili z vodo, in sicer tako da smo dobili volumen 10 μL , ki vsebuje 200 ng RNK/ μL . Temu smo dodali 10 μL predhodno pripravljene master mixa. Ploščice smo zaprli in na kratko centrifugirali, da smo vsebino spravili na dno vdolbinic in se znebili zračnih mehurčkov. Ploščice smo na koncu dali v termoblok in potekla je reverzna transkripcija po predpisanem programu.

3.2.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Uporabili smo ploščice s 384 vdolbinicami, v katerih smo pripravili reakcijsko zmes, ki je bila sestavljena iz 2 μL 20-krat razredčenega produkta reverzne transkripcije, 2,75 μL dH_2O , 5 μL SYBR Select Master Mix in 0,25 μL oligonukleotidnih začetnikov (preglednica II). Reakcijski volumen je bil 10 μL . Vzorčke smo na ploščico nanesti v treh ponovitvah. Na ploščico smo dodali tudi negativno kontrolo, ki je bila sestavljena iz dH_2O , SYBR Select Master Mix in oligonukleotidnih začetnikov. Na ploščico smo jo nanesti prav tako v treh ponovitvah. Vzorčki so bile cDNK, pripravljene iz mRNK, izolirane iz človeških osteosarkomskih celic. Ti vzorčki so bili izpostavljeni preiskovanim bisfenolom, kombinacijam bisfenolov z estrogenom, estrogenu, BPA-3,4-Q in celicam, ki niso bile izpostavljene ničemu od naštetega in so predstavljale kontrolo. Na koncu smo pripravljene ploščice zaprli s folijo in jih na kratko centrifugirali.

S pomočjo naprave LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA) smo izvedli reakcijo, in sicer smo po začetni 2-minutni inkubaciji pri 95 $^{\circ}\text{C}$ izvedli

40 ciklov pomnoževanja, pri čemer je bil vsak cikel sestavljen iz 3 faz. Prva faza je potekala 15 sekund pri 95 °C, druga 15 sekund pri 58 °C, tretja pa 20 sekund pri 72 °C. Po končanem pomnoževanju je sledilo dokazovanje specifičnosti, ki smo jo dokazovali z določanjem talilne krivulje.

3.2.6 Obdelava podatkov

Rezultate verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo dobili v obliki vrednosti Ct. To so cikli, v katerih je fluorescenca preseгла prazno fluorescenco. Prazna fluorescenca predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Iz Ct-vrednosti smo s pomočjo umeritvenih krivulj (dobili smo jih z uporabo standardov) izračunali koncentracije za tri tehnične ponovitve in njihovo povprečno vrednost. Izračunali smo tudi standardno deviacijo za koncentracije treh tehničnih ponovitev. Rezultate smo normalizirali tako, da smo povprečne vrednosti koncentracij treh tehničnih ponovitev za posamezni gen delili s povprečnimi vrednostmi koncentracij treh tehničnih ponovitev za hišni gen, ki je bil RPLP0 in smo ga uporabili kot endogeno kontrolo za normalizacijo rezultatov. Temu je sledil izračun povprečne vrednosti normaliziranih rezultatov treh bioloških ponovitev in normalizirane standardne deviacije. S pomočjo teh izračunov smo izračunali razmerje, ki je vrednost, ki nam pove, za kolikokrat se poveča oziroma zmanjša izražanje preiskovanega gena glede na kontrolo, pri čemer kontrolo predstavljajo celice, ki niso bile izpostavljene nobenemu izmed bisfenolov, estrogenu in BPA-3,4-Q. Izračunamo ga kot razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za vzorec in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo. Poleg omenjenega razmerja nas je zanimala tudi recipročna vrednost, ki nam pri genih, katerih izražanje je zmanjšano, pove, za kolikokrat se to zmanjša. Statistično analizo rezultatov smo izvedli z uporabo t-testa, kjer smo za stopnjo tveganja vzeli vrednost 0,05. S t-testom smo primerjali izražanje preiskovanega gena v primerjavi s kontrolo. Izračunali smo tudi standardno napako. Končne rezultate smo predstavili v preglednicah in v obliki grafov.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIMERJANJE UČINKOV BISFENOLOV NA IZRAŽENOST *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* IN *TNFRSF11B*

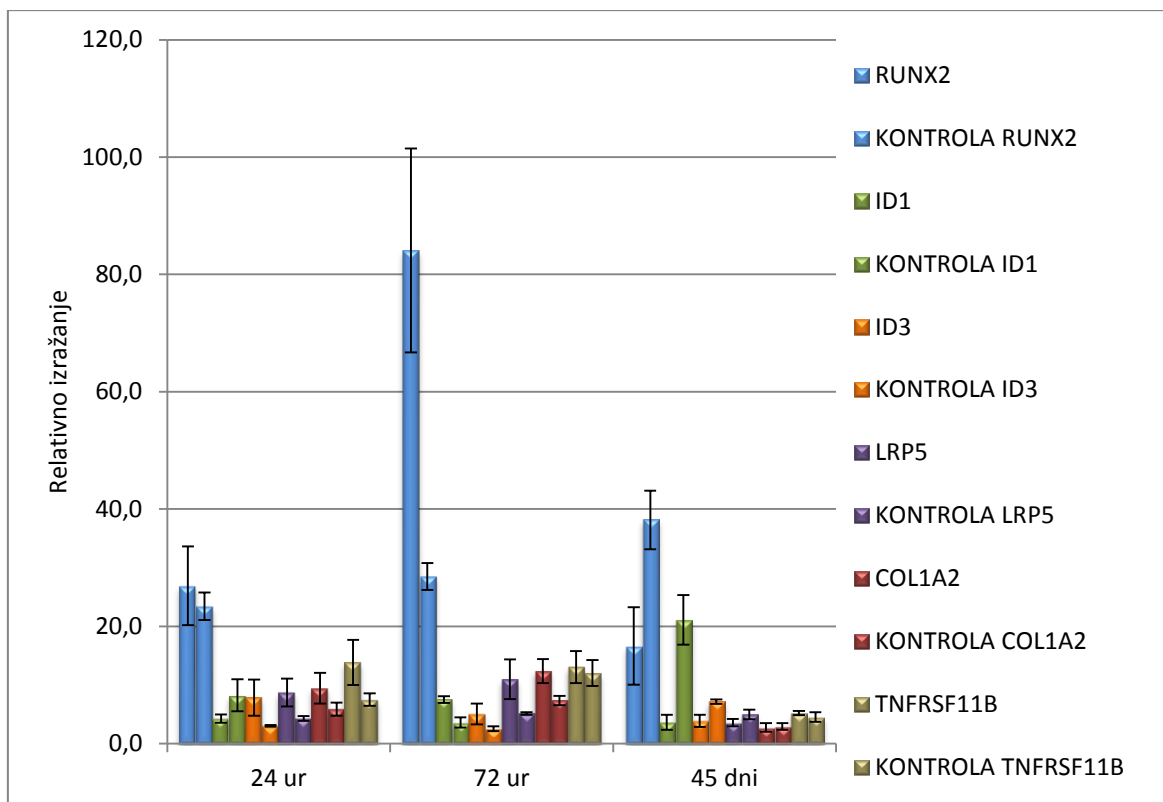
V preiskovanih celicah smo raziskovali učinke bisfenolov na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B*. Celice so bile bisfenolom s koncentracijo 10 nM izpostavljene največ 45 dni. Izbrana koncentracija je primerljiva z izpostavljenostjo ljudem. Izraženost preiskovanih genov smo raziskovali s pomočjo analize metode, ki je opisana v podpoglavju 3.2.5.

Pri izpostavljenosti celic BPA preiskovanim genom zaznamo 4 spremembe (preglednica III in slika 2), kjer je izraženost genov 2-krat povečana in 2-krat zmanjšana. Spremembe se pojavijo pri genih *RUNX2*, *ID1* in *ID3*. Največkrat se sprememba pojavi pri *ID1*, kjer je po 72 urah izraženost gena povečana in po 45 dneh zmanjšana. Genu *RUNX2* se po 72 urah najbolj poveča izraženost (za 3,0-krat), medtem ko se genu *ID1* po 45 dneh ta najbolj zmanjša (za 5,9-krat). Prvi spremembi zaznamo po 72 urah pri *RUNX2* in *ID1*, čemur sledita spremembi pri *ID1* in *ID3* po 45 dneh, kar je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic BPA. Razvidno je, da po 72 urah in 45 dneh zaznamo enako število sprememb. Učinka BPA na izraženost *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica III: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPA

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
24 ur	1,15	0,52	2,58	2,03	1,61	1,84
72 ur	2,95*	2,08*	1,99	2,13	1,68	1,08
45 dni	0,44	0,17*	0,54*	0,72	0,95	1,15

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



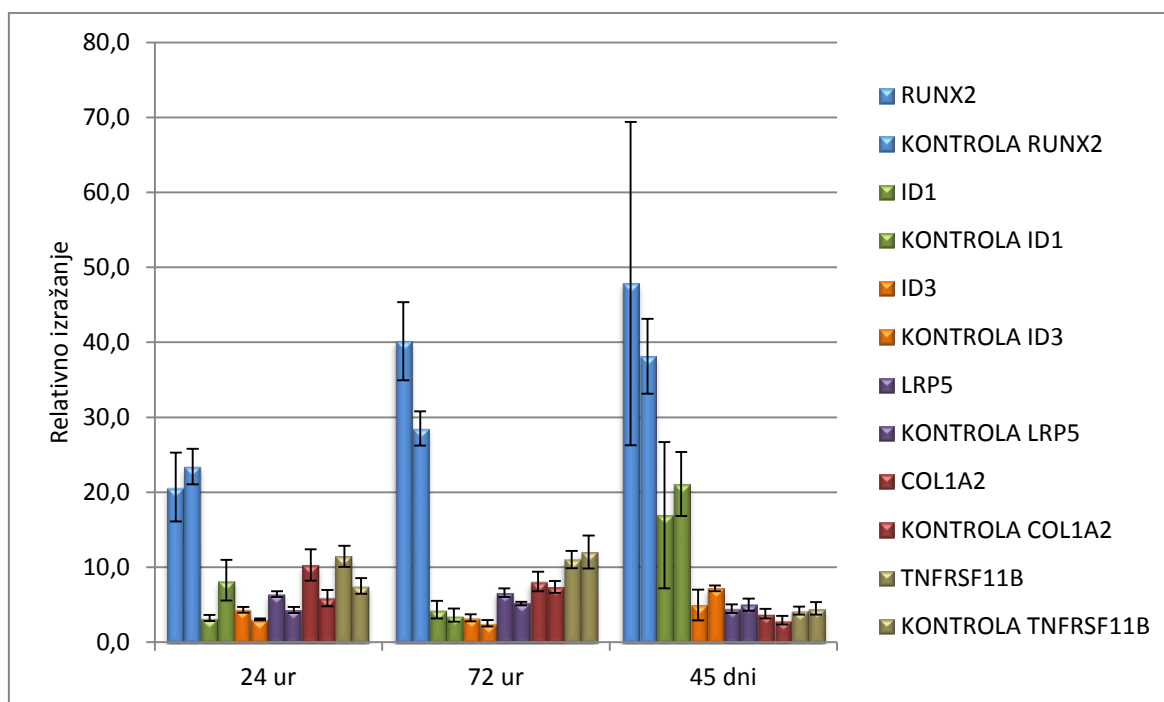
Slika 2: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPA

Pri izpostavljenosti celic BPS preiskovanim genom zaznamo 2 spremembi (preglednica IV in slika 3), kjer je izraženost genov povečana. Spremembi se pojavita pri genih *ID3* in *LRP5*. Genu *LRP5* se po 24 urah najbolj poveča izraženost (za 1,5-krat). Prvi in edini spremembi zaznamo po 24 urah, ko je izraženost *ID3* in *LRP5* povečana. Učinka BPS na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica IV: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPS

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
24 ur	0,88	0,39	1,42*	1,50*	1,75	1,53
72 ur	1,41	1,20	1,28	1,28	1,10	0,92
45 dni	1,25	0,80	0,69	0,90	1,30	0,93

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



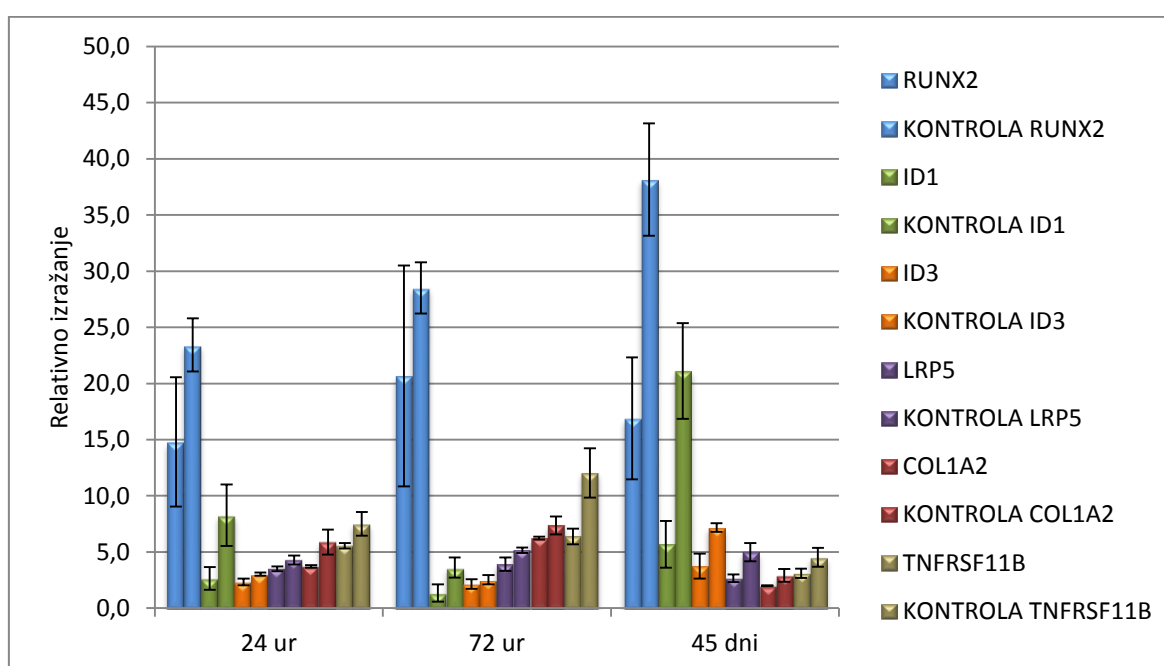
Slika 3: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPS

Tako kot pri BPS tudi pri izpostavljenosti celic BPAF preiskovanim genom zaznamo 2 spremembi (preglednica V in slika 4), vendar je tu izraženost genov zmanjšana. Spremembi se pojavita pri genih *IDI* in *ID3*. Genu *IDI* se po 45 dneh najbolj zmanjša izraženost (za 3,7-krat). Prvi in edini spremembi zaznamo po 45 dneh, kar je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic BPAF. Učinka BPAF na izraženost *RUNX2*, *LRP5*, *COLIA2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica V: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPAF

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
24 ur	0,63	0,32	0,76	0,82	0,63	0,74
72 ur	0,72	0,37	0,85	0,76	0,85	0,53
45 dni	0,44	0,27*	0,52*	0,53	0,69	0,69

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



Slika 4: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPAF

Pri primerjanju učinkov bisfenolov na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah smo ugotovili določene podobnosti in razlike med posameznimi bisfenoli. Glede na število sprememb, ki se pojavijo pri posameznem bisfenolu, se sprememba največkrat pojavi pri BPA. Enako število sprememb zaznamo pri BPS in BPAF. Zanimivo je, da se samo pri genu *ID3* sprememba pojavi pri vseh treh bisfenolih. Do razlik med posameznimi bisfenoli prihaja tudi v jakosti sprememb. Pri BPA se genu *ID1* po 45 dneh najbolj zmanjša izraženost (za 5,9-krat), medtem ko se pri BPS genu *LRP5* po 24 urah ta najbolj poveča (za 1,5-krat). Nazadnje pa se pri BPAF genu *ID1* po 45 dneh najbolj zmanjša izraženost (za 3,7-krat). Ugotovili smo, da po času zaznamo prve spremembe po 24 urah pri izpostavljenosti celic BPS. Sledijo spremembe po 72 urah pri izpostavljenosti celic BPA. Nazadnje pa zaznamo spremembe po 45 dneh pri izpostavljenosti celic BPAF. Razvidno je, da imajo različni bisfenoli glede na čas različne učinke, saj ima največji učinek na izraženost preiskovanih genov BPS, najmanjšega pa BPAF. Pri časovni odvisnosti učinka BPA na izraženost preiskovanih genov opazimo, da gre za neki vzorec, saj je izraženost genov pri izpostavljenosti celic BPA po 72 urah povečana in nato po 45 dneh zmanjšana. Zanimivo je tudi, da pri izpostavljenosti celic BPS zaznamo pri preiskovanih genih povečano izraženost. Nasprotno pa pri izpostavljenosti celic BPAF zaznamo pri preiskovanih genih zmanjšano izraženost. S časom se povečuje tudi število sprememb. Tako se največje število sprememb pojavi po 45 dneh. Poleg tega smo že omenili, da do največje spremembe v jakosti pride pri BPA. Pomemben podatek je, da do tega pride po 45 dneh, kar je hkrati čas najdaljše izpostavljenosti celic bisfenolom.

4.2 MODULIRANJE UČINKOV BISFENOLOV S STRANI ESTROGENA NA IZRAŽENOST *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* IN *TNFRSF11B*

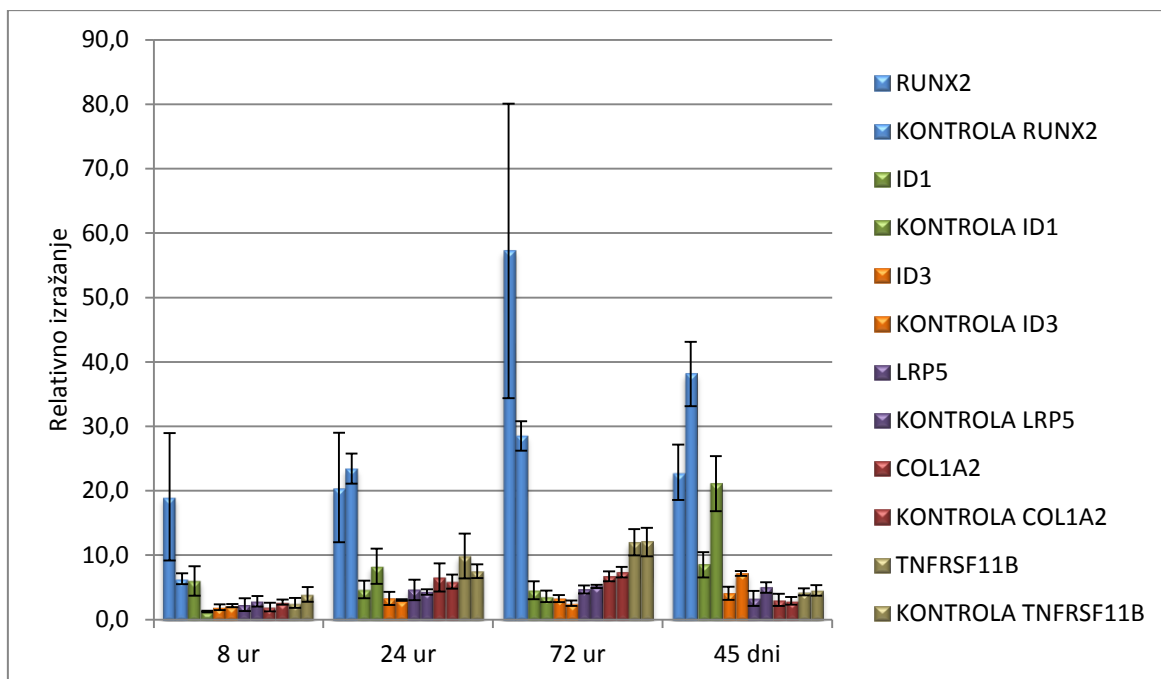
Da bi določili učinek estrogena na delovanje bisfenolov ter posledično izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B*, smo preiskovane celice izpostavili različnim bisfenolom v kombinaciji z estrogenom. Celice so bile bisfenolom v kombinaciji z estrogenom s koncentracijo 10 nM izpostavljene največ 45 dni. Izbrana koncentracija je primerljiva z izpostavljenostjo ljudem. Izraženost preiskovanih genov smo raziskovali s pomočjo analizne metode, ki je opisana v podpoglavju 3.2.5.

Pri izpostavljenosti celic estrogenu preiskovanim genom zaznamo samo 1 spremembo (preglednica VI in slika 5), kjer je izraženost gena zmanjšana. Sprememba se pojavi pri genu *ID3*. Prvo in edino spremembo zaznamo po 45 dneh, kar je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic estrogenu. Učinka estrogena na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica VI: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic estrogenu

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	3,00	4,76	0,89	0,81	0,72	0,67
24 ur	0,87	0,57	1,09	1,08	1,11	1,32
72 ur	2,01	1,26	1,28	0,91	0,91	1,00
45 dni	0,60	0,40	0,57*	0,66	1,04	0,95

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



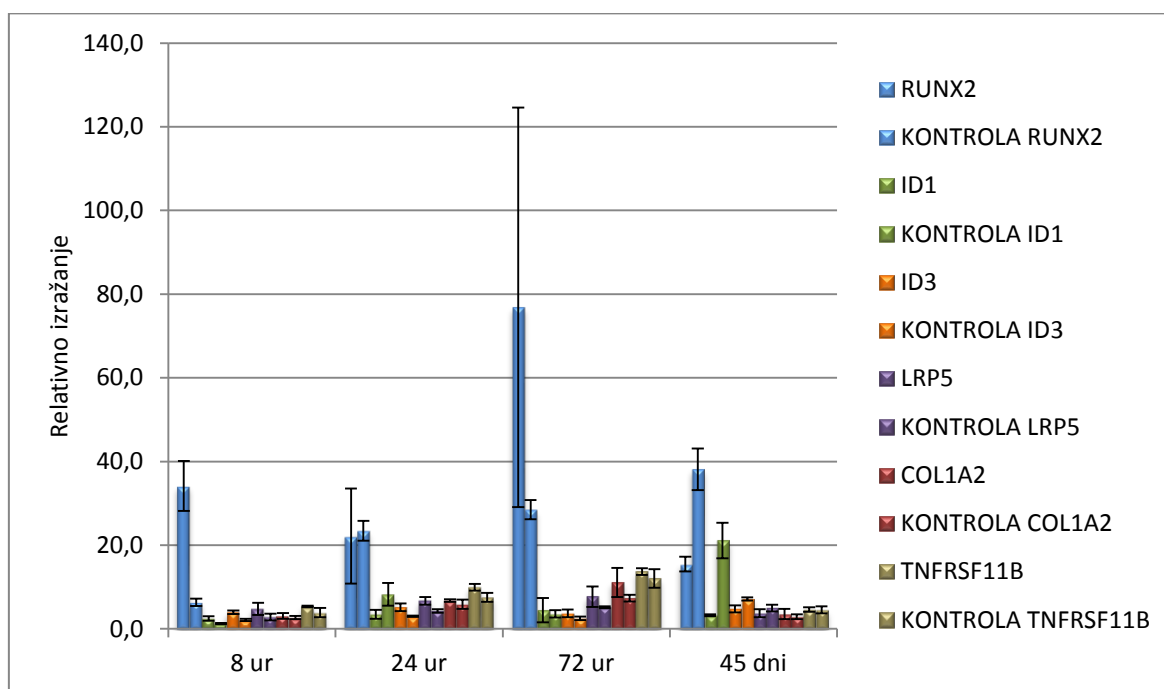
Slika 5: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic estrogenu

Pri izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom preiskovanim genom zaznamo 3 spremembe (preglednica VII in slika 6), kjer je izraženost genov 1-krat povečana in 2-krat zmanjšana. Spremembe se pojavijo pri genih *RUNX2* in *ID1*. Največkrat se sprememba pojavi pri *RUNX2*, in sicer je po 8 urah izraženost gena povečana in po 45 dneh zmanjšana. Genu *RUNX2* se po 8 urah najbolj poveča izraženost (za 5,4-krat), medtem ko se genu *ID1* po 45 dneh ta najbolj zmanjša (za 6,7-krat). Prvo spremembo zaznamo po 8 urah pri *RUNX2*, sledita spremembi pri *RUNX2* in *ID1* po 45 dneh, kar je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom. Razvidno je, da po 45 dneh zaznamo največje število sprememb. Učinka BPA v kombinaciji z estrogenom na izraženost *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica VII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	5,37*	1,98	1,85	1,68	1,14	1,38
24 ur	0,95	0,42	1,70	1,56	1,15	1,32
72 ur	2,70	1,24	1,46	1,49	1,50	1,14
45 dni	0,41*	0,15*	0,66	0,75	1,22	1,02

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



Slika 6: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom

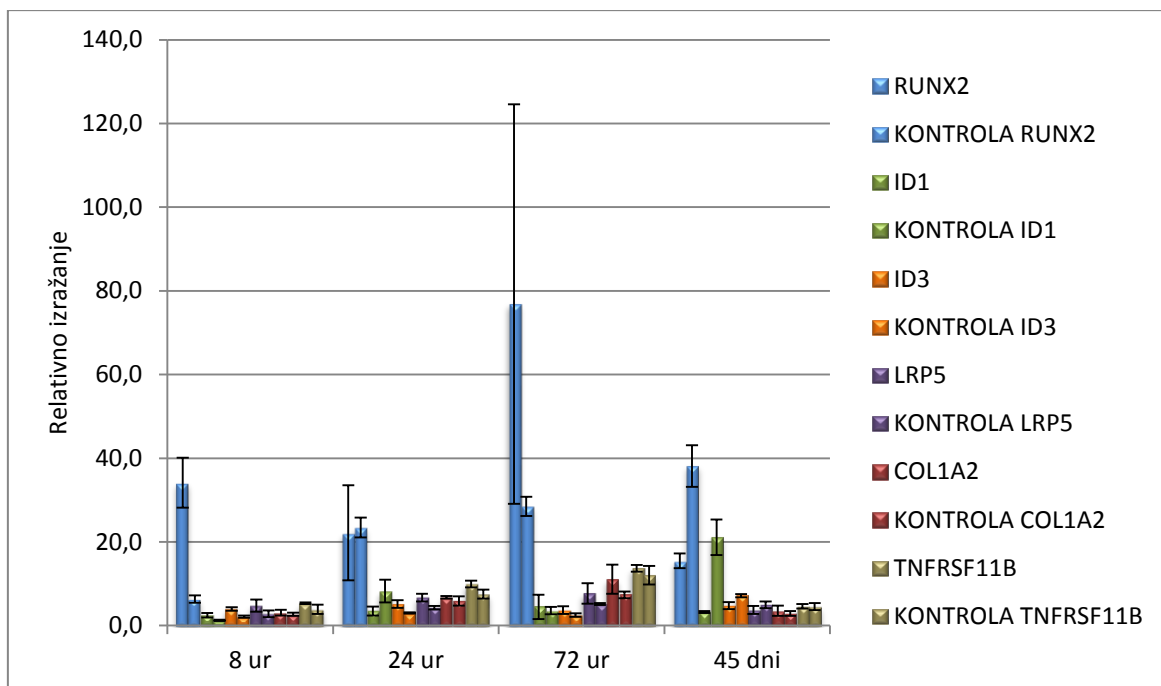
Pri izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom preiskovanim genom zaznamo 4 spremembe (preglednica VIII in slika 7), kjer je izraženost genov 2-krat povečana in 2-krat zmanjšana. Spremembe se pojavijo pri genih *RUNX2*, *ID1*, *ID3* in *LRP5*. Genu *ID3* se po 72 urah najbolj poveča izraženost (za 1,7-krat), medtem ko se genu *ID1* po 45 dneh

ta najbolj zmanjša (za 7,1-krat). Prvo spremembo zaznamo po 24 urah pri *RUNX2*, sledita spremembi po 72 urah pri *ID3* in *LRP5*, nazadnje pa zaznamo spremembo pri *ID1* po 45 dneh, kar je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom. Razvidno je, da po 72 urah zaznamo največje število sprememb. Učinka BPS v kombinaciji z estrogenom na izraženost *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica VIII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	2,20	1,20	1,20	1,23	1,10	1,30
24 ur	0,44*	0,43	1,74	1,58	1,60	1,23
72 ur	2,13	0,84	1,70*	1,65*	1,49	1,30
45 dni	0,58	0,14*	0,57	0,93	1,40	1,15

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



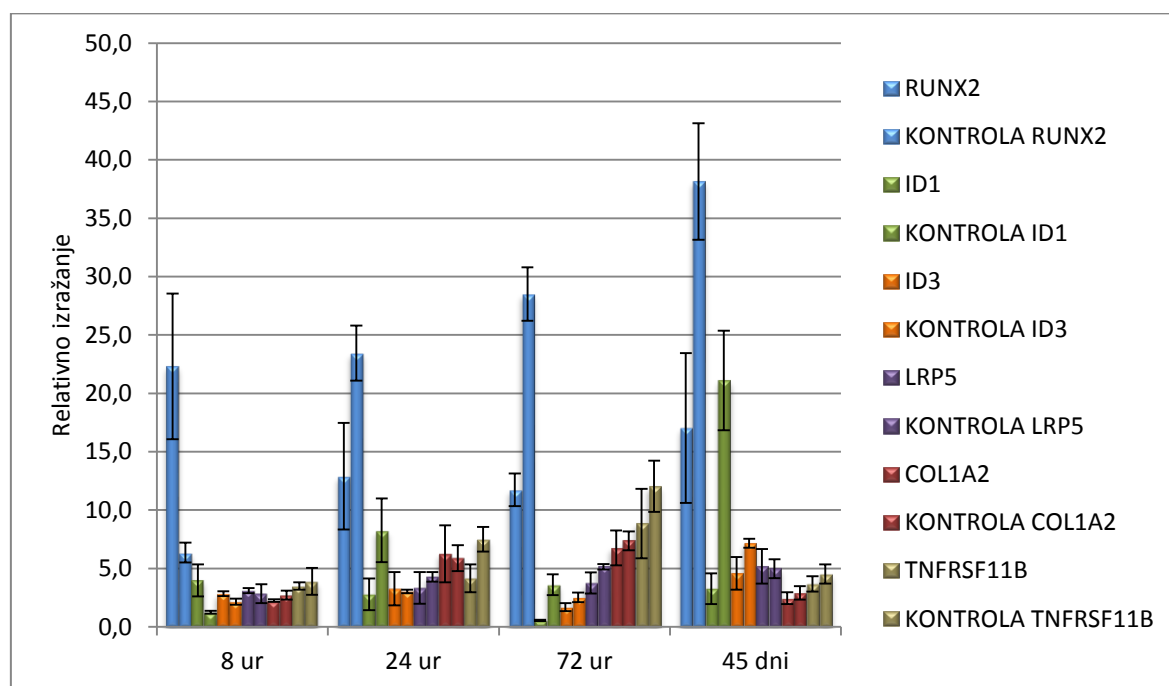
Slika 7: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom

Pri izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom preiskovanim genom zaznamo 3 spremembe (preglednica IX in slika 8), kjer je izraženost genov zmanjšana. Spremembe se pojavijo pri genih *RUNX2* in *ID1*. Največkrat se sprememba pojavi pri *ID1*, in sicer je po 72 urah in 45 dneh izraženost gena zmanjšana. Genu *ID1* se po 72 urah in 45 dneh najbolj zmanjša izraženost (za 6,7-krat). Prvi spremembi zaznamo po 72 urah pri *RUNX2* in *ID1*, sledi sprememba pri *ID1* po 45 dneh, kar je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom. Razvidno je, da po 72 urah zaznamo največje število sprememb. Učinka BPAF v kombinaciji z estrogenom na izraženost *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica IX: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	3,51	3,16	1,31	1,09	0,83	0,90
24 ur	0,87	0,34	1,07	0,78	1,06	0,55
72 ur	0,41*	0,15*	0,66	0,73	0,92	0,74
45 dni	0,45	0,15*	0,64	1,04	0,84	0,81

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



Slika 8: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom

Pri moduliranju učinkov bisfenolov s strani estrogena na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B* v preiskovanih celicah smo ugotovili določene podobnosti in razlike med bisfenoli in bisfenoli v kombinaciji z estrogenom. Glede na število sprememb se jih največ pojavi pri izpostavljenosti celic bisfenolom v kombinaciji z estrogenom. Skupno število sprememb je 10, in sicer je v 7 primerih izraženost preiskovanih genov zmanjšana in v 3 primerih povečana. Pri izpostavljenosti celic bisfenolom je skupno število sprememb 8. Tu je v polovici primerov izraženost preiskovanih genov zmanjšana in v polovici povečana. Iz tega je razvidno, da je pri izpostavljenosti celic, kjer učinek bisfenolov modulira estrogen, več primerov, ko je izraženost preiskovanih genov zmanjšana. Vzrok lahko poiščemo v estrogenu, saj se pri izpostavljenosti celic estrogenu izraženost zmanjša. Po času zaznamo največ sprememb po 45 dneh pri izpostavljenosti celic bisfenolom-to je hkrati tudi čas najdaljše izpostavljenosti celic. Pri izpostavljenosti celic bisfenolom v kombinaciji z estrogenom pa zaznamo največ sprememb po 72 urah in 45 dneh. Estrogen v času 8 ur, 24 ur in 72 ur nima učinka na izraženost preiskovanih genov. Zanimivo je, da dodatek estrogena bisfenolom zmanjša izraženost *ID1* po 45 dneh, saj je to čas, ko tudi sam estrogen vpliva na izraženost preiskovanih genov. Pri izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom je po 72 urah izraženost *ID1* zmanjšana, pri BPAF pa spremembe pri tem genu in času ne zaznamo. Pri moduliranju učinkov BPAF in BPA s strani estrogena pri 45-dnevni izpostavljenosti celic je izraženost *ID1* bolj zmanjšana kot pri BPAF in BPA. Razvidno je, da estrogen modulira učinek bisfenolov v času (45 dni), ko tudi sam vpliva na izraženost preiskovanega gena. Kot smo že omenili, je pri moduliranju učinkov BPAF in BPA s strani estrogena pri 45-dnevni izpostavljenosti celic izraženost *ID1* bolj zmanjšana kot pri BPAF in BPA. Na podlagi dobljenih rezultatov težko ugotovimo, za kakšne učinke gre pri kombinaciji bisfenolov z estrogenom, vendar v tem primeru lahko trdimo, da gre za sinergizem.

4.3 UČINEK BPA-3,4-Q NA IZRAŽENOST *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* IN *TNFRSF11B*

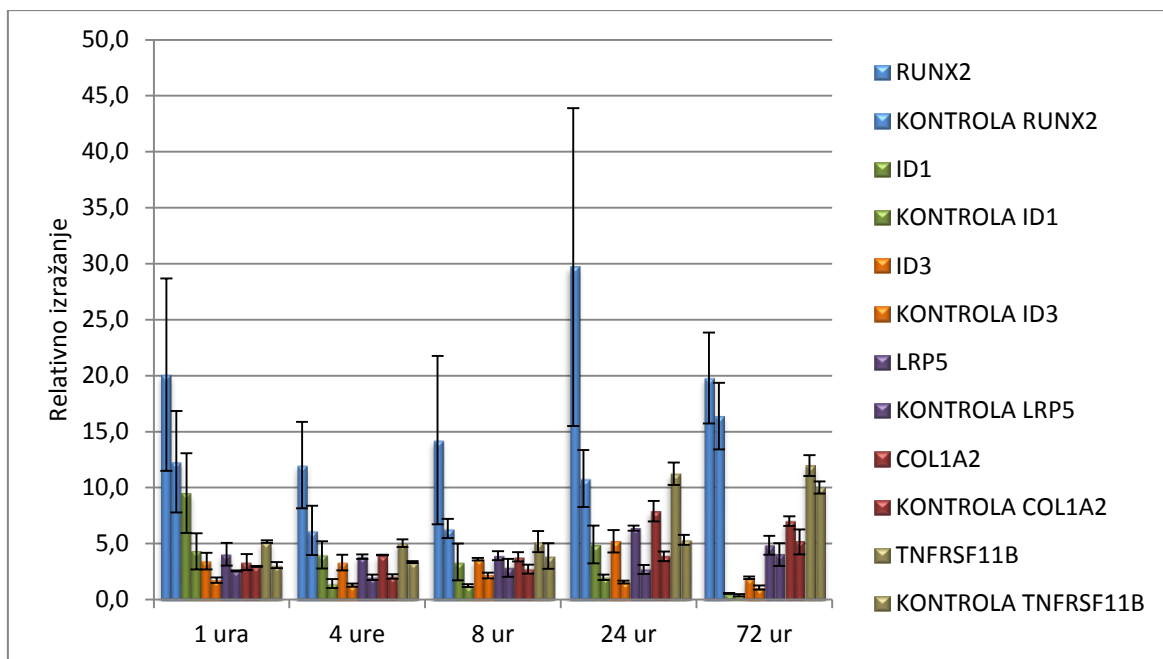
BPA se v organizmu lahko metabolizira do BPA-3,4-Q. Iz tega razloga smo v preiskovanih celicah raziskovali učinek BPA-3,4-Q na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B*. Celice so bile BPA-3,4-Q s koncentracijo 10 nM izpostavljene največ 72 ur. Izbrana koncentracija je primerljiva z izpostavljenostjo ljudem. Izraženost preiskovanih genov smo raziskovali s pomočjo analizne metode, ki je opisana v podpoglavju 3.2.5.

Pri izpostavljenosti celic BPA-3,4-Q preiskovanim genom zaznamo 4 spremembe (preglednica X in slika 9), kjer je izraženost genov povečana. Spremembe se pojavijo pri genih *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B*. Največkrat se sprememba pojavi pri *LRP5*, in sicer je po 4 urah in tudi po 24 urah izraženost gena povečana. Genu *LRP5* se po 24 urah najbolj poveča izraženost (za 2,4-krat). Prvo spremembo zaznamo že po 1 uri pri *TNFRSF11B*, sledita spremembi po 4 urah pri *LRP5* in *COL1A2*, nazadnje pa zaznamo spremembo po 24 urah pri *LRP5*. Razvidno je, da po 4 urah zaznamo največje število sprememb. Učinka BPA-3,4-Q na izraženost *RUNX2*, *ID1* in *ID3* v preiskovanih celicah nismo zaznali, saj ni prišlo do nobene statistično značilne spremembe.

Preglednica X: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za gen in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri izpostavljenosti celic BPA-3,4-Q

ČAS/GEN	<i>RUNX2</i>	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>	<i>LRP5</i>	<i>COL1A2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
1 ura	1,63	2,21	1,99	1,58	1,13	1,69*
4 ure	1,94	2,77	2,56	1,93*	1,92*	1,50
8 ur	2,24	2,66	1,67	1,38	1,40	1,33
24 ur	2,75	2,46	3,33	2,37*	2,05	2,11
72 ur	1,21	1,40	1,81	1,21	1,36	1,20

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje gena v primerjavi s kontrolo)



Slika 9: Normalizirana povprečja in standardne napake za preiskovane gene pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic BPA-3,4-Q

4.4 UČINEK BISFENOLOV, ESTROGENA IN KOMBINACIJ NA IZRAŽENOST *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* IN *TNFRSF11B* TER MOREBITNI VPLIVI NA ZDRAVJE PREK SPREMENJENEGA IZRAŽANJA GENOV

V preiskovanih celicah smo raziskovali učinke bisfenolov, estrogena in kombinacij na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COL1A2* in *TNFRSF11B*. Želeli smo določiti morebitne vplive na zdravje prek spremenjenega izražanja preiskovanih genov. Celice so bile bisfenolom, estrogenu in kombinacijam s koncentracijo 10 nM izpostavljene največ 45 dni. Izbrana koncentracija je primerljiva z izpostavljenostjo ljudem. Izraženost preiskovanih genov smo raziskovali s pomočjo analizne metode, ki je opisana v podpoglavju 3.2.5.

4.4.1 *RUNX2*

Gen *RUNX2* je član družine transkripcijskih faktorjev *RUNX* in kodira jedrni protein. Protein je pomemben za diferenciacijo osteoblastov in skeletno morfogenezo ter deluje kot nosilec za nukleinske kisline in regulatorne faktorje, ki so vključeni v skeletno gensko ekspresijo.

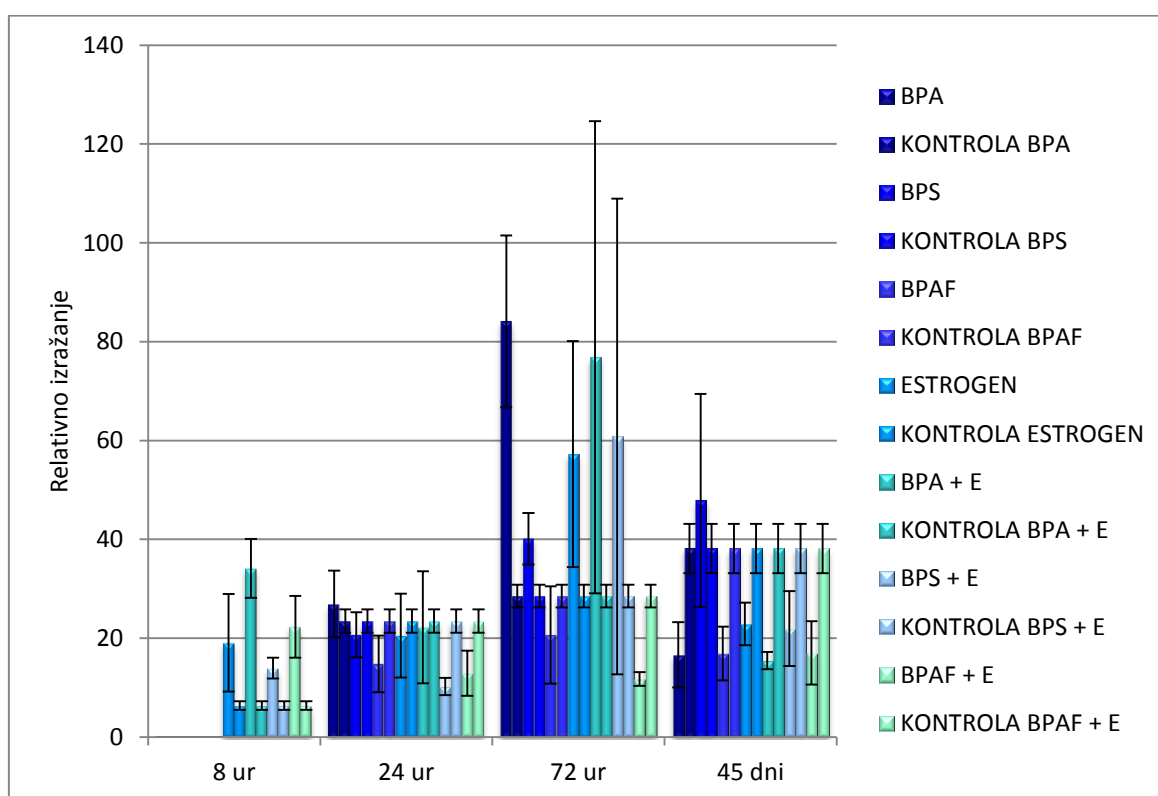
Zmanjšana izraženost *RUNX2* (preglednica XI in slika 10) se pojavi pri 45-dnevni izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom, 24-urni izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom in 72-urni izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom. Zato pride do zmanjšanja funkcionalnega proteina *RUNX2*. Posledica tega je lahko oviran normalen razvoj kosti in hrustanca ter s tem pojav kleidokranialne displazije.

Do povečane izraženosti *RUNX2* (preglednica XI in slika 10) je prišlo pri 72-urni izpostavljenosti celic BPA in 8-urni izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom. Tu pride do povečanja funkcionalnega proteina *RUNX2*. Normalen razvoj kosti in hrustanca ni oviran, temveč ojačan. To pomeni, da ima povečana izraženost *RUNX2* lahko pozitivne učinke na razvoj kosti in hrustanca.

Preglednica XI: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri *RUNX2*

ČAS/BISFENOL ČAS/ESTROGEN ČAS/BISFENOL+E	BPA	BPS	BPAF	ESTROGEN (E)	BPA + E	BPS + E	BPAF + E
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	/	/	/	3,00	5,37*	2,20	3,51
24 ur	1,15	0,88	0,63	0,87	0,95	0,44*	0,87
72 ur	2,95*	1,41	0,72	2,01	2,70	2,13	0,41*
45 dni	0,44	1,25	0,44	0,60	0,41*	0,58	0,45

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje bisfenol/estrogen/kombinacijo v primerjavi s kontrolo)



Slika 10: Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost *RUNX2* pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah

4.4.2 *IDI*

Protein, kodiran z genom *IDI*, je protein HLH, ki lahko tvori heterodimere s člani osnovne družine transkripcijskih faktorjev HLH. Kodirani protein nima aktivnosti za vezavo DNK ter zato lahko zavira sposobnost vezave in aktivacije transkripcije DNK osnovnih proteinov HLH, s katerimi interagira. Ta protein lahko igra vlogo pri rasti celic, staranju in diferenciaciji.

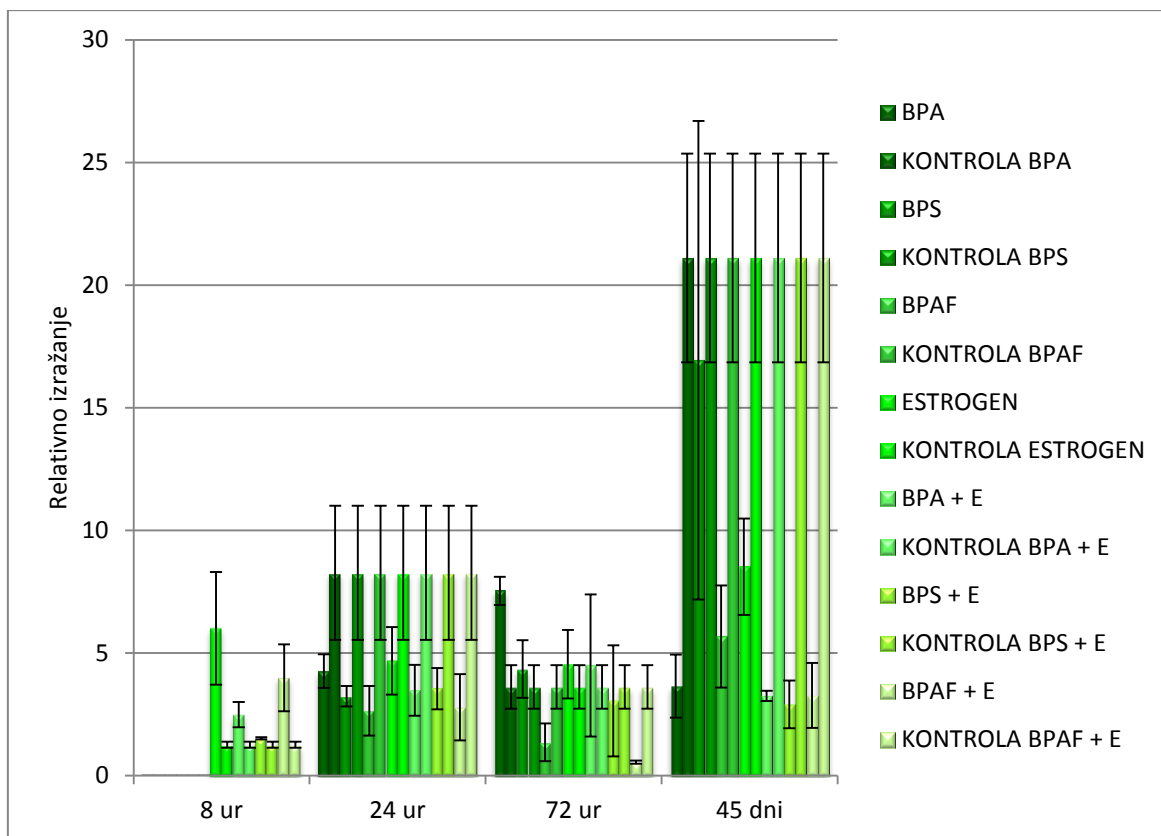
Zmanjšana izraženost *IDI* (preglednica XII in slika 11) se pojavi pri 45-dnevni izpostavljenosti celic bisfenolom (razen BPS) in bisfenolom v kombinaciji z estrogenom ter po 72-urni izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom. Posledice tega so lahko normalna rast, staranje in diferenciacija celic.

Do povečane izraženosti *IDI* (preglednica XII in slika 11) je prišlo samo 1-krat, in sicer pri 72-urni izpostavljenosti celic BPA, kar lahko vpliva na rast, staranje in diferenciacijo celic ter posledično lahko vodi v adenoid cistični karcinom in raka ščitnice.

Preglednica XII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri *IDI*

ČAS/BISFENOL ČAS/ESTROGEN ČAS/BISFENOL+E	BPA	BPS	BPAF	ESTROGEN (E)	BPA + E	BPS + E	BPAF + E
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	/	/	/	4,76	1,98	1,20	3,16
24 ur	0,52	0,39	0,32	0,57	0,42	0,43	0,34
72 ur	2,08*	1,20	0,37	1,26	1,24	0,84	0,15*
45 dni	0,17*	0,80	0,27*	0,40	0,15*	0,14*	0,15*

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje bisfenol/estrogen/kombinacijo v primerjavi s kontrolo)



Slika 11: Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost *ID1* pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah

4.4.3 *ID3*

Protein, kodiran z genom *ID3*, je prav tako protein HLH, ki lahko tvori heterodimere z drugimi proteini HLH. *ID3* nima dovolj velike DNK vezavne domene, zato zavira vezavo katerega koli proteina HLH na DNK, s katerim interagira.

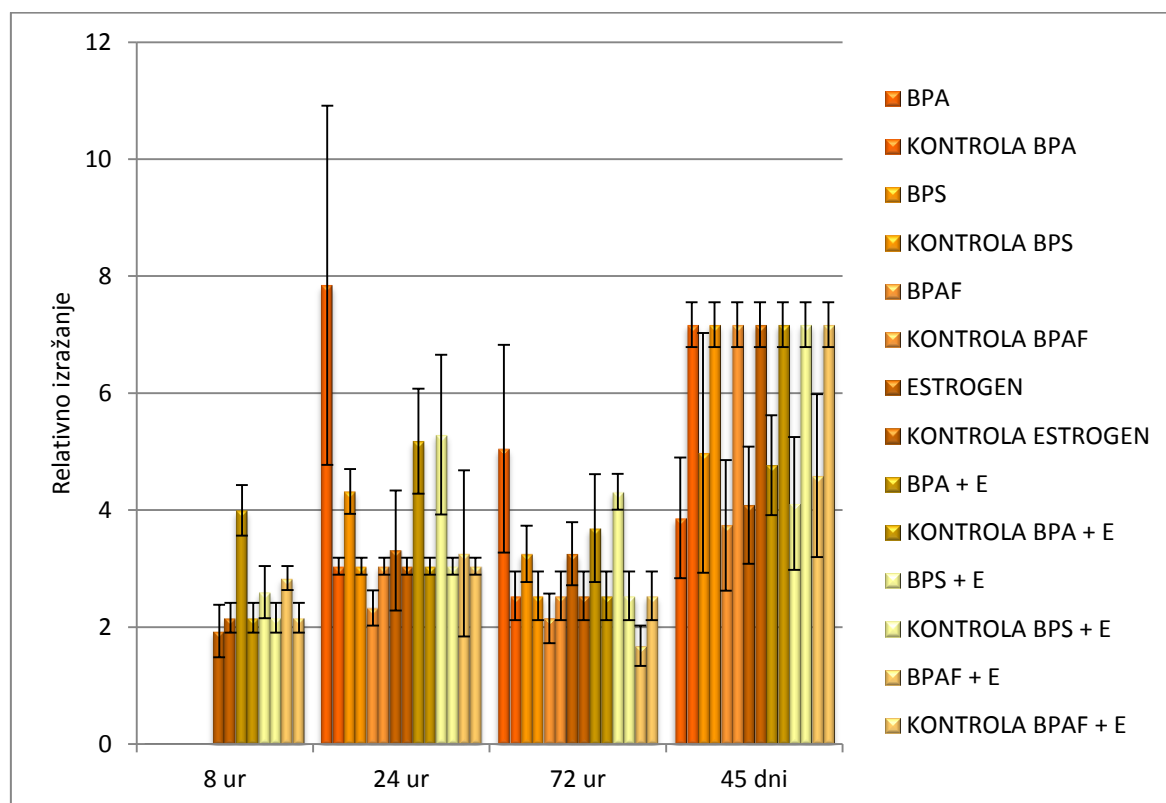
Zmanjšana izraženost *ID3* (preglednica XIII in slika 12) se pojavi pri 45-dnevni izpostavljenosti celic bisfenolom (razen BPS), zato tu verjetno ne prihaja do bolezni, kar je pozitiven učinek.

Do povečane izraženosti *ID3* (preglednica XIII in slika 12) je prišlo pri 24-urni izpostavljenosti celic BPS in 72-urni izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenu. Pojavi se lahko bolezen, kot sta progresivna osifikantna fibrodisplazija in Rettov sindrom.

Preglednica XIII: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri *ID3*

ČAS/BISFENOL ČAS/ESTROGEN ČAS/BISFENOL+E	BPA	BPS	BPAF	ESTROGEN (E)	BPA + E	BPS + E	BPAF + E
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	/	/	/	0,89	1,85	1,20	1,31
24 ur	2,58	1,42*	0,76	1,09	1,70	1,74	1,07
72 ur	1,99	1,28	0,85	1,28	1,46	1,70*	0,66
45 dni	0,54*	0,69	0,52*	0,57*	0,66	0,57	0,64

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje bisfenol/estrogen/kombinacijo v primerjavi s kontrolo)



Slika 12: Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost *ID3* pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah

4.4.4 LRP5

Gen *LRP5* proizvaja protein LRP5, ki je vgrajen v zunanjo membrano številnih tipov celic ter ima pomembno vlogo pri razvoju in ohranitvi več različnih tkiv.

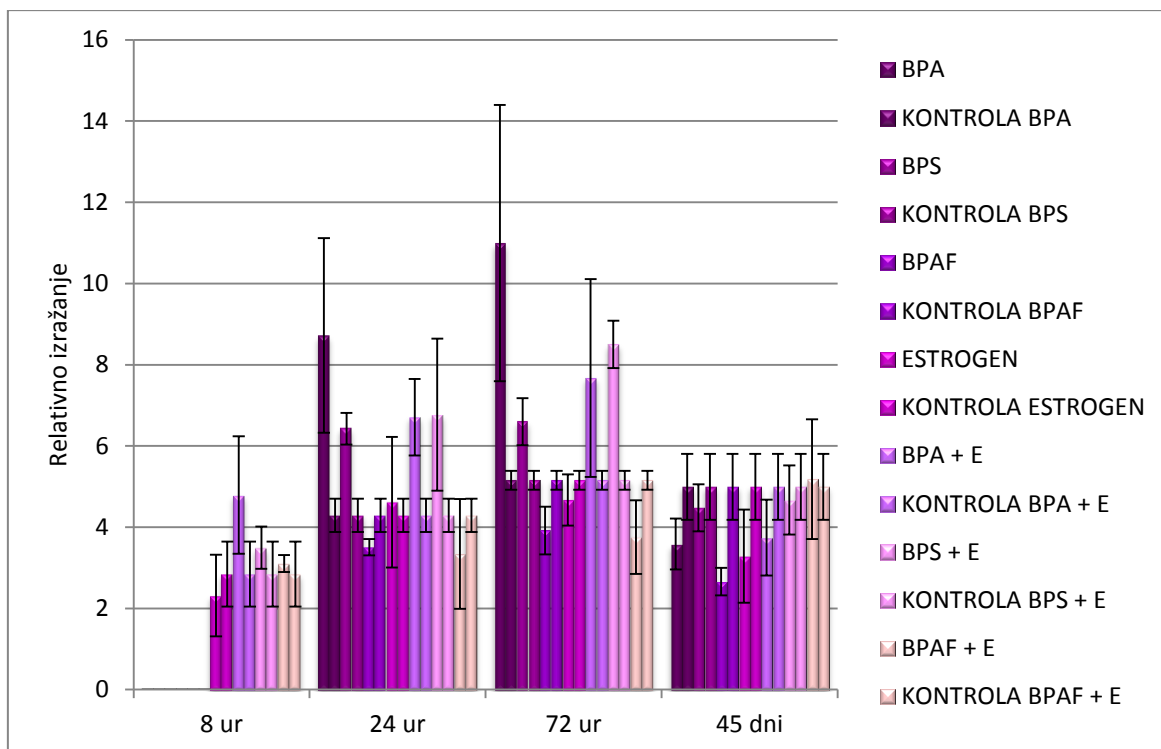
Do zmanjšane izraženosti *LRP5* (preglednica XIV in slika 13) ne pride, kar pomeni, da se družinska eksudativna vitreoretinopatija in osteoporoza-pseudoglioma sindrom ne pojavita.

Povečana izraženost *LRP5* (preglednica XIV in slika 13) se pojavi pri 24-urni izpostavljenosti celic BPS in 72-urni izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom, kar poveča količino funkcionalnega proteina LRP5. To pomeni, da ima povečana izraženost *LRP5* lahko pozitivne učinke na mrežnico, notranje uho in uravnavanje mineralne kostne gostote.

Preglednica XIV: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri *LRP5*

ČAS/BISFENOL ČAS/ESTROGEN ČAS/BISFENOL+E	BPA	BPS	BPAF	ESTROGEN (E)	BPA + E	BPS + E	BPAF + E
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	/	/	/	0,81	1,68	1,23	1,09
24 ur	2,03	1,50*	0,82	1,08	1,56	1,58	0,78
72 ur	2,13	1,28	0,76	0,91	1,49	1,65*	0,73
45 dni	0,72	0,90	0,53	0,66	0,75	0,93	1,04

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje bisfenol/estrogen/kombinacijo v primerjavi s kontrolo)



Slika 13: Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost *LRP5* pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah

4.4.5 *COLIA2*

Gen *COLIA2* proizvaja komponento kolagena tipa I, imenovano veriga pro-alfa2 (I). Kolageni sestavljajo družino proteinov, ki okrepijo in podpirajo mnogo tkiv v telesu, vključno s hrustancem, kostmi, kitam, kožo in beločnico.

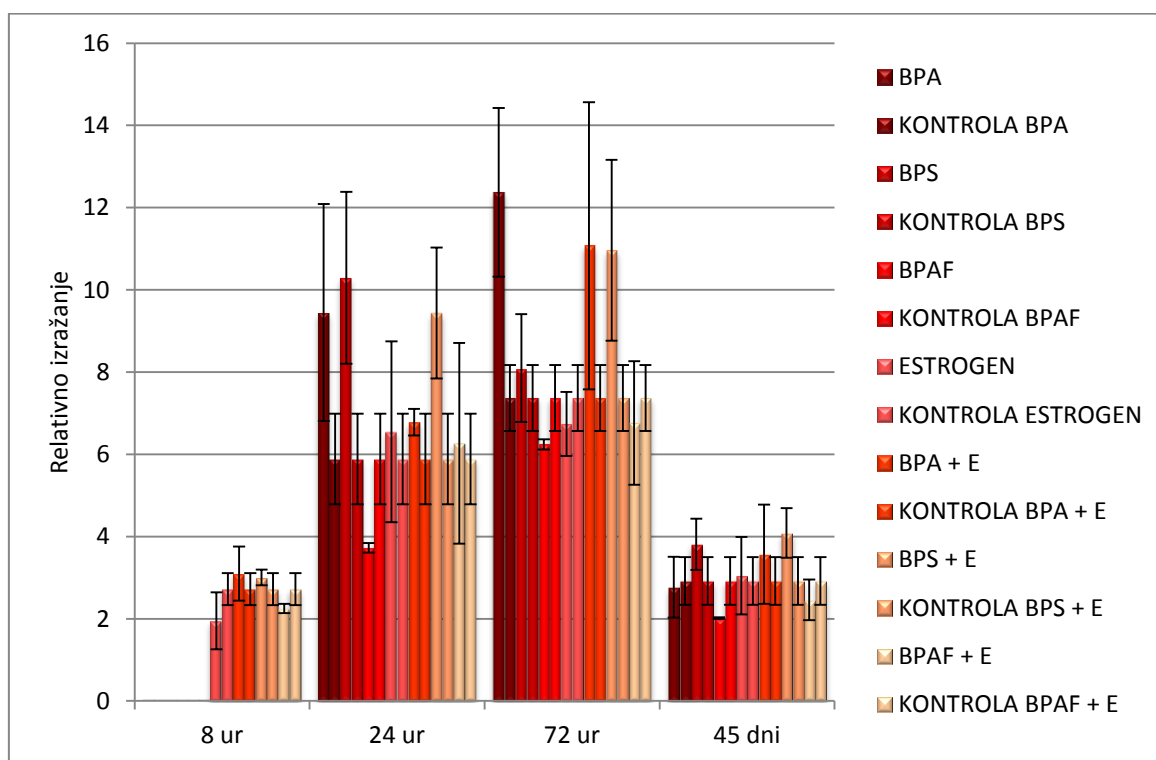
Do zmanjšane izraženosti *COLIA2* (preglednica XV in slika 14) ne pride, kar pomeni, da se Ehlers-Danlosov sindrom in osteogenesis imperfecta ne pojavita.

Tudi do povečane izraženosti *COLIA2* (preglednica XV in slika 14) ne pride. Iz tega razloga vezivno tkivo ne otrdi in pozitivnega učinka ne zaznamo.

Preglednica XV: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri *COLIA2*

ČAS/BISFENOL ČAS/ESTROGEN ČAS/BISFENOL+E	BPA	BPS	BPAF	ESTROGEN (E)	BPA + E	BPS + E	BPAF + E
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	/	/	/	0,72	1,14	1,10	0,83
24 ur	1,61	1,75	0,63	1,11	1,15	1,60	1,06
72 ur	1,68	1,10	0,85	0,91	1,50	1,49	0,92
45 dni	0,95	1,30	0,69	1,04	1,22	1,40	0,84

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje bisfenol/estrogen/kombinacijo v primerjavi s kontrolo)



Slika 14: Normalizirana povprečja in standardne napake za izražanje *COLIA2* pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah

4.4.6 *TNFRSF11B*

TNFRSF11B je protein, ki je pri ljudeh kodiran z genom *TNFRSF11B*. OPG ali *TNFRSF11B* je član naddružine receptorja TNF, ki je sestavljena iz proteinov in posredujejo citotoksičnost, apoptozo, preživetje celic, proliferacijo in diferenciacijo.

Pri zmanjšani izraženosti *TNFRSF11B* se pospešijo procesi diferenciacije, aktivacije in preživetja osteoklastov. To poveča razgradnjo kostnine, kar lahko vodi do zmanjšanja kostne mase in osteoporoze.

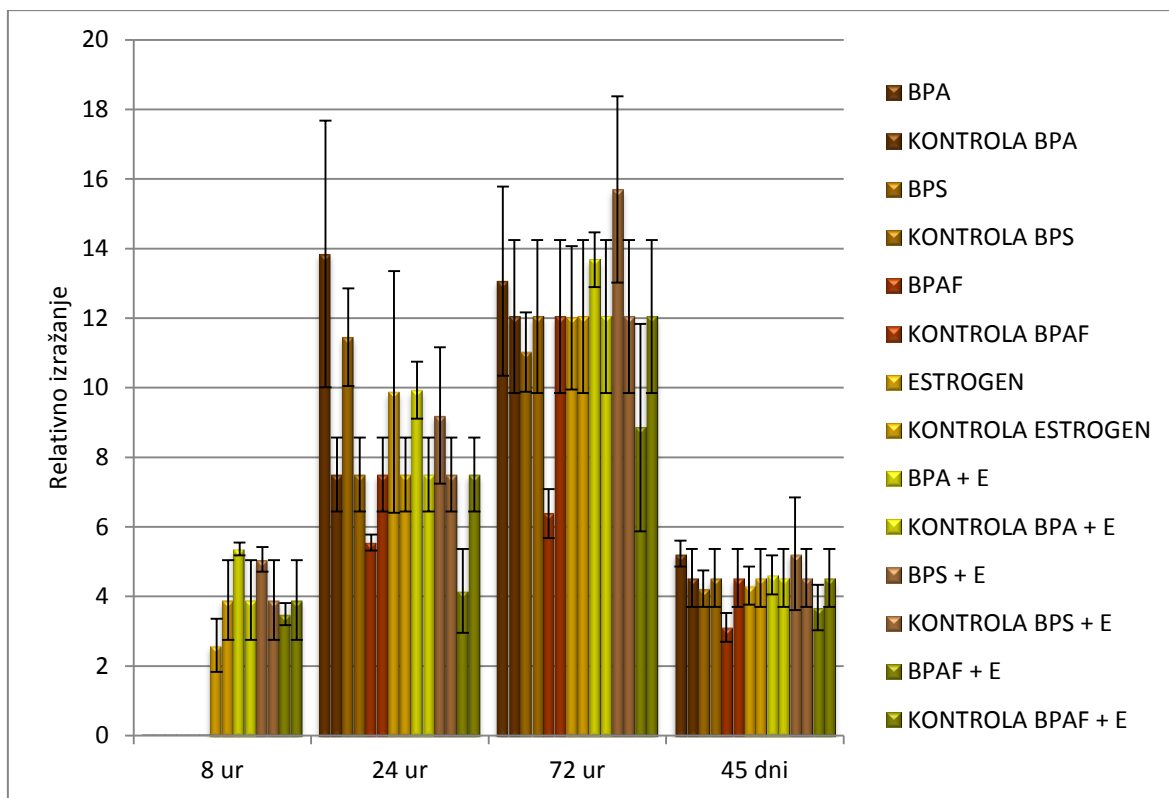
Pri povečani izraženosti *TNFRSF11B* OPG z vezavo na RANKL zmanjša razgradnjo kostnine, kar lahko vodi do povečanja kostne mase in osteopetroze.

Pri rezultatih do zmanjšane ali povečane izraženosti *TNFRSF11B* ne pride (preglednica XVI in slika 15), kar je pozitiven učinek, saj se ne pojavi osteoporoza ali osteopetroza.

Preglednica XVI: Razmerje med povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za bisfenol/estrogen/kombinacijo in povprečno vrednostjo normaliziranih vrednosti za kontrolo pri *TNFRSF11B*

ČAS/BISFENOL ČAS/ESTROGEN ČAS/BISFENOL+E	BPA	BPS	BPAF	ESTROGEN (E)	BPA + E	BPS + E	BPAF + E
	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje	razmerje
8 ur	/	/	/	0,67	1,38	1,30	0,90
24 ur	1,84	1,53	0,74	1,32	1,32	1,23	0,55
72 ur	1,08	0,92	0,53	1,00	1,14	1,30	0,74
45 dni	1,15	0,93	0,69	0,95	1,02	1,15	0,81

* $p < 0,05$, t-test (primerjali izražanje bisfenol/estrogen/kombinacijo v primerjavi s kontrolo)



Slika 15: Normalizirana povprečja in standardne napake za izraženost *TNFRSF11B* pri vzorcih in kontrolah pri izpostavljenosti celic bisfenolom, estrogenu in kombinacijam, brez vrednosti za bisfenole po 8 urah

5 SKLEP

V preiskovanih celicah smo raziskovali učinke bisfenolov na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COLIA2* in *TNFRSF11B*. Celice so bile bisfenolom s koncentracijo 10 nM izpostavljene največ 45 dni. Izbrana koncentracija je primerljiva z izpostavljenostjo ljudem.

Povečana izraženost *RUNX2* se pojavi pri 72-urni izpostavljenosti celic BPA in 8-urni izpostavljenosti celic BPA v kombinaciji z estrogenom. Zmanjšana izraženost *RUNX2* pa se pojavi pri 24-urni, 72-urni in 45-dnevni izpostavljenosti celic, ko je bisfenolom dodan estrogen.

Pri dolgotrajni izpostavljenosti celic BPA in BPAF se izraženost *ID1* zmanjša, medtem ko BPA poveča izraženost gena pri 72-urni izpostavljenosti. Pri kombinaciji bisfenolov z estrogenom imamo pri dolgotrajni izpostavljenosti celic dobro ujemanje z rezultati, ki jih dobimo pri samih bisfenolih. Opazimo še, da do zmanjšane izraženosti *ID1* pride tudi pri dolgotrajni izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom in 72-urni izpostavljenosti celic BPAF v kombinaciji z estrogenom.

Izraženost *ID3* je pri izpostavljenosti celic BPS po 24 urah povečana, pri dolgotrajni izpostavljenosti celic BPA in BPAF pa zmanjšana. Do povečane izraženosti *ID3* je prišlo tudi pri 72-urni izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom.

Pri *LRP5* povzroči BPS edino spremembo pri bisfenolih, in sicer se izraženost gena poveča po 24 urah. Poleg tega se povečana izraženost gena pojavi tudi pri 72-urni izpostavljenosti celic BPS v kombinaciji z estrogenom.

Bisfenoli in bisfenoli v kombinaciji z estrogenom na izraženost *COLIA2* in *TNFRSF11B* nimajo učinka, saj pri nobenem ni prišlo do spremembe. Iz rezultatov je razvidno, da je izraženost *COLIA2* in *TNFRSF11B* nespremenjena.

Pri primerjanju učinkov bisfenolov na izraženost *RUNX2*, *ID1*, *ID3*, *LRP5*, *COLIA2* in *TNFRSF11B* obstajajo razlike. Iz rezultatov je razvidno, da ima največji učinek na izraženost preiskovanih genov BPS, najmanjšega pa BPAF. Tega ne potrjujeta število sprememb in jakost, saj se največkrat sprememba pojavi pri celicah, ki so bile izpostavljene BPA, poleg tega do največje spremembe v jakosti prav tako pride pri BPA. S

časom se povečuje število sprememb, saj pri bisfenolih zaznamo največ sprememb po 45 dneh.

Iz rezultatov je razvidno, da bisfenoli lahko vplivajo na zdravje prek spremenjenega izražanja preiskovanih genov, razen pri genih *COL1A2* in *TNFRSF11B*, kar lahko vodi do kleidokranialne displazije, adenoid cističnega karcinoma, raka ščitnice, progresivne osifikantne fibrodisplazije in Rettovega sindroma.

6 LITERATURA

- 1) Endocrine Disruptors, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services,
http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf (dostopno maja 2010).
- 2) Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS: Differential Estrogenic Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals Bisphenol A, Bisphenol AF, and Zearalenone through Estrogen Receptor α and β in Vitro. *Environmental Health Perspectives* 2012; 120(7): 1029–35.
- 3) Schmidt J, Peterlin - Mašič L: Organic synthetic environmental endocrine disruptors: structural classes and metabolic fate. *Acta Chim Slov.* 2012; 59(4): 722–38.
- 4) Klingmüller D, Alléra A: Endokrin aktive Substanzen in der Umwelt (Endocrine Disruptors): Gefahr für den Menschen? *Dtsch med Wochenschr* 2011; 136(18): 967–72.
- 5) Sekizawa J: Low-dose effects of bisphenol A: a serious threat to human health? *The Journal of Toxicological Sciences* 2008; 33(4): 389–403.
- 6) Fic A, Žegura B, Sollner Dolenc M, Filipič M, Peterlin Mašič L: Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HEPG2 cells. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013; 64: 189–200.
- 7) Rubin BS: Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2011; 127: 27–34.
- 8) Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K: Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environmental Science & Technology* 2013; 47: 8793–800.
- 9) Molina-Molina J-M, Amaya E, Grimaldi M, Sáenz J-M, Real M, Fernández MF, Balaguer P, Olea N: In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 272(1): 127–36.
- 10) Yang Y, Yin J, Yang Y, Zhou N, Zhang J, Shao B, Wu Y: Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by

- ultra-high-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2012; 901: 93–7.
- 11) Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 26–8, 37–8, 54–8.
 - 12) Boyer R: *Temelji biokemije*, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 29–35, 243–52.
 - 13) *RUNX2* runt-related transcription factor 2 [*Homo sapiens* (human)], National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=860 (dostopno 3. 4. 2014).
 - 14) *RUNX2*, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RUNX2> (dostopno 31. 3. 2014).
 - 15) Cleidocranial dysplasia, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/cleidocranial-dysplasia> (dostopno 7. 4. 2014).
 - 16) *ID1* Gene, GeneCards, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ID1> (dostopno 23. 1. 2014).
 - 17) Adenoid Cystic Carcinoma malady, MalaCards, http://www.malacards.org/card/adenoid_cystic_carcinoma (dostopno 2. 3. 2014).
 - 18) Thyroid Cancer malady, MalaCards, http://www.malacards.org/card/thyroid_cancer (dostopno 2. 3. 2014).
 - 19) *ID3* Gene, GeneCards, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ID3> (dostopno 23. 1. 2014).
 - 20) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) malady, MalaCards, http://www.malacards.org/card/fibrodysplasia_ossificans_progressiva (dostopno 2. 3. 2014).
 - 21) Rett Syndrome (RTS) malady, MalaCards, http://www.malacards.org/card/rett_syndrome (dostopno 2. 3. 2014).
 - 22) *LRP5*, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LRP5> (dostopno 7. 4. 2014).
 - 23) *COL1A2*, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL1A2> (dostopno 31. 3. 2014).

- 24) Ehlers-Danlos syndrome, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/ehlers-danlos-syndrome> (dostopno 7. 4. 2014).
- 25) Osteogenesis imperfecta, Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/osteogenesis-imperfecta> (dostopno 7. 4. 2014).
- 26) *TNFRSF11B* (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b), Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TNFRSF11BID42610ch8q24.html> (dostopno 31. 3. 2014).
- 27) Fic A et al.: Članek v pripravi: Genome-wide gene expression profiling of low-dose, long-term exposure of human osteosarcoma cells to bisphenol A and its analogs bisphenols AF and S (dostopno 30. 4. 2014).