

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IVA COLJA

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IVA COLJA

**PREUČEVANJE VPLIVA MEŠANIC SPOJIN AVOBENZONA, BUTILIRANEGA
HIDROKSIANIZOLA IN 2-METILRESORCINOLA NA MODULIRANJE
ANDROGENEGA IN GLUKOKORTIKOIDNEGA SISTEMA**

**STUDYING THE INFLUENCE OF AVOBENZONE, BUTYLATED
HYDROXYANISOLE AND 2-METHYLRESORCINOL MIXTURES ON
MODULATION OF ANDROGEN AND GLUCOCORTICOID SYSTEMS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za usmerjanje pri delu, za vso pomoč ter za temeljit pregled magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Ivani Blagojević, mag. farm., za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela, pregled magistrske naloge in vse koristne nasvete.

Članoma komisije prof. dr. Stanku Srčiču, mag. farm., inizr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., se zahvaljujem za temeljit pregled magistrske naloge.

Posebna zahvala gre mojim najbližjim za vso podporo, spodbujanje in razumevanje tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Iva Colja

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	iv
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1. UVOD.....	1
1.1. HORMONSKI MOTILCI	1
1.1.1. METODE ODKRIVANJA HORMONSKIH MOTILCEV	2
1.2. HORMONSKI SISTEM.....	4
1.2.1. STEROIDNI HORMONI.....	4
1.2.2. ANDROGENI SISTEM	5
1.2.3. GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM	6
1.3. AVOBENZON	8
1.3.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI, UPORABA IN DELOVANJE.....	8
1.3.2. TOKSIKOKINETIKA.....	9
1.3.3. TOKSIKODINAMIKA – VPLIV NA ENDOKRINI SISTEM	10
1.4. BUTILIRAN HIDROKSIANIZOL.....	11
1.4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI, UPORABA IN DELOVANJE.....	11
1.4.2. TOKSIKOKINETIKA.....	12
1.4.3. TOKSIKODINAMIKA – VPLIV NA ENDOKRINI SISTEM	13
1.5. 2-METILRESORCINOL	14
1.5.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI, UPORABA IN DELOVANJE.....	14
1.5.2. TOKSIKOKINETIKA.....	14
1.4.3. TOKSIKODINAMIKA – VPLIV NA ENDOKRINI SISTEM	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.1.1. TESTIRANE SPOJINE.....	17
3.1.2. REAGENTI, KI SESTAVLJAJO GOJITVENI MEDIJ	19
3.1.3. OSTALI REAGENTI.....	19
3.1.4. POMEMBNEJŠE APARATURE IN OPREMA	20
3.2. METODE	21
3.2.1. PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN	21
3.2.2. CELIČNA LINIJA MDA-kb2.....	22
3.2.3. OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI	23
3.2.3.1. DELO V CELIČNEM LABORATORIJU	23
3.2.3.2. ODMRZOVANJE IN GOJENJE CELIC.....	24
3.2.3.3. PRESAJANJE IN NASAJANJE CELIC	24
3.2.3.4. ŠTETJE CELIC	26

3.2.3.5. ZAMRZNITEV CELIC.....	27
3.2.4. TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	28
3.2.5. LUCIFERAZNI TEST	30
3.2.6. ANALIZA PODATKOV	34
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1. DOLOČANJE UČINKA PREISKOVANIH SPOJIN NA ANDROGENEM IN GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU	35
4.1.1. DOLOČANJE UČINKA NA ANDROGENEM RECEPTORJU.....	35
4.1.2. DOLOČANJE UČINKA NA GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU	38
4.2. TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI MEŠANIC PREISKOVANIH SPOJIN.....	42
4.3. DOLOČANJE UČINKA MEŠANIC PREISKOVANIH SPOJIN NA ANDROGENEM IN GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU.....	45
5. SKLEP.....	52
6. LITERATURA	54
7. PRILOGE	61
7.1. PRILOGA I - AVOBENZON	61
7.2. PRILOGA II – BUTILIRAN HIDROKSIANIZOL.....	62
7.3. PRILOGA III – 2-METILRESORCINOL	63

POVZETEK

Seznam spojin, ki v človeškem telesu delujejo kot hormonski motilci, se iz dneva v dan podaljšuje. Človek jim je izpostavljen preko različnih virov, med drugim so v nizkih koncentracijah prisotni v številnih kozmetičnih izdelkih, ki jih uporabljamo vsakodnevno. V okviru naše raziskave smo vrednotili endokrino aktivnost treh spojin, ki so pogoste sestavine kozmetičnih izdelkov: avobenzon (AVB), butiliran hidroksianizol (BHA) in 2-metilresorcinol (2-MR). AVB spada med najučinkovitejše UV-filtre, BHA deluje antioksidativno in posledično preprečuje žarkost maščob, 2-MR pa najdemo v barvah za lase, kjer ima vlogo barvnega modifikatorja. Večina že opravljenih raziskav o hormonskih motilcih je osredotočenih na endokrino delovanje posamezne spojine, pri čemer preučujejo predvsem vpliv na estrogenski receptor, medtem ko podatkov o njihovem učinku na ostale hormonske receptorje skorajda ni zaslediti. Na celični liniji MDA-kb2 smo spojinam z uporabo *in vitro* luciferaznega testa ugotavljali agonistični in antagonistični učinek na androgenem (AR) in glukokortikoidnem (GR) receptorju. Spojinam smo določili vrednosti EC_{50}/IC_{50} za posamezni receptor in z uporabo slednjih koncentracij pripravili vse možne kombinacije mešanic spojin, ki smo jih testirali na AR in GR. Vrednosti IC_{50} za AR so znašale 0,00002 μ M pri AVB, 0,004 μ M pri BHA in 83,02 μ M pri 2-MR. Za GR smo določili naslednje vrednosti EC_{50} : 2,66E-9 μ M pri AVB, 0,0002 μ M pri BHA in 1,24 μ M pri 2-MR. Vrednost IC_{50} za GR je pri BHA znašala 0,81 μ M, pri 2-MR pa 4422 μ M. Mešanice, ki smo jih pripravili, so: AVB, BHA, 2-MR, 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB. Predhodno smo mešanicam z MTS-testom določili še stopnjo citotoksičnosti, pri čemer nobena izmed testiranih mešanic ni na celice MDA-kb2 delovala citotoksično. Rezultati luciferaznega testa so pokazali, da je imela statistično značilen antagonistični učinek na AR samo mešanica 2-MR+AVB. Mešanice AVB, 2-MR+BHA in 2-MR+BHA+AVB pa so izkazale agonistično aktivnost na GR. Na osnovi opravljene raziskave lahko povzamemo, da tudi če posamezna spojina pri nizkih koncentracijah nima endokrine aktivnosti, lahko v kombinaciji z že prisotnimi snovmi v telesu deluje kot hormonski motilec. Slednje predstavlja potencialno tveganje predvsem z vidika današnje raznolike uporabe kozmetičnih in ostalih izdelkov, ki jim je človek vsakodnevno izpostavljen in v katerih najdemo omenjene spojine predvsem v nizkih koncentracijah.

Ključne besede: hormonski motilci, avobenzon, butiliran hidroksianizol, 2-metilresorcinol, učinki mešanic

ABSTRACT

The list of compounds acting as endocrine disruptors in human body is increasing from day to day. Man is exposed to them through a variety of sources, including everyday use cosmetic products, where they are present at low levels. In the context of our study, we evaluated the endocrine activity of three compounds that are common ingredients of cosmetic products: avobenzone (AVB), butylated hydroxyanisole (BHA) and 2-methylresorcinol (2-MR). AVB is one of the most effective UV-filters, BHA has an antioxidant effect and consequently prevents rancidity of fats, and 2-MR can be found in hair dyes where it functions as a colour modifier. Most of the research is focused on endocrine activity of one individual compound, examining in particular the estrogen-like activity, while there is almost no data about their influence on other hormone receptors. By performing an *in vitro* luciferase assay on the MDA-kb2 cell line we tested agonistic and antagonistic effect of our compounds on androgen (AR) and glucocorticoid (GR) receptor. For each compound we determined the values of EC₅₀/IC₅₀ for the particular receptor. Using these concentrations, we prepared all possible combinations of our compounds and tested their activity on AR and GR. The values of IC₅₀ on AR were 0,00002 µM for AVB, 0,004 µM for BHA and 83,02 µM for 2-MR. On GR we determined the following values of EC₅₀: 2,66E-9 µM for AVB, 0,0002 µM for BHA and 1,24 µM for 2-MR. BHA had IC₅₀ of 0,81 µM on GR, while 2-MR's IC₅₀ value was 4422 µM. We prepared the following mixtures: AVB, BHA, 2-MR, 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB and 2-MR+BHA+AVB. Previously, we used the MTS assay for determining the level of cytotoxicity of all mixtures wherein none of the tasted mixtures showed cytotoxicity to MDA-kb2 cells. The results of the luciferase assay showed that only the mixture 2-MR+AVB had statistically significant antagonistic effect on AR, while mixtures AVB, 2-MR+BHA and 2-MR+BHA+AVB showed agonistic activity on GR. Based on the performed research, it can be concluded that even if a single compound at low levels has no endocrine activity, in combination with substances already present in the body it could act as an endocrine disruptor. This represents a potential risk, particularly in terms of today's diverse use of cosmetics and other products which people are exposed to daily and where these mentioned compounds are found primarily at low concentrations.

Keywords: endocrine disruptors, avobenzene, butylated hydroxyanisole, 2-methylresorcinol, effects of mixtures

SEZNAM OKRAJŠAV

2-MR	2-metilresorcinol
ADI	sprejemljiv dnevni vnos
AhR	receptor za arilne ogljikovodike
AMP	adenozinmonofosfat
AR	androgeni receptor
ARE	odzivni element za androgene
ATP	adenozintrifosfat
AVB	avobenzon
BHA	butiliran hidroksianizol
BHT	butiliran hidroksitoluen
BPA	bisfenol A
CAS	enoznačen številčni identifikator kemijskih elementov, spojin, polimerov, bioloških sekvenc, zmesi in zlitin
Da	dalton (atomska masna enota)
DDT	diklorodifeniltrikloroetan
DES	dietilstilbestrol
DHT	dihidrottestosteron
DIT	dijodtironin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPBS	fosfatni pufer
EC ₅₀	koncentracija, pri kateri spojina doseže 50 % maksimalnega učinka
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ER	estrogenski receptor
ER α	estrogenski receptor alfa
ER β	estrogenski receptor beta
FBS	fetalni goveji serum
FLUT	flutamid
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GnRH	gonadoliberin

GR	glukokortikoidni receptor
HC	hidrokortizon
HEPA	filter za filtracijo zraka v čistih prostorih, ki je sposoben zadržati 99,997 % delcev, večjih od 0,3 μm
HM	hormonski motilec
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRE	hormonsko odzivni element
IC ₅₀	inhibitorna koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka
IUPAC	Mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo
K _a	konstanta ionizacije
L-15	Leibovitz-15
LAF	laminarni pretok zraka
LH	luteinizirajoči hormon
MIT	monojodtironin
MMTV	virus tumorja mišje mlečne žleze
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
O/V	olje v vodi
PBB	polibromirani bifenili
PCB	poliklorirani bifenili
PES	fenazin etosulfat
P _{ow}	porazdelitveni koeficient oktanol/voda
PP _i	pirofosfat
PR	progesteronski receptor
QSAR	kvantitativno razmerje med strukturo in delovanjem
RU-486	mifepriston
SD	standardna deviacija
T3	trijodotironin
T4	tiroksin
TBHQ	terc-butilhidrokinon

UVR ultravijolično sevanje

1. UVOD

1.1. HORMONSKI MOTILCI

Endokrini sistem ima v človeškem in živalskem organizmu pomembno vlogo, saj uravnava nivo hormonov v telesu in s tem glavne življenjske funkcije, ki so ključne za normalno delovanje organizma. Eksogene snovi, imenovane hormonski motilci (HM), z vplivom na sintezo, sekrecijo, transport, metabolizem, vezavo na receptor in eliminacijo hormonov motijo delovanje endokrinega sistema in posledično procese homeostaze, razmnoževanja, razvoja, imunskega sistema in vedenja (1, 2, 3). Večina omenjenih spojin vpliva na hormonski sistem preko dveh poti, in sicer z direktnim delovanjem na kompleks hormon-receptor ali z delovanjem na specifični protein, ki skrbi za sintezo ali transport hormona do mesta delovanja (4). Njihove glavne tarče so jedrni receptorji, steroidni nejedrni receptorji (npr. membranski), nesteroidni receptorji (npr. serotoninški, dopaminski in noradrenalinški) in tako imenovani receptorji "sirote" (npr. receptor za arilne ogljikovodike – AhR). Med HM uvrščamo sintetične kemikalije, kot so industrijska topila in lubrikanti ter njihovi stranski produkti (npr. PCB, PBB, dioksini), sestavine plastike (npr. BPA), detergente, težke kovine, konzervanse, antioksidante, plastifikatorje (npr. ftalati), pesticide (npr. metoksiklor, klorpirifos, DDT), fungicide (npr. vinklozin) in farmacevtska sredstva (npr. DES). Poleg naštetih snovi najdemo v okolju tudi naravno prisotne HM, med katere spadajo fitoestrogeni (2, 5).

Rezultati laboratorijskih eksperimentov opozarjajo na nevarnost, ki jo HM predstavljajo v obdobju nosečnosti in dojenja, saj lahko povzročijo motnje v razvoju otrokovih organov. Določeni HM (npr. PCB, DDT) spadajo med lipidotopne substance, ki se kopičijo predvsem v maščobnem tkivu tekom celega življenja matere, vključno s časom pred zanositvijo. Zaradi visoke vsebnosti lipidov v materinem mleku se po porodu v veliki meri tam akumulirajo. Zabeležili so celo višje koncentracije HM v materinem mleku kot v materini krvi. Zaskrbljujoče so informacije o odkritju PCB, dioksinov, DDT in drugih pesticidov v materinem mleku in adipoznem tkivu, pri čemer največjo skrb predstavljajo potencialni aditivni ali sinergistični učinki omenjenih spojin in ostalih že prisotnih HM v telesu. Čas dojenja predstavlja tudi obdobje, ko je otrok izpostavljen najvišjim koncentracijam HM v primerjavi z ostalimi življenjskimi obdobji, posledice pa se kažejo

še le pri mladih odraslih, ko postanejo izrazite nepravilnosti v procesih reprodukcije (3). HM, ki imajo največji vpliv na procese reprodukcije in spolnega razlikovanja, imajo večinoma estrogenski ali antiestrogenski učinek (6).

Krivulja odmerek-odziv je za veliko večino HM oblike črke U ali obrnjene črke U, kateri sta značilni za hormone in živčne prenašalce (2). Presenetljivo je dejstvo, da imajo HM lahko večji učinek na hormonski sistem pri nizkih koncentracijah ($\mu\text{g/L}$ in manj). Razlog za to je predvsem nelinearna povezava med koncentracijo HM in zasedenostjo receptorja ter nelinearna povezava med zasedenostjo receptorja in biološkim učinkom, kar je značilno tudi za hormone. To pomeni, da HM lahko sprožijo močan odgovor, ne da bi pri tem zasedli vsa mesta na receptorjih. Poleg tega že majhna sprememba v koncentraciji HM lahko vodi do znatnega biološkega učinka (1). Nevarnost za človeka predstavljajo predvsem mešanice HM pri nizkih koncentracijah, ki jim je človek kronično izpostavljen preko hrane, vode, zraka, kozmetičnih izdelkov in navsezadnje tudi zdravil (2, 5). HM v nizkih koncentracijah namreč ne povzročajo akutne toksičnosti in mutagenosti, zato jih industrija v okolje sprošča brez večjega nadzora (3). Podatki iz literature poročajo o veliki onesnaženosti površinskih voda s pesticidi, fungicidi in herbicidi z relativno močnimi antiandrogenimi učinki. V odpadnih vodah pa se v večjih količinah pojavlja etinilestradiol z estrogenskim učinkom, saj je prisoten v večini danes dostopnih peroralnih kontraceptivov. V vodah je prisoten v biološko aktivnih koncentracijah, ker se iz telesa izloča v nespremenjeni obliki (6). Poleg načina izpostavitve je pomemben tudi čas izpostavitve HM, pri čemer je človek, kot že omenjeno, najbolj občutljiv še kot zarodek v maternici, kot dojenček in otrok ter v obdobjih pubertete in menopavze (1).

1.1.1. METODE ODKRIVANJA HORMONSKIH MOTILCEV

Če se bo posamezna spojina obnašala kot HM, je težko napovedati, saj se strukturno HM med seboj precej razlikujejo. Skupna jim je majhna molekulska masa (< 1000 Da), poleg tega pogosto vsebujejo tudi halogensko skupino (Cl, Br) ter fenolni del, ki posnema strukturo steroidnih hormonov in omogoča vezavo agonista oz. antagonist na receptor (2). Za učinkovitejše odkrivanje spojin z delovanjem na endokrini sistem je bila pod okriljem Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) ustanovljena delovna skupina EDTA (angl. Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force), ki je oblikovala stopenjsko testiranje spojin s pomočjo presejalnih in potrditvenih testov, prikazanih v

preglednici I. Testiranje je razdeljeno na 5 nivojev, ki si sledijo glede na kompleksnost metode in moč posameznega dokaza (7).

Preglednica I: Stopenjsko testiranje spojin kot potencialnih hormonskih motilcev s strani OECD (7).

1. NIVO	Razvrščanje (obstoječe informacije)	Razvrščanje sintetičnih in naravnih kemikalij glede na že obstoječe informacije (fizikalno-kemijske lastnosti, izpostavljenost).
2. NIVO	<i>In vitro</i> testi (podatki o mehanizmu delovanja spojine)	Ugotavljanje povezave med strukturo in delovanjem spojine (vezava na receptor, transkripcijska aktivnost, QSAR).
3. NIVO	<i>In vivo</i> testi (odkrivanje specifične endokrine aktivnosti)	Opredelitev specifične endokrine aktivnosti (uterotropni test, Hershbergerjev test, test vitelogenina).
4. NIVO	<i>In vivo</i> testi (odkrivanje neželenih učinkov v celotnem hormonskem sistemu)	Detekcija neželenih učinkov v hormonskem sistemu (izpopolnjeni test OECD 407, histopatološki testi).
5. NIVO	<i>In vivo</i> testi (odkrivanje endokrinih in neželenih učinkov)	Celoviti testi za ugotavljanje neželenih učinkov za določitev ocene tveganja (testi določenega obdobja/celotne življenjske dobe živali (sesalci, ribe, ptice)).

Testiranje je osnovano na ta način, da z uporabo *in vitro* testov in kratkoročnih *in vivo* presejalnih testov (1., 2. in 3. nivo) preuči posamezno spojino in jo uvrsti v dolgoročne študije (4. in 5. nivo) za dokončno določitev stranskih učinkov spojine, potrebnih za oceno tveganja (7).

1.2. HORMONSKI SISTEM

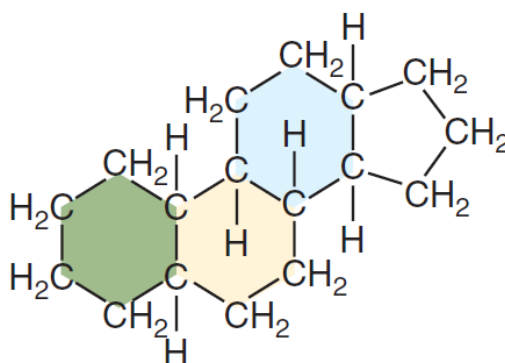
Hormonski sistem predstavlja skupino endokrinih žlez, ki v sistemski krvni obtok sproščajo hormone z namenom regulacije različnih bioloških funkcij. Skupino v prvi vrsti sestavljajo hipofiza, ščitnica, nadledvični žlezi, spolne žleze, določeni predeli trebušne slinavke ter preostale žleze. Poleg endokrinih žlez tudi vrsta drugih organov (srce, telesne maščobe, mišice, jetra, črevesje in ledvice) z izločanjem hormonov v krvni obtok prav tako pripomore k endokrini funkciji v telesu (4). Celotni hormonski sistem igra ključno vlogo pri skoraj vseh telesnih procesih. Hormoni preko ekstracelularnih tekočin dosežejo svoja tarčna mesta – receptorje, ki se nahajajo v vseh predelih telesa. Receptor prepozna specifični hormon, posledica njune interakcije pa je sprožitev zelene funkcionalne spremembe (4, 8). Glede na strukturno formulo hormone delimo v 3 skupine: proteini in polipeptidi, steroidi ter derivati aminokislina tirozin, pri čemer jih največ pripada prvonaštetim proteinom oz. polipeptidom. Koncentracije, pri katerih izzovejo učinek na receptorju, so izjemno nizke. V krvi so prisotni v koncentraciji od 1 pg/mL do nekaj µg/mL. Podobno se tudi iz telesa izločajo v majhnih količinah: od nekaj mikrogramov do nekaj miligramov dnevno (8).

Čeprav kot odgovor na različne dražljaje plazemske koncentracije hormonov tekom dneva nihajo, so le-te striktno kontrolirane z mehanizmom negativne povratne zanke. Na ta način hormon sam ali njegov stranski produkt preprečuje svojo prekomerno sekrecijo in aktivnost na tarčnem mestu. Celoten endokrini regulatorni sistem pretežno deluje na principu kaskadnih reakcij, pri čemer hormon določenega organa vpliva na sproščanje hormona iz drugega organa. Kaskada reakcij steče, ko hormon doseže specifični receptor, ki se nahaja bodisi na membrani tarčne celice bodisi v celici sami: v citoplazmi ali jedru celice (8).

1.2.1. STEROIDNI HORMONI

Steroidni hormoni predstavljajo družino hormonov s ciklopentanoperhidrofenantrenskim obročem (slika 1), ki jo sestavlja 7 strukturno in biološko različnih skupin: estrogeni, progestini, androgeni, mineralokortikoidi, glukokortikoidi, vitamin D in žolčne kisline. Vsi naštetih predstavniki so lipidotopne spojine in derivati holesterola, kar pomeni, da z lahkoto prehajajo celične membrane in vstopajo v krvni obtok. Za veliko večino velja, da oblika, ki

se sintetizira in izloči iz endokrine žleze, predstavlja že aktivno obliko hormona. V plazmi so steroidni hormoni v glavnem vezani na transportne proteine, ki poskrbijo za njihovo dostavo do mesta delovanja. Hkrati pa proteini zmanjšujejo izločanje hormonov iz telesa in predstavljajo potrebno rezervo hormonov, ko jih v telesu primanjkuje. Le slabih 10 % steroidov se v plazmi nahaja v prosti obliki, ki s pomočjo difuzije prehaja v citoplazmo celic (8, 9). Steroidni hormoni s specifičnim receptorjem tvorijo kompleks, ki deluje kot transkripcijski faktor. Kompleks hormon-receptor prepozna mesto HRE (hormonsko odzivni element) na DNA in posledično vpliva na izražanje različnih genov (10).



Slika 1: Ciklopentanoperhidrofenantrenski obroč predstavlja osnovni skelet vseh steroidnih hormonov (9).

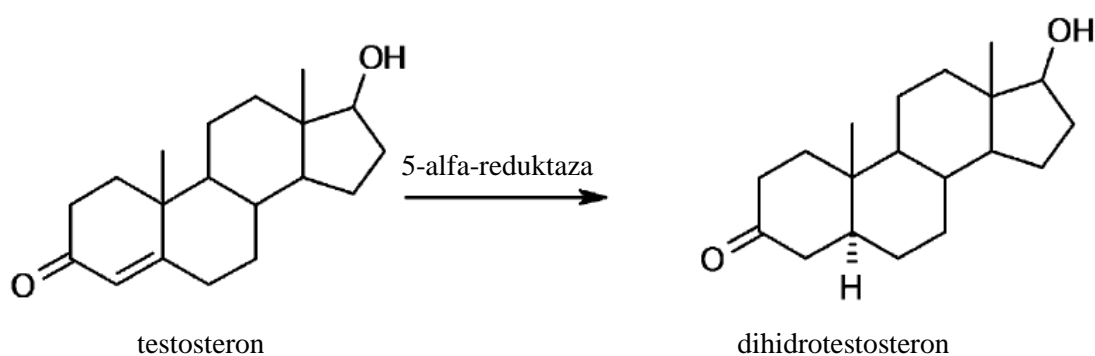
1.2.2. ANDROGENI SISTEM

Androgeni so moški spolni hormoni, ki so prisotni tako pri moških kot pri ženskah, in imajo pri obeh spolih pomembno vlogo pri procesu embriogeneze, postnatalnem razvoju in v odrasli dobi. Najpomembnejša predstavnika androgenov sta testosteron in njegov metabolit DHT (dihidrottestosteron), ki se s pomočjo encima 5-alfa-reduktaze v tarčnih tkivih tvori iz testosterona (slika 2). Testosteron in DHT se v celici vežeta na AR (androgeni receptor). Nastali kompleks androgen-AR nato dimerizira, fosforilira in vstopa v jedro celice, kjer se veže na mesto ARE (odzivni element za androgene) na DNA, kar sproži ali zavre gensko transkripcijo (11).

Testosteron nastaja v Leydigovih celicah testisov in močno pripomore k razvoju prostate, mod in penisa ter k spustu mod med fetalnim razvojem. Po sprostitvi v plazmo se približno 97 % testosterona veže bodisi na plazemski albumin, na katerem ostane šibko vezan, bodisi na beta globulin, s katerim tvori močnejšo vez. V plazmi ostaja testosteron vezan na

plazemske proteine od 30 minut do nekaj ur, po tem času pa vstopi v tarčna tkiva ali se razgradi v neaktivne produkte, ki jih telo izloči. V obdobju pubertete se pod vplivom hipofiznega LH (luteinizirajoči hormon) sproščanje testosterona iz Leydigovih celic močno poveča. Prav tako se poveča sproščanje FSH (folikle stimulirajoči hormon) iz hipofize, ki spodbuja proces spermatogeneze. Sproščanje LH in FSH spodbudi hormon GnRH (gonadoliberin), ki se izloča iz hipotalamusa. Povišana koncentracija testosterona v plazmi in proces spermatogeneze pripomoreta k razvoju sekundarnih moških spolnih znakov, kot so povečana mišična masa, povečana telesna poraščenost, razvoj odraslega moškega glasu, debelejša koža, povečana kostna masa in retencija kalcija v kosteh ter povečan bazalni metabolizem (8, 11). Za kontrolirano sproščanja testosterona poskrbi kar hormon sam, in sicer po principu negativne povratne zanke ureja sproščanje GnRH in LH. Hormon inhibin, ki ga izločajo Sertolijeve celice, pa po istem principu uravnava raven FSH (8).

V odrasli dobi so androgeni odgovorni za vzdrževanje libida, mišične mase, eritropoeze in kostne gostote, za delovanje prostate in proces spermatogeneze (11). Po 50. letu začne nivo hormonov upadati, pri 80. letih pa se nivo zniža tudi za 50 % (8).



Slika 2: Najpomembnejša hormona androgenega sistema sta testosteron in dihidrotosteron. Pretvorba testosterona v dihidrotosteron poteka s pomočjo encima 5-alfa-reduktaze (11).

1.2.3. GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM

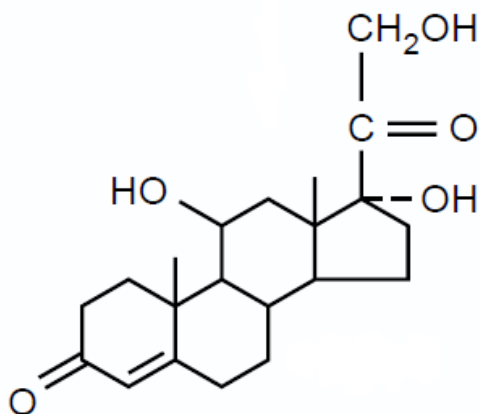
Glukokortikoidi so steroidni hormoni, ki skupaj z mineralokortikoidi tvorijo skupino kortikosteroidov – hormonov, ki jih izloča skorja nadledvične žleze. Glavni predstavnik glukokortikoidov je hormon kortizol (imenovan tudi hidrokortizon – HC), ki je odgovoren za približno 95 % glukokortikoidne aktivnosti v človeškem telesu (slika 3). V plazmi je 90-95 % celotnega kortizola vezanega na plazemske proteine, kar je vzrok za njegov

relativno dolg razpolovni čas 60-90 minut (8). Z vezavo na glukokortikoidni receptor (GR) kortizol uravnava homeostazo glukoze, odgovor na stres, imunoinflamatorne procese in delovanje hipotalamus-hipofiza-adrenalne osi (12).

Glavna metabolna funkcija kortizola je sprožitev glukoneogeneze, kar posledično poveča zaloge glikogena v jetrih, ki predstavlja glavni vir glukoze med obroki hrane. Poleg tega kortizol zmanjšuje stopnjo porabe glukoze v celicah, prav tako pa zmanjšuje občutljivost določenih tkiv na inzulin (adipozno tkivo, skeletne mišice). Glukokortikoidi vplivajo tudi na metabolizem beljakovin in maščob. Kortizol zmanjšuje sintezo proteinov in hkrati povečuje njihov katabolizem, kar se kaže z zmanjšanimi zalogami proteinov v vseh telesnih tkivih, z izjemo jeter. Razlog za ta pojav je zmanjšan transport aminokislin v ekstrahepatična tkiva in njihov povečan vstop v jetra. V adipoznem tkivu se pod vplivom glukokortikoidov zmanjšajo količine prostih maščobnih kislin, poveča pa se tudi oksidacija maščobnih kislin v vseh celicah (8).

Travme, infekcije, vročina, mraz in ostale za človeka stresne situacije močno povečajo sekrecijo kortizola. Slednji kot odgovor na stres povzroči hitro mobilizacijo aminokislin in maščob v plazmo, kjer so na razpolago kot takojšnji vir energije ali za sintezo telesu esencialnih substanc (glukoze, proteinov) (8).

Glukokortikoidi imajo ključno vlogo pri zmanjševanju vnetja. Visoke koncentracije kortizola stabilizirajo lizosomsko membrano in s tem zmanjšajo izločanje proteolitičnih encimov iz lizosomov. Poleg tega kortizol zmanjša prepustnost kapilar, inhibira migracijo levkocitov in fagocitov do mesta poškodbe, zmanjša delovanje imunskega sistema ter ublaži visoko telesno temperaturo (8).



Slika 3: Strukturna formula kortizola, glavnega predstavnika glukokortikoidov (8).

Danes je poznanih precej snovi, ki vplivajo na delovanje endokrinega sistema. Cilj naše raziskave je bil preučiti vpliv treh spojin in njihovih mešanic na moduliranje androgenega in glukokortikoidnega sistema. Avobenzon (AVB), butiliran hidroksianizol (BHA) in 2-metilresorcinol (2MR) so spojine, ki se pojavljajo v različnih kozmetičnih izdelkih, torej jim je človek lahko izpostavljen istočasno. V literaturi lahko najdemo podatke o delovanju naštetih spojin na nekatere endokrine receptorje, ki smo jih poleg fizikalno-kemijskih in toksikokinetičnih lastnosti posamezne spojine navedli v nadaljevanju. Ker sta pri vseh treh spojinah področji delovanja na androgeni in glukokortikoidni sistem še dokaj neraziskani, smo se odločili raziskati prav slednji dve.

1.3. AVOBENZON

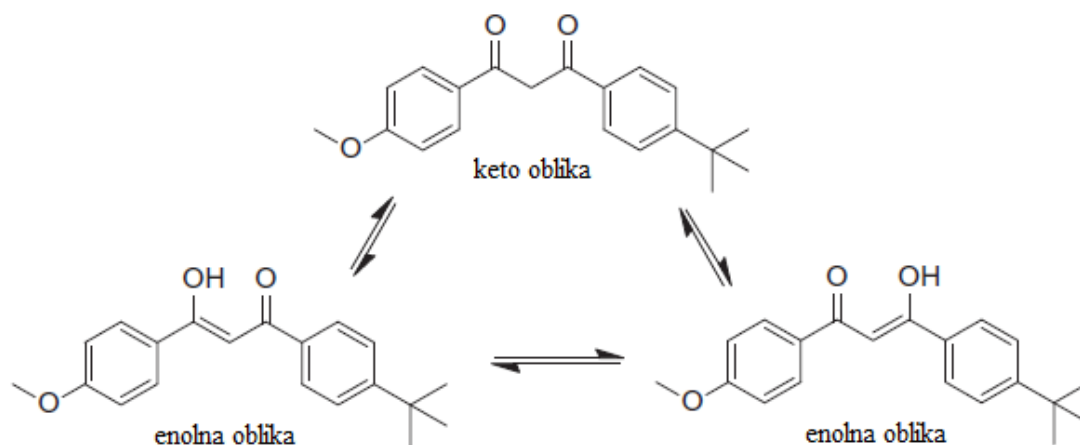
1.3.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI, UPORABA IN DELOVANJE

Avobenzon (AVB) je spojina šibko značilnega vonja, ki se pri sobni temperaturi nahaja v obliki svetlo rumenega praška (13). Najpogosteje je prisoten v izdelkih za zaščito pred soncem, saj je eden izmed najučinkovitejših UVA-filtrov (14). Ultravijolično sevanje (UVR) je namreč razdeljeno v 3 območja: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) ter UVA, ki ga tvorita območji UVA I (320-340 nm) in UVA II (340-400 nm) (13, 15). Količina UVA-žarkov, ki doseže zemeljsko površino, močno presega količino UVB-žarkov, obe vrsti žarkov pa poškodujeta človeško kožo. UVB-žarki prodirajo v zgornje plasti kože (*stratum corneum*), medtem ko UVA-žarki dosežejo tudi globlje plasti (*dermis*). Sevanju UVC-območja pa ljudje nismo izpostavljeni, saj se popolnoma absorbira v ozonskem pasu in tako ne doseže zemeljskega površja (14).

AVB spada med organske oz. kemične UV-filte in absorbira v območju 310-400 nm in človeka najbolj ščiti pred žarki UVA I (14, 13, 16). V Evropi je v izdelkih za zaščito pred sončno svetlobo največja dovoljena vsebnost AVB 5 %. Kot ostali organski UV-filtri tudi AVB deluje na principu absorpcije svetlobe, kar privede do prehoda elektrona iz osnovnega v vzbujeno singletno stanje. Iz singletnega stanja nato elektron preide ponovno v osnovno stanje (odda toploto/fluorescenčno svetlobo) ali v vzbujeno tripletno stanje, od koder se nato vrne v osnovno stanje ali razpade na različne fotoprodukte (13). Glavna slabost AVB je prav fotolabilnost in posledično zmanjšana sposobnost zaščite pred UV-svetlobo. Po 1 uri izpostavitve sončni svetlobi se namreč njegov faktor zaščite zmanjša

za 50-60 % (16). Razlog za to je prehod AVB iz glavne enolne oblike v keto obliko (slika 4), ki absorbira pretežno v UVC-območju in tako ne nudi ustrezne UV-zaščite. Poleg tega AVB oz. njegovi fotoprodukti na koži povzročajo fotoalergijske in fototoksične reakcije (13). Za preprečevanje fotodegradacije in povečanje stabilnosti AVB v nekatere izdelke dodajajo neorganske oz. fizikalne UV-filtre, kot so ZnO in TiO₂ (14, 16, 17). AVB negativno vpliva tudi na stabilnost nekaterih drugih UV-filtrov, ki so prav tako prisotni v izdelkih za zaščito pred sončno svetlobo (16).

Glavne fizikalno-kemijske lastnosti AVB so prikazane v Prilogi I (poglavje 7.1.).



Slika 4: Keto-enolna tautomerija avobenzona. Enolna oblika absorbira v UVA-območju, keto oblika pa v UVC-območju (13).

1.3.2. TOKSIKOKINETIKA

Akutna izpostavljenost AVB ne predstavlja večje nevarnosti na sistemski ravni, saj skozi kožo preide manj kot 1 % apliciranega odmerka (13, 14). Študija na koži žensk, starih 29-40 let, je z uporabo Franzovih difuzijskih celic pokazala 14,1-16,8 % penetracijo v kožo, od tega so 84,6-95,5 % zabeležili v zgornji plasti kože (*stratum corneum*), v *dermisu* pa spojine niso zaznali (18). Še nižje koncentracije AVB v koži so ugotovili z *in vivo* študijo na 6 prostovoljcih, katerim so na zdravo kožo podlakti nanесли 2 mg/cm² 0,7 % emulzije AVB. Zgornje plasti *stratum corneum* so s posebnimi trakovi odstranili, jih ekstrahirali v mešanici metanol-acetonitril ter koncentracije AVB ugotavljali z metodo HPLC. Zabeležili so 9,7 % penetracijo v *stratum corneum* (19). Čeprav se večina AVB nalaga v koži, le-ta prav tako predstavlja nevarnost za človeka. AVB oz. njegovi

fotoprodukti namreč povzročajo alergijske reakcije. Med razgradnimi produkti velja izpostaviti predvsem benzilne derivate, ki delujejo citotoksično, in arilglioksale, ki povzročajo močan fotosenzitivni učinek (13).

Uporaba UV-filtrov pa ima še vseeno precej prednosti kot slabosti. Klinična študija 7-mesečne uporabe izdelka z AVB je pokazala od odmerka odvisno zmanjšanje pojava keratoze, povzročene zaradi izpostavitve soncu, ki je prekursor skvamoznega raka (rak ploščatih celic) ter dejavnik tveganja za raka bazalnih celic in melanom. Torej lahko sklepamo, da uporaba UV-filtrov dolgoročno zmanjšuje možnost nastanka kožnega raka (17).

Človek je UV-filtrom izpostavljen direktno preko kozmetičnih izdelkov, prav tako pa pride v stik z njimi indirektno preko okolja (bazeni, reke, jezera). V jezerih so odkrili prisotnost AVB v koncentracijah 20-24 ng/L, poleg tega se je ta nalagal v nekaterih vodnih organizmih, na katere ni imel toksičnega učinka (20, 21).

1.3.3. TOKSIKODINAMIKA – VPLIV NA ENDOKRINI SISTEM

- VPLIV AVOBENZONA NA ESTROGENI SISTEM

Vpliv AVB na estrogeni sistem so raziskovali v *in vitro* ter *in vivo* študijah, pri čemer je bila pri prvi uporabljena celična linija MCF-7 (izraža oba receptorja ER α in ER β), pri drugi pa so z uterotrofičnim testom opazovali rast maternice nezrelih podgan. V nobenem primeru niso dokazali estrogene aktivnosti AVB (22). Tudi na ribah zebričah z vstavljenim reporterskim genom za luciferazo, odzivnim na estrogene, niso dokazali učinka AVB na ER (23). Drugačne rezultate pa so pridobili z *in vitro* študijo na celicah HEK293 (receptorja ER α in ER β sta bila izražena ločeno), kjer je AVB deloval šibko agonistično na receptor ER α v koncentracijah, večjih od 1 μ M (23, 24).

- VPLIV AVOBENZONA NA ANDROGENI SISTEM

AVB so v raziskavi na celični liniji MDA-kb2 testirali v širokem koncentracijskem območju z in brez prisotnosti DHT (agonist na AR) pri koncentracijah 0,1 in 0,5 nM. Na AR ni AVB v nobenem primeru deloval agonistično, prav tako ni pokazal antagonističnega učinka (22, 25). Po drugi strani pa je na celični liniji U2-OS, ki je v primerjavi z MDA-kb2 bolj občutljiva in selektivna za določanje vpliva na AR, AVB deloval šibko antagonistično

na AR. Njegova vrednost IC_{50} je znašala 11 μM , medtem ko je vrednost antagonistu FLUT znašala 0,5 μM (24).

- VPLIV AVOBENZONA NA GESTAGENI SISTEM

Čeprav je vpliv na gestagene še dokaj neraziskano področje, so v študiji na celicah U2-OS preverjali učinek sedmih UV-filtrov na PR. Za pet izmed njih so dokazali antagonistični učinek na PR, medtem ko AVB tega učinka ni pokazal (24).

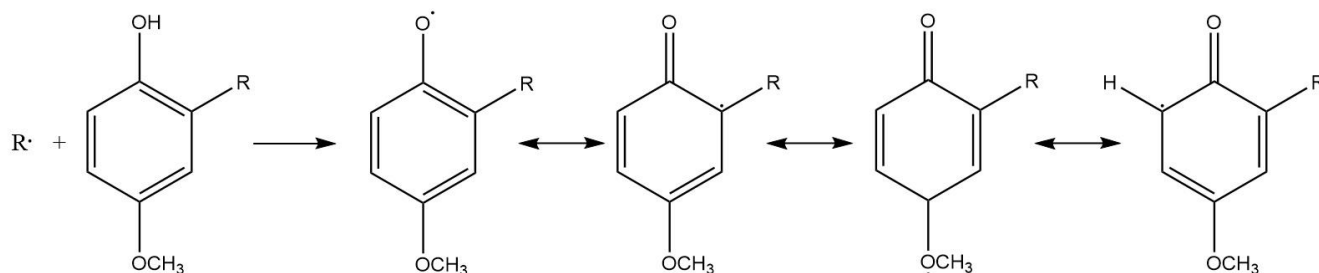
1.4. BUTILIRAN HIDROKSANIZOL

1.4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI, UPORABA IN DELOVANJE

Butiliran hidroksianizol (BHA) je sintezno pridobljena spojina, ki predstavlja zmes dveh izomerov: 2-terc-butil-4-hidroksianizola (2-BHA) in 3-terc-butil-4-hidroksianizola (3-BHA). Pri sobni temperaturi se BHA nahaja v obliki belih ali rahlo rumenih kristalov šibko značilnega vonja. Glavne fizikalno-kemijske lastnosti BHA so prikazane v Prilogi II (poglavje 7.2.) (26).

V prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji BHA predstavlja enega izmed najpogosteje uporabljenih antioksidantov, pri čemer se v 90 % uporablja izomer 3-BHA, saj velja za učinkovitejši antioksidant (5). V Evropi je v živilih največja dovoljena vsebnost BHA 200 mg/kg izdelka, pri čemer je ta vrednost prišteta k skupni količini maščob v izdelku. Nekateri izdelki (prehranska dopolnila, žvečilni gumiji) lahko vsebujejo količine tudi do 400 mg/kg izdelka, medtem ko je BHA v pijačah prepovedan. V eteričnih oljih je dovoljena največja vsebnost BHA, ki znaša 1000 mg/kg izdelka (26). Kozmetični izdelki pa ne smejo vsebovati več kot 0,07 % BHA na celotno maso izdelka (27). V EU velja za BHA sprejemljiv dnevni vnos (ADI) 0,5 mg/kg telesne mase/dan (26, 28). Ker pa je BHA v nekaterih izdelkih prisoten v večjih količinah, je izračunan skupni dovoljeni maksimalni dnevni vnos BHA za odraslega in otroka 1,25 mg/kg telesne mase/dan. BHA lahko izdelkom dodajajo posamično ali v kombinaciji z galati, terc-butilhidrokinonom (TBHQ) in butiliranim hidroksitoluenom (BHT), ki prav tako delujejo antioksidativno (26). Večinoma se ga uporablja kot dodatek oljem in emulzijam O/V, pri čemer je kot antioksidant učinkovitejši za živalske kot rastlinske maščobe, katere ponavadi že vsebujejo nekatere antioksidante, kot npr. tokoferol (5, 29).

Vsi fenolni antioksidanti, kamor spada tudi BHA, zavirajo proces oksidativne žarkosti maščob in posledično preprečujejo nastanek potencialno toksičnih razgradnih produktov. Lipidno peroksidacijo maščob opazimo po spremembi barve, vonja in okusa snovi, za kar so odgovorni aldehidi, ketoni, alkoholi, estri in kratkoverižni ogljikovodiki, ki se ob omenjeni reakciji tvorijo. Produkti lipidne peroksidacije so tudi lipidni radikali, ki nadaljujejo verižno reakcijo oksidacije na drugih maščobnih kislinah in se vgrajujejo v celične membrane, s tem pa zmanjšujejo njihovo integriteto. BHA spada v skupino fenolnih antioksidantov, ki delujejo kot lovilci radikalov. Radikalu (R^\cdot) donirajo vodikov atom in ga spremenijo v bolj stabilno molekulo (RH, ROH ali ROOH), s tem pa prekinajo verižno reakcijo oksidacije. Fenol ob tem oksidira in se pretvori v resonančno stabiliziran intermediat, ki se lahko vrne v prvotno obliko ali se pretvori v stabilnejši kinon. Oksidacija 3-BHA in resonančne strukture nastalega radikala so prikazane na sliki 5 (29).



Slika 5: Resonančne strukture 3-BHA-radikala.

1.4.2. TOKSIKOKINETIKA

Številne toksikokinetične študije na živalih in ljudeh so pokazale, da je BHA spojina, ki se hitro absorbira iz gastrointestinalnega trakta, metabolizira ter z urinom in/ali blatom izloči iz organizma. Izloča se v obliki metabolitov: glukuronidi, sulfati in prosti fenoli, vključujoč TBHQ, ki se prav tako uporablja kot antioksidant (26).

Procesa eliminacije in distribucije BHA so raziskovali v 10-dnevni študiji, pri kateri je 8 zdravih prostovoljcev vsak dan zaužilo odmerek 0,5 mg BHA/kg telesne mase (28). Prostovoljcem so večkrat analizirali vzorce krvi, slin in urina, pri čemer v nobenem primeru niso opazili razlike v standardnih kinetičnih parametrih (koncentracija albumina, uree, proteinov, Na^+ , Cl^- , K^+ , osmolarnost itd.), kar pomeni, da BHA nanje ni imel vpliva.

Statistično značilno razliko so zaznali le 3. in 7. dan študije, ko so se v urinu pojavile večje količine metabolitov nekonjugiranega BHA in TBHQ. Razlog za ta pojav so pripisali indukciji ali inhibiciji specifičnih presnovnih encimov I. in II. faze metabolizma BHA. Kot možen razlog pa so navedli tudi sposobnost bioakumulacije BHA in/ali njegovih metabolitov v organizmu (26, 30). Bianchi in sodelavci so v človeški plazmi zaznali BHA, medtem ko so bili v maščobnem tkivu prisotni tako BHA kot njegovi metaboliti, kar potrjuje sposobnost akumulacije spojine v maščobnem tkivu (31).

Z uporabo kozmetičnih izdelkov se določena količina BHA v telo absorbira preko kože. V *in vitro* študiji penetracije BHA skozi kožo so po 16-urnem stiku mazila V/O z vzorcem človeške kože z 0,07 % vsebnostjo BHA pridobili naslednje rezultate: 30,5 % BHA je ostalo na površini kože, 6,7 % BHA so zaznali v plasti *stratum corneum* in 50,8 % BHA so izmerili v *dermisu*. Možnost vstopa v krvni obtok je majhna, saj se BHA, kot že prej omenjeno, po vsej verjetnosti akumulira v maščobnem tkivu. Dobljeni rezultati so pokazali, da oseba s 60 kg in površino kože 1,8 m² absorbira skozi kožo 0,03 mg BHA/kg telesne mase, kar predstavlja 6 % sprejemljivega dnevnega vnosa BHA (ADI = 0,5 mg/kg telesne mase/dan) (27).

1.4.3. TOKSIKODINAMIKA – VPLIV NA ENDOKRINI SISTEM

- VPLIV BUTILIRANEGA HIDROKSIANIZOLA NA ESTROGENI SISTEM

Izvedene *in vitro* raziskave na rakavih celicah MCF-7 so pokazale, da BHA pri koncentraciji 50 µM izkazuje šibko estrogeno delovanje, ima sposobnost induciranja celične proliferacije in s 17β-estradiolom tekmuje za vezavno mesto na ER. Podobne rezultate je BHA izkazal na humanih osteoblastih U2-OS, pri čemer je večji učinek dosegel na ERβ kot ERα. Ob sočasnem testiranju BHA s 17β-estradiolom pa so odkrili aditivnost delovanja obeh komponent na ER (5).

3-dnevna *in vivo* študija na podganah je pokazala antiestrogeni učinek BHA, saj je le-ta pri vseh testiranih koncentracijah (50, 100, 250 in 500 mg/kg telesne mase) značilno zmanjšal maso maternice živali (5).

- VPLIV BUTILIRANEGA HIDROKSIANIZOLA NA ANDROGENI SISTEM

Androgeno aktivnost nekaterih snovi, ki so dodane v prehranska živila, so preučevali na celični liniji PC-3 LUC^{AR+}, pri čemer so snovi testirali posamezno in v kombinaciji z

androgenim agonistom DHT. Sam BHA na AR pri testiranih koncentracijah 0, 0,1, 1,0 in 10,0 μM ni pokazal učinka, v kombinaciji z DHT (50 pM) pa je pri koncentraciji 10 μM zmanjšal delovanje DHT na AR za 50 %, kar nakazuje na antiandrogeno delovanje BHA (32). *In vivo* študija na kastriranih podganjih samcih pa ni pokazala vpliva BHA na plazemske koncentracije testosterona in androgensko odvisne spolne organe (5).

1.5. 2-METILRESORCINOL

1.5.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI, UPORABA IN DELOVANJE

2-metilresorcinol (2-MR) je spojina, ki se nahaja v obliki brezbarvnih ali svetlo rjavih kristalov, in je sestavina oksidativnih barv za lase, v katerih je njegova najvišja dovoljena vsebnost 1,8 % mase pripravka. Glavne fizikalno-kemijske lastnosti 2-MR so prikazane v Prilogi III (poglavje 7.3.) (33).

Oksidativne barve za lase spadajo med permanentne barve in večinoma vsebujejo neobarvane spojine, ki se tik pred uporabo ob procesu oksidativne kondenzacije obarvajo. Sestavljene so iz dveh komponent: barvnih prekurzorjev (intermediatov + modifikatorjev) in oksidacijskega sredstva (razvijalec). Barva se tvori, ko razvijalec oksidira intermediat, pri čemer kot produkt nastane imin, ki reagira z modifikatorjem (34). Komponente se pred nanosom na lase zmeša, nato pa se jih na laseh pusti delovati približno 30 minut (33). Barvni prekurzorji so aromatski derivati in večinoma pripadajo eni od naslednjih skupin: aromatski diamini, aminofenoli in fenoli. 2-MR spada med barvne modifikatorje in tvori rumeno-bež barvo, ki ob stiku z določenim intermediatom postane intenzivnejša. Kot oksidativno sredstvo pa se v največji meri uporablja H_2O_2 v koncentraciji 3-6 %, ki sodeluje tudi pri razgradnji melanina in posledično razbarvanju las (34, 35). Za potek reakcije je potrebno alkalno okolje z vrednostjo pH približno 9,5 (35).

1.5.2. TOKSIKOKINETIKA

Na zajčji koži in koži morskih prašičkov 2-MR ne deluje iritajoče, prav tako ne povzroča nikakršne reakcije na zajčjem očesu. V 6-mesečni študiji, kjer so podgane dnevno zaužile pripravke z vsebnostjo do 1,5 % 2-MR, niso zaznali patoloških učinkov 2-MR. Poleg tega

2-MR ni deloval teratogeno. Zaznali so le značilno zmanjšanje mase živali, kar pa niso označili kot relevanten podatek za človeka, saj so bili odmerki 2-MR od 100- do 146-krat večji od odmerkov, ki jim je človek izpostavljen preko barv za lase (36, 37).

Dermalno absorpcijo oz. penetracijo 2-MR skozi kožo so preučevali v *in vitro* študiji na koži 6-8 tednov starih prašičev. Na kožo so nanegli 3 pripravke z 1,8 % vsebnostjo 2-MR (kremo brez dodanega H₂O₂, kremo z dodanim H₂O₂ in vodno raztopino) in jih pustili delovati 30 minut. Po 48 urah večkratnega merjenja koncentracije 2-MR v koži so pridobili naslednje rezultate dermalne penetracije 2-MR: 4,48 % penetracijo ($8,38 \pm 5,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) v kremi brez H₂O₂, 0,45 % penetracijo ($0,85 \pm 0,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) v kremi z dodanim H₂O₂ in 17,18 % penetracijo ($32,2 \pm 11,91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) v vodni raztopini (33).

1.4.3. TOKSIKODINAMIKA – VPLIV NA ENDOKRINI SISTEM

- VPLIV 2-METILRESORCINOLA NA TIROIDNI SISTEM

Resorcinol in nekateri njegovi derivati, med katere spada tudi 2-MR, so spojine, za katere je znano, da vplivajo na delovanje tiroidnega sistema. Njihov vpliv se kaže v motenem privzemu jodida v ščitnico, kar posledično zmanjša plazemske koncentracije T4 in T3 (38). Poleg tega tako resorcinol kot 2-MR zavirata proces organifikacije joda, kar pomeni, da preprečujeta nastanek monojodtironina (MIT) in diiodtironina (DIT), katera se z oksidativno kondenzacijo pretvarjata v T3 in T4. Obstaja celo sum, da resorcinol prehaja humano placento ter povzroča golšavost in neonatalni hipotiroidizem (39). Podatkov o vplivu 2-MR na endokrini sistem človeka in živali skorajda ni, najdemo pa lahko informacije o delovanju resorcinola kot njegove najbolj sorodne spojine. Dolgotrajna aplikacija resorcinola na človeške nožne razjede je povzročila hipertrofijo ščitnice in pojav golšavosti. Za potrditev uporabe resorcinola kot razlog za pojav golšavosti so opravili še dolgotrajno subakutno testiranje na podganah. Živalim so aplicirali resorcinol v odmerkih 40 mg/kg/dan in kot rezultat testiranja opazili pojav golšavosti. Omenjeni rezultati za človeka niso relevantni z vidika izpostavljenosti resorcinolu preko barv za lase, saj raziskave preučujejo izpostavljenost preko poškodovane kože in subakutne aplikacije. Potemtakem so resorcinol opredelili kot varno spojino brez vpliva na endokrini sistem (40).

2. NAMEN DELA

Število snovi s sposobnostjo posnemanja naravnih hormonov, t. i. hormonskih motilcev, se iz leta v leto povečuje. Človek jim je v veliki meri izpostavljen preko vsakodnevne uporabe kozmetičnih izdelkov. Najdemo lahko precej informacij o vplivu hormonskih motilcev na estrogeni sistem, medtem ko sta področji androgenega in glukokortikoidnega sistema še dokaj neraziskani.

V okviru naše naloge bomo ovrednotili endokrino aktivnost treh spojin, AVB, BHA in 2-MR, ki se v kozmetičnih izdelkih pogostoma pojavljajo. AVB je učinkovit UV-filter v pripravkih za sončenje, BHA deluje kot antioksidant, 2-MR pa je glavna sestavina oksidativnih barv za lase. Na celični liniji MDA-kb2 bomo s pomočjo luciferaznega testa ugotavljali agonistični in antagonistični učinek omenjenih spojin na AR in GR ter določili njihove vrednosti EC_{50} oz. IC_{50} . Vse tri spojine imajo v svoji strukturi elemente, ki posnemajo strukturo naravnih steroidnih hormonov, zato obstaja sum, da delujejo kot hormonski motilci. Mnogokrat se zgodi, da je človek izpostavljen ne le eni, temveč več različnim spojinam naenkrat. Iz tega razloga bomo pripravili vse možne kombinacije mešanic zgoraj naštetih spojin (AVB, BHA, 2-MR, 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB), pri čemer bomo spojine v mešanicah testirali pri pripadajočih vrednostih EC_{50} oz. IC_{50} in preučevali njihov vpliv na moduliranje aktivnosti AR in GR. Sprva bomo mešanicam spojin z MTS-testom preverili citotoksičnost na izbrani celični liniji. Sledil bo *in vitro* luciferazni test, s katerim bomo vrednotili njihov vpliv na AR in GR.

Z omenjeno metodo bomo poskušali potrditi ali zavrniti naslednji hipotezi:

1. hipoteza: BHA in 2-MR sta močnejša agonista/antagonista na AR in GR od AVB, saj vsebujeta proste fenolne skupine, medtem ko je pri AVB fenolna skupina zaetrena z metilno skupino.
2. hipoteza: Spojine AVB, BHA in 2-MR ter njihove mešanice (2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB) modulirajo aktivnost AR in GR.

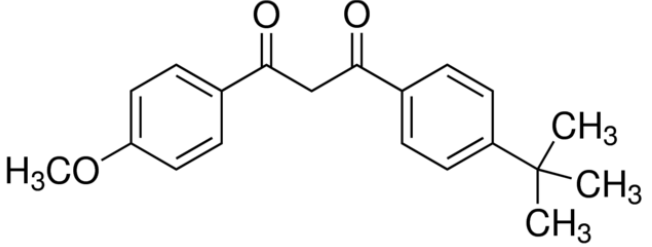
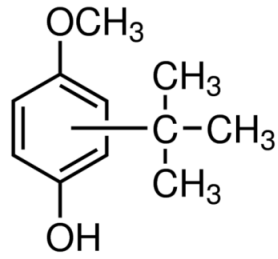
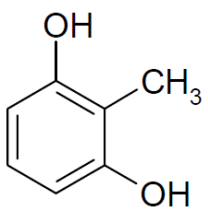
3. MATERIALI IN METODE

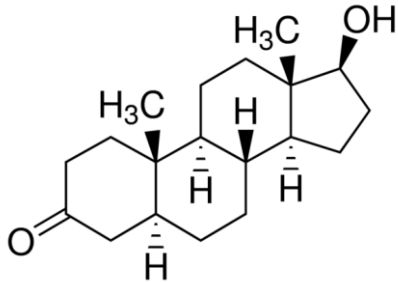
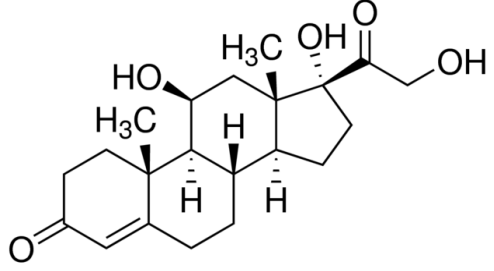
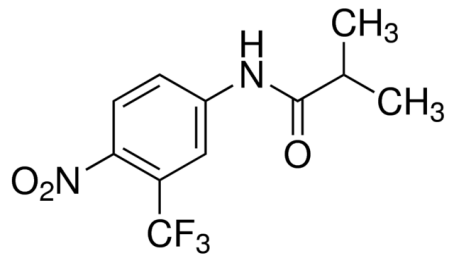
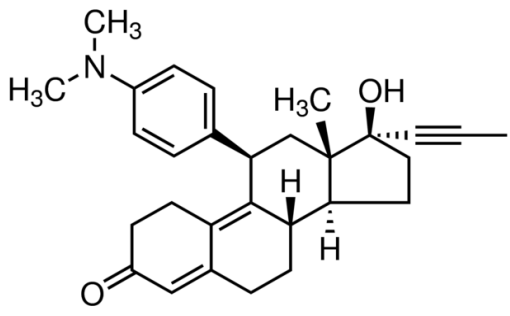
3.1. MATERIALI

3.1.1. TESTIRANE SPOJINE

Preiskovane spojine, katerih učinke na AR in GR smo določali, so bile avobenzon (AVB), butiliran hidrokisianizol (BHA) in 2-metilresorcinol (2-MR). Kot kontrolne spojine pa so nam služili dihidrotestosteron (DHT), hidrokortizon (HC), flutamid (FLUT) in mifepriston (RU-486). V preglednici II so prikazane strukturne formule, molske mase, stopnje čistote, številke CAS in proizvajalci vseh testiranih spojin.

Preglednica II: Strukturne formule, molske mase, stopnje čistote, CAS-številke in proizvajalci vseh testiranih spojin.

TESTIRANA SPOJINA, MOLSKA MASA, STOPNJA ČISTOTE, ŠTEVILKA CAS	STRUKTURNA FORMULA
AVB Molska masa: 310,39 g/mol Stopnja čistote: > 98 % Številka CAS: 70356-09-1 Proizvajalec: TCI, Belgija (41)	 (42)
BHA Molska masa: 180,25 g/mol Stopnja čistote: 96 % Številka CAS: 25013-16-5 Proizvajalec: Acros Organics, Geel, Belgija (43)	 (44)
2-MR Molska masa: 124,14 g/mol Stopnja čistote: 98 % Številka CAS: 608-25-3 Proizvajalec: Acros Organics, Geel, Belgija (45)	 (45)

<p>DHT</p> <p>Molska masa: 290,44 g/mol Stopnja čistote: $\geq 97,5\%$ Številka CAS: 521-18-6 Proizvajalec: Sigma-Aldrich, Nemčija</p> <p>(46)</p>	 <p>(46)</p>
<p>HC</p> <p>Molska masa: 362,46 g/mol Stopnja čistote: $\geq 98\%$ Številka CAS: 50-23-7 Proizvajalec: Sigma-Aldrich, Nemčija</p> <p>(47)</p>	 <p>(47)</p>
<p>FLUT</p> <p>Molska masa: 276,21 g/mol Številka CAS: 13311-84-7 Proizvajalec: Sigma-Aldrich, Nemčija</p> <p>(48)</p>	 <p>(48)</p>
<p>RU-486</p> <p>Molska masa: 429,59 g/mol Stopnja čistote: $\geq 98\%$ Številka CAS: 84371-65-3 Proizvajalec: Sigma-Aldrich, Nemčija</p> <p>(49)</p>	 <p>(49)</p>

3.1.2. REAGENTI, KI SESTAVLJAJO GOJITVENI MEDIJ

Reagenti, ki smo jih potrebovali za pripravo gojitvenega medija:

- 500 mL L-15 (Leibovitz-15) medija (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 50 mL fetalnega govejega seruma (FBS) (Gibco, ZDA);
- 5 mL raztopine antibiotikov penicilina (10000 U/mL) in streptomicina (10000 µg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

Gojitveni medij smo pripravljali v nesterilnih pogojih, zato smo pripravljeno raztopino v LAF-komori filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,22 µm. Medij smo shranjevali v hladilniku (2-8 °C) . Pred uporabo smo ga segreli na vodni kopeli na približno 37 °C.

3.1.3. OSTALI REAGENTI

Pri delu smo uporabljali naslednje reagente:

- fosfatni pufer (DPBS) (Gibco, ZDA);
- 99,9 % DMSO (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- tripsin (Gibco, ZDA);
- tripan modro (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- MTS-reagent (CellTiter 96®AQueous One Solution Reagent; Promega, Madison, WI, ZDA);
- izhodni lizirni pufer (Reporter Lysis 1X Buffer; Promega, Madison, WI, ZDA);
- luciferazni reagent (Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate; Promega, Madison, WI, ZDA).

DPBS in tripan modro smo shranjevali na sobni temperaturi. DMSO, tripsin, MTS-reagent in izhodni lizirni pufer smo shranjevali v zamrzovalniku na -20 °C, luciferazni reagent pa v zamrzovalniku na -80 °C. MTS-reagent in luciferazni reagent sta fotosenzibilna, zato smo ju shranjevali v temi.

3.1.4. POMEMBNEJŠE APARATURE IN OPREMA

Pomembnejše aparature in oprema, ki smo jih uporabljali pri delu:

- LAF-komora (Iskra, Šentjernej, Slovenija);
- analitska tehtnica (Mettler Toledo, Greifensee, Švica);
- centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija);
- inkubator MCO-18AIC (Sanyo, ZDA);
- invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonska);
- vibracijski mešalnik (Biosan, Latvija);
- avtomatska multikanalna pipeta (Biohit, Helsinki, Finska);
- hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija);
- čitalec mikrotitrskih plošč Synergy™ 4Hybrid Microplate Reader (BioTek Winooski, VT, ZDA);
- zamrzovalnik -80 °C (Sanyo, ZDA);
- zamrzovalnik in hladilnik (Gorenje, Slovenija);
- krioviale (TPP, Transadingen, Švica);
- mikrocentrifugirke 1,5 mL, 2 mL (Brand);
- centrifugirke 15 mL, 50 mL (TPP, Transadingen, Švica);
- gojitvena posoda s površino 75 cm² (plastenka v obliki črke T s perforiranim zamaškom) (TPP, Transadingen, Švica);
- serološke pipete za enkratno uporabo 5 mL, 10 mL, 50 mL (TPP, Transadingen, Švica);
- pipeta 0,1-2,5 µL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- pipete 2-20 µL, 100-1000 µL, 20-200 µL (Gilson, Middleton, ZDA);
- nastavki za pipete (Biohit, Helsinki, Finska);
- posoda za shranjevanje gojitvenega medija (TPP, Transadingen, Švica);
- pipetboy (Biohit, Helsinki, Finska);
- mikrotitrne plošče tipa 92096 (TPP, Transadingen, Švica);
- mikrotitrne plošče Lumitrac 600 (Greiner bio-one, Kremsmünster, Avstrija).

3.2. METODE

3.2.1. PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN

Za določanje učinka na androgenem in glukokortikoidnem sistemu smo uporabili spojine AVB, BHA in 2-MR ter vse možne kombinacije mešanic naštetih spojin (2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB). Preiskovane spojine smo testirali v mešanicah pri koncentracijah, pri katerih je posamezna spojina izzvala 50 % maksimalnega učinka (EC_{50}) oziroma 50 % maksimalne inhibicije ustreznega agonista (IC_{50}) na celični liniji MDA-kb2 (Luciferazni test - mešanice). Omenjenim mešanicam smo določali antagonistični učinek na AR ter agonistični učinek na GR. Pred začetkom testiranja vzorcev na AR in GR smo izvedli test citotoksičnosti in za testiranje uporabili vse vzorce spojin in pripadajočih mešanic, ki so se izkazali za necitotoksične na celični liniji MDA-kb2.

Za določitev EC_{50} oziroma IC_{50} testiranih spojin smo predhodno izvedli luciferazni test (Luciferazni test – preiskovane spojine), kjer smo s pomočjo programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ZDA) oblikovali graf učinka (n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) v odvisnosti od koncentracije spojine in določili njeno vrednost EC_{50} oziroma IC_{50} . Za izhodne koncentracije smo uporabili najvišje necitotoksične koncentracije preiskovanih spojin, ki so bile določene na celični liniji MDA-kb2. Uporabili smo 1 μ M za AVB, 50 μ M za BHA in 175 μ M za 2-MR ter testiranje nadaljevali v ustrezno nižjih koncentracijah (50).

Kot kontrolne spojine (pozitivna kontrola) so nam služili DHT (agonist na AR), FLUT (antagonist na AR), HC (agonist na GR) in RU-486 (antagonist na GR). DHT smo pri vseh testih testirali pri vrednostih EC_{50} na celični liniji MDA-kb2, za FLUT in RU-486 pa smo uporabili njuni vrednosti IC_{50} na izbrani celični liniji. Pri testu Luciferazni test – preiskovane spojine smo testirali HC pri vrednosti EC_{50} na izbrani celični liniji, pri testu Luciferazni test – mešanice pa smo testirali HC pri koncentraciji 100 nM. Testirane koncentracije kontrolnih spojin so prikazane v preglednici III.

Preglednica III: Koncentracije kontrolnih spojin, ki smo jih uporabili pri vseh testih, z izjemo Luciferaznega testa – mešanice, kjer smo HC testirali pri koncentraciji 100 nM (51).

KONTROLNA SPOJINA	TESTIRANA KONCENTRACIJA
DHT	EC ₅₀ = 0,5 nM
HC	EC ₅₀ = 500 nM
FLUT	IC ₅₀ = 5 μM
RU-486	IC ₅₀ = 100 nM

Izhodne koncentracije preiskovanih spojin (AVB, BHA in 2-MR) smo pripravili tako, da smo posamezno spojino na analitski tehtnici natehtali v mikrocentrifugirko in jo raztopili v 99,9 % DMSO. Pred nanašanjem na ploščo smo raztopine 1000-krat redčili z gojitvenim medijem. Za nadaljnja redčenja smo uporabili 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, ki na celice ne deluje citotoksično. Vse vzorce smo na ploščo nanašali v ustrezno višjih koncentracijah, da smo v vdolbinah dobili zelene testirane koncentracije.

3.2.2. CELIČNA LINIJA MDA-kb2

Za preučevanje učinka spojin 2-MR, BHA in AVB na GR in AR smo uporabili adherentno stabilno celično linijo MDA-kb2 (ATCC, Nemčija). Linija izvira iz starševske celične linije MDA-MB-453 (linija človeških epitelijskih celic raka dojke), ki je bila transformirana s plazmidnim vektorjem MMTV.luciferase.neo, ki nosi zapis za encim luciferazo ter na AR in GR odzivno promotorsko zaporedje. Starševska linija MDA-MB-453 izraža endogene GR in AR, ERβ šibko izraža, ERα in PR pa ne izraža (52). Tako GR kot AR imajo visoko afiniteto do promotorja MMTV. Celična linija je zato zelo uporaben *in vitro* sistem za preučevanje glukokortikoidnega in androgenega učinka spojin, saj so odzivi preko ostalih steroidnih receptorjev zelo šibki oz. skoraj neopazni. S sočasno uporabo ustreznih agonistov/antagonistov lahko ločeno testiramo tako glukokortikoidni kot androgeni učinek, prav tako tudi agonistični in antagonistični učinek na posameznem receptorju. Celična linija MDA-kb2 ima številne prednosti, vendar zahteva določene spretnosti dela s celičnimi kulturami (preglednica IV) (53).

Preglednica IV: Prednosti in slabosti celične linije MDA-kb2 (53).

PREDNOSTI CELIČNE LINIJE MDA-kb2	SLABOSTI CELIČNE LINIJE MDA-kb2
<ul style="list-style-type: none"> - stabilno izražanje luciferaznega reporterja skozi daljši čas in vrsto pasaž (tudi več kot 80 pasaž) - enostavno vzdrževanje in gojenje celic - hitra izvedba posameznega testa - dobra ponovljivost - visoka občutljivost - testiranje učinka na AR in GR - sočasno testiranje agonistov in antagonistov - transfekcije niso potrebne, kar pripomore k manjši variabilnosti rezultatov 	<ul style="list-style-type: none"> - prisotnost drugih receptorjev, ki aktivirajo MMTV reporter, lahko moti odziv na AR in GR

3.2.3. OSNOVNE METODE DE LA S CELICAMI

3.2.3.1. DELO V CELIČNEM LABORATORIJU

Testiranje spojin na celični kulturi smo opravljali v celičnem laboratoriju, konkretno v komori z laminarnim pretokom filtriranega zraka (LAF-komora), ki preprečuje kontaminacijo izdelka med aseptično pripravo. V LAF-komori so nameščeni HEPA filtri (angl. high efficiency particulate air filter). Gre za filtre za filtracijo zraka, ki so sposobni zadržati 99,997 % delcev, večjih od 0,3 µm. V komori se vzdržuje višji tlak zraka kot v prostoru, kjer je komora nameščena, in tako preprečuje vdor kontaminiranega zraka iz okolice v komoro. Tok zraka je laminaren, kar preprečuje nastajanje turbulenc ob ovirah. LAF-komora na ta način omogoča aseptično delo, poleg tega ščiti uporabnika pred okužbo s potencialno toksičnim materialom. Pred pričetkom dela smo komoro dvajset minut obsevali z UV-svetlobo in delovno površino pobrisali s 70 % etanolom. Isti postopek smo

ponovili ob zaključku dela v komori. V celičnem laboratoriju je obvezna uporaba čiste bele halje in zaščitnih rokavic. Tako rokavice kot ostali material smo pred uporabo v komori razkužili s 70 % etanolom.

3.2.3.2. ODMRZOVANJE IN GOJENJE CELIC

Zamrznjene celice smo pred uporabo shranjevali pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 mL krioviali. V krioviali smo imeli shranjenih približno 6×10^6 celic. Kot krioprotektant smo uporabili 5 % DMSO, ki je nad $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ toksičen, zato je zelo pomembno, da celice hitro odmrzemo in jim dodamo gojitveni medij. Kriovialo smo hitro prestavili v vodno kopel (približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) in počakali približno 1 minuto, da se je vsebina nekoliko odtalila. Celice smo prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo dodali 9 mL gojitvenega medija, ter vse skupaj centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili in celice resuspendirali v 5 mL gojitvenega medija. Na ta način smo odstranili krioprotektant. Vsebino smo premešali z uporabo vibracijskega mešalnika, ji dodali še 5 mL gojitvenega medija in vse skupaj prenesli v sterilno gojitveno posodo. Celice so po odmrznitvi potrebovale približno 1-2 tedna, da so se namnožile v dovoljšnem številu, potrebnem za testiranje. Kako celice rastejo, smo preverjali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Celice smo gojili v adherentni kulturi, kar pomeni, da so celice rasle pritrjene na podlago. Za pritrnitev na podlago so potrebovale 2-3 ure. Gojitveni medij smo jim zamenjali na vsake 3-4 dni. Celicam smo vedno dodajali približno 10 mL svežega gojitvenega medija. Celično linijo MDA-kb2 smo gojili v inkubatorju MCO-18AIC pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ brez prisotnosti CO_2 .

3.2.3.3. PRESAJANJE IN NASAJANJE CELIC

Celice je potrebno presaditi, ko se namnožijo v tolikšnem številu, da prekrijejo 80 % površine gojitvene posode, oziroma ko za preživetje porabijo vse nutiente gojitvenega medija. S presajanjem celic preprečimo njihovo odmiranje. Po postopku odmrzovanja so celice za normalno rast potrebovale več časa, nato pa so rasle hitreje, v povprečju pa smo jih presajali na 5-7 dni. Postopka presajanja in nasajanja celic na mikrotitrsko ploščo sta potekala na enak način.

Prvi korak je bil odlepljanje celic od podlage in ustvarjanje celične suspenzije. Iz gojitvene posode smo s serološko pipeto za enkratno uporabo odstranili medij, posodo sprali s 5 ml DPBS, le-tega odstranili in v posodo dodali 5 ml 0,01 % tripsina. Tripsin je proteaza, ki služi odlepljanju celic od podlage. Celice ne smejo biti predolgo izpostavljene tripsinu, saj le-ta lahko poškoduje celične površinske receptorje. Za povečanje njegove aktivnosti mu lahko dodamo EDTA. Ob prisotnosti gojitvenega medija pa se njegova aktivnost zmanjša, zato smo gojitveno posodo sprali s DPBS in tako ves medij odstranili. Po dodatku tripsina smo celice 5 minut inkubirali na 37 °C ob prisotnosti 5 % CO₂. Nato smo pod mikroskopom preverili, če so se celice odlepile od podlage. Dno gojitvene posode smo nekajkrat sprali z vsebino v posodi, da smo vse celice prenesli v suspenzijo. Suspenzijo smo nato prenesli v 15 mL centrifugirko, ji dodali 5 mL svežega gojitvenega medija in vsebino premešali z vibracijskim mešalnikom. Dodani medij je inhibiral delovanje tripsina. Iz centrifugirke smo odpipetirali 80 µL suspenzije v mikrocentrifugirko, ki nam je kasneje služila za štetje celic. Centrifugirko smo nato centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili in celice resuspendirali v 5 mL gojitvenega medija ter ponovno premešali z vibracijskim mešalnikom, da je nastala ustrezna celična suspenzija.

Pred nasajanjem celic na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami smo celice prešteli in izračunali potreben volumen pripravljene celične suspenzije, ki smo ji dodali ustrezen volumen gojitvenega medija, da smo dobili koncentracijo 10⁵ celic/mL. V vsako vdolbino smo nanесли 100 µL tako pripravljene suspenzije, ki je vsebovala 10⁴ celic. Celice smo v vdolbine nanašali z avtomatsko multikanalno pipeto. Za test citotoksičnosti smo uporabljali prozorne mikrotitrne plošče tipa 92096, za luciferazni test pa bele mikrotitrne plošče Lumitrac 600. Po nanašanju celic na ploščo je sledila 24-urna inkubacija na 37 °C brez prisotnosti CO₂.

Pri presajanju celic smo celično suspenzijo prenesli v novo gojitveno posodo, ji dodali približno 10 mL gojitvenega medija in inkubirali na 37 °C brez prisotnosti CO₂.

3.2.3.4. ŠTETJE CELIC

Za štetje celic smo uporabili barvilo tripan modro, ki prehaja samo v odmrle celice. Mrtve celice so se obarvale modro, žive celice pa so ostale svetle in neobarvane. Po daljšem času pa barvilo preide tudi v žive celice. Ker je tripan modro toksično in karcinogeno barvilo, je ob njegovi uporabi obvezna nošnja zaščitnih rokavic.

Celice smo prešteli z uporabo hemocitometra. Hemocitometer je objektna ploščica, sestavljena iz dveh komor, posamezno komoro pa sestavlja devet kvadrantov, dimenzij 1,0 mm x 1,0 mm. Nanj je položeno še krovno stekelce, tako da je globina vsake komore 0,1 mm. Torej je volumen posameznega kvadranta točno določen in konstanten ($1,0 \text{ mm} \times 1,0 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$), kar omogoča točno štetje celic v znanem volumnu celične suspenzije. Celice smo šteli v kvadrantih A, B, C in D, prikazanih na sliki 6.

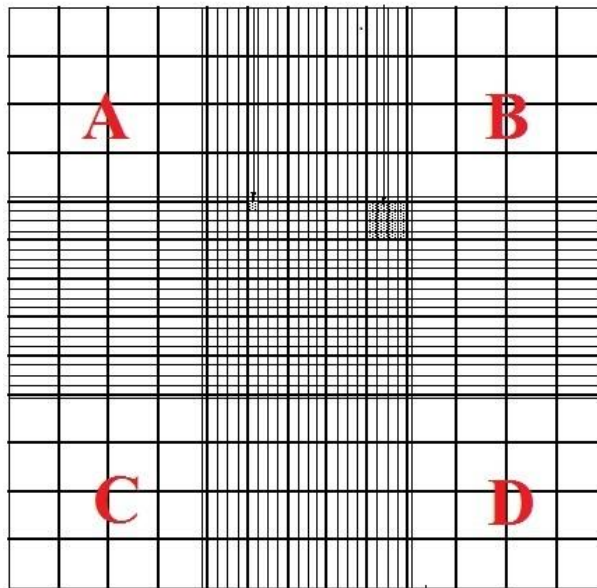
Kot prej omenjeno, smo celice prešteli po tripsinizaciji oziroma pred nasaditvijo na ploščo. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 80 μL celične suspenzije in 80 μL barvila tripan modrega (razmerje 1:1) ter vsebino s pomočjo pipete premešali. Hemocitometer smo razkužili s 70 % etanolom in v vsako komoro odpipetirali 1 μL pripravljene suspenzije. Pod svetlobnim mikroskopom smo prešteli žive (svetle) celice v štirih kvadrantih komore, prikazanih na sliki 6.

Število celic v 1 mL suspenzije smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\frac{A + B + C + D}{4} \times FR \times FK \times K \text{ [število celic/mL]}$$

Spremenljivke v enačbi:

- $\frac{A + B + C + D}{4}$ → povprečno število živih celic v 1 kvadrantu komore
(A, B, C, D – število prešteti živih celic v posameznem kvadrantu; 4 – število kvadrantov komore, v katerih smo celice šteli);
- FR → faktor redčenja (80 μL celične suspenzije smo dodali 80 μL barvila tripan modrega, torej smo redčili v razmerju 1:1 in je FR enak 2);
- FK → faktor koncentriranja (celice smo iz 10 mL resuspendirali v 5 mL, FK je torej enak 2);
- K → korekcijski faktor (celice smo šteli v volumnu 10^{-4} mL, zanimalo pa nas je število celic v 1 mL, K je torej enak 10^4).



Slika 6: Komora hemocitometra, razdeljena na devet kvadrantov. Za štetje celic smo uporabili kvadrante A, B, C in D. Vedno smo prešteli celice v vseh štirih kvadrantih (54).

Pri uporabi hemocitometra lahko preštejemo tudi napačno število celic. Najpogostejši primeri, ki privedejo do napačnega štetja, so sledeči (55):

- prisotnost mehurčka zraka ali nečistot v komori;
- nanos premajhnega volumna vzorca;
- neenakomerna razporeditev celic po komori;
- premajhno število celic (preprečimo s centrifugiranjem, resuspendiranjem v manjšem volumnu in ponovnim štetjem);
- preveliko število celic (preprečimo z večjim redčitvenim faktorjem, npr. celična suspenzija : tripan modro = 1 : 10).

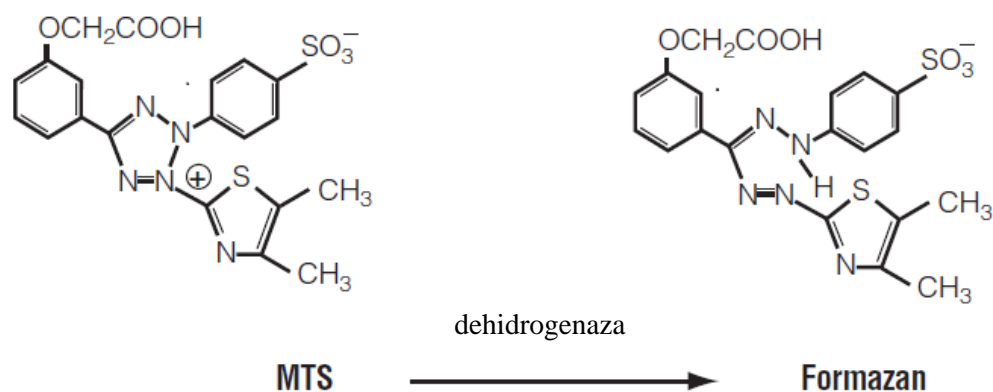
3.2.3.5. ZAMRZNITEV CELIC

Po končanem testiranju spojin na celični liniji smo celice zamrznili v raztopini naslednje sestave: 5 % DMSO, 45 % FBS in 50 % gojitvenega medija. V 1 mL krioviali smo zamrznili približno 6×10^6 celic. Celice smo najprej tripsinizirali po postopku, ki je opisan v poglavju Presajanje in nasajanje celic (3.2.3.3), in jih prešteli. Nato smo celično suspenzijo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant

odstranili in celični suspenziji dodali mešanico FBS in gojitvenega medija. V vsako kriovialo smo dali 50 μL DMSO in 950 μL pripravljene celične suspenzije. Krioviale smo opremili s potrebnimi podatki (ime celične linije, datum, število celic) in jih zamrznili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. TEST CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksičnost preiskovanih spojin in pripadajočih mešanic smo določali z metabolnim testom MTS. MTS-test je kolorimetrični test, s pomočjo katerega določimo število metabolno aktivnih celic, ki so bile izpostavljene preiskovanim spojinam. MTS-reagent vsebuje barvilo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol) in fenazin etosulfat (PES), ki reducira MTS. Tetrazolijeva sol se v metabolno aktivnih celicah reducira do obarvanega produkta formazana, ki je topen v mediju celične kulture (slika 7). Ključne za potek reakcije so celične dehidrogenaze, ki proizvajajo NADPH/NADH, ki prenese svoj elektron na PES. Le-ta reducira MTS do vodotopnega formazana, ki absorbira pri valovni dolžini 492 nm. S pomočjo izmerjene absorbanca lahko določimo količino nastalega formazana, ki je premosorazmerna številu metabolno aktivnih celic. Zaradi dejstva, da celica ob smrti izgubi zmožnost redukcije tetrazolijevih soli, nam ta test omogoča detekcijo le tistih celic, ki so preživele tretiranje s preiskovanimi spojinami. Metoda je hitra, enostavna in varna, toda lahko nam da lažno negativne rezultate, če določena celica preživi testiranje, hkrati pa ima okvarjene celične dehidrogenaze (56).



Slika 7: Pretvorba MTS v obarvan formazan v metabolno aktivnih celicah (56).

Pri testu citotoksičnosti smo za vse preiskovane spojine uporabili pripadajoče EC_{50} oz. IC_{50} in spojine testirali v naslednjih mešanica: AVB, BHA, 2-MR, 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB . Kot negativno kontrolo smo uporabili 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, kontroli topila je služil gojitveni medij s prisotnimi celicami, za slepi vzorec pa smo uporabili gojitveni medij brez prisotnih celic.

Test je trajal 3 dni po naslednjem postopku:

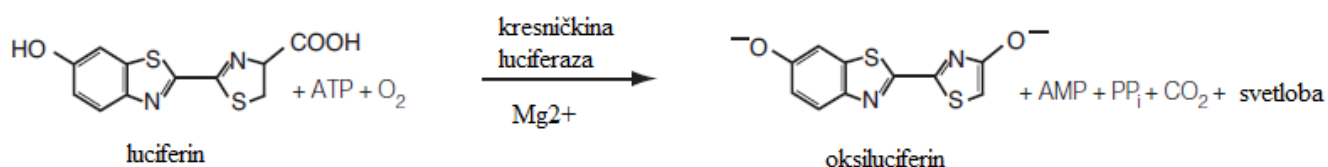
1. dan: Celice smo nasadili na prozorno mikrotitrsko ploščo tipa 92096 po postopku, ki je opisan v poglavju Presajanje in nasajanje celic (3.2.3.3.). Suspenzijo s celicami smo nanесли v vse vdolbine na plošči, razen v vdolbine za slepi vzorec. Nato smo ploščo inkubirali 24 ur na 37 °C brez prisotnosti CO_2 . V tem času so se celice popolnoma adherirale na dno plošče.
2. dan: V mikrocentrifugirkah smo si pripravili raztopine testiranih koncentracij preiskovanih in kontrolnih spojin po postopku, ki je opisan v poglavju Priprava vzorcev testiranih spojin (3.2.1.). Iz vseh vdolbin na plošči smo odstranili gojitveni medij, pri čemer so celice ostale adherirane na dnu plošče. V vdolbine smo nanесли 30 μL posamezne preiskovane spojine pri predhodno določeni koncentraciji EC_{50} oz. IC_{50} ter po potrebi dopolnili z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju do doseženega volumna 90 μL . V vdolbine smo dodali tudi 50 μL ustreznega agonista oz. antagonist (glede na kasneje izveden Luciferazni test - mešanice) za doseg končnega volumna 140 μL (90 μL + 50 μL = 140 μL). Tako pripravljeno ploščo

smo ponovno inkubirali za 24 ur na 37 °C brez prisotnosti CO₂. V tem času so testirane spojine zasedle mesta na ustreznih receptorjih.

- dan: Zaradi možnosti razpada na svetlobi smo MTS-reagent postavili v temo in ga odtalili. V temi smo v vsako vdolbino na mikrotitrski plošči nanесли po 10 μL MTS-reagenta in ploščo inkubirali 3 ure na 37 °C brez prisotnosti CO₂. Zatem smo s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader izmerili absorbanco pri valovni dolžini 492 nm.

3.2.5. LUCIFERAZNI TEST

Za določanje učinka preiskovanih spojin in pripadajočih mešanic na AR in GR smo uporabili luciferazni test, ki ga uvrščamo v 2. nivo OECD-testov (preglednica I). Luciferazni test temelji na aktivaciji gena za encim luciferazo. Aktiviran AR oziroma GR deluje kot transkripcijski faktor, ki se veže na MMTV promotorsko zaporedje, katero sproži prepisovanje gena za luciferazo, ki sledi promotorskemu zaporedju. Nastali encim sproži oksidacijo luciferina v oksiluciferin, pri čemer se sprošča svetloba, ki jo lahko merimo. Izmerjena luminiscenca služi kot merilo aktivacije encima, kar posredno predstavlja aktivacijo GR oziroma AR. Za potek dvostopenjske reakcije sta potrebna magnezijev ion in ATP, ki služita kot kofaktorja (57). V prvi stopnji pride do nastanka intermediata luciferil-adenilata, ki nato v drugi stopnji reagira s kisikom. Poteče reakcija oksidativne dekarboksilacije in nastanek oksiluciferina, CO₂, oksidativnih produktov in svetlobe (58). Reakcija je analogna reakciji bioiluminiscence v navadni vzhodni kresnički (slika 8), ki vsebuje encim kresničkino luciferazo (57).



Slika 8: Reakcija bioiluminiscence, ki poteka v navadni vzhodni kresnički. Reakcijo katalizira encim kresničkina luciferaza (57).

Omenjena testna metoda je zelo uporabna, saj je hitra, visoko občutljiva in primerna za identifikacijo spojin, ki inducirajo ali inhibirajo AR oziroma GR (57).

V testu Luciferazni test - preiskovane spojine smo preiskovane spojine testirali v koncentracijah, prikazanih v preglednici V. Spojinam smo določali antagonistični učinek na AR ter agonistični in antagonistični učinek na GR.

Preglednica V: Koncentracije preiskovanih spojin (AVB, BHA in 2-MR), ki smo jih uporabili za Luciferazni test – preiskovane spojine.

PREISKOVANE SPOJINE	TESTIRANE KONCENTRACIJE (μM)
AVB	1; 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-10} ; 10^{-12} ; 10^{-14} ; 10^{-16} .
BHA	50; 25; 1; 0,75; 0,5; 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-10} ; 10^{-12} .
2-MR	175; 150; 125; 100; 75; 50; 25; 1,75; 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-10} ; 10^{-12} ; 10^{-14} .

V testu Luciferazni test - mešanice smo za vse preiskovane spojine uporabili pripadajoče EC_{50} oz. IC_{50} in spojine testirali v naslednjih mešanicah: AVB, BHA, 2-MR, 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB. Omenjenim mešanicam smo določali antagonistični učinek na AR ter agonistični učinek na GR.

Kot pozitivno kontrolo smo za testiranje antagonizma na AR uporabili FLUT (antagonist na AR), za testiranje agonizma na GR smo uporabili HC (agonist na GR), za testiranje antagonizma na GR pa RU-486 (antagonist na GR). Kot negativno kontrolo smo uporabili 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, medtem ko nam je za kontrolo topila služil gojitveni medij.

Luciferazni test - preiskovane spojine in Luciferazni test - mešanice sta potekala 3 dni po naslednjem postopku:

1. dan: Celice smo nasadili na belo mikrotitrsko ploščo Lumitrac 600 po postopku, ki je opisan v poglavju Presajanje in nasajanje celic (3.2.3.3.). Suspenzijo s celicami smo nanесли v vse testirane vdolbine na plošči. V prazne netestirane vdolbine pa

smo nanesti po 100 μL DPBS. S tem smo dosegli manjše hlapenje medija iz testiranih vdolbin in posledično manjše standardne deviacije. Nato smo ploščo 24 ur inkubirali na 37 °C brez prisotnosti CO_2 . V tem času so se celice popolnoma adherirale na dno plošče.

2. dan: V mikrocentrifugirkah smo si pripravili raztopine testiranih koncentracij preiskovanih in kontrolnih spojin po postopku, ki je opisan v poglavju Priprava vzorcev testiranih spojin (3.2.1.). Iz vseh testiranih vdolbin na plošči smo odstranili gojitveni medij (celice so ostale adherirane na dnu plošče) in vanje dodali pripravljene raztopine testiranih spojin.

Spojine smo v vdolbine nanašali po naslednjem postopku:

- Testiranje agonizma na GR: V vdolbine smo najprej dodali 50 μL FLUT (antagonist na AR) in ploščo 30 minut inkubirali na 37 °C brez prisotnosti CO_2 . V tem času je FLUT zasedel AR in s tem omogočil določanje agonističnega učinka spojine samo na GR. Po inkubaciji smo v vdolbine dodali preiskovane spojine. Pri testu Luciferazni test - preiskovane spojine smo v vsako vdolbino nanesti 50 μL preiskovane spojine, pri testu Luciferazni test - mešanice pa smo nanesti 30 μL posamezne preiskovane spojine pri predhodno določeni koncentraciji EC_{50} ter po potrebi dopolnili z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju do doseženega volumna 90 μL .
- Testiranje antagonizma na AR: V vdolbine smo najprej nanesti preiskovane spojine. Pri testu Luciferazni test - preiskovane spojine smo v vsako vdolbino nanesti 50 μL preiskovane spojine, pri testu Luciferazni test - mešanice pa smo nanesti 30 μL posamezne preiskovane spojine pri predhodno določeni koncentraciji IC_{50} ter po potrebi dopolnili z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju do doseženega volumna 90 μL . Sledila je 30-minutna inkubacija na 37 °C brez prisotnosti CO_2 . Po inkubaciji smo v vdolbine dodali po 50 μL DHT (agonist na AR). Glede na zmanjšan učinek DHT smo določili antagonistični učinek preiskovane spojine na AR.

- Testiranje antagonizma na GR: Antagonistični učinek spojin na GR smo določali samo s testom Luciferazni test – preiskovane spojine. V vdolbine smo najprej nanесли 50 μL preiskovane spojine. Sledila je 30-minutna inkubacija na 37 °C brez prisotnosti CO_2 . Po inkubaciji smo v vdolbine dodali po 50 μL HC (agonist na GR). Glede na zmanjšan učinek HC smo določili antagonistični učinek preiskovane spojine na GR.

Tako pripravljeno ploščo smo ponovno inkubirali za 24 ur na 37 °C brez prisotnosti CO_2 . V tem času so testirane spojine prešle v jedra celic in zasedle mesta na ustreznih receptorjih.

3. dan: Z avtomatsko multikanalno pipeto smo vsebino odpipetirali iz vdolbin, pri čemer smo odpipetirali tudi DPBS iz netestiranih vdolbin. V vsako testirano vdolbino smo nanесли 100 μL DPBS, ki je služil spiranju morebitnega preostanka medija in spojin. Sledilo je odpipetiranje DPBS in dodatek 20 μL izhodnega lizirnega pufra Reporter Lysis 1X Buffer, ki smo ga predhodno odtalili, v vsako testirano vdolbino. S pomočjo lizirnega pufra smo celicam poškodovali celično steno in s tem omogočili vstop v celico kasneje dodanemu luciferinu. Ploščo smo v zamrzovalniku zamrznili na -80 °C in po 1 uri prenesli na sobno temperaturo, kjer smo jo pustili 1 uro. Omenjen postopek zamrzovanja in odtalitve smo še enkrat ponovili. Nato smo v vsako testirano vdolbino dodali 35 μL predhodno odtaljenega luciferaznega reagenta. Zaradi možnega razpada luciferaznega reagenta na svetlobi smo postopek izvedli v temi. Mikrotitrsko ploščo smo postavili v čitalec mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader in izmerili luminiscenco pri občutljivosti 135 in intervalnem času 1 sekunda.

3.2.6. ANALIZA PODATKOV

Pridobljene rezultate meritev testiranja citotoksičnosti ter testiranja učinkov na AR in GR smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. Za vsak posamezen test smo izvedli najmanj 3 neodvisne ponovitve (vsakokrat na različni pasaži celic), pri čemer smo določeno koncentracijo testirane spojine testirali v duplikatu.

Pri MTS-testiranju citotoksičnosti smo izmerjenim vrednostim absorbance testiranih spojin določili povprečje, odšteli vrednost slepega vzorca (gojitveni medij brez celic) in rezultat podali relativno glede na negativno kontrolo (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju), katera je predstavljala vrednost 1. Dobljeni rezultat predstavlja stopnjo preživetja celic oziroma stopnjo citotoksičnosti testirane spojine. Rezultate smo statistično analizirali z dvostranskim Studentovim t-testom, s katerim smo primerjali rezultate testiranih spojin s kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Izbrali smo si 5 % stopnjo tveganja ($\alpha = 0,05$). Odstopanja testiranih spojin od kontrole 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju so bila statistično značilna, ko je bila verjetnost, da testirana spojina in kontrola izzoveta enak odziv, manjša od 5 % (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Rezultate smo grafično prikazali v obliki histograma.

Pri luciferaznih testih smo izmerjenim vrednostim luminiscence testiranih spojin določili povprečje in rezultat podali relativno glede na negativno kontrolo (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju), katera je predstavljala vrednost 1. Dobljeni rezultat predstavlja relativno aktivnost luciferaze ob prisotnosti posamezne testirane spojine. Rezultate smo statistično analizirali po enakem postopku kot pri MTS-testiranju in jih grafično prikazali v obliki histograma.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. DOLOČANJE UČINKA PREISKOVANIH SPOJIN NA ANDROGENEM IN GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU

Preiskovanim spojinam (AVB, BHA in 2-MR) smo določali antagonistični učinek na AR ter agonistični in antagonistični učinek na GR. Agonističnega učinka na AR nismo določali, saj v presejalnem testu predhodne študije le-ta ni bil dokazan za nobeno izmed preiskovanih spojin (50).

Izvedli smo Luciferazni test - preiskovane spojine, opisan v poglavju Luciferazni test (3.2.5.), in iz povprečij dobljenih rezultatov s programom GraphPad Prism 5.01 oblikovali graf učinka (n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) v odvisnosti od koncentracije spojine. Določili smo vrednost koncentracije, pri kateri je posamezna spojina izzvala 50 % maksimalnega učinka (EC_{50}) oziroma 50 % maksimalne inhibicije ustreznega agonista (IC_{50}) na celični liniji MDA-kb2. Preiskovane spojine smo testirali pri koncentracijah, prikazanih v preglednici V iz poglavja Luciferazni test (3.2.5.). Za začetne koncentracije smo uporabili 1 μM za AVB, 50 μM za BHA in 175 μM za 2-MR, ki predstavljajo najvišje necitotoksične koncentracije preiskovanih spojin, ki so bile določene na celični liniji MDA-kb2 (50).

4.1.1. DOLOČANJE UČINKA NA ANDROGENEM RECEPTORJU

Na AR smo preučevali antagonistično delovanje preiskovanih spojin, pri čemer smo aktivnost spojine vrednotili glede na jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenega agonista DHT, ki smo ga testirali pri koncentraciji 0,5 nM (EC_{50} za celično linijo MDA-kb2). Iz povprečnih vrednosti rezultatov luciferaznega testa smo za vsako spojino oblikovali graf učinka v odvisnosti od koncentracije spojine, ki je prikazan na sliki 9. Iz dobljenih grafov smo definirali vrednost IC_{50} posamezne spojine in jo primerjali z vrednostjo IC_{50} FLUT (antagonist na AR), ki smo ga testirali kot pozitivno kontrolo. Iz preglednice VI je razvidno, da je kot najmočnejši antagonist deloval AVB ($IC_{50} = 0,00002 \mu\text{M}$), sledil mu je BHA z 200-krat višjo vrednostjo IC_{50} ($IC_{50} = 0,004 \mu\text{M}$).

Obe vrednosti pa sta precej nižji od vrednosti FLUT ($IC_{50} = 4,573 \mu M$). Za 2-MR ($IC_{50} = 83,02 \mu M$) pa se je izkazalo, da ima najšibkejšo antiandrogeno delovanje.

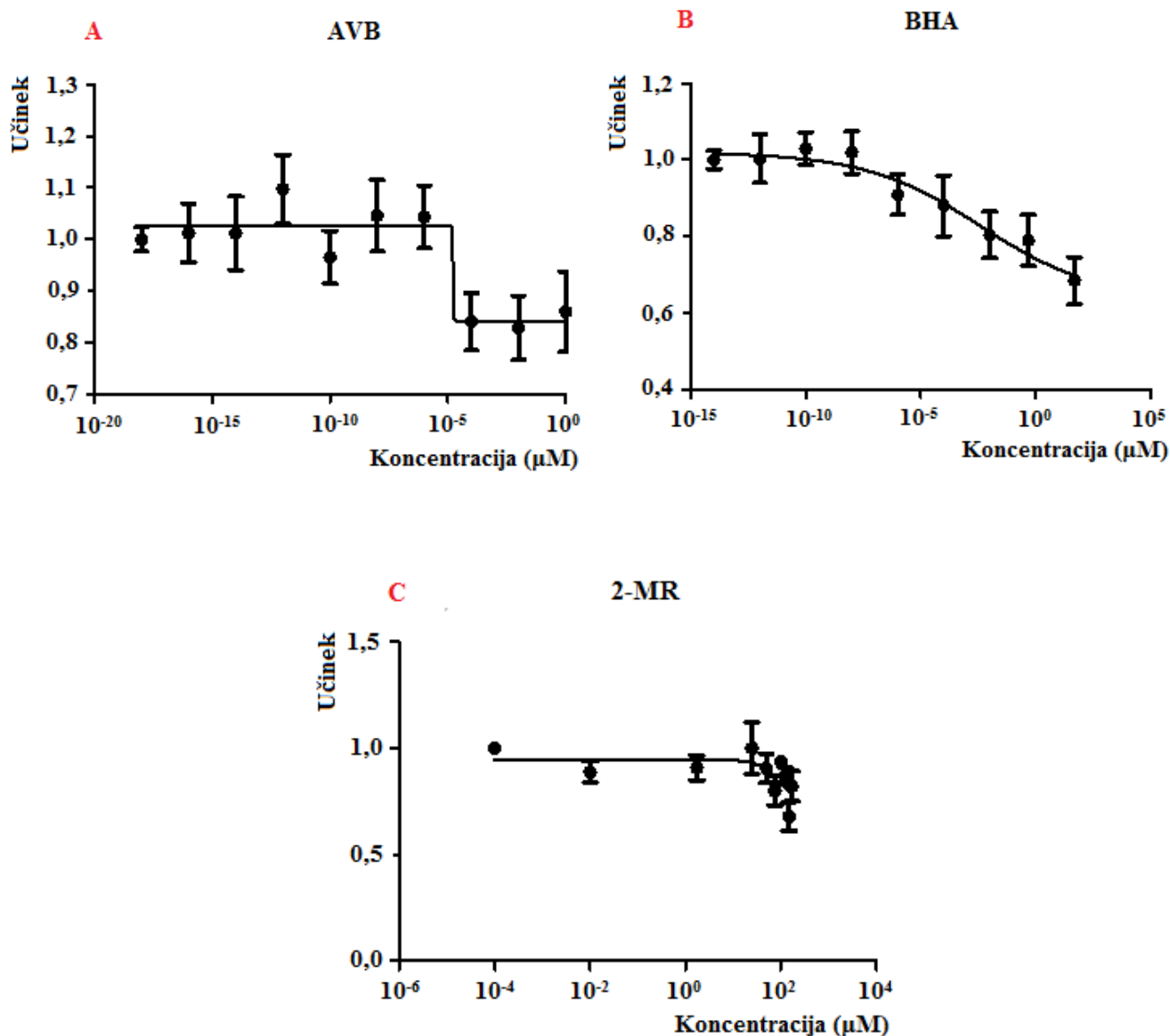
Preglednica VI: Antagonistični učinek testiranih spojin na AR.

	ANTAGONISTIČNI UČINEK NA AR
	IC_{50} (μM)
AVB	0,00002
BHA	0,004
2-MR	83,02
FLUT	4,573

Vpliv spojin AVB in BHA na androgeni sistem so raziskovali v nekaterih sorodnih študijah, pri katerih so spojini testirali v enakem koncentracijskem območju kot v našem primeru. Androgeno aktivnost AVB so preučevali v dveh *in vitro* raziskavah. Rezultati študije na celični liniji MDA-kb2 niso pokazali učinka AVB na AR, medtem ko je AVB na celični liniji U2-OS deloval šibko antagonistično na AR. Vrednost IC_{50} AVB se je izkazala za približno 20-krat višjo od IC_{50} antagonista FLUT (22, 24, 25). Razlika v rezultatih omenjenih študij je posledica uporabe drugačne celične linije (24). Razlika v rezultatih naše raziskave in študije, opravljene na isti celični liniji, pa je najverjetneje posledica drugačnih pogojev testiranja, kot so gostota celic, koncentracija agonista DHT in postopek merjenja luminiscence (25).

Podatki iz literature potrjujejo tudi antagonistični učinek BHA na AR, ki je bil dokazan na celični liniji PC-3 LUC^{AR+}, medtem ko BHA v 10-dnevni *in vivo* študiji na kastriranih podganjih samcih ni pokazal učinka na AR (32, 59).

Endokrino delovanje 2-MR je še dokaj neraziskano področje, zato objavljenih raziskav o vplivu 2-MR na AR v literaturi še ni.



Slika 9: Grafi spojin (A) AVB, (B) BHA in (C) 2-MR prikazujejo antagonistični učinek posamezne spojine na AR v odvisnosti od koncentracije spojine. Prikazane so povprečne vrednosti rezultatov (\pm SD) treh bioloških ponovitev luciferaznega testa določanja antagonističnega učinka na AR. Učinek spojine na AR je prikazan kot n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Celice so bile tretirane s preiskovanimi spojinami, po 30-minutni inkubaciji na 37 °C brez prisotnosti CO₂ pa je bil dodan še agonist DHT (0,5 nM).

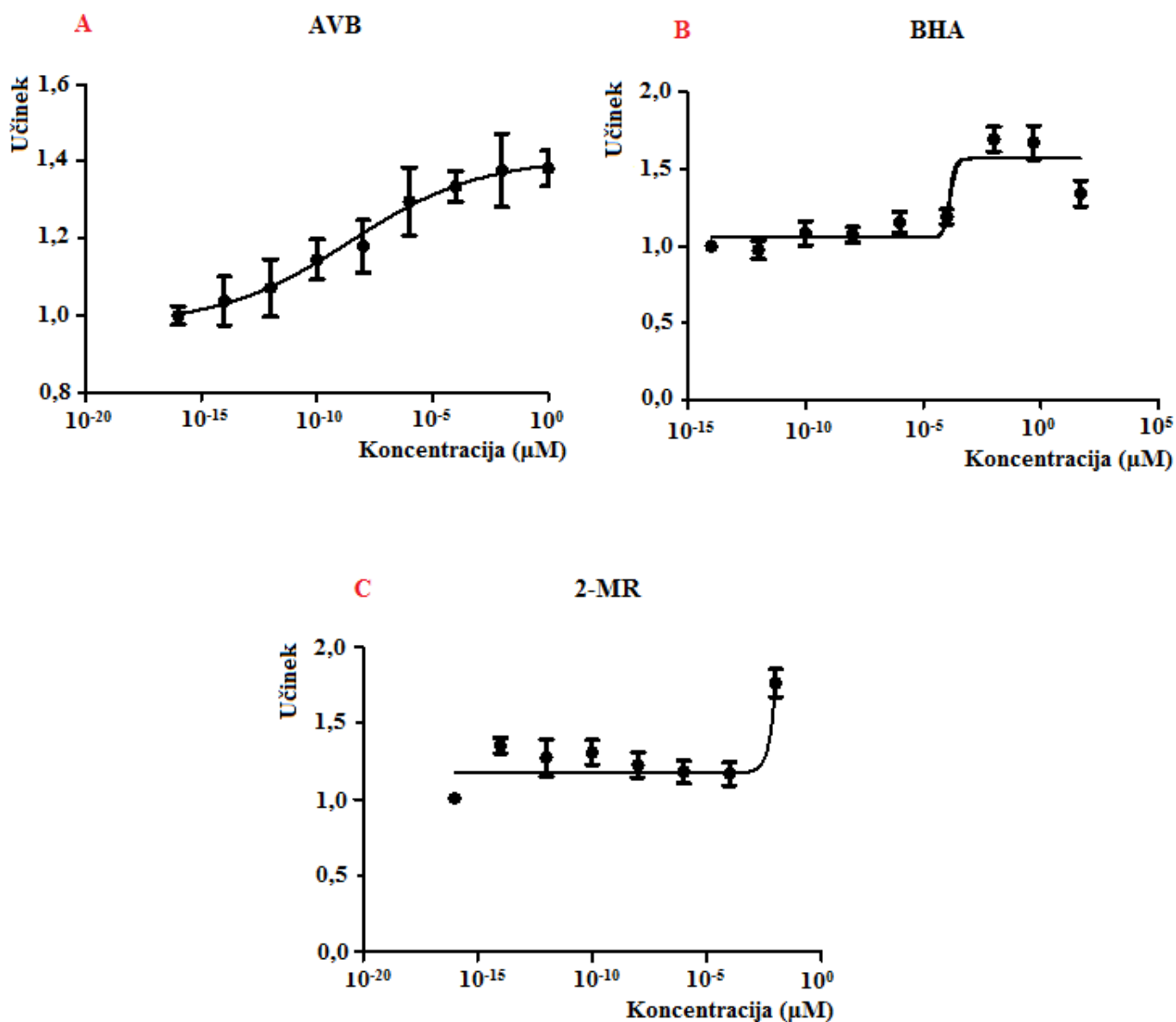
Za nadaljnje testiranje antagonističnega učinka mešanic preiskovanih spojin na AR smo uporabili vrednosti IC₅₀, prikazane v preglednici VI.

4.1.2. DOLOČANJE UČINKA NA GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU

Agonistične učinke preiskovanih spojin na GR smo določali s pomočjo predhodne 30-minutne inkubacije celic s 5 μM androgenim antagonistom FLUT (IC_{50} za celično linijo MDA-kb2), ki je zasedel AR in omogočil učinek spojin samo preko GR. Iz povprečnih vrednosti rezultatov luciferaznega testa smo za vsako spojino oblikovali graf učinka v odvisnosti od koncentracije spojine, ki je prikazan na sliki 10. Iz dobljenih grafov smo določili vrednost EC_{50} posamezne spojine in jo primerjali z vrednostjo EC_{50} HC (agonist na GR), ki smo ga opredelili kot pozitivno kontrolo. AVB je izkazal najmočnejše agonistično delovanje na GR ($\text{EC}_{50} = 2,66\text{E-}9 \mu\text{M}$). Približno 75000-krat šibkeje je deloval BHA ($\text{EC}_{50} = 0,0002 \mu\text{M}$). 2-MR ($\text{EC}_{50} = 1,24 \mu\text{M}$) pa je imel v primerjavi s HC ($\text{EC}_{50} = 0,09 \mu\text{M}$) 14-krat šibkejše glukokortikoidno delovanje (preglednica VII).

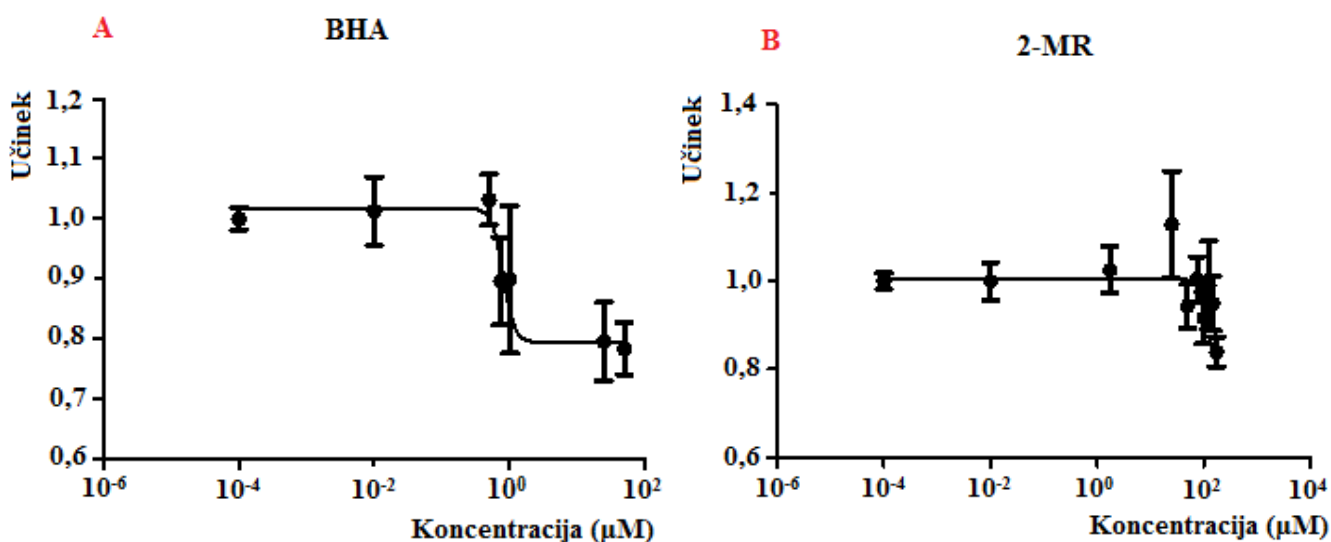
Preglednica VII: Agonistični in antagonistični učinek testiranih spojin na GR.

	AGONISTIČNI UČINEK NA GR EC_{50} (μM)	ANTAGONISTIČNI UČINEK NA GR IC_{50} (μM)
AVB	2,66E-9	/
BHA	0,0002	0,81
2-MR	1,24	4422
HC	0,09	/
RU-486	/	0,0977



Slika 10: Grafi spojin (A) AVB, (B) BHA in (C) 2-MR prikazujejo agonistični učinek posamezne spojine na GR v odvisnosti od koncentracije spojine. Prikazane so povprečne vrednosti rezultatov (\pm SD) treh bioloških ponovitev luciferaznega testa določanja agonističnega učinka na GR. Učinek spojine na GR je prikazan kot n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Celice so bile tretirane z antagonistom FLUT (5 μ M), po 30-minutni inkubaciji na 37 °C brez prisotnosti CO₂ pa so bile dodane še preiskovane spojine.

Rezultati predhodne študije niso pokazali antagonističnega učinka AVB na GR, zato le-tega nismo testirali (50). Antagonistične učinke BHA in 2-MR na GR smo vrednotili preko jakosti zmanjšanja učinka hkrati dodanega glukokortikoidnega agonista HC, ki smo ga testirali pri koncentraciji 500 nM (EC_{50} za celično linijo MDA-kb2). Slika 11 prikazuje grafa učinka v odvisnosti od koncentracije posamezne spojine, ki smo ju oblikovali iz povprečnih vrednosti rezultatov luciferaznega testa. Definirali smo vrednost IC_{50} posamezne spojine in jo primerjali z vrednostjo IC_{50} RU-486 (antagonist na GR), ki je predstavljal pozitivno kontrolo. Tako BHA ($IC_{50} = 0,81 \mu M$) kot 2-MR ($IC_{50} = 4422 \mu M$) sta v nasprotju z RU-486 ($IC_{50} = 0,0977 \mu M$) izkazala šibko antagonistično delovanje na GR. Vrednosti IC_{50} vseh testiranih spojin so prikazane v preglednici VII.



Slika 11: Grafa spojin (A) BHA in (B) 2-MR prikazujeta antagonistični učinek posamezne spojine na GR v odvisnosti od koncentracije spojine. Prikazane so povprečne vrednosti rezultatov (\pm SD) treh bioloških ponovitev luciferaznega testa določanja antagonističnega učinka na GR. Učinek spojine na GR je prikazan kot n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Celice so bile tretirane s preiskovanimi spojinami, po 30-minutni inkubaciji na 37 °C brez prisotnosti CO_2 pa je bil dodan še agonist HC (500 nM).

Iz slik 10 in 11 je razvidno, da pri BHA grafa agonističnega in antagonističnega učinka na GR v koncentracijskem območju od 10^{-4} μM do 10^2 μM sovpadata. BHA je v tem koncentracijskem območju namreč deloval tako kot agonist kot tudi antagonist na GR. Enak pojav lahko opazimo tudi pri 2-MR, ki je agonistični in antagonistični učinek na GR izkazal v koncentracijskem območju od 10^{-4} μM do 10^{-2} μM . Razlog za ta pojav je mogoče iskati v izbrani celični liniji z izraženima obema tipoma receptorjev, AR in GR, kar pomeni, da se pri testiranju učinka na GR lahko kaže tudi vpliv posamezne spojine na AR in obratno. Na drugi strani pa sta vrednosti EC_{50} obeh spojin približno 3500-4000-krat nižje od vrednosti IC_{50} na GR (preglednica VII), kar nakazuje na dejstvo, da se spojini pri zelo nizkih koncentracijah obnašata kot agonista, pri višjih pa kot antagonist.

Obe spojini v omenjenih koncentracijskih območjih delujeta tudi antagonistično na AR, kar je razvidno iz slike 9. Če spojina inducira luciferazno aktivnost preko enega tipa receptorja in hkrati zavira njeno aktivnost preko drugega tipa receptorja, so rezultati posameznega testa lahko zavajajoči (51). Tako je v našem primeru pri BHA in 2-MR možno, da preko GR inducirana luciferazna aktivnost zakrije preko DHT inhibirano luciferazno aktivnost.

V zadnjih letih se je močno povečalo število raziskav o estrogenski in androgeni aktivnosti različnih spojin, ki posnemajo strukturo naravnih hormonov, medtem ko je področje preostalih jedrnih receptorjev še precej neraziskano. Iz tega razloga tudi podobnih raziskav o vplivu spojin AVB, BHA in 2-MR na GR v literaturi še ni.

Za nadaljnje testiranje agonističnega učinka mešanic preiskovanih spojin na GR smo uporabili vrednosti EC_{50} , prikazane v preglednici VII. Antagonističnega vpliva na GR nismo izvajali, saj se spojina 2-MR v izračunani koncentraciji IC_{50} (preglednica VII) v 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju ni raztopila. Mešanic zato nismo uspeli pripraviti.

4.2. TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI MEŠANIC PREISKOVANIH SPOJIN

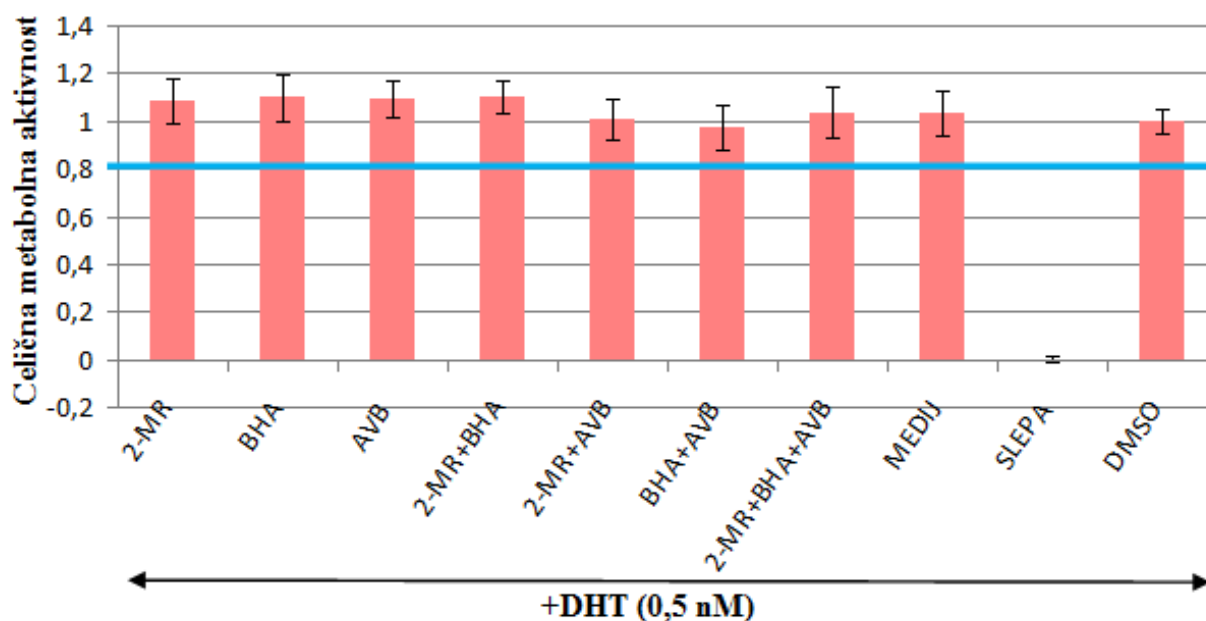
Iz testa Luciferazni test – preiskovane spojine pridobljene vrednosti IC_{50} (za AR) oz. EC_{50} (za GR) preiskovanih spojin (AVB, BHA in 2-MR) smo uporabili za testiranje antagonističnega učinka na AR (preglednica VI) in agonističnega učinka na GR (preglednica VII). Spojine smo testirali posamezno in v različnih mešanicah:

- 2-MR;
- BHA;
- AVB;
- 2-MR+BHA;
- 2-MR+AVB;
- BHA+AVB;
- 2-MR+BHA+AVB.

Pripravljenim vzorcem smo preverjali morebitno citotoksičnost s pomočjo testa MTS. Stopnjo citotoksičnosti smo določili s primerjanjem celic, tretiranih s posameznim vzorcem, s celicami, ki so bile izpostavljene negativni kontroli 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Za slepi vzorec smo uporabili gojitveni medij brez prisotnih celic, kot kontrolo topila pa smo uporabili gojitveni medij s prisotnimi celicami. Ugotovili smo, da 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju kot tudi medij sam ne vplivata na rezultate testov in na celice ne delujeta citotoksično, saj je bila v vseh primerih preživelost celic višja od 0,8, ki predstavlja izbrano mejo ustrezne celične metabolne aktivnosti (sliki 12 in 13).

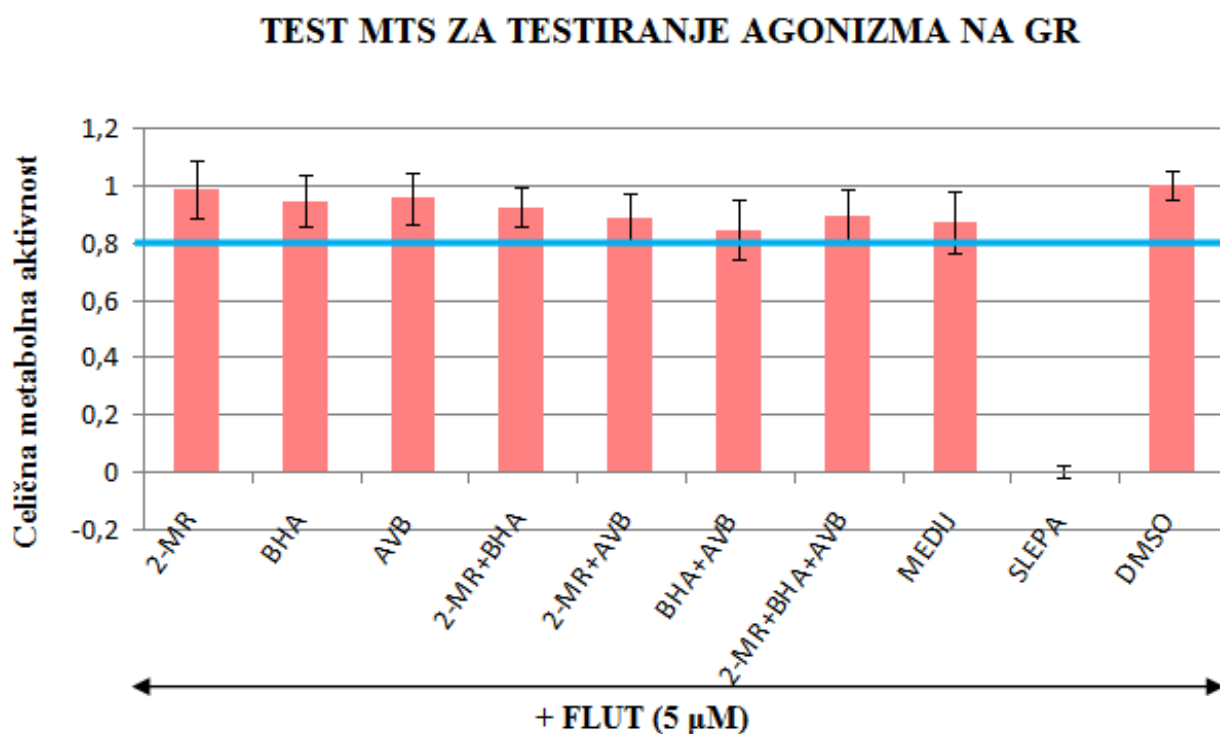
Na sliki 12 je prikazan graf preživetja celic preiskovanih spojin in pripadajočih mešanic za testiranje antagonističnega učinka na AR, iz katerega je razvidno, da je metabolna aktivnost celic za vse vzorce znašala nad 0,8, kar pomeni, da testirani vzorci na celice niso delovali citotoksično, zato smo jih uporabili pri sledečem testiranju antagonizma na AR. Vrednosti absorbanč vseh vzorcev, razen v primeru BHA+AVB (celična metabolna aktivnost = 0,97), so bile večje od kontrole (celična metabolna aktivnost = 1).

TEST MTS ZA TESTIRANJE ANTAGONIZMA NA AR



Slika 12: Histogram predstavlja povprečne vrednosti (\pm SD) treh bioloških ponovitev testa MTS za preiskovane spojine (AVB, BHA in 2-MR) in pripadajoče mešanice, namenjene testiranju antagonizma na AR. Absorbance smo izmerili po 24-urni stimulaciji celic z vzorci spojin in agonistom DHT (0,5 nM). Vrednosti celične metabolne aktivnosti predstavljajo n-kratne spremembe absorbance celic, tretiranih s posameznim vzorcem spojin, glede na absorbanco celic, tretiranih s kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Modra črta označuje minimalno mejo (0,8) metabolne aktivnosti celic, ki zagotavlja ustrezno celično viabilnost.

Slika 13 predstavlja graf preživetja celic preiskovanih spojin in pripadajočih mešanic za testiranje agonističnega učinka na GR. Tudi v tem primeru je preživelost celic za vse vzorce znašala nad 0,8 (meja ustrezne celične metabolne aktivnosti), kar pomeni, da smo vse testirane spojine in pripadajoče mešanice uporabili v nadaljnjem testiranju agonizma na GR.



Slika 13: Histogram predstavlja povprečne vrednosti (\pm SD) treh bioloških ponovitev testa MTS za preiskovane spojine (AVB, BHA in 2-MR) in pripadajoče mešanice, namenjene testiranju agonizma na GR. Absorbance smo izmerili po 24-urni stimulaciji celic z antagonistom FLUT (5 µM) in vzorci spojin. Vrednosti celične metabolne aktivnosti predstavljajo n-kratne spremembe absorbance celic, tretiranih s posameznim vzorcem spojin, glede na absorbance celic, tretiranih s kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Modra črta označuje minimalno mejo (0,8) metabolne aktivnosti celic, ki zagotavlja ustrezno celično viabilnost.

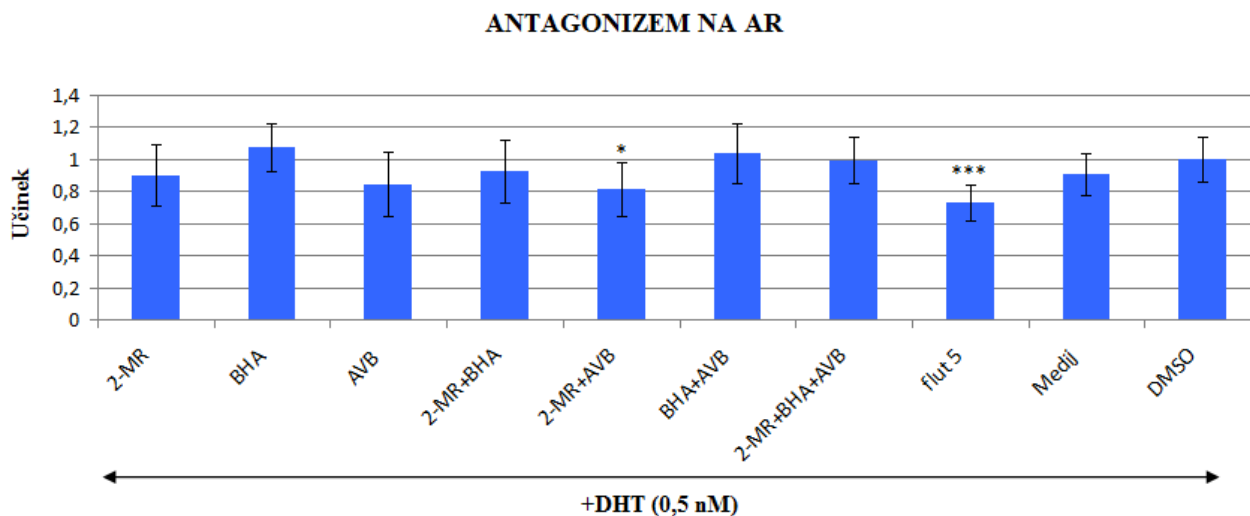
4.3. DOLOČANJE UČINKA MEŠANIC PREISKOVANIH SPOJIN NA ANDROGENEM IN GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU

Vse preiskovane spojine (AVB, BHA in 2-MR) in pripadajoče mešanice (2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB) so se pri testiranih koncentracijah IC_{50} (za testiranje antagonizma na AR) oz. EC_{50} (za testiranje agonizma na GR) izkazale za necitotoksične na celični liniji MDA-kb2, zato smo vse uporabili za testiranje antiandrogenega oziroma glukokortikoidnega delovanja. Izvedli smo Luciferazni test – mešanice, opisan v poglavju Luciferazni test (3.2.5.).

Za obravnavo antagonističnega delovanja spojin AVB, BHA in 2-MR ter njihovih mešanic na AR smo aktivnost posameznega vzorca vrednotili glede na jakost zmanjšanja učinka hkrati dodanega androgenega agonista DHT, ki smo ga testirali pri koncentraciji 0,5 nM (EC_{50} za celično linijo MDA-kb2). Iz povprečnih vrednosti rezultatov treh ponovitev luciferaznega testa smo oblikovali graf, ki prikazuje vpliv posameznega vzorca na AR (slika 14). Vse rezultate smo vrednotili glede na vrednost kontrole 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (aktivnost luciferaze = 1). Kot kontrolo topila smo uporabili gojitveni medij, ki na AR ni pokazal učinka, zato ni vplival na rezultate testa. Ugotovili smo, da je signifikantno antagonistično na AR delovala le mešanica 2-MR+AVB, ki je zmanjšala učinek DHT za 0,185-krat glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (*: $p < 0,05$), pri čemer sta bili v mešanici prisotni spojini z največjo (2-MR) in najmanjšo (AVB) vrednostjo IC_{50} . Omenjena mešanica pa je delovala približno 9-krat šibkeje od kontrole FLUT (antagonist na AR), ki je učinek DHT zmanjšal za 0,27-krat glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (***: $p < 0,001$). FLUT smo testirali pri koncentraciji 5 μ M (IC_{50} za celično linijo MDA-kb2). BHA ni v nobenem testiranem vzorcu deloval antiandrogeno.

Glede na izračunane vrednosti IC_{50} , predstavljene v preglednici VI, bi za vse tri posamezno testirane spojine pričakovali signifikanten antiandrogeni učinek. AVB in 2-MR sta aktivnost luciferaze zmanjšala (AVB za 0,16-krat, 2-MR za 0,10-krat), toda ker rezultat v nobenem primeru ni bil statistično značilen, ne moremo potrditi njunega antiandrogenega delovanja. V primeru BHA se je aktivnost luciferaze celo povečala (slika 14). Razlog, da nobena izmed spojin ni delovala antagonistično na AR, je kot že prej omenjeno moč iskati v prisotnosti tako AR kot GR in posledično delovanju posamezne spojine na oba

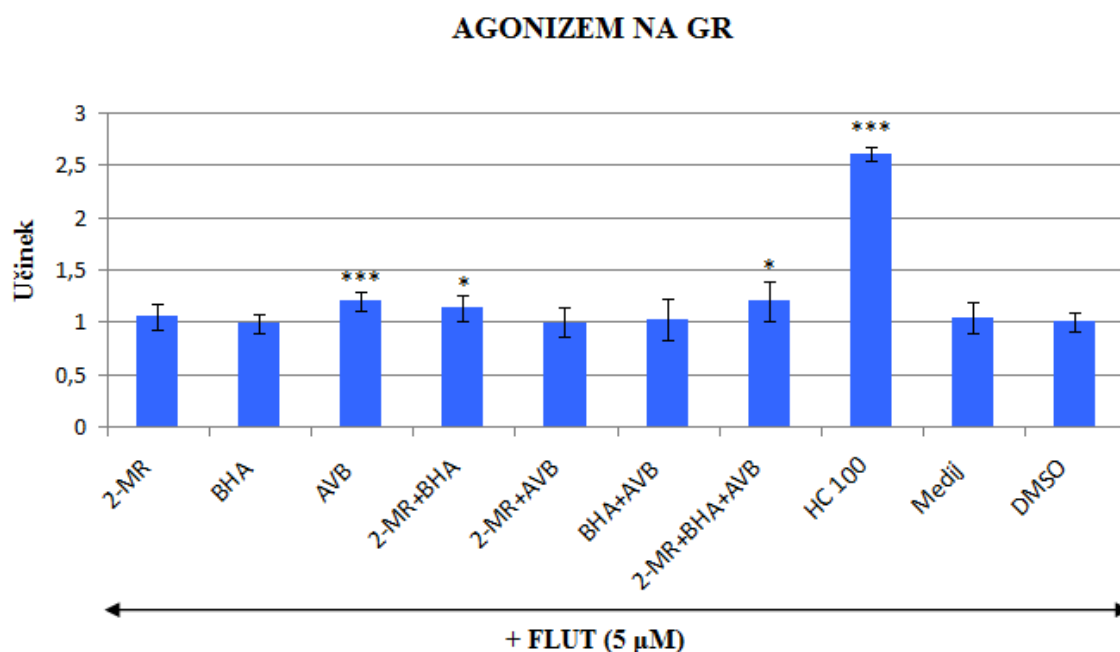
receptorja. Poleg tega vse tri spojine inhibirajo luciferazno aktivnost preko AR in so hkrati sposobne tudi inducirati njeno aktivnost preko GR, kar lahko privede do nerealnih rezultatov testa.



Slika 14: Graf prikazuje povprečne vrednosti rezultatov (\pm SD) treh bioloških ponovitev luciferaznega testa določanja antagonističnega učinka preiskovanih spojin (AVB, BHA in 2-MR) in pripadajočih mešanic na AR. Učinek vzorcev spojin na AR je prikazan kot n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Celice so bile tretirane z vzorci spojin, po 30-minutni inkubaciji na 37 °C brez prisotnosti CO₂ pa je bil dodan še agonist DHT (0,5 nM). Statistično značilna odstopanja testiranih vzorcev od kontrole (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) smo označili z: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Glukokortikoidno delovanje preiskovanih spojin in njihovih mešanic smo določali s pomočjo predhodne 30-minutne inkubacije celic s 5 μ M glukokortikoidnim antagonistom FLUT (IC₅₀ za celično linijo MDA-kb2), ki je zasedel AR in omogočil določanje učinka samo preko GR. Slika 15 predstavlja graf učinka posameznega vzorca na GR, ki smo ga oblikovali iz povprečnih vrednosti rezultatov treh ponovitev luciferaznega testa. Vse rezultate smo vrednotili glede na vrednost kontrole 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (aktivnost luciferaze = 1). Kot kontrolo topila smo uporabili gojitveni medij, ki na GR ni pokazal učinka, zato ni vplival na rezultate testa. Iz slike 15 je razvidno, da sta kot najmočnejša agonista delovala vzorca AVB in 2-MR+BHA+AVB. Oba sta aktivnost luciferaze v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju povečala za približno 0,2-krat (AVB***: $p < 0,001$; 2-MR+BHA+AVB*: $p < 0,05$). Izmed preiskovanih spojin je učinek na GR izkazal le AVB, ki je na podlagi vrednosti EC₅₀ izkazal najmočnejše

glukokortikoidno delovanje (preglednica VII). Signifikanten učinek na GR je povzročila tudi mešanica 2-MR+BHA, ki je aktivnost luciferaze povečala za 0,13-krat glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (*: $p < 0,05$). 2-MR in BHA posamezno nista izkazala statistično značilnega učinka na GR, čeprav bi to glede na izračunane vrednosti EC_{50} pričakovali (preglednica VII). 2-MR je aktivnost luciferaze sicer povečal za 0,05-krat, toda rezultat se ni izkazal za statistično značilen. Obe spojini sta v predhodnem testu izkazali tako agonistični kot antagonistični vpliv na GR, kar je mogoče razlog za takšen rezultat. Njuna mešanica 2-MR+BHA pa je delovala agonistično. Kot kontrolo smo testirali agonist HC, ki je aktivnost luciferaze povečal za 1,61-krat glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (***: $p < 0,001$). HC nismo testirali pri literaturni vrednosti $EC_{50} = 500$ nM za celično linijo MDA-kb2, pač pa pri vrednosti 100 nM, ki je približno enaka vrednosti EC_{50} , ki smo jo določili sami (preglednica VII) (51). Učinek HC na GR pri 100 nM je v enakem velikostnem razredu kot učinki naših vzorcev.



Slika 15: Graf prikazuje povprečne vrednosti rezultatov (\pm SD) treh bioloških ponovitev luciferaznega testa določanja agonističnega učinka preiskovanih spojin (AVB, BHA in 2-MR) in pripadajočih mešanic na GR. Učinek vzorcev spojin na GR je prikazan kot n-kratna sprememba aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Celice so bile tretirane z antagonistom FLUT (5 µM), po 30-minutni inkubaciji na 37 °C brez prisotnosti CO₂ pa so bili dodani še vzorci spojin. Statistično značilna odstopanja testiranih vzorcev od kontrole (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) smo označili z: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Iz rezultatov je razvidno, da sta AVB in 2-MR prisotna v vzorcu, ki je izkazal antagonistični učinek na AR (2-MR+AVB), in v vseh vzorcih, ki so izkazali agonistični učinek na GR (AVB, 2-MR+BHA in 2-MR+BHA+AVB). Na podlagi predhodno izračunanih vrednosti IC_{50}/EC_{50} je imel AVB najmočnejše, 2-MR pa najšibkejše antiandrogeno in glukokortikoidno delovanje (preglednici VI, VII). Z izjemo AVB pri testiranju antagonizma na AR nobena izmed preiskovanih spojin pri koncentraciji EC_{50}/IC_{50} ni pokazala učinka na AR in GR. Iz tega lahko sklepamo, da tudi če posamezna spojina v zelo nizki koncentraciji nima vpliva na določen receptor, oziroma je ta vpliv zanemarljiv, lahko v kombinaciji z drugimi spojinami deluje kot hormonski motilec in predstavlja tveganje za zdravje ljudi. Slednje je pomembno z vidika vsakodnevne izpostavljenosti tem spojinam v okolju, kjer so le-te prisotne večinoma v zelo nizkih koncentracijah (60).

Skrb za človekovo izpostavljenost mešanici spojin z antiandrogenim delovanjem so izkazali v dveh *in vitro* študijah, kjer so vsem spojinam in pripadajočim mešanici spojin dokazali antiandrogeno delovanje. Testirali so mešanice različnih antioksidantov, pesticidov, parabenov, UV-filtrov in drugih kemikalij, med katerimi je bil tudi BHA (60, 61). Na drugi strani so različne mešanice štirih spojin z dokazanim glukokortikoidnim delovanjem (propilparaben, butilparaben, dietilheksil ftalat in tetrametrin) izkazale agonistični učinek na GR. Tudi v tej študiji so pripravili vse možne kombinacije mešanic spojin ter jih na celični liniji MDA-kb2 testirali pri koncentracijah 1 μ M in 10 nM. Od 11 testiranih mešanic jih je pri koncentraciji 1 μ M 7 izkazalo glukokortikoidno delovanje, pri koncentraciji 10 nM pa so 3 mešanice delovale agonistično na GR (62). Omenjene študije kažejo, da je pri oceni tveganja potrebno upoštevati ne le delovanje spojine same, pač pa tudi njeno delovanje v kombinacijah z drugimi spojinami.

Čeprav je prisotnost preiskovanih spojin v človeški plazmi slabo raziskana, podatki določenih študij nakazujejo, da so AVB, BHA in 2-MR v človeškem telesu prisotni v nizkih koncentracijah. AVB je v *in vitro* študiji z uporabo Franzovih difuzijskih celic izkazal stopnjo penetracije v kožo 14,10-16,78 % apliciranega odmerka 15 μ g/mL (48,3 μ M), pri čemer se je večina spojine zadržala v zgornjih plasteh kože, medtem ko je v spodnjem *dermisu* skoraj niso zaznali. Dermalna penetracija AVB je manj kot 1 %, kar nakazuje na nizko biološko razpoložljivost spojine (14, 18). Povprečna koncentracija

BHA, ki so jo izmerili v človeški plazmi, je bila 0,00102 µg/mL (0,00566 µM) (31). Za 2-MR pa so z uporabo prašičje kože ugotovili 4,48 % dermalno penetracijo oziroma 0,45 % penetracijo v kombinaciji z vodikovim peroksidom (33). Iz omenjenih študij lahko razberemo, da se koncentracije spojin, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, približujejo vrednostim, ki jim je človek dejansko izpostavljen. Vsekakor pa bi za nadaljnje testiranje endokrinega delovanja omenjenih spojin bilo potrebno določiti točne plazemske koncentracije po dermalni aplikaciji posamezne spojine. V primeru BHA, ki je prisoten v nekaterih prehranskih in farmacevtskih izdelkih, pa bi bilo smiselno upoštevati tudi peroralni vnos spojine v telo.

Ljudje smo poleg neposrednega načina preiskovanim spojinam izpostavljeni tudi na posreden način, in sicer zaradi prisotnosti le-teh v naši okolici. V preglednici VIII so prikazana različna področja sveta, kjer so v rekah, jezerih, odpadnih vodah ter celo ob morju zaznali prisotnost preiskovanih spojin. Opazimo lahko, da se v največjem številu primerov pojavlja AVB, kar je tudi pričakovati, saj gre za UV-filter, ki v vodno okolje vstopa preko spiranja s kože in oblačil ljudi. Poleg tega se večina UV-filtrov zaradi njihove hidrofobne narave nalaga v sedimentih, kjer predstavljajo nevarnost za živali in ljudi (63, 64). Iz preglednice VIII je razvidno, da se koncentracije AVB v različnih vodah gibljejo od 18 ng/L (5,8E-5 µM) do 2935 ng/L (9,5E-3 µM), pri čemer so najvišje koncentracije izmerili tako v čistih vodah (jezero, Nemčija) kot v nečistih (odpadne vode iz čistilnih naprav, Portugalska). Poleg tega so bile najvišje koncentracije izmerjene v poletnih mesecih (predvsem v juliju), ko je tudi poraba UV-filtrov v izdelkih za sončenje največja (64, 65). Zanimivo je dejstvo, da v bazenih niso ugotovili prisotnosti AVB, kar nakazuje na možnost razpada spojine v stiku s klorom. Prisotnost AVB pa so zaznali na Arktiki, kjer naj bi bil prisoten zaradi vpliva različnih oceanskih tokov (65). V raziskavi odpadnih voda iz čistilnih naprav na Portugalskem so najvišje koncentracije AVB izmerili v okolici kopališč in najbolj poseljenih regij. Poleg tega so bile koncentracije AVB v vodi, ki vstopa v čistilno napravo, bistveno višje od koncentracij v izstopni vodi, pri čemer so za AVB izračunali 37-99 % očistek preko čistilne naprave (64). Najnižja izmerjena koncentracija 18 ng/L se približuje naši testirani koncentraciji AVB pri testiranju antagonizma na AR ($IC_{50} = 0,00002 \mu M$), kar pomeni, da smo nizkim koncentracijam AVB izpostavljeni tudi posredno preko okolja, kar lahko vpliva na delovanje endokrinega sistema.

Fenoli, med katere spada BHA, zaidejo v vodno okolje večinoma ob razpadu snovi ter preko industrijske in kmetijske dejavnosti. Zaradi razširjene uporabe BHA kot antioksidanta v različnih izdelkih (hrana, izdelki za živali, kozmetični izdelki, farmacevtski izdelki, naftni izdelki, izdelki iz gume ipd.) je njegova prisotnost v okolju skoraj neizogibna. Poleg tega je BHA spojina, ki ima sposobnost bioakumulacije, kar pomeni, da za živali in ljudi ne predstavlja le nevarnosti akutne, pač pa tudi kronične toksičnosti (66). V različnih vodnih virih (reke, odpadne vode) so zaznali prisotnost BHA v koncentracijah od 25 ng/L ($1,4E-4 \mu\text{M}$) do $7E6 \text{ ng/L}$ ($38,8 \mu\text{M}$). Tudi v tem primeru vidimo, da se naše testirane koncentracije približujejo najnižji izmerjeni koncentraciji 25 ng/L (test antagonizma na AR: $IC_{50} = 0,004 \mu\text{M}$; test agonizma na GR: $EC_{50} = 0,0002 \mu\text{M}$).

Podatkov o pojavu 2-MR v vodnih virih je zelo malo, poleg tega v raziskavi odpadnih voda iz čistilnih naprav v ZDA ni bilo sledu o prisotnosti te spojine (67). Na podlagi samo ene raziskave ne moremo trditi, da omenjena spojina v okolju ni prisotna, saj so za to potrebne dodatne študije.

Preglednica VIII: Okoljska izpostavljenost preiskovanim spojinam AVB, BHA in 2-MR.

	KONCENTRACIJA (ng/L)	PODROČJE IZPOSTAVITVE
AVB	- 44,5-2935	- odpadne vode iz čistilnih naprav, Portugalska (64)
	- 36-38	- reka, Tajska (65)
	- 2431	- jezero, Nemčija (65)
	- 20	- jezero, Švica (65)
	- 24-721	- površina ob morju, Hong Kong (65)
	- 78-104	- površina ob morju, Japonska (65)
	- 70-87; 67-109	- površina ob morju, ZDA (65)
	- 53-100	- površina ob morju, Kitajska (65)
	- 18-70	- površina ob morju, Arktika (65)
	- / *	- bazen, Grčija (65)
BHA	- 700-45200	- reka, Italija (68)
	-7E6	- industrijske odpadne vode, ZDA (66)
	- 25-230	- odpadne vode iz čistilnih naprav, ZDA (67)
2-MR	- / *	- odpadne vode iz čistilnih naprav, ZDA (67)

* - pod mejo zaznave

Na podlagi rezultatov našega testiranja ne moremo z gotovostjo potrditi antiandrogenega in glukokortikoidnega delovanje mešanic spojin AVB, BHA in 2-MR, lahko pa potrdimo vpliv vseh treh spojin in njihovih mešanic na oba receptorja. Iz rezultatov tudi ne moremo popolnoma potrditi, kakšen je mehanizem delovanja posamezne spojine. BHA je tako v eni izmed študij pokazal izredno šibko vezavo na androgeni receptor, zato bi za popolno potrditev mehanizma delovanja spojin preko modulacije receptorjev bilo potrebno podrobneje raziskati sposobnost vezave vseh preiskovanih spojin na obravnavana receptorja (59). Nadaljnje raziskave so še toliko bolj nujne zaradi vedno večje uporabe kozmetičnih izdelkov in posledično njihovega možnega negativnega vpliva kot potencialnih hormonskih motilcev na človekovo telo. Pokazali smo, da so smiselne tudi študije mešanic spojin, saj le-te dajejo bolj realen vpogled v delovanje različnih hormonskih motilcev na endokrini sistem.

5. SKLEP

Predmet naše raziskave je bil opredeliti vpliv spojin AVB, BHA in 2-MR ter njihovih mešanic 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB in 2-MR+BHA+AVB na AR in GR. Vse tri spojine se pogostoma pojavljajo v različnih kozmetičnih izdelkih.

Na podlagi rezultatov eksperimentalnega dela smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Pri testiranju antagonizma na AR in agonizma na GR se je na podlagi vrednosti EC_{50}/IC_{50} AVB izkazal kot najmočnejši antagonist na AR in agonist na GR. Sledil mu je BHA, najšibkejše delovanje pa smo zaznali pri 2-MR.

- Antagonistični učinek na GR smo testirali le za spojini BHA in 2-MR, saj AVB v predhodni študiji ni pokazal antiglukokortikoidnega učinka. BHA je imel približno 5000-krat močnejšo jakost antagonističnega učinka na GR kot 2-MR.

- Nobena izmed testiranih mešanic preiskovanih spojin (AVB, BHA, 2-MR, 2-MR+BHA, 2-MR+AVB, BHA+AVB, 2-MR+BHA+AVB) pri testirani koncentraciji EC_{50}/IC_{50} na izbranem receptorju na celični liniji MDA-kb2 ni delovala citotoksično.

- Značilno antagonistično delovanje na AR smo pri testiranju mešanic preiskovanih spojin zaznali le v primeru mešanice 2-MR+AVB, ki je v primerjavi s kontrolo (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) zmanjšala učinek agonista DHT za 0,185-krat.

- Pri testiranju agonizma mešanic preiskovanih spojin na GR so značilno glukokortikoidno delovale naslednje mešanice: AVB, 2-MR+BHA in 2-MR+BHA+AVB. Vzorca AVB in 2-MR+BHA+AVB sta luciferazno aktivnost v primerjavi s kontrolo (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) povečale za 0,2-krat, vzorec 2-MR+BHA pa je aktivnost luciferaze povečal za 0,13-krat.

Iz dobljenih rezultatov ne moremo potrditi ali zavrniti 1. hipoteze, saj je pri testiranjih antagonizma na AR in agonizma na GR najmočnejši učinek pokazal AVB (z zaetreno fenolno skupino), pri testiranju antagonizma na GR pa je najmočnejše deloval BHA (s prosto fenolno skupino). Potemtakem lahko sklepamo, da je fenolna skupina ključnega pomena za endokrino delovanje spojine, saj je prisotna pri vseh treh preiskovanih spojinah, ni pa nujno, da je le-ta prosta.

Čeprav mešanice preiskovanih spojin niso izkazale izrazitega učinka na AR in GR, z rezultati naše raziskave lahko potrdimo 2. hipotezo. Ugotovili smo, da spojine AVB, BHA in 2-MR ter njihove mešanice modulirajo delovanje tako AR kot GR, zato moramo biti pri njihovi uporabi previdni. Poleg tega rezultati opozarjajo na nevarnost endokrinega delovanja hormonskih motilcev, ki se v človeškem telesu pojavljajo istočasno. Človek jim je izpostavljen preko zdravil, okolja, hrane in nenazadnje kozmetičnih izdelkov, katerih sestavine so tudi naše preiskovane spojine. Večina raziskav je namreč osredotočenih na endokrino delovanje posamezne spojine. Zavedati pa se moramo, da tudi če posamezna spojina pri nizkih koncentracijah nima endokrine aktivnosti, lahko ob prisotnosti ostalih spojin v telesu (tvorbi mešanic) predstavlja nevarnost za naše zdravje. Pri testiranju vpliva mešanic na AR in GR so prav binarne kombinacije (2-MR+AVB in 2-MR+BHA) in terciarna kombinacija spojin (2-MR+BHA+AVB) izkazale nizek, pa vendar signifikanten učinek na receptorju, medtem ko posamezne spojine (z izjemo AVB pri testiranju agonizma na GR) niso imele signifikantnega učinka.

Za dokončno potrditev agonističnega/antagonističnega učinka preiskovanih spojin in pripadajočih mešanic na AR in GR bi bila potrebna natančnejša testiranja. Linija MDA-kb2 namreč izraža AR in GR, za pridobitev relevantnejših rezultatov pa bi bila primernejša linija z izraženim le enim tipom receptorjev. Poleg tega bi nam dodatna *in vivo* testiranja omogočila podrobnejši vpogled v mehanizem delovanja posamezne spojine in s tem določitev celostne ocene tveganja za zdravje ljudi in živali.

6. LITERATURA

1. Fuhrman VF, Tal A, Arnon S: Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. *Journal of Hazardous Materials* 2015; 286: 589-611.
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, in Gore AC: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 2009; 30 (4): 293-342.
3. Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Impact Assess Review* 1994; 14: 469-89.
4. WHO/UNEP: State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012, WHO Library Cataloguing-in-Publication data, 2013: 1-15.
5. Pop A, Kiss B, Loghin F: Endocrine disrupting effects of butylated hydroxyanisole (BHA – E320). *Clujul Medical* 2013; 86 (1): 16-20.
6. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D: Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones* 2010; 9 (1): 9-15.
7. Gelbke HP, Kayser M, Poole A: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 2004; 205: 17-25.
8. Guyton AC, Hall JE: *Textbook of Medical Physiology*, 11th Edition, Elsevier Inc., Philadelphia, 2006: 905-16, 944-54, 1003-6.
9. Norman AW, Henry HL: *Hormones*, 3rd Edition, Elsevier Inc., London, San Diego, MA, Oxford, 2015: 27-53.
10. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M: Multiple Actions of Steroid Hormones - A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacological Reviews* 2000; 52 (4): 513-55.
11. Darbre PD: *Endocrine disruption and human health*, 1st Edition, Elsevier Inc., London, San Diego, MA, Oxford, 2015: 75-80, 114-5.

12. Simmons CA, Bledsoe RK, Guex N, Pearce KH: Expression, purification, and characterization of multiple, multifunctional human glucocorticoid receptor proteins. *Protein Expression and Purification* 2008; 62: 29-35.
13. Kockler J, Robertson S, Oelgemöller M, Davies M, Bowden B, Brittain HG, Glass BD: Butyl Methoxy Dibenzoylmethane, Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 38, Elsevier Inc., San Diego, 2013: 87-111.
14. Antoniou C, Kosmadaki MG, Stratigos AJ, Katsambas AD: Sunscreens – what's important to know. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2008; 22: 1110-1119.
15. Kullavanijaya P, Lim HW: Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005; 52 (6): 937-58.
16. Sambandan DR, Ratner D. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011; 64 (4): 748-58.
17. Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF: A Review of Sunscreen Safety and Efficacy. *Photochemistry and Photobiology* 1998; 68 (3): 243-56.
18. Simeoni S, Scalia S, Benson HAE: Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 280: 163-171.
19. Scalia S, Coppi G, Iannuccelli V: Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane. In vivo skin penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; 54: 345-50.
20. Giokas DL, Salvador A, Chisvert A: UV filters. From sunscreens to human body and the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26 (5): 360-74.
21. Kaiser D, Sieratowicz A, Zielke H, Oetken M, Hollert H, Oehlmann J: Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution* 2012; 163: 84-90.

22. Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger W: Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. *Toxicology* 2004; 205: 113-122.
23. Schreurs R, Lanser P, Seinen W, Van der Burg B: Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Archives of Toxicology* 2002; 76: 257-61.
24. Schreurs RHMM, Sonneveld E, Jansen JHJ, Seinen W, Van der Burg B: Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences* 2005; 83: 264-272.
25. Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M: UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences* 2003; 74: 43-50.
26. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive, *EFSA Journal* 2011; 9 (10): 2392. http://www.ift.org/~media/Knowledge%20Center/Focus%20Areas/ProductDev/EFSA_BHA_scientificopinion.pdf; Dostop: 16.7.2015.
27. Schumann R: In vitro absorption of butylated hydroxyanisole through human skin. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 1991; 42: 335-40.
28. Iverson F: In vivo Studies on Butylated Hydroxyanisole. *Food and Chemical Toxicology* 1999; 37: 993-7.
29. Verhagen H, Schilderman PAEL, Kleinjans JCS: Butylated hydroxyanisole in perspective. *Chemico-Biological Interactions* 1991; 80: 109-34.
30. Verhagen H, Maas LM, Beckers RHG, Thijssen HHW, Ten Hoor F, Henderson PT, Kleinjans JCS: Effect of Subacute Oral Intake of the Food Antioxidant Butylated Hydroxyanisole on Clinical Parameters and Phase-I and –II Biotransformation Capacity in Man. *Human & Experimental Toxicology* 1989; 8: 451-9.

31. Bianchi L, Colivicchi MA, Della Corte L, Valoti M, Sgaragli GP, Bechi P: Measurement of synthetic phenolic antioxidants in human tissues by high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 1997; 694: 359-365.
32. Schrader TJ, Cooke GM: Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity *in vitro*. *Toxicological Sciences* 2000; 53: 278-288.
33. Scientific Committee on Consumer Products: Opinion on 2-Methylresorcinol, No. A44. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_071.pdf; Dostop: 10.5.2015.
34. Salvador A, Chisvert A: *Analysis of Cosmetic Products*, 1st Edition, Elsevier Inc., Amsterdam, Oxford, 2007: 190-209.
35. Freeman HS, Peters AT: *Colorants for Non-Textile Applications*, 1st Edition, Elsevier Inc., Amsterdam, 2000: 456-77.
36. Re TA, Loehr RF, Rodriguez SC, Gilmore CE, Burnett CM: A Subchronic, Teratologic, and Dominant Lethal Study of 2-Methylresorcinol in Rats, I. Subchronic Toxicity. *Fundamental and Applied Toxicology* 1986; 7: 287-92.
37. Re TA, Loehr RF, Rodriguez SC, Rodwell DE, Burnett CM: A Subchronic, Teratologic, and Dominant Lethal Study of 2-Methylresorcinol in Rats, II. Teratologic and Dominant Lethal Study. *Fundamental and Applied Toxicology* 1986; 7: 293-8.
38. Springer D: *A New Look of Hypothyroidism*, InTech, Praga, 2012: 21-44.
39. Gaitan E: *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1988; 2 (3): 683-702.
40. Nohynek JG, Fautz R, Benech-Kieffer F, Toutain H: Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42: 517-43.
41. <http://www.tcichemicals.com/eshop/en/eu/commodity/B3382/>; Dostop: 2.4.2015.
42. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/1045337?lang=en®ion=SI>; Dostop: 2.4.2015.

43. https://webshop.fishersci.com/insight2_uk/getProduct.do?productCode=10665282&resultSetPosition=0; Dostop: 2.4.2015.
44. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/b1212000?lang=en®ion=SI>; Dostop: 2.4.2015.
45. https://webshop.fishersci.com/insight2_uk/getProduct.do?productCode=10723023&resultSetPosition=0; Dostop: 2.4.2015.
46. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8380?lang=en®ion=SI>; Dostop: 2.4.2015.
47. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h4001?lang=en®ion=SI>; Dostop: 2.4.2015.
48. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f9397?lang=en®ion=SI>; Dostop: 2.4.2015.
49. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8046?lang=en®ion=SI>; Dostop: 2.4.2015.
50. Madžarac V: Določanje učinka avobenzona, butiliranega hidroksianizola in 2-metilresorcinola na androgenih in glukokortikoidnih receptorjih. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
51. Kolšek K, Gobec M, Raščan IM, Dolenc MS: Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of the glucocorticoid and androgen receptor activities. *Toxicology in Vitro* 2015; 29: 8-15.
52. Hall RE, Tilley WD, McPhaul MJ, Sutherland RL: Regulation of androgen receptor-gene expression by steroids and retinoic acid in human breast-cancer cells. *International Journal of Cancer* 1992; 52: 778-784.
53. Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE Jr.: A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences* 2002; 66: 69-81.
54. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>; Dostop: 10.4.2015.
55. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>; Dostop: 10.4.2015.

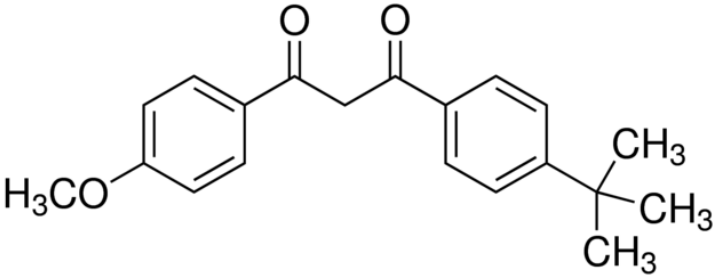
56. Promega Corporation: CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Technical Bulletin No. 245. <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf>; Dostop: 11.4.2015.
57. Promega Corporation: Luciferase Assay System, Technical Bulletin. <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/luciferase%20assay%20system%20protocol.pdf>; Dostop: 11.4.2015.
58. De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S: Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* 1987; 7 (2): 725-737.
59. Kang HG, Jeong SH, Cho JH, Kim DG, Park JM, Cho MH: Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. *Toxicology* 2005; 213: 147-156.
60. Orton F, Ermler S, Kugathas S, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A: Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014; 278: 201-208.
61. Ermler S, Scholze M, Kortenkamp A: The suitability of concentration addition for predicting the effects of multi-component mixtures of up to 17 anti-androgens with varied structural features in an in vitro AR antagonist assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011; 257: 189-197.
62. Klopčič I, Kolšek K, Dolenc MS: Glucocorticoid-like activity of propylparaben, butylparaben, diethylhexyl phthalate and tetramethrin mixtures studied in the MDA-kb2 cell line. *Toxicology Letters* 2015; 232: 376-383.
63. Kaiser D, Sieratowicz A, Zielke H, Oetken M, Hollert H, Oehlmann J: Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution* 2012; 163: 84-90.
64. Cunha SC, Pena A, Fernandes JO: Dispersive liquid-liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol A and 13 ultraviolet filters in wastewaters. *Journal of Chromatography A* 2015; 1414: 10-21.

65. Ramos S, Homem V, Alves A, Santos L: Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment – A review. *Science of the Total Environment* 2015; 526: 278-311.
66. Jos A, Repetto G, Rios JC, Del Peso A, Salguero M, Hazen MJ, Molero ML, Fernandez-Freire P, Perez-Martin JM, Labrador V, Camean A: Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints. *Aquatic Toxicology* 2005; 71: 183-92.
67. Trenholm RA, Vanderford BJ, Drewes JE, Snyder SA: Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1190: 253-62.
68. Davi ML, Gnudi F: Phenolic compounds in surface water. *Water Research* 1999; 33 (14): 3213-19.

7. PRILOGE

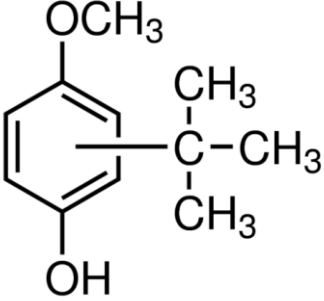
7.1. PRILOGA I - AVOBENZON

Preglednica IX: Fizikalno-kemijske lastnosti avobenzona (13).

Strukturna formula	 <p style="text-align: right;">(42)</p>
IUPAC nomenklatura	1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoksifenil)propan-1,3-dion
Empirična formula	C ₂₀ H ₂₂ O ₃
Molekulska masa	310,39 g/mol
Tališče	84,4-85,5 °C
log P_{ow}	2,41 (20)
pK_a	9,74 in 9,88
Topnost	- topen v metanolu - topen v acetonu - v vodi (20 °C): 0,01 mg/L

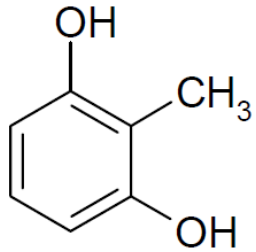
7.2. PRILOGA II – BUTILIRAN HIDROKSIANIZOL

Preglednica X: Fizikalno-kemijske lastnosti butiliranega hidroksianizola (26).

Strukturna formula	 <p style="text-align: right;">(44)</p>
IUPAC nomenklatura	2-(1,1-dimetiletil)-4-metoksifenol oz. 3-terc-butil-4-hidroksianizol in 3-(1,1-dimetiletil)-4-metoksifenol oz. 2-terc-butil-4-hidroksianizol
Empirična formula	C ₁₁ H ₁₆ O ₂
Molekulska masa	180, 25 g/mol
Vrelišče	268 °C
Tališče	48-63 °C
log P_{ow}	3,5
Gostota pri 20 °C	1,0587 g/cm ³
Topnost	<ul style="list-style-type: none"> - netopen v vodi - topen v etanolu in drugih alkoholih, propilen glikolu, petroletru, maščobah in oljih

7.3. PRILOGA III – 2-METILRESORCINOL

Preglednica XI: Fizikalno-kemijske lastnosti 2-metilresorcinola (33).

Strukturna formula	
IUPAC nomenklatura	2-metilbenzen-1,3-diol
Empirična formula	C ₇ H ₈ O ₂
Molekulska masa	124,17 g/mol
Tališče	116-123 °C
log P_{ow}	1,22 ± 0,21
Topnost	- topen v vodi in etanolu