



Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

# **Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje**

***Consumer exposure to bisphenol A its analogues and mixtures,  
and their effect on human health***

Raziskovalna naloga na področju ekologije

*Research project in the field of ecology*

Avtorica: Neja Štampar  
Letnik: 3. c  
Mentorice: dr. Marija Meznarič, prof. biol.  
dr. Martina Štampar  
dr. Alja Štern  
Šolsko leto: 2021/2022

# ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici dr. Martini Štampar ter dr. Alji Štern za pomoč pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge, za podano znanje in izvrstno mentorstvo. Zahvaljujem se tudi Katarini Fras za pomoč pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge in doc. dr. Bojani Žegura za pomoč pri ideji za raziskovalno nalogo. Zahvaljujem se mentorici dr. Mariji Meznarič, profesorici biologije za vse nasvete in podporo. Za lektoriranje raziskovalne naloge se zahvaljujem Ireni Štuhec, profesorici slovenščine in sociologije. Prav tako se zahvaljujem Nacionalnemu Inštitutu za biologijo v Ljubljani za dovoljenje uporabe laboratorijskih prostorov in laboratorijskega materiala.

# POVZETEK

Namen moje raziskovalne naloge je bil raziskati, kakšna je ozaveščenost potrošnikov o bisfenolih in njihovem vplivu ter ugotoviti, ali bisfenol A, njegovi analogi in kompleksne mešanice le-teh delujejo citotoksično.

Na začetku raziskovalne naloge sem predstavila bisfenole. Kaj so, kje so prisotni, kakšen vpliv imajo na človeka, kako jih označujemo in njihove temeljne značilnosti. Raziskovalni del sem razdelila na dva dela. V prvem delu sem predstavila rezultate ankete, ki nas seznanja o splošni razgledanosti, zavedanju in uporabi bisfenolov med anketiranci. V drugem delu sem ugotavljala, ali so različne koncentracije bisfenolov, njihovih analogov in kompleksnih mešanic povzročile citotoksičnost (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) na človeških jetrnih celicah. Za to sem uporabila MTS test, ki meri živost celic.

Rezultati ankete so pokazali, da je večina anketirancev slabo ozaveščena, oznak za vsebnost bisfenolov ne poznajo, o bisfenolu A in njegovih analogih še niso slišali nikoli, ne poznajo kratic za analoge in se skupno strinjajo, da prebivalstvo ni dovolj seznanjeno o bisfenolih in njihovem vplivu na človekovo zdravje. Laboratorijski rezultati so pokazali, da višje koncentracije BPA (bisfenol A) in BPAP (bisfenol AP) vplivajo na rast, površino in premer sferoidov, medtem ko BPC (bisfenol C) in kompleksne mešanice ne povzročajo nobenih sprememb. Na živost celic v sferoidu pa vplivajo višje koncentracije BPA in BPAP, kombinacija BPA+BPAP in kombinacija BPA+BPC+BPAP. Prisotnost BPC in BPA+BPC ni delovala citotoksično na celice.

V zaključku sem ovrednotila postavljene hipoteze. V nalogi sem tako dokazala, da bisfenol A in njegovi analogi povzročajo citotoksičnost in da je splošno ozaveščanje potrošnikov o bisfenolih zelo slabo. Vendar je za dokončni sklep potrebno še veliko raziskav.

**Ključne besede:** bisfenoli, bisfenol A in njegovi analogi, sferoidi, citotoksičnost

**Keywords:** *bisphenols, bisphenol A and its analogues, spheroids, cytotoxicity*

# SUMMARY

The aim of my research was to investigate consumers awareness of bisphenols and their impact, and to determine whether bisphenol A, its analogues and complex mixtures of bisphenols have cytotoxic effects.

At the beginning of this research paper, I introduced bisphenols. What they are, where they are found, their impact on humans, how we label them and their basic characteristics. I have divided the research part into two parts. In the first part, I presented the results of the survey, which informs us about the general knowledge, awareness and use of bisphenols among the respondents. In the second part, I investigated whether different concentrations of bisphenols, their analogues and complex mixtures induced cytotoxicity in human liver cells. To do this, I used the MTS test, which measures cell viability.

The survey results showed that most respondents have a low level of awareness, are unfamiliar with bisphenol labels, have never heard of bisphenol A and its analogues, are unfamiliar with the abbreviations for the analogues, and collectively agree that the population is not sufficiently informed about bisphenols and their impact on human health. Laboratory results showed that higher concentrations of BPA (bisphenol A) and BPAP (bisphenol AP) affect the growth, surface area and diameter of the spheroids, while BPC (bisphenol C) and complex mixtures do not cause any changes. However, cell viability in the spheroid is affected by higher concentrations of BPA and BPAP, the combination of BPA+BPAP and the combination of BPA+BPC+BPAP. The presence of BPC and BPA+BPC did not have cytotoxic effects on the cells.

In the conclusion, I evaluate the hypotheses. In this thesis, I show that bisphenol A and its analogues cause cytotoxicity and that overall consumer awareness of bisphenols is very low. However, much research is still needed to reach a definitive conclusion.

# KAZALO

ZAHVALA	I
POVZETEK	II
SUMMARY	III
KAZALO	IV
Kazalo slik	VI
Kazalo tabel	VIII
1. UVOD	1
1.1 CILJI	3
1.2 HIPOTEZE	3
2. OPREDELITEV POJMOV	4
3. TEORETIČNI DEL	6
3.1 Kaj so bisfenoli?	6
3.2 Kako nastanejo bisfenoli in njihova prisotnost v okolju	6
3.3 Kakšna je izpostavljenost človeka bisfenolom?	7
3.3.1 Bisfenoli v embalaži in kaj zares pomeni BPA free plastenka	8
3.3.2 Kombinirana izpostavljenost večim kemikalijam	8
3.4 Bisfenol A in njegovi analogi ter vpliv na zdravje	9
3.3.1 Bisfenol A	9
3.3.1.1 Regulatorna bisfenola A	11
3.3.2 Kaj so analogi bisfenolov?	11
3.3.3 Bisfenol C	12
3.3.4 Bisfenol AP	13
3.5 Preverjanje citotoksičnosti snovi	13
3.5.1 Kaj je citotoksičnost?	13
3.5.1.1 Testiranje citotoksičnosti	13
3.5.1.1.1 MTS test	14
3.5.1.2 Celični modeli za testiranje citotoksičnosti	14
3.6 Tridimenzionalni sistemi	15
4. METODE DELA	16
4.1 Anketa	16
4.2 Laboratorijsko delo	17
4.2.1 Materiali	20
4.2.1.1 Kemikalije	20

4.2.1.2 Aparature	21
4.2.1.3 Laboratorijski pripomočki	22
4.2.2 Metode	23
4.2.2.1 Celična linija HepG2	23
4.2.2.2 Gojenje celične linije HepG2	24
4.2.2.3 Presajanje celic	25
4.2.2.4 Štetje celic	26
4.2.2.5 Priprava 3D celičnih modelov - sferoidov	27
4.2.2.6 Priprava raztopin in mešanic ter tretiranje sferoidov	28
4.2.2.7 Vpliv BPA, BPC, BPAP in njihovih mešanic na rast in površino sferoidov	29
4.2.2.8 Določanje živosti celic v sferoidu po izpostavitvi BPA, BPC, BPAP in njihovim mešanicam z MTS testom	30
4.3 Pregled dokumentov in literature	31
5. ANALITIČNI DEL	32
5.1 Rezultati anketiranja	32
5.1.1 Splošna ozaveščenost anketirancev o sestavi embalaže hrane ali pijače	32
5.1.2 Splošna ozaveščenost anketirancev o bisfenolu A ter njegovih analogih	35
5.1.3 Seznanjenost anketirancev o škodljivih vplivih bisfenolov	37
5.2 Rezultati laboratorijskega dela	38
5.2.1 Spremljanje vpliva BPA, BPC, BPAP in njihovih mešanic na rast in površino sferoidov	38
5.2.2 Spremljanje vpliva živosti celic v sferoidu po izpostavitvi BPA, BPC, BPAP in njihovim mešanicam z MTS testom	42
6. ZAKLJUČKI	48
6.1 Potrditev/zavrnitev hipotez	48
6.2 Sklepi in komentarji	49
VIRI	51
Viri literature	51
Viri slik	52
PRILOGE	54
ANKETNI VPRAŠALNIK	54

## Kazalo slik

Slika 1: Oznaka na embalaži, ki je proizvedena iz polikarbonatne plastike. Vir: Change, (2022). .....	8
Slika 2: Skeletna formula bisfenola A. Vir: Calvero, (2005). .....	10
Slika 3: Preglednica povzetka dnevne izpostavljenosti BPA štirih starostnih skupin. Vir: Povzeto po Goršek, (2012). .....	10
Slika 4: Skeletna formula bisfenola C. Vir: Yikrazuul, (2009). .....	12
Slika 5: Skeletna formula bisfenola AP. Vir: Kuhnmic, (2009). .....	13
Slika 6: Proces postopka izvajanja laboratorijske vaje. Vir: Štampar, N. (2022). .....	19
Slika 7: Prikaz treh različnih laboratorijskih aparatov, levo centrifuga, na sredini je prikazan mikroskop, desno pa spektrofotometer. Vir: Štampar, N. (2022). .....	21
Slika 8: Eksperimentalno delo v laminariju. Vir: Štampar, N. (2022). .....	21
Slika 9: Inkubator ali rastna komora. Vir: Štampar, N. (2022). .....	22
Slika 10: Laboratorijski pripomočki. Vir: Štampar, N. (2022). .....	23
Slika 11: Celična linija HepG2. Vir: Štampar, N. (2022). .....	24
Slika 12: Proces presajanja celic. Najprej celice požanjemo, nato jih centrifugiramo, razbijemo z iglo na posamezne celice in jih preštejemo na hemocitometru. Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.....	25
Slika 13: Proces štetja celic. Vir: Štampar, N. (2022). .....	26
Slika 14: Proces priprave 3D celičnih modelov - sferoidov. Najprej celice požanjemo, nato jih preštejejo, zamešamo z medijem in metilcelulozo ter centrifugiramo. Po centrifugiranju nastanejo sferoidi. Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.....	27
Slika 15: Mikroskopska slika po 10 x povečavo sferoida takoj po centrifugiranju (levo) in po 72ur inkubacije/rasti (desno). Vir: Štampar, N. (2022). .....	28
Slika 16: Proces opazovanja vpliva bisfenola A in njegovih analogov ter mešanic na rast in površino sferoidov. Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.....	30
Slika 17: Prikaz procesa določanja živosti celic v sferoidih po izpostavitvi bisfenolom z MTS testom. Sferoide najprej tretiramo za 24 ur, nato zamešamo MTS test in ga dodamo k vsakemu sferoidu. Reakcijo, ki poteče, izmerimo na spktofotometru. . Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.....	31
Slika 18: Grafični prikaz pogostosti kupovanja hrane in pijače v plastični embalaži (n=191)..	33
Slika 19: Grafični prikaz preverjanja materialov plastične embalaže pred uporabo/nakupom (n=192). .....	33
Slika 20: Grafični prikaz seznanjenosti potrošnikov o tem, da plastična embalaža izloča najrazličnejše kemijske spojine v okolje/ hrano itd. (n=192).....	34
Slika 21: Grafični prikaz seznanjenosti potrošnikov o BPA free oznaki (n=174). .....	34
Slika 22: Grafični prikaz sklepanja anketirancev o oznaki, ki prikazuje prisotnost bisfenolov in epoksidne obloge (n=162).....	35
Slika 23: Grafični prikaz ozaveščenosti potrošnikov o bisfenolu A (n=187).....	35
Slika 24: Grafični prikaz ozaveščenosti potrošnikov o analogiih bisfenola A (n=176). .....	36
Slika 25: Grafični prikaz ozaveščenosti potrošnikov o kraticah za analoge bisfenola A (n=174). .....	36

Slika 26: Grafični prikaz splošnega mnenja potrošnikov o izpostavljenosti bisfenolom (n=184). .....	37
Slika 27: Grafični prikaz odgovorov potrošnikov na to, kako lahko zmanjšamo izpostavljenost bisfenolom (n=166). .....	37
Slika 28: Grafični prikaz splošnega mnenja potrošnikov o seznanjenosti o bisfenolih in njihovih vplivih na človeka (n=168). .....	38
Slika 29: Spremljanje spremembe rasti in površine pri 72 ur starih sferoidih z začetno gostoto 3000 celic/sferoid pred in po 24-urnem tretmaju s posameznimi bisfenoli (BPA, BPC in BPAP). Spremembo v kompaktnosti sferoidov smo zaznali pri bisfenolu BPAP pri koncentracijah, ki so večje od 120 $\mu$ M, označeno na sliki z rumenim kvadratom. Vir: Štampar, N. (2022). .....	39
Slika 30: Spremljanje spremembe rasti in površine pri 72 ur starih sferoidih z začetno gostoto 3000 celic/sferoid pred in po 24-urnem tretmaju s kompleksnimi mešanici bisfenolov (BPA + BPC, BPA + BPAP in BPA + BPC + BPAP). Vir: Štampar, N. (2022). .....	40
Slika 31: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi koncentracijami BPA. .....	41
Slika 32: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi koncentracijami BPC. .....	41
Slika 33: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi koncentracijami BPAP. .....	42
Slika 34: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi kombinacijami bisfenolov ter različnimi koncentracijami. .....	42
Slika 35: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi BPA določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic $\pm$ SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov. .....	43
Slika 36: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi BPC določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic $\pm$ SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov. .....	44
Slika 37: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi BPAP določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic $\pm$ SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov. .....	45
Slika 38: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi kombinaciji bisfenolov BPA + BPC določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic $\pm$ SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov. .....	45
Slika 39: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi kombinaciji bisfenolov BPA + BPAP določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic $\pm$ SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov. .....	46
Slika 40: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi kombinaciji bisfenolom BPA + BPC + BPAP določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic $\pm$ SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov. .....	46



## Kazalo tabel

Tabela 1: V tabeli je nabor vseh kemikalij, ki sem jih uporabila pri laboratorijskem delu. .... 20

Tabela 2: V tabeli so navedeni bisfenoli, ki sem jih preučevala v nalogi ter njihove lastnosti. 28

Tabela 3: Prikaz sestave mešanic bisfenolov. .... 29

# 1. UVOD

V zadnjih letih se vedno več živil pakira v plastično embalažo. Porast plastične embalaže sem opazila najprej pri sebi, saj velikokrat za malico posegam po že pripravljenih rogljičkih pakiranih v plastični embalaži in soku iz plastenke. Potem pa tudi v domačem gospodinjstvu in na policah v trgovini ter pri svojih sovrstnikih, saj jih večina vsakodnevno v šolo prinaša vodo in hrano v plastični embalaži. Zelo pomembno mi je varstvo okolja, zato se problematike razširjenosti plastike že zavedam in mi je znano dejstvo, da je eden največjih onesnaževalcev, da se ta ne razkroji, vendar razpade na vedno manjše koščke ter da se iz nje izločajo določene snovi. Zato me je najprej zanimalo, katere so te snovi, ki se izločajo iz embalaže in ali smo jim izpostavljeni že med samo uporabo. Zato se mi je tukaj pojavilo vprašanje ali je uživanje hrane in pijače, ki je shranjena v plastični embalaži nevarno za človeka oziroma ali vpliva na naše zdravje? Po dolgem brskanju in iskanju podatkov sem naletela na meni prvič slišane snovi, ki jih imenujemo bisfenoli. Ugotovila sem, da so Bisfenoli (v nadaljevanju BP) skupina industrijsko pomembnih kemikalij, ki se v veliki meri uporabljajo pri proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksidnih smol, tako predstavljajo materiale, ki tvorijo široko paleto izdelkov za vsakdanjo uporabo, od oblog za konzerve, kozmetika, stekleničk za dojenčke, igrač, računov in mnogih drugih. Tako sem se začela zavedati, da so BP-ji prisotni v vseh izdelkih, ki jih uporabljam vsakodnevno. Torej, če ljudje vsakodnevno zaužijemo hrano in pijačo shranjeno v plastični embalaži ter uporabljamo zgoraj naštetih izdelke smo nevede nenehno izpostavljeni bisfenolom. Da sem o BP-jih slišala sama prvič šele ko sem šla brskati, se mi je zdelo čudno, saj se je v preteklosti veliko govorilo o vsebnosti bisfenolov predvsem bisfenola A v plastenkah za vodo. Tako sem odkrila, da so embalaže v katerih je prisoten bisfenol A tudi označene s posebnimi oznakami. V moji generaciji o problematiki BP-jev nismo nikoli govorili v šoli, nisem jih zasledila v bioloških učbenikih in omembe o njih nisem videla na socialnih omrežjih. Zato me je zanimalo, kakšna je prepoznavnost bisfenolov in zavedanje o problematiki med ljudmi, še posebej med mojimi vrstniki.

Največ informacij sem zbrala o bisfenolu A (v nadaljevanju BPA), katerega se letno proizvede več kot 7,7 milijonov ton in je najpogosteje uporabljen BP. Tudi o njegovih različnih škodljivih učinkih se je v zadnjih dveh desetletjih nakopičilo veliko podatkov, ki pa niso prišli v celoti do uporabnikov. BPA je bil prepoznan kot snov, ki vpliva na hormonski sistem ljudi in živali in tako

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanici ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

vpliva na razmnoževanje. Med prebiranjem literature sem zasledila, da je zaradi številnih nevarnih lastnosti bila uporaba BPA v Evropski uniji postopoma omejena ali prepovedana, z namenom da bi tako zaščitili zdravje ljudi in okolje. Prepoved uporabe BPA v potrošniških izdelkih je spodbudila razvoj in vse večjo uporabo domnevno varnejših analogov BPA, kot so BPS, BPF, BPC ind. Kot rezultat se v okolju različni BP-ji pojavljajo v večjih količinah, kar pa predstavlja pereč problem.

Ker je o BPA že veliko znanega, analogi BPA pa se trenutno nekontrolirano uporabljajo v potrošniških izdelkih, sem se podrobneje poglobila v raziskovanje le teh. Kmalu sem ugotovila, da analogi BPA še niso bili tako poglobljeno raziskani in da tudi manjkajo podatki o njihovih kombiniranih učinkih, zato sem dobila dodaten zagon za raziskovanje. Iz literature sem ugotovila, da sta analoga BPC in BPAP večinoma prisotna v embalaži, ki je povezana s prehrano, zato sem ju tudi izbrala za izvedbo poskusov.

Tema se mi zdi vsakodnevna in aktualna, saj zaradi primanjkovanja podatkov ostajajo zdravstvena tveganja zaradi izpostavljenosti analogom BPA, o katerih smo ljudje slabo osveščeni. Glede na mojo izbrano temo, mi je mentorica dr. Marija Meznarič predlagala, da se povežem z Nacionalnim inštitutom za biologijo, kjer se ukvarjajo z to tematiko. Tako smo skupaj naredili raziskovalni načrt za preučevanje citotoksičnosti bisfenola A in njegovih analogov ter mešanic. Rezultate smo pridobili na podlagi opazovanja, merjenja in zbiranja ter analize podatkov.

Zaradi globalne razširjenosti in prisotnosti v vsakodnevni izdelkih, menim, da je nujno seznaniti potrošnike o pomenu ter vplivu bisfenolov, njegovih analogov in mešanic na njihovo zdravje. Zato z raziskovalno nalogo želim prispevati k ozaveščanju ljudi o BP-jih in iskanju novih, človeku bolj prijaznih rešitev. Ljudje se veliko bolj zavedajo pomena pitja vode, ne zavedamo pa se, kako lahko na zdravje vpliva uporaba neprimernih plastenk in embalaž.

## 1.1 CILJI

Ugotoviti kako so potrošniki seznanjeni s problematiko bisfenola A in njegovih analogov ter ugotoviti, ali bisfenol A ter njegovi analogi in mešanice le-teh res povzročajo citotoksičnost *in vitro* (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV).

## 1.2 HIPOTEZE

Pred pričetkom raziskovanja sem si postavila naslednje hipoteze:

1. Potrošniki niso ozaveščeni o vplivu BPA, njegovih izbranih analogov ter kompleksnih mešanic na zdravje.
2. Potrošnikov ne zanima sestava embalaže, v kateri kupujejo oziroma hranijo prehranske izdelke.
3. BPA, njegovi izbrani analogi ter njihove kompleksne mešanice vplivajo na rast, površino in premer sferoidov.
4. BPA, njegovi izbrani analogi ter njihove kompleksne mešanice vplivajo na živost celic v sferoidu.
5. Kompleksne mešanice bisfenolov vplivajo na živost celic v sferoidu pri nižjih koncentracijah kot samostojni bisfenoli.

## 2. OPREDELITEV POJMOV

**POLIKARBONATI** - so skupina termoplastičnih polimerov, ki v svoji kemični strukturi vsebujejo karbonatne skupine. Uporabljajo se v industriji močnih in žilavih materialov.

**EPOKSI SMOLE** - so termoreaktivne polimerne smole, kjer molekula smole vsebuje eno ali več epoksidnih skupin.

**MONOMER** - majhna molekula, ki se lahko kemijsko veže z drugo molekulo monomera, tako da nastane polimer.

**POLIMERIZACIJA** - reakcija vezanja dveh monomerov v en polimer.

**STRUKTURNI ANALOG** - spojina, ki ima podobno strukturo in včasih tudi funkcijo kot druga spojina, od katere se razlikuje po številu atomov, funkcionalnih skupinah ali strukturnih podenotah.

**IN VITRO** - je besedna zveza, ki se v naravoslovnem kontekstu nanaša na procese in poskuse, ki potekajo v nadzorovanem okolju zunaj živega organizma. Primer: oploditev jajčeca zunaj ženskega telesa.

**IN VIVO** - je besedna zveza, ki se v naravoslovnem kontekstu uporablja za procese, ki potekajo v živem organizmu.

**BIOTRANSFORMACIJA** - je kemijska sprememba spojin, kot so hranila, aminokisliline in zdravilne učinkovine v posamezne derivate. Potrebna je tudi za pretvorbo nepolarnih snovi v polarne, za lažjo

izločitev iz organizma. Smolo uporabljamo kot lepilo za splošno uporabo, vezivo v cementu in malte, trdne pene, nepremične namaze, lončne in ojačano plastiko.

**KSENOBIOTIKI** - kemične snovi v organizmu, katerih le-ta normalno ne proizvaja. Te snovi v naravi nikoli niso bile prisotne, vpeljal jih je človek z umetno sintezo.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

**TOKSIČNOST** - je lastnost neke snovi, da že v majhnih količinah povzroči škodljive učinke na živem organizmu.

**CITOTOKSIČNOST** - pomeni strupenost za celice.

**GENOTOKSIČNOST** - lastnost snovi, da poškoduje dedni material v celicah.

**MTS test** - je relativno natančna in enostavna metoda za določanje citotoksičnosti oziroma živosti pritrjenih celic.

**SFEROID** - skupek celic, ki rasejo v tridimenzionalni obliki.

**TRETIRANJE** - izpostavitev sferoidov različnim koncentracijam bisfenolov.

**PROLIFERACIJA CELIC** - rast in razmnoževanje struktur.

**ESTROGENSKA AKTIVNOST** – delovanje estrogenskega hormona.

**MERITEV ABSORBANCE** – merjenje vsrkavanja ali vpijanja svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca.

**ADHERENTNA RAST** – način rasti celic, ki so pritrjene na podlago.

**MORFOLOGIJA EPITELIJSKE CELICE** – značilnosti telesne celice.

**OMEJITEV V EKSPRESIJI** – omejitev v izražanju.

**TRANSPORTERJI ENCIMOV** - prenašalci encimov.

**FALKONKA** - plastična embalaža-posoda v obliki valja.

**HEMOCITOMETER** - steklena komorica za štetje celic.

## **3. TEORETIČNI DEL**

### **3.1 Kaj so bisfenoli?**

Bisfenoli (BP) so umetno proizvedene kemikalije, ki se uporabljajo pri proizvodnji polikarbonatne plastike (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) in epoksi smol (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) (12). Zlasti se uporabljajo pri proizvodnji primarnih materialov, zato lahko tvorijo najrazličnejše izdelke, od oblog za konzerve, steklenič za dojenčke, igrač, računov in mnogih drugih, ki se uporabljajo v našem vsakdanjem življenju (8). Med bisfenoli je najpogosteje uporabljen bisfenol A (BPA; 2,2-bis- (4-hidroksifenil) - propan). Kemično jih uvrščamo med difenilmetane, saj spojina vsebuje dva benzenska obroča (13).

### **3.2 Kako nastanejo bisfenoli in njihova prisotnost v okolju**

Čeprav je v zadnjih desetletjih uporaba plastike močno narasla, ta ni nov izum. Uporabljala se je že od nekdaj. Recimo, iz fosilnih goriv se s procesom polimerizacije pridobiva sintetična plastika. Njene dobre značilnosti so, da je proizvodnja poceni in hitra. Zaradi tega velja za enega najbolj priljubljenih načinov pakiranja hrane in pijače. Trenutno se najbolj uporablja material PCV, to je kratica za polivinil klorid. Najbolj razširjen je v gradbeništvu ter v tovarnah kot glavna surovina igrač in pohištva. Zaradi nešteti možnosti uporabe so plastike hitro pridobile na priljubljenosti med materiali (9).

Bisfenoli se uporabljajo kot primarna surovina za proizvodnjo polimerov, zlasti polikarbonatne plastike in epoksidnih smol (7). Prva epoksi smola za komercialno uporabo je bila sintetizirana leta 1940, leta 1957 pa se je v Združenih državah Amerike pričela komercialna proizvodnja polikarbonatnih plastik, kasneje je sledila še v Evropi (8). Tako proizvedena plastika je trdna in prosojna. Smola pa prepreči rjavenje kovine in prehajanje določenih kovin v vsebino pločevinke. Polikarbonatne plastike in epoksidne smole predstavljata dva materiala, iz katerih so izdelani najrazličnejši izdelki za vsakdanjo uporabo. Iz plastik so izdelane steklenice za pijačo, embalaža za hrano, športna oprema, otroške stekleničke in igrače, avtomobilski deli,

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

plastični namizni pribor... Medtem ko smole izkoriščamo za kovinske obloge pločevink, cevi za vodo, medicinske cevi ter, termični papir, ki se uporablja pri izdaji računov in vozovnic. Epoksidne smole pa se uporabljajo tudi pri izdelavi zobnih tesnih materialov (12).

V zadnjem desetletju svetovna proizvodnja bisfenolov predvsem BPA nenehno narašča. Ocenjena je na 8 milijonov ton na leto, za leto 2022 pa je napoved, da bo narasla na 10,6 milijonov ton. Trenutna glavna proizvajalka bisfenolov je Kitajska (8). Zaradi njihove tako obsežne proizvodnje in najrazličnejših uporab je posledično neizogibna stalna izpostavljenost ljudi bisfenolom in njihovo odstranjevanje v okolje (7).

### **3.3 Kakšna je Izpostavljenost človeka bisfenolom?**

Zaradi vse večje proizvodnje in uporabe ter stalnih izpustov se delež bisfenolov v naravi vedno bolj povečuje. Bisfenole lahko najdemo v sedimentih, prsti, površinskih vodah, podtalnici in hišnem prahu. Glavni viri sproščanja bisfenolov v naravo pa so prečiščene vode iz čistilnih naprav, sežigalnice in odlagališča odpadkov, industrijski obrati in naravna razgradnja plastičnih odpadkov v naravi (8). Večina ljudi je izpostavljena bisfenolom preko uživanja hrane in pijače, ki je bila shranjena v embalaži iz polikarbonatne plastike ali je bila v posodi, ki je imela obloge iz epoksidnih smol. Sicer v tem primeru govorimo o zelo nizkih vrednostih bisfenolov. Pojavi pa se nevarnosti pri mlajših otrocih, ker zaužijejo večjo količino hrane glede na svojo telesno maso (12).

Koncentracije BPA so višje v hrani in pijači, ki je pakirana v konzervah in plastenkah, saj se prosti monomeri (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV). BPA zaradi nepopolne polimerizacije in razgradnje sproščajo v hrano in pijačo (8). Kar pomeni, da smo bisfenolom izpostavljeni vsakodnevno. Zraven oralne izpostavljenosti smo izpostavljeni lahko tudi dermalno recimo termičnemu papirju in recikliranim papirnim izdelkom. Tudi vdihavanje prahu v zaprtih prostorih in zobni tesnilni materiali so pomemben vir izpostavljenosti (7). Izpostavitve ljudi najpogostejšemu bisfenolu BPA pa so organizacije za zaščito zdravja in ljudi že poskušale zmanjšati z ukrepi, kot so omejitve pri uporabi te spojine za izdelavo materialov, ki prihajajo v stik s hrano, nadomeščajo pa ga njegovi strukturni analogi (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) (8).



Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanici ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

### 3.3.1 Bisfenoli v embalaži in kaj zares pomeni BPA free plastenka

Za bisfenole so dokazali, da se sčasoma izločajo iz plastične embalaže. Tako se lahko prenašajo na vso hrano in pijačo, ki je v stiku z njo. Njihovo izločanje pa še poveča visoka temperatura. Lep primer povečane uporabe plastične embalaže je uporaba plastenk. Bisfenola A ne najdemo samo v plastenkah, pač pa tudi v konzervah in pločevinkah. Plastenke, ki so proizvedene iz polikarbonatne plastike, pa morajo biti označene z oznako PC oziroma trikotnik s številko 7. Po teh oznakah smo seznanjeni, da je takšna embalaža (pretežno plastenke) občutljiva na UV svetlobo, vlažnost, nihanje temperature, nekatere aditive (npr. TiO<sub>2</sub>) in nenamerno dodane sestavine (nečistoče); to vse pa lahko privede do večjega izločanja bisfenolov (11).

V raziskavi iz leta 2014 so poročali, da veliko »BPA free« polikarbonatnih plastik še vedno izloča kemikalije, ki kažejo estrogensko aktivnost (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV). To pomeni, da je »BPA free« embalaža res brez BPA, lahko pa vsebuje njegove analoge, o katerih pa še ni veliko raziskanega (11).



*Slika 1: Oznaka na embalaži, ki je proizvedena iz polikarbonatne plastike. Vir: Change, (2022).*

### 3.3.2 Kombinirana izpostavljenost večim kemikalijam

Organizmi v okolju so izpostavljeni mešanici kemikalij različnih snovi in ne posameznim kemikalijam, kar pa povzroča vrsto izzivov za oceno tveganja za ljudi in okolje. Ena izmed težav je identifikacija onesnaževal in njihovih koncentracij pri izpostavljenem organizmu. Še težje pa je dokončno oceniti učinek kombinirane izpostavljenosti. Zaradi pomanjkanja znanja o

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

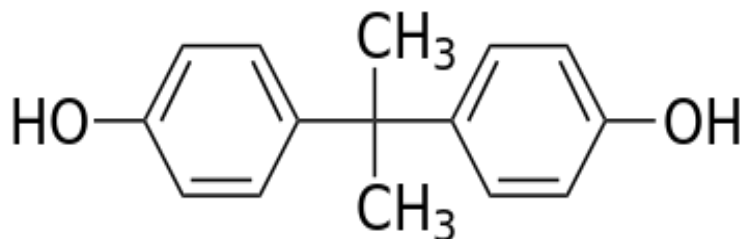
toksikoloških lastnosti se trenutno ocena tveganja za zdravje ljudi, še vedno izvaja na podlagi podatkov o posamezni spojini, kjer kombinirani učinki večih spojin niso upoštevani. Zato bi kronični izpostavljenosti in kombiniranim učinkom spojin morali posvečati več časa v nadaljnjih raziskavah (7). V sodobni civilizaciji so izdelki, ki vsebujejo BP, povezani z našim vsakdanjim življenjem, kar pa pomeni vsakodnevno izpostavljenost. Zaradi tega je verjetnost izpostavljenosti kombinaciji večim bisfenolom velika, kar je še posebej pomembno v primeru ranljivih populacij (8).

## **3.4 Bisfenol A in njegovi analogi ter vpliv na zdravje**

### **3.3.1 Bisfenol A**

BPA je najbolj razširjen okoljski onesnaževalec med bisfenoli in o njem je narejenih največ raziskav, saj smo z BPA v stiku skoraj vsakodnevno preko najrazličnejših proizvodov (5). BPA sestavljata dve fenolni skupini, ki sta med seboj povezani z ogljikovim atomom. Njegovo IUPAC ime je 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan (13). Je znan hormonski motilec, kar pomeni, da lahko z vezavo na hormonske receptorje sproži neželene učinke ali prepreči naravni hormonski odziv. Škodljive učinke izkazuje že pri zelo nizkih koncentracijah. Izpostavitve ljudi BPA-ju je povezana z razvojem številnih obolenj: hormonsko odvisna rakava obolenja, sladkorna bolezen, debelost, metabolični sindrom, srčno-žilne bolezni in motnje v reproduktivnem sistemu (5). Od leta 2018 je razvrščen kot rakotvoren, mutagen in reprotoksičen (7). Zaradi nevarnih lastnosti in potencialnih posledic na zdravje je bila uporaba BPA v Evropski uniji postopoma omejena ali prepovedana, da bi tako zaščitili zdravje ljudi in okolje. Prepoved uporabe BPA v potrošniških izdelkih je spodbudila razvoj in večjo uporabo domnevno varnejših analogov BPA. Kljub vse večji uporabi analogov o njihovi toksičnosti ni znanega veliko in večina toksikoloških informacij je omejena na znanje o potencialni endokrini motilnosti (8).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 2: Skeletna formula bisfenola A. Vir: Calvero, (2005).

Populacija	Vir izpostavljenosti	Ocena dnevne izpostavljenosti s hrano ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesna teža/dan)
Novorojenčki, 0-6 mesecev	Izključno dojeni	0,3
	Polikarbonatne plastenke in formula <sup>a</sup> (prašek-tekočina)	2,0 - 2,4
	Formula, brez polikarbonatnih plastenk <sup>a</sup> (prašek tekočina)	0,01 - 0,5
Dojenčki, 6-36 mesecev	Dojeni + trdna hrana (najboljši – najslabši primer) <sup>b</sup>	0,1
	Polikarbonatne plastenke in formula <sup>a</sup> + trdna hrana (najboljši – najslabši primer) <sup>b</sup>	0,5 - 0,6
	Formula, brez polikarbonatnih plastenk <sup>a</sup> + trdna hrana (najboljši – najslabši primer) <sup>b</sup>	0,01 - 0,1
Otroci, 3+ leta	Sadje, sladice, zelenjava, meso, juhe, morska hrana, gazirane pijače (najboljši – najslabši primer) <sup>b</sup>	0,2 - 0,7
Odrasli	Sadje, sladice, semena, zelenjava, meso, juhe, morska hrana, gazirane pijače, čaj, kava, alkohol (najboljši – najslabši primer) <sup>b</sup>	0,4 - 1,4

<sup>a</sup> Predvidena je bila samo formula, brez dojenja

<sup>b</sup> Najslabši primer je predvidevanje, da je bil dnevni vir hrane 100% pakirana hrana in pijača in najboljši primer je predvidevanje, da je bil dnevni vir hrane 25% pakirana hrana in pijača.

Slika 3: Preglednica povzetka dnevne izpostavljenosti BPA štirih starostnih skupin. Vir: Povzeto po Goršek, (2012).

### 3.3.1.1 *Regulativa bisfenola A*

Od konca devetdesetih let prejšnjega stoletja so znanstvene raziskave opozarjale na različne neželene učinke BPA - predvsem zaradi motenj človeškega hormonskega sistema. Posledično so se pojavili dvomi o njegovi varnosti. Zaradi nevarnih lastnosti BPA so v Evropski uniji omejili uporabo BPA, da bi zaščitili zdravje ljudi in okolja. Prvo regulativno poročilo o oceni tveganja za BPA, ki ga je objavila kanadska vlada leta 2008, je povzročilo prepoved uporabe BPA v otroških stekleničkah v Kanadi. Leta 2009 je evropska komisija uvrstila BPA na seznam snovi, ki so prepovedane v kozmetičnih izdelkih. Kmalu po letu 2011 je Evropska unija prepovedala proizvodnjo, trženje in uvoz steklenic za hranjenje dojenčkov, ki vsebujejo BPA, od leta 2018 pa tudi embalažo živil za dojenčke in otroke. Leta 2017 je Evropska agencija za varnost hrane predlagala začasno sprejemljiv dnevni vnos BPA, ki je bil 4 µg/kg telesne mase/dan, medtem ko je septembra 2018 uredba Evropske unije zmanjšala mejno vrednost BPA iz embalažnega materiala v živila z 0,6 mg/kg na 0,05 mg/kg in prepovedala BPA, v katero koli otroško hrano ali dojenčke. Od leta 2018 je treba izdelke, ki vsebujejo BPA, razvrstiti in označiti kot strupene za razmnoževanje. Poleg tega je uporaba BPA v termičnem papirju od leta 2020 omejena z uredbo Evropske unije in REACH (Registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij). Nacionalne omejitve v Sloveniji glede uporabe BPA sledijo zakonodaji Evropske unije (7, 12). Zgoraj naštetе omejitve glede uporabe BPA so vzpodbudile proizvajalce, da so začeli razvijati in uporabljati nove spojine, ki so po strukturi in fizikalno-kemijskih lastnostih podobne bisfenolu A. Imenujemo jih strukturni analogi bisfenola A, ki so bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF), bisfenol AF (BPAF), bisfenol C (BPC), bisfenol AP (BPAP) in mnogi drugi. Zaenkrat večina BPA analogov še vedno ni regulirana in niso vključeni v zakonodajo, čeprav se zdi, da so mnogi škodljivi za ljudi (7).

### 3.3.2 Kaj so analogi bisfenola A?

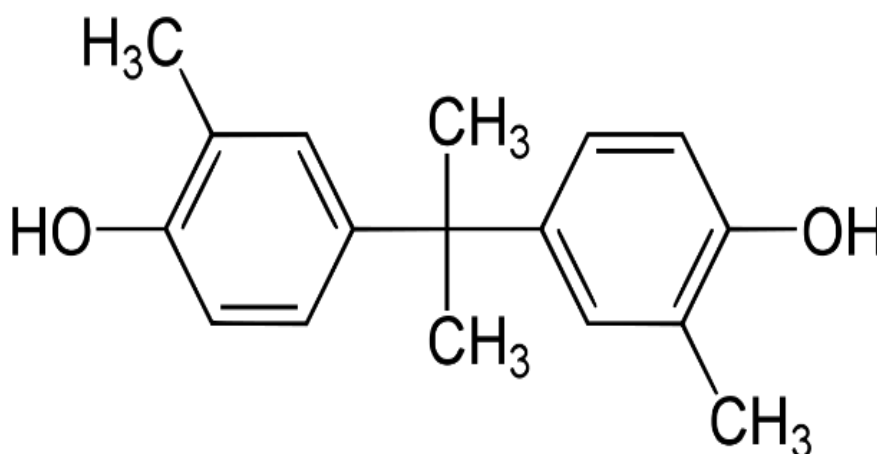
Če ima spojina sorodno strukturo in/ali tudi funkcijo kot druge spojine, od katere se razlikuje v enem ali več atomov, funkcionalnih skupinah ali strukturnih podenotah, jo imenujemo analog. Čeprav so si strukturni analogi med seboj v kemijski zgradbi podobni, ni nujno, da imajo primerljive lastnosti. Kar pomeni, da ni nujno, da so tudi funkcionalni analogi (4, 15, 18).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Do danes je bilo v potrošniških proizvodih (embalaža živil, igrače itd.) identificiranih več kot 200 BP kot analogov BPA, njihova svetovna industrijska proizvodnja pa naj bi se v bližnji prihodnosti še povečala (7, 10). Predvideva se, da so varnejša alternativa BPA. Vendar pa se tukaj pojavlja vprašanje, ali je njihova uporaba res bolj varna za okolje in človeka. V zadnjih dveh desetletjih se je veliko raziskav nanašalo na izpostavljenost BPA-ju, podatkov o analogih BPA pa primanjkuje, kljub grožnji, da bodo postali prevladujoča onesnažila v okolju. Ker imajo BPA analogi strukturne in fizikalno-kemijske lastnosti podobne BPA, je njihova varnost vprašljiva, saj so podatki raziskav pokazali, da imajo nekateri med njimi zelo podobne ali celo bolj škodljive učinke v primerjavi z BPA (7). Zato sem se v raziskovalni nalogi zraven BPA osredotočila tudi na analoge BPA, ki so manj raziskani (BPC in BPAP).

### 3.3.3 Bisfenol C

Bisfenol C (v nadaljevanju BPC), 4,4'-Isopropylidenedi-*o*-cresol, 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane je analog BPA. Zgrajen je iz dveh fenilnih skupin, ki se vežeta na en ogljikov atom. Njegovo IUPAC poimenovanje je 3,3-dimetildian (14). Je eden najbolj vsestranskih bisfenolof. Uporablja se v številnih izdelkih kot so talne obloge, igrače, pohištvo, zavese, gradbeni material, elektronska oprema, embalaža in shranjevanje živil ter izdelki iz papirja (6).

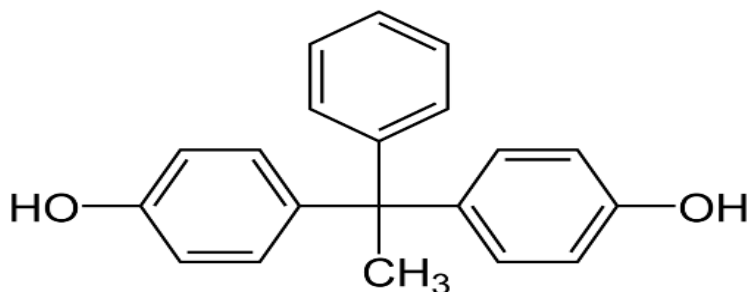


Slika 4: Skeletna formula bisfenola C. Vir: Yikrazuul, (2009).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

### 3.3.4 Bisfenol AP

Bisfenol AP (v nadaljevanju BPAP), 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-phenylethane, je sestavljen iz treh fenolnih skupin, ki so povezane z enim ogljikovim atomom. Z IUPAC sistemom ga poimenujemo 4,4- (1-feniletilden) (2). Največ se uporablja pri sintezi polimerov epoksi smole, PC, poliarilati, polietermidi. V zadnjih letih pa vse bolj pri proizvodnji premazov, električnih izolacijskih materialov, optičnih filmih, strukturalna lepila za uporabo v elektroniki, avtomobilski industriji, letalski in vesoljski industriji ter ostalo. Mogoče ga je zaznati v prahu v zaprtih prostorih in v izdelkih za osebno nego, na primer v šamponih za telo, lase, ličilih in zobnih pastah (4).



Slika 5: Skeletna formula bisfenola AP. Vir: Kuhnmic, (2009).

## 3.5 Preverjanje citotoksičnosti snovi

### 3.5.1 Kaj je citotoksičnost?

Citotoksičnost pomeni potencialno povzročitev celične smrti. Predstavlja enega od bioloških parametrov, katerega najpogosteje določamo. Test citotoksičnosti nam omogoča enostavno merjenje občutljivosti celice na določeno koncentracijo toksina. Reakcije so odvisne od koncentracije. Nizke povzročijo fiziološke spremembe v celici, višje pa povzročijo toksične efekte (3).

#### 3.5.1.1 Testiranje citotoksičnosti

Citotoksičnost so nekoč vedno ugotavljali s testiranjem na laboratorijskih živalih *in vivo* (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV). Takšno testiranje ima etične pomisleke in

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanici ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

je zelo drago. Vedno bolj se vpeljuje tudi 3R strategija. Zaradi vsega navedenega se vse več raziskovalcev odloča za *in vitro* teste. Torej, *in vitro* merjenje citotoksičnosti predstavlja alternativo testiranju na živalih. Rezultate pridobimo z določanjem deleža mrtvih celic po tem, ko jih izpostavimo substancam (3).

#### 3.5.1.1.1 MTS test

Vpliv BPA, BPC in BPAP ter njihovih kompleksnih mešanic na živost celic HepG2 bomo v nalogi določali s testom MTS. MTS test je relativno natančna in enostavna metoda za določanje citotoksičnosti oziroma živosti pritrjenih celic. Poteka tako, da se reagent MTS pod vplivom mitohondrijskih encimov, ki so aktivni le v živih celicah, spremeni v vodotopen formazan. Količino nastalega formazana določimo z meritvijo absorbance (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) pri določeni valovni dolžini (490 nm). Izmerjene vrednosti so sorazmerne količini živih celic (1,3).

#### 3.5.1.2 Celični modeli za testiranje citotoksičnosti

V toksikoloških raziskavah so dvodimenzionalni celični sistemi (oziroma adherentne monolejerske celične kulture) standard za proučevanje škodljivih učinkov kemikalij in potrošniških izdelkov. Prednosti 2D celičnih modelov so zmanjšanje števila živali v *in vivo* testiranjih, nižji stroški, za testiranja se uporabi manjše količine spojin, čas testiranja je krajši, poleg tega pa *in vitro* sistemi omogočajo preučevanje večjega števila spojin v krajšem času in jih lahko uporabljamo kot presejalne sisteme (19).

Razvitih je več različnih *in vitro* celičnih sistemov, ki imajo prednosti in slabosti v primerjavi z *in vivo* modeli. Ti sistemi so razdeljeni na primarne celične kulture ter trajne celične kulture. Za rutinske namene testiranja *in vitro* se tako najpogosteje uporabljajo trajne celične kulture (19).

V raziskovalni nalogi sem za proučevanje citotoksičnosti BPA, BPC in BPAP ter njihovih kompleksnih mešanic izbrala celično linijo HepG2. Ta celična linija je dokazano dobro *in vitro* orodje za proučevanje citotoksičnosti, kemikalij, ki jih ljudje zaužijemo s prehrano. Pozitivne lastnosti celic so, da izražajo veliko pomembnih encimov. Hkrati delujejo kot aktivatorji

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

metabolizma in kot tarča za preučevanje genotoksičnosti spojin (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV). Na njihovo občutljivost pa vpliva čas kultivacije, izpostavljenosti določeni kemikaliji in sestava gojitvenega medija. Vendar pa imajo trajne jetrne celične linije v primerjavi s primarnimi jetrnimi celicami tudi nekaj slabosti, kot npr: ravni izražanja ključnih presnovnih encimov so mnogo nižje (predvsem izražanje presnovnih encimov druge faze metabolizma ksenobiotikov), kar pa je ključni dejavnik slabe napovedi toksičnosti za ljudi (19).

### 3.6 Tridimenzionalni sistemi

Tradicionalni dvodimenzionalni (2D) *in vitro* celični modeli imajo veliko omejitev, ki so povezane s pomanjkanjem več bioloških funkcij. Zaradi tega 2D celične kulture ne morejo natančno posnemati naravnega celičnega okolja in tako lahko dajejo zavajajoče rezultate. Zaradi zavajajočih lažno pozitivnih rezultatov se lahko nepotrebno zaustavi razvoj številnih farmacevtskih izdelkov ali uporabo kemikalij (16).

Zato se v zadnjem času veliko dela vlaga v razvoj naprednih jetrnih *in vitro* 3D celičnih modelov, ki so bolj primerni za detekcijo neželenih učinkov kemikalij. *In vitro* 3D celični modeli, v nadaljevanju sferoidi, so preprosti tridimenzionalni celični modeli, ki jih lahko razvijemo iz kakršnegakoli tipa celic in se oblikujejo zaradi težnje po združitvi adhezivnih celic (19). Ti jetrni *in vitro* 3D celični modeli izražajo višjo raven jetrno specifičnih funkcij, vključno z metabolno aktivnostjo encimov ter tako boljše oponašajo naravno celično okolje in tudi dajejo bolj natančne rezultate pri proučevanju škodljivih učinkov kemikalij in potrošniških izdelkov. Razvoj izboljšanih *in vitro* 3D celičnih modelov je tudi v skladu z zakonodajo Evropske unije, ki spodbuja alternativno preskušanje kemikalij, ki ne vključuje živali. Tako novo razviti *in vitro* 3D celični modeli predstavljajo alternativni model, ki pomembno pripomore k izpolnjevanju strategije 3R (zmanjšanje, izboljšanje in zamenjava živali za eksperimentalne namene) (16, 17).



## 4. METODE DELA

Do ugotovitev sem poskušala priti na različne načine. Opravila sem:

anketo,

laboratorijsko delo,

pregled dokumentov in literature.

### 4.1 Anketa

Ker sem ob raziskovanju naletela na bisfenole, za katere sem tudi sama prvič slišala sem naredila anketo, kjer me je zanimalo, kakšna je splošna ozaveščenost anketirancev o bisfenolih, o sestavinah embalaže, ki jo vsakodnevno uporabljajo, kakšno je splošno mnenje vpliva bisfenolov na okolje ter človeka, prepoznavnosti bisfenolov in njegovih analogov, izpostavljenosti in nahajališču bisfenolov ter prepoznavnosti *BPA free* oznake.

Da bi prišla do teh ugotovitev, sem pripravila anketo v programu 1ka. Razširila pa sem jo na svojem instagram in facebook profilu.

Vsi anketiranci prebivajo v Pomurju. Za vzorec sem izbrala 200 anketirancev, od katerih je popolnoma izpolnilo anketo 172. Razdelila sem jih v skupine po spolu, starosti in izobrazbi. 27 % od navedenih anketirancev je bilo moškega spola, 72 % ženskega, 2 % pa se jih ni želelo opredeliti. Anketirancem sem postavila 16 vprašanj. Anketa je bila aktivna od 21. 1. 2022 do 9. 2. 2022. Najobsežnejši vzorec anketiranih je bil opravljen pri starostni skupini do 18 let ter starostni skupini od 19 do 29 let. Prva skupina je zajemala 91 anketirancev, druga pa 56, 25 anketirancev pa je bilo starejših od 30 let. Iz tega lahko govorimo o rezultatih mlajše populacije anketirancev.

## 4.2 Laboratorijsko delo

Za izvedbo laboratorijskega dela sem uporabila več tehnik.

1. Presajanje HepG2 celic.
2. Štetje HepG2 celic s pomočjo hemocitometra.
3. Priprava 3D sferoidov (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) iz HepG2 celic.
4. Priprava raztopin bisfenola A in njegovih analogov ter mešanic za tretma.
5. Tretiranje sferoidov (za pojasnitev glej poglavje: 2. OPREDELITEV POJMOV) za 24 ur.
6. Slikanje sferoidov in meritev površine s pomočjo mikroskopa.
7. Merjenje živosti celic z MTS-testom.

Laboratorijsko delo je v celoti potekalo na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani. S spoznavanjem in uvajanjem v laboratorijsko delo sem pričela med poletnimi počitnicami zadnji teden v avgustu, kjer sem se naučila dela z celicami, kot je presajanje in štetje celic ter pripravo 3D sferoidov. V delo me je uvajala raziskovalka dr. Martina Štampar, katera mi je najprej razložila, osnove dela v celičnem laboratoriju ter mi predstavila sterilno delo v laminariju. Nato sem se poučili o tem kaj so HepG2 celice in kako se jih goji, presaja in šteje. Na koncu me je še naučila kako pripraviti enostavne 3D kulture-sferoide. Vse tehnike mi je mentorica najprej demonstrirala, nato pa sem jih izvajala sama pod njenim nadzorom. Prve poskuse sem izpeljala v jesenskih počitnicah med 22 in 29. 10.2021. Sama sem pripravila sferoide 22.10, jih pustila rasti do ponedeljka (3 dni), ko smo jih izpostavili BP-jem in v torek sem opravljala poskus z mikroskopom in MTS. Nato sem se morala naučiti kako se izračuna koncentracije izbranih BP-jev. Potem je mentorica, zamešala koncentracije BP-jev in jih dodala na sferoide, saj so koncentracije toksičnih bisfenolov bile velike in je tako skrbela za mojo varnost. To je bil edini korak v poskusih, ki ga je izvajala mentorica, vse ostalo sem pripravljala sama. Pri mikroskopiranju mi je pomagala študentka Katarina Fras, ki me je naučila kako se mikroskopira in meri pod mikroskopom. MTS test pa me je učila in kasneje nadzorovala raziskovalka dr. Alja Štern. V zimskih počitnicah sem poskus še dvakrat ponovila med 25.2. – 4.3.2022. Sferoide sem pripravila v petek 25.2. in v ponedeljek 28.2. ter nadaljevala s poskusi do 4.3.2022. Analizo

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

podatkov sem izvajala doma s pomočjo mentorjev, s katerimi smo se slišali preko Zoom povezave.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 6: Proces postopka izvajanja laboratorijske vaje. Vir: Štampar, N. (2022).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

## 4.2.1 Materiali

### 4.2.1.1 Kemikalije

Vse kemikalije mi je dodelil laboratorij.

*Tabela 1: V tabeli je nabor vseh kemikalij, ki sem jih uporabila pri laboratorijskem delu.*

Kemikalija	Proizvajalec	Kataloška številka
<b>Bisfenol-A</b>	Sigma Aldrich Chemistry, ZDA	133027-500 g
<b>Bisfenol-AP</b>	Sigma Aldrich Chemistry, ZDA	450456-50 g
<b>Bisfenol-C</b>	Sigma Aldrich Chemistry, ZDA	06723-100 mg
<b>Etopozid (ET)</b>	Santa Cruz Biotechnology, ZDA	SC-3512A
<b>Goveji serumski albumin (BSA)</b>	Sigma, ZDA	A9418-500G
<b>Dimetil sulfoksid (DMSO)</b>	Honeywell, Riedel-de Haën, Nemčija	41640
<b>Fosfatni pufer (PBS)</b>	Gibco, Life Technologies Corp., ZDA	14200-067
<b>L- glutamin</b>	Sigma, ZDA	G7513
<b>Medij MEME ( )</b>	Sigma, ZDA	M2414
<b>Metil celuloza</b>	Sigma, ZDA	M0512
<b>MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil) -2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol)</b>	Promega, ZDA	G111A
<b>Natrijev hidrogen karbonat (0,1g/mL)</b>	Sigma, ZDA	S5761
<b>Natrijev piruvat (0,1g/mL)</b>	Sigma, ZDA	P2256
<b>Penicilin/streptomycin ( 1 %)</b>	Sigma, ZDA	P0781
<b>PMS (fenazin metosulfat)</b>	Sigma, ZDA	P9625
<b>Raztopina neesencialnih aminokislin 1 %</b>	Sigma, ZDA	M7145
<b>Tripansko modrilo</b>	Sigma, ZDA	T8154
<b>Tripsin (0,25 % Trypsin- EDTA)</b>	Gibco, Life Technologies Corp., ZDA	25200-056

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

#### 4.2.1.2 Aparature

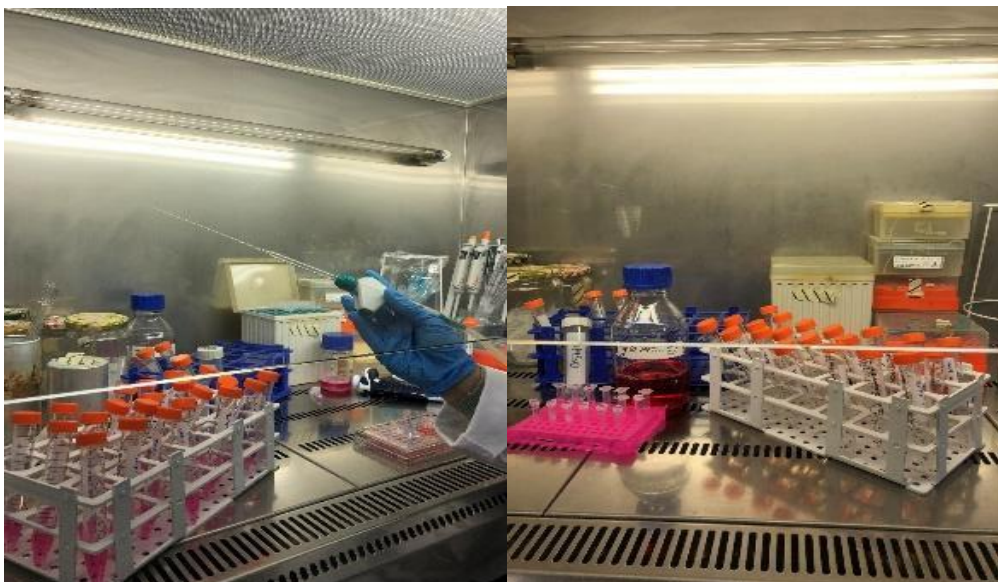
Pri laboratorijskem delu sem vključevala naslednje aparature:

- Centrifuga (Termofischer), invertni mikroskop (Nicon) in spektrofлуорimeter (Synergy, Biotech)



Slika 7: Prikaz treh različnih laboratorijskih aparatov, levo centrifuga, na sredini je prikazan mikroskop, desno pa spektrofлуорimeter. Vir: Štampar, N. (2022).

- Laminarij



Slika 8: Eksperimentalno delo v laminariju. Vir: Štampar, N. (2022).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

-Inkubator



Slika 9: Inkubator ali rastna komora. Vir: Štampar, N. (2022).

#### 4.2.1.3 Laboratorijski pripomočki

Pri laboratorijskem delu sem potrebovala naslednje pripomočke:

- pipete,
- mikrotitrna ploščica s 96 luknjicami z na U oblikovanim dnom,
- hemocitometer,
- 15 ml falkonke,
- 50 ml falkonke,
- epice,
- brizge in igle,
- platenke za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm<sup>2</sup> oziroma 75 cm<sup>2</sup>.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 10: Laboratorijski pripomočki. Vir: Štampar, N. (2022).

## 4.2.2 Metode

### 4.2.2.1 Celična linija HepG2

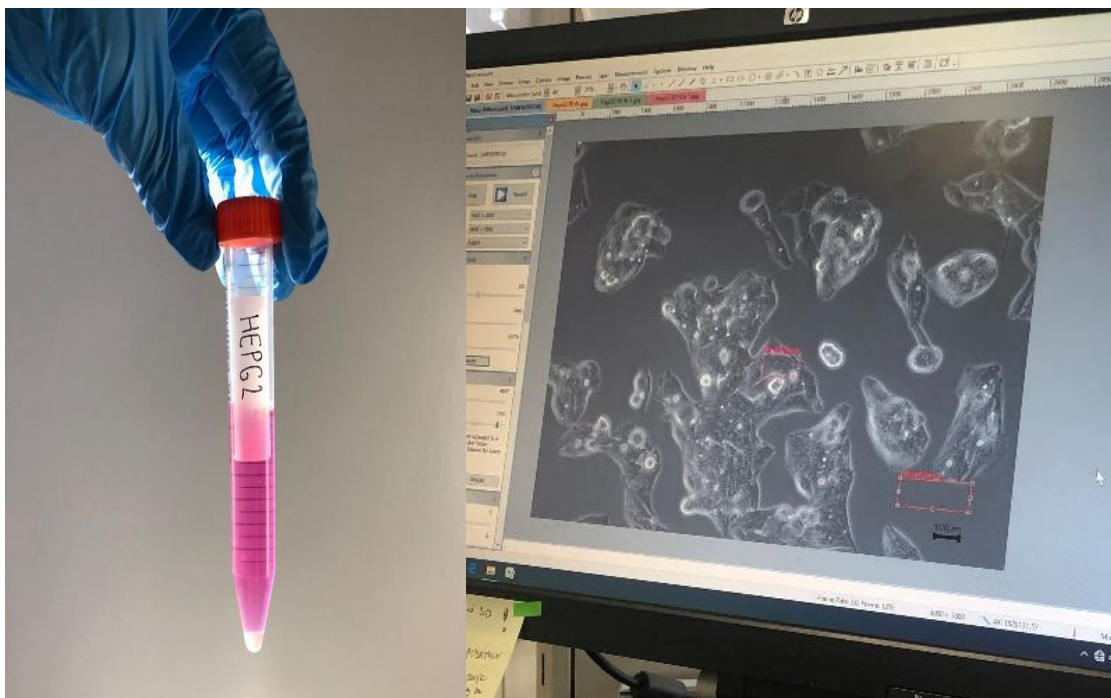
Za testiranje citotoksičnosti izbranih bisfenolov in mešanic sem izbrala jetrne celice, ki so za to najbolj primerne, saj so jetra organ metabolizma, kjer se zgodi razgradnja ksenobiotikov (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV). Uporabila sem celično linijo humanega hepatocelularnega karcinoma, HepG2 celice, ki jih imajo na Inštitutu za biologijo v Ljubljani v celični banki na oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka in izvirajo iz ameriške celične banke. Celice HepG2 rastejo adherentno (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV) in imajo morfologijo (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV) epiteljske celice. Proizvajajo albumin, transferin, fibrinogen, plazminogen, haptoglobin in druge. Sčasoma se celice v mediju sprimejo v manjše skupke (16).

Linija HepG2 ima neomejeno življenjsko dobo, je lahko dostopna in enostavna za uporabo ter vzdrževanje. Je ena najpogosteje uporabljenih celičnih linij v toksikoloških in farmakoloških raziskavah. Delo z njimi je dokaj preprosto, prav tako so enostavni protokoli kultiviranja, kar omogoča ponovljivost poskusov. Slaba stran te linije je omejitev v ekspresiji (za pojasnitev glej



Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV) encimov metabolizma zdravil in njihovih transporterjev (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV). Manjkajo pomembni encimi, ki so udeleženi v fazi razgradnje zdravil v jetrih (16). Z uporabo celičnih linij prihranimo čas in denar ter zmanjšamo število živali za namene testiranja v pred kliničnih študijah (17).



Slika 11: Celična linija HepG2. Vir: Štampar, N. (2022).

#### 4.2.2.2 Gojenje celične linije HepG2

Celice sem gojila v gojilnih posodah s površino 25 cm<sup>2</sup> s celičnim gojiščem pod sterilnimi in nadzorovanimi pogoji. Gojila sem jih v Inkubatorju s kontroliranimi pogoji 37 °C, vlažno atmosfero s 5 % ogljikovega dioksida. Gojišče za celice sem dobila pripravljeno v sterilnih pogojih in ga shranjevala do enega meseca v hladilniku na 4 °C.

Za pripravo 100 ml celičnega gojišča sem potrebovala:

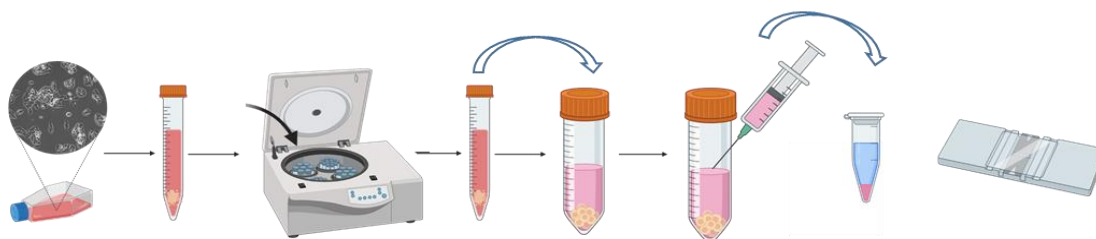
- 110 µL raztopine Na-piruvata (s koncentracijo 0,1 g/mL),
- 1 mL 1 % raztopine antibiotikov penicilin/streptomycin,
- 1 mL 1 % raztopine neesencialnih aminokislin (NEAA),
- 1 mL 1 % raztopine L-glutamina,

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

- 1,35 mL raztopine NaHCO<sub>3</sub> (s koncentracijo 0,1 g/mL),
- 10 mL seruma govejega zarodka (FBS),
- 86,54 mL medija MEME (minimum essential medium eagle – osnovni medij brez dodatkov).

#### 4.2.2.3 Presajanje celic

Presaditev celic sem opravila (slika 12), ko so dosegle 70 do 80-odstotno preraščenost površine gojilne posode. Vse poskuse sem izvajala v strogo sterilnih pogojih. Najprej sem odstranila tekoče gojišče in gojitveno posodo s celicami sprala z enkratnim fosfatnim pufrom - PBS. Nato sem na gojitveno posodo T-25 dodala 1ml 0,25 % tripsina (encim za odlepljanje celic od površine). Celice sem pustila 4 minute v inkubatorju na 37 °C. Tripsin je encim, ki pomaga odlepiti pritrjene celice s površine gojitvene posode. Nato pa sem dodala gojišče v gojitveno posodo ter jo nekajkrat sprala, da sem pobrala čim več celic, ki so po tripsinizaciji še ostale pritrjene na površino. Z dodatkom gojišča sem ustavila delovanje tripsina, drugače bi lahko prišlo do poškodb na celičnih membranah. Celice sem pobrala v 15 ml falkonko (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV). Sledilo je centrifugiranje (5 minut na 1000 obratih/minuto, na sobni temperaturi). Naprej sem odstranila staro gojišče, nato sem ostanku celic (peletu) dodala 5 ml svežega gojišča. Celice pomešane z gojiščem, sem nato prenesla v 50 ml falkonko, ter nato preko sterilne igle in brizge razbila na posamične celice. Sledilo je štetje celic s pomočjo hemocitometra (za pojasnitev glej poglavje: 2.OPREDELITEV POJMOV). Tekom poskusov sem to metodo izvajala samostojno.



Slika 12: Proces presajanja celic. Najprej celice požanjemo, nato jih centrifugiramo, razbijemo z iglo na posamezne celice in jih preštejemo na hemocitometru. Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.

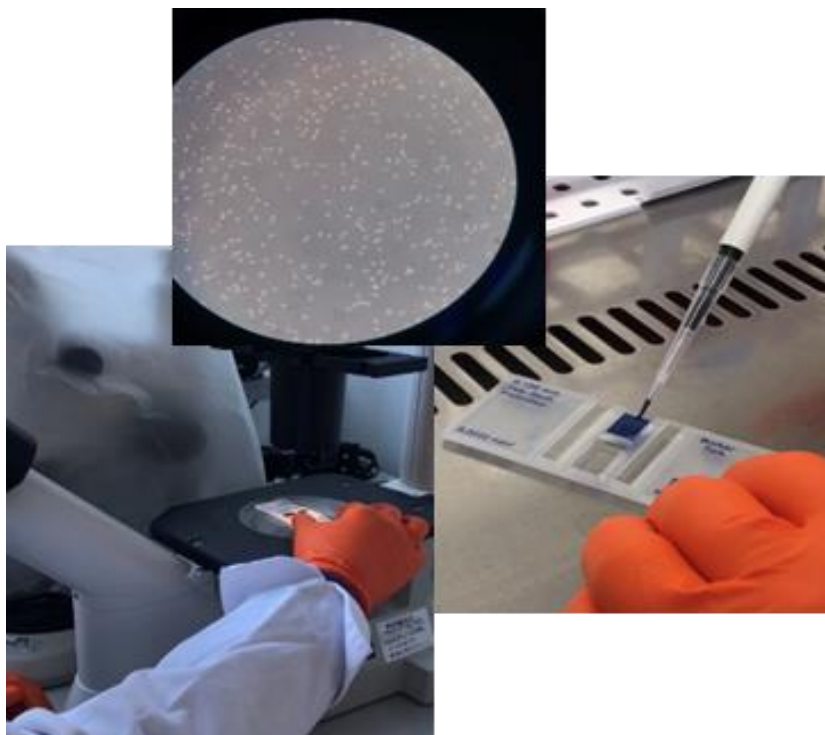
Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

#### 4.2.2.4 Štetje celic

Za štetje celic sem uporabila tripansko modrilo, s katerim razlikujemo med mrtvimi in živimi celicami (slika 13). Neobarvane celice so žive, modro obarvane celice pa so mrtve ali poškodovane, saj zaradi poškodovane membrane barvilo vstopi v celico (prodre v citoplazmo). Suspenzijo celic in tripansko modrilo sem pripravila v razmerju 1 : 5, kar je pomenilo 10  $\mu$ l suspenzije celic in 40  $\mu$ l tripanskega modrila, potem sem 10  $\mu$ l suspenzije nanese na hemocitometer in celice preštela pod mikroskopom.

Število celic sem izračunali po sledeči formuli: Št. prešteti celic x 50000 = Št. Celic/ml

Gostoto celic smo ovrednotili kot število celic/ml. Glede na izračun smo določen volumen celic presadili v nove gojitvene posode s svežim gojiščem in jih naprej gojili v inkubatorju (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ali smo jih uporabili za nadaljnje poskuse in iz njih pripravili *in vitro* 3D celične kulture (19). Tekom poskusov sem to metodo izvajala samostojno.

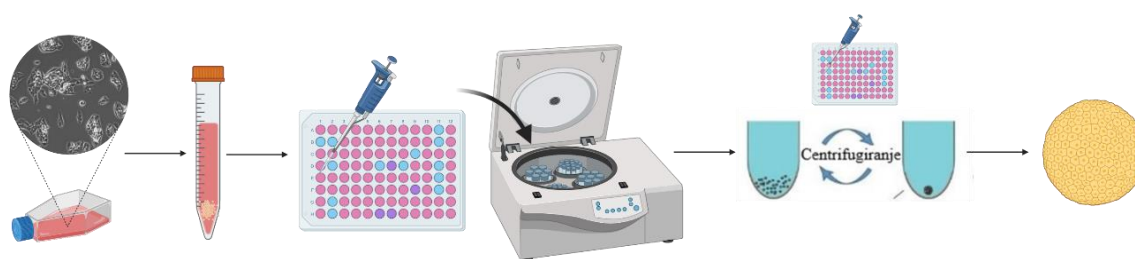


Slika 13: Proces štetja celic. Vir: Štampar, N. (2022).

#### 4.2.2.5 Priprava 3D celičnih modelov – sferoidov

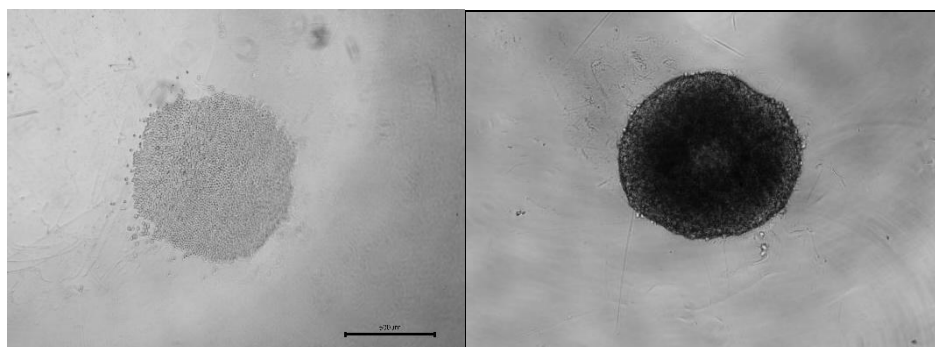
V sterilnih pogojih sem iz HepG2 celic s centrifugiranjem v mikrotitrnih ploščah z 96 U-vdolbinicami oblikovala 3D celične modele, z drugim poimenovanjem sferoide. Za pripravo sferoidov potrebujemo 4 % metilcelulozo, ki sem jo dobila pripravljeno v sterilnih pogojih.

Najprej sem izračunala, koliko gojitvenega medija, metilceluloze in celic potrebujem za pripravo sferoidov (slika 14). Za pripravo sferoidov sem uporabila 15000 celic/ml, torej 3000 celic na vdolbinico oziroma sferoid. Za eno mikrotitrno ploščo sem rabila 20 ml hladnega gojitvenega medija. 4 % od tega je predstavljala hladna metilceluloza, torej 800  $\mu$ l. Nato sem 15000 celic/ml množila z volumnom medija in rezultat delila s številom prešteti celic/ml in tako dobila, kolikšen volumen celic potrebujemo za pripravo sferoidov. Sledilo je hitro, sterilno delo v laminariju. Pripravila sem hladen gojitveni medij, ki sem mu dodala hladno metilcelulozo, to sem dobro premešala ter še dodala izračunan volumen celic. Raztopino sem še enkrat rahlo premešala. 200  $\mu$ l hladne raztopine sem odpipetirala v vsako luknjico na mikrotitrni plošči. Sledilo je centrifugiranje plošč za uro in pol pri 28 °C, 900 G (relativna centrifugalna sila), s hitrim zaganjanjem centrifuge ter počasnim ustavljanjem. Celice so agregirale v skupke – sferoide (slika 15). Po centrifugiranju sem sferoide gojila 72 ur pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>, da so postali kompaktni, nato sem jih uporabila za nadaljnje poskuse. Tekom poskusov sem to metodo izvajala samostojno pod nadzorom mentorja.



Slika 14: Proces priprave 3D celičnih modelov - sferoidov. Najprej celice požanjemo, nato jih preštejejo, zamešamo z medijem in metilcelulozo ter centrifugiramo. Po centrifugiranju nastanejo sferoidi. Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 15: Mikroskopska slika po 10 x povečavo sferoida takoj po centrifugiranju (levo) in po 72ur inkubacije/rasti (desno). Vir: Štampar, N. (2022).

#### 4.2.2.6 Priprava raztopin in mešanic ter tretiranje sferoidov

Za opazovanje vpliva bisfenola A in njegovih analogov smo skupaj z mentorico (zaradi nevarnosti dela z toksičnimi smovmi) pripravile mešanice bisfenolov in gojitvenega medija. Bisfenoli se nahajajo v obliki praha. Za pripravo založnih raztopin se določena masa bisfenolov raztopi v ustreznem volumnu dimetil sulfoksida (DMSO). Dobila sem že pripravljene založne koncentracije bisfenolov, ki so bile 16 mM, ter založno koncentracijo etopozida, ki je bila 25 mg/ml. Založne raztopine smo shranili na - 20 °C v zamrzovalniku. Ob uporabi za poskuse smo raztopine odmrznili in jih redčili v določenem volumnu gojitvenega medija z dodanim DMSO. Pri laboratorijskem delu sem uporabila 40 μM, 60 μM, 80 μM, 100 μM, 120 μM, 140 μM in 160 μM koncentracije bisfenolov ter 20 μM koncentracijo etopozida. Ta korak je zaradi varnosti pripravljala mentorica. Sama sem pri tem preračunala koncentracije.

Tabela 2: V tabeli so navedeni bisfenoli, ki sem jih preučevala v nalogi ter njihove lastnosti.

Ime	Okrajšava	Sinonim	Kemijska struktura	Formula	Molekulska masa(g·mol <sup>-1</sup> )
BPA	bisfenol A	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228.29
BPAP	bisfenol AP	4,4'-(1-Phenylethylidene)bisphenol		CH <sub>3</sub> C(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH) <sub>2</sub>	290.36
BPC	bisfenol C	4,4'-Isopropylidenedi- <i>o</i> -cresol		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C[C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )OH] <sub>2</sub>	256.34

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Po 72 ur gojenja sferoidov v inkubatorju smo sferoidom zamenjali gojitveni medij z medijem, ki je vseboval bisfenole in mešanice. 72 ur stare sferoide smo tretirali z BPA, BPC in BPAP za 24 ur. Sferoide smo izpostavili samostojnim bisfenolom s koncentracijami 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$ , 140  $\mu\text{M}$  in 160  $\mu\text{M}$  ter mešanicam. Pri tem koraku sem star medij odstranjevala sama (medij brez bisfenolov), tretma- torej dodajanje medija z bisfenoli pa je zaradi varnosti izvedla mentorica.

Mešanice so bile sestavljene tako:

*Tabela 3: Prikaz sestave mešanic bisfenolov.*

Mešanica bisfenola A in bisfenola C v razmerju 1:1	Mešanica bisfenola A in bisfenola AP v razmerju 1:1	Mešanica bisfenola A, bisfenola C in bisfenola AP v razmerju 1:1:1
BPA 80 $\mu\text{M}$ + BPC 80 $\mu\text{M}$ = kombinacija 40 $\mu\text{M}$	BPA 80 $\mu\text{M}$ + BPAP 80 $\mu\text{M}$ = Kombinacija 40 $\mu\text{M}$	BPA 120 $\mu\text{M}$ + BPC 120 $\mu\text{M}$ + BPAP 120 $\mu\text{M}$ = kombinacija 40 $\mu\text{M}$
BPA 120 $\mu\text{M}$ + BPC 120 $\mu\text{M}$ = kombinacija 60 $\mu\text{M}$	BPA 120 $\mu\text{M}$ + BPAP 120 $\mu\text{M}$ = kombinacija 60 $\mu\text{M}$	
BPA 160 $\mu\text{M}$ + BPC 160 $\mu\text{M}$ = kombinacija 80 $\mu\text{M}$	BPA 160 $\mu\text{M}$ + BPAP 160 $\mu\text{M}$ = kombinacija 80 $\mu\text{M}$	

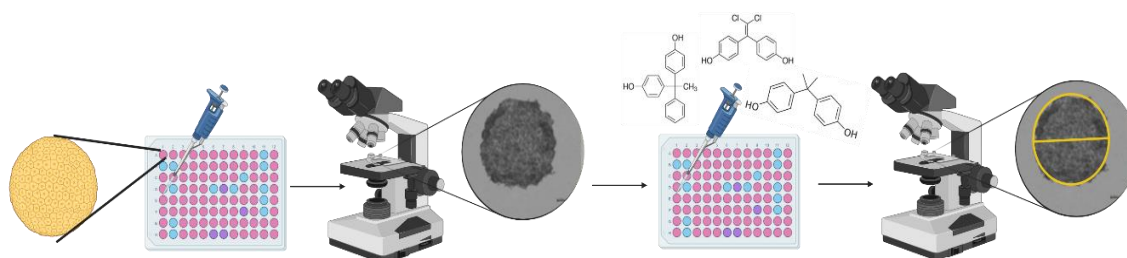
Mešanice smo pripravili tako, da smo vzeli 500  $\mu\text{l}$  vsakega posameznega pripravljenega bisfenola in ga zmešali s 500  $\mu\text{l}$  drugega pripravljenega bisfenola po zgornjem receptu, tako sem BPA 1x redčila z BPC in obratno. Na primer, za pripravo mešanice BPA + BPC 40  $\mu\text{M}$  smo zamešali 500  $\mu\text{l}$  raztopine BPA s koncentracijo 80  $\mu\text{l}$  ter jo zmešali z 500  $\mu\text{l}$  raztopine BPC s koncentracijo 80  $\mu\text{l}$ . Tako smo dobili mešanico dveh bisfenolov BPA in BPC s končno koncentracijo 40  $\mu\text{l}$ . 72 ur gojenim sferoidom v mediju smo iz posamezne luknjice na mikrotitrski plošči odsesali ta gojitveni medij in ga zamenjali z 200  $\mu\text{l}$  ustrezne koncentracije bisfenolov. Tretirane sferoide smo inkubirali pri 37  $^{\circ}\text{C}$  v vlažni atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$  za 24 ur. V vseh poskusih smo uporabljali pozitivno kontrolo (etopozid), kontrolo medija in kontrolo topila.

#### *4.2.2.7 Vpliv BPA, BPC, BPAP in njihovih mešanic na rast in površino sferoidov*

Za opazovanje vpliva BPA, BPC ter BPAP in mešanic na rast in površino (slika 16) je mentorica 72 ur stare sferoide tretirala s koncentracijami navedenimi v poglavju 4.2.2.6. za 24 ur. Najprej sem pred tretmajem 72 ur stare sferoide poslikala pod mikroskopom in jim s programom

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

izmerila površino in premer. To sem izvajala samostojno pod nadzorom mentorja. Nato je mentorica enake sferoide izpostavila bisfenolom in mešanicam za 24 ur. Po 24 urah izpostavitve sem enake sferoide ponovno poslikala in jim s programom izmerila površino in premer. Spremljala sem vsaj 5 sferoidov na pogoj. Slike sem posnela s konfokalnim mikroskopom (Nicon) pri desetkratni povečavi, s pomočjo programa NIS elements (mi je priporočala mentorica) pa sem izmerila površino in premer. Pri slikah sem opazovala, ali pride do spremembe površine in kompaktnost sferoidov po 24-urni izpostavitvi. Površino in premer sferoidov sem primerjala glede na podatke pred tretmajem. To sem izvajala samostojno pod nadzorom mentorja. Kot pozitivno kontrolo sem uporabila etopozid koncentracije 34  $\mu$ M. Grafe sem narisala s programom excel. Slike sferoidov pa sem pripravila v PPT-ju.



Slika 16: Proces opazovanja vpliva bisfenola A in njegovih analogov ter mešanic na rast in površino sferoidov. Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.

#### 4.2.2.8 Določanje živosti celic v sferoidu po izpostavitvi BPA, BPC, BPAP in njihovim mešanicam z MTS testom

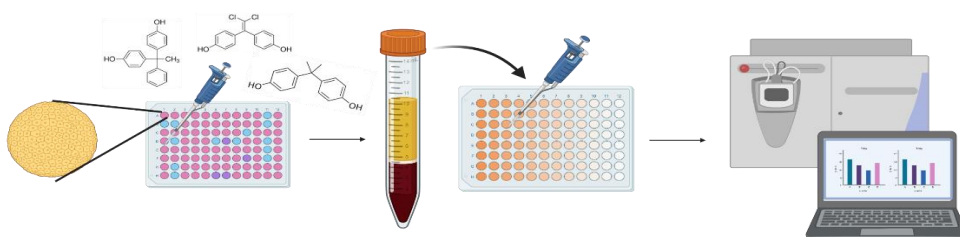
Za določanje živosti celic v sferoidu po izpostavitvi BPA, BPC, BPAP in njihovim mešanicam za 24 ur sem izvedla enostaven in natančen MTS test (slika 17). MTS test je metoda pri kateri se meri sprememba barve in z njo določamo aktivnost celic na podlagi pridobljenih meritev (številke). Osnova testa je sprememba MTSa v vodotopen formazan ob prisotnosti mitohondrijskih encimov. Ti so aktivni v živih celicah. Količino nastalega formazana lahko izmerimo z absorbanco pri 490 nm. Količina je sorazmerna številu živih celic (1). Metodo so ustrezno optimizirali za uporabo na 3D celičnih modelih (17).

Sterilno pripravljena reagenta MTS v koncentraciji 2 mg/ml in PMS v koncentraciji 0,92 mg/ml sem dobila v laboratoriju. Pripravljene raztopine so bile shranjene na  $-20^{\circ}\text{C}$ , uvite v aluminijasto folijo, saj sta tako MTS kot PMS reagenta občutljiva na svetlobo.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Za določanje živosti celic v sferoidih je mentorica 72 ur stare sferoide izpostavila različnim koncentracijam bisfenolov in mešanic (glej poglavje 4.2.2.6) za 24 ur. Jaz sem pa tik pred uporabo pripravila mešanico MTS in PMS v razmerju 20:1 (2 ml MTS in 100  $\mu$ l PMS). Po 24 urni izpostavitvi sem sferoidom dodala pripravljeno raztopino PMS in MTS v razmerju 5:1, torej 40  $\mu$ l skupne raztopine sem dodala v posamezno luknjo na mikrotitrski plošči, ki je že vsebovala 200  $\mu$ l gojitvenega medija z določenim bisfenolom ali mešanico. Sledila je triurna inkubacija (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nato je sledilo merjenje absorbance pri 490 nm na spektrofotometru.

Poskus sem izvedla v treh bioloških ponovitvah (v treh paralelah), za vsak poskus sem rabila 2 mikrotitrski plošči, za vsak pogoj sem uporabila 5 sferoidov, torej 5 tehničnih ponovitev. Kot pozitivno kontrolo sem uporabila etopozid koncentracije 34  $\mu$ M. Grafe sem narisala s programom excel.



Slika 17: Prikaz procesa določanja živosti celic v sferoidih po izpostavitvi bisfenolom z MTS testom. Sferoide najprej tretiramo za 24 ur, nato zamešamo MTS test in ga dodamo k vsakemu sferoidu. Reakcijo, ki poteče, izmerimo na spektrofotometru. . Vir: Štampar, N. (2022), Biorender program.

### 4.3 Pregled dokumentov in literature

Pregled dokumentov in literature sem opravila z namenom, da raziščem vplive in posledice izpostavljenosti bisfenolu A in njegovih analogov.



## 5. ANALITIČNI DEL

### 5.1 Rezultati anketiranja

Anketa je priložena v poglavju Priloge, na str. 52

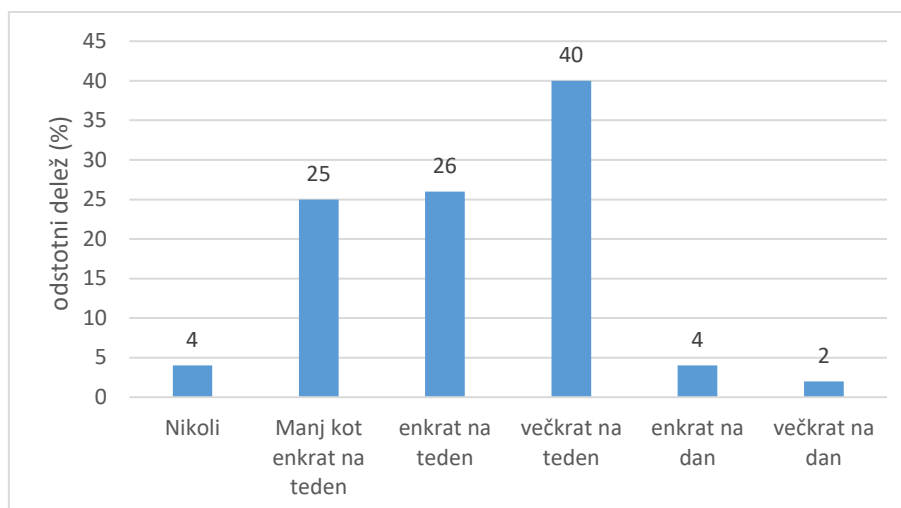
Rezultate raziskovalne naloge lahko razdelim v dva dela. V prvem delu sem pripravila anketo, preko katere sem poskušala ugotoviti, kakšna je ozaveščenost potrošnikov o bisfenolih. Zanimalo me je, ali so anketiranci ob nakupu pozorni na to, v kakšni embalaži je shranjena hrana, ali vedo, kaj sploh so bisfenoli in kje vse jih lahko najdemo, ali so seznanjeni o tem, da lahko bisfenoli vplivajo na naše zdravje. V drugem delu raziskovalne naloge sem se odpravila v laboratorij na nacionalnem inštitutu za biologijo, kjer sem testirala vpliv BPA, njegovih analogov (BPC in BPAP) in kompleksnih mešanic na celični liniji humanega hepatocelularnega karcinoma (HepG2) gojeni v 3D sistemu (Sferoidi). Vpliv na rast in kompaktnost sem merila in opazovala z mikroskopsko analizo. Citotoksično delovanje oziroma vpliv na živost celic sem testirala z testom MTS.

Za uprizoritev rezultatov ankete sem vprašanja razdelila v tri sklope. V prvem sklopu sem ugotavljala, kakšna je splošna ozaveščenost anketirancev o sestavi embalaže hrane ali pijače, v drugem, kakšna je splošna ozaveščenost anketirancev o bisfenolu A ter njegovih analogih, v tretjem sklopu pa me je zanimalo, kakšna je seznanjenost anketirancev o škodljivih vplivih bisfenolov.

#### 5.1.1 Splošna ozaveščenost anketirancev o sestavi embalaže hrane ali pijače

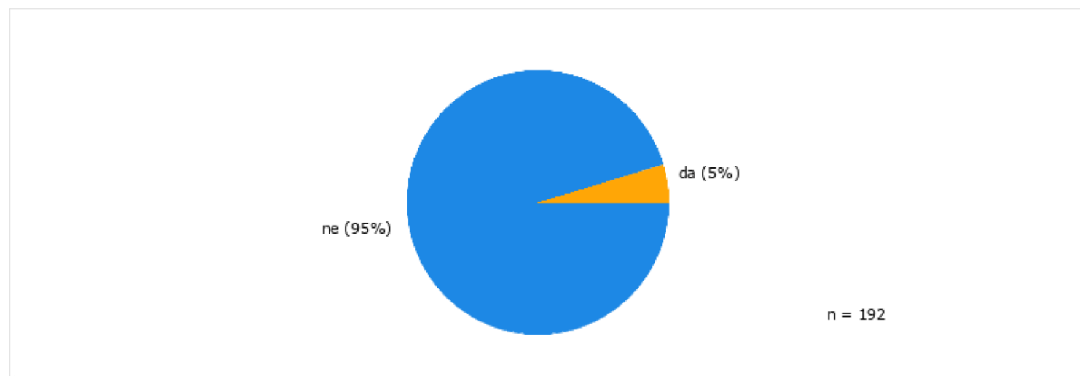
Na vprašanje: »Kako pogosto kupite hrano in pijačo v plastični embalaži (npr. platenke za vodo)?«, je največ anketirancev odgovorilo z »večkrat na teden«, kar predstavlja 40 % anketirancev (slika 18). Nato mu sledita odgovora »enkrat na teden« z 26 % in »manj kot enkrat na teden« z 25 %. Večkrat na dan pa kupuje hrano in pijačo v plastični embalaži najmanj anketirancev, kar je 2 %.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 18: Grafični prikaz pogostosti kupovanja hrane in pijače v plastični embalaži (n=191).

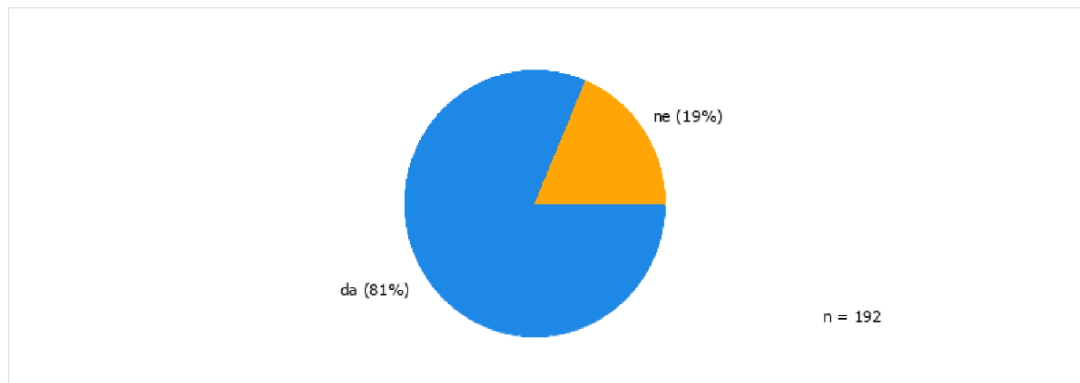
Na vprašanje: »Ali pred uporabo/nakupom preverite, iz česa je proizvedena plastična embalaža ter kaj vsebuje?« je le 5 % anketirancev odgovorilo z »da«, medtem ko kar 95 % anketirancev tega ne preveri (slika 19).



Slika 19: Grafični prikaz preverjanja materialov plastične embalaže pred uporabo/nakupom (n=192).

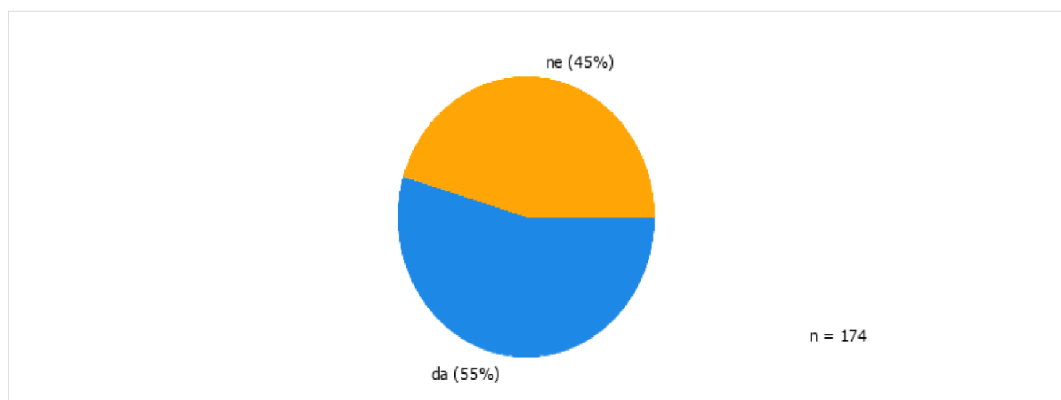
Na vprašanje:« Ali ste seznanjeni s tem, da plastična embalaža izloča najrazličnejše kemijske spojine v okolje/hrano itd. ?« je prevladal odgovor »da«, z 81 %, odgovor »ne« pa je izbralo 19 % anketirancev (slika 20).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 20: Grafični prikaz seznanjenosti potrošnikov o tem, da plastična embalaža izloča najrazličnejše kemijske spojine v okolje/ hrano itd. (n=192).

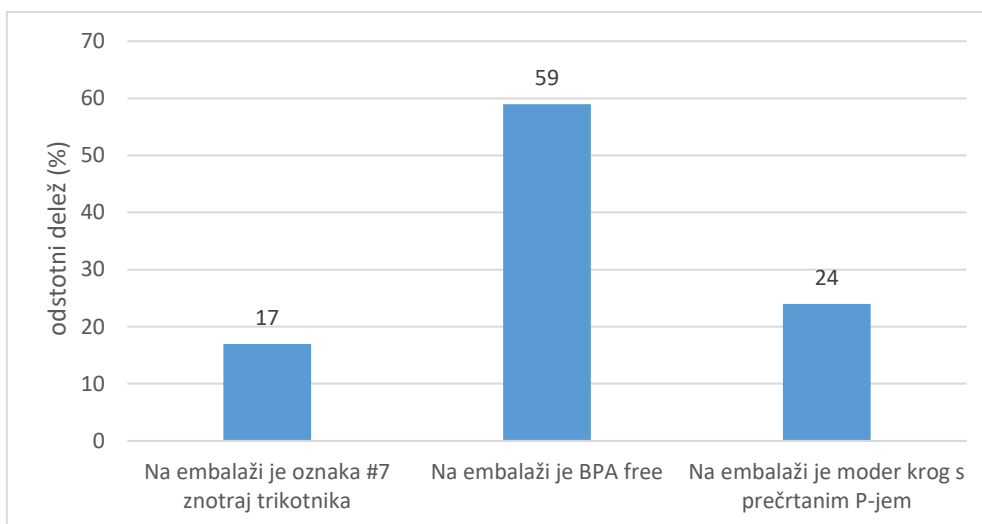
Na vprašanje: »Ali ste že slišali za BPA free plastenke/plastiko/embalažo?« je 55 % anketirancev odgovorilo z »da«, 45 % pa z »ne« (slika 21).



Slika 21: Grafični prikaz seznanjenosti potrošnikov o BPA free oznaki (n=174).

Na vprašanje: »Po čem bi sklepali, da je posoda/embalaža izdelana iz polikarbonata (bisfenolov) ali/in ima epoksidno oblogo?« je največ anketirancev, to je 59 %, odgovorilo z napačnim odgovorom »na embalaži je oznaka BPA free«. 24 % je izbralo drugo napačno možnost »na embalaži je moder krog s prečrtanim P-jem«. Le 17 % anketirancev se je odločilo za edino pravilno možnost: »Na embalaži je oznaka #7 znotraj trikotnika« (slika 22).

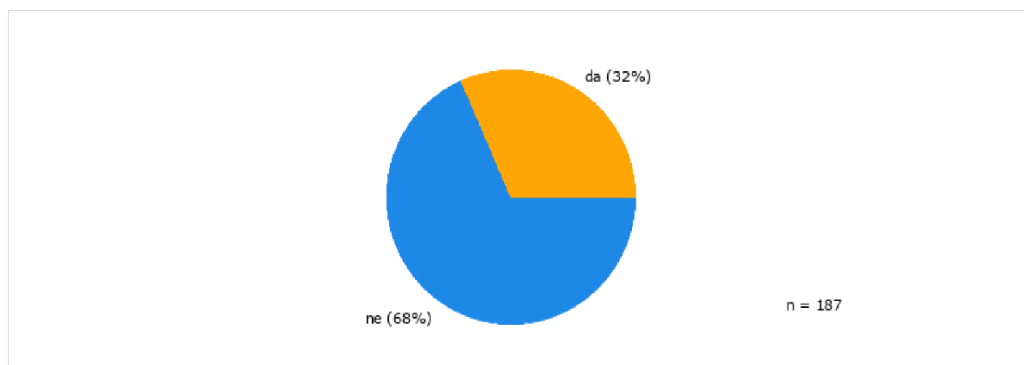
Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 22: Grafični prikaz sklepanja anketirancev o oznaki, ki prikazuje prisotnost bisfenolov in epoksidne obloge (n=162).

### 5.1.2 Splošna ozaveščenost anketirancev o bisfenolu A ter njegovih analogih

Na vprašanje: »Ali ste že slišali za bisfenol A?« je večina anketirancev, to je 68 %, odgovorilo z »ne«, 32 % pa z »da« (slika 23).

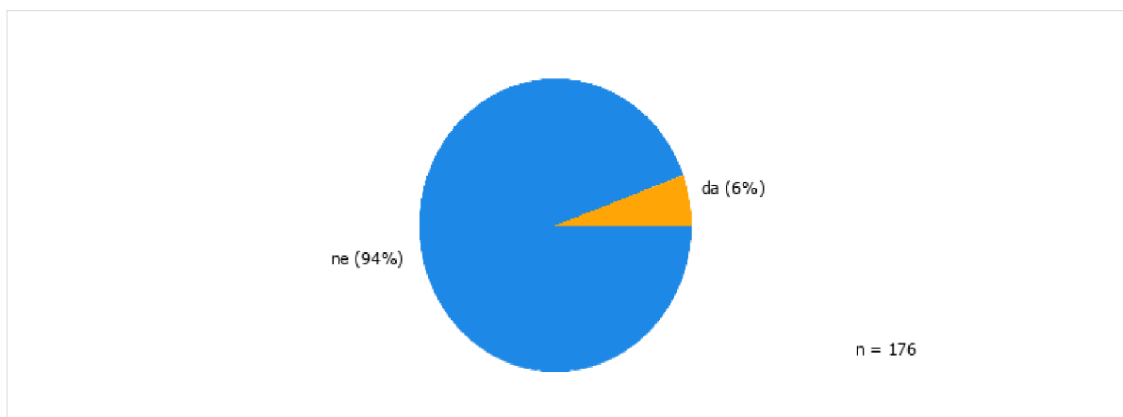


Slika 23: Grafični prikaz ozaveščenosti potrošnikov o bisfenolu A (n=187).

Na vprašanje: »Kje po vašem mnenju lahko vse najdemo bisfenol A?« so anketiranci odgovarjali poljubno. Največ odgovorov je bilo, da so v embalaži od hrane in v ostalih plastičnih izdelkih.

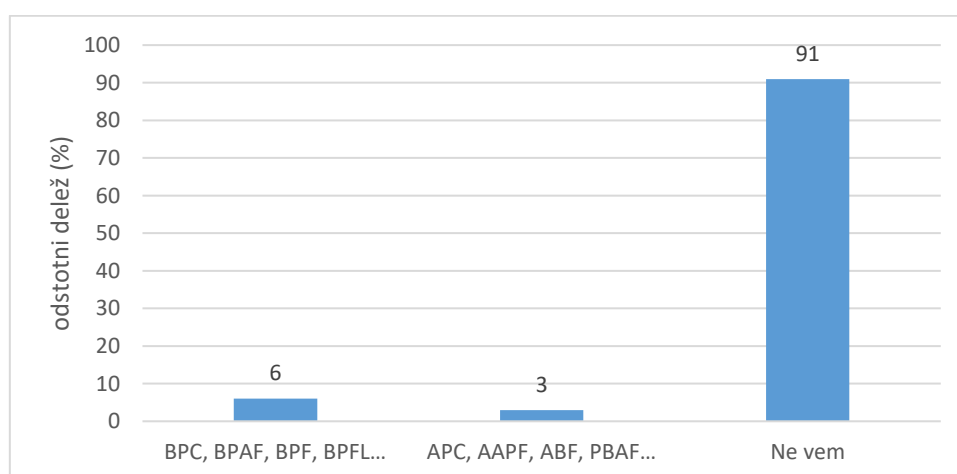
Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Na vprašanje: »Ali ste slišali za analoge bisfenola A?« je kar 94 % anketirancev odgovorilo z »ne«, medtem ko je le 6 % odgovorilo z »da« (slika 24).



Slika 24: Grafični prikaz ozaveščenosti potrošnikov o analogih bisfenola A (n=176).

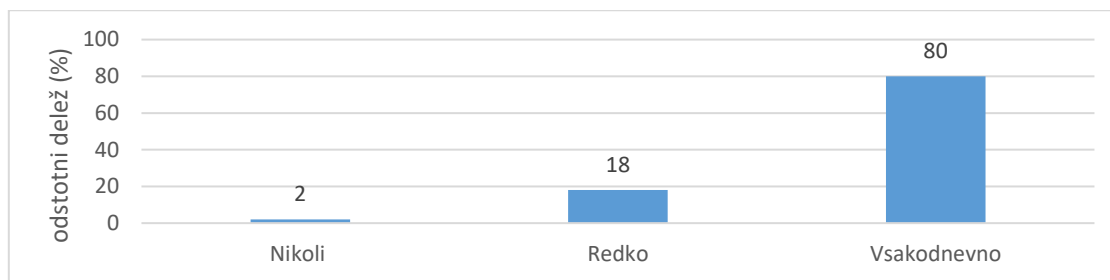
Na vprašanje: »Ali veste, kateri so analogi bisfenola A?« je velika večina, to je 91 % anketirancev, odgovorilo z »ne vem«, 6 % jih je odgovorilo z pravilnim odgovorom » BPC, BPAF, BPF, BPFL...«. 3% anketirancev je odgovorilo z napačnim odgovorom: »APC, AAPF, ABF, PBAF...«(slika 25).



Slika 25: Grafični prikaz ozaveščenosti potrošnikov o kraticah za analoge bisfenola A (n=174).

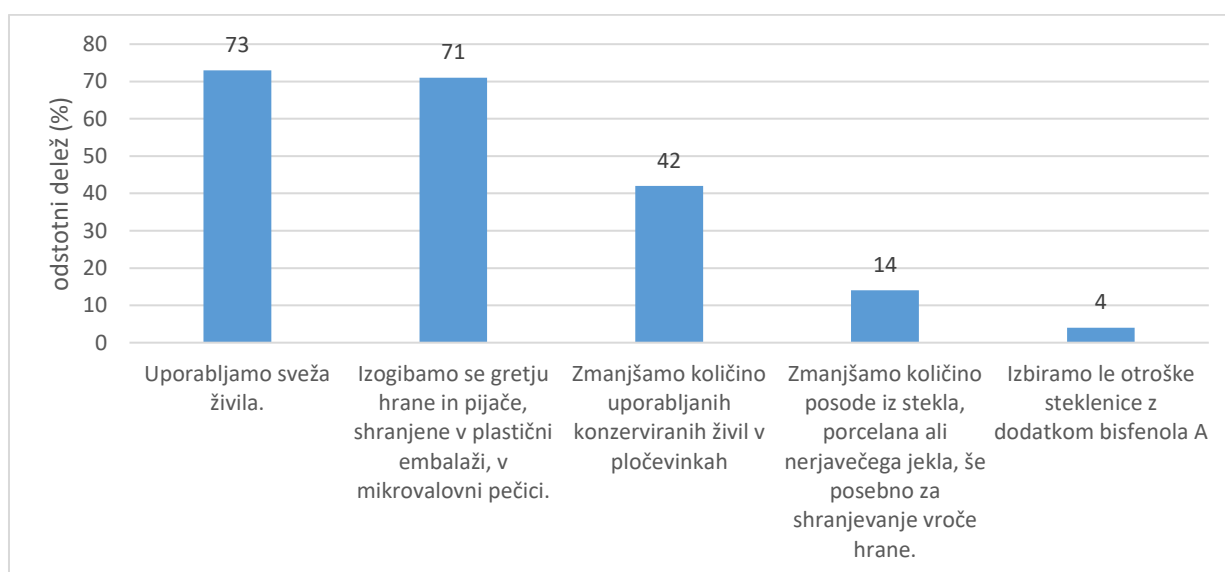
### 5.1.3 Seznanjenost anketirancev o škodljivih vplivih bisfenolov

Na vprašanje: »Kako pogosto menite, da smo izpostavljeni bisfenolom?« je 80 % anketirancev odgovorilo, da, vsakodnevno. 18 % je odgovorilo, da redko in le 2 % menita, da nikoli (slika 26).



Slika 26: Grafični prikaz splošnega mnenja potrošnikov o izpostavljenosti bisfenolom (n=184).

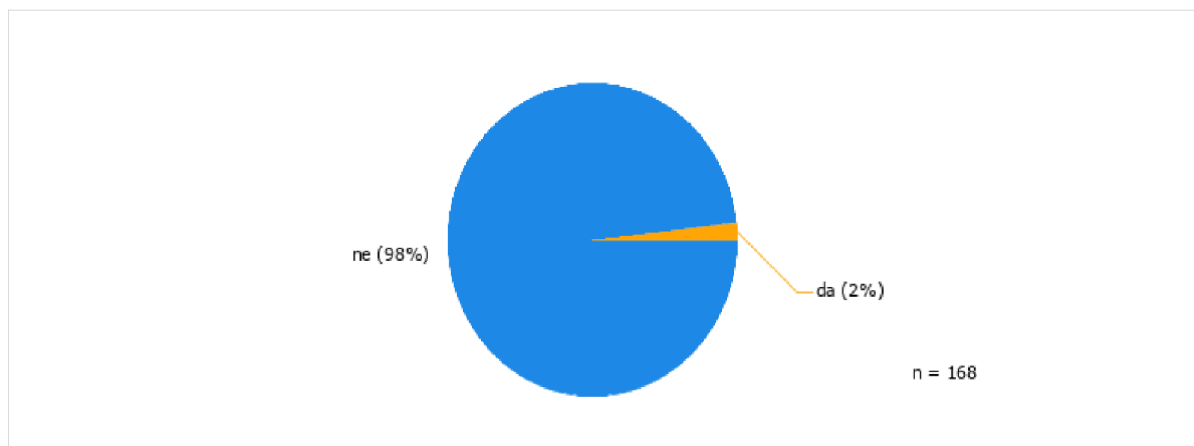
Pri vprašanju: »Kaj menite, kako lahko zmanjšamo izpostavljenost bisfenolu A in njegovim analogom?«, sta bila dva pravilna odgovora najpogosteje izbrana, in sicer, »uporabljamo sveža živila« z 73 %, »izogibamo se gretju hrane in pijače, shranjene v plastični embalaži, v mikrovalovni pečici« z 71 % (slika 27).



Slika 27: Grafični prikaz odgovorov potrošnikov na to, kako lahko zmanjšamo izpostavljenost bisfenolom (n=166).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Pri vprašanju: »Ali menite, da ste dovolj seznanjenih o bisfenolih in njihovih vplivih na človeka?« so se anketiranci skoraj popolnoma strinjali z odgovorom »ne«, to je 98 % (slika 28).



Slika 28: Grafični prikaz splošnega mnenja potrošnikov o seznanjenosti o bisfenolih in njihovih vplivih na človeka (n=168).

## 5.2 Rezultati laboratorijskega dela

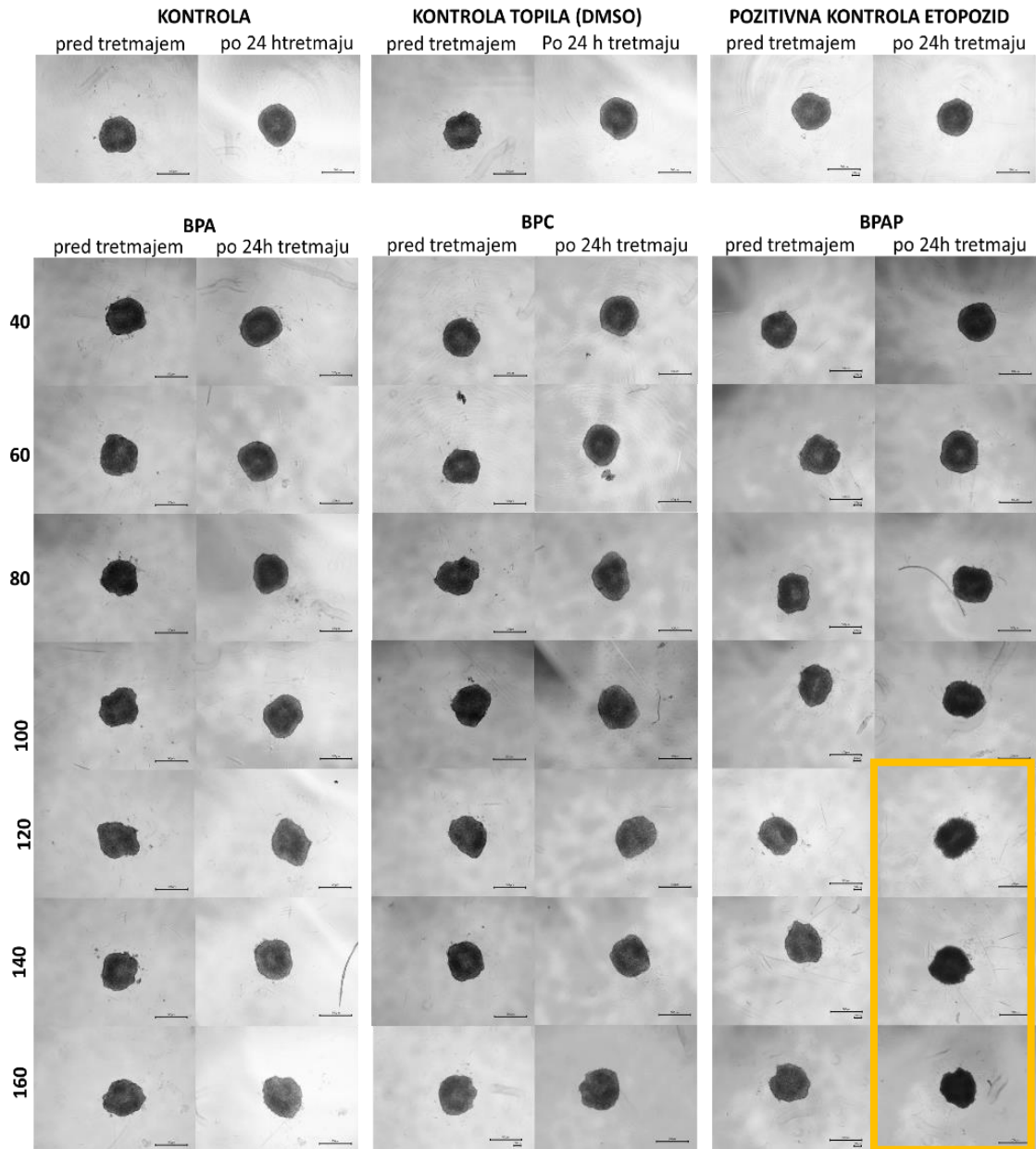
### 5.2.1 Spremljanje vpliva BPA, BPC, BPAP in njihovih mešanic na rast in površino sferoidov

Spremljala in merila sem površino sferoidov z začetno celično gostoto 3000 celic/sferoid pred (72 ur stari sferoidi) in po 24-urnem tretmaju (96 ur stari sferoidi) z izbranimi bisfenoli in mešanicami. Meritve in slike sem zajela z invertnim mikroskopom pod desetkratno povečavo. Slike sem obdelala s programsko opremo NIS 4.13. Rezultate sem podala kot povprečje vrednosti treh bioloških ponovitev  $\pm$  SD, pri vsakem pogoju sem izmerila 5 tehničnih ponovitev (5 sferoidov na pogoj).

Rezultati opazovanja slik (glej sliki 29, 30) so pokazali, da posamezni bisfenoli BPA, BPC in BPAP koncentracij 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 120  $\mu$ M, 140  $\mu$ M in 160  $\mu$ M po 24 urah izpostavitve ne vplivajo vidno na spremembo kompaktnosti sferoidov. Razen pri BPAP, pri koncentracijah, ki so večje od 120  $\mu$ M lahko zaznamo vidne razlike v rahljanju celic na obrobju sferoida. Pri opazovanju kompaktnosti sferoidov tretiranih s kompleksnimi mešanicami

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

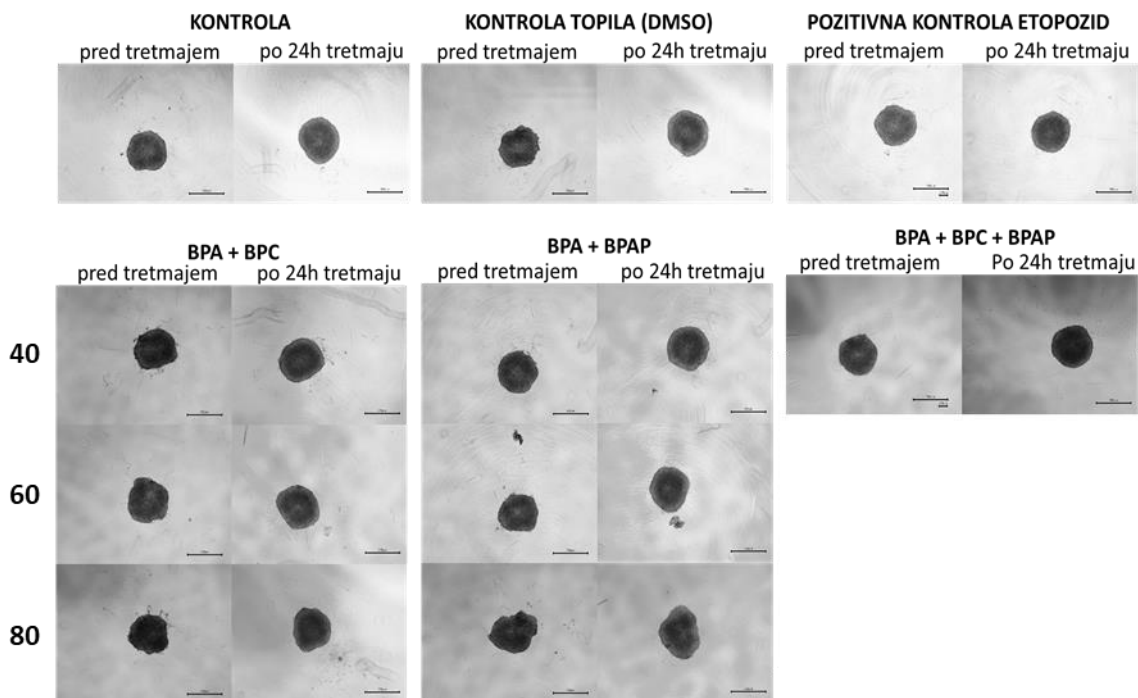
bisfenolov (BPA + BPC, BPA + BPAP in BPA + BPC + BPAP) nisem opazila nobenih razlik po 24 urah.



Slika 29: Spremljanje spremembe rasti in površine pri 72 ur starih sferoidih z začetno gostoto 3000 celic/sferoid pred in po 24-urnem tretmaju s posameznimi bisfenoli (BPA, BPC in BPAP). Spremembo v kompaktnosti sferoidov smo zaznali pri bisfenolu BPAP pri koncentracijah, ki so večje od 120  $\mu\text{M}$ , označeno na sliki z rumenim kvadratom. Vir: Štampar, N. (2022).



Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



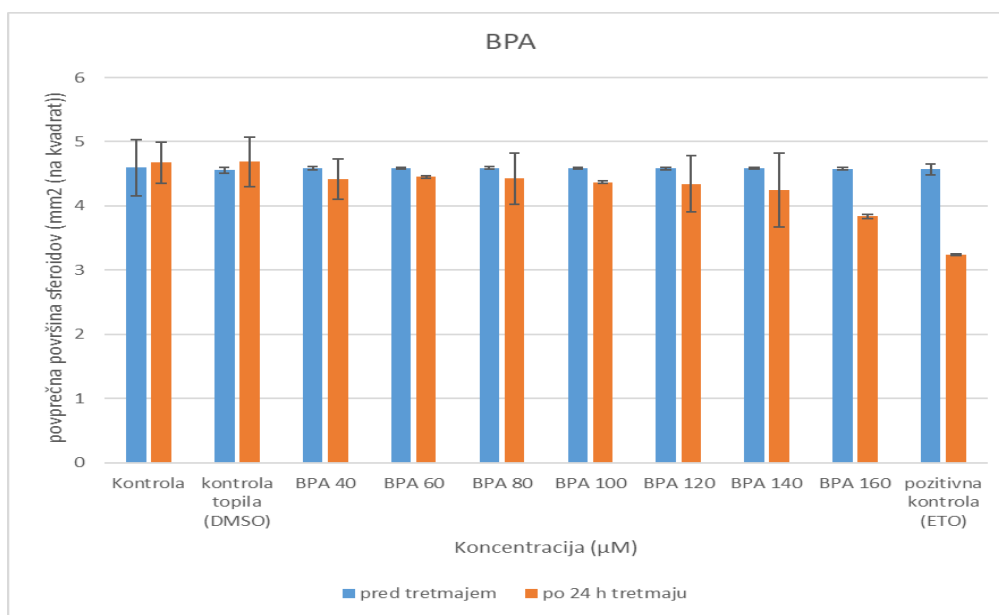
Slika 30: Spremljanje spremembe rasti in površine pri 72 ur starih sferoidih z začetno gostoto 3000 celic/sferoid pred in po 24-urnem tretmaju s kompleksnimi mešanicami bisfenolov (BPA + BPC, BPA + BPAP in BPA + BPC + BPAP). Vir: Štampar, N. (2022).

Meritve površine sferoidov sem izvedla s pomočjo mikroskopa in mikroskopskega programa, ki omogoča izvajanje meritev direktno med mikroskopiranjem (glej slike od 31-34). Rezultati so pokazali da so imeli sferoidi pred tretmajem približno enako povprečno površino, ta je znašala  $4,574 \text{ mm}^2 \pm 0,19 \text{ mm}^2$ . Po 24-urnem tretmaju sem opazila zelo majhne razlike v površini. Pri kontrolah se je površina sferoidov rahlo povečala za približno  $10 \text{ mm}^2$ , pri etopozidu pa se je površina zmanjšala za  $1,33 \text{ mm}^2$  v primerjavi s površino pred tretmajem.

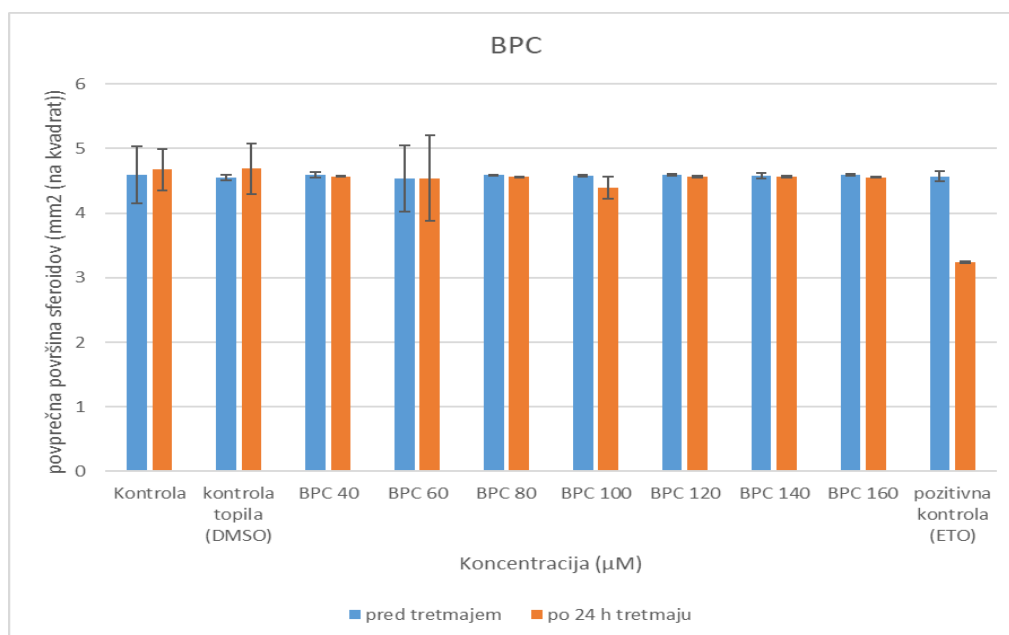
Po 24-urni izpostavitvi sferoidov BPA sem opazila, da se povprečna površina pri sferoidih ne spreminja pri večini koncentracij, do opaznih razlik je prišlo le pri koncentraciji  $160 \mu\text{M}$ , kjer je vidno zmanjšanje površine za približno  $0,74 \text{ mm}^2$ . Po 24-urni izpostavitvi sferoidov različnim koncentracijam BPC nisem opazila nobenih razlik v povprečni površini v primerjavi s kontrolo. Po 24-urni izpostavitvi sferoidov bisfenolu BPAP sem glede na višje koncentracije opazila razliko v povprečni površini sferoidov, ta se je pojavila pri koncentraciji  $120 \mu\text{M}$  in višje. Pri kombinacijah različnih bisfenolov pa sem opazila zmanjšanje v povprečni površini pri kombinaciji BPA + BPC in koncentraciji  $80 \mu\text{M}$ , kjer se je zmanjšala povprečna površina za  $0,97 \text{ mm}^2$  v primerjavi s površino pred tretmajem ter pri kombinaciji BPA + BPAP in koncentraciji

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

80  $\mu\text{M}$ , kjer se je povprečna površina zmanjšala za 0,53  $\text{mm}^2$ . Pri kombinaciji treh bisfenolov BPA + BPC + BPAP pri koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  nisem opazila razlik v povprečni površini v primerjavi s površino pred tretmajem in kontrolo. Ugotovila sem, da BPA, BPC, BPAP ter mešanice vplivajo na rast in površino sferoidov, vendar v manjši meri.

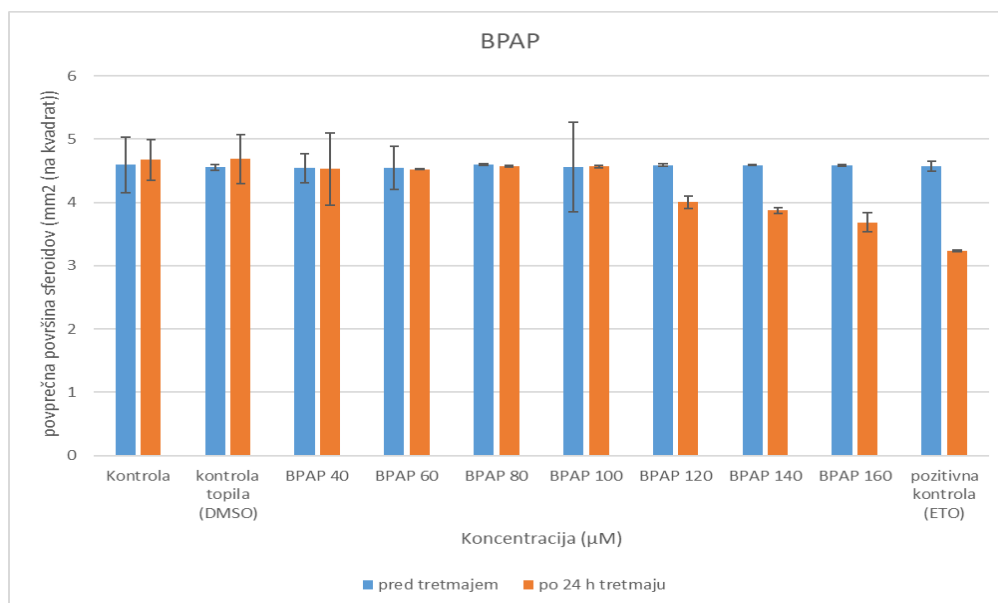


Slika 31: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi koncentracijami BPA.

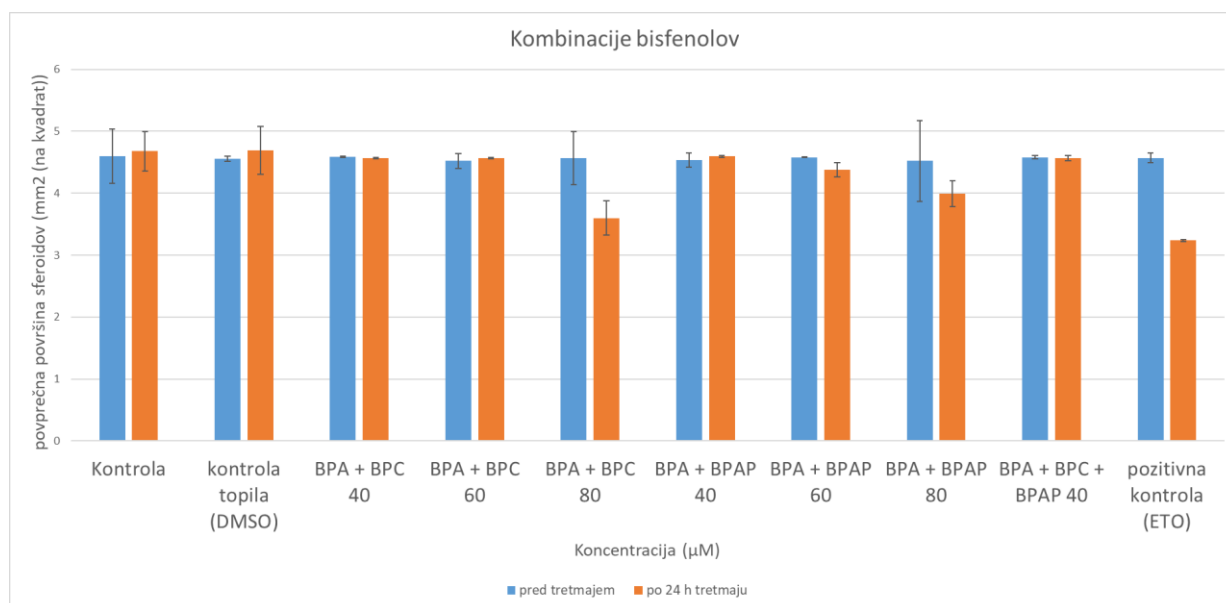


Slika 32: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi koncentracijami BPC.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 33: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi koncentracijami BPAP.



Slika 34: Graf prikazuje povprečne vrednosti površine sferoidov in standardno napako pred in po 24-urnem tretmaju z različnimi kombinacijami bisfenolov ter različnimi koncentracijami.

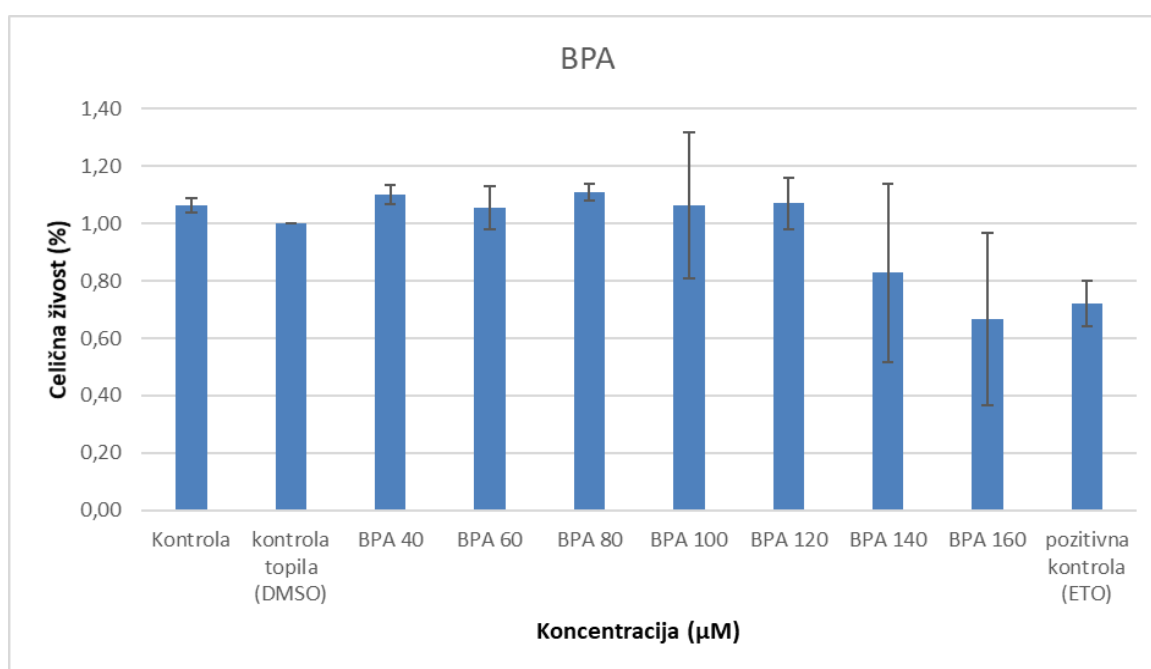
### 5.2.2 Spremljanje vpliva živosti celic v sferoidu po izpostavitvi BPA, BPC, BPAP in njihovim mešanicam z MTS testom

Citotoksično delovanje bisfenola A in njegovih mešanic sem preučevala s testom živosti (test MTS). Sferoide, z začetno gostoto 3000 celic/sferoid, ki sem jih najprej gojila 72 ur, je

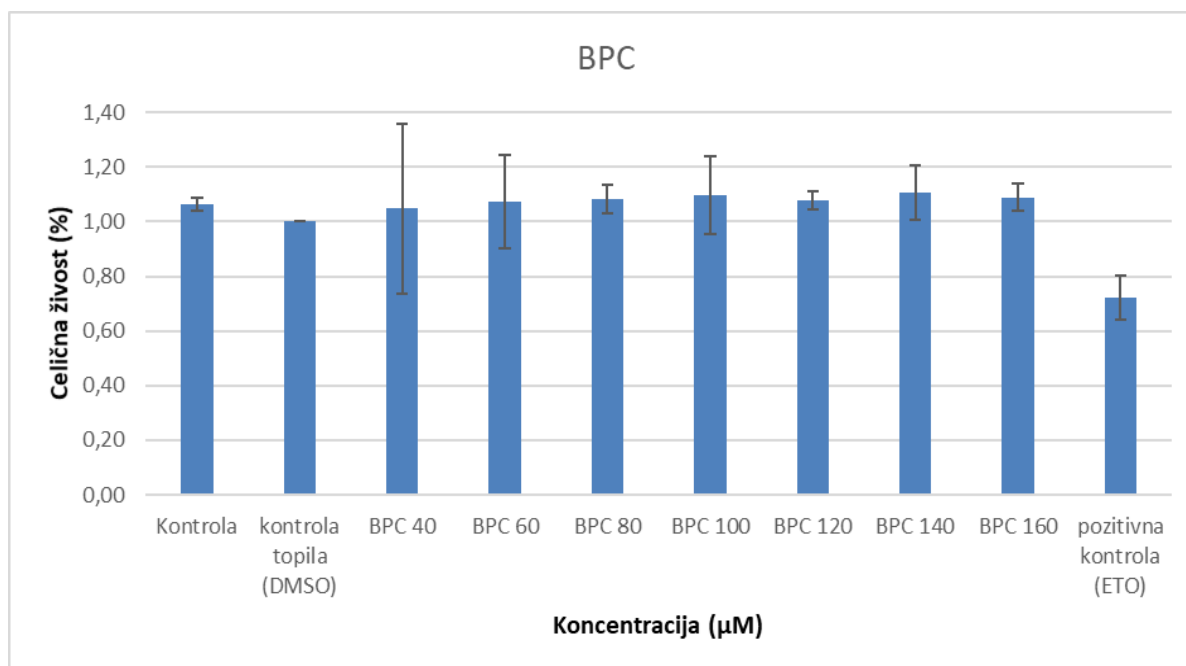
Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

mentorica izpostavila BPA, BPC in BPAP ter mešanicam pri različnih koncentracijah. Nato sem s testom MTS ugotavljala njihov vpliv na živost celic v sferoidu po 24 urah izpostavitve. Rezultate sem primerjala glede na kontrolo topila, kjer sem določila, da je bila celična živost 100 %. Rezultati so podani kot povprečje treh neodvisnih paralel  $\pm$  SD. V vsaki paraleli sem izmerila vrednost absorbcije (OD) vsaj 5 sferoidov.

Rezultati so pokazali, da BPA pri nižjih koncentracijah ni deloval citotoksično, torej ni prišlo do zmanjšanja živosti celic v sferoidih. Do zmanjšane živosti je prišlo po 24 urah pri koncentraciji 140  $\mu$ M za 17 % in 160  $\mu$ M za 33 % (slika 35). Rezultati so pokazali tudi, da BPC po 24-urni izpostavitvi ni deloval citotoksično na celice sferoidov pri nobeni izmed testiranih koncentracij (slika 36).



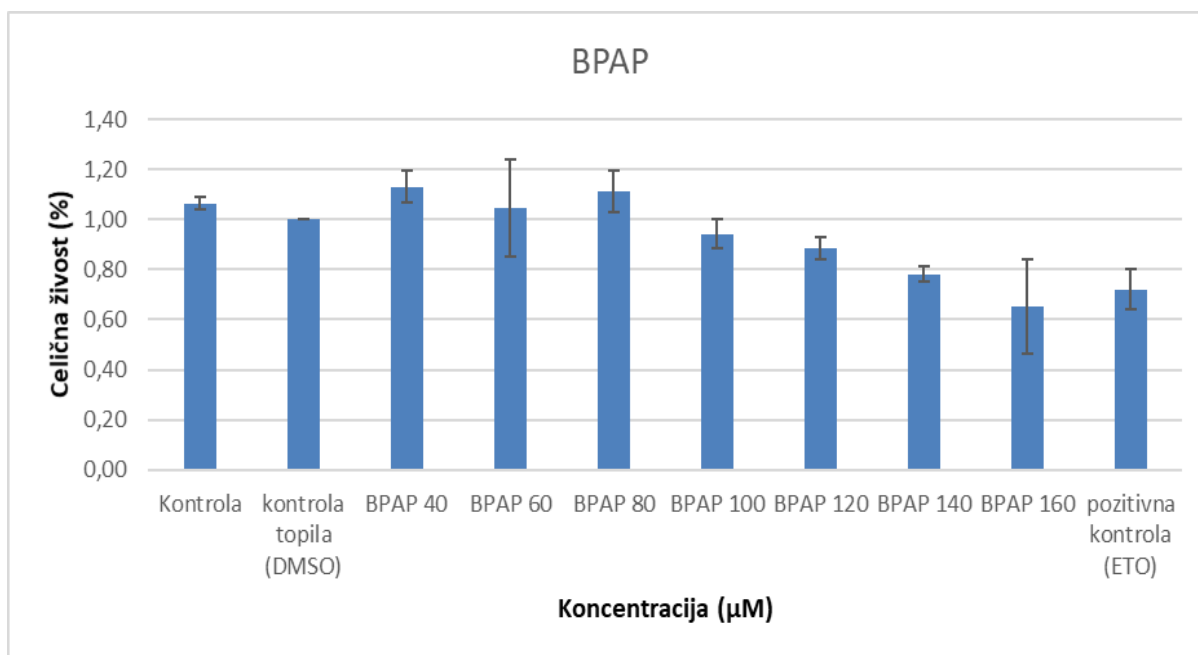
Slika 35: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi BPA določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic  $\pm$  SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov.



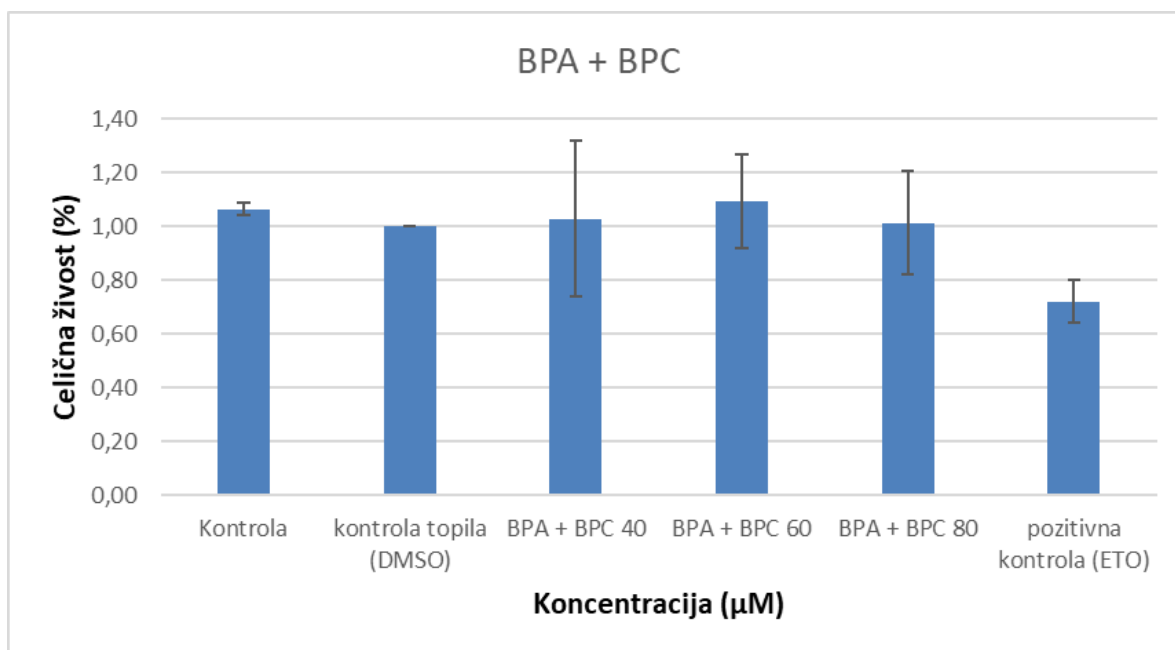
Slika 36: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi BPC določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic  $\pm$  SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov.

Največje znižanje živosti celic opazimo pri 24-urni izpostavitvi sferoidov BPAP (Slika 37). Zmanjšano živost sem opazila pri koncentracijah 100  $\mu$ M za 6 %, pri 120  $\mu$ M za 11 %, pri 140  $\mu$ M za 22 % ter 160  $\mu$ M za 35 %. Pri kombinacijah bisfenolov pa sem opazila, da se živost celic v sferoidih ni tako zelo zmanjšalo kot pri posameznih bisfenolih. Rezultati so pokazali, da kombinacija BPA + BPC po 24-urni izpostavitvi ni delovala citotoksično na celice sferoidov pri nobeni izmed testiranih koncentracij (slika 38). Pri kombinaciji BPA + BPAP sem opazila zmanjšanje celične živosti le pri najvišji koncentraciji 80  $\mu$ M, ta se je zmanjšala za 22 % (Slika 39).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

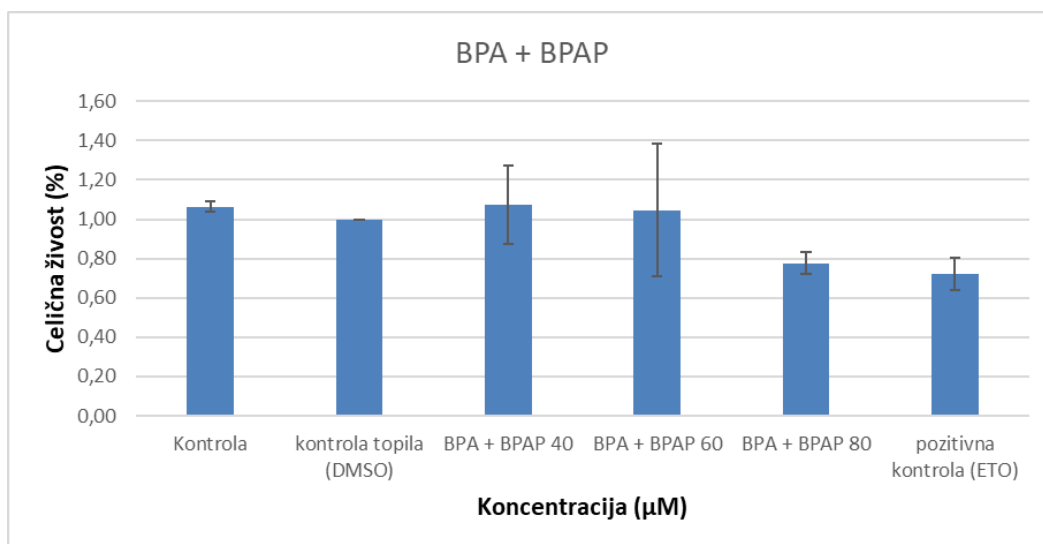


Slika 37: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi BPAP določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic  $\pm$  SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov.



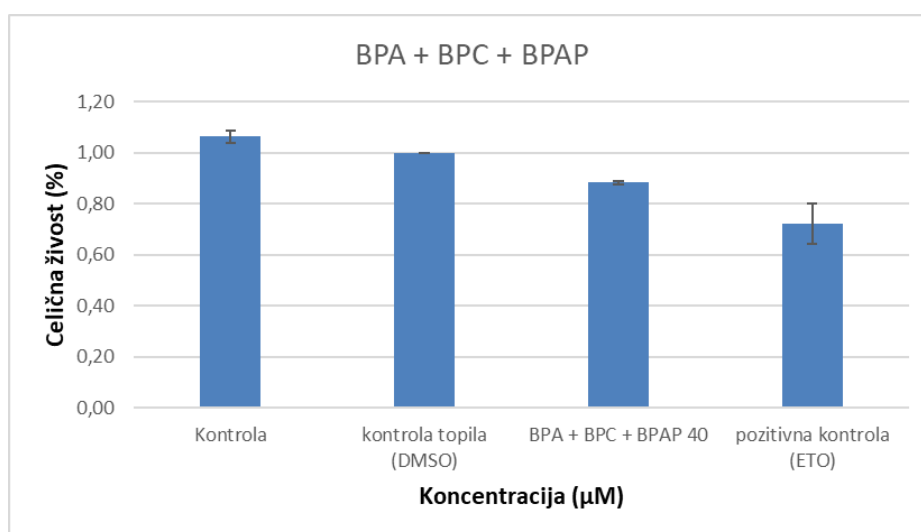
Slika 38: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi kombinaciji bisfenolov BPA + BPC določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic  $\pm$  SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga



Slika 39: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi kombinaciji bisfenolov BPA + BPAP določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic  $\pm$  SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov.

Citotoksično delovanje sem opazila tudi pri kombinaciji vseh treh bisfenolov BPA + BPC + BPAP pri edini testirani koncentraciji 40 µM, živosti celic v sferoidu se je zmanjšala za 12 % (Slika 40). Ugotovila sem, da uporabljene kombinacije vplivajo pri nizjih koncentracijah na zmanjšanje živosti kot posamezne spojine. Kot pozitivno kontrolo sem uporabila etopozid (17 µM). Etopozid je po 24 urah izpostavitve znižal živost v povprečju za 28 %.



Slika 40: Živost HepG2 celic v sferoidih po 24-urni izpostavitvi kombinaciji bisfenolom BPA + BPC + BPAP določena s testom MTS. Rezultati so podani kot % živih celic  $\pm$  SD, ki je normaliziran na kontrolo topila in izveden v treh neodvisnih bioloških paralelah, ki so zajemale vsaj 5 sferoidov.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanici ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Ugotovila sem, da BPA, BPC, BPAP vplivajo na živost sferoidov. Pri kompleksnih mešanicah izbranih bisfenolov pa sem ugotovila, da tudi vplivajo na živost sferoidov, vendar v manjši meri kot izbrani posamezni bisfenoli pri enakih koncentracijah.



## 6. ZAKLJUČKI

### 6.1 Potrditev/zavrnitev hipotez

**HIPOTEZA 1: Potrošniki niso ozaveščeni o vplivu BPA in njegovih analogov in kompleksnih mešanic na zdravje. HIPOTEZA POTRJENA.**

To hipotezo sem potrdila, saj so dobljeni rezultati ankete (večinska populacija: mladi do 29 let) pokazali, da je večina anketirancev slabo ozaveščena, oznak za vsebnost bisfenolov ne poznajo, o bisfenolu A in njegovih analogih še niso slišali nikoli, ne poznajo kratic za analoge in se skupno strinjajo, da prebivalstvo ni dovolj seznanjeno o bisfenolih in njihovem vplivu na človeka.

**HIPOTEZA 2: Potrošnikov ne zanima sestava embalaže, v kateri kupujejo oziroma hranijo prehranske izdelke. HIPOTEZA POTRJENA.**

To hipotezo sem potrdila, saj so dobljeni rezultati ankete (večinska populacija: mladi do 29 let) pokazali, da čeprav večina anketirancev kupuje vodo v plastenki večkrat na teden in se zavedajo, da plastična embalaža izloča najrazličnejše kemijske spojine v okolje in hrano, materialov, iz katerih je proizvedena embalaža, ne preverijo. Tudi ozaveščenost o oznakah za vsebnost bisfenolov je slaba. Oznak ne poznajo in jih ne prepoznavajo.

**HIPOTEZA 3: BPA, njegovi izbrani analogi ter njihove kompleksne mešanice vplivajo na rast, površino in premer sferoidov. HIPOTEZA DELNO POTRJENA, DELNO ZAVRNJENA.**

To hipotezo delno potrjujem in delno zavračam. Potrjujem jo, saj prisotnost BPA in BPAP vpliva na rast, površino in premer sferoidov. In sicer, pri obeh bisfenolih se je kot rezultat poskusa zmanjšala površina sferoida. Pri BPA je bila ta sprememba opazna šele pri najvišji koncentraciji,  $160\mu\text{M}$ , medtem ko so pri BPAP spremembe bile prisotne že pri koncentraciji  $120\mu\text{M}$  in so do najvišje koncentracije še bolj naraščale.

Zavračam jo, saj prisotnost BPC ne vpliva na rast, površino in premer sferoidov. In sicer, pri poskusu bisfenola C niso bile izmerjene nobene spremembe. Tudi pri opazovanju vpliva kompleksnih mešanic bisfenolov (BPA + BPC, BPA + BPAP in BPA + BPC + BPAP) nisem opazila nobenih razlik.

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

**HIPOTEZA 4: BPA in njegovi izbrani analogi ter njihove mešanice vplivajo na živost celic v sferoidu. HIPOTEZA DELNO POTRJENA, DELNO ZAVRNJENA.**

To hipotezo delno potrjujem in delno zavračam. Potrjujem jo, saj prisotnost BPA in BPAP vpliva na živost celic v sferoidu. In sicer, pri obeh bisfenolih se je kot rezultat poskusa živost zmanjšala. Pri BPA je bila ta sprememba opazna šele pri drugi najvišji in najvišji koncentraciji, 140 in 160  $\mu\text{M}$ , medtem ko so pri BPAP spremembe bile prisotne že pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  in so do najvišje koncentracije še bolj naraščale. Tudi prisotnost kombinacije BPA + BPAP vpliva na živost celic v sferoidu, vendar le pri najvišji koncentraciji 80  $\mu\text{M}$ , je pa ta koncentracija še zmeraj nižja kot pri posameznih. Citotoksično delovanje sem opazila tudi pri kombinaciji vseh treh bisfenolov BPA + BPC + BPAP pri edini testirani koncentraciji 40  $\mu\text{M}$ .

Zavračam jo, saj prisotnost BPC ne vpliva na živost celic v sferoidu. Rezultati so pokazali, da BPC po 24-urni izpostavitvi ni deloval citotoksično na celice sferoidov pri nobeni izmed testiranih koncentracij. Tudi prisotnost kombinacije BPA + BPC ni delovala citotoksično na celice sferoidov pri nobeni izmed testiranih koncentracij.

**HIPOTEZA 5: Kompleksne mešanice bisfenolov vplivajo na živost celic v sferoidu pri nižjih koncentracijah kot samostojni bisfenoli. HIPOTEZA POTRJENA.**

Hipotezo potrjujem, saj so rezultati poskusa pokazali, da mešanice bisfenolov vplivajo na živost sferoidov pri nižjih koncentracijah 40  $\mu\text{M}$  v primerjavi z izbranimi posameznimi bisfenoli, kjer se učinek pojavi pri višjih koncentracijah. Tako lahko sklepamo, da so kompleksne mešanice bolj nevarne od posameznih bisfenolov.

## **6.2 Sklepi in komentarji**

Ugotovila sem, da je izpostavljenost bisfenolov problem na svetovni ravni, ki je velikokrat spregledan. Bisfenoli se v naravi nahajajo predvsem v kompleksnih mešanicah in so prisotni vsepovsod okrog nas in vsakodnevno vstopajo v naše telo. Zaskrbljujoča pa ni le njihova razširjenost, temveč tudi nevednost potrošnikov.

Moji poskusi so dokazali, da bisfenol A in njegovi analogi ter kompleksne mešanice delujejo citotoksično, kar lahko potencialno vpliva na zdravje ljudi, glede na to, da smo s temi spojinami

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

ves čas v stiku. Dokazala sem tudi, da imajo kompleksne mešanice še večji učinek kot posamezni bisfenoli, kar je še posebej zaskrbljujoče. Zdi se mi zelo pomembno, da bi se o tej temi ozaveščalo in raziskovalo še več, saj bomo le tako naredili naš življenjski prostor človeku in drugim organizmom bolj prijazen.

Raziskovanje te tematike mi je razširilo obzorje in me je podrobneje seznanilo s problematiko bisfenolov. Za možnost raziskovanja v laboratoriju od NIB-a sem hvaležna, saj sem prvič lahko uporabljala bolj napredno tehnologijo in metode, kot nam omogoča šolski laboratorij. Spoznala sem delovanje veliko novih naprav kot so: centrifuga, spektrofluorometer, pipete, rastna komora, laminarij itd. Naučila sem se številne nove tehnike kot so: delo z celičnimi kulturami, presajevanje celic, štetje celic, priprava enostavnih 3D modelov, MTS test, mikroskopiranje, katere mi bodo sigurno pripomogle pri raziskovalnem delu v prihodnosti. Izkušnja dela v pravem laboratoriju s pravimi znanstveniki me je obogatila z obilico novega znanja in izkušenj.

Možnosti nadaljnjih raziskav je veliko, od preučevanja večih analogov, večih kombinacij, preučevanja neželenih učinkov z drugimi testi (na primer: kometni test, s katerim gledamo poškodbe na DNK verigi), do iskanja možnih rešitev za spopadanje s problematiko izpostavljenosti in razširjenosti bisfenolov.

## VIRI

### Viri literature

1. Abcam.(2022). Protocol for MTS Assay. Pridobljeno: 7. 2. 2020. <https://www.abcam.com/mts-assay-kit-cell-proliferation-colorimetric-ab197010.html>
2. Chemspider. (2022). Bisfenol AP. Pridobljeno: 7. 2. 2020. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.541979.html>
3. Cof, T. (2013). *Merjenje citotoksičnosti s pomočjo primarnih osteogenih celičnih kultur* [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, str. 17]. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=123385>
4. Farmaceutski terminološki slovar. (2011). Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU, str. 35.
5. Goršek, K. (2012). *Vpliv bisfenola A in njegovih analogov na diferenciacijo dendritičnih celic pripravljenih iz monocitov* [Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, str. 3, 6-13, 43]. [https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Gorsek\\_Katja\\_dipl\\_nal\\_2012.pdf](https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Gorsek_Katja_dipl_nal_2012.pdf)
6. Leon Earl Gray, Jr, Johnathan R Furr, Justin M Conley, Christy S Lambright, Nicola Evans, Mary C Cardon, Vickie S Wilson, Paul M Foster, Phillip C Hartig . (2019). A Conflicted Tale of Two Novel AR Antagonists In Vitro and In Vivo: Pyrifluquinazon Versus Bisphenol C, *Toxicological Sciences*, Volume 168, Issue 2, Pages 632–643, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz010>
7. Hercog, K. (2021). *The genotoxic potential of cyanobacterial toxins, bisphenol A, its analogues, and their mixtures* [Doktorsko delo, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, str. 7-15]. <https://plus.si.cobiss.net/opac7/bib/32993795>
8. Kač, L. (2018). *Citotoksično in genotoksično delovanje bisfenolov A, S, F in AF ter njihovih mešanic v celični liniji HEPG2* [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, str. 2-13]. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=120256>
9. Kvas, T. (2021). Alfa in Betta, blog o akvaristiki, naravnih okoljih in živalih: Plastika. Pridobljeno: 8. 2. 2022. <https://www.alfa-in-betta.com/443632725>
10. Lucarini, F., Krasniqi, T., Bailat Rosset, G., Roth, N., Hopf, N.B., Broillet, M.-C., Staedler, D.(2020). *Exposure to New Emerging Bisphenols Among Young Children in Switzerland*, in: *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG, p. 4793. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134793>
11. Ogorevc, N. (2019). Kaj zares pomeni »BPA free« na plastenkah za vodo? Pridobljeno: 8. 2. 2022. <https://www.spoznajprehrano.com/post/2017/06/23/kaj-zares-pomeni-bpa-free-na-plastenkah-za-vodo>
12. Program Obzorje. (2020). Bisfenoli: Kaj morate vedeti? Pridobljeno: 8. 2. <https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/bisfenoli.pdf>
13. Pubchem. (2005) Bisphenol A. Pridobljeno: 31. 1. 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bisphenol-A>

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

14. Pubchem. (2009). Bisphenol C. Pridobljeno: 31. 1. 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-C>
15. Slovenski medicinski slovar.(2022).Analog. Pridobljeno: 31. 1. 2022. <https://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5505679/analog?query=analog&SearchIn=All>
16. Štampar, M. (2021). *Development of novel 3D in vitro cell models for genotoxicity assessment* [Doktorsko delo, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, str. 2-3, 7, 9]. <https://dirros.openscience.si/lzpisGradiva.php?id=13713>
17. Štampar, M.; Tomc, J.; Filipič, M.; Žegura, B.(2019). *Development of in Vitro 3D Cell Model from Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line and Its Application for Genotoxicity Testing*. *Arch. Toxicol.* 93 (11), 3321–3333. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02576-6>.
18. Willett, Peter; Barnard, John M.; Downs, Geoffrey M. (1998). *Chemical Similarity Searching*. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 38 (6): 983–996. *CiteSeerX* 10.1.1.453.1788. doi:10.1021/ci9800211.
19. Žabkar, S. (2020). *Jetrni 3D celični modeli za zaznavanje genotoksičnega delovanja kemikalij* [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, str. 3-4, 12-13]. <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=124063&lang=slv>

## Viri slik

Slika 1: Oznaka na embalaži, ki je proizvedene iz polikarbonatne plastike. Pridobljeno: 29. 1. 2022. <https://www.change.org/p/the-food-and-drug-administration-stop-the-use-of-all-bpa-in-every-product>.

Slika 2: Skeletna formula bisfenola A. Pridobljeno: 31. 1. 2022. [https://fi.wikipedia.org/wiki/Bisfenoli\\_A](https://fi.wikipedia.org/wiki/Bisfenoli_A).

Slika 3: Preglednica povzetka dnevne izpostavljenosti BPA štirih starostnih skupin. Pridobljeno: 31. 1. 2022. [https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Gorsek\\_Katja\\_dipl\\_nal\\_2012.pdf](https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Gorsek_Katja_dipl_nal_2012.pdf).

Slika 4: Skeletna formula bisfenola C. Pridobljeno: 31. 1. 2022. [https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Bisphenol\\_C.svg](https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Bisphenol_C.svg)

Slika 5: Skeletna formula bisfenola AP. Pridobljeno: 31. 1. 2022. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bisphenol\\_AP.PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bisphenol_AP.PNG)

Slika 6: Proces postopka izvajanja laboratorijske vaje. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 7: Na slikah so prikazane laboratorijske aparature, prva je centrifuga, na drugi sliki je mikroskop na tretji pa spektrofotometer. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 8: Na sliki je prikazano delo v laminariju. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 9: Inkubator ali rastna komora. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 10: Laboratorijski pripomočki. Arhiv Štampar, N. (2022).

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

Slika 11: Celična linija HepG2. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 12: Proces presajanja celic. Najprej celice požanjemo, nato jih centrifugiramo, razbijemo z iglo na posamezne celice in jih preštejemo na hemocitometru. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 13: Proces štetja celic. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 14: Proces priprave 3D celičnih modelov- sferoidov. Najprej celice požanjemo, nato jih preštejejo, zamešamo z medijem in metilcelulozo ter centrifugiramo. Po centrifugiranju nastanejo sferoidi. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 15: Mikroskopska slika po 10 x povečavo sferoida takoj po centrifugiranju (levo) in po 72h inkubacije/rasti (desno). Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 16: Proces opazovanja vpliva bisfenola A in njegovih analogov ter mešanic na rast in površino sferoidov. Arhiv Štampar, N. (2022).

Slika 17: Prikaz procesa določanja živosti celic v sferoidih po izpostavitvi bisfenolom z MTS testom. Sferoide najprej tretiramo za 24 h, nato zamešamo MTS test in ga dodamo k vsakemu sferoidu. Reakcijo, ki poteče, izmerimo na spektrofotometru. Arhiv Štampar, N. (2022).

## PRILOGE

### ANKETNI VPRAŠALNIK

1. Spol:
  - a) ženska,
  - b) moški,
  - c) se ne želim opredeliti.
2. Izberi, v katero starostno skupino spadaš:
  - a) do 18 let,
  - b) od 19 do 29 let,
  - c) od 30 do 50 let,
  - č) nad 50 let.
3. Kakšna je tvoja izobrazba?
  - a) Nedokončana OŠ,
  - b) dokončana OŠ,
  - c) nižje in srednje poklicno izobraževanje (2 in 3-letno) ,
  - d) gimnazijsko, srednje poklicno -tehniško izobraževanje, srednje tehniško oziroma drugo strokovno izobraževanje višješolski program,
  - e) visokošolski strokovni in univerzitetni program (1. bolonjska stopnja),
  - f) magisterij stroke (2. bolonjska stopnja),
  - g) znanstveni magisterij,
  - h) doktorat znanosti.
4. V kateri regiji Slovenije stanuješ?
  - a) Pomurska regija,
  - b) podravska regija,
  - c) koroška regija,
  - d) savinjska regija,
  - e) posavska regija,
  - f) zasavska regija,

Štampar, N. (2022): Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje, raziskovalna naloga

- g) jugovzhodna regija,
- h) osrednjeslovenska regija,
- i) gorenjska regija,
- j) goriška regija,
- k) primorsko-notranjska regija,
- l) obalno-kraška.

Vsebinska vprašanja

1. Kako pogosto kupite hrano in pijačo v plastični embalaži (npr. plastenke za vodo)?
  - a) Nikoli,
  - b) manj kot enkrat na teden,
  - c) enkrat na teden,
  - d) večkrat na teden,
  - e) enkrat na dan,
  - f) večkrat na dan.
2. Ali pred uporabo/nakupom preverite, iz česa je proizvedena plastična embalaža ter kaj vsebuje?
  - a) Da,
  - b) ne.
3. Ali ste seznanjeni s tem, da plastična embalaža izloča najrazličnejše kemijske spojine v okolje/hrano itd.?
  - a) Da,
  - b) Ne.
5. Ali ste že slišali za bisfenol A? (BPA)
  - a) Da,
  - b) ne.
6. Ali veste kako pogosto smo izpostavljeni bisfenolom?
  - a) Nikoli,
  - b) redko,
  - c) vsakodnevno.



7. Kje vse lahko najdemo bisfenol A? Navedite.

---

8. Ali ste slišali za analoge bisfenola A?

- a) Da,
- b) ne.

9. Kateri so analogi bisfenola A?

- a) BPC, BPAF, BPF, BPFL.
- b) APC, AAPF, ABF, PBAF.
- c) Ne vem.

10. Ali ste že slišali za *BPA free* plastenke/plastiko/embalažo?

- a) Da,
- b) ne.

11. Kako vemo, da je posoda/embalaža izdelana iz polikarbonata( bisfenolov) ali/in ima epoksidno oblogo?

- a) Na embalaži je oznaka #7 znotraj trikotnika.
- b) Na embalaži je oznaka BPA free.
- c) Na embalaži je moder krog s prečrtanim P-jem.

12. Kako lahko zmanjšamo izpostavljenost bisfenolu A in njegovim analogom?

- a) Izogibamo se gretju hrane in pijače, shranjene v plastični embalaži, v mikrovalovni pečici.
- b) Zmanjšamo količino uporabljenih konzerviranih živil v pločevinkah.
- c) Uporabljamo sveža živila.
- d) Zmanjšamo količino posode iz stekla, porcelana ali nerjavečega jekla, še posebno za shranjevanje vroče hrane in pijače.
- e) Izbiramo le otroške steklenice z dodatkom bisfenola A.

13. Ali menite, da ste dovolj seznanjenih o bisfenolih in njihovih vplivih na človeka?

- a) Da,
- b) ne.