

# ESTROGENI HORMONI IN ESTROGENSKO DELUJOČI KEMIJSKI MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA: ALI VPLIVAJO NA IZRAŽANJE DNA?

## ESTROGEN HORMONES AND ESTROGENICALLY ACTIVE ENDOCRINE DISRUPTORS: DO THEY INFLUENCE DNA EXPRESSION?

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Andrej Grobin, mag. farm.<sup>1</sup>

doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.<sup>2</sup>

prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko biologijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andrej.grobin@ffa.uni-lj.si

### POVZETEK

Estrogeni hormoni in estrogeno delujoči kemijski motilci endokrinega sistema so v okolju prisotne spojine, s katerimi vsakodnevno prihajamo v stik preko vode in hrane. Poleg klasičnih mehanizmov delovanja na receptorje vplivajo tudi na izražanje genov v človeškem telesu. Do sedaj najbolj raziskani vplivi na njihovo izražanje so preko metiliranja DNA, histonskih modifikacij, dolgih nekodirajočih RNA ter mikro RNA. Nekateri od teh vplivov so potrjeni tako *in vitro* kot *in vivo*, na primeru bisfenola A že pri okoljsko relevantnih koncentracijah. Vsakodnevno pa smo izpostavljeni vedno novim vrstam še neznanih kemijskih motilcev endokrinega sistema. Problemi, povezani s tem, pa so trenutno pomanjkljiva analitika zaznavanja teh spojin v okolju in človeškem organizmu ter slaba sistematičnost določanja njihove toksičnosti preko različnih dejavnikov, ki sinergistično vplivajo na izražanje DNA.

### KLJUČNE BESEDE:

bisfenol A (BPA), epigenetika, estrogeni hormoni, izražanje DNA, kemijski motilci endokrinega sistema

### ABSTRACT

Estrogen hormones and estrogenically active endocrine disruptors are substances, which we come into daily contact with in the environment through food and water. Apart from their classic mechanisms of action which are receptor mediated, they also elicit effects on the expression of genes in the human body. Currently, the most researched mechanisms affecting gene expression are DNA methylation, histone modification and effects via long non-coding RNA and microRNA. Some of these effects have already been determined in *in vitro*, as well as in *in vivo* tests, in the case of BPA even in environmentally relevant concentrations. Lately, we are being subjected to new types of previously unknown endocrine disruptors. The issues stem from the fact that we currently have limited analytics available for detecting all these substances in the environment and humans with tests, which are not systematic enough in determining the toxicity of the aforementioned substances caused by synergistic effects they have on DNA expression.

### KEY WORDS:

bisphenol A (BPA), DNA expression, endocrine disruptors, epigenetics, estrogen hormones



# 1 UVOD

Endokrini sistem je nadzorni sistem žlez z notranjim izločanjem, ki tvorijo kemijske prenašalce hormone. Ti s pomočjo transporta po krvožilnem sistemu prehajajo na mesta delovanja v tkiva in organe. Ker v telesu delujejo že v zelo nizkih koncentracijah, prav tako pa je njihova biološka aktivnost od koncentracije močno odvisna, telo preko zapletenih povratnih zank regulira njihovo delovanje.

Eden glavnih hormonskih sistemov pri človeku je sistem spolnih hormonov, ki jih po kemizmu uvrščamo med steroidne hormone. Njihova osnovna funkcija je sodelovanje v sistemu, v katerem sta udeležena še hipotalamus in nadledvična žleza. Skrbijo za razvoj spolovil in posledično spolni dimorfizem, omogočajo razmnoževanje, delujejo pa tudi na druge telesne funkcije, kot je npr. termoregulacija. V nadaljevanju se bomo posvetili estrogenskim spolnim hormonom. Ljudje smo v vsakodnevnem življenju izpostavljeni še spojinam, ki niso telesu lastne in prav tako delujejo na hormonski sistem. V okoljskih vzorcih, kot so npr. površinske vode, v merljivih koncentracijah najdemo različne spojine (1). Poleg ostankov sintezno pridobljenih hormonskih učinkovin, endogenih hormonov in fitosterolov, je med njimi vedno več novoodkritih onesnažil, za katere so že dokazali delovanje na hormonski sistem in jih posledično uvrščamo med kemijske motilce endokrinega sistema. Med te spadajo (2–7):

- bisfenoli (plastifikatorji, ki jih najdemo v večini plastičnih izdelkov),
- poliklorirani bifenili (PCB; spojine v industrijskih hladilih in mazivih),

- polibromirani difenil etri (zaviralci gorenja in penilci),
- pesticidi (večinoma zelo polarne spojine, ki jih najdemo v vodah),
- ftalati (plastifikatorji, sestavina gastrorezistentnih oblog v tabletah ipd.) in
- perfluorirane alkilirane spojine (PFAS; na vodo in maščobo odporne prevleke za papir in karton).

Zaradi njihove sposobnosti učinkovanja že v okoljsko relevantnih koncentracijah in njihove dokazane prisotnosti v človeku so v zadnjih desetletjih deležni večje pozornosti znanstvene stroke (8).

## 2 KLASIČNI IN ALTERNATIVNI MEHANIZMI DELOVANJA STEROIDNIH HORMONOV

Obstajata dve vrsti estrogenskih receptorjev, in sicer jedrni (ER $\alpha$  in ER $\beta$ ) in membranski (GPR30, ER-X in G $_q$ -mER) estrogenski receptorji. V odsotnosti estrogena se jedrni receptor nahaja v citoplazmi, vezan s šaperoni. Po vezavi estrogena receptor dimerizira, se translocira v jedro in nato veže na hormonsko odvisne elemente, ki se nahajajo na promotorjih tarčnih genov za jedrni receptor. Nato koregulatorji jedrnega receptorja delujejo na promotor in inducirajo transkripcijo tarčnih genov (9). Med temi koregulatorji so mnogi encimi, kot so npr. histonske acetiltransferaze, histonske deacetilaze, histonske metilaze in demetilaze ter DNA metilaze in demetilaze. Estrogenski membranski receptorji pa so večinoma z G-proteinom sklopljeni receptorji. Ti po vezavi agonista na receptor preko celične mobilizacije kalcija povzročijo sproščanje fosfatidilinozitol trifosfata v jedru celice, kar sproži signalno verigo za sproščanje hormonov.



*Slika 1: Shema mehanizmov delovanja hormonov in kemijskih motilcev endokrinega sistema na DNA, ki niso povezani s spremembami v zapisu DNA.*

*Figure 1: Scheme of the mechanisms of action for hormones and endocrine disruptors on DNA not related to changes in DNA sequence.*

Mehanizem delovanja različnih skupin kemijskih motilcev endokrinega sistema na jedrne receptorje so natančno raziskali in opisali (10). Poleg prekomerno ali premalo izraženih fizioloških učinkov, ki bi bili posledica vezave na te receptorje, pride pri vezavi prej omenjenih ligandov tudi do aktivacije negenomskih reakcij, kot so kinazne kaskade PI3K/AKT in MAPK. To posledično vodi do modulacije različnih encimov v celicah, kot so kinaze in fosfataze, na katere steroidni jedrni receptorji v fizioloških pogojih ne bi imeli neposrednega vpliva (11).

Poleg neposrednega vpliva na jedrne receptorje izkazujejo tudi vpliv na genomsko pot delovanja preko prej omenjenih koregulatorjev in tako posledično spreminjajo izražanje DNA. Zelo pomembni so tudi mehanizmi, ki niso povezani s spremembami v zapisu DNA (slika 1). Najbolj raziskani med njimi so spremembe v metiliranju DNA, histonske modifikacije, vpliv na mikro RNA ter dolge nekodirajoče RNA (12–16).

### 3 METILIRANJE DNA

Metiliranje DNA je bil prvi odkrit epigenetski označevalec. DNA se večinoma metilira na petem ogljikovem atomu citozina, tako dobimo 5-metilcitozin. Reakcijo katalizirajo encimi DNA metiltransferaze (DNMT). Citozin se v baznem paru veže z gvaninom. Regije, ki so bogate s citozin-gvanin dinukleotidom (CpG), imenujemo CpG-otočki in jih pogosto najdemo v regulatornih delih genoma.

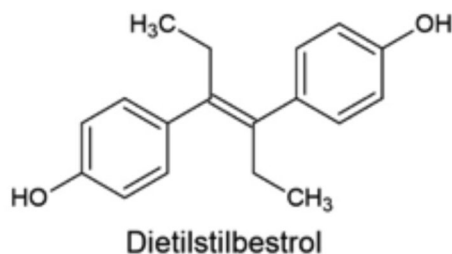
V splošnem velja, da metiliranje CpG, še posebej če gre za CpG-otoček, korelira z zaprto konformacijo kromatina, kar pomeni, da je DNA nedosegljiva za transkripcijske dejavnike. Nasprotno pa nemetilirane CpG najdemo v genih, ki se aktivno prepisujejo.

Obstajajo tudi izjeme, kjer lahko metiliranje DNA privede do povečane transkripcije. To vidimo na primeru zaviralca transkripcije CCCTC-vezavnega faktorja (CTCF), ki se veže na regije med promotorjem in ojačevalcem in s tem zavre prepisovanje genov. Metiliranje DNA na vezavnih mestih za CTCF tako onemogoči vezavo CTCF-proteina in s tem poveča izražanje genov. Estradiol z vezavo na estrogensko odzivne elemente v jedru neposredno pospešuje metiliranje DNA na CpG-otočkih, prav tako pa pospešuje izražanje DNMT (15). Njegova regulacija lahko pomembno vpliva na potek raka dojke (17).

Pomembnost vpliva kemijskih motilcev endokrinega sistema na metiliranje DNA so najprej odkrili pri terapiji z

dietilstilbestrolom. Dietilstilbestrol je sintezni nesteroidni estrogenski agonist, ki so ga do sedemdesetih let prejšnjega stoletja uporabljali za vzdrževanje normalnih serumskih koncentracij steroidnih hormonov pri nosečnicah, kar preprečuje zaplete v nosečnosti (slika 2).

Kasneje se je izkazalo, da dietilstilbestrol ni bil učinkovit pri zmanjševanju števila spontanih splavov in prezgodnjih porodov. Prišlo je celo do povečanja vaginalnega adenokarcinoma pri kar 0,1 % ženskih potomk pacientk, ki so uporabljale dietilstilbestrol, poleg tega pa še do abnormalnosti v razvoju spolovil in zmanjšani plodnosti njihovih potomk ter potomcev (5, 6). Raziskave so pokazale, da so ti učinki najverjetneje posledica sprememb v metiliranju DNA na laktoferinskem promotorju (dietilstilbestrol je povzročil demetiliranje), kar je posledično vodilo do motenj v razvoju organov (20).



*Slika 2: Kemijska struktura dietilstilbestrola.*

*Figure 2: Chemical structure of diethylstilbestrol.*

V zadnjih letih metiliranje DNA povezujejo še z več hormonsko odvisnimi boleznimi. Endometrijoza je bolezen, pri kateri najdemo endometrijo podobno tkivo izven maternične votline. Endometrijoza je najverjetneje epigenetska in od estrogenov odvisna bolezen (7, 8). Raziskave so pri intestinalni globoki endometrijozi (ena izmed najbolj agresivnih oblik) pokazale metiliranje DNA v promotorskih regijah za progesteronska receptorja A (PR-A) in B (PR-B). Metilirane alele promotorja PR-A so v večjem deležu odkrili v endometrioznem tkivu v primerjavi z zdravim, metilirane alele promotorja PR-B pa so zaznali samo v endometrioznem tkivu, ne pa tudi v zdravem (23).

Kontaminacija okolja in posledična izpostavitve človeka kemijskim motilcem endokrinega sistema lahko tudi vpliva na metiliranje DNA. Znanе so že spremembe v profilu metiliranja CpG-otočkov kot posledica uživanja hrane, kontaminirane z npr. PCB in PFAS (24). Slednji najverjetneje vplivajo na metiliranje v več delih DNA. Za perfluorooktil sulfonat, ki je predstavnik te skupine spojin, je znano, da

povzročajo zmanjšano metiliranje DNA, natančneje njenih elementov Alu, ki so najpogostejši gen v človeškem genomu (25). Prav tako so zaznali korelacijo med koncentracijo perfluorooktanojske kisline v krvi nosečnic, ki je tudi značilen predstavnik te skupine spojin, in zmanjšano porodno maso njihovih otrok (26).

Še ena izmed bolezni, za katero točni razlogi niso poznani, je sindrom policističnih jajčnikov. Poleg povezave z boleznimi metabolnega sindroma, kot sta sladkorna bolezen tipa 2 in debelost, odkrivajo tudi povezave bolezni z epigenetskimi modifikacijami, še posebej z metiliranjem DNA. Spremembe v metiliranju DNA, povezane s to boleznijo, so zaznali na več deset genih. Izražene so tako v periferni krvi in tisti v popkovnici kot tudi v tkivih, ki so zaradi bolezni spremenjena, npr. v jajčnikih, podkožnih maščobnih tkivih in skeletnih mišicah (27). Metiliranje DNA pri pacientkah z izraženo boleznijo je značilno višje kot pri zdravih (28).

Posledic metiliranja posameznih genov še ne poznamo v celoti, saj je raziskava odkrila mnogo večje število genov, pri katerih je bil profil metiliranja spremenjen, kot pa je bilo potem dejansko izraženih sprememb. Iz tega lahko sklepamo, da večina sprememb v metiliranju očitno ne vpliva na izražanje posameznih genov, zato so potrebne nadaljnje raziskave, da identificiramo posamezne gene, katerih metiliranje je pomembno za potek bolezni, in v kolikšni meri kemijski motilci endokrinega sistema vplivajo nanjo.

## 4 HISTONSKE MODIFIKACIJE

Histoni so proteini, odgovorni za urejenost DNA. 146 baznih parov DNA, navite okoli osmih histonskih molekul, tvorijo t. i. nukleosome. Vsak nukleosom je sestavljen iz dveh podenot (obe sta sestavljeni iz histonov H2A, H2B, H3 in H4)

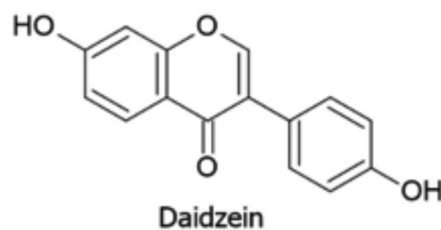
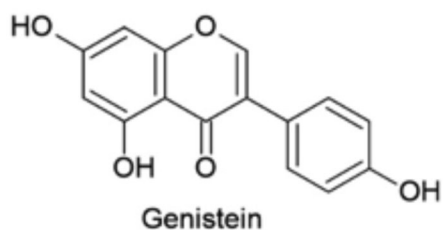
in povezovalnega histona H1, ki deluje kot stabilizator, ki poveže podenoti med seboj.

Vezavna afiniteta med DNA in histonom definira kromatinsko stanje, ki je lahko sproščeno (nizka vezavna afiniteta med DNA in histonom) ali kondenzirano (visoka vezavna afiniteta med DNA in histonom). Kromatinsko stanje je pomembno za regulacijo izražanja genov in je modulirano s posttranslacijskimi modifikacijami iztegnjenih repov histonov. Primera posttranslacijskih modifikacij sta npr. acetiliranje in metiliranje lizina. Estradiol pospešuje tako acetiliranje (z acetilazo p300, kar vodi v aktivacijo transkripcije) kot metiliranje histonov. Slednje lahko vodi v aktivacijo (metiliranje na histonu 3, lizin 4) ali inhibicijo transkripcije (metiliranje na histonu 3, lizin 27) (15).

Izoflavoni so skupina rastlinskih estrogenov. Največ jih najdemo v rastlinah iz družine metuljnic (Fabaceae), med katere spadajo arašidi, grah, čičerika in soja. Slednja je verjetno najpomembnejša predstavnik družine iz vidika nadomestne hormonske terapije, saj se uporablja v mnogih prehranskih dopolnilih, ki so prvenstveno namenjena blaženju simptomov klimakterija in ostalih postmenopavzalnih težav.

Glavni učinkovini v družini izoflavonov sta genistein in daidzein (slika 3). Po strukturi sta podobna estrogenom in delujeta na jedrne estrogenske receptorje. Učinkujeta tudi na encim histonsko acetiltransferazo in s tem povzročata povečano acetilacijo histonov (29). Učinek izoflavonov na encim je sicer manjši kot učinek estrogenov (za približno 250-krat), a je že viden tudi v serumskih koncentracijah izoflavonov, ki so značilne za populacijo s fitoestrogensko terapijo. Serumsko koncentracija pri terapiji pa je za več kot 250-krat višja od povprečne koncentracije estrogenov pri ženskah, iz česar bi lahko sklepali, da je učinek izražen tudi pri takšni terapiji (15, 16).

Verjetno najbolj raziskan kemijski motilec endokrinega sistema sodobnega časa je bisfenol A (BPA; slika 4). Uporabljamo ga v proizvodnji plastike že od šestdesetih let



Slika 3: Kemijski strukturi genisteina in daidzeina.

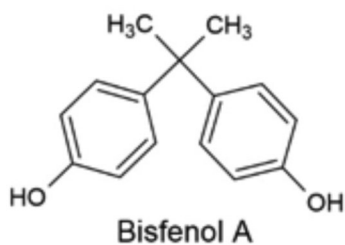
Figure 3: Chemical structures of genistein and daidzein.

prejšnjega stoletja, največ v proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smol. Le-te so pogosto uporabljane v vsebnikih za shranjevanje hrane in pijače.

BPA najdemo skoraj povsod v okolju, v vodah, zemlji in celo zraku, različne so zgolj koncentracije (31). V Evropi je uporaba BPA od leta 2011 prepovedana v plastiki, ki je namenjena za izdelavo otroških steklenič in steklenic za infuzijske raztopine. Od leta 2020 je prepovedan tudi za uporabo v termo papirju. Leta 2017 so ga dodali na evropski seznam spojin zelo velikega tveganja, ki je prvi korak omejitve uvoza in uporabe spojin v EU (32).

BPA med drugim deluje tudi na nivo metiliranja in acetiliranja promotorjev na več estrogensko reguliranih genih. Primer tega sta *HOXB9* in *HOXC6*. Udeležena sta v kodiranju proteinov, ki so kot transkripcijski faktorji udeleženi v proliferaciji in diferenciaciji celic. Le-ti imajo pomembno vlogo pri razvoju mlečnih žlez pri sesalcih (33). V primeru raka dojke je *HOXC6* značilno bolj izražen v rakavih tkivih. Podatki iz testiranj *in vitro* ter *in vivo* kažejo, da BPA inducira izražanje *HOXC6*. Enak učinek ima tudi estradiol. Povišano izražanje inducira izražanje tumorskih rastnih dejavnikov in tako pospešuje rast tumorja, čeprav je treba upoštevati, da so v raziskavi uporabili velik odmerek (25 µg/kg telesne mase) po principu odmerka z akutno toksičnostjo (34). Ocenjen vnos BPA v Sloveniji je približno 25 ng/kg telesne mase/dan (35).

BPA je vpleten tudi v indukcijo pospeševalca zeste homologa 2 (EZH2), ki je metiltransferaza, specifična za histon 3 na lizinu 27. Metilacijska aktivnost EZH2 olajša nastanek heterokromatinov in s tem utiša delovanje genov, prav tako pa je EZH2 udeležen v celični mitozii (36). EZH2 je povišano izražen pri raku dojke. Njegovo transkripcijo v telesu inducira prisotnost estradiola *in vitro* ter *in vivo*. BPA prav tako povečuje izražanje EZH2 (koncentracija, uporabljena v poskusu je bila 100 nM za BPA v primerjavi z 0,1 nM za estradiol), kar najverjetneje vodi v povečano izražanje tumorja (37).



Slika 4: Kemijska struktura bisfenola A.

Figure 4: Chemical structure of Bisphenol A.

## 5 MIKRO RNA

Mikro RNA (miRNA) so kratke nekodirajoče molekule RNA, velikosti 21 do 26 nukleotidov. Delujejo tako, da posttranslacijsko zavirajo izražanje genov preko vezave na 3'-neprevedene regije (3'-UTR) tarčnih informacijskih RNA (mRNA). Udeležene so v mnogih bioloških procesih, kot so razvoj celic, njihova rast in apoptoza (38). miRNA naj bi modulirale izražanje približno 30 % vseh genov, ki kodirajo proteine (39). Delovanje miRNA je odvisno od njene specifične interakcije s tarčo. Večina molekul miRNA se delno veže na svoje tarče na pozicijah 2–7 z njenega 5' konca. Ta regija se potem popolnoma veže na 3'-UTR preko interakcij baznih parov. Te interakcije posledično zavirajo izražanje tarčne mRNA, ker blokirajo njeno prepisovanje ali razpad (40). Raziskave kažejo, da različni hormoni modulirajo izražanje miRNA v različnih organih (41). Estradiol aktivno vpliva na nastanek miRNA v tkivih dojke in jajčnikov. To modulacijo estrogeni vršijo z inaktivacijo RNA polimeraze II in zaviranjem nastanka prekurzorjev za miRNA z zaviranjem delovanja ribonukleaze III. S tem se zmanjša prepisovanje miRNA (42). Poleg vpliva na njeno prepisovanje lahko estrogen vpliva tudi na izražanje miRNA. Skladno s tem so v raziskavah pokazali značilno razliko v profilih izražanja miRNA v estrogensko odvisnih in drugih vrstah raka dojke (43). Dokazali so tudi, da lahko estrogen neposredno modulira profile izražanja miRNA na modelu rib cebic in v celicah človeškega raka dojke MCF-7 in ZR-75 (44).

Tudi v primeru miRNA so že poznani vplivi nekaterih kemijskih motilcev endokrinega sistema na njeno izražanje (npr. pri perfluorooktanojski kislini in BPA). Motnje v profilu izražanja miRNA, ki jih ti povzročajo, se kažejo v obliki bolezni centralnega živčnega sistema, metabolnih motenj in seveda tudi motenj v reprodukciji (45). Za BPA je npr. znano, da povzroča zmanjšano izražanje miR-21 in nekaterih drugih molekul miRNA, kar je povezano z nastankom raka dojke (46).

## 6 DOLGE NEKODIRAJOČE RNA

Dolge nekodirajoče RNA (lncRNA) so skupina regulatornih molekul RNA, ki se ne prevedejo v protein in so daljše od 200 nukleotidov. lncRNA imajo več kot polovični delež



med molekulami, ki se prepisujejo v človeških celicah (47). Udeležene so v mnogih bioloških procesih, kot so pakiranje genoma, organizacija kromatina in regulacija genov. Podobno kot mRNA, se mnogo molekul lncRNA prepisuje z RNA polimerazo II ter se posttranslacijsko modificira.

Značilen predstavnik lncRNA je HOX transkripcijska protismislena RNA (HOTAIR). Gen, ki kodira zanj, najdemo na kromosomu 12. Mehanizem delovanja HOTAIR je preko utišanja nekaterih genov na kromosomu 2 (48). Znano je, da je HOTAIR povečano izražen v mnogih vrstah tumorjev, kot so npr. hepatocelični karcinom, rak trebušne slinavke, rak pljuč, kolorektalni rak in rak dojke (49).

Prepisovanje HOTAIR v telesu v primeru raka dojke regulira estradiol in je pomemben dejavnik vzdrževanja in preživetja rakavih celic. Zmanjšanje izražanja HOTAIR posledično povzroča zmanjšanje metastaz tumorja in njihovo invazivnost (50).

Eksperimenti so pokazali, da oba, BPA in dietilstilbestrol povečujeta izražanje HOTAIR v kulturi celic raka dojke ter tudi *in vivo* v mlečnih žlezah podgan. Posledično povečujeta možnost nastanka rakavih celic in vzdržujeta njegovo rast in metastaziranje (49).

## 7 RAZISKOVALNI IZZIVI PRI DOLOČEVANJU VPLIVOV KEMIJSKIH MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA

Raziskovalci učinkov kemijskih motilcev endokrinega sistema se spopadajo s številnimi izzivi (51). Eden večjih je poleg vedno naraščajočega števila spojin z endokrinim delovanjem tudi njihova koncentracijska odvisnost. Za večino kemijskih motilcev endokrinega sistema v okolju so predvidene koncentracije v velikostnem razredu nekaj ng/L (npr. za BPA v površinskih vodah) (31). Točni podatki za vse skupine teh spojin še niso na voljo, saj se analitika, ki omogoča meritve tako nizkih koncentracij, kot jih najdemo v okolju (in tudi nizkih koncentracij v kompleksnih bioloških materialih), v zadnjih letih šele razvija (52).

Mnogi učinki kemijskih motilcev endokrinega sistema, še posebej vplivi na izražanje DNA, se v tako nizkih koncentracijah, ki so značilne za okolje, ne pokažejo hitro (53). Posledično testiranja izvajamo po smernicah, ki predvidevajo kratkotrajnejša testiranja z višjimi odmerki, kar je zlati standard pri testiranju toksičnosti kemikalij (54).

Problem pri delovanju kemijskih motilcev endokrinega sistema se pokaže v dejstvu, da je lahko delovanje neke

spojine različno pri različnih koncentracijah. Če neka spojina pri višjih koncentracijah pospešuje nastanek raka, ni vedno nujno, da bo njeno delovanje enako, a zgolj počasnejše, tudi pri nižji koncentraciji. Primer tega je že prej omenjeni izoflavon genistein. Obstajajo raziskave, ki so pokazale, da v nekaterih primerih raka genistein v višjih koncentracijah (za faktor sto do nekaj tisoč višje, kot bi jih našli pri terapiji, in jih uporabljajo v kratkotrajnejših testih toksičnosti) pospešuje nastanek rakavih celic, v nižjih koncentracijah (primerljive s tistimi, ki jih pričakujemo ob terapiji) pa deluje protitumorno (41, 42).

## 8 VPLIV NA IZRAŽANJE DNA

Iz napisanega sledi, da lahko hormoni in kemijski motilci endokrinega sistema na mnogo različnih načinov, ki niso nujno vezani na delovanje preko receptorjev, delujejo na izražanje DNA. Vprašanje, ki se pri tem poraja, je, ali je ta izpostavitve relevantna s stališča toksičnosti za človeka ali pa so učinki vidni samo na testnih modelih.

Na več omenjenih primerih smo videli, da se učinek spojin lahko izrazi že v serumskih koncentracijah, ki so v območju pričakovanih oz. najdenih v človeškem organizmu, oz. v primeru BPA tudi tolikšnih, ki jih po obstoječih smernicah obravnavamo kot varne (16, 20, 43). To nam daje slutiti, da je pomen vpliva kemijskih motilcev endokrinega sistema (in analogno tudi hormonov) na izražanje DNA pri določevanju varnih dnevni odmerkov trenutno premalo upoštevan.

V klasičnih poskusih določevanja toksičnosti *in vitro* ter *in vivo*, ki so osnova za določitev varnih dnevni izpostavljenosti neki spojini, niso upoštevani vsi vidiki učinkovanja spojin, kot so kemijski motilci endokrinega sistema, saj leti še niso dobro poznani (58). Ker lahko sklepamo, da tovrstne spojine na izražanje DNA ne delujejo zgolj preko enega mehanizma (nenazadnje, BPA deluje na različne procese, povezane z izražanjem DNA), je zelo verjetno, da so ti mehanizmi med seboj sinergistični, kar še dodatno povišuje njihovo toksičnost (59). Zelo verjetno je tudi, da še mnoge druge spojine delujejo na več različnih procesov hkrati, a še niso tako dobro raziskane kot BPA.

Pomemben dejavnik sprememb izražanja DNA, ki ni povezan s spremembo genskega zapisa, je dejstvo, da se te spremembe lahko dedujejo. Raziskave potrjujejo dedovanje takšnih sprememb, ki jih povzroči BPA, na naslednje ge-

neracije, ki mu niso bile izpostavljene (60). V enem poskusu so bile vidne spremembe v izražanju genov (v serumskih koncentracijah, ki jih najdemo v splošni populaciji), potomci pa so imeli vedenjske motnje (61). Z izpostavitvijo staršev okoljsko relevantnim koncentracijam BPA so v drugem poskusu zaznali značilen upad rodnosti in sposobnosti razmnoževanja v prvi generaciji potomcev, ki se je nadaljevala še v drugo in tretjo generacijo potomcev; to so potrdili zgolj preko določanja plodnosti in histoloških preiskav (62). Iz napisanega sledi, da je naše vedenje o točnih učinkih posameznih kemijskih motilcev endokrinega sistema v okoljsko relevantnih koncentracijah trenutno pomanjkljivo. Še naprej je pomembno razvijati nove analize metode, ki nam omogočajo določitev velikostnega razreda izpostavljenosti vsem že znanim in vedno novim spojinam v okolju, še posebej v pitni vodi in hrani ter ostalih pijačah in posledično zaradi tega tudi v telesu.

Nadalje je zelo pomemben strukturiran pristop k razvoju eksperimentov, s katerimi bi v relevantnih koncentracijah ugotavljali dolgoročne učinke na žive organizme. Manjkajo predvsem večgeneracijski testi, pri katerih bi uporabljali odmerke spojin, ki so bližje izpostavljenosti v realnem svetu, torej nizke odmerke, ki so jim testni organizmi izpostavljeni vsakodnevno dlje časa, kar predstavlja realen scenarij stalnega vstopa spojin v organizme v naravi. Le tako lahko ustrezno opredelimo toksični potencial spojin, ob upoštevanju fizioloških sposobnosti popravljanja genskega zapisa po eni strani in sposobnosti akumulacije kemijskih motilcev endokrinega sistema v telesu po drugi. Za slednje velja, da kljub zmožnosti glukuronidacije in njihovem relativno hitrem izločanju iz telesa, le-te v telesu ostajajo dlje časa (31). To je lahko posledica možnosti deglukuronidacije in ponovne absorpcije v telesu in že omenjene kronične izpostavljenosti spojinam. Zavedati se moramo, da so takšni testi dolgotrajni in iz vidika potencialno negativnih rezultatov zaradi uporabe nižjih koncentracij za raziskovalce manj privlačni, a za napredek našega znanja na področju toksikologije toliko bolj pomembni.

## 9 SKLEP

Hormoni in kemijski motilci endokrinega sistema so spojine, ki jih najdemo v hrani, vodi in drugje v našem okolju. Ker so mnogi izmed njih lipofilne spojine, imajo potencial, da se nalagajo v telesu. Tako lahko kljub izpostavljenosti majh-

nim dnevnim vnosom, le-ti sčasoma postanejo veliko breme. Uporaba večine znanih kemijskih motilcev endokrinega sistema je omejena, a na trg in posledično v okolje prihajajo vedno nove spojine, velikokrat z neznanimi mehanizmi delovanja in toksičnostjo. Ker lahko poleg klasičnega načina delovanja svoje učinke izražajo tudi preko vpliva na izražanje DNA, so lahko posledično priporočene količine maksimalne dnevne izpostavljenosti postavljene previsoko, njihovi učinki pa se lahko celo izrazijo ne samo v osebnih, ki so bili neki spojinam izpostavljeni, ampak tudi v njihovih potomcih.

Odprtih ostaja veliko vprašanj, saj ne vemo, katere spojine se bodo izkazale kot kemijski motilci endokrinega sistema, kakšne so posledice sinergije učinkov različnih načinov vpliva na izražanje DNA zgolj ene spojine, kakšni so sinergistični učinki vplivov kombinacij tovrstnih spojin, katerim njihovim kombinacijam smo v vsakodnevnem življenju izpostavljeni in seveda, kakšne bodo dolgoročne posledice izpostavitve tem spojinam za nas in naše potomce. Zato so zelo pomembne skrbno načrtovane nadaljnje raziskave, ki obravnavajo to problematiko čim bolj celostno in v relevantnih časovnih ter koncentracijskih okvirjih.

## 10 LITERATURA

1. Kolodziej EP, Harter T, Sedlak DL. Dairy Wastewater, Aquaculture, and Spawning Fish as Sources of Steroid Hormones in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol*. 2004 Dec 1;38(23):6377–84.
2. Ohore OE, Zhang S. Endocrine disrupting effects of bisphenol A exposure and recent advances on its removal by water treatment systems. A review. *Scientific African*. 2019 Sep 1;5:e00135.
3. Buha Djordjevic A, Antonijevic E, Curcic M, Milovanovic V, Antonijevic B. Endocrine-disrupting mechanisms of polychlorinated biphenyls. *Curr Opin Toxicol*. 2020 Feb 1;19:42–9.
4. Cao LY, Ren XM, Yang Y, Wan B, Guo LH, Chen D, et al. Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers Exert Estrogenic Effects via Non-Genomic G Protein-Coupled Estrogen Receptor Mediated Pathways. *Environ Health Perspect*. 2018 May;126(5):057005.
5. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jun;8(6):2265–303.
6. Hlissníková H, Petrovičová I, Kolena B, Šidlovská M, Sirotkin A. Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Sep;17(18):6811.
7. Li J, Cao H, Feng H, Xue Q, Zhang A, Fu J. Evaluation of the Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Perfluoroalkyl Substances and Their Interactions with the Human Estrogen Receptor by

- Combining *In Vitro* Assays and *In Silico* Modeling. *Environ Sci Technol.* 2020 Nov 17;54(22):14514–24.
8. Karzi V, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Alegakis T, Katsikantami I, Sifakis S, et al. Biomonitoring of bisphenol A, triclosan and perfluorooctanoic acid in hair samples of children and adults. *J Appl Toxicol.* 2018 Aug;38(8):1144–52.
  9. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016 Dec 5;16(1):4–20.
  10. Deb P, Mandal SS. *Endocrine Disruptors*. In: *Gene Regulation, Epigenetics and Hormone Signaling* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cited 2019 Nov 21]. p. 607–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527697274.ch20>
  11. Ordóñez-Morán P, Muñoz A. Nuclear receptors: Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle.* 2009 Jun 1;8(11):1675–80.
  12. Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. *Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018;122(1):38–45.
  13. Nettore IC, Franchini F, Palatucci G, Macchia PE, Ungaro P. Epigenetic Mechanisms of Endocrine-Disrupting Chemicals in Obesity. *Biomedicines.* 2021 Nov;9(11):1716.
  14. Martini M, Corces VG, Rissman EF. Mini-review: Epigenetic mechanisms that promote transgenerational actions of endocrine disrupting chemicals: Applications to behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav.* 2020 Mar 1;119:104677.
  15. Kovács T, Szabó-Meleg E, Ábrahám IM. Estradiol-Induced Epigenetically Mediated Mechanisms and Regulation of Gene Expression. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(9):3177.
  16. Salinas I, Sinha N, Sen A. Androgen-induced epigenetic modulations in the ovary. *J Endocrinol.* 2021 Jun 1;249(3):R53–64.
  17. Ung M, Ma X, Johnson KC, Christensen BC, Cheng C. Effect of estrogen receptor  $\alpha$  binding on functional DNA methylation in breast cancer. *Epigenetics.* 2014 Apr 17;9(4):523–32.
  18. Dieckmann WJ, Davis ME, Rynkiewicz LM, Pottinger RE. Does the Administration of Diethylstilbestrol during Pregnancy have Therapeutic Value? *Am J Obst Gynecol.* 1953 Nov 1;66(5):1062–81.
  19. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR, Hornsby PP, Herbst AL. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med.* 1995 May 25;332(21):1411–6.
  20. Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, et al. Developmental Exposure to Diethylstilbestrol Elicits Demethylation of Estrogen-responsive Lactoferrin Gene in Mouse Uterus. *Cancer Res.* 1997 Oct 1;57(19):4356–9.
  21. Nasu K, Kawano Y, Tsukamoto Y, Takano M, Takai N, Li H, et al. Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *J Obstet Gynaecol Re.* 2011;37(7):683–95.
  22. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter Hypermethylation of Progesterone Receptor Isoform B (PR-B) in Endometriosis. *Epigenetics.* 2006 Apr 1;1(2):106–11.
  23. Meyer JL, Zimbardi D, Podgaec S, Amorim RL, Abrão MS, Rainho CA. DNA methylation patterns of steroid receptor genes *ESR1*, *ESR2* and *PGR* in deep endometriosis compromising the rectum. *Int J Mol Med.* 2014 Apr 1;33(4):897–904.
  24. Leung YK, Ouyang B, Niu L, Xie C, Ying C, Medvedovic M, et al. Identification of sex-specific DNA methylation changes driven by specific chemicals in cord blood in a Faroese birth cohort. *Epigenetics.* 2018;13(3):290–300.
  25. Liu CY, Chen PC, Lien PC, Liao YP. Prenatal Perfluorooctyl Sulfonate Exposure and Alu DNA Hypomethylation in Cord Blood. *Int J Environ Res Public Health.* 2018 24;15(6).
  26. Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The Hokkaido Study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2017;27(3):251–9.
  27. Vázquez-Martínez ER, Gómez-Viais YI, García-Gómez E, Reyes-Mayoral C, Reyes-Muñoz E, Camacho-Arroyo I, et al. DNA Methylation in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reproduction.* 2019 Apr 1;158(1):R27–40.
  28. Yu YY, Sun CX, Liu YK, Li Y, Wang L, Zhang W. Genome-wide screen of ovary-specific DNA methylation in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2015 Jul 1;104(1):145–153.e6.
  29. Hong T, Nakagawa T, Pan W, Kim MY, Lee Kraus W, Ikehara T, et al. Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004 Apr 23;317(1):259–64.
  30. Nikander E, Kilkinen A, Metsä-Heikkilä M, Adlercreutz H, Pietinen P, Tiitinen A, et al. A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients. *Obstet Gynecol.* 2003 Jun 1;101(6):1213–20.
  31. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-Response.* 2015 Jul 1;13(3):1559325815598308.
  32. ECHA. Four new substances of very high concern added to the Candidate List - All news - ECHA [Internet]. [cited 2020 Sep 8]. Available from: <https://echa.europa.eu/-/four-new-substances-of-very-high-concern-added-to-the-candidate-list>
  33. Castronovo V, Kusaka M, Chariot A, Gielen J, Sobel M. Homeobox genes: potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype. *Biochem Pharmacol.* 1994 Jan 13;47(1):137–43.
  34. Hussain I, Bhan A, Ansari KI, Deb P, Bobzean SAM, Perrotti LI, et al. Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jun;1849(6):697–708.
  35. Huang RP, Liu ZH, Yuan SF, Yin H, Dang Z, Wu PX. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. *Environ Pollut.* 2017 Nov;230:143–52.
  36. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006 Feb;439(7078):871–4.
  37. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SAM, Perrotti LI, Mandal SS. Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *J Mol Biol.* 2014 Oct 9;426(20):3426–41.
  38. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281–97.
  39. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15–20.
  40. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLOS Biol.* 2005 Feb 15;3(3):e85.
  41. Cameron BE, Craig PM, Trudeau VL. Implication of microRNA deregulation in the response of vertebrates to endocrine



- disrupting chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 2016 Apr;35(4):788–93.
42. Gupta A, Caffrey E, Callagy G, Gupta S. Oestrogen-dependent regulation of miRNA biogenesis: many ways to skin the cat. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug;40(4):752–8.
  43. Cohen A, Burgos-Aceves MA, Smith Y. Estrogen repression of microRNA as a potential cause of cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016 Mar;78:234–8.
  44. Ferraro L, Ravo M, Nassa G, Tarallo R, De Filippo MR, Giurato G, et al. Effects of Oestrogen on MicroRNA Expression in Hormone-Responsive Breast Cancer Cells. *Horm Canc.* 2012 Jun 1;3(3):65–78.
  45. Vrijens Karen, Bollati Valentina, Nawrot Tim S. MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environ Health Persp.* 2015 May 1;123(5):399–411.
  46. Tilghman SL, Bratton MR, Segar HC, Martin EC, Rhodes LV, Li M, et al. Endocrine Disruptor Regulation of MicroRNA Expression in Breast Carcinoma Cells. *PLoS One.* 2012 Mar 5;7(3):e32754.
  47. Niland CN, Merry CR, Khalil AM. Emerging Roles for Long Non-Coding RNAs in Cancer and Neurological Disorders. *Front Genet.* 2012;3:25.
  48. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1311–23.
  49. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SAM, Perrotti LI, Mandal SS. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR *in vitro* and *in vivo*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 May;141:160–70.
  50. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Kasiri S, Bashyal A, Mandal SS. Antisense transcript long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR is transcriptionally induced by estradiol. *J Mol Biol.* 2013 Oct 9;425(19):3707–22.
  51. Schug TT, Johnson AF, Birnbaum LS, Colborn T, Guillette LJ, Crews DP, et al. Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Mol Endocrinol.* 2016 Aug;30(8):833–47.
  52. Kudlak B, Szczepańska N, Owczarek K, Mazerska Z, Namieśnik J. Endocrine Disrupting Compounds – Problems and Challenges. In: *Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications* [Internet]. 2015 [cited 2019 Dec 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/emerging-pollutants-in-the-environment-current-and-further-implications/endocrine-disrupting-compounds-problems-and-challenges>
  53. Coady KK, Biever RC, Denslow ND, Gross M, Guiney PD, Holbech H, et al. Current Limitations and Recommendations to Improve Testing for the Environmental Assessment of Endocrine Active Substances. *Integr Environ Assess Manag.* 2017 Mar;13(2):302–16.
  54. OECD Work Related to Endocrine Disrupters - OECD [Internet]. [cited 2019 Dec 17]. Available from: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>
  55. Moiseeva EP, Manson MM. Dietary Chemopreventive Phytochemicals: Too Little or Too Much? *Cancer Prev Res.* 2009 Jul 1;2(7):611–6.
  56. Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;83(1–5):113–8.
  57. Chen Z, Zuo X, He D, Ding S, Xu F, Yang H, et al. Long-term exposure to a 'safe' dose of bisphenol A reduced protein acetylation in adult rat testes. *Sci Rep.* 2017 Jan 9;7(1):1–9.
  58. Lee HR, Jeung EB, Cho MH, Kim TH, Leung PCK, Choi KC. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. *J Cell Mol Med.* 2013 Jan;17(1):1–11.
  59. Barouki R. Endocrine disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology. *C R Biol.* 2017 Sep 1;340(9):410–3.
  60. Rissman EF, Adli M. Minireview: Transgenerational Epigenetic Inheritance: Focus on Endocrine Disrupting Compounds. *Endocrinology.* 2014 Aug;155(8):2770–80.
  61. Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SRJ, Gatewood JD, Taylor JA, Rissman EF, et al. Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology.* 2012 Aug;153(8):3828–38.
  62. Salián S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 2009 Nov 18;85(21–22):742–52.

